

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES Centre de Biophysique Moléculaire



Marylène BERTRAND

soutenue le : 29 juin 2009

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université d'Orléans

Discipline/ Spécialité : Chimie

Origine exogène des acides aminés prébiotiques

THÈSE dirigée par : Dr. Frances WESTALL	Directrice de recherche, CNRS
RAPPORTEURS : Dr. Louis D'HENDECOURT Pr. Patrick CHAIMBAULT	Directeur de recherche, CNRS Professeur, Université de Metz
JURY	
Pr. Luc MORIN-ALLORY	Professeur, Université d'Orléans Président du jury
Pr. Patrick CHAIMBAULT	Professeur, Université de Metz
Dr. Louis D'HENDECOURT	Directeur de recherche, CNRS
Dr. Hervé COTTIN	Maitre de conférences, Université Paris 12
Dr. Frances WESTALL	Directrice de recherche, CNRS

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier M. Jean Claude Beloeil, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire pour avoir autorisé mon inscription en thèse et pour son soutien.

Par ordre chronologique, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères

- à M. Trudelle, pour m'avoir initié à la recherche et m'avoir donné envie de faire ce métier (et aussi pour la petite chanson de Brassens qu'il fredonnait souvent).

 - à M. Brack, pour son travail dans le domaine de l'Exobiologie, pour l'enseignement et les précieux conseils qu'il m'a prodigués durant nos fructueuses années de collaboration.

Bien sûr, ma Directrice de thèse, Frances Westall, à droit à mes plus chaleureux remerciements. Non seulement, elle m'a plus qu'encouragée à me lancer dans cette aventure, mais elle a su, au cours de ces dernières années, en m'accordant une totale confiance, repousser mes limites et me montrer le chemin à suivre.

Pour son soutien moral et pour son importante et précieuse contribution, concernant notamment la préparation des échantillons des expériences EXPOSE, Annie Chabin a droit à mes chaleureux remerciements.

La chambre d'irradiation n'aurait pas vu le jour sans le précieux concours de Laurent Thirkell et de Benoit Couté du LPC2E : merci pour leur apport en mécanique, physique et optique; un grand merci aussi à Martial Bruno et Justo Torres pour leur aide technique pour les ajustements des porte-échantillons et à Michel Loncle pour m'avoir initiée à la soudure.

Les expériences spatiales EXPOSE n'auraient pu être menées à bien sans l'organisation et l'efficacité irréprochables de Hervé Cottin, PI des expériences, de Michel Viso et des soutiens financiers et humains du CNES, de l'ESA et du DLR de Cologne.

Pour les expériences d'impact, je tiens à remercier Sjerry Van der Gaast qui nous a fourni la saponite ainsi que Fred Hörz, Gérard Haynes et Faith Vilas, qui nous ont permis d'effectuer les simulations d'impact au Nasa-Johnson Space Center de Houston. Une pensée est adressée tout particulièrement à Gérard Haynes, décédé cette année.

Je remercie aussi tout particulièrement les rapporteurs Patrick Chaimbault et Louis d'Hendecourt, ainsi que les membres de jury Hervé Cottin et Luc Morin-Allory pour avoir accepté de juger ce travail.

Bien sûr, tous les membres passés et présents de l'équipe d'Exobiologie et du CBM ont contribué à la réussite des études décrites ici. Ils ont aussi apporté cette dimension humaine si nécessaire : ma reconnaissance pour leur soutien moral et affectif se porte particulièrement envers mes collègues et amies qui se reconnaitront.

Enfin, je tiens à associer à mes remerciements, ma famille sans laquelle rien n'aurait été possible : le goût de l'effort et la persévérance sont des qualités qui m'ont été transmises par mes parents et qui m'ont été particulièrement précieuses ces derniers mois ; mon amoureuse reconnaissance va à mon mari pour avoir pris soin de la maison et de nos trois enfants les nombreux week-ends de rédaction de ce manuscrit ; à mes enfants pour m'avoir fait découvrir une autre dimension de l'origine de la vie et apporter la preuve de ce que concluait Oparine dans « l'origine et l'évolution de la vie »:

« La grande voie du progrès humain n'est plus maintenant le développement biologique de la personne humaine individuelle, mais le perfectionnement de sa vie sociale ».

INTRODUCTION

I.GENERALITES

- 1.1 L'histoire de la Terre
- 1.2 Chimie prébiotique
- 1.3 Les molécules du vivant
- 1.4 Les acides aminés
- 1.5 Origine des molécules du vivant et des acides aminés
 - 1.5.1 Origine endogène
 - 1.5.1.1 L'atmosphère
 - 1.5.1.2 Les sources hydrothermales
 - 1.5.2 Origine exogène

1.6 Hypothèse de travail

II. METHODES D'EXTRACTION ET METHODES D'ANALYSE DES ACIDES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

2.1 Méthodes d'extraction des acides aminés

- 2.1.1 Généralités sur les méthodes d'extraction des acides aminés
- 2.1.2 Essais d'extraction des acides aminés
- 2.1.3 Résultats des essais de désorption
- 2.1.4 Discussion des essais de désorption

2.2 Analyse des acides aminés

- **2.2.1** Généralités sur la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)
 - 2.2.1.1 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)
 - 2.2.1.2 Gaz
 - 2.2.1.3 Injecteur
 - 2.2.1.4 Colonne
 - 2.2.1.5 Détecteur

2.2.2 Généralités sur l'analyse des acides aminés

- 2.2.2.1 Historique
- 2.2.2.2 Fonctionnalisation, fonctionnalisation des acides aminés
- 2.2.2.3 Analyse des acides aminés par chromatographie liquide
- 2.2.2.4 Analyse des acides aminés par chromatographie gazeuse
- 2.2.2.5 Analyse d'énantiomères d'acides aminés
- 2.2.2.6 Synthèse des références bibliographiques

2.3 Objectifs

2.4 Méthodes d'analyse non chirale

- 2.4.1 Optimisation des méthodes avec les chloroformiates d'alkyle
- 2.4.2 Résultats des méthodes d'analyse non chirale
 - 2.4.2.1 Modes opératoires des fonctionnalisations
 - 2.4.2.1.1 Mode opératoire avec les chloroformiates d'alkyles
 - 2.4.2.1.2 Mode opératoire avec le MTBSTFA
 - 2.4.2.2 Analyse des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester
 - 2.4.2.3 Analyse des dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl trifluoroethyl ester
 - 2.4.2.4 Analyse des dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl heptafluoro-butyl ester
 - 2.4.2.5 Analyse des dérivés *N*(*O*,*S*)-methoxycarbonyl ethyl ester
 - 2.4.2.6 Analyse des dérivés *N*(*O*,*S*)-methoxycarbonyl trifluoroethyl ester
 - 2.4.2.7 Analyse de dérivés silylés
- 2.4.3 Interprétation des spectres de masse
 - 2.4.3.1 Pour les dérivés avec les chloroformiates d'alkyle
 - 2.4.3.2 Pour les dérivés silylés
- 2.4.4 Discussion sur les méthodes d'analyse non chirale

2.5 Méthodes d'analyse chirale

- 2.5.1 Résultats des méthodes d'analyse chirale
 - 2.5.1.1 Mode opératoire des fonctionnalisations
 - 2.5.1.2 Analyse de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester

2.5.1.3 Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl 2chloropropyl ester

- 2.5.2 Discussion des méthodes d'analyse chirale
- 2.5.3 Validation des méthodes d'analyse

2.6 Conclusion des méthodes d'analyse

III. IRRADIATION D'ACIDES AMINES DANS LES CONDITIONS DE L'ESPACE

3.1. Généralités

- 3.1.1 Le rayonnement ultra-violet (UV)
- **3.1.2** Irradiation dans l'ultra violet (UV)
- **3.1.3** Irradiation d'acides aminés sous forme de films solides

3.2. Présentation des expériences

3.2.1 Expériences spatiales à bord de la station spatiale internationale

- 3.2.2 Expérience Process d'EXPOSE-Eutef
- 3.2.3 Expérience Amino d'EXPOSE-R
- 3.2.4 Expériences au sol au DLR
- 3.2.5 Expériences au CBM

3.3. Calcul de flux

3.4. Dépôt des échantillons

3.5. Préparation des échantillons

3.6. Extraction et analyse des échantillons après irradiation

- 3.6.1 Extraction
- 3.6.2 Fonctionnalisation
- 3.6.3 Analyse chromatographique
- **3.6.4** Analyse quantitative non chirale
- 3.6.5 Analyse quantitative chirale

3.7 Résultats obtenus au sol

- 3.7.1 Résultats obtenus au DLR
- 3.7.2 Résultats obtenus au CBM

3.8 Discussion

3.9 Conclusions, perspectives des expériences d'irradiation

IV. EFFET SUR LES ACIDES AMINES D'IMPACTS METEORITIQUES SIMULES EN LABORATOIRE

4.1 Généralités sur les impacts météoritiques par simulation

4.2 Présentation de l'expérience

4.2.1 Choix des acides aminés

4.2.2 Choix de la surface minérale

4.3 Préparation des échantillons

4.3.1 Préparation de l'argile

4.3.2 Préparation des échantillons

4.4 Le laboratoire de simulation d'impacts météoritiques

4.5 Extraction et analyse des composés après impact

- 4.5.1 Extraction des acides aminés et dipeptide
- 4.5.2 Fonctionnalisation des acides aminés et peptide
- 4.5.3 Analyse chromatographique
- **4.5.4** Analyse quantitative non chirale des composés
- 4.5.5 Analyse quantitative chirale des composés

4.6 Résultats obtenus

- 4.6.1 Volatilisation
- 4.6.2 Effet de la pression d'impact sur les acides aminés
- **4.6.3** Effet de la pression d'impact sur l'énantio-inversion (ou racémisation partielle)

4.7 Discussion

- 4.7.1 Volatilisation
- **4.7.2** Effet de la pression d'impact sur les acides aminés
- **4.7.3** Effet de la pression d'impact sur l'énantioinversion (ou racémisation partielle)

4.8 Conclusions sur les effets des impacts simulés en laboratoire

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

« La science ne doit pas s'inquiéter des conséquences philosophiques de ses travaux. Tant pis pour ceux dont les idées philosophiques ou politiques sont gênées par mes études ».

Louis Pasteur (1822-1895)

« Si je diffère de toi, loin de te léser, je t'augmente »

Antoine de Saint Exupéry (1900-1944)

INTRODUCTION

L'Exobiologie (appelée à présent Astrobiologie par les américains) est la science dont l'objet d'étude est l'origine de la vie, et son évolution sur Terre ainsi que sa distribution dans l'Univers. Elle s'attache à comprendre les facteurs et les processus (géochimiques, chimiques, biochimiques, biologiques) qui peuvent mener à l'apparition de la vie et contrôler son évolution. Elle s'applique aussi bien à l'étude de l'émergence de la vie sur terre, il y a environ 4 milliards d'années, qu'à la recherche de vie ou de traces de vie dans le système solaire et dans l'Univers. Elle cherche à déterminer les processus qui ont permis l'évolution du vivant tel que nous le connaissons aujourd'hui ; elle englobe la recherche d'éventuelles possibilités de vie sur d'autres astres dont les environnements sont radicalement différents du nôtre.

Cette science fait appel à de nombreuses disciplines : astrophysique, astronomie, climatologie et sciences de l'atmosphère, géologie, géochimie et géophysique, chimie, biologie et paléontologie.

Toutes ces sciences possèdent des objets d'étude très variés qui vont de l'atome jusqu'aux êtres vivants complexes. Aussi, ce sont les phénomènes qui ont permis la complexification des systèmes que nous cherchons à mieux appréhender à travers l'Exobiologie.

Cette science touche aussi à une autre discipline. Car, si elle est essentiellement tournée vers la connaissance de l'évolution des systèmes : atomes en molécules, molécules en cellules, cellules en organismes complexes, elle force aussi à se poser la question : pourquoi cette complexification des systèmes et dans quel but ? Question plus philosophique qui ne sera nullement abordée ici. Mais, il est cependant nécessaire d'énoncer que les découvertes liée à l'Exobiologie ont permis une évolution intellectuelle sans précédent des concepts et des mentalités ; leur portée s'inscrit donc bien au-delà du seul aspect scientifique de par les réponses qu'elles apportent.

Durant les dernières décennies, cette science a permis une profonde mutation des concepts : la Terre était autrefois considérée comme le centre de l'Univers, Jacques

Monod, posait en 1970 la question : «Sommes-nous le fruit du hasard ou de la nécessité ? »

Les astrophysiciens ont, à présent, découvert de nombreuses planètes en dehors du système solaire, les scientifiques sont à la recherche de vie ou de traces de vie sur d'autres planètes et les agences spatiales financent des projets à l'écoute de l'espace et à la recherche d'intelligences extraterrestres...Quelles évolutions intellectuelles et par là même, philosophiques !

Ce travail n'entend pas révolutionner les concepts mais apporter une petite pierre à l'édifice. Il s'inscrit dans l'hypothèse qui prévaut aujourd'hui concernant l'origine exogène de la matière organique et cherche à mieux en appréhender les limites. Il s'est essentiellement focalisé sur l'évolution de la matière organique au sein de météorites lors de leur transport dans l'espace et lors de l'impact à l'arrivée sur Terre. Cette étude se situe donc bien avant l'apparition du vivant ; elle tente d'apporter quelques éléments de réponse à la question :

Dans quelles conditions les molécules organiques synthétisées dans l'espace, ontelles pu contribuer à l'émergence de la vie sur Terre par l'apport des météorites ou des micrométéorites, il y a environ quatre milliards d'années ?

Ce travail étudie deux phénomènes pour répondre à cette question :

- l'effet de rayonnements VUV sur les molécules organiques : deux expériences sur la station spatiale internationale et des expériences au sol simulant les conditions de l'espace sont décrites.
- L'effet d'impacts météoritiques sur les molécules organiques : des expériences de simulation d'impacts sur la matière organique sont exposées.

Bien qu'une grande diversité de molécules organiques ait été détectée dans les météorites, nous avons choisi d'étudier en priorité les acides aminés, éléments constitutifs des protéines, constituants essentiels à tous les organismes vivants. Cette famille de molécules d'intérêt prébiotique offre, de plus, une grande diversité de groupements fonctionnels.

Et, comme l'aspect technique conditionne bien souvent l'avancée scientifique, il me semblait nécessaire de me doter des meilleurs outils. Un chapitre de ce manuscrit sera donc consacré à cet aspect et étudie les fonctionnalisations et les méthodes d'analyses des acides aminés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS : Gas Chromatography - Mass Spectrometry).

I- GENERALITES

L'exo/astrobiologie est une science toute récente puisque ce n'est qu'au XX^{ème} siècle que les scientifiques ont commencé à voir puis à explorer les différentes formes de vie bactériennes qui existent sur la Terre et envisagé la possibilité que la vie puisse exister ailleurs dans l'Univers. C'est tout d'abord la littérature, à travers la science fiction, qui a ouvert la voie à cette science. Bien que l'évolution biologique date du XIX^{ème} siècle, ce n'est que dans les années 1920 qu'Alexandre Oparin (1894-1980) et John Burdon Sanderson Haldane (1892-1964) développent le concept de soupe primitive et préconisent chacun que la matière vivante n'a pu être engendrée qu'à la suite d'une longue évolution chimique de la matière ; proposant ainsi le concept d'évolution chimique précurseur à l'évolution biologique développée par Charles Darwin (1809-1882) et Alfred Russel Wallace (1823-1913). Les livres suivants ont servi de support à cette introduction : (Brack 1998; Gargaud *et al.* 2005; Gargaud *et al.* 2006).

1.1 L'histoire de la Terre

Il y a plus de 4,56 milliards d'années, l'effondrement d'un nuage interstellaire de gaz et de poussières sur lui-même a donné lieu à la formation de notre système solaire. En son centre, s'est formé le soleil et à la périphérie, les poussières et les grains de glace vaporisés se sont agrégés pour former des planétésimaux rocheux ou gazeux. Les composés les plus lourds se sont condensés pour former les planètes telluriques dont notre Terre fait partie.

On établit la formation de la Terre à 4,56 milliards d'années.

La période précambrienne, qui couvre 85 % des temps géologiques, est paradoxalement la période la moins bien connue de l'histoire de notre planète (*Figure 1*).

Le Précambrien a été découpé en trois grandes époques : l'Hadéen (de 4,5 milliards d'années à 4 milliards d'années), l'Archéen (de 4 milliards d'années à 2,5 milliards

d'années) et enfin le Protérozoïque, de 2,5 milliards d'années à 540 millions d'années (*Figure 1*).



Figure 1 : échelle chronologique d'apparition de la vie sur Terre.

Ce travail se situe donc à l'Hadéen, période pendant laquelle la Terre a subi un apport important de matière organique grâce à d'intenses bombardements avant que les molécules ne se soient associées et organisées pour donner lieu aux premiers systèmes vivants.

1.2 Chimie prébiotique

Les premières synthèses de molécules organiques ont été effectuées par des chimistes allemands au XIX^{ème} siècle : Friedrich Wöhler (1800-1882) effectue en 1828 la synthèse de l'urée, Adolph Kolbe (1818-1884) en 1845, celle de l'acide acétique, démontrant ainsi le passage de la matière minérale aux molécules du vivant en créant la chimie organique, la chimie des molécules du vivant. La chimie prébiotique, quant à elle, cherche à reproduire en laboratoire les molécules qui ont permis l'apparition du vivant, et ce, dans des conditions aussi proches que possible de celles qui régnaient sur la Terre primitive ; encore faut-il connaitre l'environnement de cette Terre primitive.

L'expérience de Miller-Urey, publiée dans Science en 1953, fut la première expérience de chimie prébiotique fructueuse. A cette époque, l'atmosphère de la Terre primitive était supposée être constituée de méthane, d'ammoniac, d'eau et d'hydrogène. Stanley L. Miller (1930-2007), sous la direction de son Directeur de

thèse Harold Urey (1893-1981, prix Nobel de chimie en 1934), soumit ce mélange gazeux à des arcs électriques simulant les éclairs d'un orage. L'expérience permettait une circulation continue des gaz grâce à des cycles de condensation et d'évaporation. Après 7 jours de fonctionnement, Stanley L. Miller obtint, au sein de ce mélange, des molécules organiques (acide cyanhydrique, formaldéhyde, acide urique) dont 2% étaient identifiés comme des acides aminés protéiques. La chimie prébiotique était née et ouvrait la voie à de nouvelles expériences.

Depuis les années 1960, de nombreux travaux essaient de reproduire en laboratoire la synthèse de nombreuses molécules biologiques dans les conditions de la Terre primitive, avec plus ou moins de succès. Des voies de synthèses prébiotiques ont été trouvées pour quasiment toutes les familles de macromolécules (protéines, lipides, bases des acides nucléiques) ou sont proches de l'être (sucres des acides nucléiques). Mais d'autres questions restent encore en suspens :

« Quelle a pu être la constitution de la (ou des) cellule(s) primitive(s) (encore appelée proto-cellules) ? Comment les molécules organiques se sont elles assemblées et / ou organisées pour former ces premières cellules ? ». Deux théories s'affrontent et se confrontent : celle de la formation des gènes en premier (le monde ARN) où l'ARN aurait catalysé toutes les réactions nécessaires à la survie et à la réplication de la (ou des) proto-cellule(s), et celle qui donne la priorité au métabolisme primordial (les protéines d'abord). Récemment, des théories mixtes où prône une coévolution de ces deux aspects ont été avancées.

1.3 Les molécules du vivant

Les molécules du vivant sont des molécules composées pour l'essentiel d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Ces quatre atomes constituent à eux seuls 96,6 % du monde animal et 98,7 % du monde végétal. Si l'on ajoute à ces quatre premiers éléments, les deux atomes soufre et phosphore alors les proportions atteignent 97,9 % du monde animal et 99,6 % du monde végétal.

Parmi les dizaines d'atomes présents sur Terre, ces quatre ou six atomes semblent suffisants pour avoir permis l'apparition du vivant. Toutefois, ces atomes peuvent donner à eux seuls des combinaisons de molécules et de macromolécules bien plus vastes que celles trouvées au sein du monde vivant.

Quatre grandes familles de macromolécules sont caractéristiques du vivant :

Les acides nucléiques : acides désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) qui stockent et transportent l'information génétique.

Les lipides et phospholipides qui permettent la compartimentation des cellules et favorisent un environnement différent à l'intérieur de la cellule par rapport à l'extérieur.

Les glucides qui permettent le stockage et sont source d'énergie pour les organismes. Ils se répartissent en deux groupes les oses (monosaccharides) et les osides (polysaccharides).

Les protéines catalysent les réactions et sont des éléments structuraux. Ces enchaînements d'acides aminés adoptent des structures bien définies grâce à l'établissement de liaisons de faible énergie (liaisons de Van der Waals et liaisons hydrogène). Seuls 20 acides aminés sont à l'origine des protéines du vivant, mais il existe des dizaines d'autres acides aminés dont certains ont été extraits et identifiés notamment dans les météorites carbonées.

1.4 Les acides aminés

Il existe 3 grandes familles d'acides aminés (Figure 2) (Brack 1993):

- Les acides aminés de type A : ce sont des α -acides aminés monosubstitués.
- Les acides aminés de type B : ce sont des ω-acides aminés.

Les acides aminés de type C : ce sont des α–acides aminés disubstitués.
Tous les acides aminés protéigues sont de type A.



Figure 2 : formules chimiques des 3 types d'acides aminés

1.5 Origine des molécules du vivant et des acides aminés

La chimie prébiotique se doit de respecter au plus près les conditions de la Terre primitive (température, composition de l'atmosphère, rayonnements, impacts). Au fur et à mesure que les modèles permettent d'affiner l'environnement de cette Terre primitive, les théories évoluent. Si au début du XX^{ème} siècle, on pouvait penser que l'atmosphère terrestre avait engendrée nombre de composés organiques suffisamment réactifs pour donner lieu, au contact de l'eau des océans, à une soupe primitive, précurseur des macromolécules du vivant, aujourd'hui c'est l'origine exogène de la matière organique qui prédomine.

1.5.1 Origine endogène

1.5.1.1 L'atmosphère

Selon les données actuelles, l'atmosphère primitive terrestre était principalement composée de CO₂ et non de CH₄ et n'aurait jamais contenu de proportions importantes de H₂. De ce fait, les processus atmosphériques sur lesquels reposent les travaux de Miller n'ont sans doute pas participé de façon exclusive à la formation de composés organiques sur la Terre primitive. Il n'est cependant pas à exclure qu'une chimie prébiotique particulière ait pu se développer dans des microenvironnements au sein desquels les conditions auraient pu être plus propices, avec une atmosphère réductrice où d'autres conditions particulières comme celles décrites par l'équipe de Robert Pascal (Boiteau *et al.* 2006; Danger *et al.* 2006; Pascal 2006).

La synthèse de molécules organiques sur Terre la plus plausible se situe actuellement au sein des sources hydrothermales situées au niveau des dorsales d'accrétion sous-marines.

1.5.1.2 Les sources hydrothermales

Ces sources hydrothermales présentent, en effet, un environnement réducteur favorable aux synthèses prébiotiques. Elles sont en effet riches en gaz carbonique, en hydrogène sulfuré et en sulfure de fer, composés essentiels selon la théorie développée par Günther Wächtershäuser, théorie selon laquelle les sulfures sont capables de transformer le gaz carbonique en présence d'hydrogène sulfuré, en longues molécules carbonées (Wächtershäuser 1990). Sa théorie a été démontrée en 1998 par la synthèse de peptides à partir d'acides aminés en présence de sulfures de fer et de nickel, de monoxyde de carbone et d'hydrogène sulfuré, à 100°C (Huber & Wachtershauser 1998).

Des modèles thermodynamiques et des simulations expérimentales confortent cette hypothèse puisque des composés d'intérêt prébiotique sont formés en présence d'eau liquide à haute température et forte pression (Hennet *et al.* 1992; Holm & Hennet 1992; Imai *et al.* 1999; Chen *et al.* 2007) ou avec des cycles d'hydratation-déshydratation (Ferris *et al.* 1996; Bertrand *et al.* 2001).

Au fur et à mesure que les modèles concernant la composition de l'atmosphère primitive s'affinent, il s'avère de plus en plus difficile de former de nombreux composés organiques en quantité importante avec une atmosphère oxydée, de même les sources hydrothermales n'ont pu à elles seules fournir la majeure partie du matériel organique présent sur Terre. Rien cependant dans l'environnement de la Terre, n'exclue le fait qu'une chimie particulière est pu se développer dans des microenvironnements. Mais depuis quelques décennies, une autre voie est apparue et semble être, à l'heure actuelle, la source de matière organique prédominante : l'importation par les météorites, micrométéorites et comètes.

1.5.2 Origine exogène

En effet, on trouve au sein des météorites dites « carbonées » une grande variété de molécules organiques, composés carbonés insaturés (composés polycycliques aromatiques, kérogènes ou fullerènes) mais aussi de nombreuses molécules organiques constitutives des briques du vivant : amines, acides carboxyliques, hétérocycles azotés, amides, alcools,... et même une multitude d'acides aminés, et

quelques dipeptides (Shimoyama & Ogasawara 2002; Pizzarello 2004; Pizzarello 2007). En effet, plusieurs dizaines d'acides aminés dont huit protéiques (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, acide aspartique et acide glutamique) ont été découverts dans la météorite de Murchison (Shimoyama & Ogasawara 2002). Les météorites carbonées peuvent contenir jusqu'à 5% de matière organique et certaines chondrites possèdent aussi un pourcentage non négligeable d'eau (jusqu'à 20%). Cependant, c'est après hydrolyse acide que la plus grande proportion des acides aminés est identifiée dans les météorites et seulement un acide aminé, l'acide isobutyrique, a été jusqu'à présent identifié dans des micrométéorites (Matrajt *et al.* 2004).

Sachant que la période hadéenne (il y a 4,55 à 4 milliards d'années), a donné lieu à des chutes de météorites et micrométéorites 1000 fois plus intenses qu'aujourd'hui, on estime les apports de matière organique extraterrestre vingt cinq mille fois plus importants que la quantité de carbone engagée actuellement dans la biomasse superficielle terrestre (Maurette 1998). De plus, cette source exogène de matière organique apporte avec elle une importante quantité de métaux sous forme de sulfures et d'oxydes qui ont pu servir de catalyseur à des réactions chimiques entre molécules prébiotiques (Maurette *et al.* 1995). Beaucoup de météorites ont préservé une composante rare (jusqu'à un 0,1%) de matière interstellaire présolaire plus ou moins altérée.

Quatre vingt dix neuf pour cent de la matière extraterrestre collectée par la Terre provient de grains de poussière de taille comprise entre 50 et 500 µm. Ces micrométéorites, contrairement aux météorites, sont presque exclusivement de type chondrite carbonée, riche en eau et en composés organiques : elles représentent de loin l'apport dominant de matière organique sur Terre.

Avant d'être capturés et d'arriver sur Terre, les petits corps du système solaire qui circulent dans le milieu interplanétaire (avec une vitesse moyenne de 30 km/s), doivent survivre à l'entrée dans l'atmosphère terrestre et à leur impact sur Terre. Suivant leur taille et leur composition, différents scénarios peuvent se produire :

- les gros bolides (d'environ 100 tonnes) sont freinés avec l'entrée atmosphérique et décomposés en météorites qui tombent alors sur Terre avec une vitesse d'environ 10 km/s.
- les corps de taille comprise entre le centimètre et le mètre peuvent perdre jusqu'à 90% de leur masse initiale par ablation lors de la décélération avec

l'atmosphère terrestre. L'échauffement provoque souvent un phénomène de boule de feu avec formation d'une croute de fusion. Le reste du matériau est préservé sous cette croute de fusion.

- Les particules extraterrestres plus petites, de dimensions comprises entre le millimètre et le centimètre, provoquent à leur entrée dans l'atmosphère terrestre un phénomène lumineux appelé « étoile filante ». Ces particules sont le plus souvent retrouvées sur Terre à l'état fondu.
- Les particules inférieures à 1 mm, sont ralenties à des altitudes plus élevées que celles des corps plus volumineux, dans des couches d'air moins denses où les ondes de chocs ne peuvent se propager, ce qui permet la survie sans dommage de la plupart de ces particules très friables.

1.6 <u>Hypothèse de travail</u>

Le travail présenté dans ce manuscrit, étudie l'hypothèse d'un apport exogène de la matière organique par les météorites et micrométéorites à la période hadéenne de l'histoire de la Terre (il y a 4,55 à 4 milliards d'années), bien avant que les molécules organiques au contact de l'eau des océans ne se soient assemblées et organisées pour donner lieu au vivant. Nous cherchons à connaître si les molécules organiques synthétisées dans l'espace interstellaire sont endommagées

par les rayonnements VUV subis au cours de leur transport
par l'impact météoritique à leur arrivée sur la Terre.

Deux projets ont été mis en œuvre pour étudier l'hypothèse de cet apport exogène :

- 1) l'irradiation dans les conditions de l'espace de molécules organiques : En effet, au cours de leur voyage dans l'espace, les molécules organiques encapsulées au sein de la matrice minérale de la météorite subissent les rayons cosmiques (flux de particules de haute énergie : protons, noyaux d'hélium, électrons, rayons gamma et neutrinos) ainsi que le rayonnement VUV solaire.

Plusieurs expériences ont été mises en œuvre pour comprendre l'effet du rayonnement VUV sur les molécules organiques et pour, ultérieurement, confronter les résultats obtenus dans l'espace avec ceux obtenus au sol. Ce manuscrit comporte :

- La préparation des deux expériences Process et Amino qui sont positionnées sur les modules EXPOSE-Eutef et EXPOSE-R de la station spatiale internationale (ISS)

- La description de trois expériences d'irradiation au sol (préparations et analyses), une au DLR (Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt) de Cologne où les échantillons ont été irradiés entre 200 et 400 nm, et deux au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans où les échantillons ont été irradiés entre 112 nm et 370 nm durant 14 jours.

- 2) L'effet des impacts météoritiques sur les molécules organiques :

La préparation et l'analyse d'expériences de simulation d'impacts réalisés au NASA-Johnson Space Center de Houston sont exposées. Des molécules organiques enrobées au sein d'une matrice d'argile ont subi des pressions de chocs comprises entre 15 et 28,9 GPa, ce qui correspond à des impacts de météorites terrestres de faible à moyenne intensité. La saponite, argile de type montmorillonite, ayant été identifiée au sein de météorites de type carboné, a été choisie comme matrice minérale pour cette étude.

Les molécules organiques choisies pour ce travail sont les acides aminés et les dipeptides suivants : glycine (Gly), alanine (Ala), acide amino isobutyrique (Aib), acide aminobutyrique (Abu), sérine (Ser), valine (Val), norvaline (NVal), tert-Leucine (tLeu), acide diamino propionique (DAPA), acide aspartique (Asp), cystéine (Cys) et les dipeptides dialanine (Ala₂) et dileucine (Leu₂) (*Figure 3*). Ils ont été sélectionnés pour leur intérêt prébiotique et pour la diversité de leurs groupements fonctionnels. Aib est le seul acide aminé de type C. Les autres acides aminés sont tous des α -acides aminés monosubstitués (type A), certains sont de nature protéiques (Gly, Ala, Ser, Val, Asp, Cys), d'autres non (Aib, Abu, NVal, tLeu, DAPA) (*Tableau 1*). Afin d'éviter des contaminations, les énantiomères D des acides aminés protéiques ont été choisis pour ces études. Il existe en effet moins de risque de contamination avec ces énantiomères D car ceux-ci sont rencontrés beaucoup plus rarement chez les êtres vivants. De plus, la racémisation d'un acide aminé dans l'eau en milieu acide ou neutre est extrêmement faible et négligeable sur la durée des expériences.



Figure 3 : Formules chimiques, abréviations et noms des acides aminés et des dipeptides

IMPACT	EXPOSE - E	EXPOSE - R	DLR	CBM IRRAD 1	CBM IRRAD 2
Gly	Chy	Chy	Chy	Chy	
D-Ala	D-Ala	D-Ala	D-Ala	D-Ala	
Aib Abu	Aib Abu	Aib Abu	Aib Abu	Aib Abu	
D-Ser D-Val	D-Ser	D-Ser D-Val			
NVal tLeu DAPA					
D-Asp	D-Asp	D-Asp	D-Asp	D-Asp	D-Asp
D-Cys					
D-(Ala) ₂	D-(Leu) ₂	D-(Leu) ₂	D-(Leu) ₂	D-(Leu) ₂	

protéiques non protéiques dipeptides

Tableau 1 : acides aminés et dipeptides étudiés au cours des différentesexpériences.

La deuxième partie de ce manuscrit décrit la mise au point de méthodes permettant l'analyse d'acides aminés et de dipeptides par chromatographie gazeuse. Ces méthodes ont été testées puis développées pour l'analyse quantitative d'acides aminés ainsi que pour l'identification de leurs produits de dégradation. Ces méthodes ont aussi été effectuées avec la perspective lointaine d'une spatialisation, c'est à dire qu'elles doivent être réalisables facilement par des automates, pour être embarquées à bord de satellites ou de robot d'exploration planétaire et consommatrices de peu d'énergie.

Plusieurs GC et GC-MS fonctionnent actuellement dans l'espace. Ces instruments ont d'abord été développés pour l'analyse de composés volatiles présents dans le milieu interstellaire ou dans l'atmosphère de planètes et de satellites explorés. Ce n'est qu'actuellement que la recherche de composés d'origine prébiotique (souvent plus polaires et moins volatiles) est envisagée. La chromatographie gazeuse a été préférée à la chromatographie liquide d'abord, parce que des versions spatialisées de ces instruments existent déjà et que le développement d'instrument pour la spatialisation est long, difficile et couteux, et d'autre part, parce que le transport et l'utilisation de gaz plutôt que de liquides s'avèrent plus faciles à réaliser en milieu d'apesanteur et de vide.

Les méthodes développées dans le cadre de cette étude ont ensuite servi à l'identification et à la quantification de composés pour les expériences d'irradiation et de simulation d'impact.

II. METHODES D'EXTRACTION, ET METHODES D'ANALYSE DES ACIDES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Avant de procéder à l'analyse des acides aminés, il est essentiel de vérifier que la quasi-totalité des acides aminés a été extraite de la matrice minérale à laquelle les acides aminés étaient associés. Aussi une première partie de ce chapitre est consacrée à l'extraction des acides aminés, la deuxième partie étant consacrée à leur analyse par GC-MS.

2.1. Méthodes d'extraction des acides aminés

L'étude bibliographique effectuée dans ce paragraphe concerne l'extraction des acides aminés dans les météorites, micrométéorites et au sein d'argiles : elle a servi de référence pour les premiers essais. Les essais que nous avons mis en œuvre ont rapidement été limités à deux surfaces minérales : les argiles et la poudre de météorite d'Allende. Compte tenu des écarts obtenus sur différentes argiles, nous avons choisi d'effectuer des tests sur un seul et unique type d'argile, la saponite, et d'utiliser le même lot pour tous les échantillons de l'expérience de simulation d'impact. De même, seule la poudre de météorite d'Allende a servi de matrice minérale pour toutes les expériences d'irradiation. Ces études nous ont permis d'identifier les méthodes d'extraction des acides aminés les plus adaptées et nous les avons utilisées avant de procéder à leurs analyses par GC-MS. Seuls les essais d'extraction des acides aminés les ici.

2.1.1. Généralités sur les méthodes d'extraction des acides aminés

Pour extraire la matière organique de météorites, micrométéorites ou d'argiles, une fraction soluble est extraite par un ou plusieurs solvants de polarités différentes (solvants aqueux et/ou organiques); une fraction dite insoluble est ensuite extraite de la matrice minérale par une ou plusieurs hydrolyses acides. Ces hydrolyses permettent de dissoudre les minéraux inorganiques y compris les carbonates et ainsi, de libérer la matière organique.

Ainsi, dans les publications suivantes, la matière organique a été extraite par :

 plusieurs extractions à l'eau à 100°C-110°C pendant 8 à 24 heures suivies ou non d'une ou plusieurs hydrolyses acides (Shock & Schulte 1990; Engel *et al.* 1995; Cronin & Pizzarello 1997; Pizzarello *et al.* 2003; Pizzarello *et al.* 2004; Pizzarello *et al.* 2008).

ou plus rarement,

- directement par une ou plusieurs hydrolyses acides.

Les hydrolyses acides sont effectuées (Stevenson & Cheng 1970; Cheng *et al.* 1975) :

- soit avec de l'acide chlorhydrique 5.6N, pendant 3 à 24 heures à 150°C.
- soit avec de l'acide fluorhydrique 5N dans l'acide chlorhydrique 0,1N, pendant 24 heures.
- soit avec les deux hydrolyses acides à la suite, notamment pour les échantillons calcaires.

Dans un premier temps, ces méthodes d'extraction ont été testées sur des échantillons tests contenant trois acides aminés (Gly, Ala et β -Ala) mais n'ont pas apporté les résultats attendus (environ 50% de perte pour chaque acide aminé). Aussi, avons-nous recherché d'autres méthodes plus efficaces.

2.1.2. Essais d'extraction des acides aminés

Différents essais de désorption des acides aminés de l'argile ont été réalisés préalablement afin de mettre au point la méthode à utiliser pour extraire les acides aminés des échantillons d'impact et procéder à leur analyse par GC-MS.

De nombreux essais ont été préalablement menés avec différents solvants de désorption: eau de 20°C à 100°C, solutions d'acide chlorhydrique (HCl 0,1N, HCl 1N, HCl 5,6 N), acide fluorhydrique (HF), mélanges de solutions aqueuses et organiques méthanol/eau, acétonitrile/eau en diverses proportions (de 20% à 100%); des essais ont été effectués avec 3 à 6 extractions, avec un solvant aqueux puis un solvant

organique. Grâce à ces analyses préliminaires, nous avons établi un protocole reproductible d'extraction et de traitement des échantillons.

Une seule expérience est présentée ici. Elle résume les différents essais qui ont été effectués préalablement avec un nombre plus ou moins grand d'acides aminés. Un étalon interne (parfois deux) a été ajouté à chaque échantillon afin de pouvoir comparer les différentes analyses. De plus, la reproductibilité des résultats obtenus ainsi que le temps d'analyse des expériences ont été améliorés grâce à l'installation sur la GC-MS d'un injecteur automatique.

Mode opératoire :

105 μ L de la solution mère (0,5 μ mole de chaque acide aminé) a été ajoutée à 175 mg d'argile afin de reproduire huit échantillons d'impact.

Ces échantillons ont été séchés sous un vide continu environ 12 heures puis laissés sous vide 60 heures. Les échantillons ont ensuite été désorbés avec trois fois 1 mL d'eau milliQ (essais 1 et 2), 1 mL d'HCl 1N (essais 3 et 4), 1 mL d'HCl 5,6N (essais 5 et 6), ou 1 mL de solution méthanol/eau 50/50 (essais 7 et 8).

Les trois désorbats ont été réunis puis 100 μ L de cette solution ont été prélevés, l'étalon interne à été ajouté (ici 1,666.10⁻² μ mole de leucine), puis les acides aminés ont été fonctionnalisés par 50 μ L d'éthanol dans la pyridine et 15 μ L d'éthylchloroformiate pour former des dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl ethyl ester (voir paragraphe suivant). Les dérivés ont été extraits par 100 μ L de chloroforme et 1 μ L de cette solution a été analysé par GC-MS.

2.1.3. Résultats des essais de désorption

- 1 et 2 : extraction à l'eau, 1h à 100°C.
- 3 et 4 : extraction à l'aide d'une solution d'HCl 0,2N, 1h à 100°C.
- 5 et 6 : extraction à l'aide d'une solution d'HCl 5,6N, 24 h à 100°C.
- 7 et 8 : extraction à l'aide d'une solution 50/50 méthanol/eau, à 25°C.

Les résultats obtenus sont présentés dans la *Figure 4* en fonction de la nature de l'acide aminé et dans la *Figure 5* en fonction du solvant d'extraction utilisé.



Figure 4 : Pourcentage d'acides aminés extraits analysés par GC-MS en fonction de la nature des acides aminés et selon les méthodes d'extraction.



Figure 5 : Pourcentage d'acides aminés extraits analysés par GC-MS en fonction des solvants d'extraction.

2.1.4. Discussion, conclusion des essais de désorption

Les résultats ci-dessus démontrent que l'extraction des acides aminés de l'argile est fonction de la nature de l'acide aminé et est très dépendante des solvants d'extraction utilisés.

Ainsi les extractions à l'eau (essais 1 et 2), permettent de recouvrer environ 60% des acides aminés à chaîne alkyl mais seulement 20 à 40% des autres acides aminés.

Les extractions à l'acide chlorhydrique (essais 3 à 6) sont bien meilleures pour les acides aminés à chaîne alkyl puisqu'elles permettent de recouvrer la quasi-totalité de ces derniers ; elles sont par contre moins performantes que l'eau pour certains composés tels que l'acide aspartique, le dialanine ou l'acide diaminopropionique.

Les extractions avec le mélange méthanol/eau (50/50) s'avèrent les plus performantes puisqu'elles permettent de recouvrer 94 à 100% de tous les acides aminés.

Le pH de l'eau pure à 100°C est de 6,14. A ce pH comme à pH 7, les acides aminés sont sous forme zwitterionique alors qu'ils sont sous forme cationique à pH acide en présence d'acide chlorhydrique (fonctions carboxyliques sous forme COOH et fonctions amines sous forme NH_3^+).

Lorsque le pH change, la charge apparente des acides aminés est modifiée ainsi que la force ionique du milieu.

Il est difficile de préciser de quelle manière les interactions entre les acides aminés et l'argile sont régies d'autant plus que l'argile utilisée dans le cadre de cette étude possède des silanols, sites échangeurs de cations, mais aussi des métaux, sites échangeurs d'anions. L'ajout de méthanol modifie la phase d'extraction : les charges des acides aminés sont moins exprimées mais les paires d'ions sont moins dissociables et elles peuvent être, de ce fait, plus fortes. Cependant, au vu des résultats obtenus, on constate que la désorption des acides aminés et peptide peu solubles dans l'eau (comme Asp et dialanine) gagne beaucoup à être effectué avec le mélange méthanol / eau : la solvatation de ces composés est ainsi facilitée par l'apport de méthanol.

De plus, la sérine et la cystéine oxydées par le traitement HCI, et la dialanine coupée en alanine en présence de HCI 5.6N à 100°C, restent intacts avec le mélange méthanol / eau.

Ce solvant d'extraction a donc été utilisé pour extraire les composés de l'argile.

A chaque modification de solution d'acides aminés, des essais préliminaires ont été effectués afin de vérifier que tous les composés utilisés étaient recouvrés dans leur quasi-totalité (pourcentage supérieur à 90%) et ce, avec une bonne reproductibilité des résultats obtenus.

Les expériences menées ont montré qu'une étude beaucoup plus approfondie aurait été nécessaire pour mieux comprendre et analyser les mécanismes d'extraction des acides aminés contenus dans les matrices météoritiques. La désorption quantitative par extraction hydro alcoolique au méthanol (50/50) des acides aminés d'intérêt étudiés a cependant permis de poursuivre nos objectifs analytiques.

2.2. Analyse des acides aminés

Dans notre équipe, l'analyse des acides aminés a, jusqu'en 2002, été effectuée par chromatographie liquide avec une détection UV grâce à une fonctionnalisation avant analyse à l'aide du FLEC (chloroformiate de fluorényléthyle), puis grâce à l'acquisition d'un GC-MS, par chromatographie gazeuse.

2.2.1. Généralités sur la chromatographie couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

La chromatographie est une technique permettant d'identifier (analyse qualitative) et/ou mesurer (analyse quantitative) une ou plusieurs espèces chimiques d'un échantillon. Ces espèces sont entraînées par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (silice, polymère, silice greffée...). Chaque espèce se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases (Rosset *et al.* 1991; Rouessac & Rouessac 2004).

2.2.1.1. Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG en français et GC en anglais) s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

Dans le cas d'une GC-MS le détecteur est un spectromètre de masse.

La Figure 6 présente le schéma d'une GC-MS



Figure 6 : Schéma d'une GC-MS

La GC-MS utilisée pour cette étude est un chromatographe de type 6890 couplé à un spectromètre de masse de type 5973, tous deux de marque Agilent.

2.2.1.2. <u>Gaz</u>

Dans cette étude, le gaz utilisé est de l'hélium en bouteille de qualité 6.0 (99.9999%) alphagaz 2 fourni par Air Liquide. La pression en tête de colonne est ajustée électroniquement à l'aide d'un EPC (electronic pressure control) afin que le débit de gaz reste constant quelle que soit la température du four. L'analyse est de ce fait plus rapide et la longévité des colonnes accrue.

2.2.1.3. Injecteur

L'échantillon peut être introduit grâce à une seringue manuellement ou grâce à un injecteur automatique.

Dans cette étude, deux modes d'injection ont été utilisés en fonction de la concentration des composés à analyser : le mode avec division et le mode sans division (encore appelés « split » ou « splitless »).

Dans le cas du mode sans division c'est la totalité de l'échantillon qui est introduit dans la colonne après vaporisation (cas des composés à faible concentration).

Dans le cas du mode avec division c'est une fraction de l'échantillon qui est introduit dans la colonne après vaporisation (cas des composés plus concentrés). La fraction de l'échantillon introduit peut aller de la moitié au 1/700^{ème}.

2.2.1.4. Colonne

Deux types de colonnes capillaires (composées d'un revêtement en polyimide, de silice fondue, et d'une phase stationnaire) ont été utilisés pour cette étude :

les colonnes dites achirales ne permettent pas la séparation d'énantiomères (image l'un de l'autre dans un miroir) mais de diastéréoismères.

- les colonnes chirales sont greffées avec un composé chiral et permettent la séparation d'énantiomères.

La colonne achirale utilisée est une colonne CP-Sil 19CB low bleed / MS de 30 m avec un diamètre intérieur de 0,25 mm. C'est un polysiloxane greffé à 14% par des cyanopropyles-phényles et à 86% par des diméthyles. Cette colonne est une colonne de polarité intermédiaire. Low bleed / MS signifie que la colonne est conçue spécifiquement pour réduire le bruit de fond et donc augmenter la sensibilité lorsque

la détection est effectuée par spectrométrie de masse (qualité valable aussi avec d'autres détecteurs). Ces colonnes permettent l'amélioration du rapport signal / bruit d'un facteur 4.

De plus, la colonne Varian CP-Sil 19CB, est une colonne à efficacité élevée (132000 plateaux théoriques N), résistante à l'usage, et qui accepte des températures importantes (température maximale d'utilisation : 300°C).

Les colonnes chirales utilisées sont des colonnes Chirasil-Val, colonnes de 25 m avec un diamètre intérieur de 0,25 mm. Ce sont des colonnes de silice fondue sur lesquelles sont greffés des L-Valine. Deux marques ont été utilisées au cours des cette étude avec des performances différentes : colonne Permabond Chirasil-Val fournie par Macherey-Nagel et colonne Chirasil-L-Val fournie par Varian.

Les deux colonnes présentent des efficacités similaires (N~105000) mais la colonne fournie par Macherey Nagel présente un rapport signal sur bruit beaucoup plus important que la colonne fournie par Varian à température élevée (lorsque la température du four est supérieure à 150°C).

De plus, les colonnes chirales sont beaucoup plus fragiles et leur performances décroissent rapidement à l'usage comparativement aux colonnes achirales ; elles possèdent aussi une température d'utilisation plus limitée (température maximale d'utilisation : 200°C).

2.2.1.5. Détecteur

Le détecteur est un spectromètre de masse appelé MS ou MSD (détecteur sélectif de masse). Il permet d'obtenir un spectre de fragmentation de chacun des composés élués.

Dans le cas de la chromatographie couplée à un spectromètre de masse (GC-MS), le détecteur est un spectromètre de masse qui permet à la fois d'identifier et de quantifier les différents composés d'un échantillon.

A partir du courant ionique total (TIC), un chromatogramme représentatif des composés élués peut être tracé (mode d'acquisition « scan », balayage en masse) ce qui fait du spectromètre de masse un détecteur universel. Si un ion particulier est sélectionné (mode d'acquisition SIM, « selected ion monitoring »), un

chromatogramme sélectif peut-être obtenu (EIC pour « extracted ion chromatogram »).

Le spectromètre de masse est donc à la fois un détecteur universel mais aussi un détecteur sélectif et sensible selon le mode d'acquisition des données avec lequel il est utilisé. Le mode scan est utilisé en analyse qualitative avec une sensibilité s'étendant dans une gamme de masse allant du microgramme à en-dessous du picogrammme ; le mode SIM est utilisé pour l'analyse quantitative avec une sensibilité s'étendant dans une gamme de masse allant du nanogramme à quelques dizaines de fentogramme.

En mode SIM, jusqu'à 100 groupes d'ions peuvent être recherchés et ce, à différents moments de l'analyse. Ce mode permet de sélectionner uniquement les ions qui présentent un intérêt et d'éliminer les autres. La sensibilité de l'analyse, l'exactitude et la précision sont ainsi améliorées. Cependant, la version du spectromètre de masse que nous détenons au laboratoire ne nous permet pas de créer plusieurs groupes d'ions au cours d'un même intervalle de temps ou au cours d'intervalles de temps se chevauchant. L'intégration automatisée de pics non séparés n'est de ce fait pas possible.

Le spectromètre de masse est composé de trois parties :

- la source
- l'analyseur
- le détecteur

La source utilisée, pour cette étude, est une source à impact électronique. Les molécules volatilisées sont bombardées dans la source par des électrons énergétiques à 70 eV produits par des filaments. L'analyseur utilisé est un filtre quadripolaire. Dans l'analyseur les ions formés par la source sont filtrés suivant leur rapport m/z (masse / charge). Après séparation, les ions terminent leur trajectoire dans le détecteur qui est une dynode à haute énergie (HED) qui focalise et amplifie le signal, et totalise l'abondance respective de chacun des ions.
2.2.2 Généralités sur l'analyse des acides aminés

2.2.2.1 Historique

Les premières séparations d'acides aminés décrites dans la littérature ont été effectuées dans les années 1940 d'abord par chromatographie de partage (phases liquides de gel de silice (Martin & Synge 1941), puis par chromatographie sur papier (Synge 1944). L'introduction de la chromatographie échangeuse d'ions, le développement de différentes résines polymériques échangeuses d'ions (Stein & Moore 1949) puis la détection post-colonne à la ninhydrine dans les années 1950 ont ensuite permis la séparation quantitative d'acides aminés. Durant les années 1950 et 1960, c'est la chromatographie gazeuse qui a prédominé, puis dans les années 1970 et 1980, la chromatographie liquide. Dans les années 1990, les techniques mises au point pour la chromatographie liquide ont été adaptées à l'électrophorèse capillaire.

Les acides aminés sont des composés difficiles à analyser puisqu'ils ne peuvent être détectés directement par spectroscopie optique (sauf pour les acides aminés aromatiques présentant un chromophore); de plus, ils présentent différents états de charge qui créent des interactions variées, hydrogène et ionique, qui nuisent à l'analyse chromatographique. C'est donc grâce au développement de différentes méthodes de fonctionnalisations que l'analyse des acides aminés a pris son essor et que l'analyse de dérivés d'acides aminés a été réalisée par chromatographie liquide et par chromatographie gazeuse (Husek & Simek 2001).

2.2.2.2 Fonctionnalisation

La fonctionnalisation d'un composé est la transformation d'un composé par une ou plusieurs réactions chimiques. De cette manière, on réalise la synthèse d'un dérivé (produit de la (ou des) réaction(s) chimique(s)), qui, de par ses propriétés, va permettre ou faciliter l'analyse par chromatographie.

En effet, la fonctionnalisation offre de nombreux avantages et permet notamment de :

- Diminuer la température d'ébullition d'un composé par élimination de groupes polaires (OH, NH, SH) ou par action spécifique sur des groupes fonctionnels

types contenant les atomes O, S, N et P. La fonctionnalisation peut, par exemple, rendre un composé volatile de manière à procéder à son analyse par chromatographie gazeuse.

- Augmenter la température d'ébullition afin de réaliser l'analyse d'un composé à très bas point d'ébullition.
- Augmenter la stabilité d'un composé sensible à la dégradation en le stabilisant
 l'analyse de son dérivé permet alors d'améliorer la reproductibilité des résultats.
- Améliorer l'efficacité analytique d'un composé en réduisant ses interactions.
 L'application principalement mise en œuvre est la réduction des phénomènes d'adsorption avec le support de la colonne.
- Augmenter ou permettre la détectabilité d'un composé. La fonctionnalisation d'un composé permet souvent l'amélioration du seuil de détection. Elle peut aussi permettre dans le cas d'une fonctionnalisation chirale la séparation d'énantiomères.

Bien sûr, la fonctionnalisation peut coupler plusieurs des avantages décrits ici.

2.2.2.3 Analyse des acides aminés par chromatographie liquide

L'analyse par chromatographie liquide a prédominé dans les années 1970 et 1980 grâce aux développements de fonctionnalisations pré- ou post-colonne et de phases stationnaires pour la séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse (Abdalla *et al.* 1987). Ces méthodes permettent des analyses quantitatives rapides et sensibles. Les plus employées conduisent à la formation de dérivés d'acides aminés avec des agents de dérivation comme la ninhydrine (James 1978), le chlorure de 1-sulfonyle 5-(dimethylamino)naphthalene (chlorure de DANSYL) (Gray & Hartley 1963; Dejong & al. 1982; Weidmeier & al. 1982), l'o-phtalaldéhyde (OPA) (Lindroth & Mopper 1979; Jones & Gilligan 1983; Sista 1986), le phenylisothiocyanate (PITC) (Heinrikson & Meridith 1984; Cohen *et al.* 1986), le réactif de Marfey (Marfey & Al. 1984) ou encore le fluorenylmethyl chloroformiate (Fmoc) (Einarsson 1985a; Einarsson 1985b; Bank *et al.* 1996). Les propriétés optiques d'absorption mais aussi d'excitation et d'émission de ces

molécules sont utilisées pour l'analyse quantitative des acides aminés (détection par spectroscopies V, UV et/ou de fluorescence).

Actuellement, les dérivations pré-colonne sont privilégiées en chromatographie liquide, car la séparation des acides aminés dérivés est facilitée par leur fonctionnalisation.

Dans la littérature, c'est essentiellement des fonctionnalisations avec l'o-phtaldialdéhyde (Chernobrovkin *et al.* 2004; Csapo *et al.* 2004; Peris-Vicente *et al.* 2006; Noctor *et al.* 2007) et le flurorenylmethylchloroformiate (Molnar-Perl *et al.* 2007; Van Eijk *et al.* 2007) voir même un couplage des deux méthodes (Koros *et al.* 2008) qui sont utilisées. Le couplage de la chromatographie avec la spectrométrie de masse (Chaimbault *et al.* 1999; Petritis *et al.* 2000; Piraud *et al.* 2003; Piraud *et al.* 2005a; Piraud *et al.* 2005b; Zoppa *et al.* 2006) de même que la mise au point de nouveaux détecteurs universels comme par exemple le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) (Petritis *et al.* 2002; Petritis *et al.* 2004) ont aussi permis de développer des méthodes d'analyse sans fonctionnalisation des acides aminés ce qui réduit et facilite considérablement le temps de traitement des échantillons avant analyse. Les différentes méthodes les plus sensibles pour l'analyse de composés organiques, notamment en vue de l'analyse d'acides aminés, ont été recensées dans une revue (Vandenabeele-Trambouze *et al.* 2005).

Cependant, avec la généralisation d'instruments couplés à la spectrométrie de masse, les acides aminés sont de plus en plus analysés en LC-MS sans fonctionnalisation préalable (Piraud *et al.* 2005b; Zoppa *et al.* 2006; Liu *et al.* 2008).

2.2.2.4 Analyse des acides aminés par chromatographie gazeuse

Concernant l'analyse par chromatographie gazeuse, c'est essentiellement la fonctionnalisation des acides aminés par silylation, qui, en les rendant volatiles, a permis leurs premières analyses par cette technique (Pierce 1968; Knapp 1979). Cependant, cette méthode d'analyse était encore peu utilisée pour l'analyse des acides aminés jusqu'aux années 1980. Comme les acides aminés à identifier et quantifier proviennent essentiellement d'hydrolyse de peptides et de protéines ou de milieux aqueux complexes, c'est en général l'analyse par chromatographie liquide qui était privilégiée (Walker & Mills 1995).

39

La mise au point des colonnes capillaires et le couplage avec la spectrométrie de masse, a permis un retour en force de la chromatographie gazeuse (Zumwalt *et al.* 1987), cette méthode d'analyse se révélant extrêmement performante et facile à automatiser.

Différentes méthodes de fonctionnalisation des acides aminés en vue de leur analyse par chromatographie gazeuse ont été développées à la fin des années 1980 et au cours des années 90 (Simek *et al.* 1994; Abe *et al.* 1996; Husek 1998; Husek & Simek 2001).

Les premiers dérivés silylés d'acides aminés n'étant pas très stables, en particulier pour les acides aminés basiques, d'autres méthodes ont été développées.

Les méthodes les plus couramment utilisées actuellement en chromatographie gazeuse emploient :

- des solutions d'alcools comme agent d'alkylation couplé à des chloroformiates d'alkyle comme agents d'acylation (Bruckner & Schieber 2001; Husek 2005; Windelberg *et al.* 2005; Krizman *et al.* 2007; Zampolli *et al.* 2007; Husek *et al.* 2008).

- des agents de silvlation (Deng *et al.* 2005; Hope *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006; Fuzfai & Molnar-Perl 2007; Noctor *et al.* 2007; Yoon 2007; Paik *et al.* 2008)

Les domaines d'application de ces méthodes d'analyse des acides aminés sont extrêmement variés puisqu'ils sont à la fois utilisés pour l'analyse de nourriture (Bernal *et al.* 2005; Mayadunne *et al.* 2005; Peace & Gilani 2005; Bernal *et al.* 2008), de milieux biologiques (urine, sang) (Bruckner & Schieber 2001; Fiamegos *et al.* 2004; Deng *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006; Zoppa *et al.* 2006), pour l'analyse de peinture d'œuvres d'art (Peris-Vicente *et al.* 2006), ou dans le cadre d'analyse spatiale (Botta *et al.* 2007; Nuevo *et al.* 2007; Zampolli *et al.* 2007; Pizzarello *et al.* 2008).

Aujourd'hui, la chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse sont toutes deux employées pour l'analyse des acides aminés auxquelles s'ajoute bien sûr l'électrophorèse capillaire (Poinsot *et al.* 2008).

40

2.2.2.5. Analyse d'énantiomères d'acides aminés :

Généralement, l'analyse d'énantiomères d'acides aminés peut être effectuée de deux manières différentes :

- Par l'analyse directe d'énantiomères ou de dérivés d'énantiomères d'acides aminés sur une colonne chirale.

- Par la fonctionnalisation des énantiomères d'acides aminés par un dérivé chiral ce qui permet l'obtention de diastéréoisomères et l'analyse de ces dérivés sur une colonne chirale ou achirale.

En chromatographie liquide, ces deux types de stratégies coexistent :

- La fonctionnalisation à l'aide d'un composé non chiral suivi d'une analyse sur colonne chirale (Ilisz *et al.* 2008). De nombreuses molécules chirales ont été développées et sont greffées sur différents polymères. Elles donnent lieu à des phases stationnaires chirales variées (Gubitz & Schmid 2001; Chernobrovkin *et al.* 2004).
- 2) Des analyses sur colonne achirale avec des fonctionnalisations préalables à l'aide d'un composé chiral comme par exemple le fluorenyl ethyl chloroformiate (Einarsson *et al.* 1987). Bien d'autres composés chiraux existent et sont résumés dans la revue suivante (Ilisz *et al.* 2008).

Toutefois, il existe, en chromatographie liquide, une troisième méthode d'analyse:

 Aucune fonctionnalisation, mais une analyse des acides aminés à l'aide d'une colonne chirale suivi d'une détection par spectrométrie de masse (Petritis *et al.* 2001).

En chromatographie gazeuse, les méthodes les plus employées sont des fonctionnalisations achirales avec une colonne chirale.

Il existe deux types de colonnes chirales permettant l'analyse d'énantiomères d'acides aminés :

- les colonnes avec un acide aminé greffé. L'acide aminé le plus couramment utilisé est la valine sous sa forme L ou D.
- les colonnes avec des cyclodextrines greffées.

Les différents travaux concernant la séparation des énantiomères sur des phases stationnaires chirales pour la chromatographie gazeuse sont résumées par Schürig (Schürig 2001). Cependant, de nouveaux groupements sont régulièrement développés (Abe & Ohtani 2006).

Les méthodes les plus couramment utilisées sont des fonctionnalisations à l'aide des chloroformiates d'alkyle et leur analyse sur colonne greffée avec la L-Valine (Abe *et al.* 1994; Abe *et al.* 1996; Abe *et al.* 1997; Husek 1998; Bruckner & Schieber 2001; Gubitz & Schmid 2001; Lee *et al.* 2001; Rodier *et al.* 2002; Chernobrovkin *et al.* 2004; Husek 2005; Abe & Ohtani 2006; Herrero *et al.* 2007; Mie *et al.* 2007; Zampolli *et al.* 2007; Bertrand *et al.* 2008; Husek *et al.* 2008; Ilisz *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008; Ward & Baker 2008; Zahradnickova *et al.* 2008).

Il existe peu de méthodes d'analyse d'énantiomères d'acides aminés par chromatographie gazeuse sur colonne achirale par fonctionnalisation chirale. La formation de diastéréoisomères avec un dérivé chiral a été étudiée avec le chloroformiate de menthyle sur colonne chirale et colonne achirale (Domergue *et al.* 1993). Les méthodes d'analyse chirale que nous avons testées n'ayant pas été satisfaisantes (co-élution de pics de leucine et d'isoleucine de même poids moléculaire avec le chloroformiate de menthyle et coélution des énantiomères de la proline avec le chloroformiate d'éthyle), nous avons mis au point une nouvelle méthode (Bertrand *et al.* 2008).

2.2.2.6. Synthèse des références bibliographiques :

Les publications citées au cours de ce chapitre sont reprises dans le tableau 2.

Auteur	Année	Analvse	Fonctionnalisation	Application		
Abdalla	1987	GC LC	pls	-	enantiomères	revue
Abe et al., 1994	1994	GC	chloroformates	-	enantiomères	
Abe et al., 1996	1996	GC	chloroformates	-	enantiomères	
Abe et al., 1997	1997	GC	chloroformates	-	enantiomères	
Abe and Ohtani, 2006	2006	GC	chloroformates	-	enantiomères	
Bank et al., 1996	1996	LC	Fmoc	-		
Bernal et al., 2005	2005	LC	Fmoc DEMM AQC	végétaux, nourriture		
Bernal et al., 2008	2008	GC-MS	-	végétaux, nourriture		
Bertrand et al., 2008	2008	GC-MS	chloroformates	-	enantiomères	
Botta et al., 2007 Bruckner and Schieber,	2007	LC GC-MS	pls	analyse spatiale		revue
	2001	GC-IVIS	chloroformates	milieux biologiques	opontiamàroa	
Casal Chaimbault at al. 1000	2005	GC	chioroionnales	vegetaux, nournture	enantiomeres	
Chambault et al., 1999	2004			- végétaux pourriture	enantiomères	
	2004			vegetaux, nournaite	enantiomeres	
Conen et al., 1986 Csapo et al., 2004;	2004	LC	OPA	végétaux, nourriture		
Dejong and al., 1982	1982	LC	dansyl			
Deng et al., 2005	2005	GC-MS	silylation	milieux biologiques		
Domergue, 1993	1993	GC	chloroformates		enantiomères	
Einarsson, 1985	1985	LC	Fmoc			
Fiamegos et al., 2004 Fuzfai and Molnar-Perl,	2004	GC GC-MS	chloroformates	milieux biologiques		
2007	2007	GC-MS	silylation	végétaux, nourriture		
Gubitz and Schmid, 2001	2001	EC GC LC	pls		enantiomères	revue
Gray and Hartley, 1963	1963	LC	dansyl			
Heinrikson and Meridith,	400.4		DITO			
1984	1984		PIIC	· · ·		
Hope et al., 2005	2005	GC-MS	Silylation	vegetaux, nourriture		
Husek and Simek, 2001	2001	LC et GC	chloroformates	milieux biologiques		
Husek et al., 2006	2008	GC	chloroformates	milieux biologiques		
Husek, 1996	2005	GC	chloroformates			
lliaz at al. 2009	2005		chloroioiniates	milleux biologiques	anantiamàraa	
lamos 1078	2000		pis		enantiomeres	Tevue
James, 1970	1092					
	1903	LC	OFA			
Knapp, 1979	1979		Silviation			
Kolos et al., 2008	2008	EC GC	opa el Finoc	vegetaux, nournture		
	2007	90	chloroionnales	milleux biologiques		
	2001	GC	chloroformates		enantiomeres	
	2008		-	analyse spatiale		
Lindroth and Mopper, 1979	1979	LC	OPA			
Marfey and Al., 1984	1984	LC	Marfey			
Martin and Synge, 1941 Mayadunne et al., 2005	1941 2005	de partage GC	chloroformates	végétaux, nourriture		

Molnar-Perl et al., 2007;	2007	LC	Fmoc			
Noctor et al., 2007	2007	LC GC-MS	OPA silylation	végétaux, nourriture		
Nuevo et al., 2007	2007	LC		analyse spatiale		
Paik et al., 2008	2008	GC-MS	silylation	milieux biologiques		
Peace and Gilani, 2005	2005	ionique LC GC	pls	végétaux, nourriture		revue
Peris-Vicente et al., 2006	2006	LC	OPA	œuvre d'art		
Petritis et al., 2000	2000	LC-MS	-	-		
Petritis et al., 2001	2001	LC-MS	-	-	enantiomères	
Petritis et al., 2002	2002	LC-ELSD	-	-		
Petritis et al., 2004;	2004	LC-ELSD	-	-		
Pierce, 1968	1968		silylation			
Piraud et al., 2003	2003	LC-MS	-	milieux biologiques		
Piraud et al., 2005a	2005	LC-MS	-	milieux biologiques		
Piraud et al., 2005b	2005	LC-MS	-	milieux biologiques		
Pizzarello et al., 2008	2008	GC-MS	TFAA	analyse spatiale		
Poinsot et al., 2008	2008	EC		milieux biologiques		revue
Rodier et al., 2002	2002	GC-MS	pls	analyse spatiale	enantiomères	
Schurig, 2001	2001	GC	pls	-	enantiomères	revue
Shen et al., 2006;	2006	GC-MS	silylation	milieux biologiques		
Simek et al., 1994	1994	GC	silylation	végétaux, nourriture		
Sista, 1986	1986	LC	OPA			
Stein and Moore, 1949	1949	ionique				
Synge, 1944	1944	sur papier				
Van Eijk et al., 2007	2007	LC-MS	Fmoc	milieux biologiques		
Vandenabeele et al., 2005	2005	pls	pls	analyse spatiale		revue
Walker and Mills, 1995	1995	LC		milieux biologiques		
Ward and Baker, 2008	2008	LC GC	pls		enantiomères	revue
Weidmeier and al., 1982	1982	LC	dansyl			
Windelberg et al., 2005	2005	GC-MS	chloroformates	milieux biologiques		
Yoon, 2007	2007	GC-MS	silylation	milieux biologiques		
Zahradnickova et al., 2008	2008	GC	chloroformates	milieux biologiques	enantiomères	
Zampolli et al., 2007	2007	GC	chloroformates	analyse spatiale		
Zoppa et al., 2006	2006	LC-MS	-	milieux biologiques		
Zumwalt et al., 1987	1987	GC				

Tableau 2 : publications citées dans le chapitre 2

2.3. Objectifs

Au cours de cette étude, des méthodes d'analyse des acides aminés ont été testées et sélectionnées dans le but :

1) d'analyser un maximum d'acides aminés en une seule injection.

2) d'analyser un maximum d'énantiomères d'acides aminés en une seule injection.

3) de fonctionnaliser les acides aminés par des méthodes simples, pratiques à mettre en œuvre, automatisables et pouvant à terme être spatialisées.

4) d'obtenir les meilleures sélectivité, résolution et sensibilité possibles.

Différentes méthodes d'analyse des acides aminés ont donc été testées dans ce but et deux démarches ont été poursuivies au cours de cette étude :

1) La recherche de méthodes achirales, permettant l'analyse d'un maximum d'acides aminés avec une sensibilité importante mais ne discriminant pas les énantiomères.

2) La recherche de méthodes chirales permettant l'analyse d'un maximum d'énantiomères d'acides aminés.

Dans le cas d'une analyse achirale, la fonctionnalisation ainsi que la colonne n'ont pas besoin d'être chirales.

Dans le cas d'une analyse chirale, la fonctionnalisation et/ou la colonne doivent impérativement être chirales.

2.4. Méthodes d'analyse non chirale

Les méthodes d'analyse achirales mises en œuvre ont toutes été effectuées avec la colonne Varian CP-Sil 19CB, colonne performante (132000 plateaux théoriques), de polarité intermédiaire, résistante à l'usage, et qui accepte des températures élevées (température maximale d'utilisation : 300°C).

Différentes fonctionnalisations ont été testées avec différents acides aminés :

- Acylation des fonctions amines à l'aide d'anhydride d'acide trifluoracétique (TFAA) en présence de triethylamine après estérification par l'isopropanol, le méthanol ou l'éthanol.
- Acylation par l'heptafluorobuturylimidazole (HFBI).
- Alkylation par le tetrabutylammonium hydroxide (TBH).
- Alkylation par le dimethylformamide diethylacétals (DMF-diethylacétals).

Ces différents essais n'ont pas donné de résultats satisfaisants : soit à cause de nombreux pics de produits secondaires, pics parasites qui risquent de perturber l'analyse, soit du fait de leur mise en œuvre difficile avec, par exemple, de nombreuses extractions. Ils ne sont donc pas présentés ici.

Les fonctionnalisations décrites ici sont de deux types :

1) estérification des fonctions carboxyliques et alkylation des fonctions thiols et hydroxyles à l'aide d'alcools dans la pyridine et acylation des fonctions amines à l'aide de chloroformiates d'alkyle selon le schéma réactionnel suivant :



Trois alcools, éthanol (EtOH), trifluoroéthanol (TFE), heptafluoroéthanol (7F-BuOH), avec deux chloroformiates différents, chloroformiate de méthyle (MCF) et chloroformiate d'éthyle (ECF), ont été utilisés (5 méthodes de fonctionnalisation au total).

2) silylation avec l'agent de silylation : methylterbutylsilyl trifluoroacétamide (MTBSTFA) selon le schéma réactionnel suivant :



Dans le cas, d'acides aminés possédant une fonction sur leur chaîne latérale, la réaction est la suivante :



Six fonctionnalisations différentes sont donc présentées :

- Fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate d'éthyle (EtOH/ECF) conduisant à des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester (*Figure 7*).
- Fonctionnalisation avec le trifluoroéthanol et le chloroformiate d'éthyle (TFE/ECF) conduisant à des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl trifluoroethyl ester (*Figure 8*).
- Fonctionnalisation avec l'heptafluorobutanol et le chloroformiate d'éthyle (7F-BuOH/ECF) conduisant à des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester (*Figure 9*).
- Fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate de méthyle (EtOH/MCF) conduisant à des dérivés N(O,S)-methoxycarbonyl ethyl ester (*Figure 10*).
- Fonctionnalisation avec le trifluoroéthanol et le chloroformiate de méthyle (TFE/MCF) conduisant à des dérivés N(O,S)-methoxycarbonyl trifluoroethyl ester (*Figure 11*).
- Fonctionnalisation avec le MTBSTFA + 1% de TBDMSCI conduisant à des dérivés silylés (*Figure 12*).

2.4.1. Optimisation des fonctionnalisations utilisant les chloroformiates d'alkyle

Des études ont été effectuées afin d'optimiser les différentes proportions de chloroformiates, de pyridine et d'alcool. Ces tests ont été effectués sur l'alanine avec la méthode conduisant aux dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester d'alanine (fonctionnalisation EtOH / ECF). Différentes quantités d'éthanol, pyridine et de chloroformiate d'éthyle ont été testées : de 0.157 à 0.785 mmoles (proportions de 1 à

5). Celles-ci n'influent pas les résultats obtenus ; aussi, les proportions utilisées dans les modes opératoires, ont été celles communément usités dans les publications précédentes soit une proportion pyridine / alcool / chloroformiate de 1 / 2.5 / 1 (0.393 mmoles d'alcool et 0.157 mmoles de pyridine et chloroformate). Ces réactifs sont présents en large excès par rapport à la quantité d'acide aminé mis en présence. Les coefficients de réponse restent stables quelle que soit la quantité d'alanine fonctionnalisée (de 10^{-5} à 10^{-8} mole).

Les temps d'agitation ont aussi été testés. Ainsi, une minute d'agitation est nécessaire à l'extraction des acides aminés dans le chloroforme.

Après extraction, les dérivés d'acides aminés sont stables sur 24 et 48 heures.

2.4.2. Résultats des méthodes d'analyse non chirale

Ces différentes méthodes ont été testées avec la fonctionnalisation d'une micromole des acides aminés suivants :

Alanine, acide aminoisobutyrique, acide aminobutyrique, acide aspartique, acide diaminopropionique, cystéine, glycine, leucine, norvaline, tert-leucine, sérine, valine et dialanine.

Toutes les fonctionnalisations ont été effectuées selon les modes opératoires suivants :

2.4.2.1. Modes opératoires des fonctionnalisations :

2.4.2.1.1. Mode opératoire avec les chloroformiates d'alkyles :

80 μ L d'une solution contenant 0.05 μ mole des acides aminés suivants : alanine, acide aminoisobutyrique, acide aminobutyrique, acide aspartique, acide diaminopropionique, cystéine, glycine, leucine, norvaline, tert-leucine, sérine, valine et dialanine sont placés dans un flacon de 1 mL. Un volume x de solution d'alcool dans la pyridine est ajouté à la solution (x = 35.6 μ L pour l'éthanol dans la pyridine (dont 22.9 μ L d'éthanol et 12.7 μ L de pyridine), 41.3 μ L pour le trifluoroéthanol dans la pyridine (dont 28.6 μ L de trifluoroéthanol et 12.7 μ L de pyridine), et 61.8 μ L pour l'heptafluorobutanol dans la pyridine (dont 49.1 μ L d'heptafluorobutanol et 12.7 μ L de pyridine). Le flacon est agité. Un volume de 15 μ L de chloroformiate d'éthyle ou de

12.2 μ L de chloroformiate de méthyle est ajouté. Le flacon est de nouveau agité puis laissé au repos pendant 5 minutes afin d'augmenter le rendement de la réaction et permettre la libération de CO₂. Le flacon est de nouveau agité pendant 15 secondes puis 100 μ L de chloroforme est ajouté. Une agitation de 2 minutes est effectuée afin d'extraire au maximum les dérivés dans le chloroforme. Le flacon est ensuite mis à décanter pendant plusieurs minutes dans la glace, la phase organique est ensuite extraite et 1 μ L de cette solution injectée dans le chromatographe.

2.4.2.1.2. Mode opératoire avec le MTBSTFA :

80 µL d'une solution contenant 0.05 µmole des acides aminés suivants : alanine, acide aminoisobutyrique, acide aminobutyrique, acide aspartique, acide diaminopropionique, cystéine, glycine, leucine, norvaline, tert-Leucine, sérine, valine et dialanine sont placés dans un flacon de 1 mL et évaporés à sec au speed-vacuum. Le dépôt est repris par 70 µL d'acétonitrile, le tout est agité sous ultrasons pendant 15 minutes, puis 30 µl de MTBSTFA (methylterbutylsilyltrifluoroacétamide) est ajouté, le tout est de nouveau mis sous ultrasons pendant 15 minutes, puis chauffés dans étuve à 60°C pendant 45 minutes.

Un microlitre de cette solution d'acétonitrile contenant les dérivés silylés est finalement injectée dans le chromatographe.

Analyse chromatographique :

Un microlitre de tous les dérivés a été injecté dans le chromatographe équipé d'une colonne Varian CP-Sil19CB (30 m x 0.25 mm, 0.2 µm) avec l'hélium comme gaz vecteur en mode splitless. La température de colonne a été ajustée à 120 °C pendant 5 minutes puis 3°C par min jusqu'à 200°C avec maintien à 200°C pendant 5 minutes. Le détecteur utilisé est le spectromètre de masse.

Tous les chromatogrammes présentés ci-dessous ont donc été effectués dans les mêmes conditions pour comparaison. L'abondance relative des différents ions fragments obtenus pour chaque dérivé est donnée entre parenthèses dans les tableaux.

49

2.4.2.2. <u>Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl ethyl ester :</u> Après fonctionnalisation avec l'éthanol dans la pyridine et le chloroformiate d'éthyle (EtOH / ECF), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 7*). Leurs principales caractéristiques sont reportées dans le *tableau 3*.



Figure 7 : Fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate d'éthyle.

t _R (min)	dérivés EtOH /ECF	ions fragments	M _{dérivé}	M-73
8,71	Aib	<mark>130</mark> (100) 58(72)	203	130
8,87	Ala	<mark>116</mark> (100)	189	116
9,80	Gly	<mark>102</mark> (100)	175	102
11,25	Abu	<mark>130</mark> (100) 58(53)	203	130
12,55	Val	<mark>144</mark> (100) 72(27)	217	144
13,39	tLeu	129(100) <mark>158</mark> (75) 101(58) 175(50)	231	158
14,02	NVal	<mark>144</mark> (100) 72(24)	217	144
19,63	Ser	132(100) 60(66) 86(40) 74(28) 101(31) 175(26)	205	132
21,45	Leu	<mark>158</mark> (100)	231	158
23,56	Asp (C ₂ H ₅)	<mark>188</mark> (100)	261	188
30,01	Ala2	116(100) 117(28) 88(21) 141(21)	260	
30,76	Ala2	116(100) 117(28) 88(21) 141(21)	260	
31,62	Cys (COOC ₂ H ₅)	220 (100) 102(86) 74(54)	293	220
32,03	DAPA (COOC ₂ H ₅)	175(100) 129(90) 102(59) 101(45) 85(35)	276	175

Tableau 3 : dérivés EtOH / ECF

2.4.2.3. <u>Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl trifluoroethyl ester :</u> Après fonctionnalisation avec le trifluororéthanol dans la pyridine et le chloroformiate d'éthyle (TFE / ECF), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 8*). Leurs principales caractéristiques sont reportées dans le *tableau 4*.



Figure 8 : Fonctionnalisation avec le trifluoroéthanol et le chloroformiate d'éthyle.

t _R (min)	dérivés TFE /ECF	ions fragments	M _{dérivé}	M-127
5,97	Aib	<mark>130(</mark> 100), 58(77)	257	130
6,29	Ala	<mark>116</mark> (100)	243	116
7,54	Gly	102(100)	229	102
8,13	Abu	130(100) 58(77)	257	130
9,08	Val	144(100) 101(31) 55(24)	271	144
9,80	tLeu	57(100) 129(83) 101(67) 229(50) <mark>158</mark> (36)	285	158
10,52	NVal	<mark>144</mark> (100) 72(22)	271	144
11,78	Leu	<mark>158</mark> (100) 102(20)	285	158
16,32	Asp (CH ₂ -CF ₃)	242(100) 70(39)	287	
17,38	Ser	101(100) 129(100) 132(73) 86(70) 229(54)	259	132
26,35	Ala2	116 (100)	314	
27,03	Cvs (COOC ₂ H ₅)	102(100) <mark>220</mark> (93)	347	220
27,60	Ala2	116 (100)	314	
28,42	DAPA (COOC ₂ H ₅)	102 (100) 85(22)	302	

Tableau 4 : dérivés TFE / ECF

2.4.2.4. <u>Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester :</u> Après fonctionnalisation avec l'heptafluorobutanol dans la pyridine et le chloroformiate d'éthyle (7FBuOH / ECF), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 9*). Leurs principales caractéristiques sont reportées dans le *tableau 5*.



Figure 9 : Fonctionnalisation avec l'heptafluorobutanol et le chloroformiate d'éthyle.

	dérivés 7FBuOH /			
t _R (min)	ECF	ions fragments	M _{dérivé}	M-227
6,00	Aib	<mark>130</mark> (100), 58(69)	357	130
7,25	Ala	<mark>116</mark> (100)	343	116
8,62	Gly	<mark>102</mark> (100)	329	102
9,02	Abu	<mark>130</mark> (100) 58(43)	357	130
9,79	Val	<mark>144</mark> (100) 101(31)	371	144
10,36	tLeu	57(100) 129(74) 101(52) 329(50) <mark>158</mark> (39)	385	158
11,32	Nval	<mark>144</mark> (100)	371	144
17,32	Asp (CH ₂ -C ₃ F ₇)	<mark>342</mark> (100) 254(65)	569	342
18,29	Ser	101(100) 129(100) <mark>132(</mark> 90) 86(70) 329(54)	359	132
26,73	Ala2	116 (100)	414	
27,01	Cys (COOC ₂ H ₅)	102(100) <mark>220(</mark> 93)	447	220
27,98	Ala2	116 (100)	414	
28,46	DAPA (COOC ₂ H ₅)	102 (100)	430	

Tableau 5 : dérivés 7FBuOH / ECI	F
---	---

2.4.2.5. <u>Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-methoxycarbonyl ethyl ester :</u> Après fonctionnalisation avec l'éthanol dans la pyridine et le chloroformiate de méthyle (EtOH / MCF), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 10*). Leurs principales caractéristiques sont reportées dans le *tableau 6*.



Figure 10 : Fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate de méthyle.

	dérivés EtOH /			
t _R (min)	MCF	ions fragments	M _{dérivé}	M-73
5,48	Ala	<mark>102</mark> (100)	175	102
5,79	Aib	<mark>116</mark> (100)	189	116
6,17	Gly	<mark>88</mark> (100)	161	88
7,45	Abu	<mark>116</mark> (100)	189	116
7,60	Leu	115 (100) 147(38) <mark>144</mark> (36)	217	144
8,63	Val	<mark>130</mark> (100)	203	130
9,45	tLeu	<mark>144</mark> (100) 115(69)	217	144
9,95	Nval	<mark>130</mark> (100)	203	130
11,27	Leu	<mark>144</mark> (100)	217	144
15,38	Ser	86(100) <mark>118</mark> (80) 115(60)	191	118
17,41	Asp (C ₂ H ₅)	<mark>174</mark> (100)	247	174
25,48	Cys (COOCH ₃)	<mark>192</mark> (100) 160(58)	265	192
26,27	DAPA (COOCH ₃)	161(100) 115(100) 143(25) <mark>175</mark> (17)	248	175
26,73	Ala2	102 (100)	246	

Tableau 6 : dérivés EtOH / MCF

2.4.2.6. <u>Analyse de dérivés *N*(*O*,*S*)-methoxycarbonyl trifluoroethyl ester :</u> Après fonctionnalisation avec le trifluororéthanol dans la pyridine et le chloroformiate de méthyle (TFE / MCF), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 11*). Leurs principales caractéristiques sont données dans le *tableau 7*.



Figure 11 : Fonctionnalisation avec le trifluoroéthanol et le chloroformiate de méthyle.

t _R (min)	dérivés TFE / MCF	ions fragments	M _{dérivé}	M-127
3,80	Ala	<mark>102</mark> (100)	229	102
4,17	Aib	<mark>116</mark> (100)	243	116
4,60	Gly	<mark>88</mark> (100)	215	88
5,08	Abu	<mark>116</mark> (100)	243	116
5,85	Val	<mark>130</mark> (100) 115(41)	257	130
6,47	tLeu	115(100) 215(50) <mark>144</mark> (39)	271	144
7,03	Nval	<mark>130</mark> (100)	257	130
8,13	Leu	<mark>144</mark> (100)	271	144
12,51	Asp (C ₂ H ₅)	<mark>228</mark> (100)	355	228
13,08	Ser	160(100) <mark>118</mark> (25) 128(55)	245	118
21,17	Cys (COOCH ₃)	<mark>192</mark> (100) 160(52)	319	192
22,58	Ala2	102(100)	300	
22,97	DAPA (COOCH ₃)	88(100) 143(25) <mark>175</mark> (15)	302	175
23,81	Ala2	102 (100)	300	

Tableau 7 : dérivés TFE / MCF

2.4.2.7. Analyse de dérivés silylés :

Après fonctionnalisation avec le methylterbutylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA), le chromatogramme des dérivés suivants est obtenu (*Figure 12*). Leurs principales caractéristiques sont données dans le *tableau 8*.



Figure 12 : Fonctionnalisation avec le MTBSTFA.

t _R (min)	dérivés TBDMS	ions fragments	M _{dérivé}	M-159	M-57
13,94	Ala	158(100) 73(73) 232(59) 260(50)*	317	158	260
15,13	Gly	147(100) 73(88) 218(100) 246(67)*	303	144	246
15,62	Aib	172(100) 73(43) 246(31) 274(21)*	331	172	274
16,26	Abu	172(100) 73(48) 246(50) 274(50)*	331	172	274
17,82	Val	<mark>186</mark> (100) 73(53) 260(40) 288(33)*	345	186	288
18,37	NVal	<mark>186</mark> (100) 73(47) 260(46) 288(36)*	345	186	288
19,28	Leu	200(100) 73(45) 302(27) 274(33)*	359	200	302
19,32	tLeu	200(100) 302(100) 73(50) 274(30)*	359	200	302
21,45	DAPA(MTBS)	313(100) 73(39)128(29)	446	287	389
28,87	Ser(MTBS)	288(71) 73(100) 302(40)	447	288	390
30,83	Cys(MTBS)	144(100) 73(45)	463	304	406
35,45	Asp(MTBS)	302(69) 73(100) <mark>316</mark> (38)	475	316	418
35,83	Ala2	158(100) 331(39) 73(39)	388	229	331

*seuls les 4 ions les plus abondants sont répertoriés

Tableau 8 : dérivés TBDMS

2.5.2 Interprétation des spectres de masse

En impact électronique, chaque molécule entre en collision avec des électrons incidents de forte énergie cinétique (70 eV). Ces électrons arrachent un électron périphérique de l'orbitale moléculaire pour donner un cation radical qui va se fragmenter dans la source et donner différentes espèces, cations et radicaux. Le spectre de masse de la molécule présente les ions fragments caractérisant la molécule avec des intensités de pics relatives à leur abondance (De Hoffmann *et al.* 1996).

2.5.2.1 Pour les dérivés avec les chloroformiates d'alkyle :

Pour les dérivés de chloroformiates d'alkyle, les fragmentations ont lieu comme suit (*Figure 13*) :

- a : fragmentation par rupture simple
- b : fragmentation par réarrangement ou par rupture simple
- c : fragmentation par réarrangement



Figure 13 : schéma des principales fragmentations des dérivés de chloroformiates d'alkyle.

La fragmentation majoritaire a lieu en a par rupture simple et donne lieu à l'ion immonium caractéristique de l'acide aminé et du chloroformiate utilisé.

Ces ions correspondent à la perte de 73 unités de masse à partir de l'ion moléculaire $[M-73]^+$ du composé pour les fonctionnalisations avec EtOH / ECF et EtOH / MCF (perte du radical [COO-CH₂-CH₃][•]), à M-127 pour les fonctionnalisations avec TFE / ECF et TFE / MCF (perte du radical [COO-CH₂-CF₃][•]), et à M-227 pour les fonctionnalisations avec 7FBuOH / ECF (perte du radical [COO-CH₂-CF₂-CF₂-CF₃][•]). Ainsi pour l'alanine, l'ion majoritaire correspond à la masse 116 pour les fonctionnalisations avec l'ECF et à la masse 102 pour les fonctionnalisations avec MCF (*Figure 14*).



Figure 14 : spectres de masse de l'alanine avec les fonctionnalisations EtOH / ECF, 7FBuOH / ECF et EtOH / MCF.

Prenons l'exemple de la fonctionnalisation EtOH / ECF :

• Pour tous les acides aminés :

Fragmentation en a conduisant à l'ion R-O-CO-⁺NH=CH-R

• Pour les acides aminés à chaine alkyl Abu, Aib, Val, NVal :

Fragmentation en a puis perte du groupe R'OCO en c par réarrangement conduisant

à l'ion $^+NH_2 = CH - R$

(M=58 pour Aib et Abu et M=72 pour Val et NVal)

• Pour la tLeu, la Ser et le DAPA:

Pas de fragmentation en c mais rupture en b conduisant à l'ion de masse 175

CH₃-CH₂-O-CO-⁺NH=CH-COO-CH₂-CH₃

(ion de masse 229 avec fonctionnalisation TFE / EtOH et 329 avec 7FBuOH / EtOH)

Puis cet ion conduit à l'ion de masse 129 CH_3 - CH_2 -O-CO-⁺NH=CH-C=O (mêmes ions pour les fonctionnalisations TFE / EtOH et 7FBuOH / EtOH) et à l'ion de masse 101.

Pour les acides aminés DAPA et cystéine, on relève aussi une fragmentation de leur chaine latérale donnant lieu à l'ion de masse 102.

 $CH_3-CH_2-O-CO-^+NH=CH_2$

Cet ion est favorisé et est présent majoritairement avec les fonctionnalisations TFE / ECF et 7FBuOH / ECF. La présence de groupements électro-attracteurs favorise la création de cet ion au détriment de la fragmentation a pour ces acides aminés.

Pour la sérine en plus des fragmentations précédemment décrites, la présence d'un ion de masse 86 est à relever : cet ion correspond à la cyclisation de la chaine alkyl de la sérine.

• Pour la dialanine

La fragmentation a lieu au niveau de la liaison CH-CO entre les deux chaines alkyl des deux alanines et conduit à l'ion caractéristique 116.

2.5.2.2 Pour les dérivés silylés

Pour la plupart des dérivés silylés, le fragment majoritaire correspond à la masse moléculaire auquel la masse 159 a été soustraite, ce qui correspond à la perte du radical $[COO-Si(CH_3)_2-C(CH_3)_3]^{\bullet}$.

Les principales fragmentations ont lieu par ruptures simples comme suit (Figure 15) :



Figure 15 : schéma des principales fragmentations des dérivés silylés.

La fragmentation a ou a' conduit à l'ion de masse M-57 avec perte du radical terbutyle (M=57) et la fragmentation en b à l'ion de masse M-159 avec la perte d'un radical de masse 159.

De plus, les ions M-57 conduisent à des composés de masse M-85 par perte d'un carbonyle et migration de OMTBS. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour connaitre le(s) mécanisme(s) mis en jeu.

Des ions caractéristiques des composés silylés de masse M=73 et dans une moindre mesure M=147 (proportion de cet ion souvent inférieure à 20%), sont présents dans la plupart des spectres. L'ion de masse 73 correspond au composé $(CH_3)_3Si^+$, le composé de masse 147 au composé $(CH_3)_3Si-O-Si^+(CH_3)_2$ qui résulte d'une réorganisation entre l'ion silylé de masse 73 et un radical (Phillipou 1977; De Hoffmann *et al.* 1996).

Pour exemple, ci-dessous un spectre d'alanine (Figure 16):

Les ions 73 et 147 sont caractéristiques des composés silylés. L'ion 158 correspond à la fragmentation b conduisant à l'ion M-159 L'ion 260 correspond à la fragmentation a ou a' conduisant à l'ion M-57 L'ion 232 correspond à l'ion M-85 avec perte d'un terbutyle et perte d'un carbonyle.



Figure 16 : spectre de masse du dérivé silylé de l'alanine

2.5.3 Discussion des méthodes d'analyse non chirale

Concernant les fonctionnalisations avec les chloroformiates, les acides aminés trifonctionnels tels que la sérine et l'acide aspartique, présentent, suivant les fonctionnalisations, des dérivés di ou tri-substitués. Ainsi, la sérine est soit mono soit di-acétylés et l'acide aspartique, soit mono soit di-estérifié. Ceci constitue un facteur limitant pour des analyses quantitatives ultérieures.

La fonctionnalisation avec le trifluoroéthanol et le chloroformiate de méthyle présente quelques petits pics parasites qui ne sont pas gênants pour une analyse quantitative en SIM (selected ion monitoring).

Cependant, parmi les méthodes restantes, les chromatogrammes des dérivés silylés, des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester et des dérivés N(O,S)-

ethoxycarbonyl trifluoroethyl ester sont dépourvus de pics parasites et présentent des limites de détection plus faibles que les autres méthodes.

Aussi, ces trois méthodes ont été testées pour les différentes expériences. Suivant la séparation chromatographique des acides aminés à identifier et à quantifier, l'une ou l'autre de ces méthodes à été utilisée. Ainsi, pour les expériences de simulation d'impacts, c'est la méthode avec l'heptafluorobutanol et le chloroformiate d'éthyle qui a été mis en œuvre, pour les expériences d'irradiation c'est la silylation qui a été choisie, celle-ci présentant des limites de détection supérieures.

2.5. Méthodes d'analyses chirales

Deux méthodes ont été testées, comparées et publiées en 2008 (Bertrand *et al.* 2008) :

- Une méthode avec une fonctionnalisation non chirale et analyse sur colonne chirale
- Une nouvelle méthode, conçue et développée au laboratoire, avec une fonctionnalisation chirale et une analyse sur colonne achirale.

Dans les deux cas, la fonctionnalisation est une estérification des fonctions carboxyliques à l'aide d'alcools dans la pyridine et une acylation des fonctions amines, thiols, et hydroxyles à l'aide de chloroformiates d'alkyle. La réaction a lieu selon le schéma réactionnel suivant :



Dans le cas d'un alcool chiral (comme par exemple le 2-chloropropanol) ou d'un chloroformiate d'alkyle chiral, les dérivés formés sont des diastéréoisomères qui peuvent ensuite être séparés et analysés sur une colonne chirale ou non.



Si l'alcool et le chloroformiate d'alkyle utilisés ne sont pas chiraux, alors les dérivés formés sont des énantiomères qui ne peuvent être séparés que sur colonne chirale. La performance de la colonne CPSil 19 CB étant meilleure et sa température d'utilisation maximale supérieure, la formation de diastéréoisomères à l'aide des composés chiraux a été recherchée. Pour ce faire, différents alcools et chloroformiates d'alkyles chiraux ont été testés : estérification à l'aide de (R)-(+)-1-phényléthanol, de (S)-(-)-2-méthyl-1-butanol, ou acylation à l'aide du 1-chloroéthyl chloroformiate. Ces fonctionnalisations, malgré des essais d'optimisations, n'ont pas donné de rendements de réaction et/ou de résolutions énantiomériques suffisants : elles ne sont donc pas présentées ici.

2.5.1. Résultats des méthodes d'analyse chirale

2.5.1.1. Mode opératoire des fonctionnalisations :

Solution standard d'acides aminés :

Chaque énantiomère d'acides aminés est dissout dans l'eau à une concentration de 0.1M pour les énantiomères de la lysine, l'arginine, l'alanine, la thréonine, la proline et la cystéine, à 0.05 M pour ceux de la sérine et de la valine, à 0.02 M pour ceux de l'histidine l'isoleucine, la méthionine et l'asparagine, à 0.01M pour ceux de la phénylalanine, la leucine et la glutamine, 5.10⁻³ M pour ceux du tryptophane, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, et 5.10⁻⁴ M pour la tyrosine.

La solution standard a été préparée en ajoutant le même nombre de mole de chaque énantiomère d'acide aminé, chaque acide aminé ayant alors une concentration de 3.12.10⁻⁴ M.

Fonctionnalisations :

100 μ L de la solution standard (0.0312 μ mole de chaque énantiomères d'acides aminés) sont placés dans un flacon de 1 mL. Un volume x de solution d'alcool dans la pyridine est ajouté à la solution (x = 35.6 μ L pour l'éthanol dans la pyridine (dont 22.9 μ L d'éthanol et 12.7 μ L de pyridine), x= 46.3 μ L pour le 2-chloropropanol dans la pyridine (dont 33.6 μ L de 2-chloropropanol et 12.7 μ L de pyridine). Le flacon est agité. Un volume de 15 μ L de chloroformiate d'éthyle est ajouté. Le flacon est de nouveau agité puis laissé au repos pendant 5 minutes afin d'augmenter le rendement de la réaction. Le flacon est de nouveau agité pendant 15 secondes puis 100 μ L de chloroforme est ajouté. Une agitation de 2 minutes est effectuée afin d'extraire au maximum les dérivés dans le chloroforme. Le flacon est ensuite mis à décanter pendant plusieurs minutes dans la glace, la phase organique est ensuite extraite et 1 μ L de cette solution injectée dans le chromatographe.

Analyse chromatographique :

Dans le cas des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester, le chromatographe est équipé d'une colonne Varian CP-Sil19CB (30 m x 0.25 mm, 0.2 μ m) avec l'hélium comme gaz vecteur. L'injection a lieu en mode splitless. La température de colonne a été ajustée à 100 °C pendant 5 minutes puis programmée à 2°C par min jusqu'à 275°C. Le détecteur utilisé est le spectromètre de masse en mode SIM.

Dans le cas des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester, le chromatographe est équipé d'une colonne Macherey-Nagel Chirasil L-Val (25 m x 0.25 mm, 0.12 µm) avec l'hélium comme gaz vecteur. L'injection a lieu en mode splitless. La température de colonne a été ajustée à 70°C pendant 3 minutes puis programmée à 5°C par min jusqu'à 180°C. Le détecteur utilisé est le spectromètre de masse en mode scan (la version du GC-MS ne permettant pas l'intégration automatique des pics avec le mode SIM lors de superposition de pics).

2.5.1.2. Analyse de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester :

Après fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate d'éthyle (EtOH / ECF) selon le mode opératoire précédemment décrit, le chromatogramme suivant est obtenu (*Figure 17*). Les caractéristiques principales des dérivés obtenus sont reportées dans le *tableau 9*.



Figure 17 : Fonctionnalisation avec l'éthanol et le chloroformiate d'éthyle.

Dérivés de	t _R (min)	R _s	lons fragment	s M	M-73
D,L-Ala	21.19-22.00	3.04	116	189	116
Gly	23.49	-	102	175	102
D,L-Val	26.73-27.36	2.25	144	217	144
D,L-Pro	29.88	ns	142	215	142
D,L-Ile	31.93-32.50	1.78	158	231	158
D,L-Leu	33.36-34.26	3.45	158	231	158
D,L-Asp	36.68-36.90	1.04	160	233	160
D,L-Asp (bis-esterified)	43.72-44.02	1.26	188	261	188
D,L-Asn	43.80-44.06	0.76	141 15	232	159
D,L-Thr	46.77-47.21	0.45	146 129	9 219	146
D,L-Ser (bis acetylated)	48.13-48.46	1.4	114 204	4 277	204
D,L-Met	49.09-49.75	2.62	249	249	176
D,L-Glu (bis-esterified)	51.86-52.46	2.67	202	275	202
D,L-Phe	53.04-53.54	1.82	192	265	192
D,L-Lys (bis acetylated)	62.58-63.95	1.32	156	318	245
D,L-His	62.67	ns	182	255	182
D,L-Cys (bis acetylated)	69.89-71.25	1.35	220	293	220
D,L-Tyr (bis acetylated)	69.92-71.22	1.27	280 10 ⁻	7 353	280

 $\begin{array}{l} t_{\text{R}}: \text{temps de rétention} \quad R_{\text{s}}: \text{résolution énantiomérique } R_{\text{s}} = 1.177 \; x(\; t_{\text{RL}} - t_{\text{RD}}) \; / \; (\delta_{\text{L}} + \delta_{\text{D}}) \\ \text{les largeurs des pics à mi hauteur)} \end{array} \tag{$\Delta_{\text{L}} + \delta_{\text{D}}$ for the temps of temp$

Tableau 9 : dérivés EtOH / ECF avec analyse sur colonne chirale

2.5.1.3. Analyse de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester :

Après fonctionnalisation avec le 2-chloropropanol et le chloroformiate d'éthyle selon le mode opératoire précédemment décrit, les chromatogrammes suivants sont obtenus (*Figures 18 et 19*). Les caractéristiques principales des dérivés obtenus sont reportées dans le *tableau 10*.



Figure 18 : Fonctionnalisation avec le 2-chloropropanol et le chloroformiate d'éthyle.

Un zoom sur le chromatogramme, permet de mieux visualiser la séparation des énantiomères (*Figure 19*).



Figure 19 : Séparation énantiomérique de dérivés 2-CIPrOH / ECF.

Dérivés de	t _R (min)	Rs	lons frag	gments	М	M-121.5
D,L-Ala	29.17-29.38	1.54	116		238	116
Gly	31.43	-	102		224	102
D,L-Val	34.07-34.28	1.53	144		266	144
D,L-Leu	37.95-38.19	1.67	158		280	158
D,L-IIe	38.33-38.53	1.41	158		280	158
D,L-Pro	40.62-40.84	1.52	142		264	142
D,L-Thr	44.06-44.25	1.33	146	129	268	146
D,L-Ser	45.30-45.44	1	132		254	132
D,L-Asn	48.6	ns	141	159	281	159
D,L-Met	53.27-53.39	0.75	176		298	176
D,L-Phe	57.08	ns	192		314	192
D,L-Cys (bis acetylated)	59.59	ns	220		342	220
D,L-Asp (bis-esterified)	61.61-61.76	0.91	237		358	237
D,L-Glu (bis-esterified)	67.44	ns	251		372	251
D,L-GIn	69.99	ns	173		295	173
D,L-Lys (bis acetylated)	74.77-74.87	0.48	156		295	173
D,L-His (bis acetylated)	75.7	ns	254		376	254
D,L-Trp	76.45	ns	130	231	353	231
D,L-Tyr (bis acetylated)	80.03	ns	107	208	330	208

 t_R : temps de rétention R_s : résolution énantiomérique R_s = 1.177 x(t_{RL} - t_{RD}) / (δ_L + δ_D) (δ_L + δ_D étant les largeurs des pics à mi hauteur).

Tableau 10 : dérivés 2-CIPrOH / ECF avec analyse sur colonne achirale

Afin de vérifier que cette méthode de fonctionnalisation ne provoque aucune racémisation, les acides aminés L puis les acides aminés D ont été fonctionnalisés séparément. La *figure 20* présente le chromatogramme obtenu pour les acides aminés L. Elle démontre que seul au plus 0.65% de l'autre diastéréoisomère est obtenu que la fonctionnalisation soit effectuée avec des acides aminés D ou le soit avec des acides aminés L. La formation de ce diastéréoisomère a été attribuée au fait que le 2 chloropropanol n'est optiquement pur qu'à 98%.



Figure 20 : Fonctionnalisation avec le 2-chloropropanol et le chloroformiate d'éthyle d'acides aminés L.

2.5.2. Discussion sur les méthodes d'analyse chirale

L'analyse des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl esters donne des pics d'intensité satisfaisante et 19 des 20 acides aminés sont identifiés par cette méthode. 8 des 18 paires d'acides aminés sont séparées avec des résolutions énantiomériques variées. Tous les énantiomères d'acides aminés D ont des temps de rétention plus courts que leurs homologues L. Cette méthode donne de bonnes résolutions énantiomériques pour les énantiomères d'acides aminés à chaîne alkyl (comme l'alanine, la valine, la proline, la leucine et l'isoleucine). Les résolutions énantiomériques sont satisfaisantes pour la sérine, la thréonine et l'acide aspartique. Les autres énantiomères d'acides aminés ne sont pas séparés.

Le ressuage de la colonne CP-Sil 19 CB étant faible, elle permet une bonne séparation des acides aminés et des énantiomères d'acides aminés malgré des points d'ébullition très proches. De plus, cette colonne présentant un faible bruit de fond même à haute température, des pics de faible intensité ont ainsi pu être détectés. L'utilisation du mode de détection SIM et l'automatisation de l'intégration de tous les pics détectés sont rendues possible du fait de la séparation de tous les acides aminés grâce à cette méthode.

La quantification de tous les acides aminés en une seule analyse est donc possible par cette méthode ce qui la rend particulièrement attractive pour l'analyse spatiale.

Concernant l'analyse des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester, 18 des 20 acides aminés sont identifiés. L'arginine comme dans le cas précédent mais aussi le tryptophane ne sont pas détectés. 12 des 17 paires d'acides aminés sont séparées avec des résolutions énantiomériques variables suivant l'acide aminé. Ces résolutions énantiomériques sont satisfaisantes pour tous les acides aminés exceptés pour l'acide aspartique, l'asparagine, et la thréonine. Par cette méthode, de nombreux acides aminés sont confondus : ainsi, l'asparagine et l'acide aspartique présentent quasiment le même temps de rétention, les pics des énantiomères de l'histidine et de la lysine se chevauchent, de même que ceux de la cystéine et de la thréonine. Cette méthode ne permet donc pas une quantification de tous les acides aminés en une seule injection, puisqu'il est impossible avec la version actuelle de notre GC-MS d'établir plusieurs groupes d'ions moléculaires caractéristiques à des intervalles de temps se chevauchant. Or, pour les faibles quantités de composés dont nous disposons après désorption des échantillons, ce facteur s'avère déterminant.

Nous avons donc utilisé la méthode formant des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2chloropropyl lorsque nous avions une mauvaise sélectivité des composés à analyser (pour les composés de l'expérience d'impact), et la méthode formant des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester avec une colonne chirale lorsque la sélectivité des

69

composés à analyser était satisfaisante, cette dernière permettant l'obtention de meilleures résolutions énantiomériques (expériences d'irradiation).

2.5.3. Validation des méthodes d'analyse

Les méthodes ont été choisies en fonction des acides aminés à quantifier. Ne pouvant établir plusieurs groupes d'ions moléculaires durant des mêmes intervalles de temps, la sélectivité des composés a été prioritaire dans le choix de la méthode (pas de coélution de composés). Pour les analyses chirales, c'est la résolution énantiomérique des composés qui a guidé notre choix. Grâce à l'analyse en SIM (selected ion monitoring) et la création de groupes d'ions moléculaires, chaque composé a pu être quantifié spécifiquement.

La justesse (erreur relative %) et la précision (CV %) ont été évaluées pour vérifier la répétabilité instrumentale ainsi que la répétabilité des méthodes de fonctionnalisations. Ainsi, des analyses de plusieurs lots de fonctionnalisations ont été effectuées ainsi que l'analyse répétée d'un même lot d'échantillons. Nous avons aussi vérifié la stabilité des composés dérivés sur 24 et 48 heures.

Erreur		7F-BuOH /	EtOH /	2ClPrOH /	TFE /	EtOH /	TFE /
relative	MTBSTFA	ECF	ECF	ECF	ECF	MCF	MCF
Ala	0,36%	0,22%	1,03%	0,46%	0,28%	0,20%	0,24%
Gly	0,35%	0,16%	2,16%	0,50%	0,17%	0,47%	0,13%
Aib	0,09%	-	1,58%	2,67%	-	-	-
Abu	0,16%	-	2,85%	1,27%	-	-	-
Asp	0,13%	0,28%	2,44%	2,02%	0,31%	1,92%	0,34%
Leu2	2,01%	-	-	-	-	-	-
Coefficient		7F-BuOH /	EtOH /	2ClPrOH /	TFE /	EtOH /	TFE /
variation	MTBSTFA	ECF	ECF	ECF	ECF	MCF	MCF
Ala	0,96%	0,25%	1,34%	0,62%	0,32%	0,29%	0,34%
Gly	0,97%	0,15%	2,62%	0,71%	0,18%	0,66%	0,19%
Aib	0,64%	-	3,05%	3,54%	-	-	-
Abu	0,46%	-	2,54%	1,66%	-	-	-
Asp	0,33%	0,35%	2,12%	2,53%	0,39%	2,21%	0,47%
Leu2	2,18%	-	-	-	-	-	-

Voici quelques données calculées pour différentes méthodes de fonctionnalisations :

Linápritá				
Lineante		/FBUUH/	ELOH /	Z CIPTOR /
R ²	MTBSTFA	ECF	ECF	ECF
Ala	0,9976	0,9989	0.9999	0,9999
Gly	0,9989	0,9976	0.9985	0,9999
Aib	0,9957	0,9978	0.9975	0,9999
Abu	0,9999	0,9996	0.9997	0,9998
Asp	0,9999	0,9926	0.9947	0,9957

Tableau 11 : critères de validation des différentes méthodes utilisées.

La linéarité des méthodes, estimée à partir des coefficients de détermination, a été étudiée pour les fonctionnalisations sélectionnées afin de quantifier les différents acides aminés.

Dans l'ensemble, toutes les méthodes de fonctionnalisation présentent des erreurs relatives faibles et des coefficients de variation corrects. La justesse et la précision sont améliorées par l'utilisation de trifluoroéthanol ou d'heptafluoroéthanol à la place de l'éthanol. La répétabilité est bonne (coefficient de variation inférieur à 3,54%) sur l'injection d'un même échantillon dérivé dans les mêmes conditions) quelle que soit la méthode utilisée. La fonctionnalisation au MTBSTFA présente une bonne répétabilité sur un même échantillon pour tous les acides aminés et en particulier pour l'acide aspartique mais une répétabilité sur différentes fonctionnalisations d'un même échantillon faible. En effet, les coefficients de variation peuvent atteindre 20% pour l'acide aspartique et la dileucine lors de fonctionnalisations répétées d'un même échantillon alors qu'ils n'atteignent pas plus de 8% pour ce même acide aminé lors de fonctionnalisations répétées à l'heptafluorobutanol.

Concernant la linéarité, les coefficients de détermination sont bons pour les quatre fonctionnalisations. La linéarité des méthodes n'est pas obtenue sur les mêmes gammes de concentration. En effet, la méthode au MTBSTFA reste précise pour de faibles quantités d'acide aminé (0.01 ng) mais n'est plus linéaire au-delà de 0.75 ng d'acide aminé fonctionnalisé injecté. Ce constat n'a pas été relevé pour les autres méthodes qui restent linéaires même lors d'injection de 50 ng d'acides aminés dérivés.

2.6 Conclusion des méthodes d'analyse

Cette partie concerne la mise au point de méthodes de désorption et d'analyse des acides aminés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Dans un premier paragraphe, l'extraction des acides aminés a été testée avec différents solvants. Dans le cas de la saponite, ce sont trois extractions avec une solution méthanol / eau (50/50 : v :v) qui ont été retenues.

Concernant la fonctionnalisation des acides aminés, les méthodes utilisant les chloroformiates d'alkyle sont particulièrement attractives du fait de la simplicité de leur mise en œuvre et de leur faible coût. Cependant, même en prenant de nombreuses précautions, ces fonctionnalisations s'effectuant en milieu aqueux, il est difficile de ne pas injecter quelques molécules d'eau dans le chromatographe. L'eau est à proscrire pour l'efficacité des colonnes de même que pour leur durée de vie et celle du multiplicateur d'électrons du spectromètre de masse. Aussi, la fonctionnalisation à l'aide de chloroformiates d'alkyle a été utilisée pour l'analyse des expériences d'impact avec la formation de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptaflurobutyl ester, et pour l'analyse chirale des acides aminés. Pour les autres expériences, notamment pour les expériences d'irradiation, la fonctionnalisation mise en œuvre pour l'analyse non chirale des acides aminés a été effectuée par silylation, cette fonctionnalisation présentant l'intérêt de présenter des limites de détection et des limites de quantification supérieures.
III. IRRADIATION D'ACIDES AMINES DANS LES CONDITIONS DE L'ESPACE

Les expériences décrites dans le chapitre suivant visent à étudier les effets sur les molécules organiques des conditions de l'espace (irradiation VUV, rayons cosmiques, vide, température) lors de leur transport au sein de météorites ou micrométéorites afin de mieux connaitre comment la Terre primitive a été enrichie par ces météorites.

Le flux solaire reçu pendant deux semaines d'exposition en orbite terrestre étant estimé à celui reçu pendant 2 millions d'années dans le milieu interstellaire (Barbier *et al.* 2000), il est intéressant d'exposer des molécules en orbite terrestre pour simuler un voyage interstellaire de plusieurs milliers d'années. De plus, durant la période hadéenne (période de bombardement intense de météorites), le rayonnement ultra violet était sans doute beaucoup plus important qu'il ne l'est actuellement. Le rayonnement UV sous vide, beaucoup plus énergétique que le rayonnement UV moyen, permet l'obtention de réactions chimiques inaccessibles autrement.

L'exposition de molécules organiques dans les conditions de l'espace permet donc l'obtention de différentes réactions chimiques qui ont pu avoir lieu dans le milieu interstellaire et sur la Terre à la période hadéenne ainsi que l'identification de différents produits de réaction. Ces produits de réaction seront comparés à ceux obtenus en laboratoire.

Aussi, plusieurs expériences ont été mises en œuvre dans l'espace pour connaitre l'effet du rayonnement VUV et du rayonnement cosmique (flux de particules de haute énergie : protons, noyaux d'hélium, électrons, rayons gamma et neutrinos) sur les molécules organiques. Les résultats obtenus dans l'espace seront comparés à ceux obtenus au sol. Ce chapitre comprend la description de plusieurs expériences d'irradiation :

 La préparation de deux expériences Process et Amino qui sont positionnées sur les modules EXPOSE-Eutef et EXPOSE-R de la station spatiale internationale (ISS).

- La préparation, description et analyse de trois expériences d'irradiation au sol, une au DLR de Cologne où les échantillons ont été irradiés entre 200 et 400 nm, et deux au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans où les échantillons ont été irradiés entre 112 nm et 370 nm.

La chambre d'irradiation mise en œuvre au CBM est un bon outil de simulation du flux solaire en orbite terrestre pour des longueurs d'onde inférieures à 200 nm : son flux est environ 8.5 fois plus important que le flux solaire sur cette gamme de longueurs d'onde et permet d'obtenir des réactions difficilement accessibles dans la gamme de longueurs d'onde 200-400 nm.

La chambre d'irradiation du DLR est, quant à elle, un bon outil de simulation concernant les longueurs d'onde de 200 à 400 nm : elle a un flux 5.2 fois plus important que le flux solaire.

Les flux en orbite terrestre, au DLR et au CBM sont reportés dans le tableau 12.

	Flux solaire	Irradiation	irradiations
	en orbite terrestre	DLR	CBM
Flux 100-400 nm	92.1 W.m ⁻²	479,2 W.m ⁻²	0,904 W.m ⁻²
(VV.III)	0.1 M/m^{-2}	$0.101 m^{-2}$	$0.950 \text{ W} \text{m}^{-2}$
(W.m ⁻²)	0,1 vv.m	0 vv.m	0,850 W.M
Flux 200-400 nm	92 W.m ⁻²	479,2 W.m ⁻²	0,054 W.m ⁻²
(W.m⁻²)			
Temps d'exposition		85 h 56 min	336 h
Energie reçue		1,5.10 ⁺⁵ kJ.m ⁻²	1,092.10 ⁺³ kJ.m ⁻²

Tableau 12 : flux en orbite terrestre, au DLR et au CBM

3.1 <u>Généralités</u>

La relation entre les synthèses organiques au sein des nuages interstellaires et les molécules prébiotiques a été évoquée par Kerridge en 1986 et Epstein en 1987 (Kerridge 1986; Epstein *et al.* 1987).

Depuis quelques années, cette hypothèse de l'origine exogène de la matière organique terrestre prévaut et de nombreux travaux relatent et/ou étudient la

question de la synthèse de la matière organique dans l'espace (Irvine 1998; Kerridge 1999; Munoz Caro *et al.* 2002) et de son importation sur Terre par les météorites, micrométéorites et comètes (Chyba & Sagan 1992; Irvine 1998; Kerridge 1999; Cohen & Chyba 2000; Brack 2005; Chyba & Hand 2006; Ehrenfreund & Sephton 2006; Maurette 2006; Oro *et al.* 2006).

L'aspect cométaire est principalement étudié au LISA de Créteil (Cottin *et al.* 2004; Benilan & Cottin 2007), à l'Institut d'Astrophysique Spatiale d'Orsay (Nuevo *et al.* 2008) et à l'université de Leiden (Ehrenfreund & Sephton 2006) alors que nous nous attachons plus, dans notre équipe, à l'aspect météoritique (Barbier *et al.* 2000; Barbier *et al.* 2001; Boillot *et al.* 2002). Cependant, notre équipe a aussi participé à la mise en œuvre et à l'analyse de mélanges gazeux irradiés sous forme de glaces (Munoz Caro *et al.* 2002).

3.1.3 Le rayonnement ultra-violet (UV)

Le rayonnement UV est un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 400 et 10 nm (énergie de 3 à 100 eV). Les longueurs d'ondes de ces UV sont comprises entre ceux de la lumière visible et ceux des rayons X. Les ultra-violets sont divisés en quatre régions distinctes :

- Les UV-A : de 400 à 320 nm,
- Les UV-B : 320 à 280 nm,
- Les UV-C : 280 à 190 nm,
- UV sous vide : 190 à 10 nm. Ils sont aussi appelés les UV lointains ou UV extrêmes.

Les trois familles UV-A, UV-B, et UV-C forment ce que l'on appelle les UV proches. L'énergie des photons pour les UV lointains est d'environ 6 à 20 eV pour des longueurs d'onde comprises entre 62 et 200 nm, et inférieur à 6 eV pour les UV proches dont les longueurs d'onde sont comprises entre 190 et 400 nm.

L'énergie de ces rayonnements induit des excitations électroniques et des ionisations.

L'état physique des molécules a une influence importante sur l'irradiation des molécules. En effet, à l'état gazeux, les rencontres intermoléculaires sont rares, l'excitation ou la modification chimique d'une molécule n'induit pas de réactions avec

d'autres molécules. A l'état liquide, la mobilité et la densité des molécules permettent les réactions intermoléculaires (le solvant joue alors un rôle extrêmement important). A l'état solide, une molécule excitée peut réagir avec ses voisines directes, mais l'absence de mobilité réduit cette possibilité. Bien évidemment, l'effet induit par ces rayonnements UV sera différent si les molécules sont situées dans un environnement absorbant ou non.

Suivant l'énergie des photons, on peut constater :

1° une simple accélération de l'agitation thermique des molécules, agitation constante dans tous les corps à une température un peu éloignée du zéro absolu.

2° le déplacement d'un électron sur une orbitale moléculaire plus énergétique que celle qu'il occupe habituellement. En général, un photon de lumière visible possède théoriquement une énergie suffisante pour réaliser cette modification de l'état électronique des atomes, ou des molécules, qui prennent ainsi un état dit " excité ". L'énergie du photon doit correspondre à celle qui est nécessaire au déplacement de l'électron sur sa nouvelle orbitale. Quand l'électron regagne, en une ou plusieurs fois, son orbitale primitive, l'énergie est libérée sous la forme de phénomènes d'émission de lumière de longue durée (phosphorescence) ou de courte durée (fluorescence).

3° l'arrachement d'un électron à l'attraction du noyau de son atome, ou des noyaux de la molécule. Pour ce faire, il faut, et suivant les cas, des photons (ou des particules) d'une énergie supérieure à 10 eV.

Bien d'autres effets peuvent être observés, mais le cas 2° (déplacement d'un électron, d'une orbitale sur une autre, par un photon d'énergie modérée) se rencontre fréquemment dans les phénomènes photochimiques. En effet, quand l'électron déplacé regagne son orbitale primitive, il libère l'énergie qu'il a emmagasinée. S'il appartient à une molécule complexe, celle-ci peut se fractionner en parties plus petites. Parfois, certains corps exposés à la lumière deviennent conducteurs d'électricité et il en résulte divers effets, comme une action catalytique photochimique. On rencontre aussi des phénomènes d'émission de lumière de longue durée (phosphorescence) - ou de courte durée (fluorescence).

Les différents types de transitions électroniques dépendent de la nature et de la composition chimique du composé. Les transitions couramment rencontrées sont les transitions $\pi \rightarrow \pi *$ (dans le cas de doubles liaisons), $\sigma \rightarrow \sigma *$ (dans le cas de simple liaison par exemple d'alcanes), $n \rightarrow \sigma^*$ (dans le cas d'alcools, d'halogènes, d'amines tri substituées (possédant un atome avec un doublet d'électrons libre) et $n \rightarrow \pi^*$ (dans le cas d'aldéhydes ou de cétones). L'intensité des bandes d'absorption est fonction de la probabilité de la transition.

3.1.4 Irradiation dans l'ultra violet (UV)

Les irradiations UV les plus fréquentes dans la littérature sont des irradiations de molécules organiques, par exemple de PAHs (pour Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) au sein de glaces d'eau (Bernstein *et al.* 2001; Bernstein *et al.* 2002a; Bernstein *et al.* 2003; Elsila *et al.* 2006; Elsila *et al.* 2007) ou des irradiations de glaces de petites molécules (H₂O, CO₂, CO, NH₃, CH₃OH...) seuls ou en mélange (Meierhenrich *et al.* 2002; Munoz Caro *et al.* 2002; Takano *et al.* 2003; Nuevo *et al.* 2006; Nuevo *et al.* 2007; Nuevo *et al.* 2008). Ces dernières irradiations produisent en général des acides aminés.

Quelques articles décrivent également les effets d'irradiation UV sur des acides aminés en solution aqueuse, libres ou liés les uns aux autres au sein de protéines (Vicendo *et al.* 2007), des irradiations de composés (2-aminoethanol, methylamine, ethylamine, acetonitrile) qui produisent de la glycine (Mita *et al.* 2004) et des irradiations UV à 193 nm d'amines, d'alcools ou d'amides qui produisent des acides aminés (glycine, α - et β -alanine et acide α , β et γ amino butyrique) (Morita *et al.* 2005).

Concernant les irradiations de films solides d'acides aminés sous rayonnement VUV, six études ont relevé mon attention (Barbier *et al.* 2000; Boillot *et al.* 2002; Jochims *et al.* 2004; Meierhenrich *et al.* 2005; Schwell *et al.* 2006; Tanaka *et al.* 2008). Elles sont détaillées dans le paragraphe suivant.

En lumière polarisée dans l'UV, trois publications sont à noter : les travaux de Meierhenrich (2005) qui obtient une destruction énantiosélective en irradiant de la leucine à l'état solide, les travaux de Bernstein (2002b) et ceux de Nuevo (2006) qui obtiennent des acides aminés avec des excès énantiomériques en irradiant des glaces en lumière polarisée.

3.1.5 Irradiation d'acides aminés sous forme de films solides

Les premiers travaux d'irradiation d'acides aminés dans l'espace ont été effectués à bord de satellites FOTON lors des expériences BIOPAN-1 et BIOPAN-2 (Barbier *et al.* 2000; Barbier *et al.* 2001). Lors du premier vol (du 14 juin au 2 juillet 1994), six acides aminés (Gly, Ala, Leu, Val, Asp, Glu) et un dipeptide (Ala₂) ont été exposés aux conditions de l'espace associés ou non à de l'argile. Les acides aminés ont été protégés lorsqu'ils étaient associés à l'argile et seuls les acides aspartique et glutamique ont été partiellement décomposés. Lors du deuxième vol (du 8 au 23 octobre 1997), des acides aminés photosensibles ont été exposés. Une perte de glycine due à une sublimation de ce composé a été mesurée. Aucune racémisation des composés n'a été constatée.

Lors de l'exposition de l'expérience PERSEUS à bord de la station orbitale MIR, quatre composés (leucine, methylleucine, thioethylester de trileucine, et dicétopipérazine de leucine) ont été exposés pendant 98 jours, associés ou non à différents composés minéraux d'épaisseurs variables (météorite d'Allende, poudre de basalte et argile de type montmorillonite). La météorite d'Allende, réduite en poudre, est la substance minérale qui protège le mieux : 5 µm de film de météorite d'Allende sont suffisants pour assurer la protection des composés organiques. La dégradation la plus fréquente est la décarboxylation.

Concernant les irradiations en laboratoire, des acides aminés (glycine associée aux acides aminés aromatiques, tyrosine et tryptophane) forment des dipeptides en étant irradiés à des longueurs d'onde comprises entre 100 et 200 nm (Simakov *et al.* 1994).

En 2004, les schémas de fragmentation de cinq acides aminés soumis à une photoionization (entre 6 et 22 eV, 56 à 206 nm) sont décrits (Jochims *et al.* 2004). Les acides aminés étudiés sont la glycine, l'alanine, la β -alanine, l'acide α -aminoisobutyrique et la valine.

Cette étude a été complétée par une étude équivalente, parue en 2006, sur d'autres biomolécules (Schwell *et al.* 2006). Au cours de cette étude, les premières énergies de ionisation enregistrées correspondent à 9.38 eV pour la glycine, 9.05 eV pour l'alanine et 9.1 eV pour l'acide amino isobutyrique (correspondant à des irradiations

de longueurs d'onde 132 nm pour la glycine, 137 nm pour l'alanine et 136 nm pour l'acide amino isobutyrique). Ces ionisations donnent lieu à des fragmentations.

De plus, des dimères d'alanine ont été formés à partir d'alanine sous rayonnements VUV (Tanaka *et al.* 2008). Les rendements quantiques de formation du dimère diffèrent suivant la longueur d'onde du rayonnement (208, 183, et 87 nm). Outre des désaminations et des décarboxylations, cette étude a aussi permis de révéler une décomposition de la chaine alkyl de la leucine lorsque celle-ci est irradiée.

De ces quelques données, il apparait qu'à l'état de films solides, les décompositions les plus fréquentes pour des acides aminés non aromatiques sont des décarboxylations, des désaminations, une décomposition de la chaine alkyl de la leucine, mais des formations de dimères sont également décrites.

3.2 Présentation des expériences

Les expériences PROCESS et AMINO, embarquées à bord de la station spatiale internationale, consistent à exposer aux rayonnements ultraviolets solaires des molécules solides ou des mélanges gazeux relatifs :

(1) aux comètes dans le cadre d'études sur l'origine des sources distribuées (POM (polyoxyméthylène), HMT (hexaméthylènetétramine), polymères d'acide cyanhydrique, de C_3O_2),

(2) aux météorites (acides aminés, bases azotées),

(3) à la chimie organique de l'atmosphère de Titan (tholins, mélanges gazeux représentatifs de l'atmosphère),

(4) à la stabilité photochimique de molécules organiques dans l'environnement martien (glycine, hopanes, lipides, kérogènes...).

L'analyse des résultats de ces expériences, à leur retour sur Terre, sera principalement effectuée par spectroscopie infrarouge et chromatographie en phase gazeuse. Les résultats seront comparés aux mesures de photolyse réalisées en laboratoire. Des informations complémentaires sur ces expériences ont été publiées dans Advances in Space Research, publication à laquelle nous avons participée (Cottin *et al.* 2008). Cette publication résume toutes les expériences d'irradiation en orbite terrestre effectuées à ce jour.

Concernant la participation de notre équipe aux deux expériences Process de Expose-Eutef et Amino de Expose-R, seuls des films solides d'acides aminés et d'un dipeptide, associés ou non à de la poudre de météorite ont été exposés dans le but de mieux cerner l'apport météoritique. Les échantillons sont exposés sous forme de films solides sur des fenêtres de MgF₂, associés ou non à de la poudre de météorite.

Pour Process, cinq acides aminés (alanine, acide γ -amino butyrique, acide α -amino isobutyrique, acide aspartique, glycine) et un dipeptide (dileucine) ont été choisis pour exposition pour la diversité de leur chaine latérale. Certains ont déjà été exposés à bord de BIOPAN 1, comme la glycine, l'alanine et l'acide aspartique, les autres n'ont encore jamais été exposés (acide γ -amino butyrique, acide α -amino isobutyrique et dileucine). La dileucine avait été exposée à bord de la station spatiale MIR sous forme de dicétopipérazine ce qui correspond à sa forme cyclique, beaucoup plus stable que le dipeptide.

Pour Amino, les mêmes acides aminés que pour Process ont été choisis, la valine a été ajoutée en supplément.

La poudre de météorite d'Allende a été choisie comme substance minérale, celle-ci offrant la meilleure protection pour les composés (Barbier *et al.* 2002; Boillot *et al.* 2002).

Des expériences préliminaires ont été réalisées en laboratoire, au DLR de Cologne et au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, dans le but de comparer les résultats obtenus en laboratoire et en orbite.

Au total, ce sont plus de 200 échantillons qui ont été préparés et ont été, sont ou seront analysés avec au moins 4 fonctionnalisations et 5 injections par échantillon soit donc un minimum de 20 injections par échantillon (8000 injections auxquelles se rajoutent les blancs et les témoins de calibration).

3.2.1 Expériences spatiales à bord de la station spatiale internationale

La *figure 21* situe sur la station spatiale internationale les expériences Process de Expose-Eutef et Amino de Expose-R.

Expérience Amino d'EXPOSE-R sur le module russe Zarya



Expérience Process d'EXPOSE-Eutef sur le module européen Colombus

Figure 21 : Expériences PROCESS et AMINO sur la station spatiale internationale

3.2.2 Expérience PROCESS de EXPOSE-Eutef









Porte - échantillons





ExpérienceProcess sur Expose-Eutef



Module Colombus de l'ISS

Figure 22 : Expérience PROCESS de EXPOSE-Eutef

L'expérience EXPOSE-Eutef (*Figure 22*) a été installée sur le module européen Columbus de la station spatiale internationale le 7 février 2008. L'exposition a démarré le 20 février 2008.

Cette expérience est couplée avec une expérience menée en parallèle au sol au DLR de Cologne où les échantillons sont (ou non) exposés entre 200 et 400 nm ; certains échantillons subissent les mêmes conditions de température et de pression que les échantillons exposés sur l'ISS, d'autres sont gardés à température et pression constante. Ceci permettra de mieux appréhender l'influence de chacun des facteurs mis en cause lors d'une exposition dans l'espace.

Ainsi 5 séries d'échantillons ont été préparées :

- 1 lot exposé aux conditions de l'espace et irradié (sur l'ISS)
- 1 lot exposé aux conditions de l'espace mais non irradié (sur l'ISS).
- 1 lot exposé aux conditions de l'espace et irradié entre 200 et 400 nm (au DLR)
- 1 lot exposé aux conditions de température et de pression de l'espace mais non irradié (au DLR)
- 1 lot laissé à température et pression constante, non irradié (au DLR).

Chaque lot d'échantillons comprend 10 cellules réparties comme suit :

- 3 cellules avec 100 μg des 6 composés : alanine, acide γ-amino butyrique, acide α-amino isobutyrique, acide aspartique, glycine et dileucine.
- 3 cellules avec les mêmes 6 composés + de la météorite d'Allende (de manière à avoir une épaisseur d'environ 5 µm).
- 2 cellules avec 100 µg d'acide aspartique seul.
- 2 cellules avec 100 µg d'acide aspartique + de la météorite d'Allende.

3.2.3 Expérience Amino de EXPOSE-R

Le dispositif d'exposition EXPOSE-R a été monté à bord de la station spatiale internationale le 26 novembre 2008 (*Figure 23*). L'expérience, qui devait démarrer initialement en décembre 2008 a été reportée. Elle a été installée à l'extérieur de la station sur le module russe Zarya au cours d'une sortie extravéhiculaire le 11 mars et a réellement démarré le 12 mars 2009.



Expérience Amino sur EXPOSE-R





Expérience Amino sur Expose-R

Figure 23 : Expérience AMINO de EXPOSE-R

Cette expérience est, elle aussi, couplée en parallèle à une expérience au DLR de Cologne où les échantillons sont (ou non) exposés entre 200 et 400 nm et ceci dans le même but que précédemment.

Les mêmes 5 séries d'échantillons ont été préparées.

Un sixième lot a aussi été préparé en même temps et gardé sous vide à température constante au CBM afin de servir de témoin supplémentaire.

Chaque lot d'échantillons comprend 10 cellules réparties comme suit :

- 3 cellules avec 20 μg des 7 composés : alanine, acide γ-amino butyrique, acide α-amino isobutyrique, acide aspartique, glycine, valine et dileucine.
- 3 cellules avec les mêmes 7 composés + 50 mg de météorite d'Allende (épaisseur estimée à environ 5 µm).
- 2 cellules avec 50 µg d'acide aspartique seul
- 2 cellules avec 50 µg d'acide aspartique + de la météorite d'Allende

Par rapport à l'expérience précédente la quantité d'acide aminé a été réduite (mais la surface exposée a elle aussi été réduite et la valine a été ajoutée comme composé supplémentaire.

3.2.4 Expérience au sol au DLR

L'expérience a eu lieu au mois d'avril 2007. Les échantillons ont été irradiés entre 200 et 400 nm (voir spectre *figure 24*). Deux lots d'échantillons avaient été préparés : l'un des lots a été exposé au rayonnement, l'autre a servi de contrôle.

Chaque lot d'échantillon comprenait 10 cellules réparties comme suit :

- 3 cellules avec 100 μg des 6 composés : alanine, acide γ-amino butyrique, acide α-amino isobutyrique, acide aspartique, glycine et dileucine.
- 3 cellules avec les mêmes 6 composés + de la météorite d'Allende (de manière à avoir une épaisseur d'environ 5 µm).
- 2 cellules avec 100 µg d'acide aspartique seul
- 2 cellules avec 100 µg d'acide aspartique + de la météorite d'Allende.

Les échantillons ont été irradiés entre 200 et 400 nm durant 86 heures et 56 minutes pour un flux total de 479.2 W.m⁻², correspondant à 1,5.10⁵ kJ.m⁻². Durant l'exposition, la température maximale atteinte a été de 57 °C.



Figure 24 : Spectre du flux de la lampe du DLR

3.2.5 Expériences au CBM

Afin de réaliser des expériences au sol, une chambre d'irradiation a été réalisée au CBM. Différentes expériences ont été mises en œuvre au CBM d'Orléans : deux sont présentées ici, d'autres sont en cours d'analyse.

Première expérience :

Une expérience similaire à celle du DLR de Cologne mais avec 15 jours d'irradiation entre 112 et 370 nm avec des échantillons sans surface minérale et avec des concentrations en acides aminés de 5 µg et de 50 µg.

Deux lots d'échantillons ont été préparés, l'un a été exposé, l'autre a été positionné dans la chambre d'irradiation mais n'a pas été exposé.

Chaque lot d'échantillons comprenait :

 4 cellules avec 5 μg des 6 composés : alanine, acide γ-amino butyrique, acide α-amino isobutyrique, acide aspartique, glycine, et dileucine. 4 cellules avec les mêmes 6 composés mais avec une concentration de 50 µg.

Deuxième expérience :

Une expérience avec uniquement 50 µg d'acide aspartique.

Deux lots d'échantillons ont été préparés, l'un a été exposé, l'autre a été positionné dans la chambre d'irradiation mais n'a pas été exposé.

Chaque lot d'échantillons comprenait :

- 4 cellules avec 50 µg d'acide aspartique.

Chambre d'irradiation

Afin d'irradier des échantillons en laboratoire, une enceinte à vide a été réalisée (*Figures 25, 26, 27*). Le but de cette enceinte était d'obtenir l'irradiation d'échantillons dans l'UV lointain pour des longueurs d'onde comprises entre 100 et 200 nm accessibles uniquement sous vide : la conception de l'enceinte et l'irradiation des échantillons ont été essentiellement mises en œuvre dans ce but.



Figure 25 : Photographie de la chambre d'irradiation du CBM

La chambre d'irradiation du CBM a été réalisée grâce à l'apport de Laurent Thirkell et de Benoit Couté du LPC2E (Laboratoire Physique et Chimie de l'environnement et de l'espace d'Orléans). Un cahier des charges a été établi afin de définir les fonctions attendues des pièces mécaniques manquantes puis plusieurs des pièces mécaniques ont été conçues et réalisées d'après le cahier des charges établi (deux porte-échantillons, un support de porte-échantillons, un support de porte-échantillons, un support de porte-échantillons, un support de porte porte porte de ventilation). Ces pièces mécaniques ont ensuite été assemblées et ajustées pour répondre aux besoins des expériences d'irradiations.

Cette chambre d'irradiation est une enceinte en acier inoxydable 304L d'environ 20 litres équipée de piquages de différents diamètres DN 40, DN 100 et DN 160, d'une vanne tiroir, d'un manipulateur Z, d'une vanne de remise à l'air, d'un hublot en MgF₂ et d'un hublot à ouverture rapide.

Le vide est assuré par une pompe primaire Pfeiffer Vacuum MVP 055-3 et une pompe turbomoléculaire Pfeiffer Vacuum TMH 261 P ; ce vide est contrôlé par une unité « operating unit DCU 600 ».

L'irradiation est effectuée grâce à une lampe deuterium cathodeon F05 (112-370 nm). Le flux reçu par les échantillons est contrôlé par une photodiode AXUV (116-254 nm). La température est régulée grâce à un cryothermostat Julabo FP 50, permettant une régulation selon une gamme de température –50°C à + 200°C). La température à l'intérieur de la chambre est contrôlée par un thermocouple K fourni par Hanna instruments.

Le vide de cette enceinte peut ainsi atteindre 10⁻⁸ mbar.



Figure 26 : Schéma général de la chambre d'irradiation.



Figure 27 : Schéma du dispositif d'irradiation des échantillons réalisé à l'intérieur de la chambre d'irradiation.

Lampe VUV (Vacuum Ultra Violet) :

La lampe choisie est une lampe deutérium Cathodeon de type FO5. C'est une des rares lampes qui émet en dessous de 200 nm (grâce à son corps en MgF₂) mais son spectre est assez différent du spectre solaire. Deux spectres de la lampe sont donnés : un spectre allant de 110 nm à 360 nm (*Figure 28*) et un zoom sur la gamme de longueurs d'onde 100 à 200 nm (*Figure 29*) afin de le comparer au spectre solaire (*Figure 30*). L'intensité de la lampe est variable d'une lampe à l'autre, ces lampes très spécifiques étant fabriquées sur mesure (d'où l'intérêt d'avoir une photodiode pour calculer le flux reçu par les échantillons).



Figure 28 : Spectre de la lampe FO5 de 110 à 370 nm



Figure 29 : Spectre de la lampe de 100 à 200 nm

Le spectre de la lampe est assez différent du spectre solaire enregistré dans l'espace (sans la protection émanant de l'atmosphère). La lampe, comme le spectre solaire, présente une raie à 122 nm que l'on appelle raie Lyman α très énergétique.



Figure 30 : Spectre solaire entre 100 et 200 nm (d'après données UARS-SOLSTICE)

D'après les calculs effectués, le flux de la lampe est environ 10 fois plus important que le flux solaire à 122 nm, mais le flux solaire est environ 7 fois plus important que le flux de la lampe à 200 nm. Si l'on intègre les spectres sur la gamme 100-200 nm, le flux de la lampe est de 850 mW.m⁻² alors que celui du spectre solaire est d'environ 100 mW.m⁻². Le flux de la lampe est donc environ 8.5 fois plus important que le flux solaire sur cette gamme de longueurs d'ondes.

Le flux de la lampe concernant la gamme de longueurs d'onde 200-400 nm est de 54 mW. m^{-2} : il représente seulement 5.9 % du flux total de la lampe ce qui n'est pas du tout le cas pour le flux solaire.

Le flux solaire est estimé à environ 1370 W.m⁻². Le flux solaire entre 200 et 400 nm représente environ 6.7 % du flux solaire total soit 92.1 W.m⁻². En dessous de 200 nm, il est de l'ordre de 100 mW.m⁻² alors qu'il est de 92 W.m⁻² dans la gamme de longueurs d'onde 200-400 nm : ce flux solaire est beaucoup plus important entre 200 et 400 nm : il représente 99.89 % du flux total (Nicolet 1989). Le tableau situé dans l'introduction reprend ces valeurs.

Photodiode :

Une photodiode AXUV permettant une mesure des photons dans la gamme de longueurs d'onde 116-254 nm a été installée au dessus du porte-échantillons. Cette photodiode étant extrêmement sensible, il a été nécessaire de l'encapsuler au sein d'une boite opaque et de limiter le flux arrivant sur la photodiode pour éviter sa saturation. Plusieurs systèmes d'atténuation ont été testés : un filtre à 193 nm, un diaphragme de 75 μ m, un diaphragme + un filtre, deux diaphragmes de 75 μ m et enfin deux diaphragmes et un filtre. Voici les différents spectres qui ont été enregistrés au cours des expériences (Figure 31) : avec un seul filtre, la photodiode sature trop, avec un seul diaphragme, il y a des effets de diffractions et sans doute de réflexions dus aux bords, avec deux diaphragmes et un filtre, la tension reçue par la photodiode est trop faible.

C'est donc l'option avec deux diaphragmes qui a été préférée (Figure 32), cette dernière donnant une indication précise et donc plus facilement exploitable.



Figure 31 : Flux reçu par la photodiode avec différentes configurations.



Figure 32 : Flux reçu par la photodiode avec deux diaphragmes.

3.3 Calcul de flux

D'après le temps d'exposition et le flux reçu par la photodiode, l'énergie reçue par les échantillons peut être calculée. Ainsi au cours des deux irradiations effectuées au CBM, les échantillons ont reçu 14 jours d'irradiation à 903 mW.m⁻² soit 1,092.10⁺⁶ Joules par m² soit pour un échantillon irradié sur une surface de 0.385 cm², 42,03 Joules.

L'énergie moyenne des photons fournie par la lampe est de 1,241.10⁻¹⁸ Joule (pour un photon de 160 nm) ; chaque échantillon a donc reçu environ 3.10⁺¹⁹ photons durant les 14 jours d'irradiation.

3.4 Dépôt d'échantillons

Différents essais de dépôts d'échantillons ont été testés : des essais de vaporisation sous forme de spray, des dépôts à la pipette avec différentes conditions de séchage (sous lampe, sous P_2O_5 , à différentes températures (de 10 à 50 °C), de vide (de

pression ambiante à 10 mbars) des essais de sol-gel (spin et dip-coating). Aucune de ces méthodes n'a donné de dépôts homogènes reproductibles. La moins mauvaise solution a été obtenue en déposant la solution contenant les échantillons à la pipette avec séchage lent (à l'air libre et température ambiante).

Pour de prochaines expériences, nous envisageons d'irradier des échantillons comportant un seul composé qui pourront alors être déposés par sublimation. Cette méthode, qui a été mise en œuvre au LISA de Créteil par Hervé Cottin et collaborateurs, permet une bonne homogénéité des dépôts par condensation d'un composé après sublimation. Elle peut être mise en œuvre sur différents supports et a permis l'obtention de dépôts homogènes, d'épaisseurs différentes, satisfaisants notamment pour les acides aminés. Cependant, certains composés ne peuvent être déposés par cette méthode (par exemple, la condensation de l'acide aspartique par sublimation a échoué et les dépôts de cet acide aminé n'ont pu être réalisés).

3.5 Préparation des échantillons

Bien que la préparation ait quelque peu varié selon les expériences, un mode opératoire général est donné ici. Des procédures très détaillées ont été rédigées pour chaque expérience afin de n'omettre aucune étape (comme des étapes de lavages, de pesées, de prises de vues).

Pour résumer, pour chaque expérience le mode opératoire suivant a été effectué :

Des solutions de chacun des composés ont été préparées en fonction de la solubilité des composés (2 mg/mL pour les acides aminés Gly, D-Ala, D-Val, Aib, Abu; 2.5 mg/mL de D-Asp et 1.5 mg/mL pour Leu₂).

Une solution contenant la même quantité en masse de chaque acide aminé a été préparée (0.625 mg/ml de chaque acide aminé pour Expose–Eutef et 0.267 mg/ml pour Expose-R).

La quantité nécessaire pour l'expérience a été déposée sur la cellule à la pipette et séchée à l'air libre pour les échantillons ne comprenant pas de météorite.

La quantité nécessaire pour l'expérience a été mélangée à de la poudre de météorite préalablement pesée dans un microtube puis le tout a été déposé sur la cellule à la

pipette et séchée à l'air libre pour les échantillons comprenant de la poudre de météorite. Des pesées et des prises de vue des échantillons ont été effectuées. Chaque cellule a ensuite été scellée sous azote pour transport. Elles ont ensuite été positionnées sur les porteurs et sur l'expérience (voir photos).

3.6 Extraction et analyse des échantillons après irradiation

Les procédures d'extractions utilisées ont été mises au point pour la première expérience au DLR de Cologne et pour les expériences au CBM (les autres étant en cours). Les mêmes procédures seront mises en œuvre au retour des autres expériences.

3.6.1 Extraction

Le dépôt est extrait avec 3 x 200 μ L de solution méthanol / eau (50/50 : v /v). Le méthanol est évaporé sous vide dans une enceinte à vide avec pompe à membrane puis l'eau est évaporée sous vide au speed vac (centrifugeuse sous vide avec pompe à huile). Le culot est repris avec 1 mL d'eau milliQ. 0,1 mL de solution est prélevé pour la fonctionnalisation, le reste étant congelé pour analyses ultérieures. L'étalon interne (valine) est ajouté et le tout est directement fonctionnalisé pour l'analyse chirale (fonctionnalisation avec l'éthanol dans la pyridine et le chloroformiate d'éthyle) ou l'échantillon est de nouveau évaporé au speed vac puis fonctionnalisé avec le MTBSTFA, et 1 μ L de cette solution silylée est injectée dans le chromatographe.

3.6.2 Fonctionnalisation

Pour chacun des échantillons, deux fonctionnalisations ont été réalisées et systématiquement répétées pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

La première fonctionnalisation, réalisée avec le MTBSTFA a permis de mesurer la quantité des acides aminés restants après irradiation et de rechercher des sous produits éventuellement formés. Le détail du mode opératoire pour cette fonctionnalisation figure au paragraphe 2.5.1.1.2.

La deuxième fonctionnalisation a été réalisée avec l'éthanol dans la pyridine et le chloroformate d'éthyle sur colonne chirale dans le but d'identifier la racémisation ou non des échantillons durant l'irradiation. Le détail du mode opératoire employé figure au paragraphe 2.5.1.1.1.

3.6.3 Analyse chromatographique

Le détecteur utilisé est dans tous les cas le spectromètre de masse, qui a été utilisé en mode SIM (selected ion monitoring) pour la quantification des composés exposés et en mode scan pour l'analyse des produits secondaires formés lors des expériences d'exposition.

3.6.4 Analyse quantitative non chirale

L'analyse non chirale des composés a été effectuée via leurs dérivés silylés sur une colonne Varian CP-Sil19CB (30 m x 0.25 mm, 0.2 µm). La température du four a été ajustée à 125°C pendant 5 min puis programmée pour atteindre 250°C à 5°C/min. La quantification des composés a été réalisée par la création de groupes d'ions fragments selon les intervalles de temps suivants (*Tableau 13*) :

		ion fragment
acide aminé	intervalle de temps	m/z
Ala	09.00-10.00	158
Gly	10.00-10.70	147
Aib	10.70-11.10	172
Abu	11.10-13.00	172
S.I.	13.00-15.00	186
Asp(TBDMS)	15.00-24.00	302
Leu ₂	24.00-30.00	200

Tableau 13 : groupes d'ions fragments recherchés

La quantification des composés a été effectuée par la méthode d'étalonnage interne.

3.6.5 Analyse quantitative chirale

L'analyse chirale des composés a été effectuée via leurs dérivés N(O,S)ethoxycarbonyl ethyl ester sur une colonne Macherey-Nagel Chirasil L-Val (25 m x 0.25 mm, 0.12 µm). La température du four a été ajustée à 80°C pendant 5 min puis programmée pour atteindre 155°C à 2°C/min. A 155°C, la température est maintenue pendant 5 minutes. La quantification a été réalisée par la création de groupes d'ions fragments selon les intervalles de temps suivants (*Tableau 14*) :

		ion fragments
acide aminé	intervalle de temps	m/z
Aib	15.00-16.20	130
D,L-Ala	16.20-18.00	116
Gly	18.00-20.00	102
S.I	20.00-31.00	144
D,L-Abu	31.00-37.00	130
D,L-Asp	37.00-42.00	160
Leu ₂	42.00-44.00	57

Tableau 14 : groupes d'ions fragments recherchés

La quantification des composés a été effectuée par la méthode de l'étalonnage interne. Au cours de l'analyse des données, seuls les acides aminés Ala, Abu et Asp qui présentent un centre de symétrie ont été considérés. Cette méthode, a été mise en œuvre afin de connaitre si ces composés subissaient une racémisation au cours de leur irradiation. Cette dernière bien que moins sensible que la méthode utilisant le MTBSTFA a permis la vérification des résultats obtenus par une autre méthode de fonctionnalisation pour les acides aminés considérés.

3.7 <u>Résultats obtenus au sol</u>

3.7.1 Résultats obtenus au DLR

L'expérience qui a eu lieu en mai 2007 a consisté en une irradiation d'échantillons comprise entre 200 et 400 nm durant 15 jours.

Différents échantillons ont été préparés :

- des échantillons avec les 6 composés : alanine, acide γ-amino butyrique, acide α-amino isobutyrique, acide aspartique, glycine et dileucine : deux lots de trois échantillons avec météorite (un lot irradié, un lot témoin) et deux lots de trois échantillons sans météorite (un lot irradié, un lot témoin).
- des échantillons avec un seul composé, l'acide aspartique : deux lots de deux échantillons avec météorite (un lot irradié, un lot témoin) et deux lots sans météorite (un lot irradié, un lot témoin).

Les résultats obtenus pour les échantillons contenant les six composés avec météorite sont présentés ci-dessous (*Figure 33*) :

Il est à noter que l'échantillon irradié 3 a dû être écarté (problème lors du traitement de l'échantillon).



Figure 33 : résultats obtenus au DLR pour les échantillons avec poudre de météorite

Des pourcentages moyens de chaque acide aminé présent dans les échantillons irradiés et témoins ont été calculés par rapport à la solution initiale. Après calculs, les résultats considérés acide aminé par acide aminé, sont les suivants (*Figure 34*) :



Figure 34 : résultats obtenus au DLR pour les échantillons avec poudre de météorite en fonction de la nature des acides aminés

Dans l'ensemble, il y a peu de différence entre les échantillons témoins et irradiés. Une différence entre la solution initiale et les échantillons, témoins et irradiés, est constatée pour l'alanine et la glycine, ce qui signifie une perte de ces acides aminés lors de la mise en œuvre de l'étape de désorption. Afin d'y remédier, une modification du mode opératoire a été effectuée pour les échantillons suivants.

Une perte de dileucine pour les échantillons irradiés est à relever : une différence notable de dileucine est constatée entre les échantillons témoins et les échantillons irradiés.

Pour les échantillons avec les six composés sans météorite, les résultats suivants ont été obtenus (*Figure 35*) :



Figure 35 : résultats obtenus au DLR pour les échantillons sans poudre de météorite

Après calculs, les résultats moyennés considérés acide aminé par acide aminé sont les suivants (*Figure 36*) :



Figure 36 : résultats obtenus au DLR pour les échantillons sans poudre de météorite en fonction de la nature des acides aminés

Seule, une différence pour la dileucine entre les échantillons témoins et échantillons irradiés est à relever.

Si l'on compare tous les échantillons avec et sans météorite, les résultats sont donc les suivants (*Figure 37*) :



Figure 37 : résultats obtenus au DLR pour les échantillons sans poudre de météorite en fonction de la nature des acides aminés

La modification du traitement d'échantillons (évaporation sous vide à faible température au lieu de température moyenne), a permis d'obtenir des pourcentages en alanine et glycine corrects pour les échantillons sans météorite. Une perte importante de dileucine est à noter (de 46 à 80 %) pour les échantillons irradiés avec ou sans présence de météorite.

Voici les résultats obtenus pour les échantillons contenant l'acide aspartique avec et sans météorite (*Figure 38*) :



Figure 38 : résultats obtenus au DLR pour l'acide aspartique avec et sans poudre de météorite.

En considérant la moyenne des résultats décrits par rapport à la solution initiale, le graphique suivant est obtenu (*Figure 39*) :



Figure 39 : résultats moyennés obtenus au DLR pour l'acide aspartique avec et sans poudre de météorite.

Une dégradation de 58 à 80% d'acide aspartique est constatée pour les échantillons irradiés qu'ils aient été irradiés avec ou sans présence de météorite : les résultats obtenus présentent cependant des variations importantes d'un échantillon à l'autre.

3.7.2 Résultats obtenus au CBM

Deux expériences d'irradiation menées dans la chambre d'irradiation du CBM, sont présentées ici.

La première expérience a consisté à irradier les mêmes acides aminés que ceux irradiés au DLR de Cologne mais avec une irradiation plus énergétique (longueurs d'onde comprises entre 112 et 370 nm), sans météorite ni autre surface minérale protectrice. Deux quantités d'acides aminés ont été testées : des dépôts de 5 et de 50 µg ont été effectués.

La deuxième irradiation a été réalisée avec des dépôts de 50 µg d'acide aspartique comme seul composé.

Première expérience :

Pour les dépôts de 5 µg d'acides aminés, les résultats suivants ont été obtenus (*Figure 40*) :



Figure 40 : résultats obtenus au CBM pour 5 µg d'acides aminés sans poudre de météorite.

Après calculs, les résultats moyennés, considérés acide aminé par acide aminé, sont les suivants (*Figure 41*) :



Figure 41 : résultats moyennés obtenus au CBM pour 5 µg d'acides aminés sans poudre de météorite en fonction de la nature des acides aminés.

Pour les dépôts de 50 µg d'acides aminés, les résultats suivants ont été obtenus (*Figure 42*) :



Figure 42 : résultats obtenus au CBM pour 50 µg d'acides aminés.

Après calculs, les résultats moyennés considérés acide aminé par acide aminé sont les suivants (*Figure 43*) :



Figure 43 : résultats moyennés obtenus au CBM pour 50 µg d'acides aminés en fonction de la nature des acides aminés.

Pour les dépôts de 5 µg en acides aminés, aucune différence entre les échantillons témoins et irradiés n'est relevée alors qu'il semble que l'acide aspartique et la dileucine des échantillons à 50 µg aient été dégradés.

Deuxième expérience :

Au cours de cette expérience seul l'acide aspartique a été exposé.

Les résultats suivants ont été obtenus après traitement des échantillons (Figure 44).


Figure 44 : résultats obtenus au CBM pour l'acide aspartique.

Par rapport à la solution initiale, les pourcentages moyennés pour les échantillons sont donc les suivants (*Figure 45*) :



Figure 45 : résultats moyennés obtenus au CBM pour l'acide aspartique.

68 % à 75 % d'acide aspartique sont retrouvés dans les échantillons exposés : une dégradation de 25 à 32 % d'acide aspartique est constatée au cours de l'irradiation.

3.8 Discussion

L'énergie reçue par les échantillons est 150 fois plus importante dans le cadre de l'exposition au DLR que dans les expériences mises en œuvre au laboratoire. Cependant, l'énergie fournie au DLR, au CBM et dans l'espace n'est pas constituée de photons de même énergie ni des mêmes particules (puisqu'il existe en plus dans l'espace le rayonnement cosmique). De plus, l'énergie reçue par les échantillons est différente de l'énergie absorbée. Cette dernière dépend de la composition chimique des composés irradiés pour lesquels il serait utile d'obtenir des spectres d'absorption sur la gamme 100-200 nm. Ces spectres nécessitent un spectrophotomètre sous vide.

Lorsque nous disposerons de ces spectres, et de résultats fiables sur des composés irradiés séparément, nous pourrons alors calculer, d'après le flux de photons incident, le flux de photons absorbés et ensuite établir pour chaque composé, un rendement quantique défini par la relation :

Rendement quantique = nb de molécules transformées / nb de photons absorbés

Concernant l'expérience au DLR :

Les résultats de l'expérience effectuée au DLR à Cologne montrent qu'aucune racémisation n'a été constatée dans les échantillons et que les acides aminés alanine, glycine, acide amino isobutyrique, acide amino butyrique, ne subissent aucune dégradation au cours de l'irradiation.

Par contre, la perte d'une proportion importante de dileucine (entre 46 et 80 %) et d'acide aspartique (entre 58 et 80%) est constatée après irradiation : ces composés sont dégradés au cours de l'irradiation qu'ils soient associés ou non à de la poudre de météorite. Cependant, les résultats obtenus étant assez aléatoires et le nombre d'échantillons considérés insuffisant, d'autres expériences devront être mises en œuvre pour confirmer les résultats obtenus.

Des résultats analogues ayant été obtenus avec et sans présence de météorite, celle-ci n'apparait pas, pour cette expérience, un élément protecteur des composés.

Concernant les expériences au CBM :

Les résultats des expériences mises en œuvre dans la chambre d'irradiation du CBM montrent que les acides aminés alanine, glycine, acide amino isobutyrique, acide amino butyrique à 5 µg comme à 50 µg, ne subissent aucune dégradation au cours de l'irradiation. De plus, aucune racémisation d'acide aminé n'a été constatée quel que soit l'échantillon considéré.

Les composés acide aspartique et dileucine à 5 µg ne semblent pas avoir subi de dégradation alors qu'ils apparaissent dégradés pour les échantillons à 50 µg. En effet, pour ces échantillons, 15 % d'acide aspartique et 39 % de dileucine sont en moyenne dégradés. Cette différence n'est interprétable que par le fait que les échantillons à 5 µg étaient situés à l'extérieur du porte échantillon lors de l'exposition, alors que les échantillons à 50 µg étaient situés au centre : l'irradiation ayant eu lieu alors que la photodiode n'était pas encore installée, des mesures ont été effectuées a postériori : il s'avère que les échantillons situés à l'extérieur reçoivent un flux environ 3.8 fois inférieur à celui des échantillons situés au centre, ce qui permet d'expliquer cette différence. Aussi, la deuxième irradiation a consisté en l'irradiation d'échantillons moins nombreux mais répartis de manière homogène par rapport au flux de la lampe.

Concernant la deuxième expérience des résultats plus homogènes ont été obtenus puisque la dégradation d'acide aspartique s'étend de 25 à 32 % suivant l'échantillon considéré. Des cinétiques de dégradation de cet acide aminé ainsi qu'une prolongation du temps d'exposition sont programmée pour la prochaine irradiation. Il serait aussi nécessaire d'avoir le spectre de cet acide aminé entre 100 et 200 nm.

De plus, des dépôts d'échantillons par sublimation sont prévus dans le but d'évaluer si l'obtention de dépôts plus homogènes peut améliorer la reproductibilité des résultats.

Cette technique avait précédemment été écartée parce que nous avions fait le choix d'un dépôt simultané de plusieurs composés que cette méthode ne permettait pas et parce que l'obtention d'un dépôt d'acide aspartique s'était avérée impossible par sublimation. Cependant, la méthode par sublimation permet le dépôt d'un composé sous une forme amorphe nettement plus homogène que celle obtenue par la méthode par évaporation. Elle pourrait permettre d'améliorer la reproductibilité des résultats obtenus même si elle n'est pas envisageable pour tous les composés.

De plus, afin de se soustraire aux problèmes rencontrés lors du traitement d'échantillons, l'ajout d'étalons marqués (par exemple deutérés) correspondants aux composés irradiés serait aussi très utile.

Nos résultats s'avèrent tout à fait conformes à ceux précédemment obtenus en orbite terrestre. En effet, lors de précédentes irradiations les composés les plus fragiles avaient été les acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique et acide glutamique), les acides aminés les plus résistants, les acides aminés à chaine alkyl (Barbier *et al.* 2000), ce que nous avons retrouvé à la fois avec des acides aminés précédemment exposés mais aussi avec de nouveaux acides aminés. De plus, des dommages sur la leucine avec des coupures de sa chaine alkyl avaient été identifiés (Boillot *et al.* 2002). Il est tout à fait probable que ce procédé ait eu lieu sur la dileucine bien que nos premières analyses par GC-MS n'aient pu le révéler. Aussi, d'autres analyses sont actuellement en cours et de futures expériences d'irradiation prolongée de la dileucine seule devraient permettre d'identifier et de quantifier tous les produits de dégradation d'un composé irradié sur son dépôt solide avant la solubilisation dans l'eau nécessaire à l'analyse par GC-MS.

Nos résultats ne correspondent pas à ceux obtenus par Schwell et Jochims (Jochims *et al.* 2004; Schwell *et al.* 2006) puisque ces auteurs relèvent des premières dégradations des acides aminés glycine, alanine et acide amino isobutyrique pour des photons d'énergie 9.38 eV, 9.05 eV et 9.1 eV correspondants à des longueurs d'onde de 132, 137 et 136 nm. Ces expériences, ayant lieu à l'état gazeux, il existe peu de possibilité de dispersion d'énergie (comme cela est le cas pour nos échantillons sous forme de films) puisque les premières fragmentations de la glycine ont lieu à son potentiel de l'ionisation (9.38 eV). Aussi, il n'est pas sûr que des dégradations de ces composés puissent être obtenues sous forme de films dans la chambre d'irradiation du CBM même au cours d'expériences d'irradiations prolongées.

3.9 Conclusions, perspectives des expériences d'irradiation

Deux expériences d'exposition d'échantillons d'un ou plusieurs acides aminés et dipeptides, associés ou non à une matrice minérale, ont été mises en œuvre sur la station spatiale internationale et sont actuellement en cours : les données recueillies permettront de mieux connaitre l'effet du rayonnement VUV et rayonnement cosmique sur des acides aminés, de confirmer l'hypothèse d'une importation des molécules exposées sur la terre primitive par les météorites ou les micrométéorites, et d'extrapoler leur temps de stabilité dans le milieu interstellaire (une semaine d'irradiation en orbite terrestre étant évaluée correspondre à 1 million d'années dans le milieu interstellaire). Cependant, les températures atteintes au cours des différentes expériences d'irradiation sont plus élevées que celles relevées dans le milieu interstellaire. L'effet des rayons cosmiques est aussi mal évalué. Ces expériences sur la station spatiale internationale sont corrélées à des expériences d'irradiation de molécules en laboratoire au DLR à Cologne fournissant la même énergie mais avec des photons moins énergétiques situés dans une gamme de longueur d'onde différente.

Une première expérience a eu lieu au DLR à Cologne avec une irradiation d'échantillons entre 200 et 400 nm correspondant à une énergie de 1,5.10⁺⁵ kJ.m⁻². Aucune dégradation pour les acides aminés aminés alanine, glycine, acide amino isobutyrique, acide amino butyrique n'a été relevée. Des dommages sur l'acide aspartique et sur la dileucine ont été constatés.

Une chambre d'irradiation a été créée et assemblée au Centre de Biophysique Moléculaire afin d'irradier des échantillons entre 112 et 370 nm dans des conditions proches de celles de l'espace sur la gamme de longueurs d'onde 100-200 nm permettant d'obtenir d'autres types de réactions que sur la gamme 200-400 nm. Deux expériences ont été mises en œuvre. La première était similaire à celle qui a eu lieu au DLR de Cologne mais avec des proportions en acides aminés différentes et sans poudre de météorite. Elle a conforté les résultats obtenus au DLR : les acides aminés alanine, glycine, acide amino isobutyrique, acide amino butyrique n'ont subi aucune dégradation au cours de l'irradiation. 15 % d'acide aspartique et 39 % de

dileucine ont été dégradés au cours de l'exposition pour les échantillons ayant reçu une énergie de 1,092.10⁺³ kJ.m⁻². Lorsque ces mêmes échantillons ne reçoivent que 0,287.10⁺³ kJ.m⁻², aucune dégradation n'est constatée.

La deuxième expérience, a consisté en une irradiation unique d'acide aspartique. 25 à 32 % de perte de cet acide aminé a été relevée. La différence entre ces deux expériences et les pourcentages de dégradation relevés s'expliquent par le fait que l'acide aspartique a été irradié seul en quantité plus importante au cours de la deuxième irradiation alors qu'il a été irradié en mélange en moindre quantité lors de la première expérience.

Quelles que soient les expériences mises en œuvre au DLR ou au CBM, l'alanine, la glycine, l'acide amino isobutyrique, et l'acide amino butyrique, n'ont subi ni racémisation ni dégradation au cours des irradiations alors que des pertes ont été constatées pour l'acide aspartique et la dileucine. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus.

Certains échantillons sont en cours d'analyse afin d'identifier les produits de dégradation de l'acide aspartique et de la dileucine. De plus, d'autres expériences d'irradiation sont programmées afin de conforter et affiner les résultats précédemment obtenus. Des dépôts d'échantillons par sublimation sont envisagés pour certains composés comme la dileucine afin d'évaluer si ce paramètre améliore la reproductibilité des résultats obtenus.

Les expériences mises en œuvre au laboratoire et décrites ici avaient pour but de simuler les expériences envoyées sur la station spatiale internationale et de tester la chambre d'irradiation du CBM. Ces irradiations de 14 jours ont permis de simuler 119 jours d'exposition sur la station spatiale internationale pour des longueurs d'onde comprises entre 100 et 200 nm (soit 2 millions d'années dans le milieu interstellaire), et elles ont permis d'identifier des composés d'intérêt sur lesquels nous allons maintenant porter nos efforts.

IV. EFFET SUR LES ACIDES AMINES D'IMPACTS METEORITIQUES SIMULES EN LABORATOIRE

Les impacts météoritiques ont pu conduire à l'extinction d'organismes vivants mais ils ont aussi pu apporter les molécules nécessaires à l'apparition de ce vivant.

Actuellement, c'est l'origine exogène de la matière organique qui prévaut. De plus en plus d'expériences sont mises en œuvre pour mieux comprendre l'effet des rayons cosmiques et de l'irradiation VUV sur les molécules organiques lors de leur voyage spatial au sein de météorites et de micrométéorites (voir chapitre précédent) mais l'effet des impacts météoritiques sur la matière organique est assez peu étudié. Aussi, nous avons mise en œuvre, en collaboration avec le Nasa-Johnson Space Center de Houston, une expérience permettant de mesurer la dégradation et la racémisation d'acides aminés et d'un dipeptide lors d'impacts météoritiques à diverses pressions (de 12 à 28.9 GPa). Une partie de cette expérience est actuellement en cours de publication (Bertrand *et al.* in press).

4.1 Généralités sur les impacts météoritiques par simulation

Des gaz éjectés dans l'atmosphère à la suite d'impacts météoritiques ont été analysés (Mukhin *et al.* 1989), des composés organiques ont été synthétisés grâce à des chocs par laser à haute énergie simulant des impacts (McKay 1997), des peptides ont été synthétisés à partir d'acides aminés immergés dans de l'huile minérale à l'aide de décharges électriques (Marcano *et al.* 2001) ; l'effet d'impact de comètes de 1 à 5 km de diamètre tombant sur terre à des vitesses de 15, 20 et 25 km.s⁻¹ a aussi été modélisé par Pierazzo et Chyba (Pierazzo & Chyba 1999), mais peu d'expériences de simulation ont été menées pour étudier l'effet des impacts météoritiques sur la matière organique.

Trois échantillons de la météorite de Murchison ont été soumis à des chocs correspondants à des pressions de 19, 20 et 36 GPa (Tingle *et al.* 1992). Les analyses effectuées par spectrométrie de masse ont démontré une perte de matière organique par volatilisation pouvant atteindre 70 % et une diminution du rapport alcènes / alcanes.

Des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs) enrobés dans une matrice hydratée et non hydratée ont été soumis à des chocs allant jusqu'à environ 30 GPa (Mimura & Toyama 2005). A cette pression, 95% de ces PAHs sont décomposés et transformés en des composés proches de la suie.

Trois expériences ont été effectuées sur des acides aminés (Peterson *et al.* 1997; Blank *et al.* 2001; Chen *et al.* 2007).

Dans les expériences de Blank et Chen, les acides aminés sont en solution saturée dans l'eau et les températures atteintes peuvent être extrêmement élevées (jusqu'à 500°C). Dans l'expérience de Peterson, les acides aminés sont enrobés au sein de poudre de météorite d'Allende et de Murchison et la température atteinte ne dépasse pas 150°C.

Dans le cas de solutions d'acides aminés saturées (Blank *et al.* 2001; Chen *et al.* 2007), des polymérisations d'acides aminés sont constatées après impact. Ces transformations apparaissent être davantage le fait de la pression exercée que de la température atteinte. L'alanine est le seul acide aminé étudié dans l'expérience de Chen. Les pressions utilisées n'excèdent pas 4 GPa dans cette expérience. Les analyses ont été effectuées par spectroscopie Raman.

Dans l'expérience décrite par Blank, la lysine, la proline, la phénylalanine, l'acide γ amino butyrique et la norvaline ont été étudiés. Les pressions exercées vont jusqu'à 21 GPa. Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'acide γ -amino butyrique s'est avéré l'acide aminé le plus stable, la phénylalanine, le moins stable. Des polymérisations et des cyclisations sous forme de dicétopipérazines ont été identifiées après impact.

La proline, l'acide aspartique, la phénylalanine, l'acide glutamique, l'acide α aminobutyrique, la norleucine, l'isovaline et l'acide isobutyrique ont été étudiés dans l'expérience de Peterson (Peterson *et al.* 1997). La pression exercée atteint 32 GPa. Les analyses ont été effectuées par chromatographie gazeuse. Les acides aminés sont partiellement détruits et une proportion d'entre eux subie une énantio-inversion (ou racémisation partielle) c'est-à-dire qu'une partie de l'énantiomère de l'acide aminé concerné va, au cours de l'impact, être transformé en son énantiomère (énantiomère L transformé en D et inversement). Certains produits secondaires

formés suite aux impacts ont été identifiés : il s'agit de l'alanine, la glycine, la β alanine, l'acide γ -aminobutyrique et l'acide β -aminoisobutyrique.

Les conditions et les principaux résultats décrits dans ces publications sont résumés dans le *tableau 14* et comparés à l'expérience que nous avons mise en œuvre décrite ci-après et en cours de publication (Bertrand *et al.* in press).

	Chen, 2007	Blank, 2001	Peterson, 1997	Bertrand, sous presse
Acides aminás	alanina			alaning
Acides annies	aidiiiile	proline	proline	aidiiiite
		phenylalanine	phenylalanine	
		priorigiaiarinto	acide aspartique	acide aspartique
		acide v-aminobutvrique		acide v-aminobutvrique
		norvaline		norvaline
			acide aminoisobutyrique	acide aminoisobutyrique
			acide α -aminobutyrique	tert-Leucine
			norleucine	acide diaminopropionique
			isovaline	glycine
			acide glutamique	valine
				sérine
		lysine		cystéine
				dialanine
Etat	solution saturée	solution saturée	enrobés dans une	enrobés dans une
	dans l'eau	dans l'eau	matrice de météorite	matrice d'argile
Pressions exercées	1.23	5,1	3.5	12
(GPa)	1,98			15
	2,69			21
	2,78			28,9
	3,67	21	32	
Température (°C)	500°C	139°C à 597 °C	< 150°C	< 150°C
Technique(s) d'analyse	Spectroscopie Raman	LC-MS	GC	GC-MS
Résultats obtenus	polymérisation	polymérisation	destruction	destruction
	perfinenceation	dicétopipérazine	racémisation	racémisation
Stabilité		Abu le plus stable	Phe le plus stable	tLeu le plus stable
		Phe le moins stable	Pro, Glu les moins stables	Cys, DAPA moins stables
			produits secondaires	produits secondaires
			Ala, Gly,Aib, β -Ala, Abu	Gly, Ala
Acides aminés protéiques	Acides aminés no	on protéiques Dir	peptide	

Tableau 14 : résumé des expériences de Chen, Blank, Peterson et Bertrand.

4.2 Présentation de l'expérience

Afin de connaître l'effet d'impacts météoritiques sur des acides aminés et un dipeptide, ces derniers ont été enrobés au sein d'une matrice minérale d'argile et ont subi des pressions de chocs comprises entre 15 et 28.9 GPa. Ces chocs, effectués au Nasa - Johnson Space Center de Houston, simulent des impacts de faibles intensités correspondant à des météorites terrestres tombant à des vitesses comprises entre 2.4 à 5.8 km.s⁻¹. Ces chocs sont comparables à ceux de météorites tombant sur la Terre avec des angles assez faibles par rapport à la surface de la Terre ou tombant dans l'eau des océans.

4.2.1 Choix des acides aminés

Dans notre expérience, nous avons repris certains acides aminés déjà étudiés dans les expériences précédentes pour comparaison et nous en avons testés d'autres inusités afin d'élargir la gamme.

C'est essentiellement la composition chimique des acides aminés qui a guidé notre choix (voir *figure 3*).

En effet, nous avons voulu testé l'effet des chocs d'impact :

1) sur la longueur de la chaîne alkyl.

Nous avons ainsi choisi la glycine (sans chaîne latérale), l'alanine (avec un groupe -CH₃ en chaîne latérale), l'acide γ -amino butyrique (avec un groupe -CH₂-CH₃ en chaîne latérale) et la norvaline (avec un groupe -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃ en chaîne latérale).

2) sur le groupement fonctionnel de la chaîne latérale.

Nous avons ainsi choisi l'acide aspartique (avec un groupe -CH₂-COOH en chaîne latérale), la sérine (avec un groupe -CH₂-OH en chaîne latérale), la cystéine (avec un groupe -CH₂-SH en chaîne latérale), l'acide diaminopropionique (avec un groupe -CH₂-NH₂ en chaîne latérale) afin de comparer la stabilité des groupements acide, hydroxyl, thiol et amine.

3) sur la substitution de la chaîne latérale.

Nous avons ainsi choisi l'alanine (avec un groupe $-CH_3$ en chaîne latérale), l'acide γ -amino butyrique (avec un groupe $-CH_2-CH_3$ en chaîne latérale), la valine (avec un groupe -CH-(CH₃)₂ en chaîne latérale) et la tert-Leucine (avec un groupe -C-(CH₃)₃ en chaîne latérale) afin de comparer la stabilité de groupements nonsubstitués avec ceux mono di ou tri substitués.

4) sur la substitution de l'acide aminé.

Nous avons ainsi choisi la glycine qui est non substitué, l'alanine (monosubstitué, avec un groupe -CH₃), et l'acide aminoisobutyrique (disubstitué, avec deux groupes -CH₃).

4.2.2 Choix de la surface minérale

Nous avons recherché une matrice minérale se rapprochant de celle des météorites carbonées. La saponite et la serpentine sont les deux argiles qui s'en rapprochent le plus (Jones & Brearley 2006; Ohnishi & Tomeoka 2007). La saponite (lot 1433 ruduo, Pologne) nous a été fournie par Sjerry Van der Gaast du Netherlands Institute of Sea Research (Nioz, Texel, Pays-Bas).

4.3 Préparation des échantillons

4.3.1 Préparation de l'argile

La saponite a été lavée à l'eau et les particules les plus fines ont été utilisées pour l'expérience d'impact. Pour ce faire, la saponite a été décantée plusieurs fois dans une éprouvette contenant de 500 mL d'eau milliQ. Le surnageant contenant l'argile a été prélevé après 30 secondes de décantation de manière à ne conserver que les particules les plus fines et les plus homogènes. Les différents surnageants ont été réunis, centrifugés puis ont été lavés plusieurs fois à l'eau milliQ (par centrifugations et prélèvements répétés du surnageant). L'argile ainsi obtenue a été séchée sous vide sans chauffage ni P_2O_5 afin de ne pas modifier la structure de l'argile et ses propriétés.

4.3.2 Préparation des échantillons

Des solutions aqueuses de chacun des onze acides aminés et du dipeptide ont été effectuées. Ces solutions sont diversement concentrées en fonction de la solubilité

du composé concerné : les concentrations de ces solutions initiales sont ainsi comprises entre 5.10⁻³ et 10⁻¹M. Une solution mère contenant 100 µmoles de chacun des composés a ensuite été préparée à partir des solutions précédentes. La moitié du volume de cette solution a été congelé afin de servir de référence pour des contrôles ultérieurs. L'autre fraction a été utilisée pour la préparation des échantillons et pour des contrôles préalables à cette préparation (fonctionnalisations des acides aminés et analyses par GC-MS avant la préparation des échantillons). La préparation des échantillons a eu lieu comme suit, la *figure 46* présente les différentes pièces du porte-échantillons :

175 mg d'argile ont été déposés dans un mortier et broyés.

105 µL de la solution mère contenant 0,5 µmole de chacun des composés sont ajoutés et mélangés à l'argile.

Le mélange résultant (acides aminés + argile) est transféré dans un porte-échantillon (**A**) en acier de 2,5 cm de diamètre et de 1,12 cm de profondeur que l'on laisse quelques jours à température ambiante pour séchage.

Un bouchon-piston (**B**) est positionné sur le porte-échantillon et l'ensemble est vissé dans une bague en acier (**C**) de 3,4 cm de diamètre et de 2 cm de profondeur.

L'opération est renouvelée pour chacun des 6 échantillons.

Ces assemblages sont enveloppés, numérotés et emballés précieusement pour leur transport jusqu'à Houston.



Figure 46 : Photographie du dispositif porte-échantillons

C'est au « Johnson Space Center » que les assemblages (**A+B+C**) seront positionnés dans un large cylindre métallique (**D**) ; l'ensemble sera alors la cible d'impact (et non le projectile).

4.4 Le laboratoire de simulation d'impacts météoritiques (Figure 47) :



Figure 47 : Photographies du laboratoire de simulation d'impacts

L'instrument utilisé pour la mise en œuvre des chocs est composé d'un fusil avec un long canon qui s'étend jusqu'à une enceinte à vide (**Target Chamber**), et d'instruments optiques permettant de calculer la vitesse du projectile.

Le porte-échantillon assemblé (**A+B+C+D**) est positionné dans l'enceinte mise sous vide ($\sim 10^{-2}$ torr).

Le fusil sert à envoyer le projectile sur la cible contenant l'échantillon selon une vitesse prédéfinie. La pression exercée est fonction de la densité du métal utilisé pour le projectile. Les pressions les plus élevées sont réalisées avec des projectiles de densités importantes. La pression est mesurée en calculant la vitesse du projectile grâce à des faisceaux laser infra rouge et des photodiodes.

Après le choc, les échantillons sont refroidis aussi vite que possible afin d'éviter des effets supplémentaires inhérents à une température élevée. Pour ce faire, l'enceinte à vide est remise à pression ambiante et l'échantillon est placé sur une surface

aluminium refroidie à -20°C. L'échantillon est ainsi rapidement refroidi à température ambiante. La procédure entre l'impact et le placement de l'échantillon sur la surface refroidie ne nécessite pas plus de 2 minutes et tous les échantillons recouvrent une température ambiante en 10 minutes maximum.

Pour notre étude, les échantillons ont subi des pressions allant de 12.0 à 28.9 GPa. Pour notre expérience, la température n'a pas été enregistrée mais la température maximum atteinte durant l'expérience est estimée à 58°C pour l'échantillon ayant subi une pression de 30 GPa (Peterson *et al.* 1997).

Les porte-échantillons étant extrêmement déformés par le choc, ils ne peuvent être dévissés. Ils ont été prédécoupés au Johnson Space Center afin de ne laisser qu'une surface d'environ 2 mm au-dessus de l'échantillon. De retour au CBM, le métal a été lentement usiné à 45°C jusqu'à ce que le couvercle métallique soit dégagé et que l'échantillon apparaisse (*Figure 48*).



Figure 48 : Photographie des porte-échantillons après retour d'impact et découpage des couvercles

4.5. Extraction et analyse des composés après impact

La poudre contenant l'argile et les composés à analyser a été transférée dans un tube afin d'y subir les extractions et centrifugations nécessaires à la désorption des composés à analyser. Une attention toute particulière a été portée afin de recouvrer la quasi-totalité des acides aminés et du dipeptide (voir chapitre II) et afin de limiter la racémisation lors de l'extraction et de la fonctionnalisation des composés (Shock & Schulte 1990) avant leur analyse par chromatographie gazeuse.

4.5.1. Extraction des acides aminés et dipeptide

Les acides aminés et le dipeptide ont été extraits par trois extractions-centrifugations successives par une solution méthanol /eau (50/50 : v/v).

Après ajout d'environ 2 mL de solution méthanol / eau, le tube est placé sous ultrasons pendant 15 minutes puis centrifugé 15 min à 10000 tour par min. Après le troisième prélèvement, les surnageants sont réunis évaporés à sec à la centrifugeuse sous vide. Le culot est alors repris dans 1 mL d'eau purifiée par dissolution 15 min sous ultrasons.

Les échantillons sont alors stockés au congélateur avant analyse.

4.5.2. Fonctionnalisation des acides aminés et peptide

Les composés ont d'abord été fonctionnalisés par une méthode décrite par Husek (Husek 1998; Husek 2005). Grâce à l'utilisation d'heptafluorobutanol dans la pyridine et du chloroformiate d'éthyle, la formation de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluoro-butyl ester est réalisée. Cette méthode a été optimisée au sein du laboratoire selon le mode opératoire décrit au paragraphe 2.5.1.1.

La mise au point d'une méthode de quantification de chacun des composés à été réalisée à partir de cette fonctionnalisation.

De plus, la racémisation a été quantifiée par une méthode développée au laboratoire (Bertrand *et al.* 2008) qui permet la formation de dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester grâce à la fonctionnalisation avec le 2-chloropropanol dans la pyridine et le chloroformiate d'éthyle.

Pour chaque échantillon, deux fonctionnalisations avec les deux méthodes décrites ont été réalisées et chaque solution a été injectée 5 fois (20 injections au total) afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

La D-leucine, et parfois l'octadécane dans l'hexane, ont été ajoutés à chaque analyse comme étalon interne.

4.5.3. Analyse chromatographique

Un chromatographe Agilent de type 6890 a utilisé pour cette étude. Il est couplé à un spectromètre de masse de type 5973. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur et l'injection a été effectuée en mode sans division (splitless). La température de l'injecteur a été positionnée à 230°C, celle du détecteur à 250°C.

Pour l'analyse des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluoro-butyl ester, la température du four a été ajustée à 120°C pendant 5 min puis programmée pour atteindre 200°C à 3°C/min. A 200°C, la température est maintenue pendant 5 minutes.

Pour l'analyse des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester, la température du four a été ajustée à 125°C pendant 5 min puis programmée pour atteindre 220°C à 5°C/min. A 220°C, la température est maintenue pendant 5 minutes.

4.5.4. Analyse quantitative non chirale des composés

L'analyse non chirale des acides aminés a été effectuée par l'analyse de leurs dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluoro-butyl ester et par leur quantification par la création de groupes d'ions fragments selon les intervalles de temps suivants (*Tableau 15*) :

acide aminé	intervalle de	ion fragment	
	temps (min)	m/z	
Aib	6.60-7.00	130	
Ala	7.00-8.00	116	
Gly	8.00-8.90	102	
Abu	8.90-9.50	130	
Val	9.50-10.20	144	
tLeu	10.20-11.00	329	
NVal	11.00-12.00	144	
Leu / S.I.	12.00-13.00	158	
Asp	13.00-18.00	342	
Ser	18.00-20.00	132	
C ₁₈ H ₃₈ / S.I.	20.00-26.00	85	
Ala ₂	26.00-26.90	116	
Cys	26.90-27.80	220	
Ala ₂	27.80-28.30	116	
DAPA	28.30-29.00	102	

Tableau 15 : groupes d'ions fragments recherchés

La quantification des composés a été effectuée par la méthode de l'étalonnage interne : les aires des pics de chacun des composés ont donc été comparées avec les aires des étalons internes et des coefficients de réponse relatifs ont été calculés. Les meilleurs coefficients de détermination ont été obtenus avec la leucine comme étalon interne. Les coefficients de réponse relatifs ci-dessous sont donc donnés par rapport à l'aire des pics de la leucine. Des droites d'étalonnage ont donc été effectuées comme suit (*Figure 49*) et la quantité d'acides aminés restants après impact calculée par rapport à ces droites étalons. Les valeurs correspondant aux droites d'étalonnage sont reportées dans le *tableau 16*.

La concentration à 0.05 mole.L⁻¹ correspond à l'injection de 1 μ L de 0.05 μ mole de chacun des composés. Tous les composés ont des limites de détection supérieures à 0.5 nmole.



Figure 49 : Droites d'étalonnage des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester des différents acides aminés

mole.L ⁻¹	0,001	0,005	0,0125	0,025	0,05	К	R^2
Aib	0,0007	0,0020	0,0059	0,0112	0,0241	0,4739	0,9978
D-Ala	0,0122	0,0573	0,1342	0,3035	0,5925	11,8490	0,9989
Gly	0,0117	0,0581	0,1299	0,3071	0,6172	12,2350	0,9976
Abu	0,0164	0,0795	0,1896	0,4074	0,8046	16,0850	0,9996
D-Val	0,0170	0,0824	0,1930	0,4153	0,8285	16,5230	0,9995
tLeu	0,0081	0,0362	0,0781	0,1551	0,2913	5,9289	0,9973
NVal	0,0196	0,0980	0,2436	0,5006	0,9983	19,9520	0,9999
D-Asp	0,0055	0,0452	0,1207	0,2734	0,6093	11,8040	0,9926
D-Ser	0,0003	0,0031	0,0086	0,0253	0,0415	0,8556	0,9809
Cys	0,0014	0,0147	0,0473	0,1135	0,2748	5,2138	0,9811
(Ala)2	0,0027	0,0365	0,1855	0,3765	0,8289	16,1340	0,9921
DAPA	0,0039	0,0700	0,1787	0,3812	0,8265	16,1590	0,9962

K : coefficient de réponse relatif R^2 : coefficient de détermination de la droite de régression

Tableau 16 : Données concernant les droites d'étalonnage

4.5.5. Analyse quantitative chirale des composés

L'analyse chirale de certains acides aminés a été effectuée par l'analyse de leurs dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester et par leur quantification par la création de groupes d'ions fragments selon les intervalles de temps suivants (*Tableau 17*) :

	intervalle de	ion fragments
acide aminé	temps	m/z
Ala	14.00-15.80	130
Gly	15.80-16.20	116
Abu	16.20-16.80	130
Val	16.80-17.35	144
tLeu	17.35-17.70	158
NVal	17.70-18.40	144
Leu / S.I.	18.40-19.00	158

Tableau 17 : groupes d'ions fragments recherchés

La quantification des composés a été effectuée avec la méthode de l'étalonnage interne : les aires des pics de chacun des composés ont été comparées avec les aires de l'étalon interne (la leucine) et des coefficients de réponse relatifs ont été calculés.

Des droites d'étalonnage ont donc été effectuées comme suit (*Tableau 18, Figure 50*) et la quantité d'acides aminés restants après impact calculée par rapport à ces droites étalons.

La concentration à 0.05 mole.L⁻¹ correspond à l'injection de 1 μ L de 0.05 μ mole de chacun des composés.

mole.L ⁻¹	0,005	0,025	0,05	К	R^2
D-Ala	0,102	0,502	1,000	20,025	0,9999
D-Abu	0,11	0,604	1,211	24,188	0,9998
D-Val	0,119	0,601	1,198	23,979	0,9999
D-tLeu	0,013	0,067	0,135	2,6893	0,9999
D-NVal	0,11	0,556	1,110	22,211	0,9999

Tableau 18 : Données concernant les droites d'étalonnage



Figure 50 : Droites d'étalonnage des dérivés N(O,S)-ethoxycarbonyl 2-chloropropyl ester des différents acides aminés

4.6. Résultats obtenus

Trois paramètres ont été mesurés :

- la perte de poids de l'échantillon due à la volatilisation de certains composés de l'échantillon.

- l'effet de la pression d'impact sur les acides aminés.

- l'effet de la pression d'impact sur l'énantio-inversion (ou racémisation partielle)

4.6.1. Volatilisation

Chaque échantillon a été pesé avant et après impact. La perte de poids de ses échantillons augmente avec la pression d'impact exercée. Aussi, un paramètre dit de volatilisation des composés de l'échantillon a été calculé comme suit :

volatilisation = (masse ech initial – masse ech impact) / masse ech initial

Où la « masse _{ech initial} » est la masse de l'échantillon avant impact et où « masse _{ech} _{impact} » est la masse de l'échantillon après impact. La courbe suivante est alors obtenue (*Figure 51*) :



Figure 51 : Volatilisation des échantillons en fonction de la pression

La volatilisation est faible (perte de masse inférieure à 10%) en dessous de 15 GPa mais atteint 40% de l'échantillon à 28.9 GPa.

4.6.2. Effet de la pression d'impact sur les acides aminés

Chaque acide aminé de chaque échantillon a quantifié avec les aires des pics des chromatogrammes.

Ci-dessous deux exemples de chromatogrammes réalisés pour le premier avant impact sur un échantillon témoin (*Figure 52*) et, pour l'autre, après un impact à 28.9 GPa (*Figure 53*).



Figure 52 : Chromatogramme d'un échantillon témoin avant impact



Figure 53 : Chromatogramme d'un échantillon après un impact de 28.9 GPa.

Le pourcentage de la quantité de chaque composé restant par rapport à la quantité initiale a été porté en fonction de la pression d'impact exercée *(Tableau 19, Figure 54)*.

Pression (GPa)	0	12	15,3	21	28,9
Aib	97%	83%	74%	61%	4%
D-Ala	99%	83%	86%	99%	4%
Gly	98%	71%	70%	44%	1%
Abu	98%	87%	83%	59%	2%
D-Val	98%	88%	83%	60%	2%
tLeu	101%	100%	99%	72%	2%
NVal	101%	89%	85%	58%	1%
D-Asp	100%	54%	44%	13%	0%
D-Ser	99%	54%	40%	17%	0%
Ala ₂	99%	30%	17%	3%	0%
Cys	97%	3%	2%	0%	0%
DAPA	94%	2%	1%	0%	0%

 Tableau 19 : Pourcentage d'acides aminés restants après impact.

Les courbes suivantes ont ainsi été obtenues :



Figure 54 : Pourcentage d'acides aminés restants dans les échantillons après impact en fonction de la pression exercée.

Les acides aminés peuvent être répartis en deux groupes. Le premier groupe, le plus résistant, concerne les acides aminés à chaine alkyl : l'acide aminoisobutyrique (Aib), l'alanine (D-Ala), l'acide aminobutyrique (Abu), la valine (D-Val), la tert-Leucine (tLeu), la norvaline (NVal) et la glycine (Gly). Ce groupe résiste bien à la pression puisque la plupart des composés sont conservés à plus de 50% à 21 GPa et que tous sont conservés même à 28.9 GPa.

Le deuxième groupe résiste moins bien aux pressions d'impact. Il est quant à lui, constitué des acides aminés avec des fonctions réactives sur leur chaine latérale : acide aspartique (D-Asp), sérine (D-Ser), cystéine (D-Cys), acide diaminopropionique (DAPA) et du dipeptide.

La quantité des composés diminue beaucoup plus fortement pour ce deuxième groupe que pour le premier. Deux d'entre eux, la cystéine et l'acide diaminopropionique, ne sont pas retrouvés à 21 GPa et tous sont entièrement détruits à 28.9 GPa.

4.6.3. Effet de la pression d'impact sur l'énantio-inversion (ou racémisation partielle)

Les quantités d'énantiomères L produites à partir des isomères D de l'alanine, de la valine, de la norvaline, de l'acide butyrique et de la tert-Leucine ont été quantifiées et les pourcentages d'énantio-inversion ont été reportés en fonction de la pression d'impact subie par les échantillons.

Les pourcentages d'énantio-inversion de chaque acide aminé ont été calculés comme suit :

% = quantité de L-aa / (quantité de L-aa + quantité de D-aa)

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant (Tableau 20)

Pression (GPa)	0	15,3	21,0	28,9
Ala	2%	4%	18%	43%
NVal	2%	4%	11%	35%
Abu	2%	4%	10%	32%
Val	2%	4%	9%	23%
tLeu	2%	5%	6%	15%
Leu / S.I.	2%	2%	2%	2%

Tableau 20 : Pourcentage d'énantio-inversion en fonction de la nature des acides aminés et de la pression d'impact exercée

Il est à noter que le (S)-(+)-2-chloropropanol n'est énantiomériquement pur qu'à 98%. Aussi, de ce fait, 2% de l'autre dérivé diastéréoisomère est formé même dans l'échantillon témoin (ce pourcentage varie d'un lot de chloropropanol à l'autre).



Figure 55 : Pourcentage de racémisation des acides aminés en fonction de la pression exercée

Le graphique ci-dessus présente le pourcentage d'énantio-inversion en fonction de la pression d'impact exercée. Cette énantio-inversion est faible (inférieure à 20%) jusqu'à une pression de 21 GPa mais atteint jusqu'à 40 % d'un composé lorsque l'échantillon est exposé à une pression d'impact de 28.9 GPa.

4.7. Discussion

Les principaux effets subis par la matière organique au cours des impacts sont :

- Une volatilisation de l'échantillon.
- Une destruction des acides aminés et du dipeptide
- Une énantio-inversion des énantiomères d'acide aminés

4.7.1. Volatilisation

Au cours de l'impact, une perte de masse de l'échantillon a été mesurée. Cette perte de masse est faible (<10%) jusqu'à 15 GPa et atteint 40% de la masse de

l'échantillon à 28.9 GPa (voir paragraphe 4.6.1). Cette perte de masse est due à l'éjection de composés volatiles, contenues au sein de l'échantillon.

Glavin et Bada (Glavin & Bada 2001) décrivent que la majeure partie des molécules éjectées sont de l'eau et des petites molécules organiques comme la glycine. De même, Tingle et al. (Tingle *et al.* 1992) a remarqué des signatures chimiques différentes entre les échantillons avant et après impact.

Notre expérience confirme la perte de petites molécules à faibles point d'ébullition comme l'eau et la glycine.

La perte de poids mesurée dans les échantillons est trop importante pour être due aux seules molécules organiques. La saponite contient beaucoup d'eau au sein de ses feuillets et la perte de poids de l'échantillon est sans doute majoritairement due à l'évaporation d'eau dans l'échantillon au cours des chocs d'impact.

La glycine possède un faible point d'ébullition et présente un comportement intermédiaire entre le groupe d'acides aminés résistants, composés des acides aminés à chaines alkyl et celui des acides aminés comprenant une fonction sur leur chaine latérale (voir graphique paragraphe 4.6.2). Aussi, ce comportement intermédiaire de la glycine pourrait être expliqué par la volatilisation d'une partie de ce composé et viendrait corroborer les résultats de Glavin et Bada.

4.7.2. Effet des impacts sur les composés

Les résultats présentés au paragraphe 4.6.2 indiquent une bonne conservation des molécules organiques puisqu'une grande partie d'entre elles sont encore présentes à 21 GPa. Deux groupes sont cependant à distinguer : le premier groupe composé des acides aminés à chaine alkyl (Aib, D-Ala, Gly, D-Abu, D-Val, tLeu and NVal), qui est plus résistant à la pression que le deuxième groupe, composé des acides aminés présentant une fonction sur leur chaine latérale (D-Asp, D-Ser, D-Cys, DAPA) et du dipeptide (D-Ala-D-Ala). Le deuxième groupe est moins résistant et ne résiste pas à la pression de 28.9 GPa.

Acides amines à chaine alkyl (Aib, Gly, Abu, D-Val, tLeu and NVal):

Les acides aminés Aib, Abu, D-Val, et NVal ont des comportements très similaires. Cette similarité peut être expliquée par leur structure chimique très proche. La tertLeucine, qui est plus stable que les autres, est trisubstituée. La trisubstitution de sa chaine latérale pourrait être une explication à cette résistance plus importante.

La glycine est l'acide aminé que l'on retrouve en moindre quantité dans ce groupe. L'explication la plus probable est la volatilisation de cet acide aminé à faible point d'ébullition mais c'est aussi un acide aminé qui est non substitué sur sa chaine latérale donc moins stable, et cet élément, au regard du comportement de la tert-Leucine pourrait aussi être un facteur explicatif de cette perte de masse.

A l'intérieur de ce groupe, l'alanine (et dans une moindre mesure la glycine) présente un comportement particulier. En effet, la masse d'alanine à 21 GPa est plus importante qu'à 15.3 GPa, elle-même plus importante qu'à 12 GPa. Ce phénomène peut être expliqué par la formation d'alanine comme produit secondaire, produit secondaire qui pourrait être essentiellement due à la coupure du dipeptide Ala-Ala en acide aminé Ala mais il pourrait aussi être dû à la coupure des fonctions amine, hydroxyl, thiol et acide des acides aminés DAPA, Ser, Cys, et Asp. De même, la glycine pourrait être, comme décrit par Peterson et al. (Peterson *et al.* 1997), un produit secondaire formé par la destruction d'autres acides aminés. Cet acide aminé pourrait être produit lors de la coupure de la chaine latérale de la valine, norvaline ou acide aminobutyrique et permettrait d'expliquer les masses très semblables pour la glycine à 15.3 et à 12 GPa.

Acides amines à chaine fonctionnelle (D-Asp, D-Ser, D-Cys, DAPA) :

Ces acides aminés sont moins résistants à la pression que leur homologues à chaine alkyl. L'acide aspartique (avec une fonction carboxylique) et la sérine (avec une fonction hydroxyl) présentent des comportements similaires et sont les plus stables de ce groupe ; la cystéine (avec une fonction thiol) et l'acide diaminopropionique (avec une fonction amine) présentent des comportements similaires et sont les moins stables.

Les groupements carboxylique et thiol apparaissent donc, dans cette étude, plus résistants à la pression de choc que les groupements thiol et amine.

Les fonctions réactionnelles sont plus labiles lors des chocs que les chaines alkyl.

4.7.3. Enantio-inversion (ou racémisation partielle)

L'énantio-inversion augmente avec la pression subie par les échantillons ; elle est corrélée à la destruction des composés. En effet, plus la proportion d'acides aminés détruits augmente, plus l'énantio-inversion s'accroit. Cette augmentation peut être due à la température subie par l'échantillon, une température élevée étant source de racémisation.

Cette énantio-inversion est fonction de l'acide aminé considéré. En effet, l'acide aminé le plus sensible parait être l'alanine suivi de la norvaline et de l'acide butyrique ; La tert-leucine et la valine sont les plus résistants à la racémisation ce qui suggère un effet protecteur de la ramification de la chaine latérale puisque la valine possède un carbone di-substitué et la tert-leucine un carbone tri-substitué sur sa chaine latérale.

Cependant, le pourcentage de L-alanine est surement plus important qu'il ne devrait être, puisque le dipeptide Ala-Ala -qui devait être D,Ala-D,Ala et ne présenter qu'un seul pic s'il était énantiomériquement pur- en présente deux, ce qui signifie une présence importante de L-Ala. Cette L-Ala est donc retrouvée lors de la probable coupure du dipeptide Ala-Ala en acide aminé Ala.

4.8. Conclusions sur les effets des impacts simulés en laboratoire

Les expériences que nous avons mises en œuvre sont de bonnes simulations des conditions d'impacts de météorites carbonées pour des impacts de moyenne intensité : la quantité d'acides aminés est très proche de celle contenue dans les météorites carbonées, la saponite dans laquelle sont enrobés les composés organiques est très similaire à celle des météorites carbonées, et les chocs d'impact mis en œuvre, équivalents à ceux de météorites tombant sur la Terre avec des vitesses estimées de 2.4 à 5.8 km.s⁻¹.

Les vitesses estimées sont assez imprécises car la pression subie par les échantillons est fonction de la taille des météorites, de la densité de la météorite et du sol sur lequel les météorites s'écrasent. De plus, les molécules de notre expérience sont encapsulées au sein d'un porte échantillon métallique qui ne peut se détendre comme le font de réelles météorites.

Cette expérience a permis d'étudier la résistance aux chocs d'impact d'acides aminés non encore étudiés dans les précédentes expériences (Peterson *et al.* 1997; Blank *et al.* 2001; Chen *et al.* 2007) et de les comparer en fonction de leur composition chimique. Elle a aussi permis d'étudier la racémisation de certains énantiomères d'acides aminés.

Notre étude conforte l'hypothèse que certaines molécules (notamment la glycine) peuvent être volatilisées pendant l'impact météoritique pouvant alors servir de précurseurs à la chimie prébiotique. De nettes différences ont été relevées en fonction de la composition chimique des acides aminés : les acides aminés à chaine alkyl sont beaucoup plus résistants à l'impact que les acides aminés portant une fonction réactionnelle sur leur chaine latérale. Parmi eux, ceux portant les fonctions carboxylique et hydroxylique apparaissent aussi plus résistants que ceux portant les fonctions amine et thiol.

Pour les acides aminés à chaine alkyl, ceux présentant une chaine ramifiée apparaissent plus stables que ceux à chaine linéaire et sont aussi plus résistants à l'énantio-inversion.

Ces résultats tendent à prouver que les excès énantiomériques relevés dans les météorites et notamment dans la météorite de Murchison pourraient avoir été avant impact encore plus importants que ceux relevés après impact. Aucune distinction entre les acides aminés protéiques et non protéiques n'a été relevée mais il existe clairement une différenciation en fonction de la composition chimique de ces acides aminés.

Pour conclure, nos données suggèrent que les impacts pourraient servir de filtres moléculaires en favorisant certaines molécules au détriment d'autres.

Les météorites pourraient aussi agir comme de petits réacteurs chimiques au sein desquels certaines molécules organiques pourraient être transformées en d'autres molécules plus accessibles à la chimie prébiotique.

CONCLUSION

Cette étude a consisté à mieux cerner la nature et l'évolution chimique de la matière organique encapsulée au sein de météorites ou de micrométéorites lors de leur transport dans l'espace et de leur arrivée sur la Terre primitive il y a plus de quatre milliards d'années. Elle a permis d'identifier quel type de molécules avait pu arriver sur la Terre pour ensuite participer à l'évolution vers le vivant. Des acides aminés ayant été identifiés dans des synthèses en laboratoire de glaces cométaires et au sein de météorites carbonées présentes sur Terre, ils étaient les principaux candidats pour cette étude.

Aussi, des acides aminés et un dipeptide ont été soumis aux conditions de l'espace et exposés aux rayonnements UV à bord de la station spatiale internationale (expériences EXPOSE-R et EXPOSE-Eutef) ainsi qu'en laboratoire lors d'expériences au sol (expérience au DLR de Cologne et au CBM d'Orléans).

Ces différentes expériences ont permis une première comparaison de résultats obtenus par deux irradiations de nature différente, puisque les molécules étaient irradiées entre 200 et 400 nm au DLR de Cologne alors qu'elles ont été exposées à un rayonnement VUV plus énergétique entre 112 et 370 nm au CBM d'Orléans.

Les acides aminés alanine, glycine, acide amino isobutyrique, acide amino butyrique n'ont subi aucune dégradation significative et aucune racémisation n'a été relevée pour aucun des acides aminés étudiés quelle que soit l'exposition subie. Des dommages sur l'acide aspartique et sur la dileucine ont été constatés à la fois pour les irradiations au DLR et pour les irradiations au CBM. De nouvelles analyses sont en cours pour obtenir des taux de dégradation de ces composés plus fiables et plus reproductibles et procéder à l'identification de produits secondaires ; d'autres irradiations avec des dépôts plus homogènes sont aussi envisagées.

Les expériences de simulation d'impacts météoritiques ont permis de démontrer que la résistance à la pression de chocs est fonction de la nature chimique des composés; ainsi les composés à chaine alkyl sont beaucoup plus résistants que les leurs homologues présentant des fonctions réactionnelles sur leurs chaines latérales.

Des énantio-inversions ont été relevées lors de la dégradation des acides aminés due aux chocs. Sachant que des excès énantiomériques de divers composés ont été constatés dans plusieurs météorites, les résultats de notre étude tentent à prouver que ces excès énantiomériques pourraient avoir été plus élevés avant impact.

Ainsi ces différentes expériences démontrent que :

- Certains composés synthétisés dans l'espace peuvent avoir été dégradés au cours de leur transport dans l'espace et, dégradés ou racémisés lors de l'impact météoritique.
- La proportion de certains composés peut être différente à l'arrivée sur Terre que celle avant transport ou avant impact.
- Les molécules synthétisées dans l'espace n'ont sans doute pas été utilisées telles quelles par le vivant mais ont subi différents processus chimiques.

Aussi, le transport dans l'espace comme l'impact météoritique pourrait être des filtres moléculaires qui auraient permis de favoriser certaines molécules au détriment d'autres. Ces composés, outils chimiques de l'évolution vers le vivant, peuvent ainsi avoir été très différents de ceux formés initialement dans l'espace.

D'autres expériences d'exposition de molécules au spectre solaire étendu s'avèrent donc indispensables pour mieux cerner les conditions de transport et d'évolution chimique de la matière organique dans les environnements extraterrestres.

Cependant, les mesures effectuées ces dernières années tendent à prouver que la majeure partie de la matière organique accrétée par la Terre proviendrait, à l'heure actuelle, de micrométéorites de 50 à 500 µm, très riches en matière organique mais dans lesquelles de très faibles quantités d'acides aminés ont été relevées : si l'on se réfère à ces résultats, les acides aminés n'apparaissent plus être de bons candidats pour l'étude de l'origine de la matière organique. Cependant, les conditions ainsi que l'atmosphère de la Terre primitive étaient très différentes de ce qu'elles sont aujourd'hui. Beaucoup reste à faire pour les connaitre et savoir de quelle manière les résultats obtenus aujourd'hui concernant la taille des objets à l'origine de la matière organique présente sur Terre et la composition de cette matière organique peuvent être extrapolés à la période hadéenne de la Terre.

Il apparait cependant particulièrement intéressant d'étudier à présent le lien entre les diverses familles de molécules organiques synthétisées dans l'espace et les molécules constituant les briques du vivant en s'intéressant davantage aux précurseurs des acides aminés plutôt qu'aux acides aminés eux-mêmes, ces précurseurs pouvant être beaucoup plus stables aux rayonnements et aux impacts et pouvant avoir donné lieu, sur Terre, à une importante diversité de molécules organiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla S, Bayer E , Frank H (1987). Derivatives for Separation of Amino-Acid Enantiomers. *Chromatographia*. **23**, 83-85.
- Abe I, Fujimoto N, Nishiyama T, Terada K , Nakahara T (1996). Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **722**, 221-227.
- Abe I, Nakao Y, Nakahara T (1997). N-pivaloyl methyl esters as novel derivatives of amino acid enantiomers for chiral-phase capillary gas chromatography. *Chemistry Letters*, 629-630.
- Abe I, Nishiyama T , Nakahara T (1994). Enantiomer Separation of Amino-Acids after Derivatization with Alkyl Chloroformates by Chiral Phase Capillary Gas-Chromatography. Analytical Sciences. 10, 501-504.
- Abe I , Ohtani S (2006). Novel chiral selectors anchored on polydimethylsiloxane as stationary phases for separation of derivatized amino acid enantiomers by capillary gas chromatography. *Journal of Separation Science*. **29**, 319-324.
- Bank RA, Jansen EJ, Beekman B, Koppele JMT (1996). Amino acid analysis by reversephase high-performance liquid chromatography: Improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytical Biochemistry*. 240, 167-176.
- Barbier B, Bertrand M, Boillot F, Chabin A, Didier C, Odile H, Brack A (2000). *The Role of Radiation in the Origin and Evolution of Life*: Kyoto University Press, Japan.
- Barbier B, Boillot F, Chabin A, Buré C, Venet M, Belsky A, Jacquet R, Bertrand-Urbaniak M, Delmas A, Brack A (2002). The Perseus-exobiology experiment onboard Mir. In Second European Workshop on Exo/Astro-Biology. (ES Publication, ed^eds). Graz, Austria: ESA, pp. 109-112.
- Barbier B, Boillot F, Chabin A, Venet M, Buré C, Jacquet R, Bertrand-Urbaniak M, Brack A (2001). Behaviour of amino acids and peptides exposed in earth orbit. In *First European Workshop on Exo/Astro-Biology*. (ES Publication, ed^eds). Frascatti: ESA, pp. 291-294.
- Benilan Y, Cottin H (2007). Comets, Titan and Mars: Astrobiology and space projects. *Lectures in Astrobiology Vol 2*, 347-428.
- Bernal JL, Nozal MJ, Toribio L, Diego C, Mayo R, Maestre R (2008). Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *Journal of Chromatography A*. **1192**, 266-272.
- Bernal JL, Nozal MJ, Toribio L, Diego JC, Ruiz A (2005). A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science*. **28**, 1039-1047.
- Bernstein MP, Dworkin JP, Sandford SA, Allamandola LJ (2001). Ultraviolet irradiation of naphthalene in H2O ice: Implications for meteorites and biogenesis. *Meteoritics & Planetary Science*. **36**, 351-358.
- Bernstein MP, Dworkin JP, Sandford SA, Allamandola LJ (2002a). Ultraviolet irradiation of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) naphthalene in H2O. Implications for meteorites and biogenesis. In Space Life Sciences: Extraterrestrial Organic Chemistry, Uv Radiation on Biological Evolution, and Planetary Protection), pp. 1501-1508.

- Bernstein MP, Dworkin JP, Sandford SA, Cooper GW, Allamandola LJ (2002b). Racemic amino acids from the ultraviolet photolysis of interstellar ice analogues. *Nature*. **416**, 401-403.
- Bernstein MP, Moore MH, Elsila JE, Sandford SA, Allamandola LJ, Zare RN (2003). Side group addition to the polycyclic aromatic hydrocarbon coronene by proton irradiation in cosmic ice analogs. *Astrophysical Journal*. **582**, L25-L29.
- Bertrand M, Buré C, Fabrice F, Brack A (2001). *Geochemistry and the origin of Life*. Tokyo, Japan: Universal Academy Press, Inc.
- Bertrand M, Chabin A, Brack A, Westall F (2008). Separation of amino acid enantiomers VIA chiral derivatization and non-chiral gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1180**, 131-137.
- Bertrand M, Van der Gaast S, Faith V, Hörz F, Barnes G, Chabin A, Brack A, Westall F (in press). Amino Acid Degradation during simulated Meteoritic Impacts.
- Blank JG, Miller GH, Ahrens MJ, Winans RE (2001). Experimental Shock Chemistry of Aqueous Amino Acid Solutions and the Cometary Delivery of Prebiotic Compounds. *Origins of Life and Evolution of Biospheres.* **31**, 15-51.
- Boillot F, Chabin A, Buré C, Venet M, Belsky A, Bertrand-Urbaniak M, Delmas A, Brack A, Barbier B (2002). The Perseus exobiology mission on Mir : behaviour of amino acids and peptides in Earth orbit. Origins of Life and Evolution of the Biosphere. 32, 359-385.
- Boiteau L, Danger G, Pascal R, Taillades J, Commeyras A (2006). An amino-acid based protometabolic system: The primary pump scenario. Implications on the emergence of homochirality. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **36**, 267-269.
- Botta O, Martins Z , Ehrenfreund P (2007). Amino acids in Antarctic CM1 meteorites and their relationship to other carbonaceous chondrites. *Meteoritics & Planetary Science*. 42, 81-92.
- Brack A (1993). From amino acids to prebiotic active peptides : A chemical reconstitution. *Pure and Applied Chemistry*. **65**, 1143-1151.
- Brack A (1998). The Molecular Origins of Life : Assembling Pieces of the Puzzle.
- Brack A (2005). From the Origin of life on Earth to Life in the Universe. In *Lectures in Astrobiology*. (M Gargaud, B Barbier, H Martin, J Reisse, eds): Springer, pp. 3-23.
- Brack A, Leclercq B (2003). La vie est-elle universelle ? Des premiers êtres vivants à *l'exploration spatiale*.
- Bruckner H, Schieber A (2001). Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. **15**, 166-172.
- Chaimbault P, Petritis K, Elfakir C, Dreux M (1999). Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **855**, 191-202.
- Chen JY, Cheng HB, Zhu M, Jin LL, Zheng HF (2007). In situ transformation of an aqueous amino acid at high pressures and temperatures. *Geochemical Journal*. **41**, 283-290.
- Cheng CN, Shufeldt RC, Stevenson FJ (1975). Amino-acid Analysis of Soils and Sediments - Extraction and Desalting. *Soil Biology & Biochemistry*. **7**, 143-151.
- Chernobrovkin MG, Anan'eva IA, Shapovalova EN, Shpigun OA (2004). Determination of amino acid enantiomers in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. **59**, 55-63.
- Chyba C, Sagan C (1992). Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature*. **355**, 125-132.
- Chyba CF, Hand KP (2006). Comets and Prebiotic Organic Molecules on Early Earth. In *Comets and the Origin and Evolution of Lifeed*^eds), pp. 169-206.
- Cohen BA, Chyba CF (2000). Racemization of Meteoritic Amino Acids. *Icarus*. 145, 272-281.
- Cohen SA, Bidlingmeyer BA, Tarvin TL (1986). PITC derivatives in amino acid analysis. *Nature*. **320**, 769 770.
- Cottin H, Benilan Y, Gazeau MC, Raulin F (2004). Origin of cometary extended sources from degradation of refractory organics on grains: polyoxymethylene as formaldehyde parent molecule. *Icarus.* **167**, 397-416.
- Cottin H, Coll P, Coscia D, Fray N, Guan YY, Macari F, Raulin F, Rivron C, Stalport F, Szopa C, Chaput D, Viso M, Bertrand M, Chabin A, Thirkell L, Westall F, Brack A (2008). Heterogeneous solid/gas chemistry of organic compounds related to comets, meteorites, Titan, and Mars: Laboratory and in lower Earth orbit experiments. *Advances in Space Research.* 42, 2019-2035.
- Cronin JR, Pizzarello S (1997). Enantiomeric Excesses in Meteoritic Amino Acids. *Science*. **275**, 951-955.
- Csapo J, Pohn G, Varga-Visi E, Csapo-Kiss Z , Terlaky-Balla E (2004). Mercaptoethanesulfonic acid as the reductive thiol-containing reagent employed for the derivatization of amino acids with o-phthaidialdehyde analysis. *Chromatographia*. 60, S231-S234.
- Danger G, Boiteau L, Cottet H, Pascal R (2006). The peptide formation mediated by cyanate revisited. N-carboxyanhydrides as accessible intermediates in the decomposition of N-carbamoylamino acids. *Journal of the American Chemical Society*. **128**, 7412-7413.
- De Hoffmann E, Charette J , Stroobant V (1996). *Mass Spectrometry : Principles and Applications*: John Wiley & sons.
- Dejong C, al. e (1982). Journal of Chromatography. 241, 345-359.
- Deng CH, Wang B , Liu LF (2005). Fast diagnosis of neonatal phenylketonuria by gas chromatography-mass spectrometry following microwave-assisted silylation. *Chromatographia*. **62**, 617-621.
- Domergue N, Pugniere M, Previero A (1993). One-Step Conversion of Amino-Acids into Nmenthyloxycarbonyl alkyl ester derivatives for Chiral Gas-Chromatography. *Analytical Biochemistry*. **214**, 420-425.
- Ehrenfreund P , Sephton MA (2006). Carbon molecules in space: from astrochemistry to astrobiology. *Faraday Discussions*. **133**, 277-288.
- Einarsson S (1985a). Journal of Chromatography. 348, 213-220.
- Einarsson S (1985b). Selective Determination of Secondary Amino-Acids Using Precolumn Derivatization with 9-Fluorenylmethylchloroformate and Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography*. **348**, 213-220.
- Einarsson S, Josefsson B, Moller P, Sanchez D (1987). Separation of Amino-Acid Enantiomers and Chiral Amines Using Precolumn Derivatization with (+)-1-(9-Fluorenyl)Ethyl Chloroformate and Reversed-Phase Liquid-Chromatography. *Analytical Chemistry*. **59**, 1191-1195.
- Elsila JE, Dworkin JP, Bernstein MP, Martin MP, Sandford SA (2007). Mechanisms of amino acid formation in interstellar ice analogs. *Astrophysical Journal*. **660**, 911-918.
- Elsila JE, Hammond MR, Bernstein MP, Sandford SA, Zare RN (2006). UV photolysis of quinoline in interstellar ice analogs. *Meteoritics & Planetary Science*. **41**, 785-796.
- Engel MH, Macko SA, Qian Y, Silfer JA (1995). Stable isotope analysis at the molecular level: A new approach for determining the origins of amino acids in the Murchison meteorite. *Advances in Space Research.* **15**, 99-106.

- Epstein S, Krishnamurthy RV, Cronin JR, Pizzarello S, Yuen GU (1987). Unusual stable isotope ratios in amino acid and carboxylic acid extracts from the Murchison meteorite. *Nature*. **326**, 477-479.
- Ferris JP, Hill AR, Liu RH, Orgel LE (1996). Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. *Nature*. **381**, 59-61.
- Fiamegos YC, Nanos CG, Stalikas CD (2004). Ultrasonic-assisted derivatization reaction of amino acids prior to their determination in urine by using single-drop microextraction in conjunction with gas chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 813, 89-94.
- Fuzfai Z , Molnar-Perl I (2007). Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *Journal of Chromatography A.* **1149**, 88-101.
- Gargaud M, Barbier B, Martin H, Reisse J (2005a). *Lectures in Astrobiology*. Berlin Heidelberg New York.
- Gargaud M, Claeys P, Lopez-Garcia P, Martin H, Montmerle T, Pascal R, Reisse J (2006). *From Suns to Life : a Chronological Approach to the history of Life on Earth.* The Netherlands.
- Gargaud M, Claeys P, Martin H (2005b). Des atomes aux planètes habitables. Pessac.
- Gargaud M, Despois D, Parisot J-P (2001). L'environnement de la Terre primitive. Pessac.
- Gargaud M, Despois D, Parisot J-P, Reisse J (2003). Les traces du vivant. Pessac.
- Glavin DP, Bada JL (2001). Survival of Amino Acids in Micrometeorites During Atmospheric Entry. *Astrobiology*. **1**, 259-269.
- Gray WR, Hartley BS (1963). Biochemistry Journal. 89, 379-380.
- Gubitz G, Schmid MG (2001). Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. **22**, 291-336.
- Heinrikson RL, Meridith SC (1984). Analytical Biochemistry. 136, 65-74.
- Hennet RJC, Holm NG, Engel MH (1992). Abiotic Synthesis of Amino-Acids under Hydrothermal Conditions and the Origin of Life - a Perpetual Phenomenon. *Naturwissenschaften*. **79**, 361-365.
- Herrero M, Ibanez E, Martin-Alvarez PJ, Cifuentes A (2007). Analysis of chiral amino acids in conventional and transgenic maize. *Analytical Chemistry*. **79**, 5071-5077.
- Holm NG , Hennet RJC (1992). Hydrothermal Systems Their Varieties, Dynamics, and Suitability for Prebiotic Chemistry. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **22**, 15-31.
- Hope JL, Prazen BJ, Nilsson EJ, Lidstrom ME, Synovec RE (2005). Comprehensive twodimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry detection: analysis of amino acid and organic acid trimethylsilyl derivatives, with application to the analysis of metabolites in rye grass samples. *Talanta*. **65**, 380-388.
- Huber C , Wachtershauser G (1998). Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: Implications for the origin of life. *Science*. **281**, 670-672.
- Husek P (1998). Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **717**, 57-91.
- Husek P (2005). Quantitation of amino acids as chloroformates A return to gas chromatography. In *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography: Methods and Protocols.* (I MolnarPerl, ed). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, Amsterdam (NL), pp. 2-38.
- Husek P , Simek P (2001). Advances in amino acid analysis. *Lc Gc North America*. **19**, 986-+.

- Husek P, Simek P, Hartvich P, Zahradnickova H (2008). Fluoroalkyl chloroformates in treating amino acids for gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*. **1186**, 391-400.
- Ilisz I, Berkecz R , Peter A (2008). Application of chiral derivatizing agents in the highperformance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **47**, 1-15.
- Imai E, Honda H, Hatori K, Brack A, Matsuno K (1999). Elongation of oligopeptides in a simulated submarine hydrothermal system. *Science*. **283**, 831-833.
- Irvine WM (1998). Extraterrestrial organic matter: A review. Origins of Life and Evolution of the Biosphere. 28, 365-383.
- James LB (1978). Amino Acid Analysis : Ninhydrine Reaction with Titanous Chloride. Journal of Chromatography. 152, 298-300.
- Jochims HW, Schwell M, Chotin JL, Clemino M, Dulieu F, Baumgartel H, Leach S (2004). Photoion mass spectrometry of five amino acids in the 6-22 eV photon energy range. *Chemical Physics.* **298**, 279-297.
- Jones BN, Gilligan JP (1983). Journal of Chromatography. 266, 471-482.
- Jones CL, Brearley AJ (2006). Experimental aqueous alteration of the Allende meteorite under oxidizing conditions: Constraints on asteroidal alteration. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **70**, 1040-1058.
- Kerridge J (1986). Prebiotic chemical evolution: evidence from carbonaceous meteorites. *Origins of Life and Evolution of Biospheres.* **16**, 216-217.
- Kerridge J (1999). Formation and Processing of Organics in the Early Solar System. *Space Science Reviews.* **90**, 275-288.
- Knapp DR (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. New York: John Wiley & Sons.
- Koros A, Varga Z, Molnar-Perl I (2008). Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1203, 146-152.
- Krizman M, Virant-Klun I, Prosek M (2007). Determination of derivatized amino acids in human embryo culture media by gas chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* **858**, 292-295.
- Lee J, Kim K-R, Won S, Kim JH, Goto J (2001). Enantioseparation of chiral amino acids as the N(O,S)-ethoxycarbonylated diastereomeric esters by achiral dual-capillary column gas chromatography. *Analyst.* **126**, 2128-2133.
- Lee KA, Yeo S, Kim KH, Lee W , Kang JS (2008). Enantioseparation of Nfluorenylmethoxycarbonyl alpha-amino acids on polysaccharide-derived chiral stationary phases by reverse mode liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **46**, 914-919.
- Lindroth P, Mopper K (1979). Analytical Chemistry. 51, 1667-1674.
- Liu DL, Beegle LW, Kanik I (2008). Analysis of underivatized amino acids in geological samples using ion-pairing liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Astrobiology*. **8**, 229-241.
- Marcano V, Benitez P , Palacios-Pru E (2001). An experimental approach to production of peptide-like compounds in the early terrestrial planets. *Planetary and Space Science*. 49, 617-632.
- Marfey P, Al. e (1984). Carlsberg Research Communication. 49, 585-590.
- Martin AJP, Synge RLM (1941). Biochemistry Journal. 35, 1358.

- Matrajt G, Pizzarello S, Taylor S, Brownlee D (2004). Concentration and variability of the AIB amino acid in polar micrometeorites: Implications for the exogenous delivery of amino acids to the primitive Earth. *Meteoritics & Planetary Science*. **39**, 1849-1858.
- Maurette M (1998). Carbonaceous Micrometeorites and the Origin of Life. Origins of Life and Evolution of Biospheres. 28, 385-412.
- Maurette M (2006). Cometary Micrometeorites in Planetology, Exobiology, and Early Climatology. In *Comets and the Origin and Evolution of Life*). Berlin / Heidelberg: Springer, pp. 69-111.
- Maurette M, Brack A, Kurat G, Perreau M , Engrand C (1995). Were micrometeorites a source of prebiotic molecules on the early Earth? *Advances in Space Research*. **15**, 113-126.
- Mayadunne R, Nguyen TT, Marriott PJ (2005). Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **382**, 836-847.
- McKay CPB, W.J. (1997). Organic Synthesis in Experimental Impact Shocks. *Science*. **276**, 390-392.
- Meierhenrich UJ, Caro GMM, Schutte WA, Barbier B, Segovia AA, Back A, Rosenbauer H, Thiemann WHP (2002). Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **66**, A505-A505.
- Meierhenrich UJ, Nahon L, Alcaraz C, Bredehoft JH, Hoffmann SV, Barbier B, Brack A (2005). Asymmetric vacuum UV photolysis of the amino acid leucine in the solid state. *Angewandte Chemie-International Edition.* **44**, 5630-5634.
- Mie A, Jornten-Karlsson M, Axelsson BO, Ray A , Reimann CT (2007). Enantiomer separation of amino acids by complexation with chiral reference compounds and highfield asymmetric waveform ion mobility spectrometry: Preliminary results and possible limitations. *Analytical Chemistry*. **79**, 2850-2858.
- Mimura K , Toyama S (2005). Behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons at impact shock: Its implication for survival of organic materials delivered to the early Earth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **69**, 201-209.
- Mita H, Shirakura N, Yokoyama H, Nomoto S , Shimoyama A (2004). Kinetic study of abiotic amino acid formation by UV-irradiation. Space Life Sciences: Search for Signatures of Life, and Space Flight Environmental Effects on the Nervous System. 33, 1282-1288.
- Molnar-Perl I, Hanczko R, Koros A, Varga Z, Perl A (2007). Advances in the ophthalaldehyde derivatization of amino acids and amines for their high performance liquid chromatographic analysis. *Amino Acids*. **33**, L-L.
- Morita M, Harada Y, Iseki K, Izumi S, Hiraya A (2005). Mass spectroscopic approach to amino acids formation processes by UV irradiation to simple organic molecules in aqueous solution. *Analytical Sciences*. **21**, 1085-1090.
- Mukhin LM, Gerasimov MV, Safonova EN (1989). Origin of precursors of organic molecules during evaporation of meteorites and mafic terrestrial rocks. *Nature*. **340**, 46-48.
- Munoz Caro GM, Meierhenrich UJ, Schutte WA, Barbier B, Arcones Segovia A, Rosenbauer H, Thiemann WH-P, Brack A, Greenberg JM (2002). Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature*. **416**, 403-406.
- Nicolet M (1989). Solar Spectral Irradiances with their diversity between 120 and 900 nm. *Planetary and Space Science*. **37**, 1249-1289.
- Noctor G, Bergot GL, Mauve C, Thominet D, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL (2007). A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-

time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics*. **3**, 161-174.

- Nuevo M, Auger G, Blanot D, d'Hendecourt L (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**, 37-56.
- Nuevo M, Chen Y-J, Yih T-S, Ip W-H, Fung H-S, Cheng C-Y, Tsai H-R, Wu C-YR (2007). Amino acids formed from the UV/EUV irradiation of inorganic ices of astrophysical interest. *Advances in Space Research.* **40**, 1628-1633.
- Nuevo M, Meierhenrich UJ, Caro GMM, Dartois E, d'Hendecourt L, Deboffle D, Auger G, Blanot D, Bredehoft JH, Nahon L (2006). The effects of circularly polarized light on amino acid enantiomers produced by the UV irradiation of interstellar ice analogs. *Astronomy & Astrophysics.* **457**, 741-751.
- Ohnishi I , Tomeoka K (2007). Hydrothermal alteration experiments of enstatite: Implications for aqueous alteration of carbonaceous chondrites. *Meteoritics & Planetary Science*. **42**, 49-61.
- Oro J, Lazcano A, Ehrenfreund P (2006). Comets and the Origin and Evolution of Life. In *Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. (PJ Thomas, RD Hicks, CF Chyba, CP McKay, eds). Berlin / Heidelberg: Springer, pp. 1-28.
- Paik MJ, Cho EY, Kim H, Kim KR, Choi S, Ahn YH, Lee G (2008). Simultaneous clinical monitoring of lactic acid, pyruvic acid and ketone bodies in plasma as methoxime/tertbutyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Biomedical Chromatography*. 22, 450-453.
- Pascal R (2006). Amino acid N-carboxyanhydrides as early energy carriers Towards a continuous scenario from prebiotic amino acid chemistry to the emergence of the translation apparatus. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **36**, 211-212.
- Peace RW, Gilani GS (2005). Chromatographic determination of amino acids in foods. *Journal of Aoac International.* **88**, 877-887.
- Peris-Vicente J, Adelantado JV, Carbo MTD, Castro RM, Reig FB (2006). Characterization of proteinaceous glues in old paintings by separation of the o-phtalaldehyde derivatives of their amino acids by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*. **68**, 1648-1654.
- Peterson E, Horz F, Chang S (1997). Modification of amino acids at shock pressures of 3.5 to 32 GPa. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **61**, 3937-3950.
- Petritis K, Chaimbault P, Elfakir C , Dreux M (2000). Parameter Optimization for the Analysis of Underivatized Protein Amino Acids by Liquid Chromatography and Ionspray tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **896**, 253-263.
- Petritis K, de Person M, Elfakir C , Dreux M (2004). Validation of an ion-interaction chromatography analysis of underivatized amino acids in commercial preparation using evaporative light scattering detection. *Chromatographia*. **60**, 293-298.
- Petritis K, Elfakir C , Dreux M (2002). A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *Journal of Chromatography A*. **961**, 9-21.
- Petritis K, Valleix A, Elfakir C, Dreux M (2001). Simultaneous analysis of underivatized chiral amino acids by liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry using a teicoplanin chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*. **913**, 331-340.
- Phillipou G (1977). Genesis of trimethylsilyl cation in electron-impact mass-spectra of tertbutyldimethylsilyl derivatives. *Organic Mass Spectrometry*. **12**, 261-261.
- Pierazzo E, Chyba CF (1999). Amino Acid Survival in large Cometary Impacts. *Meteoritics & Planetary Science*. **34**, 909-918.

Pierce AE (1968). Silylation of Organic Compounds. Rockford, IL: Pierce Chemical.

- Piraud M, Vianey-Saban C, Bourdin C, Acquaviva-Bourdain C, Boyer S, Elfakir C, Bouchu D (2005a). A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatised amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 19, 3287-3297.
- Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Bouchu D (2005b). Ionpairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **19**, 1587-1602.
- Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, Bouchu D (2003). ESI-MS/MS Analysis of Underivatised Amino Acids : a new Tool for the Diagnosis of Inherited Disorders of Amino Acid Metabolism. Fragmentation Study of 79 Molecules of Biological Interest in Positive and Negative Ionisation Mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17, 1297-1311.
- Pizzarello S (2004). Chemical evolution and meteorites: An update. Origins of Life and Evolution of the Biosphere. **34**, 25-34.
- Pizzarello S (2007). Why astrobiology? *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. **37**, 341-344.
- Pizzarello S, Huang Y, Alexandre MR (2008). Molecular asymmetry in extraterrestrial chemistry: Insights from a pristine meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 3700-3704.
- Pizzarello S, Huang Y, Fuller M (2004). The carbon isotopic distribution of Murchison amino acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **68**, 4963-4969.
- Pizzarello S, Zolensky M , Turk KA (2003). Nonracemic isovaline in the Murchison meteorite: chiral distribution and mineral association. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **67**, 1589-1595.
- Poinsot V, Rodat A, Gavard P, Feurer B, Couderc F (2008). Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis*. **29**, 207-223.
- Rodier C, Laurent C, Szopa C, Sternberg R, Raulin F (2002). Chirality and the origin of life: In situ enantiomeric separation for future space missions. *Chirality*. **14**, 527-532.
- Rosset R, Caude M, Jardy A (1991). Chromatographie en phase liquide et supercritique: Masson.
- Rouessac F, Rouessac A (2004). Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris: Dunod.
- Schürig V (2001). Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **906**, 275-299.
- Schwell M, Jochims HW, Baumgartel H, Dulieu F, Leach S (2006). VUV photochemistry of small biomolecules. *Planetary and Space Science*. **54**, 1073-1085.
- Shen XZ, Deng CH, Wang B, Dong L (2006). Quantification of trimethylsilyl derivatives of amino acid disease biomarkers in neonatal blood samples by gas chromatographymass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384**, 931-938.
- Shimoyama A, Ogasawara R (2002). Dipeptides and Diketopiperazines in the Yamato-791198 and Murchison Carbonaceous Chondrites. *Origins of Life and Evolution of Biospheres.* **32**, 165-179.
- Shock EL, Schulte MD (1990). Summary and implications of reported amino acid concentrations in the Murchison meteorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **54**, 3159-3173.

- Simakov MB, Kuzicheva EA, Malko IL, Dodonova NY (1994). Abiogenic synthesis of oligopeptides in solid state under action of vacuum ultraviolet light (100-200 nm). In F3 1/F3 4/F2 4/F3 8 Symposia of COSPAR Scientific-Commission-F on Life Sciences Space and Mars Recent Results, at the 30th COSPAR Scientific Assembly. (A Brack, G Horneck, EI Friedmann, MA Meyer, G Reitz, A Banin, ed^eds). Hamburg, Germany, pp. 61-64.
- Simek P, Heydova A, Jegorov A (1994). High-Resolution Capillary Gas-Chromatography and Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of Protein and Nonprotein Amino-Acids, Amino-Alcohols, and Hydroxycarboxylic Acids as Their Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography*. **17**, 145-152.
- Sista HS (1986). Journal of Chromatography. 359, 231-240.
- Stein WH, Moore S (1949). Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology. 14, 179.
- Stevenson FJ, Cheng CN (1970). Amino Acids in Sediments : recovery by acid hydrolysis and quantitative estimation by colorimetric procedure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **34**, 77-88.
- Synge RLM (1944). Biochemistry Journal. 38, 285.
- Takano Y, Ushio K, Kaneko T, Kobayashi K , Hashimoto H (2003). Amino acid precursors from carbon monoxide in simulated interstellar dust ice mantle by UV irradiation at 10 K. Chemistry Letters. 32, 612-613.
- Tanaka M, Kaneko F, Koketsu T, Nakagawa K , Yamada T (2008). Fragmentation and dimerization of aliphatic amino acid films induced by vacuum ultraviolet irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 77, 1164-1168.
- Tingle TN, Tyburczy JA, Ahrens TJ, Becker CH (1992). The fate of organic matter during planetary accretion: Preliminary studies of the organic chemistry of experimentally shocked murchison meteorite. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. **21**, 385-397.
- Van Eijk HMH, Suylen DPL, Dejong CHC, Luiking YC, Deutz NEP (2007). Measurement of amino acid isotope enrichment by liquid chromatography mass spectroscopy after derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 856, 48-56.
- Vandenabeele-Trambouze O, Claeys-Bruno M, Dobrijevic M, Rodier C, Borruat G, Commeyras A, Garrelly L (2005). Comparison of methods for measurement of organic compounds at ultra-trace level: Analytical criteria and application to analysis of amino acids in extraterrestrial samples. *Astrobiology*. 5, 48-65.
- Vicendo P, Bijeire L, Elias B, Jouvet C, Kirsch-De Mesmaeker A, Moucheron C (2007). Amino acids and proteins in photochemistry. *Actualite Chimique*, 15-18.
- Wächtershäuser G (1990). Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**, 200-204.
- Walker V, Mills GA (1995). Quantitative Methods for Amino-Acid-Analysis in Biological-Fluids. *Annals of Clinical Biochemistry*. **32**, 28-57.
- Ward TJ, Baker BA (2008). Chiral separations. Analytical Chemistry. 80, 4363-4372.
- Weidmeier VT, al. e (1982). Journal of Chromatography. 231, 410-417.
- Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G , Ueland PM (2005). Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Chemistry*. **51**, 2103-2109.
- Yoon HR (2007). Two step derivatization for the analyses of organic, amino acids and glycines on filter paper plasma by GC-MS/SIM. *Archives of Pharmacal Research*. **30**, 387-395.

- Zahradnickova H, Hartvich P, Simek P, Husek P (2008). Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after fast derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. *Amino Acids*. **35**, 445-450.
- Zampolli MG, Basaglia G, Dondi F, Sternberg R, Szopa C, Pietrogrande MC (2007). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis. *Journal of Chromatography A*. **1150**, 162-172.
- Zoppa M, Gallo L, F. Z, Giordano G (2006). Method for Quantification of Underivatized Amino Acids on dry Blood Spots from Newborn Screening by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technology for Biomedical Life Sciences*. 831, 267-273.
- Zumwalt RW, Desgres J, Kuo KC, Pautz JE, Gehrke CW (1987). Amino-Acid-Analysis by Capillary Gas-Chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **70**, 253-262.

Marylène BERTRAND

Origine exogène des acides aminés prébiotiques

Cette étude vise à conforter l'apport de matière organique extraterrestre via les météorites et les micrométéorites. Elle permet de mieux cerner les conditions dans lesquelles les molécules organiques, synthétisées dans l'espace, ont contribué à l'émergence de la vie sur Terre il y a environ quatre milliards d'années. Pour cela, des molécules organiques ont été exposées aux conditions de l'espace à bord de la station spatiale internationale et également irradiées en laboratoire lors d'expériences au sol.

Par ailleurs, des molécules organiques associées à une argile, ont été soumises à des chocs mécaniques pour simuler des impacts météoritiques. Des acides aminés et des dipeptides ont été choisis pour ces études en raison de leur intérêt prébiotique et de la diversité des groupements fonctionnels qu'ils offrent.

Des méthodes de fonctionnalisation pour l'analyse chirale ou non chirale de ces molécules par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse ont été développées. Les expériences démontrent que la résistance des molécules à l'irradiation et à l'impact est fonction de la nature chimique des composés. De ce fait, le transport dans l'espace et l'impact météoritique pourraient servir de filtres moléculaires en favorisant certaines molécules au détriment d'autres.

Exogenic origin of prebiotic amino acids

This study concerns the transport to Earth of exogenic organic matter by meteorites or micrometeorites in order to better determine the conditions under which organic molecules synthesized in space contributed to the emergence of the life on Earth four billion years ago or more. Organic molecules were exposed to space conditions on board the international space station as well as in laboratory experiments.

Moreover, simulated meteorite impacts on organic molecules associated with a clay were carried out to determine the survival of the organic components. Amino-acids and dipeptides were selected for these studies because of their prebiotic interest and for the diversity of their functional groups.

Methods of derivatization for chiral and not chiral analysis of these molecules by gas chromatography coupled to a mass spectrometer were developed. The results of the experiments show that the resistance of the molecules to irradiation and to impact is a function of their chemical nature, and that transport in the space environment as well meteoritic impact could be used as molecular filters by favouring the survival of certain molecules rather than others.

Key words : Astrobiology, GC-MS, derivatization, amino acids, VUV irradiation, impact shock



Centre de Biophysique Moléculaire CNRS, UPR 4301 Rue Charles Sadron 45071 ORLEANS cedex 2



