HAL
open science

Etude des mécanismes de pyrolyse en présence d'hydroxyde de tetramethylammonium de composés protéiques modèles. Implication pour la détection de matériel azoté dans la matière organique naturelle et l'identification de macromolécules sources

Nicolas Gallois

To cite this version:

Nicolas Gallois. Etude des mécanismes de pyrolyse en présence d'hydroxyde de tetramethylammonium de composés protéiques modèles. Implication pour la détection de matériel azoté dans la matière organique naturelle et l'identification de macromolécules sources. Chemical Sciences. Chimie ParisTech, 2008. English. NNT : . pastel-00005006

HAL Id: pastel-00005006

https://pastel.hal.science/pastel-00005006

Submitted on 10 Apr 2009

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

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

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie analytique

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris- Centre

Présentée par

Nicolas GALLOIS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude des mécanismes de pyrolyse en présence d'hydroxyde de tetramethylammonium de composés protéiques modèles. Implication pour la détection de matériel azoté dans la matière organique naturelle et l'identification de macromolécules sources.

Soutenance prévue le 13 Mai 2008

devant le jury composé de :

Mme DERENNE Sylvie (Directrice de Recherche CNRS)	Directeur de thèse
M. AMBLES André (Professeur)	Rapporteur
M. del RIO José (Investigador Cientifico)	Rapporteur
M. SALIOT Alain (Professeur)	Examinateur

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie analytique

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris- Centre

Présentée par

Nicolas GALLOIS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude des mécanismes de pyrolyse en présence d'hydroxyde de tetramethylammonium de composés protéiques modèles. Implication pour la détection de matériel azoté dans la matière organique naturelle et l'identification de macromolécules sources.

Soutenance prévue le 13 Mai 2008

devant le jury composé de :

Mme DERENNE Sylvie (Directrice de Recherche CNRS)	Directeur de thèse
M. AMBLES André (Professeur)	Rapporteur
M. del RIO José (Investigador Cientifico)	Rapporteur
M. SALIOT Alain (Professeur)	Examinateur

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Résumé

Malgré son implication importante dans de nombreux processus environnementaux, la matière organique naturelle (MON) reste mal caractérisée, principalement à cause du caractère réfractaire des structures dans lesquelles elle est impliquée. Si des fonctions amides ont été mises en évidence dans la MON, la structure moléculaire des unités associées est encore inconnue. La pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS) en présence de Tetra-Methyl-Ammonium Hydroxyde (TMAH) est a priori un outil pertinent pour l'analyse de ces structures. Pour mieux comprendre le comportement des structures azotées de la MON au cours de la Py-GC-MS/TMAH, nous avons étudié par cette méthode, les 20 acides aminés protéiques, 17 dipeptides, 4 polypeptides et une protéine, la Sérum Albumine Bovine (SAB). Cette étude a permis de mettre en évidence les principaux mécanismes de pyrolyse des acides aminés (méthylation directe, cyclisation, dimérisation, homolyse, décarboxylation, et déamination), et l'influence de la liaison peptidique sur ces mécanismes. La Py-GC-MS/TMAH des dipeptides et des polypeptides a montré l'importance des produits de cyclisation, en particulier des diketopiperazines et de structures plus complexes basées sur 3 acides aminés, et des produits d'homolyse pour les acides aminés aromatiques. De plus, cette étude a permis d'établir une base de données des produits de pyrolyse des acides aminés et des 17 dipeptides. Enfin, la pyrolyse de la SAB en mélange avec les deux principales macromolécules présentes dans la biomasse (lignine et cellulose) montre que les coefficients de réponse sont défavorables à la protéine.

Mots clefs

Azote, acide aminé, peptide, protéine, Py-GC-MS, TMAH, mécanisme, diketopiperazine

Study of pyrolysis mechanisms in the presence of TMAH of proteic model compounds. Implication for the detection of nitrogen-containing material and identification of macromolecular sources.

Abstract

Despite its implication in many environmental processes, Natural Organic Matter (NOM) is only partially characterised, mainly due to its refractory nature. Amide functions have been revealed by spectroscopic studies, but the molecular structure of the concerned units remains unknown. Pyrolysis coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Py-GC-MS), in the presence of Tetra-Methyl-Ammonium Hydroxyde (TMAH) is considered to be a convenient tool to investigate these structures. For a better understanding of the behaviour of nitrogen-containing structures of NOM upon Py-GC-MS/ TMAH, we used this technique to analyse the 20 proteic amino acids, 17 dipeptides, 4 polypeptides and a protein, the Bovin Serum Albumin (BSA). This study allowed highlighting the main pyrolysis mechanisms undergone by the amino acids (direct methylation, cyclisation, dimerisation, homolysis, decarboxylation and deamination) and the influence of the peptidic bond on these mechanisms. Py-GC-MS/TMAH of dipeptides and polypeptides pointed to the importance of cyclisation products, mainly diketopiperazines and more complex compounds based on 3 amino acids, and homolysis products for aromatic amino acids. Morever, this study allowed creating a database for the pyrolysis products arising from amino acids and dipeptides. Finally, pyrolysis of mixtures of BSA with the main two macromolecules of the biomass (lignin and cellulose) showed that response factors are unfavourable to the protein.

Key-words

Nitrogen, amino acid, peptide, protein, Py-GC-MS, TMAH, mechanism, diketopiperazine

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris et je souhaite remercier les personnes que j'ai côtoyées.

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement Sylvie Derenne, ma directrice de thèse, et Joëlle Templier, qui ont encadré ce travail, pour le temps qu'elles m'ont consacré et pour la qualité et la rigueur scientifiques de leur encadrement.

J'exprime ma reconnaissance à Claude Largeau, ancien directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli dans son équipe. Je remercie Odile Largeau et Jean-Rober Gowe pour leur disponibilité et leur gentillesse. Merci à Yves Pouet de m'avoir formé sur l'appareillage de Py-GC-MS et Christelle Anquetil pour son aide sur le nouvel appareillage. Merci aussi à Pierre Metzger et Béatrice Allard pour leurs conseils de tout ordre.

Je souhaite aussi saluer et remercier tous les étudiants que j'ai pu côtoyer au cours de cette thèse et qui ont animé la vie de laboratoire : Isabelle, Mylene, Marion, Mohamed, Romain, Alexis, Mercedes, Raja, Elodie et tous les autres. Merci aussi à Nazaré, Violaine, Thomas et Jeanne avec qui j'ai partagé de très bons moments en dehors du laboratoire.

Il me tient à cœur de saluer chaleureusement mes complices : Katell (ma binôme de déjeuner), Johan (mon partenaire adversaire de ju-jitsu), Laurent et Jörgen (les joueurs fous).

Je souhaite également saluer trois enseignants qui ont marqué mon cursus scolaire : Mme Dutois, institutrice de CP, M. Darchen et M. Auchard, respectivement professeur et maître de conférence à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille pour son soutien permanent, inconditionnel et indéfectible, et Soraya pour le rôle primordial qu'elle a joué dans le bon déroulement de cette thèse.

Sommaire général

Introduction générale 1

Chapitre 1 : étude bibliographique 5

1 La matière organique naturelle **9**

1.1 Définitions **9**

1.2 Le cycle du carbone **10**

1.3 Les grandes classes des composés de la MON **13**

1.3.1 Les composés de faible masse moléculaire 13

1.3.1.1 La fraction hydrosoluble 13

1.3.1.2 Les lipides 13

1.3.2 Les composés macromoléculaires 14

1.3.2.1 Les polysaccharides 15

1.3.2.2 Les macromolécules polyphénoliques 18

1.3.2.3 La cutine et la subérine 20

1.3.2.4 Les mélanoïdines 20

1.3.3 Les substances humiques 20

1.3.4 Les kérogènes 21

1.3.4.1 Définition et formation 21

1.3.4.2 Composition 23

2 La matière organique naturelle azotée **25**

2.1 Le cycle de l'azote **25**

2.1.1 La répartition de l'azote sur Terre 25

2.1.2 Les processus du cycle 26

2.1.3 Les échanges entre compartiments 29

2.1.3.1 De la terre à l'atmosphère 29

2.1.3.2 De l'océan à l'atmosphère 29

2.1.3.3 De la terre à l'océan 29

2.1.3.4 De l'atmosphère à la surface 29

2.2 Les composés organiques azotés **29**

2.2.1 Formes biologiques 30

2.2.1.1 Les protéines et les polypeptides 30

2.2.1.2 L'ADN et l'ARN 33

2.2.1.3 Les polymères d'amino-sucres. 33

2.2.1.4 Les porphyrines 33

2.2.2 Formes abiotiques 34

3 Dégradation et préservation de la MON **35**

3.1 La dégradation de la matière organique au cours de la diagenèse **35**

3.1.1 Les différents modes de dégradation de la MO 35

3.1.2 Paramètres d'évaluation de la dégradation de la MON 36

3.1.3 Les paramètres influençant la dégradation de la MO 38

3.2 Récalcitrance et préservation **39**

3.2.1 Récalcitrance intrinsèque 39

3.2.2 Récalcitrance acquise 40

3.2.3 Préservation assistée 41

4 MON réfractaire et méthodes analytiques *43*

4.1 Les techniques globales **43**
4.1.1 L'analyse élémentaire 43
4.1.2 L'infra-rouge 44
4.1.3 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 44
4.1.4 La fluorescence 45
4.1.5 La spectrométrie de photoélectrons X (XPS) 45

4.2 Les méthodes de dégradation **45**
4.2.1 Les dégradations chimiques 46
4.2.2 La pyrolyse 46
4.2.3 La pyrolyse off-line 47
4.2.4 La pyrolyse on-line 48

4.3 La dérivation **51**

Chapitre 2 :

Py-GC-MS of the 20 protein amino acids in the presence of TMAH 53

1 Introduction *57*

2 Results *59*

2.1 Predominance of only one mechanism **60**
2.1.1 Methylation 60
2.1.2 Cyclisation 63
2.1.3 Deamination 65

2.2 Co-occurrence of several major mechanisms **66**
2.2.1 Methylation and decarboxylation 66
2.2.2 Methylation, decarboxylation and homolysis 69
2.2.3 Methylation and dimerisation 74
2.2.4 Methylation and cyclisation 76

2.3 Co-occurrence of several mechanisms with one prevailing **77**
2.3.1 Predominant methylation 77
2.3.1.1 Cyclisation 77
2.3.1.2 Decarboxylation 83
2.3.1.3 Homolysis 85
2.3.1.4 Dehydration and dimerisation 86
2.3.2 Cyclisation dominating dimerisation 88
2.3.3 Deamination dominating methylation 89

3 Role of the derivatizing agent *92*

3.1 Role of TMAH **92**

3.2 Methylation versus trimethylsilylation **93**

4 Implications for studies of natural samples *95*

5 Appendix A. *97*

6 Supplementary material : mass spectra *98*

Chapitre 3 :

Py-GC-MS de 17 dipeptides en présence de TMAH 103

1. Dipeptides vs. mélanges d'acides aminés *109*

1.1. Pyrolyse de mélanges binaires d'acides aminés 109

1.2. Pyrolyse des dipeptides correspondants 115
1.2.1. Pyrolyse de Val-Phe 117
1.2.2. Pyrolyse de Ala-Tyr 121
1.2.3. Pyrolyse de Ala-Trp 125

1.3. Comparaison des pyrolyses de dipeptides et des mélanges 128

2. La pyrolyse de dipeptides 129

2.1. Dipeptides aliphatiques 131
2.1.1. Pyrolyse de Gly-Gly en présence de TMAH 131
2.1.2. Pyrolyse de Gly-Leu en présence de TMAH 135

2.2. Dipeptides contenant un acide aromatique 139
2.2.1. Pyrolyse de Leu-Trp en présence de TMAH 139

2.3. Dipeptides hydroxylés 143
2.3.1. Pyrolyse de Thr-Ser en présence de TMAH 143
2.3.2. Pyrolyse de Gly-Ser en présence de TMAH 147
2.3.3. Pyrolyse de Val-Thr en présence de TMAH 153
2.3.4. Pyrolyse de Val-Ser en présence de TMAH 159
2.3.5. Pyrolyse de Thr-Leu en présence de TMAH 163

2.4. Dipeptide aromatique hydroxylé 169
2.4.1. Pyrolyse de Ser-Tyr en présence de TMAH 169

2.5. Comparaison de dipeptides symétriques 173
2.5.1. Val-Phe et Phe-Val 173
2.5.2. Leu-Tyr et Tyr-Leu 178
2.5.3. Met-Leu et Leu-Met 184
2.5.4. Conclusions sur la pyrolyse de dipeptides symétriques 193

3. Discussion des résultats de pyrolyse de dipeptides 195

3.1. Conclusion sur le rôle de la liaison peptidique 195
3.1.1. Dipeptide vs. acide aminé individuel 195
3.1.2. Considérations sur les produits de pyrolyse 195

3.2. Des diketopiperazines complexes 196

3.3. Influence de la nature des acides aminés sur les produits de pyrolyse du dipeptide 198
3.3.1. Les dipeptides aromatiques 199
3.3.2. Les dipeptides hydroxylés 199
3.3.3. Les dipeptides aliphatiques 200

3.4. Discussion en terme de mécanismes 200
3.4.1. Les mécanismes de pyrolyse sont-ils conservés ? 200
La formation de diketopiperazines 202
L'homolyse 203
La méthylation 204
La déshydratation 204
Déamination, décarboxylation 205
Dimérisation 205
Rupture de la liaison peptidique 205
D'autres mécanismes ? 206
3.4.2. Implications pour l'étude d'échantillons de Matière Organique Naturelle 206

4. Des hypothèses sur la multiplicité de certains spectres de masse 207

4.1. Equilibre céto-énolique 208

4.2. Séparation de stéréoisomères 209

4.3. Conclusion 210
5. *Un possible biais d'interprétation* 211
5.1. Introduction 211
5.2. Results and discussion 213

Chapitre 4 :

Py-GC-MS en présence de TMAH de polypeptides et de macromolécules 217

1. *La pyrolyse de polypeptides* 221
1.1. Val-Ala-Ala-Phe 223
1.2. Arg-Lys-Asp-Val-Tyr 227
1.3. Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH_2 231
1.4. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 235
1.5. Pyrolyse de SAB 238
1.6. Discussion 243
2. *La pyrolyse de macromolécules* 245
2.1. La lignine 247
2.2. Mélanges SAB/lignine 249
2.2.1. Mélange SAB/lignine, 50/50 251
2.2.2. Mélange SAB/lignine, 80/20 255
2.2.3. Discussion 255
2.3. La cellulose 259
2.4. Mélanges SAB/cellulose 262
2.4.1. Mélange 50/50 265
2.4.2. Mélange 80/20 269
2.5. Mélange SAB / lignine / cellulose 273
2.6. Conclusion 275

Conclusion générale 277

Annexe : matériel et méthode 283

Références bibliographiques 289

Introduction générale

Introduction générale

La matière organique azotée représente le deuxième réservoir d'azote sur la planète Terre, après l'azote atmosphérique. En terme de géochimie, cette matière organique azotée se distribue principalement entre le compartiment terrestre et le compartiment aquatique. Pour le compartiment terrestre, l'azote organique est principalement associé à la matière organique du sol ; dans le compartiment aquatique, il est combiné à la matière dissoute et particulaire. Ces différentes formes de matière organique azotée prennent part à de nombreux processus environnementaux. Selon la nature de l'azote organique et les formes dans lesquelles il est impliqué, la biodisponibilité et l'accumulation d'azote dans les compartiments environnementaux varient.

Malgré cette importance dans les problématiques environnementales, la structure chimique de la matière organique azotée demeure peu connue, en particulier à cause de son caractère réfractaire. En effet, 40 à 90 % de l'azote organique total du sol et des sédiments n'est actuellement pas caractérisé dans la matière organique naturelle. Une meilleure connaissance de la structure chimique matière organique azotée naturelle permettrait d'étudier son évolution.

Deux types de méthodes analytiques sont utilisés pour étudier l'azote dans la matière organique macromoléculaire réfractaire. Premièrement, les méthodes spectroscopiques permettent d'obtenir des informations globales sur la nature des fonctions azotées. Ainsi, des études récentes par RMN de l'azote (RMN ^{15}N) ont montré la présence de fonctions amides, indiquant donc que l'azote était engagé dans des unités polaires. Le second type d'analyses fournit des informations au niveau moléculaire. Ces dernières mettent en jeu des dégradations chimiques ou thermiques.

Depuis une vingtaine d'années, la pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS) constitue un outil efficace dans l'investigation de la structure de composés macromoléculaires. De plus, il a été montré plus récemment que l'ajout de TMAH (Tetra-Methyl-Ammonium Hydroxyde), qui est à la fois une base forte et un agent de méthylation, permettait une hydrolyse assistée thermiquement et une meilleure détection en chromatographie gazeuse, en particulier pour les produits polaires. L'ajout de TMAH permet également de minimiser les réactions de décarboxylation qui ont lieu fréquemment au cours de la pyrolyse conventionnelle.

Cependant, malgré une teneur en azote parfois significative, peu de produits azotés sont identifiés par Py-GC-MS de la matière organique naturelle et la nature des macromolécules sources (protéines, pigments, ou mélanoïdines) n'est pas établie de manière univoque.

Des travaux récents réalisés sur des fractions hydrophobes et transphiliques de matière organique dissoute de rivières ont montré de grandes variations dans l'abondance des produits azotés obtenus par pyrolyse, en dépit de teneurs en azote voisines. Ces différences dans la détection des composés azotés par pyrolyse ont pu être reliées à des variations dans la nature des fonctions azotées. Ainsi, peu de composés azotés sont détecté au cours de la pyrolyse de matière organique dans laquelle l'azote est majoritairement sous forme amide.

Les protéines représentant la fraction la plus importante de l'azote organique, ce travail a pour but d'identifier les produits formés au cours de la pyrolyse du matériel protéique afin de comprendre les mécanismes qui interviennent. Pour cela, nous avons analysé par Py-GC-MS en présence de TMAH les produits formés à partir de composés modèles de complexité croissante : acides aminés, dipeptides, polypeptides. Puis, nous avons comparé le comportement pyrolytique de différents types de macromolécules naturelles.

Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique sur la matière organique naturelle et les méthodes utilisées pour son analyse. Le chapitre 2 décrit les résultats obtenus pour les 20 acides aminés protéiques. Le rôle de la liaison peptidique est abordé dans le chapitre 3 avec l'étude de 17 dipeptides. Enfin, le chapitre 4 présente la pyrolyse de polypeptides constitués de 4 à 9 acides aminés, ainsi que celle de la SAB, seule et en mélange avec deux autres macromolécules naturelles (lignine et cellulose) pour estimer les coefficients de réponse de ces trois macromolécules.

Chapitre 1 :
Etude bibliographique

1 La matière organique naturelle ... 9

1.1 Définitions ... 9

1.2 Le cycle du carbone ... 10

1.3 Les grandes classes des composés de la MON ... 13

1.3.1 Les composés de faible masse moléculaire ... 13

1.3.1.1 La fraction hydrosoluble ... 13

1.3.1.2 Les lipides ... 13

1.3.2 Les composés macromoléculaires ... 14

1.3.2.1 Les polysaccharides ... 15

1.3.2.2 Les macromolécules polyphénoliques ... 18

1.3.2.3 La cutine et la subérine ... 20

1.3.2.4 Les mélanoïdines ... 20

1.3.3 Les substances humiques ... 20

1.3.4 Les kérogènes ... 21

1.3.4.1 Définition et formation ... 21

1.3.4.2 Composition ... 23

2 La matière organique naturelle azotée ... 25

2.1 Le cycle de l'azote ... 25

2.1.1 La répartition de l'azote sur Terre ... 25

2.1.2 Les processus du cycle ... 26

2.1.3 Les échanges entre compartiments ... 29

2.1.3.1 De la terre à l'atmosphère ... 29

2.1.3.2 De l'océan à l'atmosphère ... 29

2.1.3.3 De la terre à l'océan ... 29

2.1.3.4 De l'atmosphère à la surface ... 29

2.2 Les composés organiques azotés ... 29

2.2.1 Formes biologiques ... 30

2.2.1.1 Les protéines et les polypeptides ... 30

2.2.1.2 L'ADN et l'ARN ... 33

2.2.1.3 Les polymères d'amino-sucres. ... 33

2.2.1.4 Les porphyrines ... 33

2.2.2 Formes abiotiques ... 34

3 Dégradation et préservation de la MON ... 35

3.1 La dégradation de la matière organique au cours de la diagenèse ... 35

3.1.1 Les différents modes de dégradation de la MO ... 35

3.1.2 Paramètres d'évaluation de la dégradation de la MON ... 36

3.1.3 Les paramètres influençant la dégradation de la MO ... 38

3.2 Récalcitrance et préservation ... 39

3.2.1 Récalcitrance intrinsèque ... 39

3.2.2 Récalcitrance acquise ... 40

3.2.3 Préservation assistée ... 41

4 MON réfractaire et méthodes analytiques ... 43

4.1 Les techniques globales ... 43

4.1.1 L'analyse élémentaire ... 43

4.1.2 L'infra-rouge ... 44

4.1.3 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ... 44

4.1.4 La fluorescence ... 45

4.1.5 La spectrométrie de photoélectrons X (XPS) ... 45

4.2 Les méthodes de dégradation ... 45

4.2.1 Les dégradations chimiques ... 46

4.2.2 La pyrolyse 46
4.2.3 La pyrolyse off-line 47
4.2.4 La pyrolyse on-line 48

4.3 La dérivation 51

A l'aube du XXI siècle, les questions liées à notre environnement naturel connaissent un engouement important. Outre les questions géopolitiques que soulèvent les ressources énergétiques ou en eau, les questions d'ordre écologique, auxquelles elles sont souvent liées, proposent de nouveaux défis à la science contemporaine. En effet, les processus qui régissent le fonctionnement des écosystèmes restent mal connus. Afin d'appréhender ces phénomènes complexes, il est nécessaire de connaître les éléments qui les composent. A l'échelle moléculaire, il s'agit d'identifier et de caractériser les composantes chimiques qui participent à des mécanismes biologiques ou géologiques par exemple. Ces composés d'intérêts biogéochimiques forment la matière organique naturelle.

1 La matière organique naturelle

1.1 Définitions

Le terme « matière organique naturelle » (MON) désigne l'ensemble des composés organiques présents dans notre environnement naturel sur la planète. Ces composés proviennent des organismes vivants. En milieu continental il s'agit principalement des produits organiques synthétisés par les plantes, de la production des micro-organismes et des résidus associés à ces organismes, à des stades de décomposition plus ou moins avancés. En milieu marin, il s'agit des produits de synthèse planctonique, et des apports terrestres également plus ou moins dégradés.

Les substances humiques et les kérogènes sont les fractions de MON non-extractibles aux solvants organiques, respectivement dans les sols et les sédiments. Les kérogènes, au cours de leur enfouissement, donnent naissance au pétrole, comme l'indique l'étymologie du mot. Les substances humiques se déclinent en trois catégories suivant le pH auquel elles sont solubles dans l'eau ou non : les acides fulviques, solubles pour tous les pH, les acides humiques, solubles à pH supérieur à 2, et l'humine insoluble, quel que soit le pH.

La MON subit des modifications qui dépendent de l'environnement et de sa capacité à être dégradée. Elle est également susceptible d'être transportée, principalement par entraînement éolien ou aqueux.

Depuis de nombreuses années, les échanges entre les différents compartiments de MON font l'objet d'études et restent encore des sujets de débat.

Le cycle global du carbone propose un modèle dynamique des stocks naturels de carbone et des flux de carbone entre les différents compartiments qui le constituent.

1.2 Le cycle du carbone

Le cycle du carbone présente les échanges de carbone au sein de et entre quatre réservoirs principaux. L'atmosphère, les océans, la biosphère et la lithosphère (les combustibles fossiles et les kérogènes) constituent ces quatre compartiments (figure 1-1).

Les échanges entre ces compartiments peuvent être extrêmement rapides ou lents : de la seconde, pour la fixation de CO_2 atmosphérique en carbohydrate par photosynthèse, à plusieurs millénaires, pour l'accumulation de carbone fossile par dépôt et diagenèse de matière organique.

Le cycle du carbone est important pour trois raisons au moins :

- ✓ Le carbone forme la structure de la vie sur notre planète et compte pour environ 50% du poids sec de la biomasse.
- ✓ Le cycle du carbone est fortement lié aux flux d'énergie. Les plantes transforment l'énergie solaire en énergie chimique, utilisée au fil des chaînes alimentaires. De plus, la société industrialisée consomme de l'énergie fossile à des fins de chauffage, transports et production d'électricité.
- ✓ Les gaz contenant du carbone, principalement le dioxyde de carbone, CO_2, et le méthane CH_4, participent à l'effet de serre ; ces gaz naturels ont un impact très important sur la température de la planète. Il est donc particulièrement important de mieux connaître les processus de production et de consommation de ces gaz pour mieux appréhender les changements climatiques et préserver la planète.

Le stock de carbone le plus important se trouve dans la lithosphère (30.10^6 Pg de carbone, sédiments) auxquels s'ajoutent 5000 à 10000 Pg de combustibles fossiles. Les océans constituent le deuxième réservoir avec 38000 Pg. La biosphère (2000 Pg) et l'atmosphère (780 Pg) sont des réservoirs bien plus modestes. Notons que le carbone organique, estimé à 1000 Pg, représente un peu plus de 2.5% du carbone océanique.

Les océans contiennent environ 50 fois plus de carbone que l'atmosphère ou que la végétation terrestre mondiale. Par conséquent, des modifications d'abondance du carbone dans les différents réservoirs affecteront de façon significative la biosphère et l'atmosphère. Les océans jouent un rôle tampon et seront moins perturbés. Les activités humaines constituent une perturbation majeure de ce cycle et affectent principalement la biosphère.

Les échanges les plus importants s'effectuent entre la biosphère et l'atmosphère d'une part et entre les océans et l'atmosphère d'autre part. L'atmosphère connaît des flux estimés à 25% de son stock. Les échanges entre la biosphère et l'atmosphère sont liés à la photosynthèse (réduction du CO_2 et production de glucose) et à la respiration et la combustion de matière organique (oxydation de la matière organique). Les échanges entre les océans et l'atmosphère reposent principalement sur l'équilibre entre le CO_2 dissous, les bicarbonates et les carbonates.

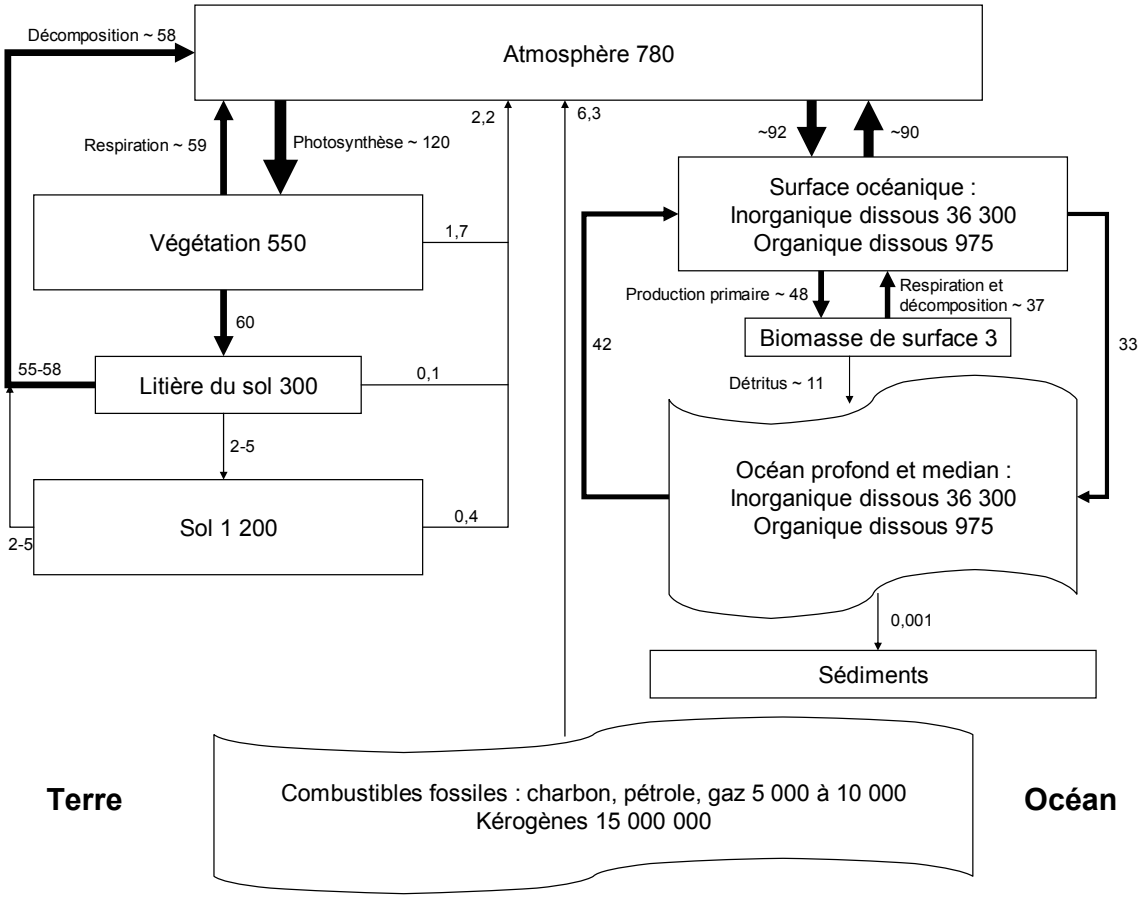


figure 1-1Cycle global du carbone (unités : Pg C ou Pg C.an^{-1})

Ce cycle présente un modèle communément admis. Il traduit la distribution du carbone dans les différents compartiments ainsi que les flux qui s'établissent entre ces derniers. Cependant les formes moléculaires du carbone restent peu connues.

La caractérisation chimique moléculaire des différents compartiments fait l'objet de nombreuses études, que ce soit en milieu océanique ou terrestre, et de nombreuses démarches analytiques.

De plus, l'apport terrestre de MON au compartiment océanique reste mal connu ; la quantité est de mieux en mieux évaluée, mais cet apport n'est pas encore caractérisé par des structures moléculaires. Qu'il s'agisse des deltas de fleuve (Keil *et al.*, 1997), ou de zones côtières (Mannino & Harvey, 2000), la question des flux de MON reste déterminante pour une bonne connaissance du cycle de carbone.

Au sein même des réservoirs précédemment présentés, la MON subit des transformations qui sont de mieux en mieux appréhendées (Baldock *et al.*, 2004), (McCarthy *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 2004), mais qui nécessitent souvent la connaissance et l'identification de marqueurs de dégradation (Wakeham *et al.*, 1997). De même, dans les océans, le devenir de la MON d'origine terrestre demeure peu connu, même si il semble que la majeure partie de celle-ci soit rapidement dégradée en milieu océanique (Hedges *et al.*, 1997).

Or il est difficile d'appréhender les flux de MO tant que la structure de celle-ci n'est pas relativement bien connue. En effet, la MO terrestre contribue à la MO océanique, mais sous différentes formes qu'il est nécessaire d'identifier afin de discriminer la MO terrestre de la MO océanique. Ces formes dépendent évidemment des organismes qui ont produit les composés mais également des transformations qu'ont subies les composés au cours de leur histoire. Le potentiel de préservation de ces composés joue donc un rôle essentiel dans la dégradation de la MO.

Cette préservation découle de plusieurs paramètres : elle peut être directement liée à la structure chimique des composés, ou bien dépendre de l'environnement : température, présence de minéraux, possibilité d'interaction avec des composés eux-mêmes récalcitrants. Les principaux mécanismes de préservation seront abordés au paragraphe 3.2.

1.3 Les grandes classes des composés de la MON

Ainsi, il apparaît indispensable de connaître la structure de la MO afin de mieux comprendre les différents processus intervenant dans les flux de MO et plus généralement dans le cycle du carbone. On distingue les composés de faible masse et les macromolécules. Parmi les composés de faible masse, les sucres et les acides aminés constituent la fraction hydrosoluble et les lipides la fraction organosoluble. Dans les sols et les sédiments, les macromolécules forment respectivement les substances humiques et les kérogènes. Ces composés macromoléculaires sont constitués de molécules appartenant à des grandes familles structurales telles que les polysaccharides, -parmi lesquels figurent la cellulose, l'amidon et la chitine-, la lignine, la cutine et la subérine, les mélanoïdines, les tannins, les pigments comme la chlorophylle, ou les protéines.

Sans en faire une présentation exhaustive, les paragraphes suivants présentent les grandes classes de composés constituant la MON.

1.3.1 Les composés de faible masse moléculaire

1.3.1.1 La fraction hydrosoluble

Par définition, elle est constituée des composés de la MON solubles dans l'eau : les carbohydrates et les acides aminés.

Les carbohydrates, de formule brute $(CH_2O)_n$ comportent les sucres simples (oses) dont le plus répandu est le D-glucose. Les oses sont présents en grande quantité dans la betterave sucrière par exemple. Le glucose est l'unité structurale la plus répandue dans la nature et il constitue le monomère des polymères naturels que sont la cellulose et l'amidon.

Les acides aminés constituent avec les sucres les molécules de base des organismes vivants : les protéines sont composées de l'association de vingt acides α-aminés par liaison peptidique. Les acides aminés représentent une source d'azote pour les organismes vivants.

1.3.1.2 Les lipides

Cette fraction comprend les composés non solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques. Elle regroupe une grande diversité de familles chimiques parmi lesquelles : hydrocarbures, cétones, alcools, acides, esters, terpènes et acides gras. Ce sont des composés dont la taille peut atteindre C_{50} à C_{60}.

Les hydrocarbures sont principalement des n-alcanes, leur proportion dans les lipides est très variable (de quelques pourcents à 50%). La contribution d'alcanes ramifiés ainsi que d'alcènes demeure mineure.

Les composés oxygénés, tels que les alcools secondaires, les cétones, les hydroxyacides, les dicétones, et les hydroxydicétones sont des constituants classiques des lipides. Ce sont des composés impairs, majoritairement en C_{29} ou C_{31} dont la fonction oxygénée se situe généralement en milieu de chaîne.

Au contraire, les alcools primaires sont des composés pairs, dont le nombre d'atomes de carbone varie généralement de 22 à 34.

Les monoesters constituent les cires cuticulaires (la cuticule est une pellicule superficielle protectrice des jeunes tiges et des feuilles) et sont composés d'acides pairs saturés en C_{12}-C_{30} et d'alcools en C_{20}-C_{32}.

Les terpènes constituent entre autres le principe odoriférant des végétaux. Leur structure est basée sur des unités isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène), et ils sont souvent cycliques.

D'autre part, les micro-organismes produisent des lipides principalement sous forme d'acides gras, qui sont surtout liés à d'autres molécules, en particulier le glycérol en raison de leur toxicité. Les acides libres peuvent être linéaires ou ramifiés, et comportent souvent une ou deux insaturations.

Enfin mentionnons aussi les phospholipides, dont les glycérophospholipides. Associés en doubles couches, ils forment les parois des cellules. En synthèse organique, ils sont souvent synthétisés pour former des liposomes, ensuite utilisés comme vecteur de principe actif (médicamenteux ou cosmétique).

1.3.2 Les composés macromoléculaires

Cette famille recouvre les édifices moléculaires de haute masse moléculaire. Il peut s'agir de polymères naturels très ordonnés ou résultants de mécanismes moins concertés. Ces

composés macromoléculaires peuvent présenter un caractère récalcitrant. Cet aspect sera abordé dans la troisième partie de ce chapitre bibliographique.

1.3.2.1 Les polysaccharides

La cellulose représente à elle seule plus de 50% du carbone organique de la biosphère. C'est le polyoside de structure la plus simple puisqu'il s'agit d'un enchaînement linéaire de D-glucoses liés en β(1-4) (figure 1-2).Cette structure développe de nombreuses liaisons H qui lui confèrent ses propriétés mécaniques indispensables à sa fonction structurelle. Le poids moléculaire de la cellulose varie de 50000 à 500000 Daltons, ce qui représente 300 à 3000 unités glucose.

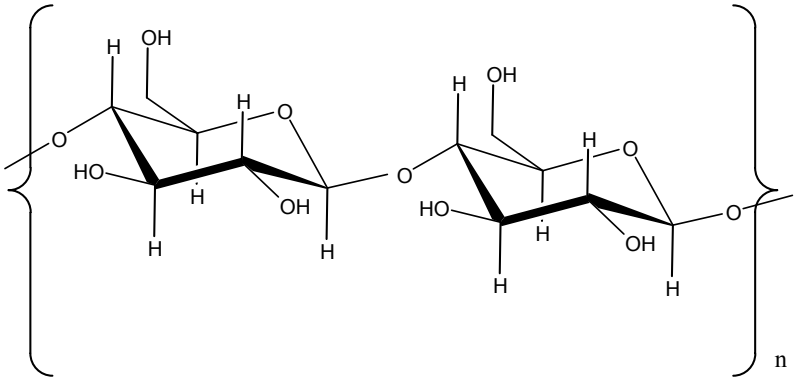
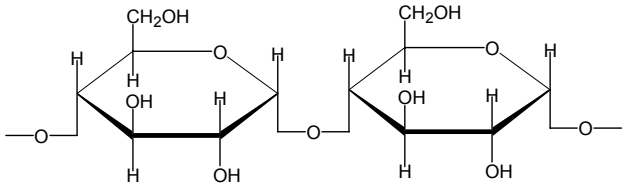


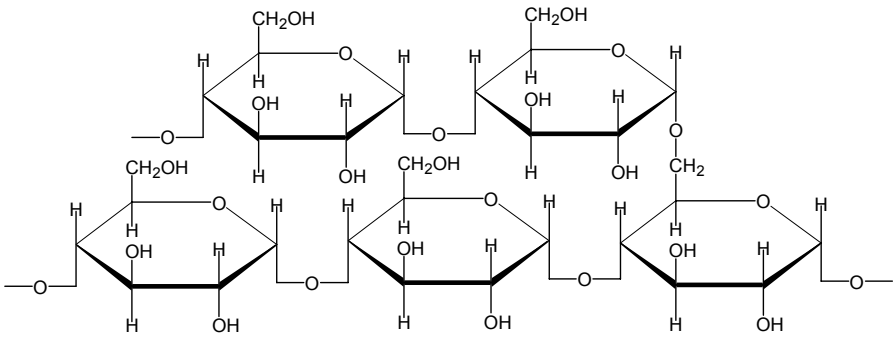
figure 1-2 : structure de la cellulose

Pour illustrer l'importance de la cellulose, un arbre en produit 10 g par jour, ce qui représente $1{,}3.10^{10}$ t/an à l'échelle de la planète.

L'amidon est également un polymère de glucose. C'est un polysaccharide de réserve et il est présent dans les plantes, les algues et les bactéries. C'est le deuxième produit naturel après la cellulose. Il est composé de deux polysaccharides : l'amylose et l'amylopectine, basées toutes les deux sur un enchaînement d'unités anhydroglucose pontées par des liaisons 1-4, auxquelles se substituent quelques liaisons 1-6 (toutes les 25 à 30 unités) pour l'amylopectine créant ainsi une structure ramifiée (figure 1-3).



Amylose



Amylopectine

figure 1-3 : les polymères de l'amidon

L'équivalent de l'amidon pour le règne animal est le glycogène dont la structure ne diffère de celle de l'amylopectine que par la présence d'un nombre plus important de liaisons 1-6 : toutes les 8 à 12 unités.

Avec près de 10.10^9 t. synthétisées par an, la chitine constitue un des principaux polysaccharides naturels. Comme la cellulose, la chitine est un polymère de structure particulièrement résistante et principalement présent dans les carapaces des crabes et crustacés (Baas *et al.*, 1995; Stankiewicz *et al.*, 1998b). Pour le crabe, la chitine peut représenter 70% de la masse de l'animal. D'un point de vue structural, la chitine est un équivalent de la cellulose, constituée de β 1-4 2 acetamido-2-deoxyglucose (figure 1-4).

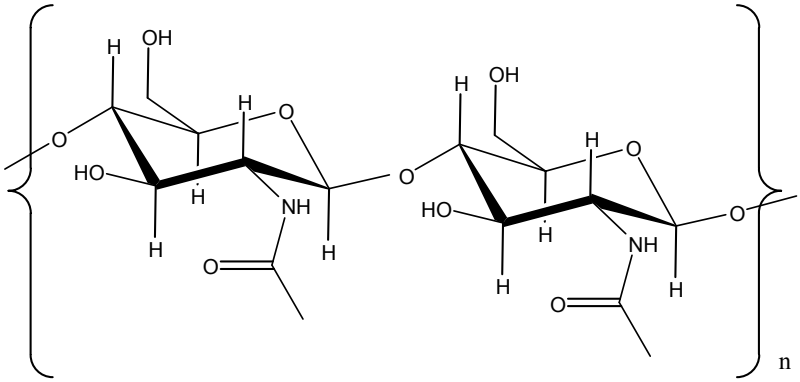


figure 1-4 : structure de la chitine

De plus il existe des macromolécules résultant de l'association de carbohydrates avec d'autres molécules, macromoléculaires ou non : glycoprotéines, glycopeptides, peptidoglycanes, glycolipides et lipopolysaccharides.

Les glycoprotéines sont composées d'une protéine et d'un carbohydrate ne comprenant pas plus de 10 monosaccharides. Elles sont importantes dans les cellules, et elles peuvent être libres ou liées aux membranes cellulaires.

Les peptidoglycanes, aussi appelés muréines, sont des constituants des parois bactériennes. Ce sont des chaînes polysaccharidiques liées à des tetra- ou pentapeptides (figure 1-5). La composition de ces peptides varie en fonction de l'espèce bactérienne et également entre les espèces Gram (–) et les espèces Gram (+). La chaîne polysaccharidique est constituée de l'alternance de N-acetylglucosamine et d'acide N-acetylmuramique. La réticulation des chaînes est assurée par des ponts peptidiques.

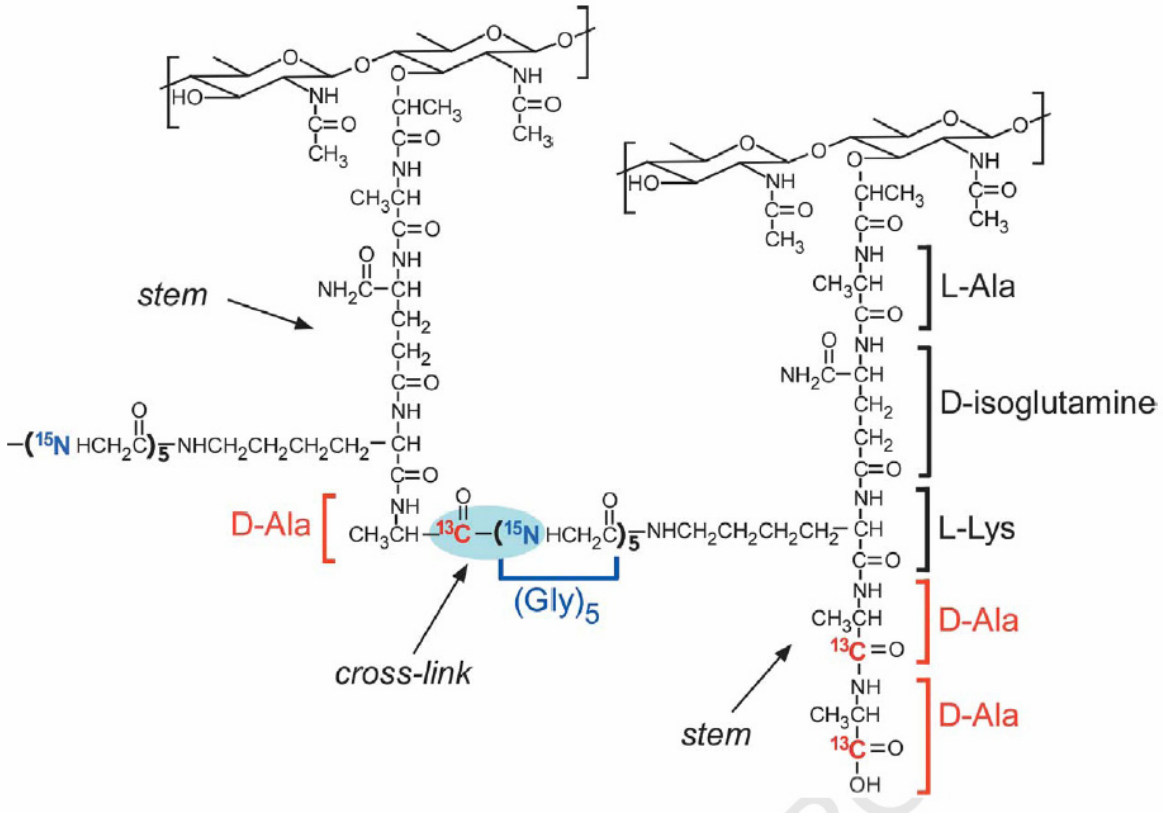


figure 1-5 : structure de peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*, d'après (Cegelski *et al.*, 2006)

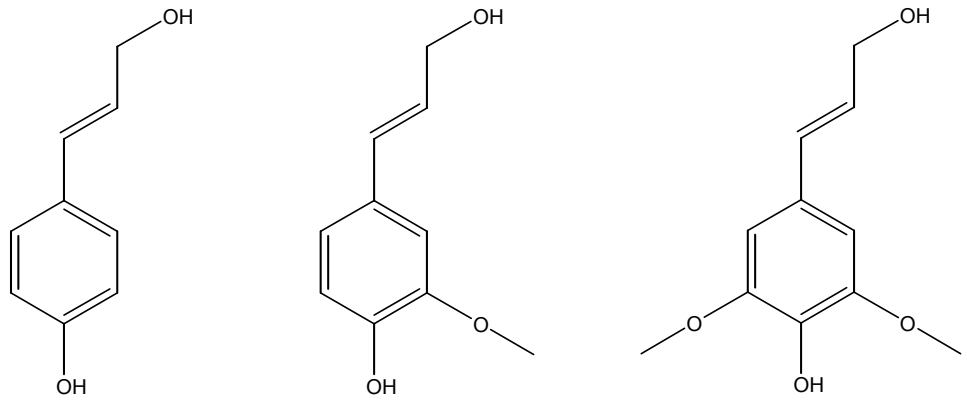
Les glycolipides résultent de l'association d'un lipide avec un ou plusieurs carbohydrates. Ils sont sources d'énergie et peuvent aussi servir de marqueur d'identité cellulaire.

Les lipopolysaccharides sont des constituants essentiels de la paroi bactérienne des bactéries Gram (-). Ils sont formés d'un lipide, d'un cœur oligosaccharidique et d'un polysaccharide. Ils jouent un rôle important dans le déclenchement d'une réponse immunitaire.

1.3.2.2 Les macromolécules polyphénoliques

Après les polysaccharides, la lignine est le constituant le plus abondant des plantes supérieures et constitue de 5 à 10 % des feuilles et aiguilles et jusqu'à 30 % dans le bois.

La lignine est une macromolécule polyaromatique de haut poids moléculaire qui compose une partie de la paroi des plantes ligneuses, des fougères et de certaines mousses et assure leur rigidité. Ce copolymère naturel est le produit de condensation de monomères phénoliques alkylés en C_3. Les trois principaux précurseurs de la lignine sont les alcools synapique, coniférique et p-coumarique (figure 1-6).



alccol coumarique alccol coniferique alccol synapique

figure 1-6 : les trois principaux monomères de la lignine

Ces unités de base sont reliées par des liaisons arylglycerol-β-arylether (β-O4), biphényles (5-5) ou phénylcoumaranes (β-5) (figure 1-7).

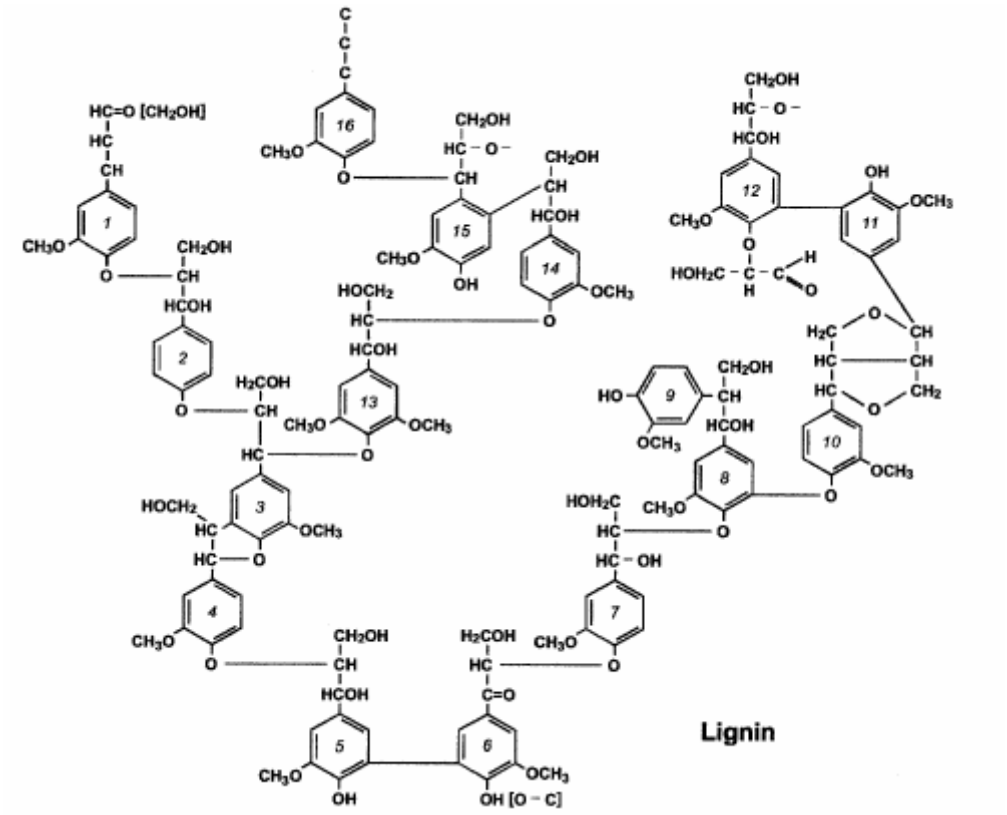


figure 1-7 : modèle de structure de la lignine, d'après (de Leeuw & Largeau, 1993)

Dans une plante donnée, l'abondance relative de ces trois unités varie et caractérise ainsi la plante source. La connaissance de la proportion de ces unités permet donc de déterminer quel est le type de plante (par exemple : angiospermes ou gymnospermes) qui a produit la lignine étudiée (de Leeuw & Largeau, 1993).

La lignine semble présenter une résistance à la dégradation plus importante que la cellulose. Elle est particulièrement résistante en milieu anaérobie, ce qui explique son accumulation dans les charbons et les tourbes.

Il existe d'autres macromolécules polyphénoliques, comme les tannins. Les tannins sont présents dans les plantes supérieures (Hernes & Hedges, 2004) mais aussi dans certaines algues. Ce sont des constituants des racines, des graines et des écorces. Ils possèdent la propriété de précipiter les protéines en milieu aqueux et de complexer la cellulose et l'amidon. Il existe trois sortes de tannins qui se différencient par leur structures chimique, leur poids moléculaire et leurs potentiel de préservation : les tannins condensés, ou polymères proanthocyanides, les phlorotannins et les tannins hydrolysables. A l'heure actuelle, il existe peu d'études au sujet des tannins.

1.3.2.3 La cutine et la subérine

Ce sont également des familles de macromolécules importantes dans les plantes supérieures. La cutine et la subérine sont des polyesters qui, associés aux cires, forment une enveloppe protectrice des plantes. La cutine, associée aux cires, constitue la cuticule qui protège les parties aériennes des plantes supérieures. La subérine est localisée dans les parties souterraines des plantes ainsi que dans l'écorce et les tissus cicatriciels. Cette enveloppe constitue une barrière imperméable entre la plante et son environnement grâce à laquelle la diffusion des gaz peut être contrôlée. Ces polymères sont des produits de condensation, principalement, d'acides et d'hydroxy-acides, liés entre eux par des liaisons esters. Ils diffèrent par la longueur des chaînes aliphatiques de ces constituants (Kolattukudy *et al.*, 1976). De plus, des unités polyphénols similaires à celles de la lignine sont présentes de la subérine (Bernards & Lewis, 1998).

1.3.2.4 Les mélanoïdines

Les mélanoïdines sont des produits de condensation de carbohydrates avec des acides aminés, ou réaction de Maillard (1912). Ces composés possèdent une structure proche de celle des substance humiques et un potentiel de préservation important. La réaction de Maillard et le potentiel de préservation qui en découle seront abordés dans la troisième partie de ce chapitre.

1.3.3 Les substances humiques

La matière organique des sols se compose d'un mélange de résidus d'origines végétale et animale, à des degrés de décomposition variés, de substances dégradées chimiquement et/ou par des microorganismes, des microorganismes morts et vivants, de petits animaux, et des restes de décomposition. La matière organique des sols se répartit en deux familles : les substances non humiques, dont les composés ont conservé des caractéristiques identifiables (carbohydrates, protéines par exemple) et les substances humiques (Schulten, 1999).

Le terme de substances humiques recouvre les composés issus de décomposition de la matière organique des sols qui présentent un caractère réfractaire. Les substances humiques sont amorphes, de couleurs sombres, en partie aromatiques, et peuvent être polychargées. Leur masse moléculaire varie de quelques centaines de daltons à plusieurs centaines de milliers de daltons.

Les substances humiques regroupent les acides humiques, les acides fulviques et l'humine. Ces trois classes de composés se rapportent aux protocoles expérimentaux d'extraction et sont donc des définitions opérationnelles : les acides fulviques sont solubles en solutions acide et basique, les acides humiques sont solubles en milieu acide et insolubles en milieu basique et l'humine est insoluble dans les deux milieux.

Le terme de substances humiques a été étendu à la MO des rivières. Elles peuvent être isolées par osmose inverse, adsorption/désorption sur des résines (Lehtonen *et al.*, 2000b), ou par ultrafiltration (Mannino & Harvey, 2000).

La composition chimique des substances humiques demeure peu connue. Il est généralement admis que les composés humiques se composent de structures analogues entre eux. Schulten et Schnitzer (Schulten & Schnitzer, 1992) ont démontré par Py-FIMS que les principaux constituants des acides humiques étaient les carbohydrates, phénols, monomères et dimères de lignine, alcanes, alcènes, acides gras et n-alkyl esters. Le degré de polymérisation varie au sein des composés humiques, il est plus élevé dans l'humine. Des modèles de substances humiques aqueuses ont récemment été proposés (Schulten, 1999).

1.3.4 Les kérogènes

1.3.4.1 Définition et formation

Le terme kérogène désigne la fraction insoluble de la matière organique sédimentaire par opposition au bitume. Le kérogène représente 95% en moyenne de la matière organique sédimentaire (Durand, 1980; Tyson, 1995).

La théorie classique de la formation des kérogènes repose sur un mécanisme dit de dégradation-recondensation (Tissot & Welte, 1978b). La matière organique de production primaire est fragmentée en constituants de plus petite taille par action microbienne et physicochimique au début de la diagenèse. La majorité de cette MO est minéralisée mais une petite partie échappe à cette dégradation totale en se recondensant. La dégradation et la

condensation qui lui succède immédiatement, produisent une zone de quelques mètres d'épaisseur dans la partie supérieure du sédiment, zone dans laquelle les deux types de transformation prennent lieu. Le caractère insoluble de ce matériel augmente avec le temps et découle directement de la polycondensation à laquelle est associée la perte de groupements fonctionnels hydrophiles. A la fin de la diagenèse, la matière organique sédimentaire se compose principalement de kérogène. Seule une faible partie de la MO reste soluble et constitue les bitumes.

Cependant quelques modifications ont été apportées à ce modèle classique. Il apparaît que le kérogène est produit à une étape relativement précoce de la diagenèse. Il semble également qu'une certaine fraction de kérogène provienne de mélanges de biomacromolécules résistantes, sélectivement préservées ou partiellement altérées plutôt que de la recondensation aléatoire de biomacromolécules dépolymérisées.

D'autres voies de formation des kérogènes ont aussi été mises en évidence :

- la préservation sélective de biopolymères résistants (Derenne *et al.*, 1991; Hatcher *et al.*, 1983) : des macromolécules initialement présentes dans la biomasse survivent aux dégradations diagénétiques et sont préservées quasi-intactes dans le kérogène.
- la sulfuration naturelle : certains lipides et carbohydrates réagissent avec des sulfures pour former des macromolécules soufrées (Brassell *et al.*, 1986).

La figure suivante (figure 1-8) propose un schéma de formation des kérogènes, d'après Tegelaar *et al.* (1989).

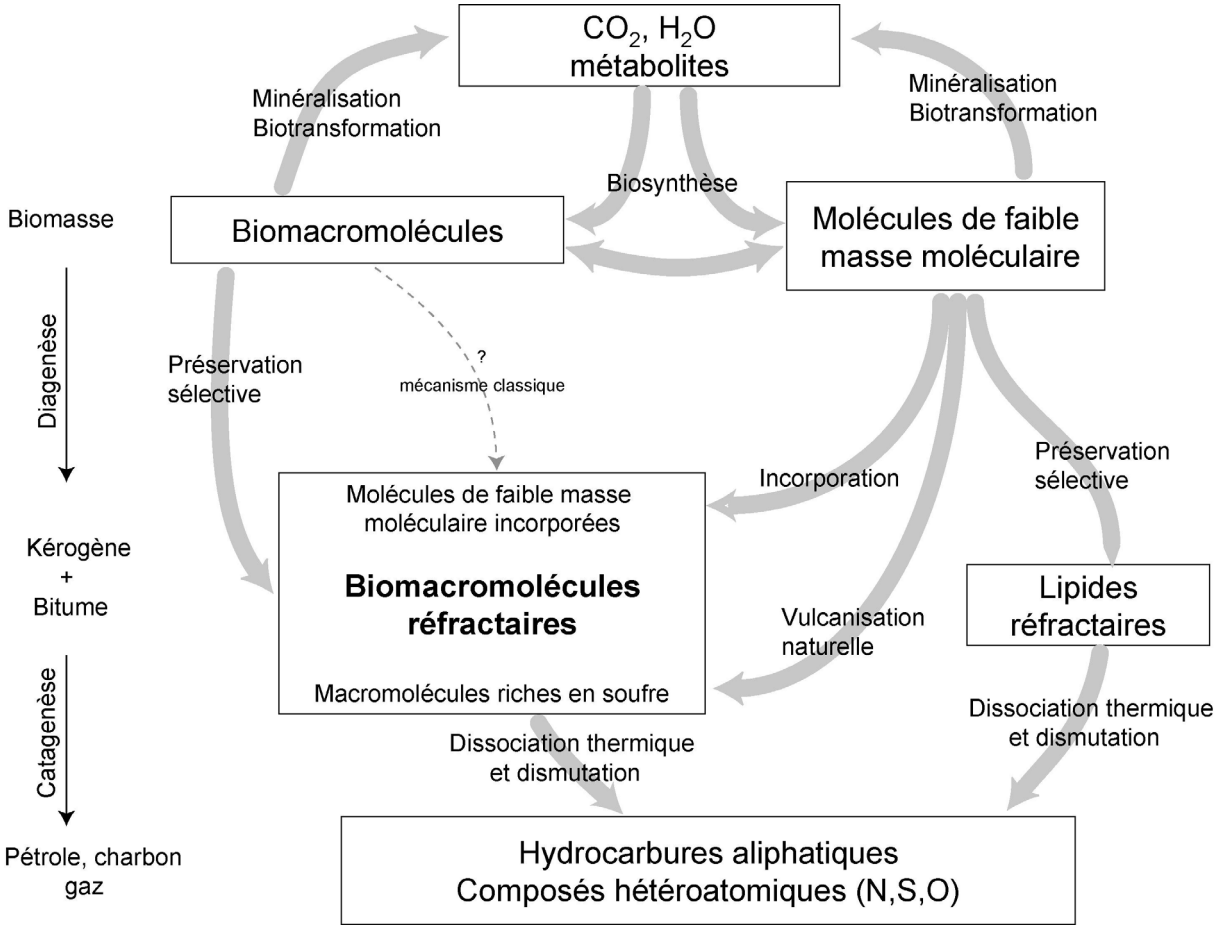


figure 1-8 : Modèle de formation de kérogène

1.3.4.2 Composition

D'un point de vue élémentaire, le carbone et l'hydrogène constituent les principaux éléments des kérogènes. L'oxygène est également important dans la structure des kérogènes et sa teneur est évaluée entre 10 à 25 % en masse dans les sédiments récents de surface, il est principalement présent sous la forme de ponts éthers. Pour 1000 atomes de carbone, sont présents 500 à 1800 atomes d'hydrogène, 25 à 300 atomes d'oxygène, 5 à 30 atomes de soufre et 10 à 35 atomes d'azote.

Comme pour les substances humiques, l'analyse structurale des kérogènes est difficile. Cependant les techniques d'oxydation et de pyrolyse ont permis de déterminer la plupart des unités structurales.

La composition des kérogènes dépend de la nature de la matière organique source. Cette composition détermine la quantité d'hydrocarbures que le kérogène peut générer. Mais elle dépend aussi d'autres paramètres qui seront abordés plus loin dans ce document.

On distingue trois types de kérogène :

- le type I, d'origine algaire et bactérienne en milieu lacustre
- le type II, d'origine algaire et bactérienne en milieu marin
- le type III, issus de plantes supérieures, en milieu continental.

Les kerogènes de type I sont les plus aliphatiques, ceux de type II ont une contribution plus importante de structures cycliques et oxygénées et ceux du type III sont plus aromatiues. Une distinction est faite pour les kérogènes riches en soufre ($S/C \geq 0.02$) qui appartiennent essentiellement au type II et pour lesquels a été défini le type II-S. Il semble que cette présence de soufre puisse favoriser la préservation de certaines fonctions labiles, en particulier azotées (del Rio *et al.*, 2004; Mongenot *et al.*, 2001; Riboulleau *et al.*, 2002).

2 La matière organique naturelle azotée

Cette expression désigne un sous-ensemble de la matière organique naturelle : il s'agit des composés azotés de cette dernière. De la même manière que pour le carbone, les composés azotés naturels sont produits et transformés par les organismes vivants et subissent également des mécanismes de dégradation, biologique, chimique et physique. Tout comme pour le carbone, il existe différents compartiments dans lesquels l'azote se trouve sous des états différents, et entre lesquels ont lieu des échanges.

2.1 Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote, à un degré moindre par rapport à celui du carbone, a un impact important sur le climat terrestre et représente un élément clé de la diversité, des dynamiques et du fonctionnement de nombreux écosystèmes terrestres, marins, et d'eau douce (Stankiewicz & van Bergen, 1998). Il consiste également en différents compartiments répartis dans l'atmosphère, la biosphère et la géosphère. Cependant, la majeure partie de l'azote n'est pas accessible pour les organismes vivants.

2.1.1 La répartition de l'azote sur Terre

La quantité d'azote sur la planète Terre est estimée à 5.10^{21}g, dont 80% se trouvent sous forme diatomique N_2 dans l'atmosphère. Les roches sédimentaires contiennent presque la totalité du reste, et les océans ainsi que les organismes morts et vivants ne représentent qu'une infime fraction du stock d'azote (tableau 2-1). Dans l'atmosphère, l'azote se trouve principalement sous forme minérale alors que, dans les océans et les sols, les formes majoritaires sont les formes organiques, ammoniac et nitrates.

tableau 2-1 : répartition de l'azote sur Terre (Tg N) d'après (Galloway, 2004)

Reservoirs	Quantité	Pourcentage
Atmosphère	3 950 000 000	79.5
Roches sédimentaires	999 600 000	20.1
Océan		
N_2	20 000 000	0.4
NO_3^-	570 000	0.0
MO des sols	190 000	0.0
biomasse terrestre	10 000	0.0
biomasse marine	500	0.0

2.1.2 Les processus du cycle

La fixation de l'azote consiste en la transformation du diazote N_2 en toute autre espèce azotée de degré d'oxydation non nul. Avant les activités humaines, l'azote biodisponible provenait principalement de la fixation biologique et des éclairs lors des orages. Les éclairs produisent en effet des oxydes d'azote (NO_x) en quantités non négligeables (Beirle *et al.*, 2004; Hild *et al.*, 2002; Ridley *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005) influençant ainsi, entre autres processus, la formation d'ozone et donc le climat global de la planète. La production de NO_x aboutit rapidement à la formation d'acide nitrique (HNO_3) (Galloway, 2004). Cependant, depuis quelques années, la disponibilité biologique a profondément changé à cause des activités humaines : l'azote est désormais plus fixé par des processus liés à l'activité humaine que par des processus naturels.

Le cycle de l'azote dépend fortement de facteurs climatiques et environnementaux, comme la disponibilité de l'eau, le pH, la salinité, l'aération, la végétation ou la température.

Par conséquent, beaucoup d'études portent sur des écosystèmes particuliers d'étendues variables et aux enjeux différents : par exemple à Venise (Solidoro *et al.*, 2005), il s'agit d'appréhender l'eutrophisation du lagon, alors que dans le golfe d'Aden (Bange *et al.*, 2005; Rixen & Ittekkot, 2005), les flux d'azote restent peu connus et les études portent alors sur les transformations que subit l'azote dans cet écosystème. Pour les sols, les études portent sur les interactions entre le cycle des nutriments et la consommation et la production des plantes afin de mieux contrôler la fertilité des sols (Jimenez *et al.*, 2002; Personeni & Loiseau, 2005).

Mais la bonne connaissance du cycle de l'azote de ces écosystèmes particuliers est essentielle pour parvenir à celle du cycle global de l'azote. De plus, contrairement au cycle du carbone, les quantités de matière mises en jeu demeurent très peu connues. Ainsi un effort est réalisé pour la détermination de la distribution spatiale et des flux de matière azotée, que ce soit en milieu océanique (Soetaert *et al.*, 2000; Voss *et al.*, 2001) ou terrestre (Wang *et al.*, 2001). Il s'agit également de déterminer les origines de la matière naturelle azotée et les transformations qu'elle subit (Benner *et al.*, 1997; Christian *et al.*, 1996).

Le cycle de l'azote dépend de plusieurs réactions qui ont lieu dans la nature (Stankiewicz & van Bergen, 1998). La fixation biologique de l'azote s'effectue principalement via des réactions enzymatiques et ne se produit que dans certains organismes, tels que les procaryotes, les cyanobactéries et quelques plantes symbiotiques, en milieu aérobie ou anaérobie. L'ammoniac (NH_3) est libéré au cours du processus de minéralisation qui intervient après la mort et la décomposition des organismes. L'assimilation d'ammoniac est réalisée principalement par les plantes, les animaux ne pouvant pas assimiler cette forme d'azote. La nitrification, processus important, permet de convertir l'ammoniac en nitrate (NO_3^-) et est assurée par des bactéries aérobies. Les nitrates peuvent être consommés par les plantes, les champignons, et les bactéries mais pas par les animaux. De plus les nitrates peuvent être convertis en nitrites, NO_2^-, et utilisés par de nombreux organismes au cours du processus de dénitrification qui aboutit à la formation de N_2O et N_2. La dénitrification se produit en conditions anaérobies dans les sols ou les océans. Bien que l'assimilation de l'ammoniac soit favorisée par rapport à celle des nitrates, les nitrates peuvent être directement utilisés par la plupart des microorganismes et des plantes.

De plus, il existe des processus non biologiques de fixation de l'azote au sein de la biosphère et de la géosphère, qui affectent le cycle en lui soustrayant une partie de l'azote : la réaction d'acides aminés ou de l'ammoniac avec des phénols ou des quinones et la réaction de Maillard (réaction de condensation d'acides aminés avec des polysaccharides, qui sera développée dans la troisième partie de ce chapitre) sont les principaux processus qui modifient la matière azotée, en particulier au cours de la décomposition de la matière organique. Ces processus jouent un rôle important dans la formation de macromolécules insolubles.

Mentionnons enfin, de façon plus anecdotique, la production d'azote par les bactéries anammox (anaerobic ammonium oxidation) (Kuypers *et al.*, 2003; Strous *et al.*, 1999; Ward, 2003). Ces bactéries anaérobies réalisent une rétro-dismutation de l'azote diatomique avec l'ion ammonium et les nitrites selon l'équation bilan suivante :

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2\ H_2O$$

Ce mécanisme a été découvert très récemment et montre bien que le cycle de l'azote possède encore des zones d'ombre.

Ces différents mécanismes sont illustrés par le schéma du cycle global de l'azote (figure 2-1). Notons que les processus d'assimilation de l'azote en milieu océanique sont analogues aux processus terrestres. L'azote N_2 est assimilé par des microorganismes et le phytoplancton, qui alimentent le règne animal. La décomposition de ces organismes vivants (végétaux et animaux) mène à la minéralisation de l'azote en ammoniac. Ce dernier entre alors dans le cycle de nitrification et dénitrification qui aboutit à la libération d'azote diatomique.

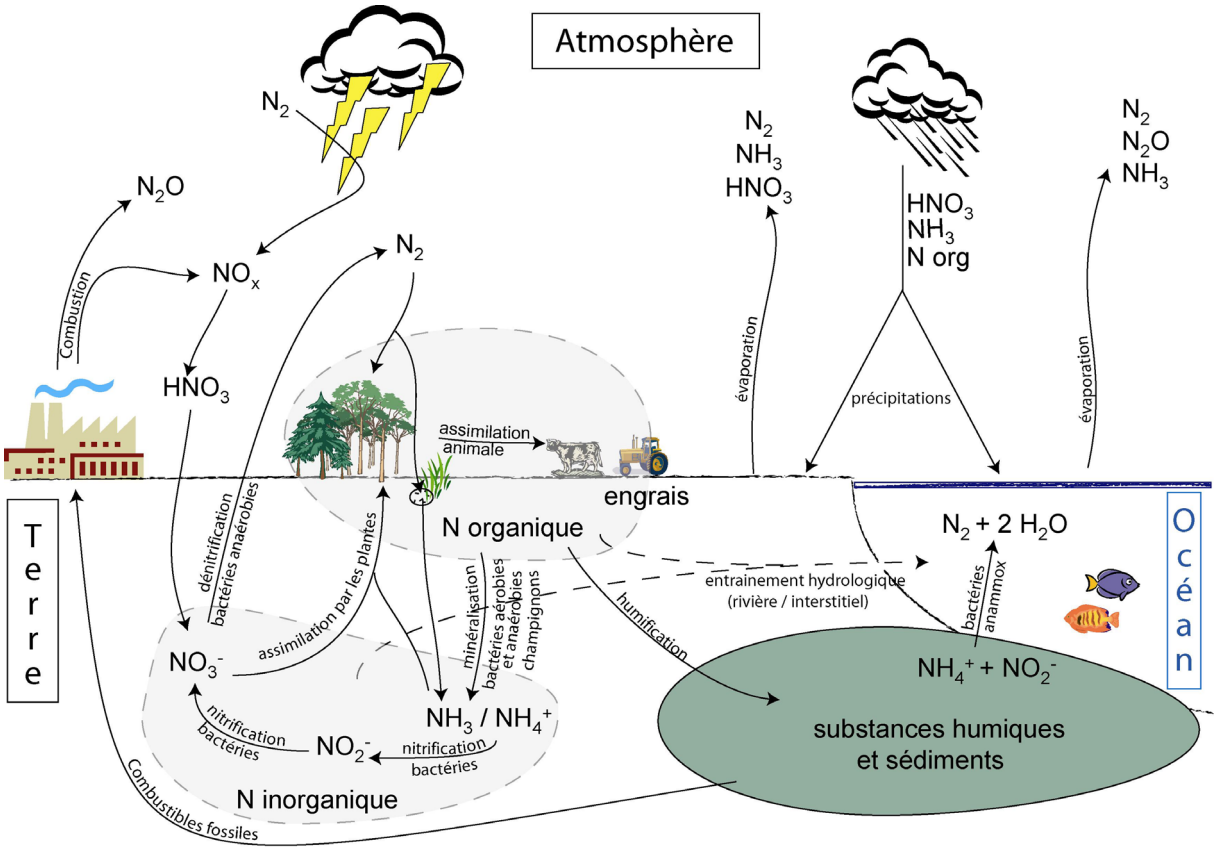


figure 2-1 : cycle global de l'azote

2.1.3 Les échanges entre compartiments

2.1.3.1 De la terre à l'atmosphère

L'azote est transféré à l'atmosphère par des procédés hautes et basses températures. La combustion de la biomasse et des combustibles fossiles produit des oxydes d'azote (NO_x) et du protoxyde d'azote (N_2O). Le dégazage des sols et des eaux ainsi que la formation de particules par turbulences constituent les processus de basses températures. Les gaz sont générés principalement par l'activité microbienne.

2.1.3.2 De l'océan à l'atmosphère

Il s'agit d'échanges basés sur les équilibres de dissolution des gaz : lorsque leur pression partielle dans l'océan est supérieure à celle dans l'atmosphère, les gaz tels que NH_3, N_2 et N_2O s'échappent dans l'atmosphère. Ils peuvent également être transférés par la formation d'aérosols à la surface de l'eau (bulles et écumes).

2.1.3.3 De la terre à l'océan

Les composés azotés, inorganiques ou organiques, solubles ou particulaires sont charriés par les eaux souterraines ou de surface, du continent vers l'océan. La majorité de l'azote se trouve alors sous forme de nitrates ou de composés organiques particulaires.

2.1.3.4 De l'atmosphère à la surface

L'azote est déposé sur les continents et les océans par voie humide ou sèche. La voie humide regroupe les différents types de précipitations météorologiques : pluie, neige, grêle. L'azote peut être organique ou inorganique. La voie sèche désigne les gaz et les aérosols, qui contiennent essentiellement de l'acide nitrique et de l'ammoniac. Les flux liés aux aérosols sont beaucoup plus faibles que les flux gazeux.

2.2 Les composés organiques azotés

Outre l'azote diatomique, les composés organiques représentent environ la moitié de l'azote combiné. Ces composés azotés appartiennent à de grandes classes de macromolécules

principalement d'origine biologique telles que l'ADN, les protéines ou les amino-sucres. Cependant, le devenir de ces macromolécules azotées dans la biosphère et la géosphère demeure peu connu. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier cette matière afin de mieux appréhender le cycle global de l'azote.

2.2.1 Formes biologiques

Dans les organismes vivants, l'azote se trouve sous forme gazeuse (dans les cellules), ou sous forme oxydée et/ou réduite. La forme réduite constitue la forme majoritaire des trois structures macromoléculaires biologiques les plus importantes : protéines, ADN et amino-sucres. D'autre part, des molécules biologiques de plus petite taille contribuent aussi au pool de la matière organique azotée : les porphyrines comme la chlorophylle ou l'hémoglobine et les métabolites de plantes secondaires comme les alcaloïdes.

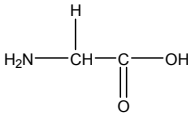
2.2.1.1 Les protéines et les polypeptides

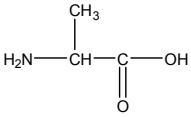
Les protéines et les peptides sont des macromolécules très importantes dans le cycle de la vie et sont des polymères d'acides aminés. Les protéines peuvent représenter jusqu'à 20 % de la matière sèche des plantes. Les protéines sont les substances cellulaires les plus abondantes. Ces molécules remplissent des rôles biologiques fondamentaux : elles peuvent servir de matériel structurel (kératine), de catalyseurs (enzymes) ou de régulateurs (sous forme globulaire). Elles sont souvent associées à d'autres macromolécules. Cependant, elles sont généralement rapidement dégradées par des enzymes et par conséquent les protéines ne représentent pas une grande proportion de la MON. Toutefois, il existe des cas particuliers, pour lesquels le matériel protéique présente une bonne préservation. Ces cas seront abordés dans la suite de ce travail.

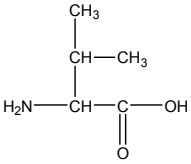
Dans ces macromolécules, les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques. La structure 3D de ces macromolécules peut être complexe car les chaînes latérales fonctionnalisées peuvent développer des liaisons de faible énergie, voire des liaisons covalentes, telles que des ponts disulfures.

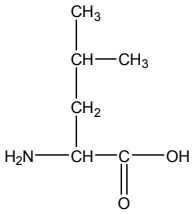
Les protéines sont constituées de l'association de vingt acides aminés présentés dans la figure 2-2 et représentent donc une source d'azote organique. Leur potentiel de préservation est supposé faible et leur dégradation produit des peptides dans un premier temps puis des

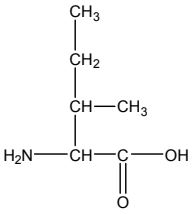
acides aminés libres. Ainsi elles sont facilement accessibles aux microorganismes et participent donc au cycle de l'azote.

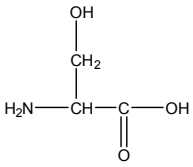

Glycine

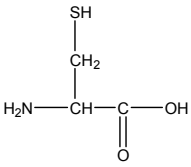

Alanine

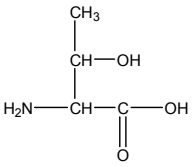

Valine

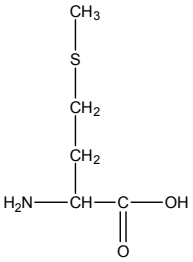

Leucine

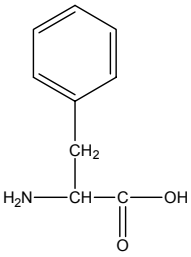

Isoleucine

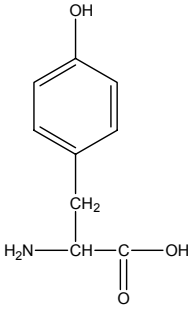

Serine

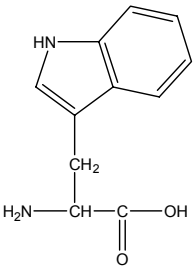

Cystéine

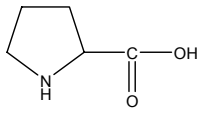

Thréonine

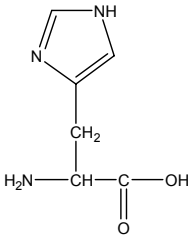

Methionine

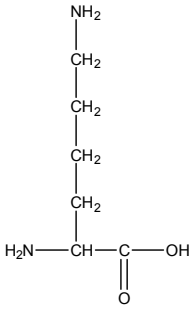

Phenylalanine

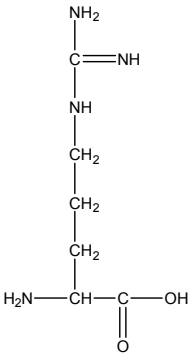

Tyrosine

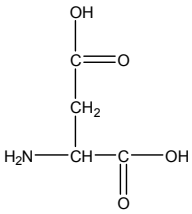

Tryptophane

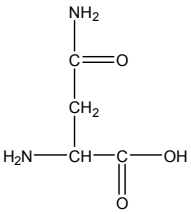

Proline

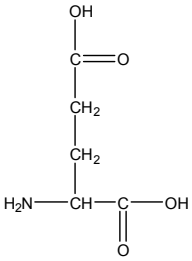

Histidine


Lysine


Arginine


Acide Aspartique


Asparagine


Acide Glutamique

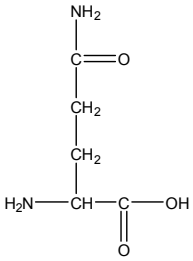

Glutamine

figure 2-2 : les 20 acides aminés protéiques.

2.2.1.2 L'ADN et l'ARN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) sont fondamentaux pour la vie sur Terre puisqu'ils codent l'information génétique. Les chaînes de ces acides sont constituées de nucléotides. Les nucléotides sont constitués d'un phosphate, d'un sucre, et d'une base hétérocyclique. Cette dernière peut être soit une purine (adenine ou guanine) soit une pyrimidine (uracile, cytosine ou thymine)

L'ADN est rapidement décomposé dans la biosphère et n'est retrouvé que très rarement dans des échantillons de matière organique âgée.

2.2.1.3 Les polymères d'amino-sucres.

Les polymères d'amino-sucres sont des composés souvent associés à d'autres biopolymères et formant des complexes comme les lipopolysaccharides (polysaccharides et lipides) par exemple. La chitine est le polysaccharide azoté le plus important. (structure présentée paragraphe 1.3.2.1, figure 1-4). Elle est considérée comme la macromolécule azotée la plus résistante à la dégradation. Elle fait l'objet de nombreuses études (Baas *et al.*, 1995; Chandumpai *et al.*, 2004; Flannery *et al.*, 2001; Stankiewicz *et al.*, 1997; Wanjun *et al.*, 2005) pour mieux comprendre les transformations qu'elle subit.

2.2.1.4 Les porphyrines

Les porphyrines sont des molécules de plus petite taille et dont la contribution au stock de matière organique azotée est moins importante. Cependant des porphyrines ont été retrouvées intactes dans des sédiments vieux de plusieurs millions d'années. Bien que faiblement abondantes, ces molécules peuvent incorporer des macromolécules azotées si la molécule originale possède des fonctions réactives.

Elles sont composées de noyaux tetrapyrroles hétérocycliques et sont présentes sous formes de complexes métalliques dans les chlorophylles (figure 2-3) et l'hémoglobine.

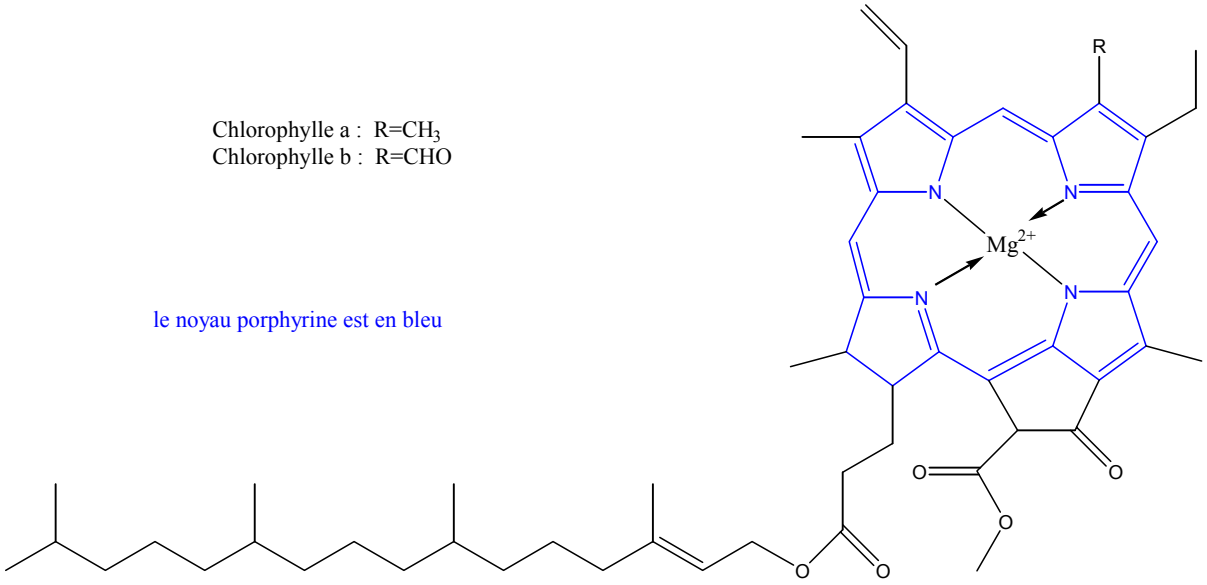


figure 2-3 : structure de la chlorophylle

2.2.2 Formes abiotiques

Un des problèmes pour comprendre le cycle global de l'azote et les transformations chimiques complexes produisant les macromolécules azotées réside dans la formation de matériel azoté non biologique. Dans les écosystèmes terrestres, mises à part les formes connues de l'azote –acides aminés, protéines, acides nucléiques- jusqu'à 50% de la matière organique azotée reste « inconnue » ou « non identifiée ». Cette fraction de matière organique est plus difficile à minéraliser et reste emprisonnée. Cette immobilisation de l'azote a de fortes conséquences sur la fertilité des sols et provoque des changements dans la décomposition de l'humus, qui affecte directement l'émission de CO_2 dans l'atmosphère.

Dans les chapitres précédents, la préservation de la matière organique a été évoquée à plusieurs reprises. Différentes notions liées à la préservation sont abordées dans ce chapitre. Les modes de dégradation et de préservation de la MO y sont présentés ainsi que les principaux critères d'évaluation de l'état de dégradation de la MO.

3 Dégradation et préservation de la MON

3.1 La dégradation de la matière organique au cours de la diagenèse

3.1.1 Les différents modes de dégradation de la MO

Après la mort des organismes vivants (principalement le phytoplancton, le zooplancton, les végétaux et les bactéries), la majeure partie de leurs débris est réutilisée dans le cycle biologique du carbone organique, sauf une fraction très faible (ca. 0.1%) qui est préservée et s'accumule dans les sédiments (Tissot & Welte, 1978a). La dégradation de ces matières passe par plusieurs étapes d'évolution mettant en jeu trois grands modes de dégradation : l'activité biologique, des réactions chimiques et des processus physiques.

L'ensemble des transformations physico-chimiques et micro biologiques que subit la matière organique directement après son enfouissement, est appelé diagenèse ou humification. Elle aboutit à la formation de substances humiques et de kérogènes.

L'activité biologique, en particulier de bactéries, joue un rôle très important dans la dégradation de la MO. Cette activité biologique reste un domaine d'étude étendu. Martinez *et al.* (1991) ont montré par exemple que la décomposition de bois dépendait de l'espèce de champignons qui le dégradait.

D'autre part, la MO subit également de nombreuses réactions chimiques, en particulier des réactions d'oxydoréduction, dont la nature (oxydation ou réduction) dépend de l'environnement. En milieu aqatique, l'oxygène est dissous dans l'eau et diffuse au travers des couches supérieures des sédiments. Le milieu est alors oxique ou suboxique et la MO subit principalement des réactions d'oxydation. En plus grande profondeur, le milieu devient progressivement anoxique et les réactions de réduction sont majoritaires. Le caractère aliphatique de la MO augmente alors. Dans les sols, le profil de la concentration en oxygène

est similaire et la MO la plus profonde est majoritairement assujettie à des réactions de réduction.

Que ce soit dans les sols ou les sédiments, la MON subit des transformations qui affectent sa structure et par conséquent ses propriétés biologiques, physiques et chimiques. Ces modifications aboutissent généralement à la formation des substances humiques et des kérogènes, respectivement dans les sols et les sédiments. De nombreux paramètres permettent d'appréhender le degré de dégradation de la MON.

3.1.2 Paramètres d'évaluation de la dégradation de la MON

Il s'agit ici de présenter quelques paramètres permettant d'apprécier les dégradations subies par la matière organique originale et non d'en faire une liste exhaustive. De plus, comme la dégradation et la préservation sont des phénomènes opposés et souvent concurrents, les paramètres d'évaluation de la dégradation doivent essentiellement permettre d'estimer l'état d'avancement des réactions de dégradation par rapport à l'état initial.

Le phénomène le plus général qui caractérise la diagenèse est la perte préférentielle des hétéroéléments. Ainsi le rapport atomique C/N, déterminé par analyse élémentaire du carbone et de l'azote, est souvent utilisé comme indicateur de l'avancement de la diagenèse. La variation de cet indice le long d'une colonne verticale reflète en partie les effets de la diagenèse et les perturbations que cette dernière peut subir (Baldock *et al.*, 2004; McCarthy *et al.*, 1996).En général, la MON s'appauvrit en fonctions hétéroatomiques au cours de la diagenèse et le rapport C/N croît. Ainsi les sédiments les plus vieux sont caractérisés par des valeurs de C/N élevés : elles sont comprises entre 20 et 200 pour les kérogènes. Cependant, dans certains cas ce paramètre varie peu voire décroît (Derenne *et al.*, 1997). La préservation de composés azotés par adsorption sur des minéraux ou par son incorporation dans des géopolymères pourrait expliquer cette décroissance du rapport.

Par ailleurs, le degré d'aliphaticité augmente en général au cours de la diagenèse de la MO, en particulier en milieu réducteur. Ainsi, les hydrocarbures sont moins dégradés que les molécules azotées ou oxygénées par exemple (Yang *et al.*, 2005). Les chaînes aliphatiques et les structures aromatiques constituent la majorité des structures identifiées pour des kérogènes ou des asphaltènes par exemple (del Rio *et al.*, 1995).

Le rapport C/N permet également de discriminer les apports terrestres des apports océaniques pour la matière organique des sédiments récents (Hedges, 1990; Hedges *et al.*,

1997) et a été utilisé pour caractériser la matière organique dissoute et particulaire (Benner *et al.*, 1997)

L'âge de la matière organique peut être déterminé par datation au carbone 14 et les temps de séjours dans différents compartiments par marquage isotopique. L'analyse isotopique permet également de déterminer la source de la matière organique étudiée : Keil et al. (1997) ont ainsi montré que les deux tiers du carbone total des particules du delta de l'amazone étaient d'origine terrestre. Il est évident que plus la matière organique est âgée, plus la probabilité qu'elle ait été dégradée est importante.

Des nouveaux indicateurs ont été développés pour estimer l'état d'avancement de la dégradation de la matière organique au cours de la diagenèse. Ainsi, Cowie et Hedges (1994) ont proposé de suivre simultanément trois rapports : le pourcentage de carbone organique sous forme aldose et acides aminés protéiques, le pourcentage d'azote protéique estimé par le rapport d'azote protéique sur azote total, et le pourcentage d'azote non protéique estimé par le rapport d'azote de la β-alanine et de l'acide γ-aminobutyrique sur l'azote de la totalité des acides aminés.. La combinaison de ces trois paramètres a permis aux auteurs d'estimer l'état d'avancement de la diagenèse quel que soit le stade de dégradation et reflète bien le degré d'altération.

D'autres rapports peuvent être utilisés pour estimer l'état d'avancement de la diagenèse. Le rapport de concentrations des énantiomères D et L des acides aminés tend vers 50/50 au cours de la dégradation par racémisation des mélanges naturels. En effet, les acides aminés naturels (produits par les organismes vivants) sont les énantiomères L. Au cours de la diagenèse (processus non stéréospécifique), la teneur en énantiomère L diminue et le rapport D/L tend donc vers 1. Ce rapport permet également d'estimer le remaniement de la MO par des microorganismes (Dittmar *et al.*, 2001; Fitznar *et al.*, 1999).

De même, dans des cas plus particuliers, le rapport acide/aldéhyde des monomères de la lignine, permet d'évaluer l'avancement de la dégradation de la lignine. Ainsi, Amir *et al.* (2006) ont imputé l'augmentation du rapport acide/aldéhyde de tels monomères dans la matière organique issue de boues d'épuration à l'oxydation lors de la biotransformation de la lignine en substances humiques.

Enfin, toutes ces données peuvent être utilisées conjointement afin de corréler les informations qu'elles permettent de recueillir.

3.1.3 Les paramètres influençant la dégradation de la MO

La dégradation de la MO dépend de nombreux paramètres. Sans en faire une liste exhaustive, les paragraphes suivants en donnent un rapide aperçu.

Hedges et Keil (1995) ont recensé différents paramètres influençant la dégradation de la MO dans les sédiments marins. L'intensité de production primaire locale, la composition de la MO ainsi que les conditions oxiques ou anoxiques sont déterminants pour le devenir de la MO.

Le taux d'accumulation des sédiments et la bioturbation sont également des paramètres importants. En effet, plus la vitesse d'accumulation des sédiments est élevée, plus la préservation de cette MO est importante, car l'activité bactérienne est maximale à la surface des sédiments. Inversement, plus le temps de séjour dans la colonne d'eau est important, moins la matière organique est préservée. C'est également dans cette zone que les accepteurs d'électrons sont disponibles. Dans les dédiments, une bioturbation importante entraînera des temps de séjours plus longs à l'interface entre le fond océanique et les couches supérieures de sédiments et donc une dégradation plus importante.

La concentration en oxygène dissous et la présence d'ions métalliques réducteurs (Fe^{2+} et autres métaux tels que Mn et Cu) influencent également le devenir de la MO. Plus la concentration en oxygène est élevée, plus la dégradation serait importante, mais cette affirmation reste très controversée (Hedges & Keil, 1995). Quant aux cations métalliques, ils sont oxydés et mènent à la production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2, qui permet d'oxyder très efficacement la matière organique. (réactif de Fenton, 1894). Par ailleurs, ces cations interagissent aussi avec la MO en particulier dans les complexes argilo-humiques. De plus, tous les paramètres régissant les propriétés oxydoréductrices du milieu sont à prendre en considération, comme la présence de sulfates par exemple, pouvant entraîner l'incorporation de soufre dans la MO par le biais de bactéries sulfatoréductrices (Sinninghe Damste *et al.*, 1993).

D'autre part, il est évident que le pH joue un rôle déterminant dans la disponibilité de la plupart de espèces inorganiques ou organiques, via précipitation ou mise en solution, ou

encore complexation. Le pH joue aussi un rôle dans l'agrégation de la MO (Sollins *et al.*, 1996), en particulier en influençant les états de charge surfacique, les constantes de complexation, et les solubilités des espèces mises en jeu.

La température exerce un rôle important, en particulier sur les différents mécanismes de dégradation biologique. De façon plus générale, tous les paramètres déterminants pour l'activité biologique le sont par voie de conséquence pour la dégradation de la MO. Outre la température, soulignons l'importance des précipitations météorologiques pour la MO des sols (Post *et al.*, 1982) la densité de carbone du sol augmente généralement lorsque les précipitations augmentent..

3.2 Récalcitrance et préservation

La partie de la MO qui sort du cycle biologique du carbone subit donc d'importantes transformations qui peuvent aboutir à la minéralisation complète de la MO. Toutefois, cette minéralisation n'est pas systématique et la matière organique peut être préservée. Au sein de cette MO préservée, les substances humiques représentent 70 à 75% du carbone organique des sols. Mais la structure et la formation de ces produits naturels complexes demeurent mal connues.

3.2.1 Récalcitrance intrinsèque

Certaines macromolécules résistent naturellement aux dégradations auxquelles elles sont exposées. Cette résistance peut être qualifiée de récalcitrance intrinsèque liée essentiellement à leur structure et ne dépendant pas de facteurs extérieurs.

Citons la lignine, la cutine et la subérine dont les structures subissent relativement peu de modifications au cours de la diagenèse. C'est également le cas de la chitine, constituant important des carapaces de crustacés (Flannery *et al.*, 2001; Stankiewicz *et al.*, 1996).

Ainsi, certaines macromolécules synthétisées dans la cellule possèdent cette résistance naturellement. Les algaenanes constituent un très bel exemple. Ce terme désigne le biopolymère présent en grandes quantités dans les parois cellulaires de certaines microalgues

(Largeau *et al.*, 1984). Il apparaît qu'il est constitué de longues chaînes aliphatiques reliées entre elles par des ponts ether. Des biomacromolécules hautement aliphatiques, comme les cutanes et les subéranes ont aussi été identifiées dans des plantes supérieures (Tegelaar *et al.*, 1989).

De façon générale, les hydrocarbures (alcanes et alcènes peu ramifiés à longue chaîne) et le squelette carboné des lipides sont très bien préservés. Leur récalcitrance provient de leur faible réactivité : ils sont peu voire non fonctionnalisés. Ils font partie des produits majoritaires de la matière organique argileuse (Schulten *et al.*, 1996) mais ont aussi été détectés dans des fossiles datant de 40 millions d'années (Yang *et al.*, 2005).

3.2.2 Récalcitrance acquise

Dans une moindre mesure, il existe également des molécules polymériques possédant une grande résistance aux dégradations, qui résultent de réactions de condensation de petites molécules. Certaines possèdent une résistance liée directement à leur structure.

Durant la diagenèse, la matière organique subit des réactions de polymérisation ou de condensation, telle que la réaction de Maillard (du nom du scientifique qui l'a décrite pour la première fois en 1913). La réaction de Maillard désigne la réaction de condensation de sucres avec des acides aminés et joue un rôle déterminant dans la formation de la matrice structurale des substances humiques. Les produits obtenus sont appelés mélanoïdines (Ikan *et al.*, 1996). La réaction de Maillard peut être étendue à d'autres composés que les sucres et les acides aminés, par exemple entre des sucres et les fonctions amines des protéines (Maillard, 1916).

De manière générale, les réactions de condensation produisent des macromolécules susceptibles de s'accumuler dans les sédiments.

Le mécanisme de « dégradation-recondensation » désigne le processus de condensation de produits de dégradation de biomacromolécules, telles que les protéines ou les polysaccharides. Une faible fraction des produits de dégradation échappe à la dégradation totale dans les sédiments et subit une réaction de condensation aléatoire qui aboutit à la formation de la structure macromoléculaire complexe des kérogènes.

Dans les environnements riches en soufre, Sinninghe Damste *et al.* (1993) ont montré l'intervention d'un mécanisme de sulfuration qui permet à des composés labiles (carbohydrates, lipides) d'échapper à la minéralisation par la formation de ponts disulfure.

Ces différentes réactions chimiques jouent donc un rôle essentiel dans l'accumulation de matière organique, sous la forme de molécules réfractaires de haute masse moléculaire, dans les sédiments.

3.2.3 Préservation assistée

Par ailleurs, des molécules, dont le caractère labile avéré proscrit toute préservation, ont été détectées dans des sédiments. Il peut s'agir par exemple d'acides aminés ou même de protéines. Or il est établi que ce matériel est très rapidement dégradé par l'action biologique. Différents mécanismes de protection ont donc été proposés pour expliquer cette préservation inhabituelle.

Parmi les premiers mécanismes de protection évoqués, l'adsorption de la MO sur des particules minérales a été proposée dans des environnements riches en minéraux. Hedges et Keil en font une très bonne description dans leur revue sur la préservation de la MO sédimentaire (Hedges & Keil, 1995). Une fois adsorbée en mono couche sur une surface minérale, la MO est protégée des attaques enzymatiques grâce à la gêne stérique engendrée par l'adsorption. De plus, l'adsorption semble favoriser les réactions de condensation, augmentant ainsi le caractère récalcitrant de la MO adsorbée.

De façon plus générale, l'association de matière organique dégradable avec de la matière réfractaire entraîne une meilleure préservation de la MO.

D'autre part, les interactions hydrophobes et/ou les liaisons de faible énergie (liaison hydrogène) stabilisent la matière organique en favorisant la formation d'agrégats. Nguyen et Harvey (2001) ont proposé ce mécanisme pour expliquer la préservation de protéines dans des systèmes marins pour lesquels la teneur en minéraux est faible.

Knicker et Hatcher (2001) ont proposé récemment un mécanisme de protection original : ils suggèrent que la préservation de matériel protéique s'opère par l'encapsulation dans le réseau paraffinique des algenanes. L'interaction forte avec le matériel réfractaire offre ainsi une protection. Comme décrit dans la figure 3-1, le matériel protéique est piégé dans la structure de la paroi cellulaire au cours de la diagenèse. Intimement lié aux algenanes, le matériel protéique profite de la récalcitrance de cette structure.

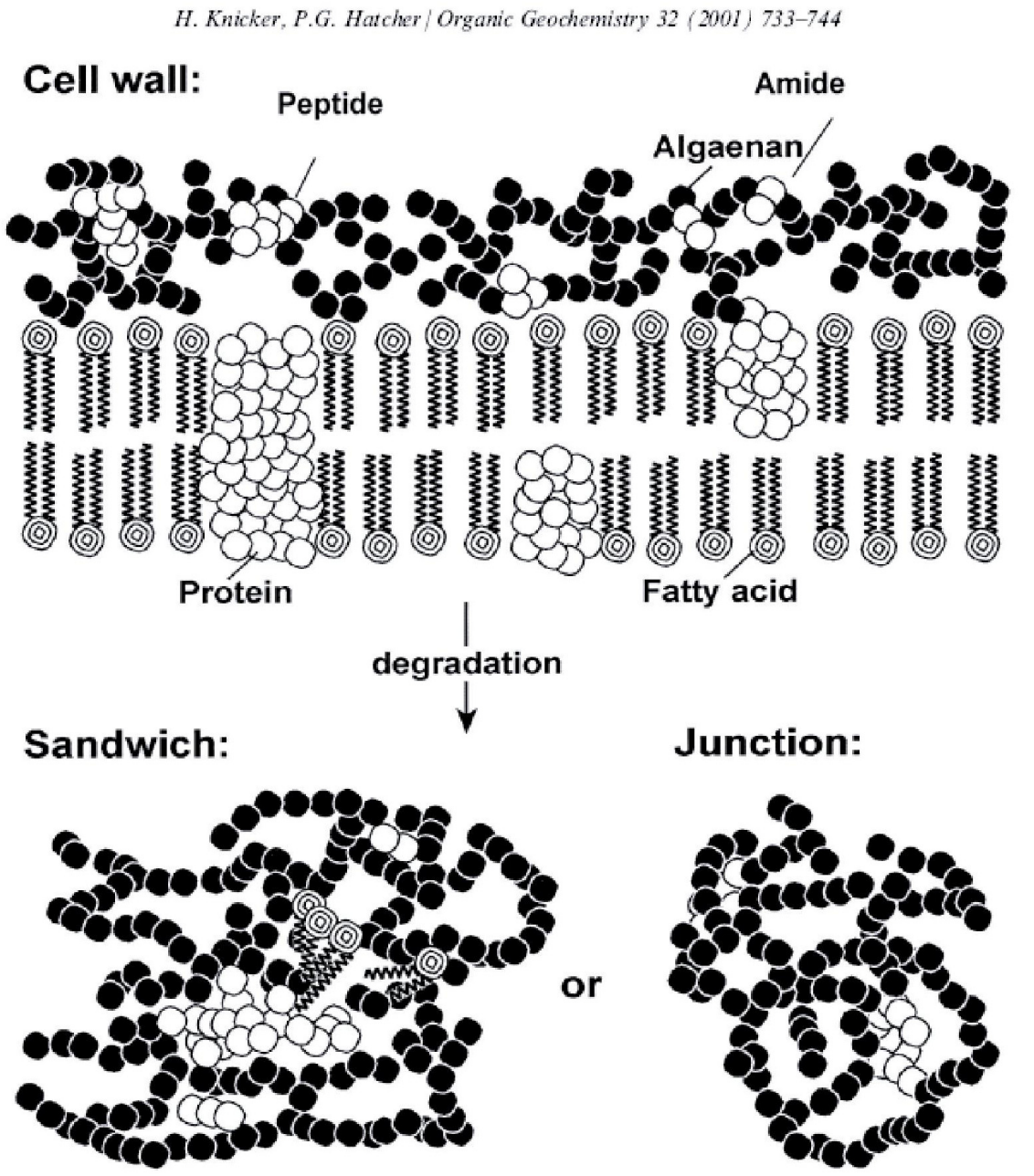


Fig. 5. Conceptual scheme for the preservation of proteinaceous material in algal-derived organic remains.

figure 3-1 : schéma d'encapsulation de matériel protéique au sein de la structure de la paroi cellulaire d'algues. (Knicker & Hatcher, 2001)

Ce dernier mécanisme a été repris de nombreuses fois pour expliquer la présence de matériel labile dans des sols ou des kérogènes (Baldock *et al.*, 2004; Nguyen & Harvey, 2003) et semble être favorisé par la présence de soufre (del Rio *et al.*, 2004; Mongenot *et al.*, 2001; Riboulleau *et al.*, 2000).

4 MON réfractaire et méthodes analytiques

Ce paragraphe présente les principales techniques classiquement utilisées pour la caractérisation de la MON. On distingue les techniques qui permettent d'obtenir des informations globales sur la structure chimique des échantillons, de celles qui fournissent des informations au niveau moléculaire. Ces dernières mettent en jeu des dégradations chimiques ou thermiques.

L'analyse de la MON, et en particulier de la MON réfractaire, pose de réelles difficultés. En effet, pour obtenir des informations au niveau moléculaire sur des macromolécules, on recourt généralement à des hydrolyses (c'est le cas des protéines ou des polysaccharides). Lorsque les macromolécules étudiées résistent aux différentes hydrolyses, il faut alors mettre en œuvre des techniques différentes et surtout combiner plusieurs approches.

4.1 Les techniques globales

La majorité de ces techniques sont des techniques spectroscopiques. En effet, outre l'analyse élémentaire, les plus répandues sont l'infra rouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La fluorescence est également assez répandue par exemple pour l'étude de substances humiques. La spectrométrie de photoélectrons X (XPS, X-ray Photoelectron specroscopy) a été également récemment utilisée.

4.1.1 L'analyse élémentaire

L'analyse élémentaire permet de déterminer la composition élémentaire de l'échantillon. Les éléments les plus souvent analysés sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. Pour certains échantillons, la teneur en soufre ou celle en halogènes peut également apporter des informations intéressantes.

4.1.2 L'infra-rouge

La spectroscopie IR permet de détecter certaines liaisons, C=O, C=C, N-H, O-H , et de déterminer l'hybridation des carbones. Elle permet donc d'accéder à des informations très générales sur le type d'échantillon étudié. Les études récentes sont toutes réalisées en utilisant l'infra rouge à transformée de Fourier (FTIR). Cette technique reste très largement employée dans la caractérisation de la matière organique, que ce soit pour l'étude de kérogène (Bruan *et al.*, 2001), ou celle de sols (Quenea *et al.*, 2006; Tinoco *et al.*, 2006).

D'autre part, cette technique a été également associée à de la chromatographie gazeuse pour assurer une double détection Infra rouge / Spectrométrie de masse. Les informations obtenues par FTIR complètent et corrèlent les informations structurales obtenues par la spectrométrie de masse (Basiuk & Navarro-Gonzalez, 1997).

4.1.3 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour l'analyse de la matière organique naturelle il s'agit essentiellement de RMN à létat solide, principalement en carbone 13, et plus récemment en azote 15. La RMN repose sur les différences d'environnement magnétique des noyaux et permet de déterminer le type de liaison dans lequel le noyau est engagé. La RMN peut être utilisée sur des échantillons bruts, ne nécessitant qu'un broyage et pas d'autre prétraitement. La méthode la plus utilisée pour la MON est celle de la polarisation croisée avec rotation à l'angle magique 'CP/MAS NMR' (Cross-polarization / Magic angle spinning) qui permet d'obtenir des spectres relativement bien résolus et plus intenses. Dans cette technique, le ^{13}C étant un isotope relativement peu abondant, on utilise les ^{1}H comme réservoir à partir duquel est transférée l'aimantation. Les carbones protonés seront donc relativement mieux détectés que les non protonés. La RMN du ^{15}N présente une situation plus défavorable que celle du ^{13}C en raison de (i) la plus faible abondance de N dans les échantillons, (ii) la plus faible abondance isotopique de ^{15}N et (iii) le plus faible rapport gyromagnétique, qui rendent la technique moins sensible.

Cependant, la RMN de l'azote 15 a permis de mettre en évidence la nature peptidique de l'azote présent dans les sols par la détection de signaux amides (Knicker *et al.*, 1993).

D'autre part la RMN procure des informations qui peuvent être corrélées avec d'autres techniques, comme les méthodes pyrolytiques (Gonzalez-Vila *et al.*, 2001; Templier *et al.*, 2005a).

4.1.4 La fluorescence

La fluorescence désigne le phénomène d'absorption d'une onde excitatrice et de l'émission consécutive d'un rayonnement de moindre énergie pour retourner à un état stable. On distingue les spectres d'émission (balayage de la longueur d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixe) et les spectres d'excitation (balayage de la longueur d'onde d'excitation pour une longueur d'émission donnée). La spectrofluorométrie 3D qui générère des matrices tridimensionnelles 'Excitation, Emission, Intensité' est de plus en plus utilisée car les spectres contiennent simultanément les différents types de spectre. Cette technique est principalement employée pour étudier la matière organique dissoute, même si elle peut avoir été préalablement extraite de sols (Hita *et al.*, 1996). Elle permet d'établir des profils de concentration de matériel protéique (Yamashita & Tanoue, 2003) ou de caractériser des substances humiques (Sierra *et al.*, 2005) aussi bien que de la matière organique dissoute dans des eaux naturelles (Parlanti *et al.*, 2002).

4.1.5 La spectrométrie de photoélectrons X (XPS)

L'XPS est une technique d'analyse de surface (épaisseur sondée inférieure à 100 Å) bien adaptée pour obtenir des informations sur l'environnement chimique d'un atome. Le principe consiste à mesurer l'énergie de liaison des électrons de cœur éjectés d'un atome soumis à un bombardement de rayons électromagnétiques X. Les énergies de liaisons mesurées permettent de déterminer la nature des liaisons chimiques dans lesquelles l'atome considéré est impliqué (nature des ligands, caractère ionique ou covalent de la liaison). L'application de cette technique à l'étude de la matière organique complexe a permis de mettre en évidence (i) l'importante contribution de groupes amide dans des substances humiques de sols (Monteil-Rivera *et al.*, 2000), (ii) le caractère covalent des liaisons que les substances humiques peuvent créer avec des éléments traces (Mercier *et al.*, 2002), (iii) ainsi que la présence de carbonyles non détectés en RMN ^{13}C (Templier *et al.*, 2005b).

4.2 Les méthodes de dégradation

Pour surmonter la difficulté liée au caractère insoluble et non hydrolysable de la majorité des échantillons naturels, des méthodes dégradatives sont mises en œuvre.

4.2.1 Les dégradations chimiques

Les méthodes de dégradation chimique, essentiellement des oxydations fournissent souvent de faibles rendements. Mais elles permettent d'obtenir des informations sur la structure et la composition de macromolécules complexes. L'analyse des produits de dégradation chimique de la matière organique réfractaire suite à l'utilisation d'oxydants doit être corrélée aux informations obtenues par spectroscopie et par pyrolyse. Les réactifs utilisés sont très divers et dépendent des objectifs considérés : mise en évidence de liaisons spécifiques ou détermination de la structure globale. Pour le premier cas de figure, le persulfate de sodium ($Na_2S_2O_8$) permet de réaliser une oxydation douce qui permet de libérer les composés les plus accessibles et les composés liés par des liaisons de faible énergie (liaisons de Van der Waals, liaisons hydrogènes).Le perborate de sodium ($NaBO_3$), oxydant plus fort que le persulfate (Almendros *et al.*, 1987) permet de réaliser une dégradation plus importante. Le permanganate de potassium ($KMnO_4$) est une oxydant puissant et permet de réaliser des dégradations très poussées du complexe macromoléculaire qui peuvent aller jusqu'à la formation de CO_2 ; ce réactif a été utilisé pour l'étude de kérogènes par exemple (Bajc *et al.*, 2001; Vitorovic *et al.*, 1984). D'autres réactifs, comme le tetroxyde de ruthénium (RuO_4) offrent la possibilité de réaliser des oxydations sélectives : le RuO_4 oxyde préférentiellement les carbones aromatiques et coupent les liaisons de plusieurs groupes fonctionnels (Rullkötter & Michaelis, 1989). On peut également réaliser une oxydation avec de l'oxyde de cuivre (CuO), par exemple pour l'étude de la lignine (Hatcher *et al.*, 1995).

4.2.2 La pyrolyse

La pyrolyse est certainement la méthode de dégradation la plus répandue dans l'étude de la MON.

La pyrolyse est un craquage thermique qui permet d'obtenir des fragments caractéristiques de l'échantillon pyrolysé. Les températures de pyrolyse sont variées et répondent souvent à des critères d'analyse. En effet, des températures relativement basses (<400°C) ne provoquent pas le cracking de la macromolécule mais libèrent seulement les composés adsorbés ou thermolabiles. Un cracking efficace est observé à partir de 400°C en raison de l'énergie des liaisons de la macromolécule. Un stress thermique trop important peut induire des réactions secondaires.

On distingue plusieurs types de pyrolyse suivant les conditions expérimentales appliquées. La pyrolyse peut être effectuée en milieu fermé, dans des ampoules en verre ou des tubes en or scellés, sous vide ou sous atmosphère contrôlée. En milieu ouvert, l'échantillon pyrolysé est souvent soumis à un flux gazeux chargé de transporter les produits de pyrolyse vers un système de piégeage ou d'analyse. La pyrolyse est dite off-line, lorsque les produits de pyrolyse sont collectés, éventuellement séparés et dérivés. Lorsque la pyrolyse est directement couplée à la méthode d'analyse, il s'agit de pyrolyse on-line.

Les applications de la pyrolyse sont vastes (Voorhees, 1984) ; Blazso (1997) et Challinor (2001) en donnent un aperçu non exhaustif mais démontrant que la pyrolyse peut être un outil adapté pour l'analyse de nombreux échantillons : des polymères synthétiques aux kérogènes en passant par les protéines et les sols.

Les fragments obtenus lors de la pyrolyse représentent les 'briques' ou éléments caractéristiques de la structure de la macromolécule dont ils sont issus. Afin d'accéder à la structure de cette macromolécule originale, il est donc nécessaire de déterminer la structure des produits de pyrolyse. Par conséquent, une méthode de caractérisation succède à la pyrolyse.

4.2.3 La pyrolyse off-line

La pyrolyse off-line possède plusieurs avantages. Le rendement de pyrolyse peut être déterminé par pesée avant et après pyrolyse. De plus, après la collecte des produits de pyrolyse, il est possible d'ajouter des étalons internes pour l'analyse des produits de pyrolyse par chromatographie en phase gazeuse. L'utilisation d'étalons internes permet non seulement de comparer les produits de pyrolyse à des produits de référence mais aussi de les quantifier (Hatcher *et al.*, 1995; Page *et al.*, 2002).

La pyrolyse off-line peut être réalisée en milieu fermé ou ouvert. Pour réaliser une pyrolyse en milieu fermé, la méthode la plus répandue consiste à introduire l'échantillon dans une ampoule en verre ou un tube en or qui est ensuite scellé. L'atmosphère du réacteur peut être doublement contrôlée : nature et pression du gaz. Après pyrolyse, le réacteur est ouvert et les produits de pyrolyse sont récupérés par des solvants (Hatcher & Minard, 1996; Knicker *et al.*, 2001).

En milieu ouvert, l'échantillon est placé sous le flux d'un gaz inerte. Les produits de pyrolyse sont recueillis dans un solvant (Largeau *et al.*, 1986) ou par un piégeage cryogénique

(Kralert *et al.*, 1995; Lehtonen *et al.*, 2000a). De plus la pyrolyse off-line en milieu ouvert permet de réaliser des pyrolyses préparatives. Une première pyrolyse est effectuée pour libérer les produits emprisonnés dans la matrice de l'échantillon mais non représentatifs de ce dernier. La véritable pyrolyse est ensuite effectuée à température supérieure. Cette méthode permet d'éliminer les produits emprisonnés dans la matrice de kérogènes par exemple (Bruan *et al.*, 2001). Elle a aussi pour conséquence une concentration de l'échantillon puisqu'on en élimine les contaminants.

La pyrolyse off-line présente cependant certains inconvénients. En premier lieu, elle nécessite une quantité de matière relativement importante : environ 50 mg minimum. Par ailleurs, la mise en œuvre des ampoules scellées est délicate. En milieu ouvert, l'inconvénient majeur réside dans la collecte des produits de pyrolyse : les composés les plus volatils sont certainement moins bien récupérés que les composés moins volatils. Il en va de même pour les produits peu solubles voire insolubles dans le solvant de collecte.

Le four le plus utilisé en pyrolyse off-line est le four à convection classique au centre duquel l'échantillon est placé. Le four est chauffé par effet Joule développé par une résistance.

4.2.4 La pyrolyse on-line

Dans ce cas de figure, le pyrolyseur est directement relié au système d'analyse. Ce dernier peut être un spectromètre de masse sans séparation préalable des produits de pyrolyse.

La technique de pyrolyse FIMS (Field Ionisation Mass Spectrometry) consiste à réaliser simultanément la pyrolyse et l'ionisation dans le spectromètre de masse. Schulten et son équipe ont beaucoup travaillé avec cette méthode, par exemple pour étudier la matière organique de complexe organo-argileux (Schulten *et al.*, 1996) ou les substances humiques aqueuses (Schulten, 1999).

Dans les méthodes plus classiques de Py-SM, le four est couplé à un spectromètre de masse. Dans ces deux cas la difficulté, réside dans l'interprétation des données car on obtient un spectre de masse qui résulte de la superposition de ceux de tous les produits de pyrolyse.

. Pour s'affranchir de cette difficulté, il est nécessaire de séparer les produits de pyrolyse avant leur identification par spectrométrie de masse. L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse permet d'atteindre cet objectif efficacement.

La pyrolyse on-line offre de réels avantages : elle est généralement plus facile à mettre en œuvre que la pyrolyse off-line. De plus le couplage direct de la pyrolyse avec la méthode d'analyse évite la perte des composés volatils. Cet aspect constitue l'avantage le plus appréciable d'un point de vue analytique. De plus, la pyrolyse on-line nécessite de plus faibles quantités de produits.

Cependant, ce couplage rend quasiment impossible l'utilisation d'étalons et la quantification des produits de pyrolyse est donc très difficile. De plus, pour des mélanges de pyrolyse complexe, il n'est pas possible de réaliser une séparation, par extraction aux solvants par exemple. Enfin, les composés polaires produits par la pyrolyse constituent un problème pour leur séparation sur une colonne chromatographique apolaire. Ces composés requièrent une dérivation on-line pour leur analyse par chromatographie gazeuse.

Par conséquent, les deux méthodes on- ou off-line peuvent être considérées comme complémentaires.

Lorsqu'ils sont destinés à une utilisation couplée directement à la CG-SM, les fours de pyrolyse doivent répondre à différentes exigences inhérentes à ce couplage.

Ils doivent en effet permettre d'injecter des petites quantités de matière au système chromatographique. Si les quantités de matière introduites dans la colonne séparative sont importantes, il est probable que des phénomènes de phase apparaissent et se répercutent sur la qualité chromatographique : en cas de saturation de la phase stationnaire ou mobile, les pics chromatographiques présenteront des traînées arrière ou avant respectivement.

Par ailleurs, une contrainte supplémentaire réside dans le temps de chauffage court afin de permettre une durée d'injection la plus courte possible. En effet la durée d'injection joue directement sur la diffusion des analytes et donc sur la résolution chromatographique. Or en termes de pyrolyse on-line, les analytes sont produits et par conséquent injectés dans le système séparatif durant le chauffage. Ainsi la durée de pyrolyse peut être assimilée à la durée d'injection.

Les fours pyrolytiques doivent, entre autres caractéristiques, permettre de chauffer rapidement une petite quantité de matière. Ces critères sont également pertinents pour des raisons similaires dans le cas d'injection directe dans un spectromètre de masse. Le contrôle de la température de pyrolyse reste également une préoccupation importante dans le cadre d'analyses par pyrolyse.

C'est pourquoi, de nouveaux fours répondant à ces critères font toujours l'objet de recherche et de développement : Havey *et al.* (2004) ont proposé un appareillage miniaturisé à

chauffage résistif, qui permet une montée en température rapide, une bonne longévité et dont la consommation électrique est très faible (350 mW).

On utilise aussi lds fours à filaments. Le filament résistif chauffe par effet Joule et l'échantillon est ainsi pyrolysé. Il existe aussi des fours à micro-ondes, particulièrement adaptés aux échantillons avec des teneurs en hétéroéléments élevées et par conséquent polaires. Le chauffage par micro-ondes permet des montées en températures rapides et réduit considérablement la durée des pyrolyses préparatives. Ce mode de pyrolyse a été récemment développé et utilisé pour l'étude de schistes bitumineux (Chanaa *et al.*, 1994; El harfi *et al.*, 2000) ou de revalorisation de boues d'épuration (Dominguez *et al.*, 2006; Menendez *et al.*, 2002).

La pyrolyse au point de Curie est particulièrement séduisante. Son principe repose sur l'utilisation de certains matériaux, qui possèdent des propriétés ferromagnétiques jusqu'à une certaine température au-delà de laquelle ils perdent cette propriété et deviennent diamagnétiques. Cette température caractéristique du changement de propriétés magnétiques est appelée température de Curie. La pyrolyse au point de Curie repose sur un chauffage par induction électromagnétique : l'échantillon est placé dans une nacelle réalisée dans un alliage ferromagnétique. Soumis à un champ électromagnétique développé par une bobine (figure 4-1), l'alliage chauffe par induction jusqu'à atteindre sa température de Curie. A cette température, il perd ses propriétés ferromagnétiques et par conséquent ne chauffe plus. Ainsi, la pyrolyse est effectuée à température constante et reproductible (la température de Curie de l'alliage). De plus le chauffage par induction permet d'atteindre très rapidement la température de pyrolyse.

Les performances analytiques d'un pyrolyseur au point de Curie ont été comparées à celles d'un pyrolyseur résistif (Stankiewicz *et al.*, 1998a) ; il en résulte que les deux techniques sont comparables, mais que la pyrolyse au point de Curie permet une montée en température beaucoup plus rapide et que la température de pyrolyse est parfaitement contrôlée.

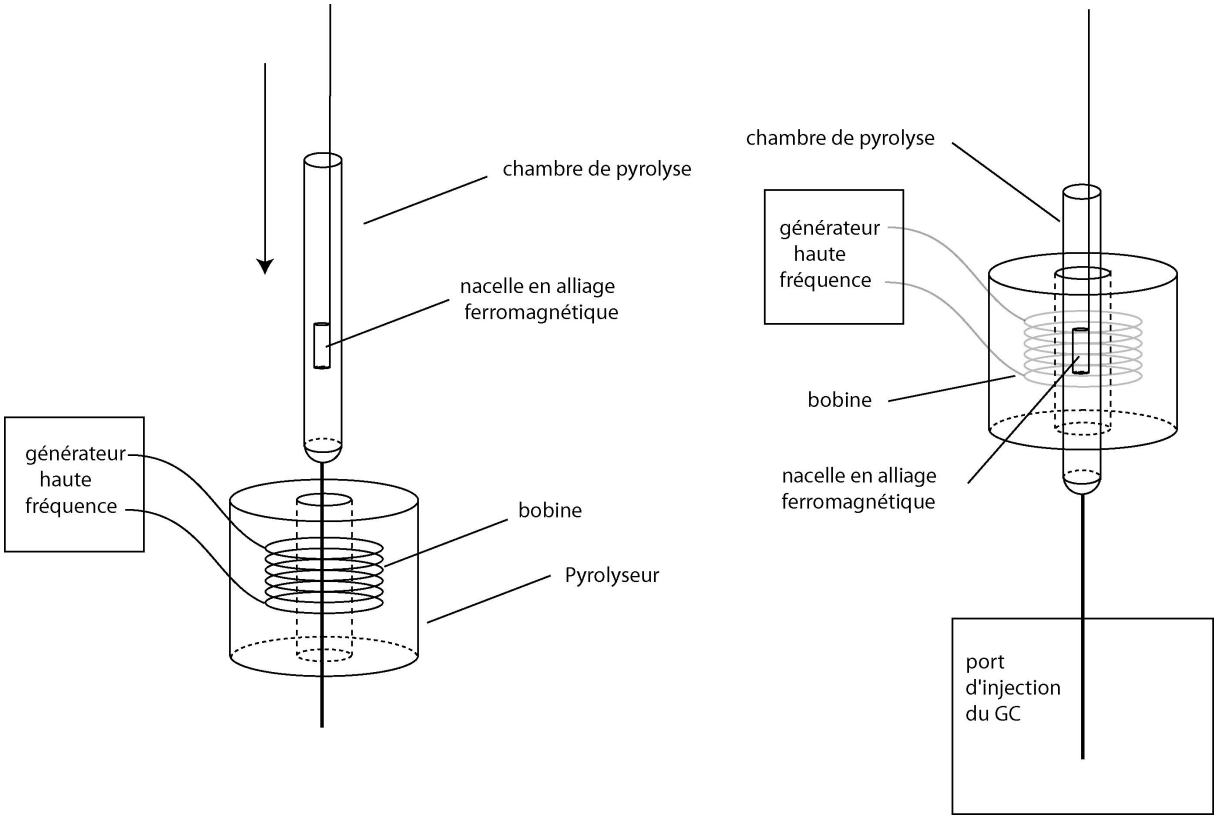


figure 4-1 : schéma du pyrolyseur au point de Curie

4.3 La dérivation

L'utilisation de la chromatographie soulève un problème, mentionné précédemment dans ce chapitre. En effet, les produits de pyrolyse présentent une grande variété de polarité. Les colonnes habituellement utilisées sont des colonnes apolaires. Les produits polaires ne sont quasiment pas séparés sur ce type de colonnes. Les techniques de dérivation pré ou post colonnes sont des techniques bien maîtrisées. Une fois dérivés, les produits polaires peuvent donc être élués et séparés sur des colonnes polaires.

Ainsi, Challinor (Challinor, 1989) a proposé l'utilisation de sels d'alkylammonium quaternaires comme agents de dérivation pour la pyrolyse : les hydroxydes de tetramethylammonium ou de tetrabutylammonium (TMAH et TBAH respectivement). D'abord utilisés pour la pyrolyse de polymères synthétiques, ces agents d'alkylation ont ensuite été employés pour la pyrolyse d'échantillons très variés : des complexes ligno-cellulosiques (Challinor, 1995) aux kérogènes, en passant par les sols ou des macromolécules telles que les protéines ou les polysaccharides (Challinor, 2001).

L'utilisation de ces agents de dérivation offre plusieurs avantages : une meilleure information structurale, une préparation minimale des échantillons et une meilleure sensiblité. Quelques années plus tard, Challinor (2001) dressait un tableau du développement et des applications des réactions d'hydrolyse thermiquement assistée et de méthylation, relatives à l'utilisation du TMAH.

Par ailleurs, de nombreux agents de dérivation ont été proposés, répondant à des critères de choix différents. Pulchan et al. (Pulchan *et al.*, 1997) a utilisé comparativement le TMAH et le TEAH (TetraEthylAmmonium Hydroxyde). De la même façon, Grasset *et al*. (Grasset *et al.*, 2002) a utilisé le TMAH et le TEAAc (TetraEthylAmmonium Acetate) en parallèle, ce qui lui permettait, entre autres, de distinguer les acides gras libres de ceux déjà esterifiés, qu'il n'est pas possible de distinguer par l'utilisation simple de TMAH, sauf si il est marqué au carbone 13 (Filley *et al.*, 2000).

Il existe également des agents de dérivation autres que des sels d'alkylammonium quaternaires : Ishida (Ishida *et al.*, 1999) utilise de l'hydroxyde de trimethylsulfonium et Chiavari de l'hexamethyldidilazane pour obtenir des dérivés silylés (Chiavari *et al.*, 2001).

Cependant, il est maintenant reconnu que le TMAH est l'agent de dérivation le plus efficace (Lehtonen *et al.*, 2003). L'utilisation de TMAH entraîne une meilleure analyse des produits de pyrolyse : les produits polaires sont méthylés et peuvent ainsi être séparés sur une colonne apolaire. De façon générale, la méthylation des produits de pyrolyse augmente leur volatilité, ce qui permet d'analyser un plus grand nombre d'entre eux. De plus, l'efficacité de la pyrolyse est également améliorée car le TMAH détruit des liaisons spécifiques telles que les ponts disulfure. Enfin, il est reconnu que l'utilisation de TMAH minimise les réactions de décarboxylations qui ont lieu habituellement au cours de la pyrolyse conventionnelle, permettant ainsi une identification structurale de la molécule originale plus aisée.

Comme le souligne Knicker (Knicker, 2004) tous ces mécanismes de stabilisation, humification, dépolymerisation-recondensation, vulcanisation naturelle, interaction avec la phase minérale, agrégation, encapsulation, dépendent de l'environnement. Bien souvent, la préservation de la MO résulte de l'action concomitante de plusieurs de ces mécanismes.

Chapitre 2 :

Py-GC-MS of the 20 protein amino acids in the presence of TMAH

1 Introduction ***57***

2 Results ***59***

2.1 Predominance of only one mechanism **60**

2.1.1 Methylation 60

2.1.2 Cyclisation 63

2.1.3 Deamination 65

2.2 Co-occurrence of several major mechanisms **66**

2.2.1 Methylation and decarboxylation 66

2.2.2 Methylation, decarboxylation and homolysis 69

2.2.3 Methylation and dimerisation 74

2.2.4 Methylation and cyclisation 76

2.3 Co-occurrence of several mechanisms with one prevailing **77**

2.3.1 Predominant methylation 77

2.3.1.1 Cyclisation 77

2.3.1.2 Decarboxylation 83

2.3.1.3 Homolysis 85

2.3.1.4 Dehydration and dimerisation 86

2.3.2 Cyclisation dominating dimerisation 88

2.3.3 Deamination dominating methylation 89

3 Role of the derivatizing agent ***92***

3.1 Role of TMAH **92**

3.2 Methylation versus trimethylsilylation **93**

4 Implications for studies of natural samples ***95***

5 Appendix A. ***97***

6 Supplementary material : mass spectra ***98***

Le travail présenté ci après a pour objectif l'étude de la matière organique azotée protéique par pyrolyse en présence de TMAH. 20 acides aminés constituent les briques élémentaires sur lesquelles sont construites les protéines. Afin de pouvoir identifier ces acides aminés dans les pyrolysats des protéines, il faut connaître les produits de pyrolyse de ces acides aminés. De plus, une étude des mécanismes de pyrolyse de ces acides aminés peut nous aider à mieux appréhender ceux qui régissent la pyrolyse des protéines. Ainsi, le premier chapitre de ce manuscrit présente l'étude de la pyrolyse des 20 acides aminés protéiques en présence de TMAH. Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans le Journal of Analytical and Applied Pyrolysis [1]. Dans ce chapitre, nous avons ajouté les pyrochromatogrammes des acides aminés non publiés dans l'article ainsi que les figures disponibles 'on-line'.

[1] 'Pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry of the 20 protein amino acids in the presence of TMAH'. N. Gallois et *al.*, J. Anal. Appl. Pyrol. (2007), 216-230

1 Introduction

Pyrolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry (Py-GC–MS) is known to be a powerful tool in analysing macromolecular materials and has been widely applied to the study of natural complex organic matter, such as those contained in sediments, soils or waters. Curie-point pyrolysis-GC–MS is a reproducible technique which, in addition, only requires low amounts of material. However, when applied to materials with polar building blocks, it presents some limitations since some of the released products are not GC-amenable and hence not detected (del Rio *et al.*, 1996). To overcome these limitations, pyrolysis in the presence of tetraalkylammonium hydroxide has been developed (Challinor, 1989). The most efficient reagent was proven to be tetramethylammonium hydroxide, TMAH (Lehtonen *et al.*, 2003). It plays a role of base along with that of methylating agent (de Leeuw & Baas, 1993). This technique, hereafter referred to as TMAH pyrolysis, thus allows an efficient cracking of the macromolecule and in situ methylation of the released products. Thus derivatized, the latter, being less polar, can be detected by GC–MS.

Natural organic matter from soil and riverine water is much richer in heteroelements (O, N) when compared to ancient sediments. However, Curie-point pyrolysis of soil and water organic matter only scarcely releases nitrogen-containing products, including various heterocyclic products (Quenea *et al.*, 2005) and (Frazier *et al.*, 2003). In contrast, solid state ^{15}N NMR revealed that nitrogen mostly occurs as amide functions in soils (Knicker *et al.*, 1993), recent sediments (Knicker *et al.*, 1996) and waters (Templier *et al.*, 2005b), and a proteinaceous nature is often proposed for natural organic nitrogen. However, hydrolyses only release 10–60% of the total organic nitrogen in soils and sediments (Kelly & Stevenson, 1996). Due to the polar nature of the natural organic matter, Curie-point pyrolysis was performed in the presence of TMAH. In several cases, methylated homologues of amino acids could be detected through this technique, although in quite low abundance in recent (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001) and (Knicker *et al.*, 2001) and ancient sediments (Mongenot *et al.*, 2001), (Riboulleau *et al.*, 2002) and (del Rio *et al.*, 2004), in peat humic acid (Zang *et al.*, 2000) and (Zang *et al.*, 2001) and in natural waters (Frazier *et al.*, 2003), (Mannino & Harvey, 2000) and (Templier *et al.*, 2005a). Moreover, only a limited number of amino acids could be recognised in these pyrolysates.

The aim of the present study is thus to address the question of the behaviour of amino acids upon pyrolysis in the presence of TMAH so as to define potential diagnostic signals in studies of natural organic samples.

Conventional pyrolysis of amino acids was extensively studied and four main mechanisms were described: decarboxylation, homolysis of the side chain, deamination and dimerisation (Ratcliff *et al.*, 1974). A pioneer study using Curie-point pyrolysis in the presence of TMAH and directly coupled to mass spectrometry was performed on glycine, alanine, tyrosine and oligopeptides (Hendricker & Voorhees, 1998). Mixtures of amino acids were then investigated using TMAH Py-GC–MS (Mannino & Harvey, 2000) along with small peptides (Knicker *et al.*, 2001). The most extensive study was performed by Zang et al. (Zang *et al.*, 2001) since 17 out of the 20 proteinic amino acids were analysed. However, the results are focused on the most abundant product and, as shown below, minor products, depending on their retention time, may be of diagnostic value in natural sample studies. Finally, another derivatization method, trimethylsilylation was applied during pyrolysis of all the proteinic amino acids but glutamic acid, glutamine, lysine and asparagine (Chiavari *et al.*, 2001).

The present study therefore thoroughly investigates the mechanisms undergone by the 20 proteinic amino acids upon TMAH pyrolysis. Results will be compared with those from the aforementioned studies and their potential application to screening of amino acids in natural samples will be discussed.

2 Results

As stressed above, several mechanisms have been reported in previous pyrolytic studies of amino acids. Depending on the considered amino acid, the relative importance of these mechanisms varies. We hereby distinguish three cases: one mechanism is by far the major one, two or three mechanisms account for the major compounds and one mechanism predominates although another one significantly yields products. The behaviour of all the studied amino acids with respect to the mechanisms they undergo upon TMAH pyrolysis can be synthesized in Fig. 1.

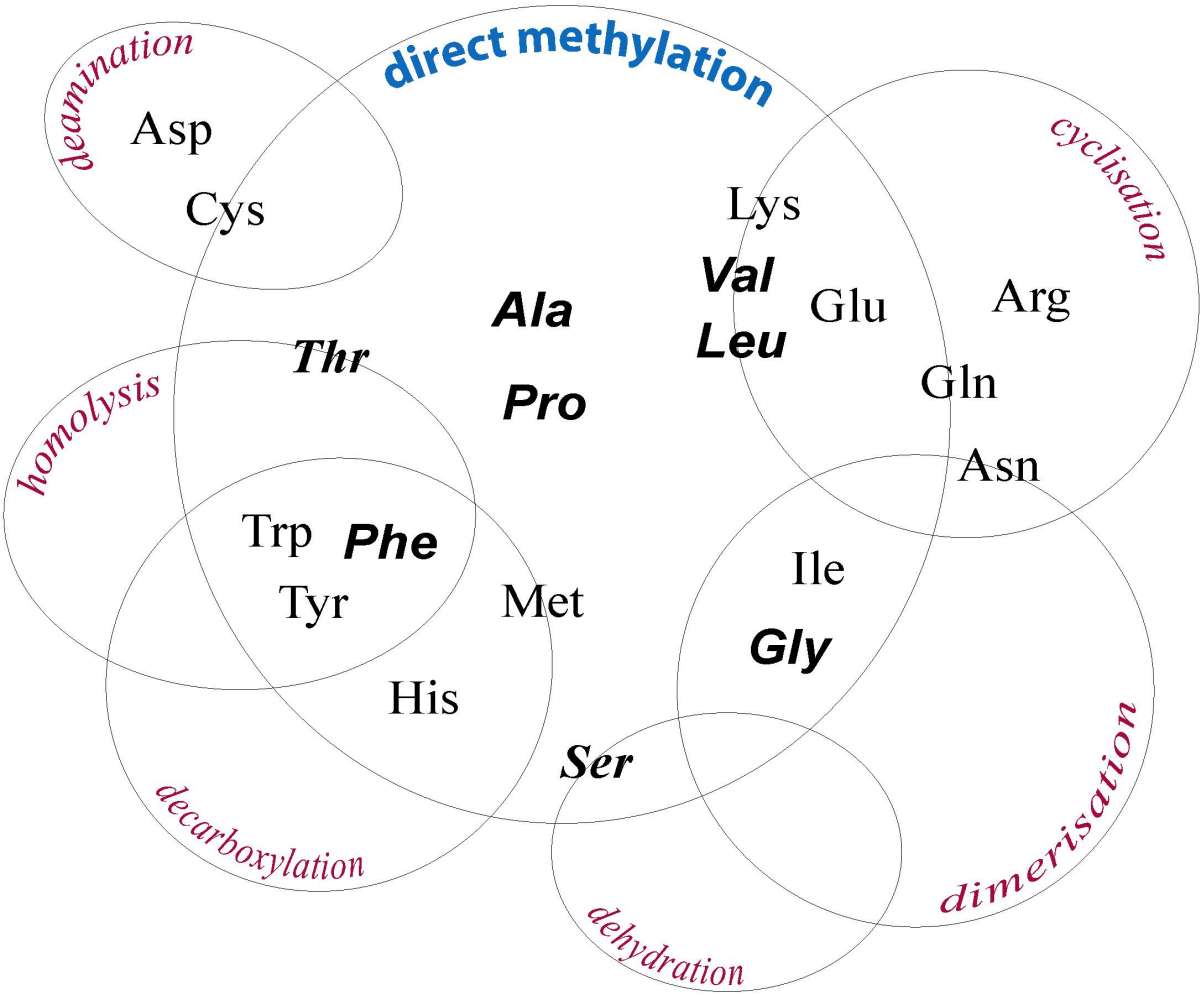


Fig. 1: The different mechanisms undergone by the 20 proteinaceous amino acids through pyrolysis in the presence of TMAH. In this figure, each circle corresponds to a mechanism. Amino acids located inside a given circle yield abundant amounts of products through the corresponding mechanism whereas, when located on the border line of a circle, the corresponding mechanism is not a major one. Amino acids yielding their diketopiperazines are indicated in bold.

2.1 Predominance of only one mechanism

2.1.1 Methylation

Since TMAH is a methylating agent, as expected methylation is a major process upon amino acid pyrolysis in the presence of TMAH. However, it is by far only prevailing over the other mechanisms in two cases: alanine and proline.

All the major compounds observed upon TMAH pyrolysis of alanine result from methylation of the starting amino acid (Table 1, Fig. 2). Along with the methyl ester derivative comprising 0, 1 or 2 additional methyl group on the nitrogen atom, the *N*,*N* dimethyl aminopropanoic acid, i.e. with a free carboxyl group is detected as a peak with a sloping front and a sharp tail (Fig. 2). Such a major involvement of the methylation process was previously reported upon Curie-point pyrolysis at 510 °C of alanine in the presence of TMAH (Hendricker & Voorhees, 1998). However, in this study, pyrolysis was directly coupled with MS, which did not allow differentiating the isomers and assessing the relative abundance of the products. The predominant product in the pyrochromatogram is *N*,*N* dimethylaminopropanoic acid, i.e. the compound without any methylation of the acid group, and not the fully methylated derivative. This may appear in contrast with a previous study in which it was reported that all the amino acids (except cysteine, aspargine and arginine for which no data is reported) yield their fully derivatized counterpart as the main product upon pyrolysis with TMAH (Zang *et al.*, 2001). However, in the latter study, a lower pyrolysis temperature was used (300 °C instead of 650 °C), which may account for the observed differences. Indeed, Lehtonen *et al.* (2000) have reported that an increase in temperature results in an increase in the number of products released upon TMAH-Py-GC–MS. Moreover, TMAH is used in larger excess in Zang's study and this difference may have an important impact, by influencing the methylation-equilibrium during the pyrolysis.

Table 1 : Main products released from pyrolysis of amino acids in the presence of TMAH, as related in Section 2.12.1

Amino Acid	Retention time	Relative abundance (surface)	MS fragments	Molecular Weight	compounds	*mechanism*
Alanine	31,00	100	**72** 44 42 58 56 70	117	N,N-dimethylaminopropanoic acid	*direct methylation*
	6,30	61	**44** 42 88	103	Alanine methyl ester	*direct methylation*
	7,88	34	**58** 56 42 117	117	N-Methylalanine methyl ester	*direct methylation*
	11,76	30	**72** 44 42 56 131	131	N,N-Dimethylalanine methyl ester	*direct methylation*
	51,25	13	**44** 99 42 56 71 142	142	3,6-Dimethylpiperazine-2,5-dione (MS 1)	*dimerisation +cyclisation (DKP)*
Proline	22,79	100	**84** 42 82 143 55 85	143	N-Methylproline methyl ester	*direct methylation*
	37,61	68	**84** 42 82 57 70	129	N-Methylproline	*direct methylation*
	22,02	24	**70** 41 43	129	Proline methyl ester	*direct methylation*
	49,97	8	**84** 58 100 42 85 82	228	unidentified dimerisation product	*dimerisation*
	63,15	3	**70** 194 41 96	194	Prolylproline diketopiperazine	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
Arginine	35,79	100	**56** 57 69 111 44 43	111	1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one (MS 2)	*cyclisation*
	39,50	100	**70** 99 57 42 128	128	3-(N-Methylamine)piperidin-2-one (MS 3)	*cyclisation*
	38,28	95	**69** 56 43	97	3,4-Dehydropiperidin-2-one	*cyclisation*
	37,41	76	**70** 113 57 84 42 44	142	1-Methyl-3-(N-methylamine)piperidin-2-one (MS 4)	*cyclisation*
	37,84	72	**84** 69 56 42 113 156	156	1-Methyl-3-(N,N-dimethylamine)piperidin-2-one (MS 5)	*cyclisation*
	40,48	55	**70** 84 99 142 42	142	3-(N,N-Dimethylamine)piperidin-2-one (MS 6)	*cyclisation*
Glutamine	42,35	100	**84** 41 143 111	143	5-Oxoproline methyl ester	*cyclisation*
	39,44	75	**98** 41 157 42 70	157	N-Methyl- 5-oxoproline methyl ester **(2)**	*cyclisation*
	50,20	2	**84** 143 42 98 116 112	202	N,N,N'-Trimethylglutamine methyl ester	*direct methylation*
	48,83	2	**84** 129 42 44 56 116	188	N,N-Dimethylglutamine methyl ester	*direct methylation*
Aspartic Acid	21,95	100	**113** 85 59 114 53 54	144	Butenedioic acid dimethyl ester	*deamination*
	26,07	8	**113** 56 57 58 55 85	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione **(12)**	*cyclisation*
	22,35	8	**115** 114 55 59 87	146	Butanedioic acid dimethyl ester	*deamination*

(MS *i*) refers to the mass spectrum number (*i*), illustrated in section 6.

[a] MS fragments are in order of decreasing abundance, with base peak in bold.

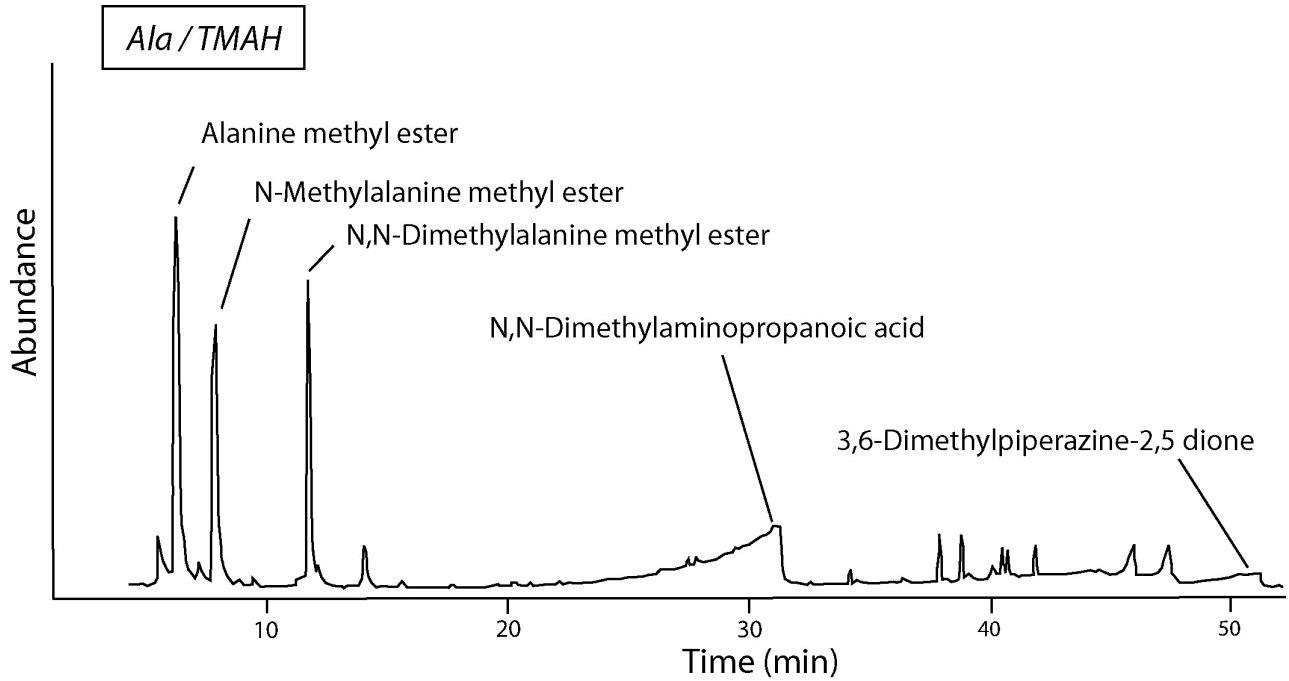


Fig. 2 : Pyrochromatogram of alanine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

Proline also yields almost exclusively its methylated counterparts upon TMAH pyrolysis (Table 1). The pyrochromatogram (Fig. 3) is highly dominated by the fully methylated derivative and a peak with a sloping front and a sharp tail which is assigned to *N*-methyl proline, i.e. the proline derivative with free carboxyl group. The proline methyl ester, without any methylation on the amino group, is detected as a shoulder of the main peak.

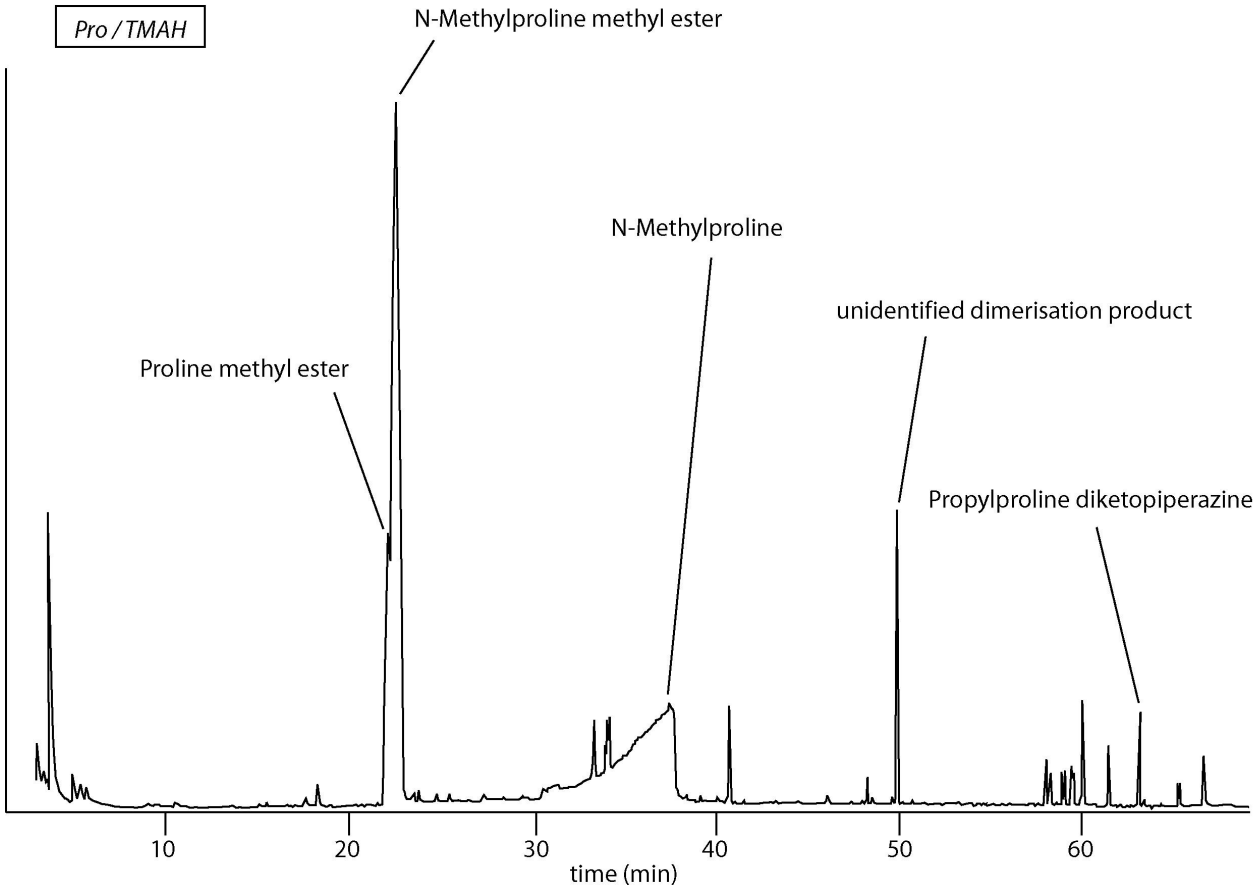


Fig. 3 : Pyrochromatogram of proline, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.1.2 Cyclisation

Amino acids that comprise at least one additional amino or carboxyl group on their side chain may lead to cyclisation products by forming an intramolecular peptidic bond. Such a cyclisation is yielding most of the products upon TMAH pyrolysis of arginine and glutamine.

In the case of arginine, cyclisation occurs between the carboxyl group and the secondary amino group so as to form a 6-membered lactam after elimination of the amidine group (Fig. 5). The thus obtained 3-amino-piperidin-2-one can undergo several stages of methylation and/or elimination of the amino substituent. The latter process results in the formation of a double bond between C-3 and C-4 as observed in the major pyrolysis product. Taken together these mechanisms lead to six piperidinone derivatives such as **1** as the main products formed upon TMAH pyrolysis of arginine (Fig. 4,Table 1, Appendix A).

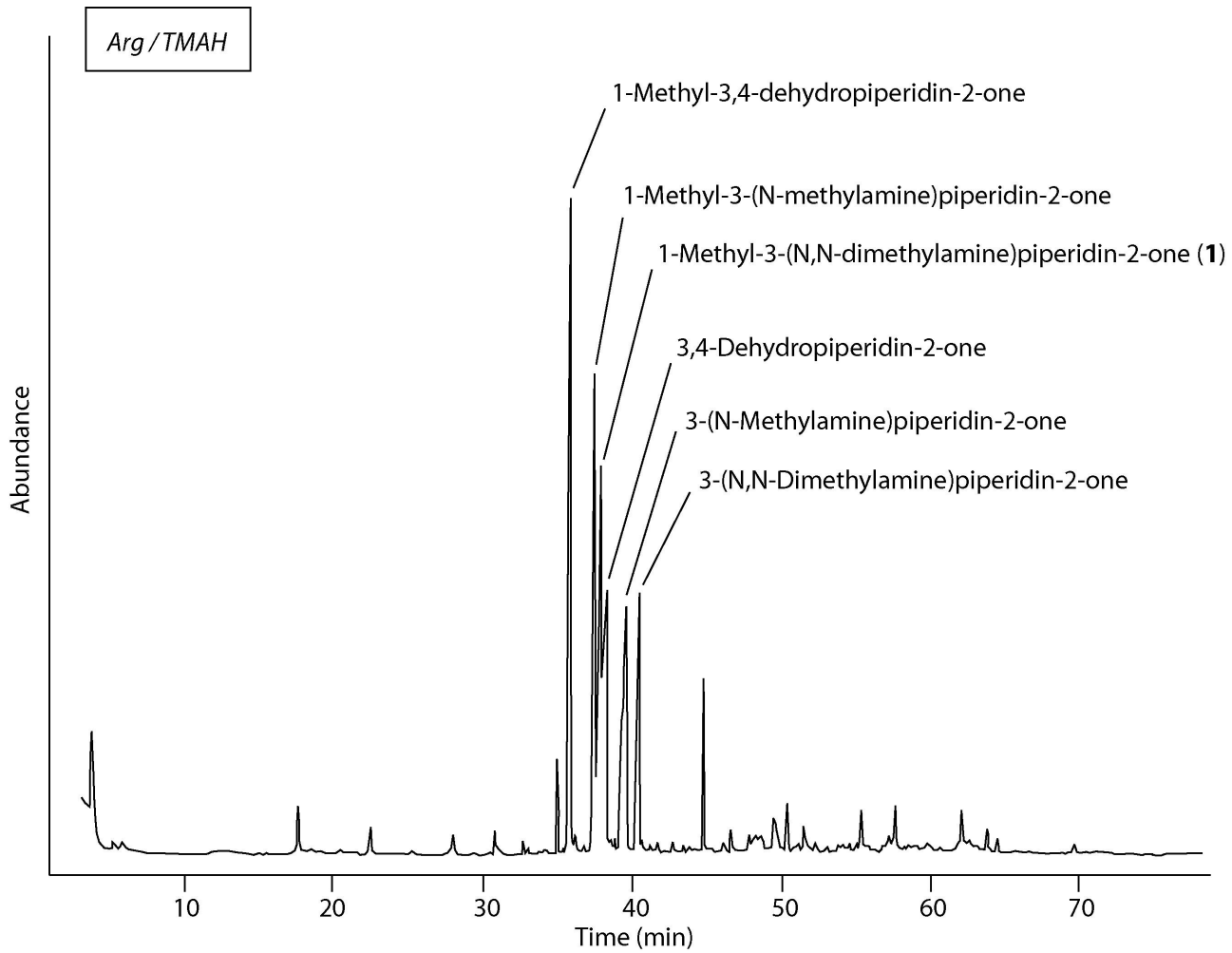


Fig. 4 : Pyrochromatogram of arginine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 C.

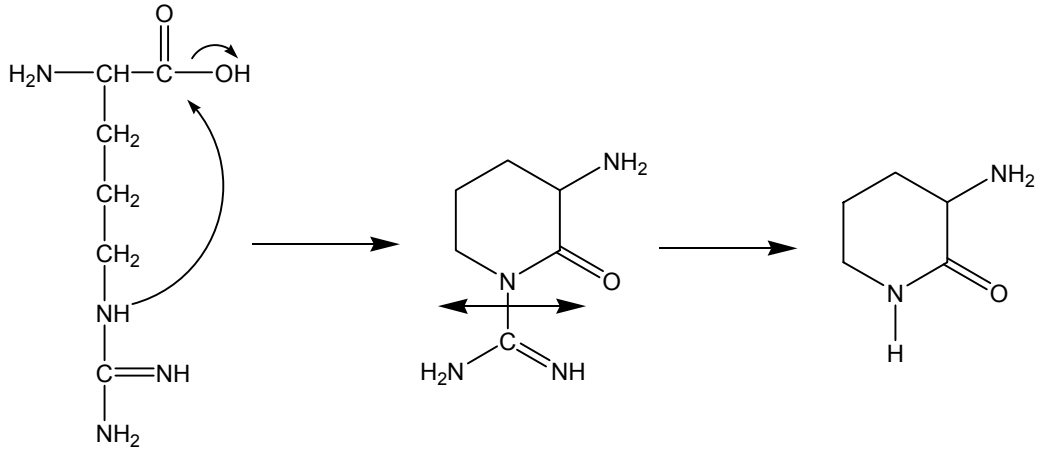


Fig. 5 : Formation of a 6-membered lactam from arginine.

As previously observed by Zang *et al.* (2001), glutamine also undergoes cyclisation with ammonia elimination upon TMAH pyrolysis with to give 5-oxoproline methyl ester. This and its *N*-methyl derivative **2**, are the two major products in the pyrochromatogram of glutamine (Fig. 6, Table 1, Appendix A).

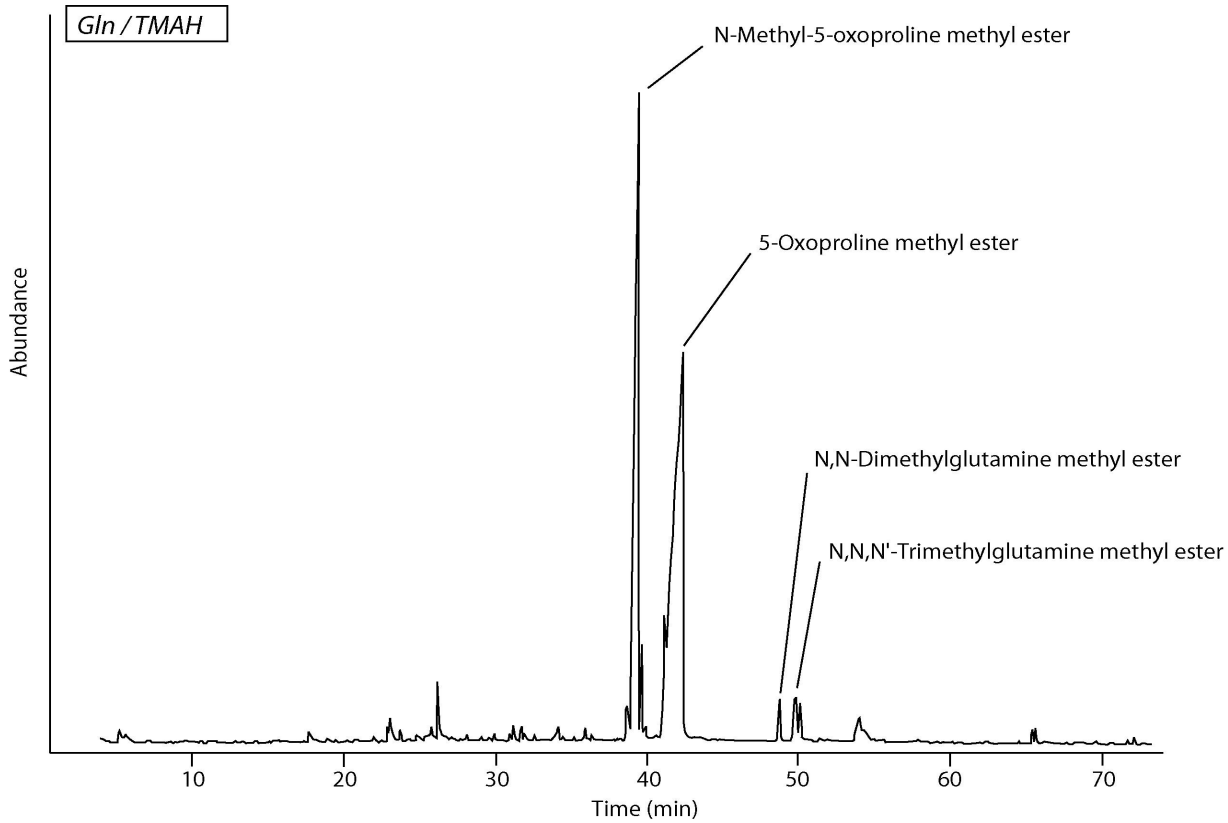


Fig. 6 : Pyrochromatogram of glutamine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.1.3 Deamination

Deamination, i.e. ammonia elimination, has already been reported in the 1970s as one of the main processes occurring upon amino acid pyrolysis (e.g. (Simmonds *et al.*, 1972)). It was shown to take place even in the presence of TMAH by Zang et al. (Zang *et al.*, 2001) who observed it for aspartic acid and phenylalanine. The final product may be either the saturated or the unsaturated carboxylic acid.

Aspartic acid pyrochromatogram is dominated by butenedioic acid dimethyl ester along with its saturated counterpart, thus showing that deamination strongly prevails over other mechanisms in this case (Fig. 7, Table 1). It can be anticipated that the presence of the second carboxyl group promotes the elimination of the amino group.

In the present conditions, deamination is only a very minor process upon phenylalanine TMAH pyrolysis.

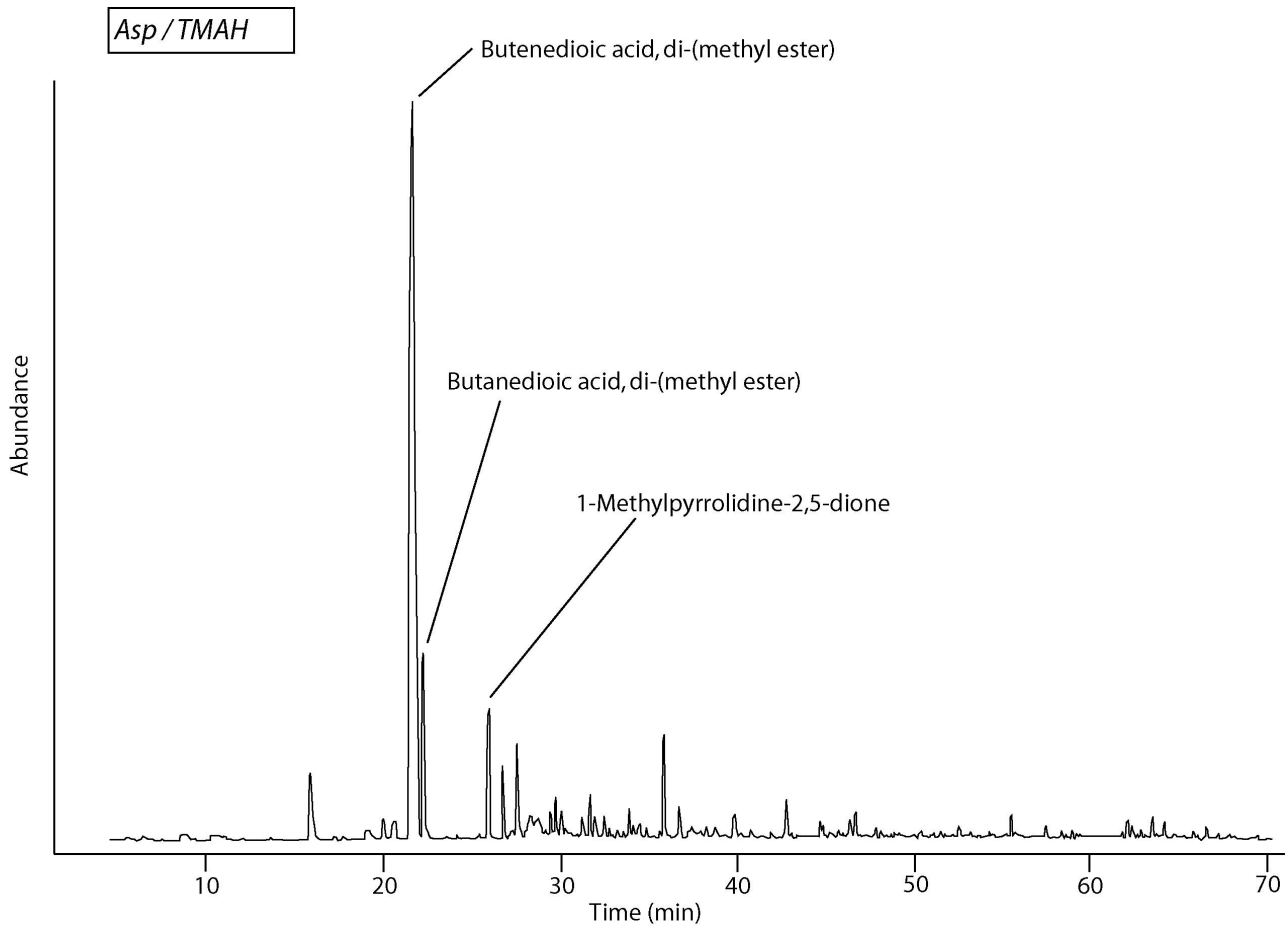


Fig. 7 : Pyrochromatogram of aspartic acid, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.2 Co-occurrence of several major mechanisms

2.2.1 Methylation and decarboxylation

Decarboxylation, i.e. loss of carbon dioxide, was reported as the main process occurring upon amino acid pyrolysis (Simmonds *et al.*, 1972). TMAH is often considered as preventing from decarboxylation through derivatization of the carboxyl group into its methyl ester (Challinor, 1989). However, decarboxylation is observed as a competing process with methylation in histidine, leading to amines.

The pyrochromatogram of histidine exhibits two groups of peaks of similar intensities with retention times around 40–43 min and 52–55 min (Fig. 8). The peaks which are eluting later correspond to methylated counterparts of histidine such as **3**, the most abundant being the fully methylated product. Like lysine, histidine is a basic amino acid that can also be methylated on the basic function. Two isomers of the methyl ester of histidine with two additional methyl groups on the N atoms are thus detected in addition to the fully methylated histidine. The other group of peaks is dominated by products related to 4-ethanamine-1-methylimidazole, the histidine decarboxylation product. The latter compound is detected along with its counterpart **4** that bearing an additional methyl on the primary amino group (Table 2).

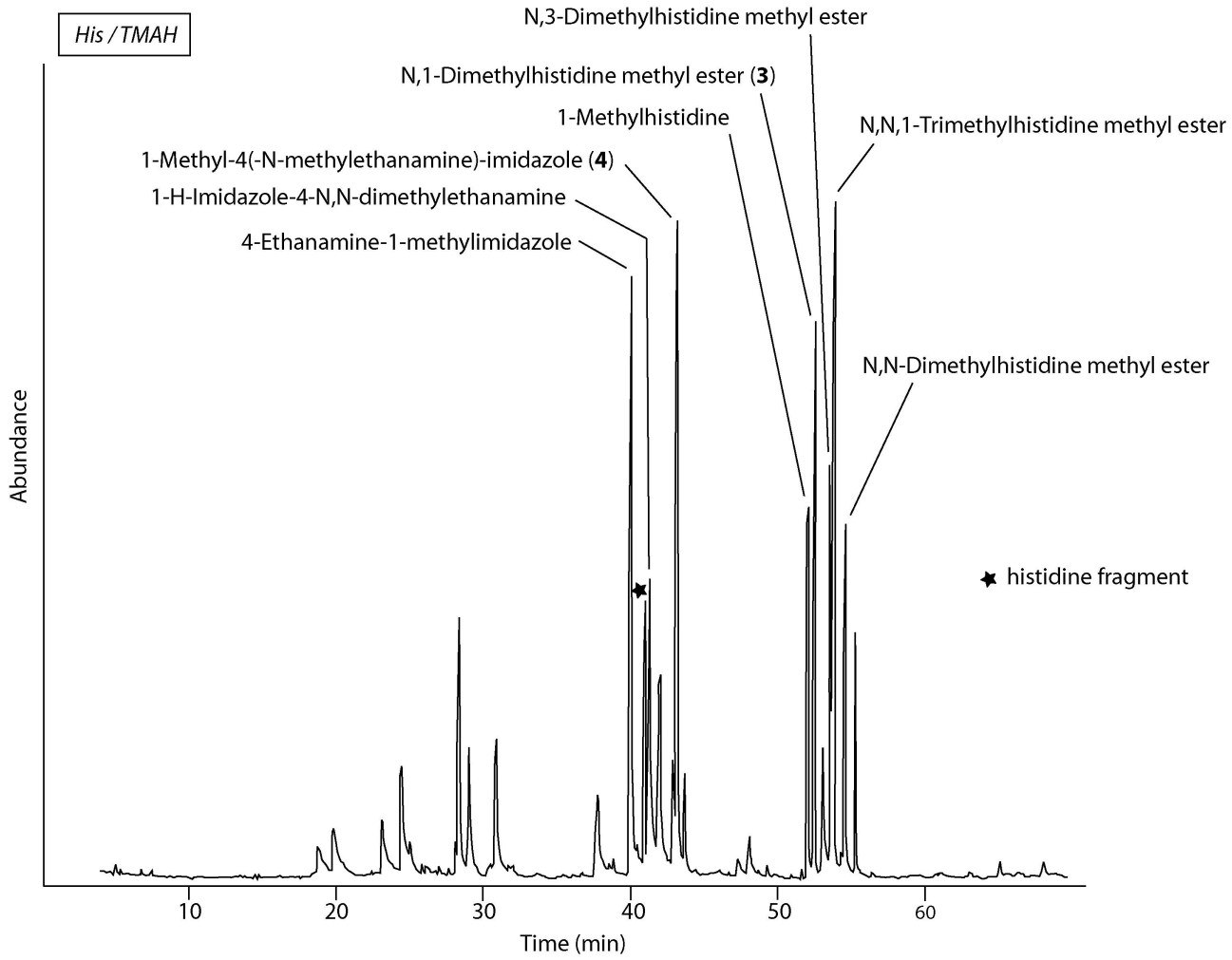


Fig. 8 : Pyrochromatogram of histidine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650°C.

Table 2 : Main products released from pyrolysis of amino acids in the presence of TMAH as related in Section 2.2

Amino Acid	Retention time	Relative abundance (surface)	MS fragments	Molecular Weight	compounds	*mechanism*
Histidine	43,14	100	**96** 44 95 42 68 81	139	1-Methyl-4(-N-methylethanamine)-imidazole **(4)** (MS 7)	*decarboxylation*
	53,78	89	**116** 109 152 42 168 56	211	N,N,1-Trimethylhistidine methyl ester	*direct methylation*
	41,28	87	**58** 42	139	1-H-imidazole-4-N,N-dimethylethanamine	*decarboxylation*
	40,01	85	**96** 81 44 42 95 97	125	4-Ethanamine-1-methylimidazole	*decarboxylation*
	41,96	67	**82** 44 81 83 42		Histidine fragment	*decarboxylation*
	54,55	64	**116** 138 95 42 56 84	197	N,N-Dimethylhistidine methyl ester	*direct methylation*
	52,47	59	**96** 138 42 81 109 97	197	N,1-Dimethylhistidine methyl ester **(3)**	*direct methylation*
	53,59	52	**96** 95 42 102 97 138	197	N,3-Dimethylhistidine methyl ester	*direct methylation*
	52,04	48	**96** 124 95 81 42 54	169	1-Methylhistidine	*direct methylation*
Phenylalanine	43,36	100	**102** 134 42	193	N-Methylphenylalanine methyl ester	*direct methylation*
	29,00	59	**44** 91 135	135	N-Methylbenzeneethanamine	*decarboxylation*
	coeluted		**117** 90 116 89 51 63	117	Benzeneacetonitrile	*decarboxylation*
	3,35	46	**91** 92 65	92	Toluene	*homolysis*
	44,75	42	**116** 148 133	207	N,N-Dimethylphenylalanine methyl ester	*direct methylation*
	42,55	33	**88** 120 91 77	179	Phenylalanine methyl ester	*direct methylation*
	88,50	23	**91** 294 203 175 120	294	3,6-Dibenzylpiperazine-2,5-dione (MS 8)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	89,38	21	**91** 294 203 175 120	294	Isomer of diketopiperazine	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	10,99	18	**104** 103 78 51	104	Ethenylbenzene	*decarboxylation + deamination*
	47,08	17	**91** 182 65	182	1,2-Diphenylethane	*homolysis + radical dimerisation*
	85,15	12	**91** 189 217 308 42 120	308	3,6-Dibenzyl-1-methylpiperazine-2,5-dione (MS 9)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	87,42	12	**91** 203 294 175 120 42	294	Isomer of diketopiperazine	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	55,62	11	**194** 115 193 179 114 178	194	1,2-Diphenylpropene	*homolysis + radical dimerisation*
	72,94	9	**231** 232 230 202 102	232	3-Benzyl-1,3-dimethylpiperazine-2,5-dione (MS 10)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	29,72	8	**58** 42 91 77	149	N,N-Dimethylbenzeneethanamine	*decarboxylation*
	48,13	5	**105** 143 115 104 77 196	196	1,2-Diphenylpropane	*homolysis + radical dimerisation*
	8,35	5	**91** 106 65	106	Ethylbenzene	*decarboxylation + deamination*
Tyrosine	53,69	100	**102** 121 122 42 164 77	223	N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester	*direct methylation*
	42,11	88	**44** 122 91 77	165	4-Methoxy-N-methylbenzenethanamine	*decarboxylation*
	55,08	79	**116** 178 42 56 84 117	237	N,N-dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester	*direct methylation*
	21,30	57	**122** 121 107 77 91 79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	*homolysis*
	42,74	53	**58** 179 91 77	179	4-Methoxy-N,N-dimethylbenzenethanamine	*decarboxylation*
	29,30	48	**134** 119 91 65 39	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	*decarboxylation + deamination*
	54,43	38	**121** 192 221 122 77 162		unidentified	
	26,95	34	**121** 136 77 91 122	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	*decarboxylation + deamination*
	39,63	14	**135** 150 77 107 92 43	150	1-(4-Methoxyphenyl)-ethanone	*deamination*
	24,99	14	**107** 108 77 79 39 53	108	4-Methylphenol	*decarboxylation + deamination*
	41,74	12	**147** 146 132 77 107 116	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile	*decarboxylation*
	66,88	11	**121** 242 122 77	242	1,2-Di(paramethoxyphenyl)ethane	*homolysis + radical dimerisation*
Tryptophan	40,59	100	**144** 145 77 143 128 115	145	1,3-Dimethyl-1H-Indole	*Homolysis*
	67,06	85	**144** 116 145 260 201	260	N'-Methyl-N,N-dimethyltryptophan methyl ester	*direct methylation*
	56,68	55	**145** 144 44 188	188	1-Methyl-3-(N-methylethanamine)-indole **(5)**	*decarboxylation*
	47,84	54	**157** 156 115 142 78 128	157	Dimethylquinoline **(6)** (MS 11)	*unknown*
	65,79	53	**144** 145 246 102 77	246	N'-Methyl-N-methyltryptophan methyl ester	*direct methylation*
	66,25	33	**144** 145 143 232	232	N'-Methyltryptophan methyl ester	*direct methylation*
	56,96	28	**58** 144 170 115 202	202	1-Methyl-3-(N,N-dimethylethanamine)-indole	*decarboxylation*
	54,85	21	**144** 145 174 77	174	2-Methyltryptamine	*decarboxylation*
	36,93	20	**117** 90 89 58 63 118	117	1H-Indole	*Homolysis*
	44,31	16	**144** 159 143 145 115 128	159	Trimethyl-1H-indole	*Homolysis*
	87,23	14	**144** 288 145 143	288	1,2-Diindolylethane **(7)**	*homolysis + radical dimerisation*
Glycine	36,41	100	**58** 42 44 103 43 57	103	N,N-Dimethylaminethanoic acid	*direct methylation*
	9,24	40	**58** 117 42	117	N,N-Dimethylglycine methyl ester	*direct methylation*
	40,63	33	**58** 174 115	174	N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester (MS 12)	*dimerisation*
	5,80	28	**89** 42 90	89	Glycine methyl ester	*direct methylation*
	7,44	24	**44** 103 42 43	103	N-Methylglycine methyl ester	*direct methylation*
	49,50	20	**128** 42 43 71 44 99	128	1-Methylpiperazine-2,5-dione	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	45,25	11	**142** 42 44 43 57 85	142	1,4-Dimethylpiperazine-2,5-dione	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
Isoleucine	23,66	100	**86** 88 100 102 69 41	145	Isoleucine methyl ester	*direct methylation*
	23,91	56	**100** 102 42 69 44	159	N-Methylisoleucine methyl ester	*direct methylation*
	38,67	48	**156** 154 69 41 86 96	213	4-(1-Methylpropyl)-2-(N,N-dimethylethanamine)-imidazolidine-5-one (MS 13)	*dimerisation + cyclisation*
	22,61	45	**98** 43 70 41 71 127	155	2-Methyl-N-(2-methylbutylidene)butan-1-amine **(13)** (MS 14)	*N-alkylaldimine formation*
	25,49	39	**114** 116 84 42 58 69	173	N,N-Dimethylisoleucine methyl ester	*direct methylation*

(MS *i*) refers to the mass spectrum number (*i*), illustrated in section 6.

[a] MS fragments are in order of decreasing abundance, with base peak in bold.

2.2.2 Methylation, decarboxylation and homolysis

The aforementioned two mechanisms are in some cases associated with a third mechanism, namely side chain homolysis. This mechanism, which involves the cleavage of the C–C bond α to the amino and carboxyl groups, is favoured when this bond is also located β to an aromatic ring. As a result, side chain homolysis is a major process in phenylalanine, tyrosine and tryptophan. It occurs in a much lower extent in the case of histidine, yielding imidazole and its 1,3 dimethyl homologue.

Phenylalanine methyl ester comprising 0, 1 or 2 additional methyl groups are observed as three major peaks in the pyrochromatogram in the 42–45 min range of retention times revealing the intensity of the methylation process (Fig. 9). Apart from them, an intense peak is observed at 29 min, which can be assigned to a coelution of *N*-methylbenzeneethanamine with benzeneacetonitrile, i.e. decarboxylation products. A third major product, observed at the very beginning of the pyrochromatogram is toluene, i.e. the product of homolysis of the side chain. Ethenylbenzene and ethylbenzene are also identified. Although these compounds are also hydrocarbons, their formation mechanism must not be considered as homolysis since they retain the carbon which was bearing the amino and carboxyl group in the amino acid. They therefore result from a combination of decarboxylation and deamination processes. The rather high temperature used in the present study likely favours the formation of these hydrocarbons. Homolysis through organic radical formation allows their subsequent coupling and thus the formation of 1,2-diphenyl-ethane, propene and propane (Table 2).

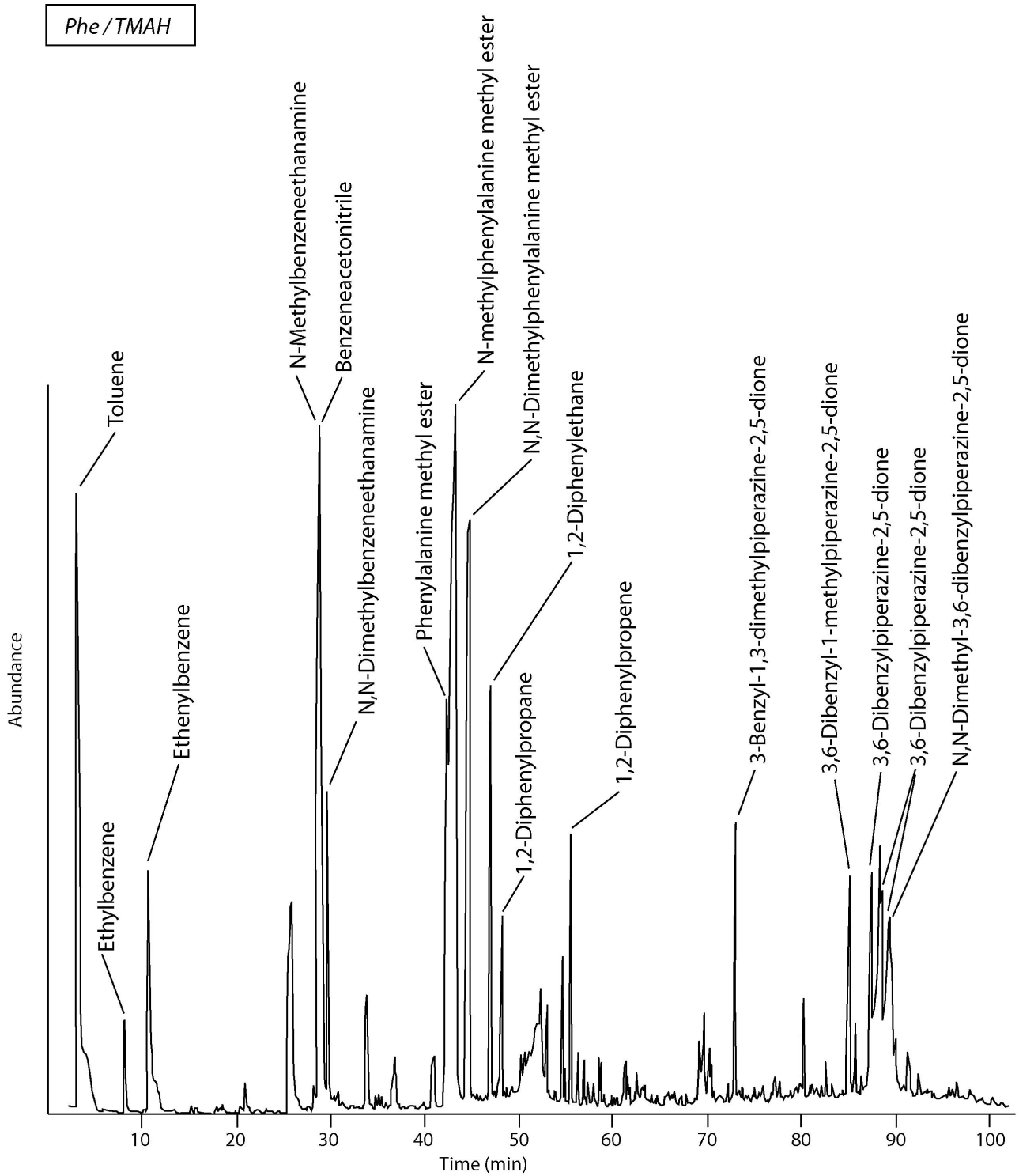


Fig. 9 : Pyrochromatogram of phenylalanine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650°C.

Tyrosine only differs from phenylalanine by the presence of the hydroxyl group on the phenyl ring and is thus expected to behave similarly upon TMAH pyrolysis. It must be noted that derivatization of the hydroxyl group into methoxyl group is systematically observed. The methoxy homologues of the TMAH pyrolysis products of phenylalanine are thus identified in spite of differences in relative abundance of the compounds (Fig. 10, Table 2).

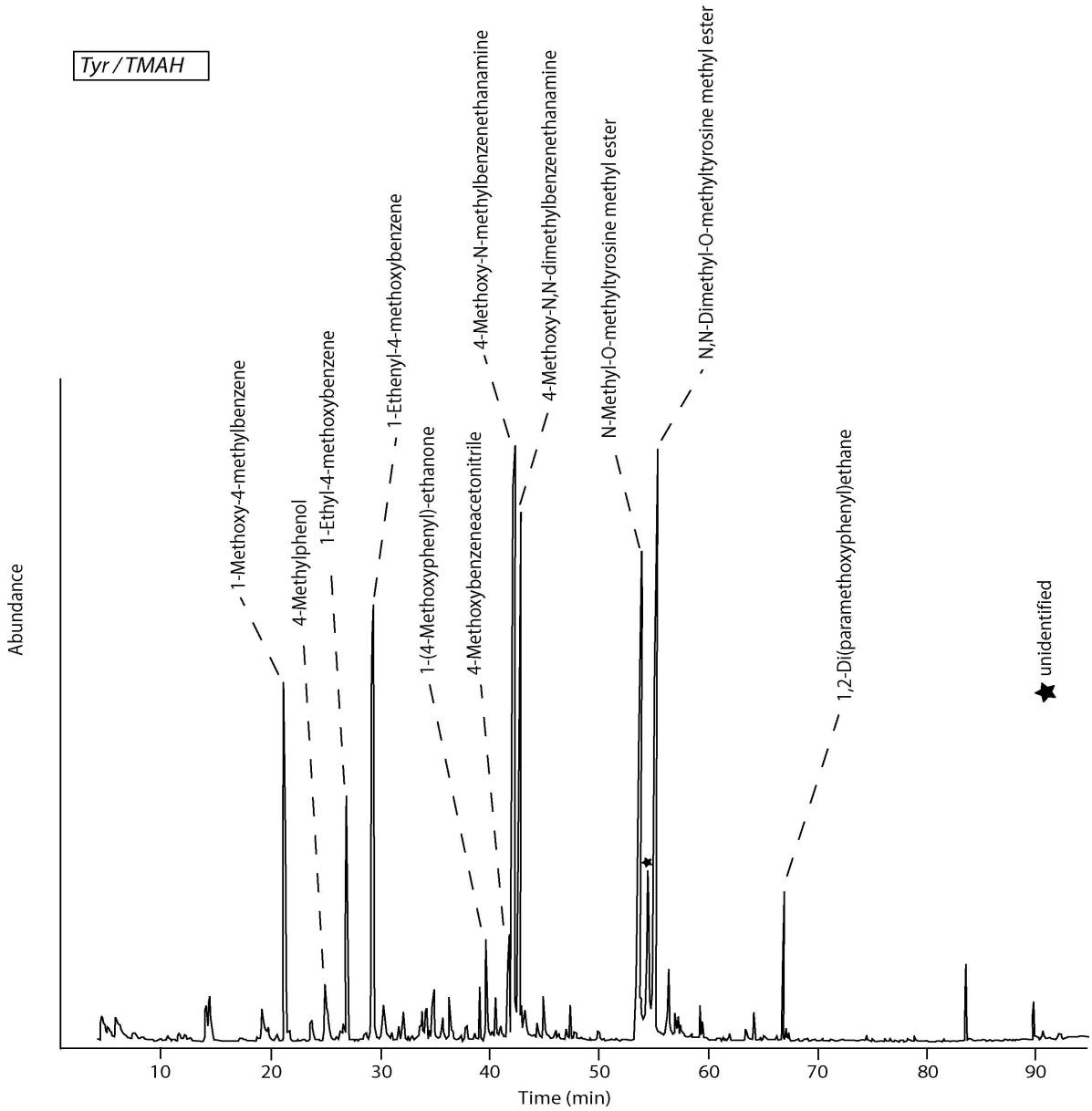


Fig. 10 : Pyrochromatogram of tyrosine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

Tryptophan is characterized by an indole ring. The major product of the pyrochromatogram (Fig. 11) is a dimethylindole. Positions of methyl groups are difficult to assign, because of the similarity of the mass spectra of the isomers. However, it is likely to be the 1,3 isomer according to tryptophan structure. It is formed through side chain homolysis and subsequent methylation of the nitrogen atom. It occurs along with several methylated homologues of tryptophan. Two peaks differing by their degree of methylation also contribute significantly to the pyrochromatogram. They correspond to the tryptophan decarboxylation product, methylated on the nitrogen of the ring with one **5** or two methyl groups on the primary amine function (Table 2, Appendix A). Finally, a dimethylquinoline **6** was detected, the relative positions of the substituents not being specified. Its formation is puzzling; we suspect homolysis and further ring extension. Homolysis and subsequent radical coupling is also evidenced by the occurrence of a di-indolylethane **7** at the end of the pyrochromatogram (Table 2, Appendix A).

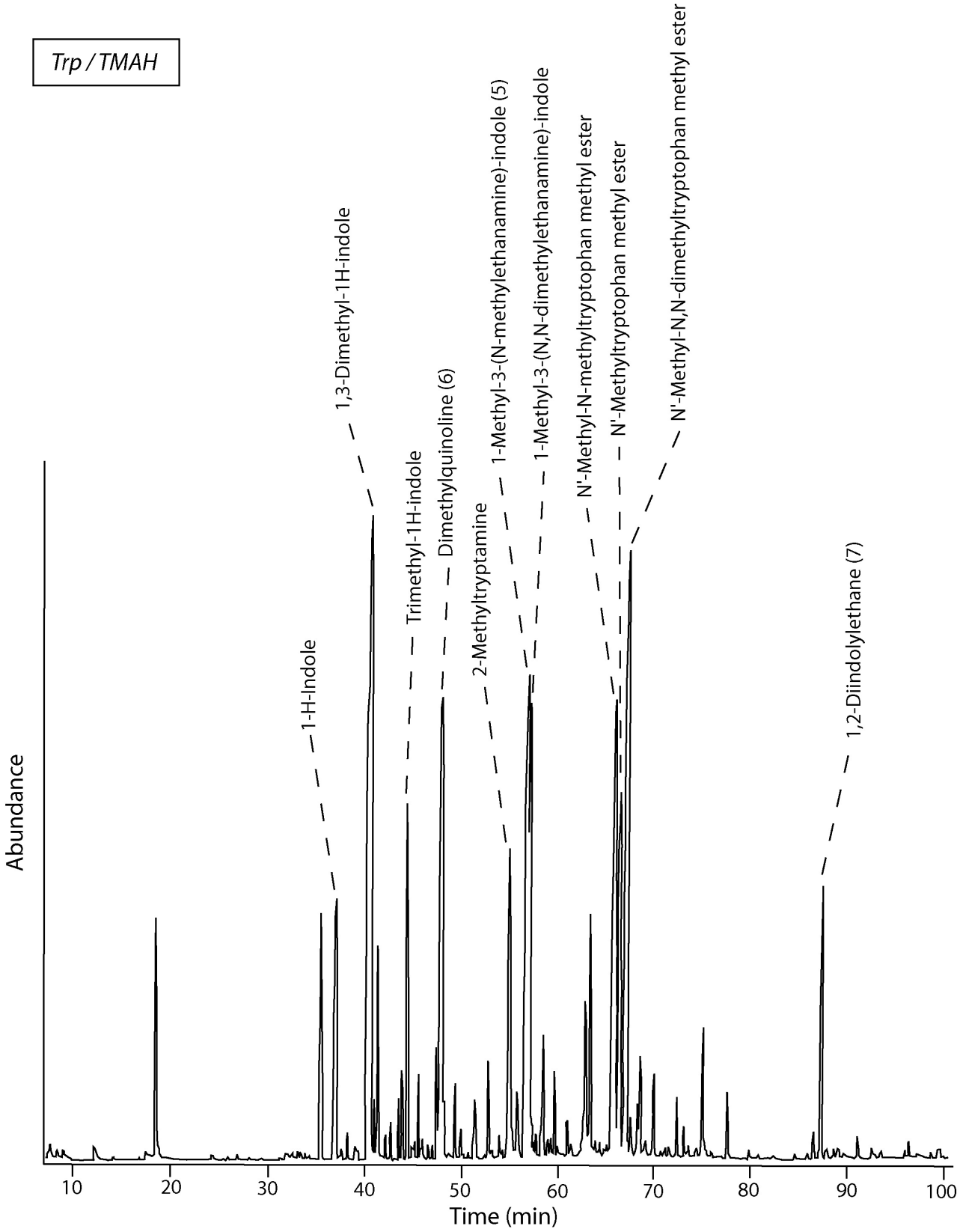


Fig. 11 : Pyrochromatogram of tryptophan, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.2.3 Methylation and dimerisation

Dimerisation through formation of a peptide bond is a well-known mechanism, which involves loss of water. Although suspected to occur upon conventional pyrolysis, it could not be evidenced due to the high polarity of the resulting dipeptide (Simmonds *et al.*, 1972). Evidence for dimer formation was firstly reported by Voorhees *et al.* (1997) and Hendricker and Voorhees (1998) upon TMAH pyrolysis from the simplest amino acid, glycine. In the present study, the dimethylated derivative of the glycylglycine dipeptide is one of the major products of the pyrochromatogram and the fully methylated one is also identified in trace amounts (Fig. 12). Glycine thus exhibits a unique behaviour among the twenty amino acids. Such a dimer may also undergo further cyclisation and water elimination so as to yield diketopiperazines **8** (DKP, R=H). The formation of diketopiperazines upon pyrolysis of amino acids has been reported as far back as 1970 (Simmonds *et al.*, 1972). The mono- and dimethyldiketopiperazines of glycine are thus observed in the pyrochromatogram. Methylated derivatives of glycine including that with the amino group bearing two methyls and with a free carboxylic group, which appears as a peak with a sloping front and a sharp tail, are identified (Table 2).

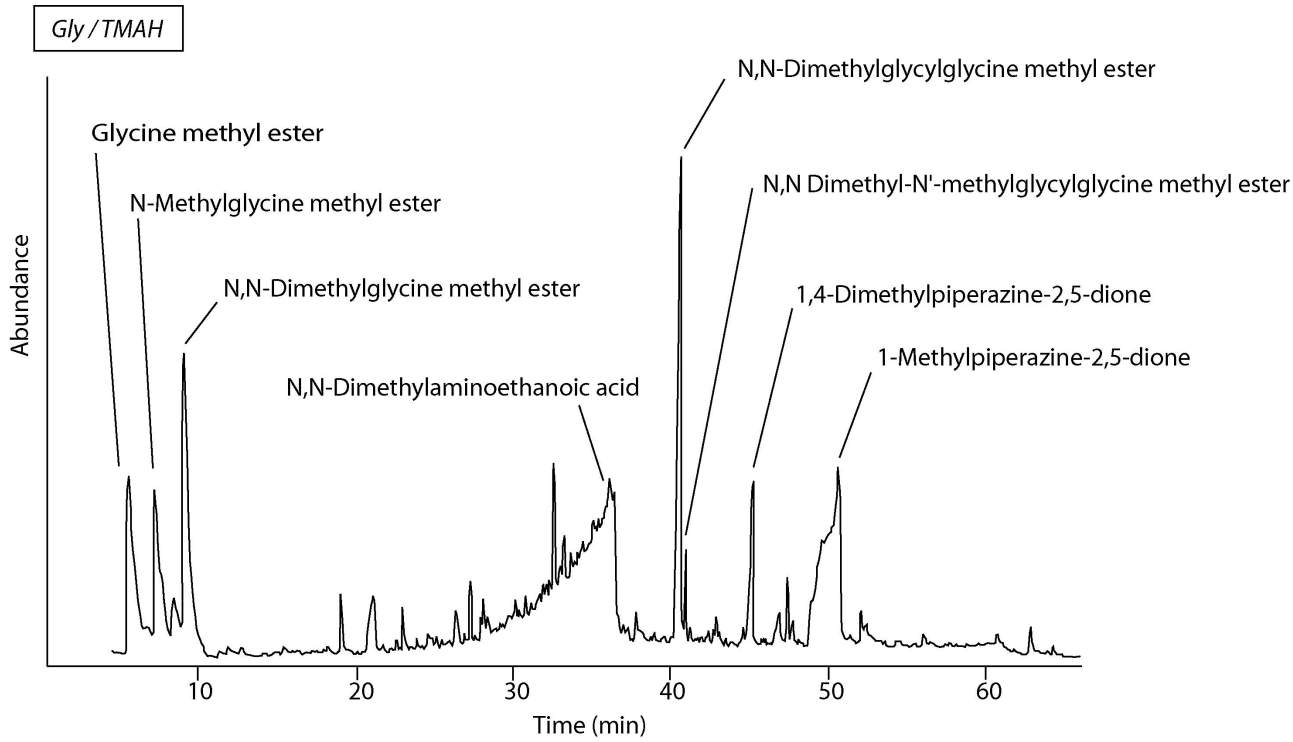


Fig. 12 : Pyrochromatogram of glycine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650°C.

Although less abundant than from glycine, diketopiperazines were also detected in the TMAH pyrolysates of alanine, phenylalanine, valine, leucine, proline and serine. It must be noted that neither diketopiperazine formation nor dimerisation was observed in Zang's study (Zang *et al.*, 2001).

The main products formed upon TMAH pyrolysis of isoleucine are the methylated derivatives (Fig. 13, Table 2). However, a peak, eluting at 38.67 min results from the same mechanism as the one observed for **10** from leucine (Fig. 16).

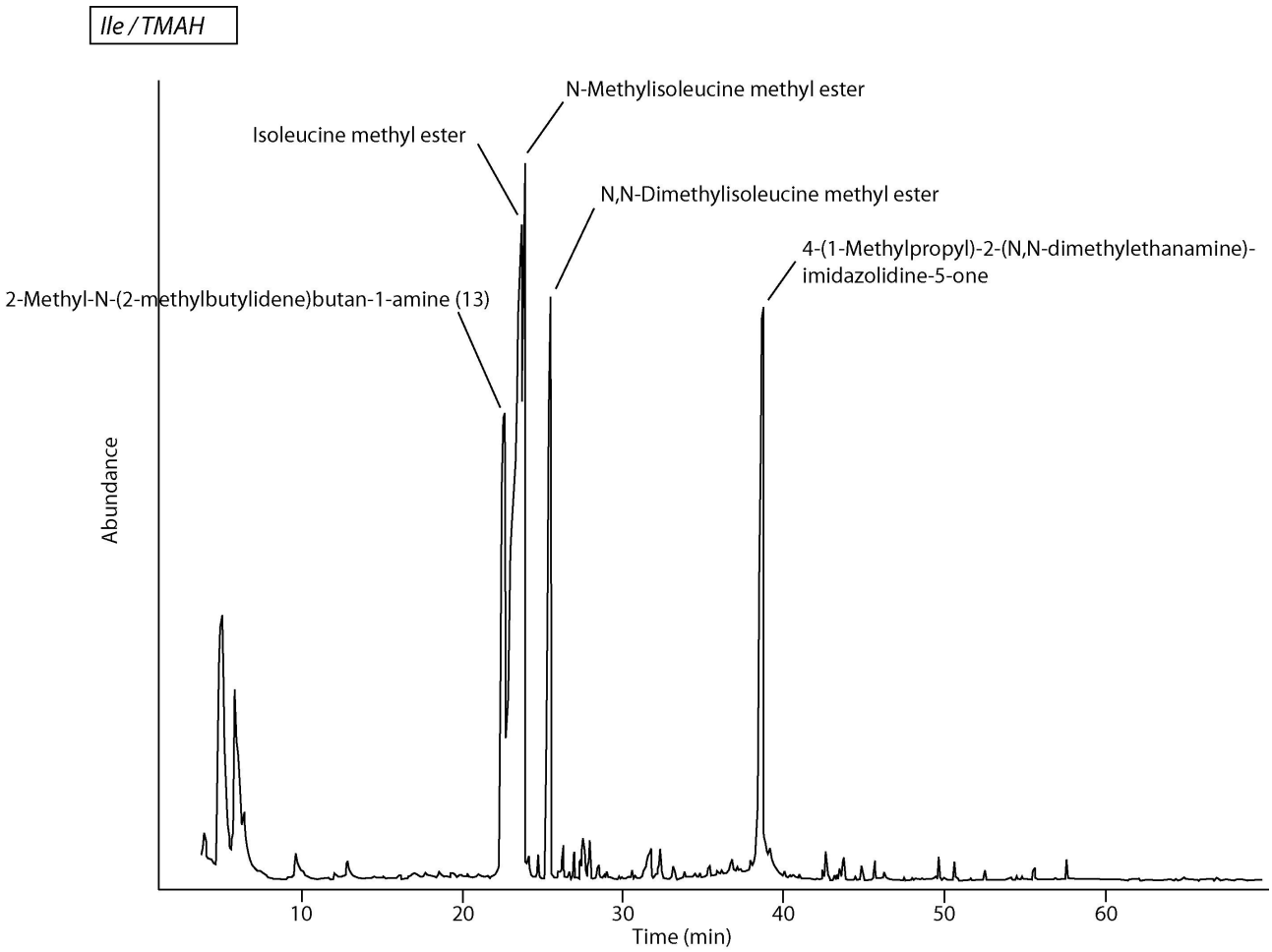


Fig. 13 : Pyrochromatogram of isoleucine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.2.4 Methylation and cyclisation

Glutamic acid differs from glutamine by its carboxylic group instead of the amide one. Both amino acids undergo similar cyclisation with elimination of ammonia or water, leading to the same oxoproline derivatives **2**. This mechanism is predominant as in the case of glutamine although glutamic acid also yields in high amounts its fully methylated counterpart along with two additional methylated derivatives (Fig. 14, Table 2).

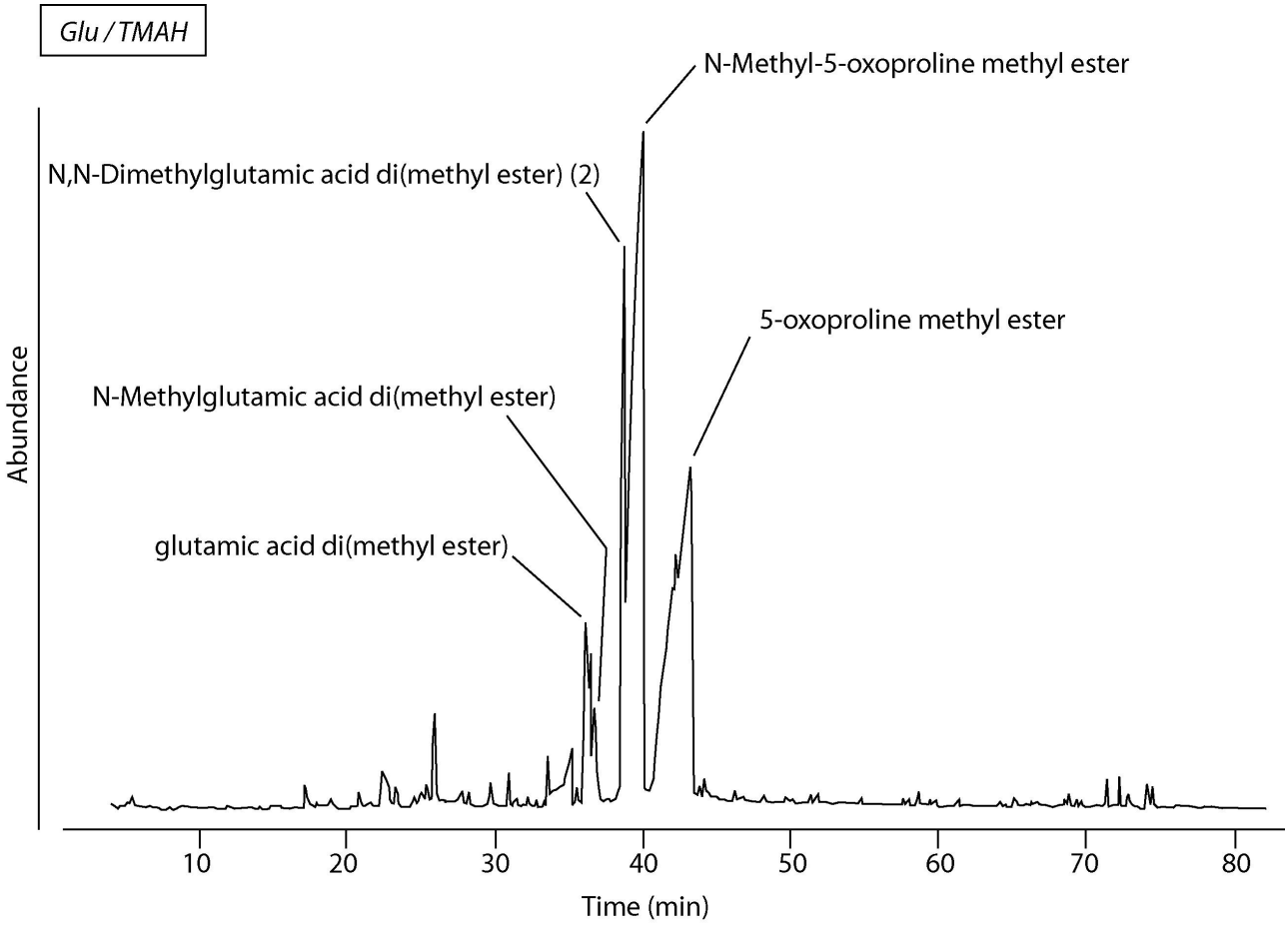


Fig. 14 : Pyrochromatogram of glutamic acid, pyrolysed in the presence of TMAH at 650°C.

2.3 Co-occurrence of several mechanisms with one prevailing

2.3.1 Predominant methylation

As expected and already mentioned above, methylation is the major mechanism in TMAH pyrolysis. The amino acids discussed in this section thus exhibit their methylated counterparts as major products but other mechanisms are observed, although in significantly lesser amount.

2.3.1.1 Cyclisation

Although methylation is predominating with the formation of the mono-, di- and trimethylated counterparts, a peak is worthy of interest in the pyrochromatogram of valine (Fig. 15). It exhibits a base peak at 126 and a molecular weight of 183 (Table 3). On the basis on its mass spectrum we tentatively identify it as compound **9** for which we propose a formation through decomposition of bicyclic amidines (Fig. 16). Bicyclic amidines were shown to be formed from simple aliphatic acids through heating under reduced pressure and in the presence of silica. The formation of the bicyclic amidines involves acylation by an amino acid molecule of one of the nitrogen atom of the diketopiperazine (Fig. 16) (Basiuk & Navarro-Gonzalez, 1997). Numerous decomposition products were reported from these bicyclic amidines mainly involving cleavage of the 6-membered pyrazine ring with elimination of CO and side chains (Basiuk & Navarro-Gonzalez, 1997).

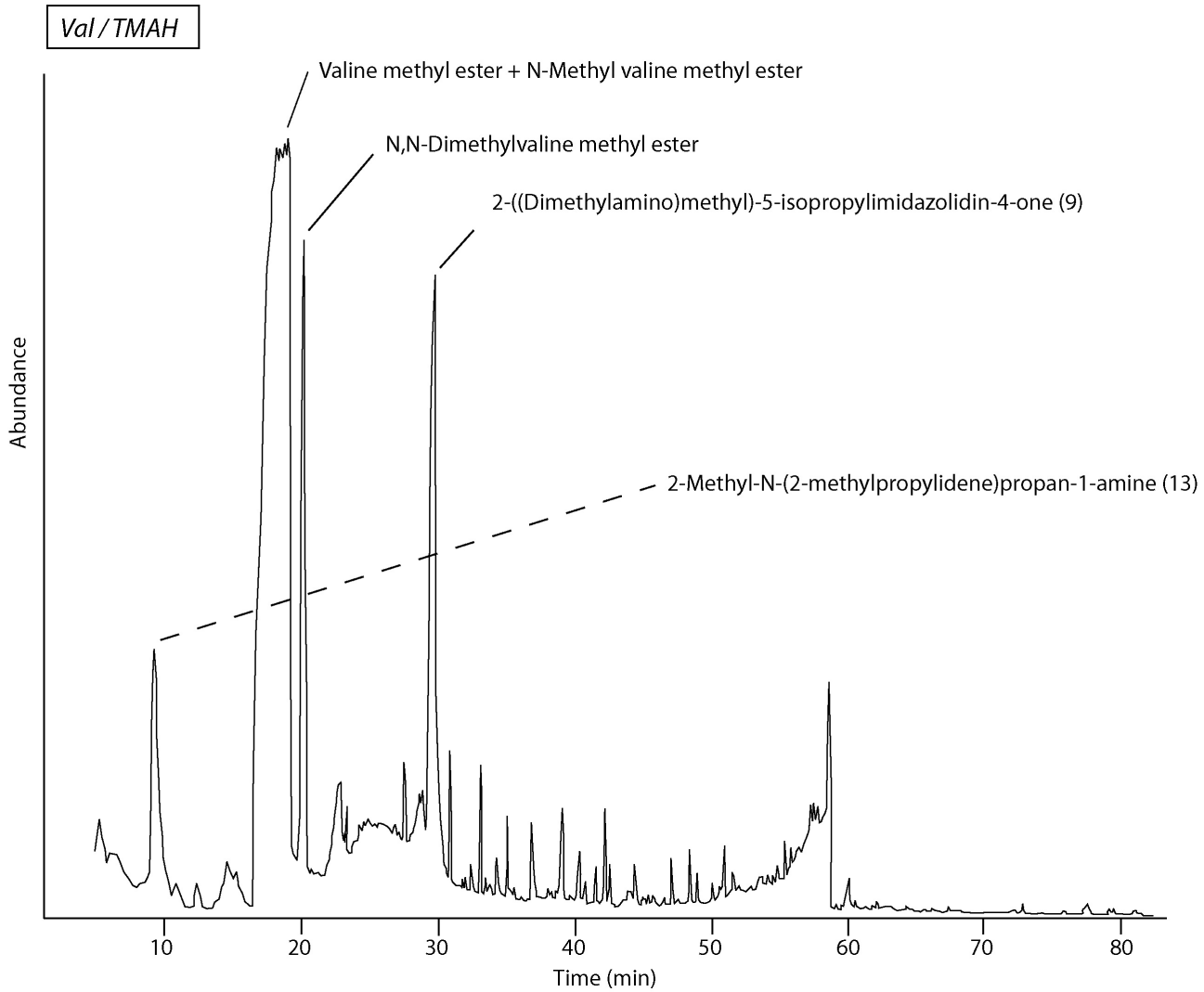


Fig. 15 : Pyrochromatogram of valine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

Table 3 : Main products released from pyrolysis of amino acids in the presence of TMAH as related in Section 2.3

Amino Acid	Retention time	Relative abundance (surface)	MS fragments	Molecular Weight	compounds	*mechanism*
Valine	18,00	100	**72** 88 55	131	Valine methyl ester	*direct methylation*
	18,00	100	**86** 102 42	145	N-Methylvaline methyl ester	*direct methylation*
	29,80	20	**126** 55 82 142 41 59	185	2-((Dimethylamino)methyl)-5-isopropylimidazolidin-4-one (**9**) (MS 15)	*cyclisation*
	20,34	15	**100** 116 44 42 85 84	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester	*direct methylation*
	9,43	10	**84** 57 41 55 56 70	127	2-Methyl-N-(2-methylpropylidene)propan-1-amine (**13**) (MS 16)	*N-alkylaldimine formation*
Leucine	38,66	100	**154** 112 41 69 115 156	214	2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one (**10**) (MS 17)	*cyclisation*
	22,04	90	**86** 44 43 88 41 87	145	Leucine methyl ester	*direct methylation*
	22,72	63	**100** 58 44 42 102 41	159	N-Methylleucine methyl ester	*direct methylation*
	24,83	47	**114** 72 42 58 116 115	173	N,N-Dimethylleucine methyl ester	*direct methylation*
	5,65	45	**44** 101 58	101	N-Methylisobutanamine	*decarboxylation*
	33,67	28	**114** 72 102 42 58 56	159	N,N-Dimethylleucine	*direct methylation*
	63,18	8	**170** 86 43 44 114 113	226	3,6-Diisobutylpiperazine-2,5-dione (MS 18)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	60,51	7	**184** 127 128 155 42 100	240	3,6-Diisobutyl-1-methylpiperazine-2,5-dione	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
Lysine	40,60	100	**58** 44 84 188 72 56	188	Dimethyllysine methyl ester (unknown positions)	*direct methylation*
	38,86	63	**84** 98 42 70 56 102	174	N-Methyllysine methyl ester	*direct methylation*
	40,82	55	**84** 129 56 116 42 156	188	N,N-Dimethyllysine methyl ester	*direct methylation*
	41,19	46	**98** 44 58 70 86 188	202	N,N',N'-Trimethyllysine methyl ester	*direct methylation*
	38,20	45	**84** 56 72 43 101	160	Lysine methyl ester	*direct methylation*
	7,54	39	**55** 83 41 54 56	82	2,3,4,5-Tetrahydro-pyridine	*cyclisation*
	43,12	39	**56** 83 43 80 84 82	128	3-Aminoazepine-2-one (**11**) (MS 19)	*cyclisation*
	42,84	35	**98** 44 70 56 116 202	202	N,N,N'-Trimethyllysine methyl ester	*direct methylation*
	42,71	31	**58** 84 114 112 157 42	216	N,N,N',N'-Tetramethyllysine methyl ester	*direct methylation*
	48,80	30	**58** 84 114 42 44 98		unidentified	
	43,27	23	**70** 84 97 57 42 142	142	3-Amino-1-methylazepine-2-one	*cyclisation*
Methionine	38,51	100	**132** 84 61 42 116 70	191	N,N-Dimethylmethionine methyl ester	*direct methylation*
	36,15	77	**61** 56 104 163 115 88	163	Methionine methyl ester	*direct methylation*
	36,71	71	**118** 70 61 102 42 145	177	N-Methylmethionine methyl ester	*direct methylation*
	20,62	38	**44** 119 58 91 104 61	119	N-Methyl-3-methylthiopropanamine	*decarboxylation*
	17,18	13	**88** 57 105 56 73 61	105	3-Methylthiopropanamine	*decarboxylation*
	28,03	11	**73** 121 136 61 41 45	136	1,3-Di-(methylthio)-propane	*decarboxylation + deamination*
Threonine	8,53	100	**58** 117 42	117	2-(N,N-Dimethylamino)ethanoic acid methyl ester	*homolysis*
	25,35	49	**116** 117 84 56 42 102	175	N,N-Dimethyl-O-methylthreonine methyl ester	*direct methylation*
	23,15	43	**103** 102 59 42 70 88	161	N-Methyl-O-methylthreonine methyl ester	*direct methylation*
	22,03	41	**59** 89 88 56 42 74	147	O-Methylthreonine methyl ester	*decarboxylation*
	6,80	37	**44** 103 41 42	103	2-Methoxy-N-methylpropanamine	*decarboxylation*
	24,39	27	**116** 102 117 42 44 56	161	N,N-dimethylthreonine methyl ester	*direct methylation*
	47,27	17	**42** 99 127 154 56 126	186	3-(1'-methoxyethyl)-1-methylpiperazinedione	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	53,23	10	**68** 152 42 212 153 180	212	2-(1'-Methoxyethyl)-4-methyl-5-ethenylpiperazinedione (MS 20)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
Serine	23,75	100	**88** 116 44 42 58 56	147	N-Methyl-O-methylserine methyl ester	*direct methylation*
	23,57	70	**116** 102 42 56 58 161	161	N,N-dimethyl-O-methylserine methyl ester	*direct methylation*
	5,40	34	**86** 58 56 42 43 101	101	2-Aminopropenoic acid methyl ester	*deshydratation*
	8,44	24	**58** 42 117	117	2-(N,N-Dimethylamino)ethanoic acid methyl ester	*homolysis*
	47,32	20	**111** 154 42 44 56 55	154	2,5-Dimethylidene-3-methoxypiperazine-6-one (MS 21)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	45,49	18	**125** 168 55 153 56 54	168	2,5-Dimethylidene-3-methoxy-1-methylpiperazine-6-one (**15**) (MS 22)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	47,44	16	**55** 166 56 57 69 139	166	2,5-Dimethylidene-3-methoxy-1-methyl-3,4-dehydropiperazine-6-one (MS 23)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
	5,28	13	**67** 41 40 39 38 66	67	1H-Pyrrole	*cyclisation*
	27,42	12	**94** 153 78 41 67 53	153	1-Methyl-1H-Pyrrole-2-acetic acid methyl ester	*cyclisation*
	4,60	11	**58** 44 42 41 89 86	89	2-(Dimethylamino)-ethanol	*decarboxylation*
	45,86	7	**154** 55 125 42 54 126	154	(i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 or 4) (**14**) (MS 24)	*dimerisation + cyclisation (DKP)*
Asparagine	26,50	100	**113** 56 58 57 55 42	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione (**12**)	*cyclisation*
	16,47	76	**54** 111 82 83	111	1-Methylpyrrole-2,5-dione (**16**)	*cyclisation*
	85,48	66	**78** 163 333 106 222 248	333	trimer of pyrrolidinedione (**18**) (MS 25)	*dimerisation*
	22,48	44	**125** 40 68 39 96	125	1,3-Dimethylpyrrole-2,5-dione	*cyclisation*
	30,79	42	**125** 54 39 53 70 113	125	3,4-Dimethylpyrrole-2,5-dione	*cyclisation*
	coeluted		**99** 56 42 70	99	Pyrrolidine-2,5-dione	*cyclisation*
	65,06	34	**54** 113 224 82 53 55	224	dimer of pyrrolidine-2,5-dione (**17**) (MS 26)	*dimerisation*
	62,85	33	**113** 54 224 82 85 139	224	dimer of pyrrolidine-2,5-dione (**17**) (MS 27)	*dimerisation*
	35,93	25	**44** 71 56 156 113 98	156	1,N,N-Trimethyl-3-Amino-pyrrolidine-2,5-dione	*cyclisation*
	28,03	22	**139** 54 39 82 110	139	1,3,4-Trimethylpyrrole-2,5-dione	*cyclisation*
	21,40	100	**61** 74 134 75 59 103	134	3-(Methylthio)propanoic acid methyl ester (MS 28)	*deamination*
	33,09	54	**116** 71 118 56 42 84	177	N,N-Dimethyl-S-methylcysteine methyl ester	*direct methylation*

(MS *i*) refers to the mass spectrum number (*i*), illustrated in section 6.

[a] MS fragments are in order of decreasing abundance, with base peak in bold.

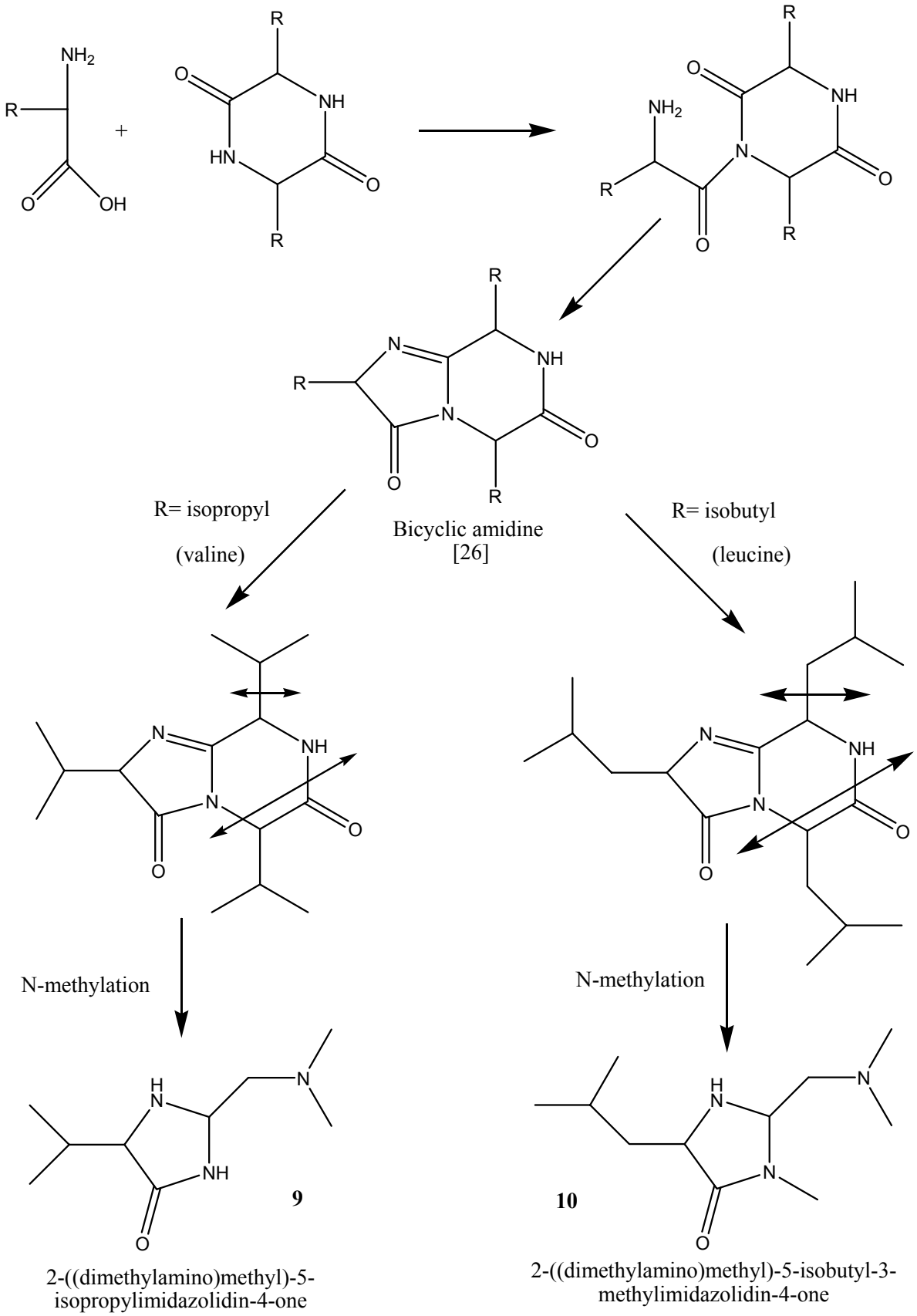


Fig. 16 : Formation and decomposition products of bicyclic amidine.

In the same way, leucine yields, in addition to its methylated counterparts, a product with a base peak at 154 and a molecular weight of 197 (Fig. 17, Table 3). This compound is tentatively assigned as **10** and a formation pathway is proposed from bicyclic amidine (Fig. 16).

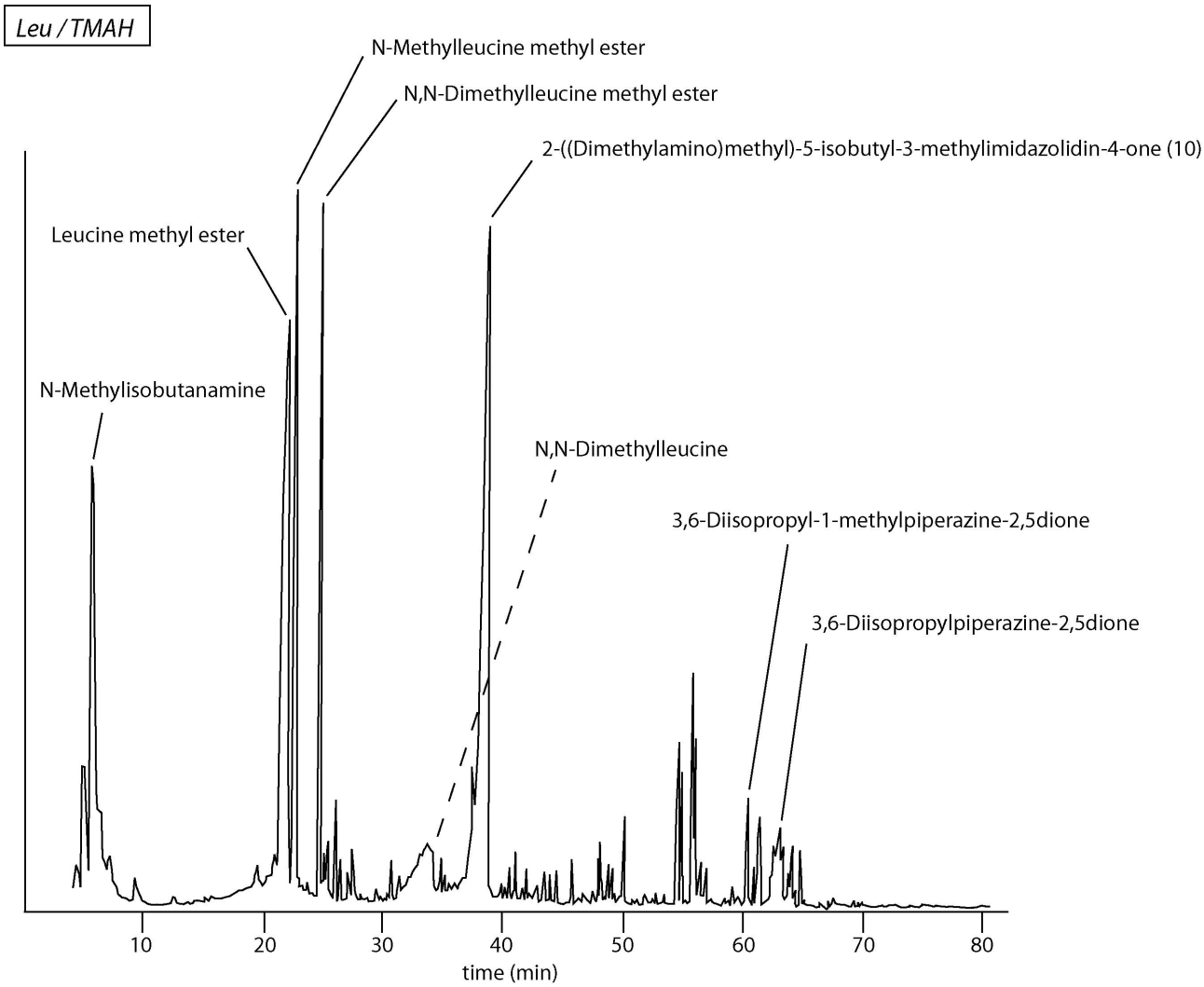


Fig. 17 : Pyrochromatogram of leucine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

Lysine yields a complex mixture of various methylated homologues Fig. 18). This was expected since up to five methyl groups can be fixed onto the starting amino acid. Thus, seven methylated derivatives have been detected in lysine pyrochromatogram. Two additional peaks, differing from each other by a methyl group, result from internal cyclisation between the carboxylic group and the primary amino group located at the opposite end of the chain leading to 7-membered ring compounds, termed 3-aminoazepine-2-one **11** (Table 3).

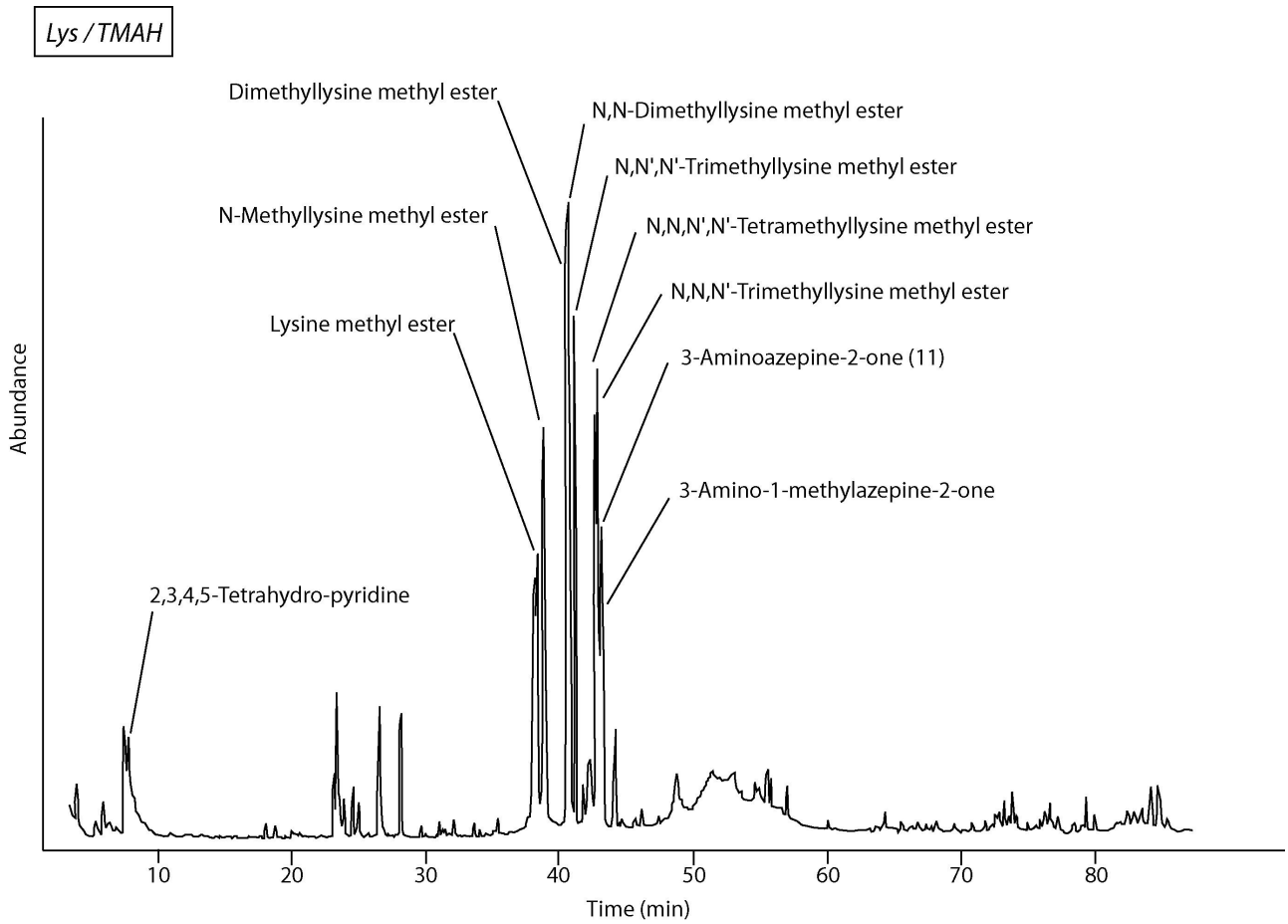


Fig. 18 : Pyrochromatogram of lysine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

Aspartic acid also undergoes cyclisation. This cyclisation may involve intermediate formation of an intramolecular peptide bond leading to a 4-membered lactam, analogue to the 5-oxoproline observed from glutamic acid. Immediate opening of the ring associated with an additional intramolecular peptide bond formation, results in pyrrolidinedione **12** formation (Table 1).

2.3.1.2 Decarboxylation

The fully methylated derivative of methionine is the major product in the TMAH pyrolysate of methionine along with its lower homologues (with only 0 or 1 methyl group on the amine function) (Fig. 19). Decarboxylation is evidenced by the presence of the 3-methylthiopropanamine, monomethylated or not. In addition, 1,3-di(methylthio)-propane is identified. Its formation involves both decarboxylation and deamination and subsequent addition of a methylthio group (Table 3).

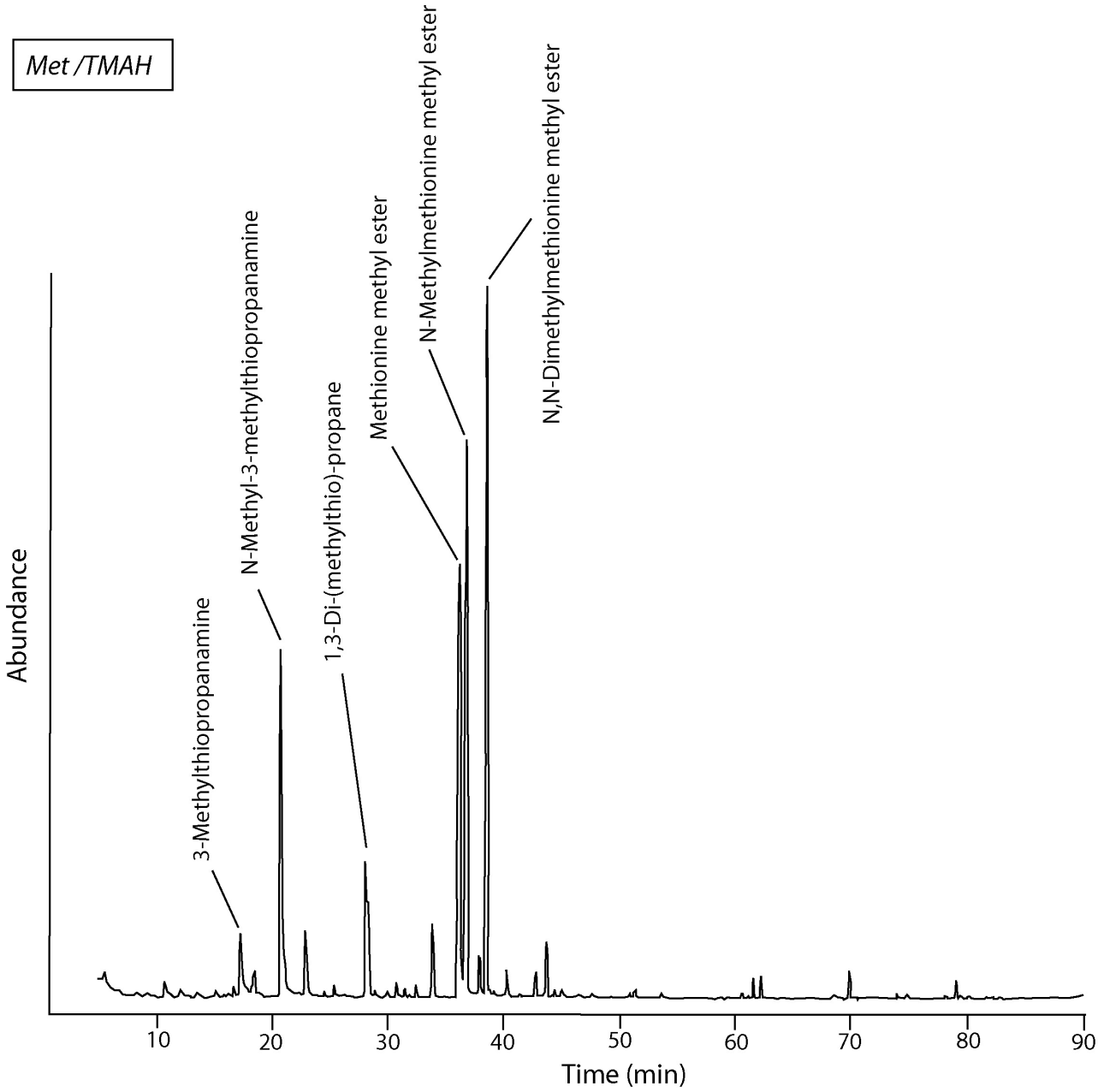


Fig. 19 : Pyrochromatogram of methionine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 C.

Decarboxylation also occurs upon TMAH pyrolysis of leucine, threonine and cysteine (Table 3).

Some products, although not simply resulting from decarboxylation, also reveal the involvement of this mechanism. Indeed, *N*-alkylaldimines **13** are considered as secondary products of decarboxylation. As thoroughly described by Simmonds *et al.* (1972) and Ratcliff *et al.* (1974), alkylaldimines are the result of the condensation of the amine formed by decarboxylation of the amino acid, with the imine, which is the dehydrogenation product of this amine. In the present study, alkylaldimines were identified from isoleucine and valine (Table 2 and Table 3, Appendix A).

2.3.1.3 Homolysis

As all the amino acids described in this section, threonine yields its methylated counterparts as major products upon TMAH pyrolysis (Fig. 20). It must be noted that a quite intense peak is detected at the beginning of the pyrochromatogram. Based on its mass spectrum and retention time, it is assigned to 2-(*N*,*N* dimethylamino)-ethanoic acid methyl ester (Table 3). This product results from homolysis of the side chain and subsequent methylation. Homolysis of the side chain was previously discussed in Section 2.2.1. However, it was shown to release hydrocarbons, i.e. the side chain itself. In the present case, the released compound is the "amino acid part", which is identical to glycine. The formation of the fully methylated counterpart of glycine from threonine reveals that this product can be erroneously considered as deriving from glycine in natural samples. The potential biases associated with the formation of this product from non-glycine amino acids will be discussed elsewhere (chapitre 3, section 5). It must be noted that the same compound is also observed upon TMAH pyrolysis of serine although in lower amount (Table 3).

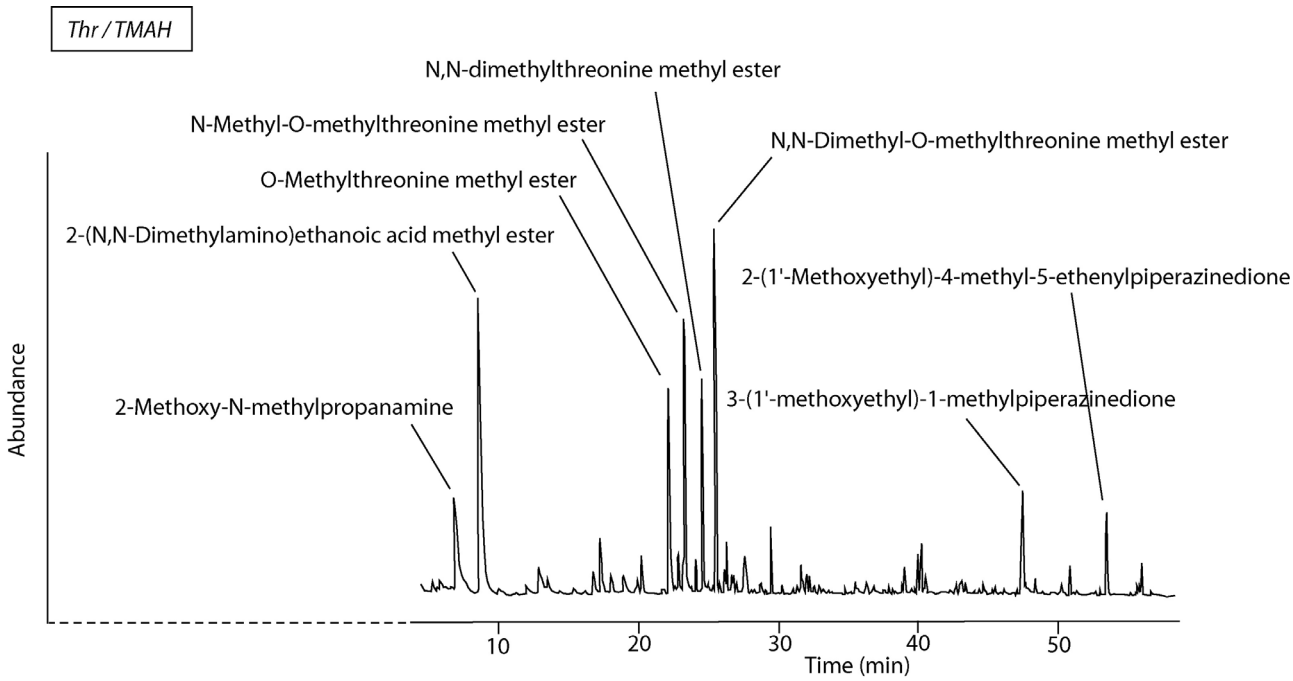


Fig. 20 : Pyrochromatogram of threonine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650°C.

2.3.1.4 Dehydration and dimerisation

The pyrochromatogram of serine (Fig. 21) is dominated by a methylated derivative whose carboxyl and hydroxyl groups are methylated and amino function is methylated once. At the beginning of the trace, a compound is assigned to 2-aminopropenoic acid methyl ester. It results from dehydration of serine and further methylation of the carboxylic group. Several peaks are observed at the end of the pyrochromatogram. They were identified on the basis of their mass spectra as diketopiperazines, which have undergone further methylation and dehydration **14** or as piperazinones **15** (Appendix A). They result from a similar process of dimerisation and cyclisation as the one observed to form diketopiperazines.

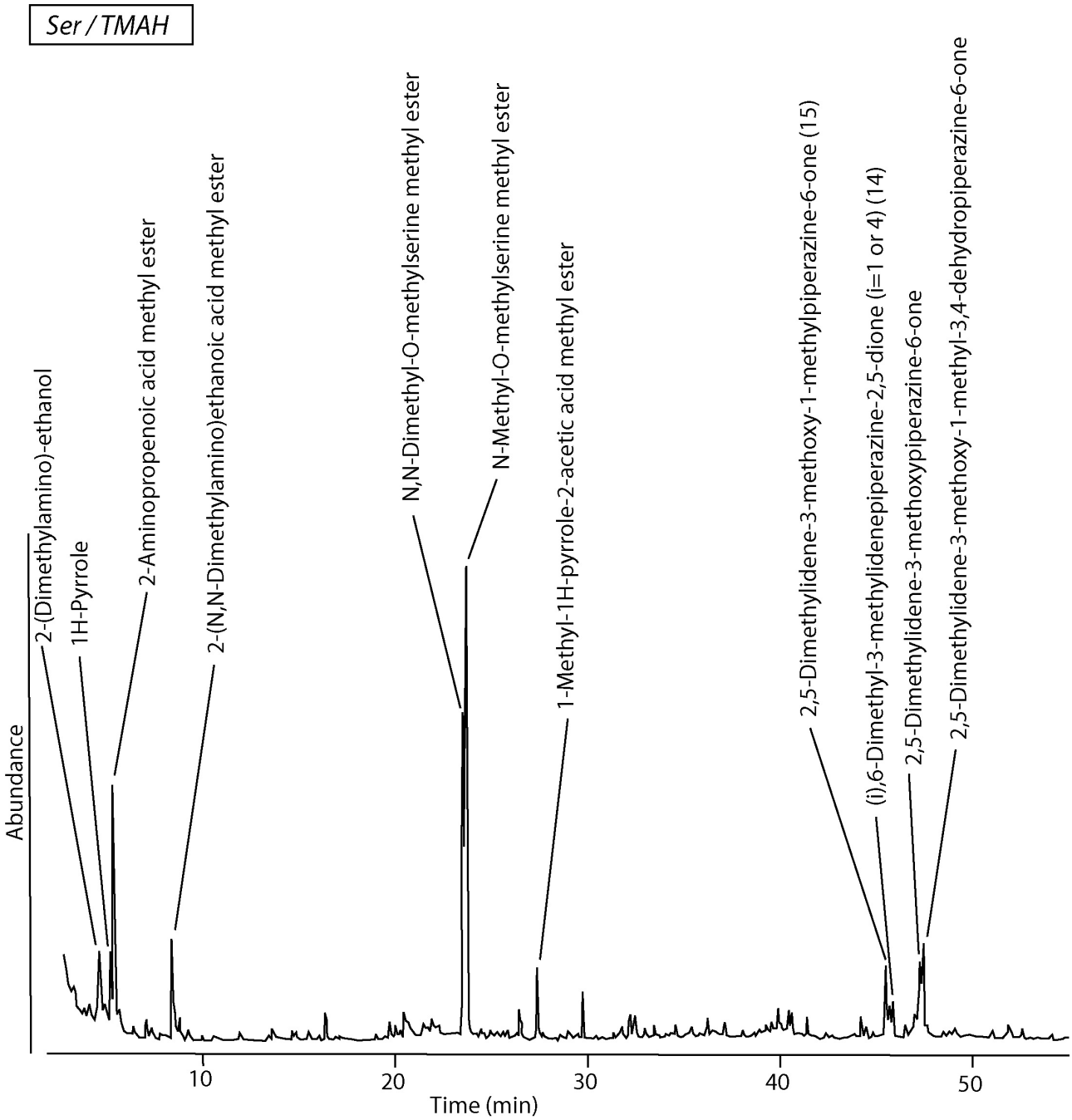


Fig. 21 : Pyrochromatogram of serine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.3.2 Cyclisation dominating dimerisation

Asparagine, which structure is relatively close to that of glutamine behaves in a similar way since it yields predominantly cyclisation products upon TMAH pyrolysis. The major products result from the formation of an intramolecular peptidic bond between the carboxylic group and the amino group of the amide function and further elimination of ammonia leading to pyrroledione **16**. Saturated **12** and methylated homologues are also identified (Fig. 22, Table 3). Compounds **12** and **16** were also shown to be formed upon conventional pyrolysis by Sharma *et al.* (2003) who proposed a mechanism to account for the formation of the saturated compound. This mechanism involves the intermediate formation of a dipeptide. The end of the pyrochromatogram shows peaks which corresponds to dimers and trimers of derivatives of asparagine, **17** and **18**. The dimer (trimer) formation likely involves two (three) intramolecular cyclisations in a di (tri) peptide followed by elimination of ammonia (Table 3).

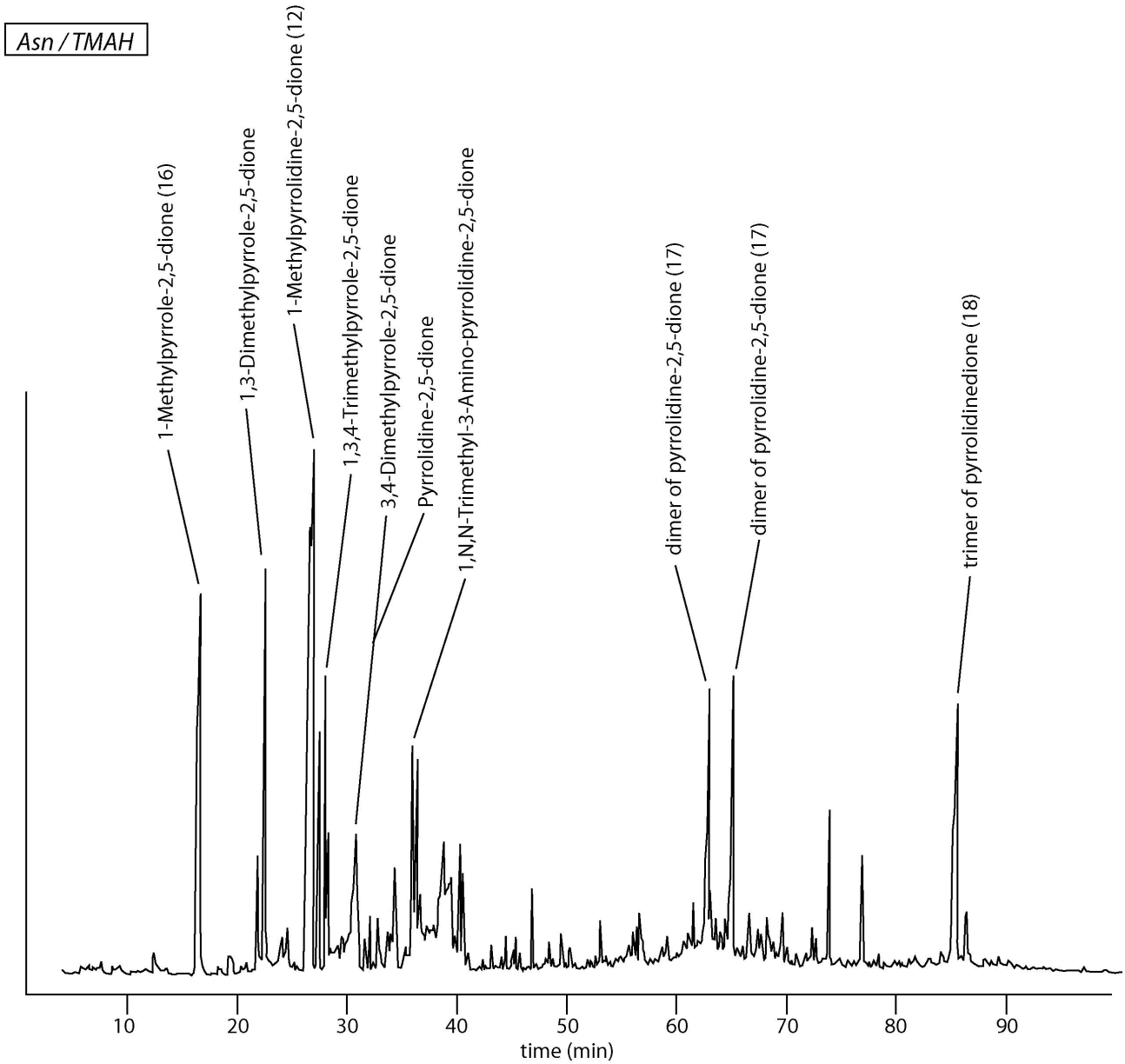


Fig. 22 : Pyrochromatogram of asparagine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

2.3.3 Deamination dominating methylation

Cysteine yields 3-(methylthio)-propanoic acid methyl ester as the major product upon TMAH pyrolysis (Fig. 23). It results from deamination of cysteine and further methylation of the thio group. The loss of the amino group may also lead to the formation of a double bond, hence the formation of the propenoic homologue. Interestingly, deamination was shown to dominate in the case of aspartic acid where the second carboxylic group was suspected to favour the elimination of the amino group. We can thus anticipate a similar role for the thio group. The fully methylated derivative of cysteine is also identified along with a lower homologue with only one methyl group

on the amino function. 1,2-Di(methylthio)-ethene is observed in the pyrolysate. Its formation involves either both deamination and decarboxylation and further addition of a methylthio group or homolysis followed by dimerisation and dehydrogenation (Table 3).

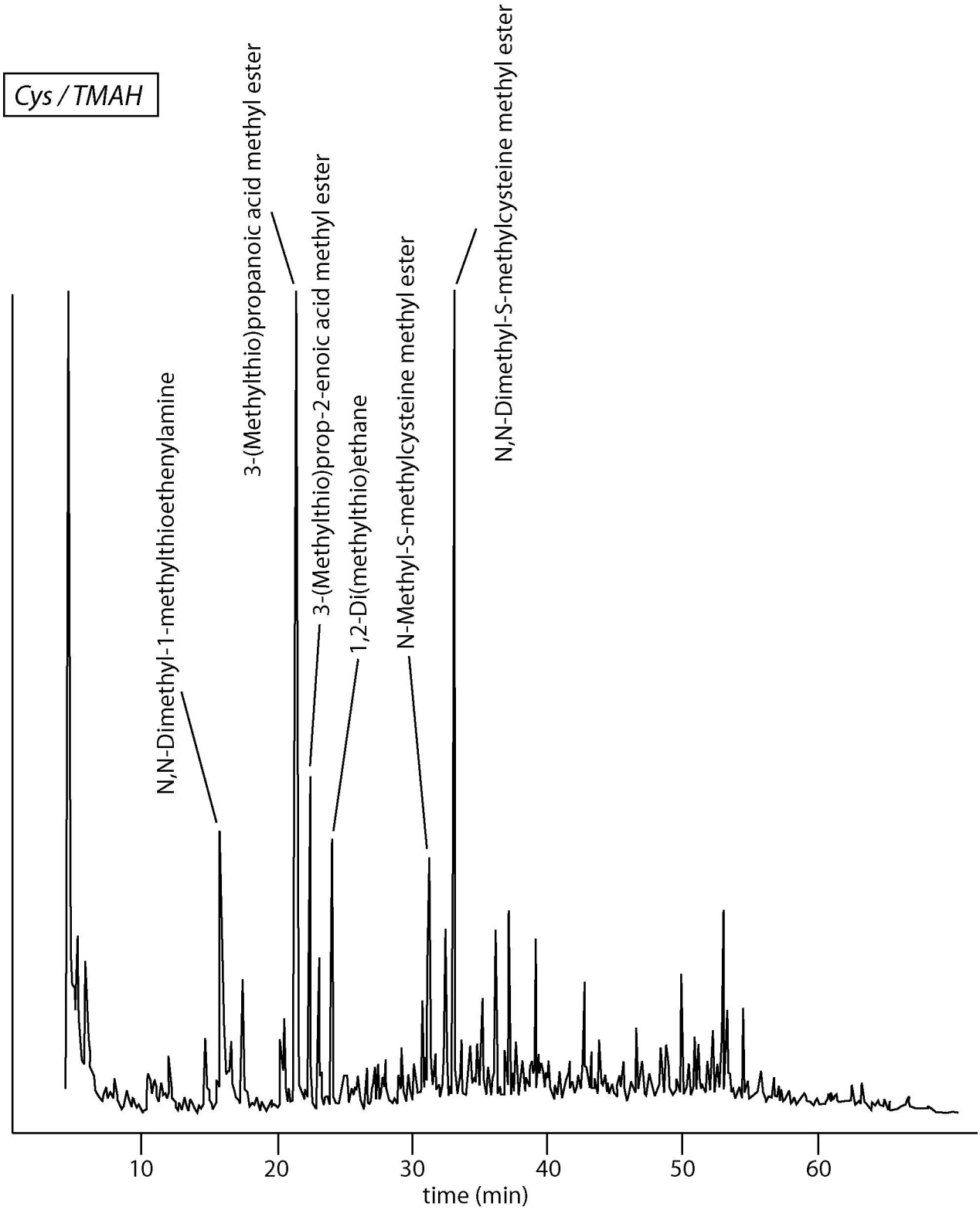


Fig. 23 : Pyrochromatogram of cysteine, pyrolysed in the presence of TMAH at 650 °C.

3 Role of the derivatizing agent

3.1 Role of TMAH

As stressed in the Introduction section, mechanisms occurring upon pyrolysis of amino acids have been extensively described (Ratcliff *et al.*, 1974). We discuss here the effect of the presence of TMAH on these mechanisms.

It stands to reason that the major effect of TMAH is methylation. Almost all the studied amino acids undergo methylation as a major pathway. In fact, only arginine, glutamine, aspartic acid and asparagine do not yield their methylated derivatives. Moreover, the products released through other mechanisms (such as deamination or decarboxylation) are also methylated, hence a better detection.

To address the role of TMAH, we will compare our data with those reported on 19 α-amino acids using conventional pyrolysis by Chiavari and Galletti (1992) because of the similarities in temperature (600 °C) and pyrolysis conditions (open system).

TMAH was expected to prevent from decarboxylation (Challinor, 1989). The decarboxylation products, i.e. amines, are observed in the case of leucine, isoleucine, lysine and proline upon conventional pyrolysis and were not observed in the present study. Amines formed through decarboxylation are known to yield the corresponding nitriles as observed for leucine and isoleucine upon conventional pyrolysis. These compounds are not detected in the TMAH pyrolysate but evidence for the involvement of the decarboxylation process in the presence of TMAH is provided by the formation of alkylaldimines from isoleucine and valine. Such alkylaldimines were also reported for leucine, isoleucine and valine, upon conventional pyrolysis. Moreover, decarboxylation of phenylalanine, tyrosine and methionine was observed in both studies.

Dimerisation is the major process upon TMAH pyrolysis of glycine. It is not observed upon conventional pyrolysis. As previously shown by Hendricker and Voorhees (1998), the formation of Gly–Gly dipeptide requires the presence of TMAH, which was interpreted as an effect of the base character of TMAH. Dimers are considered as the precursors of diketopiperazines, for which major differences are noted when TMAH is used or not. Diketopiperazine is the main product of conventional pyrolysis of proline and is also detected in the case of leucine. In contrast, in the presence of TMAH, glycine yields diketopiperazine as a major product and diketopiperazine is also detected although in lower amount from phenylalanine, valine, leucine, proline and serine. Diketopiperazines were shown to yield bicyclic amidines and derived products upon conventional

pyrolysis of simple aliphatic amino acids (Basiuk & Navarro-Gonzalez, 1997). Intermediate formation of these bicyclic amidines is likely to occur in the presence of TMAH since derived products are proposed in the present study for valine, leucine, and isoleucine.

Cyclisation occurs independently of the presence of TMAH since the same cyclisation products are observed upon pyrolysis with and without TMAH: 3-amino-2-piperidone from arginine, pyrrole- and pyrrolidinedione from asparagine (Reeves & Francis, 1997) and pyrrolidinone from glutamic acid (Chiavari & Galletti, 1992). Lysine also yields a cyclisation product identified as an azepinone by Chiavari and Galletti (Chiavari & Galletti, 1992).

Side chain homolysis is observed with and without TMAH for tryptophan, phenylalanine and tyrosine pointing to the lack of influence of TMAH on what is often considered as a thermal pathway. Formation of vinyl-1-methylthioether was reported from methionine upon conventional pyrolysis but this compound was not detected in the presence of TMAH.

Deamination was reported upon pyrolysis of phenylalanine in the presence or not of TMAH (Knicker *et al.*, 2001), (Zang *et al.*, 2001) and (Knicker & Hatcher, 1997) leading to phenylpropanoic and phenylpropenoic acids but none of these acids could be detected under the present conditions.

3.2 Methylation versus trimethylsilylation

Comparison between the present data and those reported using hexamethyldisilazane (HMDS) as derivatizing reagent (Chiavari *et al.*, 2001) is made possible by the similarity in the pyrolysis (open systems) and the temperatures (600 °C). Pyrolysis in the presence of HMDS was performed on all the proteinic amino acids but glutamic acid, glutamine, lysine and asparagine (Chiavari *et al.*, 2001).

When HMDS was used, pyrolysis of amino acids mainly released their trimethylsilylated (TMS) counterparts (Chiavari *et al.*, 2001). This direct derivatization is analogous to the methylation observed in the presence of TMAH. It is observed for alanine, phenylalanine, glycine, isoleucine valine, leucine, methionine and threonine. However, differences can be noted between the level of derivatization and the nature of the derivatized functions. Indeed, with HMDS, the main compound was generally the TMS ester, i.e. with no derivatization of the amino group, whereas TMAH leads to a mixture of methylated products. Among these methylated products, the major one varies between the fully methylated derivative (as for example in methionine), that with one methyl on the amino group and the methyl ester (as in leucine) or just the methyl ester (as in alanine). Products with free carboxylic group and dimethylated amino group can also be formed in substantial amount (difficult to quantify due to peak shape) as from alanine. In contrast no free

carboxylic group is reported with HMDS and N-derivatization never excesses monosilylation, likely due to steric hindrance of the TMS group.

Cyclisation is also an important process when HMDS is used. The same product, namely 3-amino-piperidin-2-one, is formed from arginine whatever the reagent. Dimerisation along with cyclisation preferentially leads to TMS-oxypyrazines when HMDS is used instead of diketopiperazines with TMAH. This is observed with glycine, alanine and serine. Again the large size of the TMS group likely hinders the DKP formation and especially its subsequent derivatization on the N atom. Interestingly, a diketopiperazine is formed in one case with HMDS, that of proline where no derivatization can occur. It must be noted that the abundance of the diketopiperazine from proline is much lower than that of the methylated homologue when TMAH is used.

Amino acids may behave differently with respect to deamination and decarboxylation depending on the derivatizing agent. Deamination predominates in both cases for aspartic acid and decarboxylation occurs for tyrosine, methionine and cysteine and tryptophan with both HMDS and TMAH. In contrast, deamination was shown to be a major process in TMAH pyrolysis of cysteine, which is not observed with HMDS and decarboxylation is reported for histidine, phenylalanine, leucine and threonine with TMAH and not with HMDS. Deamination is observed upon HMDS pyrolysis of threonine and serine but not when TMAH is used.

Products resulting from side chain homolysis are reported from histidine, phenylalanine, tyrosine and tryptophan with HMDS, as with TMAH although homolysis is a minor process in the TMAH pyrolysis of histidine. This similarity likely indicates that this homolytic cleavage is a pure thermal process.

It must also be noted that no alkylaldimine is reported when pyrolysis is performed in the presence of HMDS, valine and isoleucine only yielding their trimethylsilylated derivatives.

4 Implications for studies of natural samples

As mentioned in Section 2, amino acids have been identified as their methylated derivatives in several types of natural samples. However, only a limited number of amino acids have thus been recognised. Indeed, the methylated derivatives of glycine, alanine, valine, leucine/isoleucine and serine were reported in most TMAH pyrolysates of natural samples (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001), (Knicker *et al.*, 2001), (Mongenot *et al.*, 2001), (Riboulleau *et al.*, 2002), (Zang *et al.*, 2000), (Zang *et al.*, 2001), (Templier *et al.*, 2005a) and (Knicker & Hatcher, 1997). Phenylalanine and tyrosine contribution is revealed by their deamination products (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001), (Knicker *et al.*, 2001), (Zang *et al.*, 2000), (Zang *et al.*, 2001), (Templier *et al.*, 2005a) and (Knicker & Hatcher, 1997), aspartic acid by its cyclisation product, 2,5-pyrrolidine dione (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001) and (Knicker *et al.*, 2001) and lysine by the *N*-methyl, 2-aminohex-5-enoic acid methyl ester (Knicker *et al.*, 2001) and (Zang *et al.*, 2000). 5-Oxoproline, methyl ester is often detected in these pyrolysates and interpreted as originating from glutamic acid (Knicker *et al.*, 2001) or from aspartic acid (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001), (Mongenot *et al.*, 2001), (Riboulleau *et al.*, 2002), (del Rio *et al.*, 2004), (Zang *et al.*, 2000) and (Knicker & Hatcher, 1997). Similarly, 2,5-pyrrolidinedione is commonly identified in TMAH pyrolysates (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001), (Knicker *et al.*, 2001), (Mannino & Harvey, 2000), (Templier *et al.*, 2005a) and (Knicker & Hatcher, 1997) and is sometimes assigned to aspartic acid (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001) and (Knicker *et al.*, 2001). The occurrence of indole derivatives is also generally considered as indicative of tryptophan (Mannino & Harvey, 2000), (Templier *et al.*, 2005a) and (Reeves & Francis, 1997). Additional peaks, although not identified but characterized by a base peak at *m*/*z* 116 were attributed to amino acid derivatives (Mongenot *et al.*, 2001), (Riboulleau *et al.*, 2002) and (del Rio *et al.*, 2004).

From the aforementioned literature data, as far as we are aware, it seems that not all the amino acids, such as arginine and cysteine, have been reported.

The present study clearly shows that although methylation is the major process occurring upon TMAH pyrolysis, methylated derivatives are formed in relatively low amount in a number of cases including those of arginine and cysteine. However, a number of other products can be useful to reveal amino acids in natural samples. This is confirmed by the aforementioned studies in which products of cyclisation or homolysis are used as diagnostic of some amino acids. The co-occurrence of some pyrolysis products can also be used to infer an amino acid contribution. For example, butanedioic di(methyl ester) is a ubiquitous product in TMAH pyrolysate of natural samples for which several origins can be considered (Frazier *et al.*, 2003), (Knicker *et al.*, 2001), (Mannino &

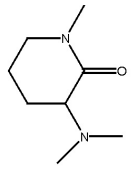
Harvey, 2000) and (Templier *et al.*, 2005a). The present study shows that it can be formed from aspartic acid and, when detected along with 2,5-pyrrolidinedione, it provides stronger evidence for the contribution of this amino acid. It must be noted that, according to the present study, 2,5-pyrrolidinedione can also originate from asparagine but under our conditions, asparagine does not yield any butanedioic acid. The use of the present study as a database should be useful to look for minor amino acid derivatives resulting from other processes than direct methylation. Indeed, as highlighted in Section 3, no systematic prediction can be made upon amino acid pyrolysis whatever the used derivatizing agent.

Although most studies on natural samples are performed at 600–650 °C, several results are reported for lower temperatures. We therefore investigated the behaviour of seven amino acids at 358 °C in the presence of TMAH. No additional information could be obtained when compared to 650 °C. Indeed, similar results were obtained for glycine, phenylalanine, lysine and glutamine. In the case of valine, leucine and isoleucine, we observed an increase in the high molecular weight products but also the virtual lack of characteristic cyclic compounds such as **9** and **10**. Such products may be of diagnostic value in a study of natural sample.

Moreover, the retention time of the pyrolysis products must be considered. Indeed, most of the pyrolysis products elute in the 20–30 min range. As a result, pyrolysis products eluting after this range, even if in lower abundance may be of interest for diagnostic. Knicker *et al.* (2001) reported the occurrence of a number of products eluting after 36 min, which were not determined due to their complexity. The present study, by investigating all the proteinaceous amino acids, should thus constitute a basis for the detection of such products in pyrolysis of more complex materials. As the first step in increased complexity, peptides will be analysed in the light of the present data.

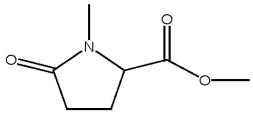
5 Appendix A.

1



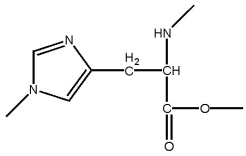
1-Methyl-3-(N,N-dimethylamine)piperidin-2-one

2



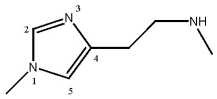
N-Methyl- 5-oxoproline methyl ester

3



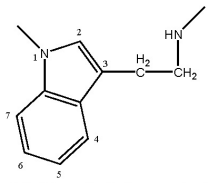
N,1-Dimethylhistidine methyl ester

4



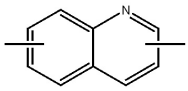
1-Methyl-4(-N-methylethanamine)-imidazole

5



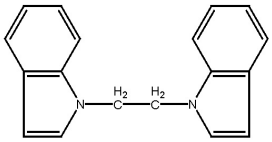
1-Methyl-3-(N-methylethanamine)-indole

6



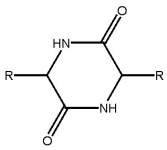
Dimethylquinoline

7



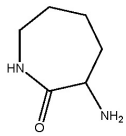
1,2-Diindolylethane

8



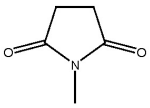
DKP: Diketopiperazine
R is the side chain of the amino acid

11



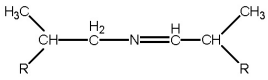
3-Aminoazepine-2-one

12



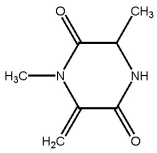
1-Methylpyrrolidine-2,5-dione

13



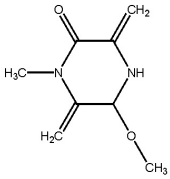
N-alkylaldimine arising from
valine (R: CH3), or isoleucine (R: CH2-CH3)

14



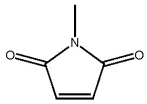
4,6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione

15



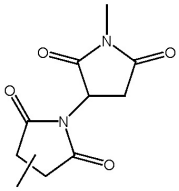
2,5-Dimethylidene-3-methoxy-1-methylpiperazine-6-one

16



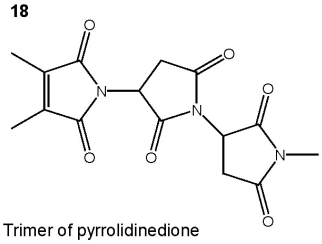
1-Methylpyrrole-2,5-dione

17



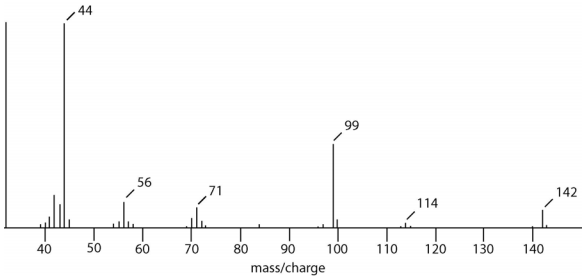
Dimer of pyrrolidinedione

18

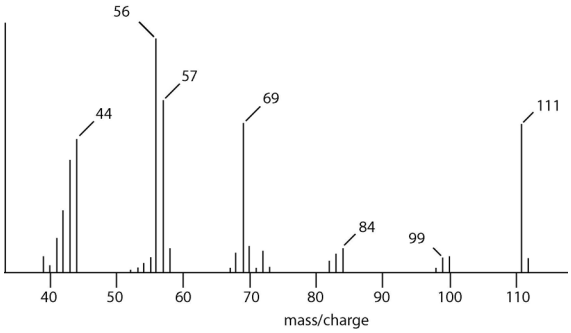


Trimer of pyrrolidinedione

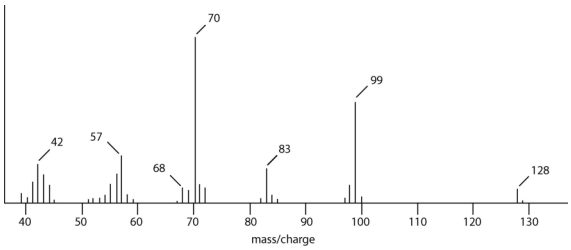
6 Supplementary material : mass spectra



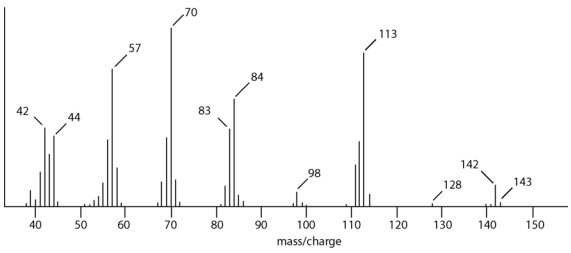
MS 1 : 3,6-Dimethylpiperazine-2,5-dione



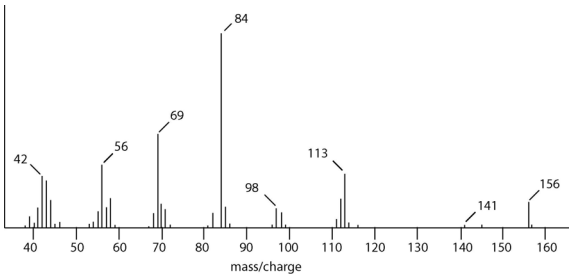
MS 2 : 1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one



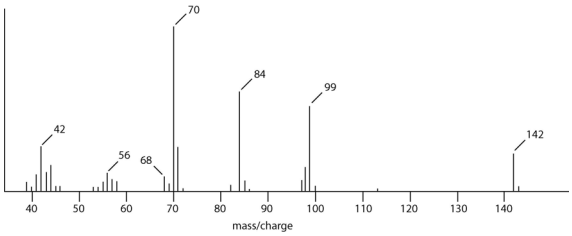
MS 3 : 3-(N-Methylamine)piperidin-2-one



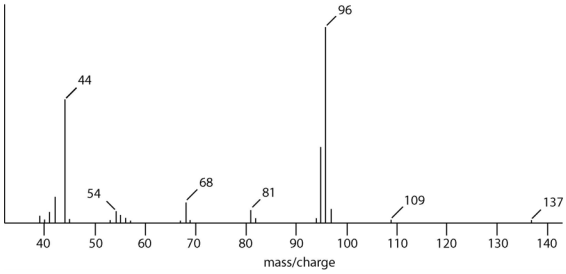
MS 4 : 1-Methyl-3-(N-methylamine)piperidin-2-one



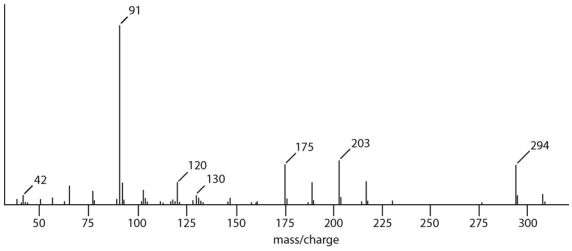
MS 5 : 1-Methyl-3-(N,N-dimethylamine)piperidin-2-one



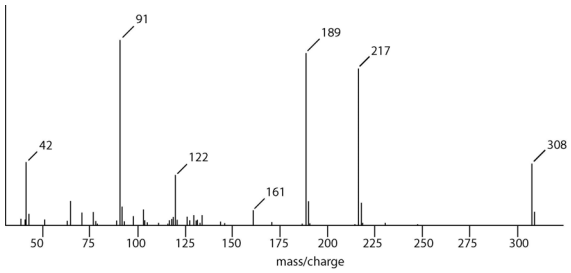
MS 6: 3-(N,N-Dimethylamine)piperidin-2-one



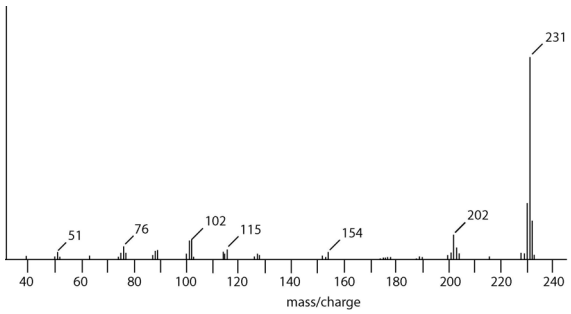
MS 7: 3-Methyl-4(-N-methylethanimine)-imidazole



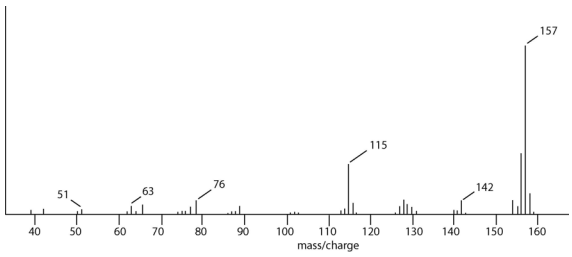
MS 8: 3,6-Dibenzylpiperazine-2,5-dione



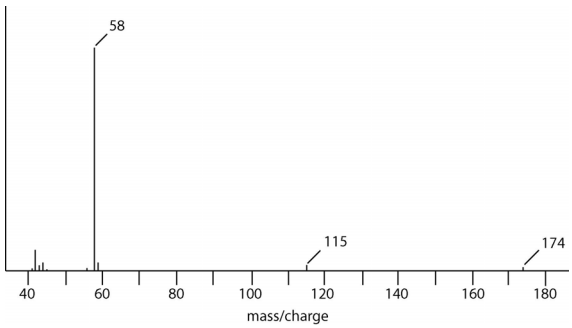
MS 9: 3,6-Dibenzyl-1-methylpiperazine-2,5-dione



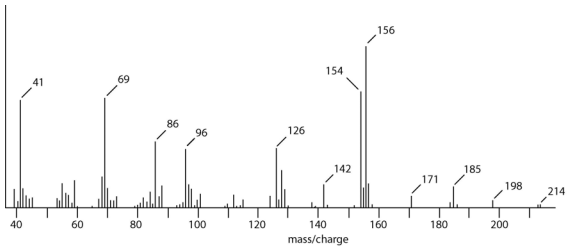
MS 10: 3-Benzyl-1,3-dimethylpiperazine-2,5-dione



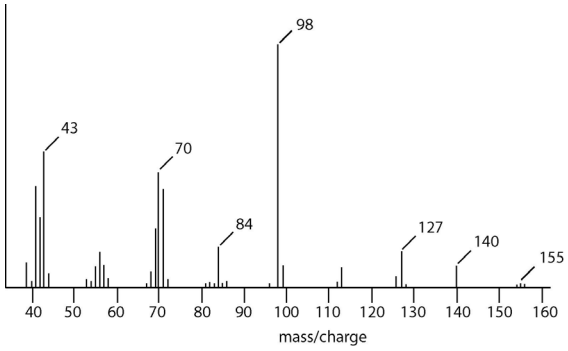
MS 11: Dimethylquinoline



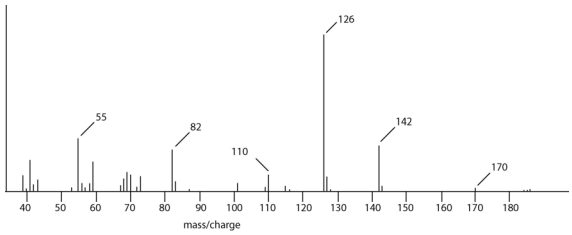
MS 12: N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester



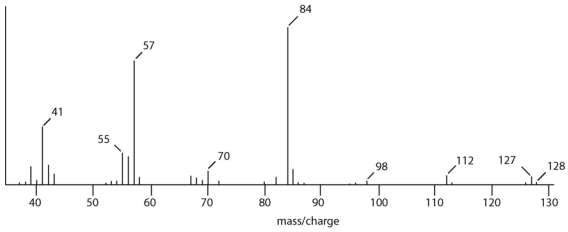
MS 13: 4-(1-Methylpropyl)-2-(N,N-dimethylethanamine)-imidazolidine-5-one



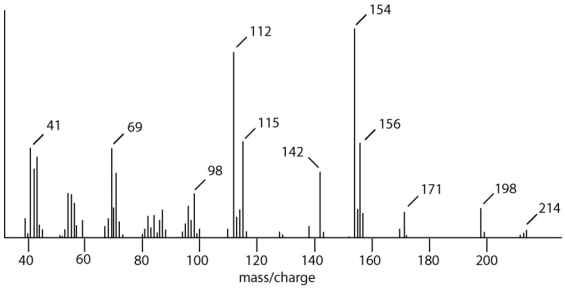
MS 14: 2-Methyl-N-(2-methylbutylidene)butan-1-amine



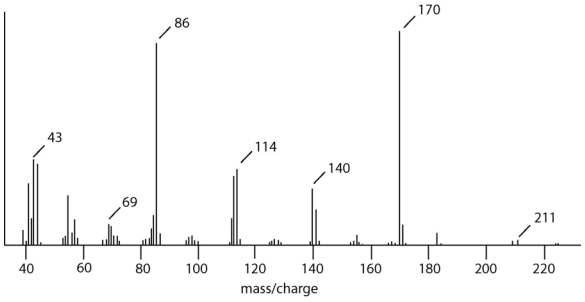
MS 15: 2-(N,N-Dimethylmethanamine)-4-isopropylidenimidazolidine-5-one



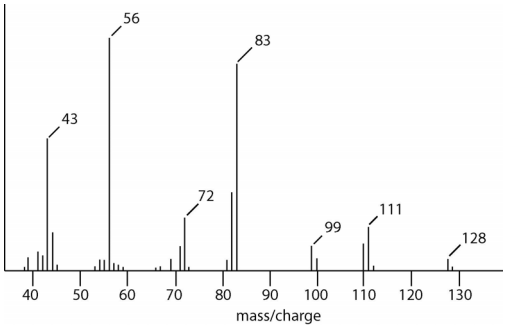
MS 16: 2-Methyl-N-(2-methylpropylidene)propan-1-amine



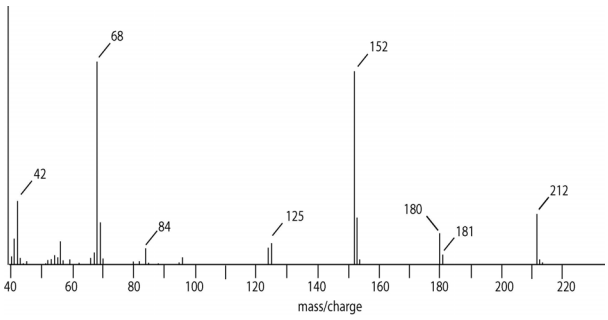
MS 17: 4-Isobutyl-2-(N-methylmethanamine)-imidazoline-5-one



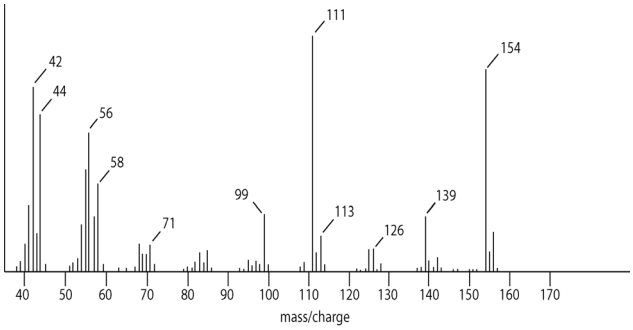
MS 18: 3,6-Diisobutylpiperazine-2,5-dione



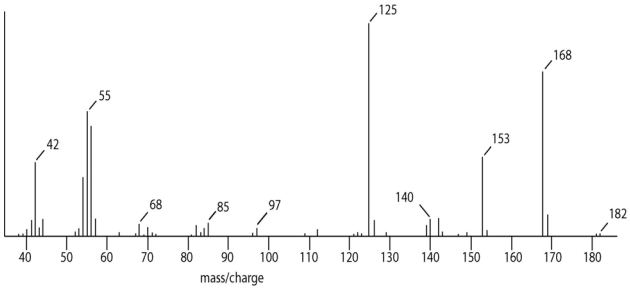
MS 19: 3-aminoazepine-2-one



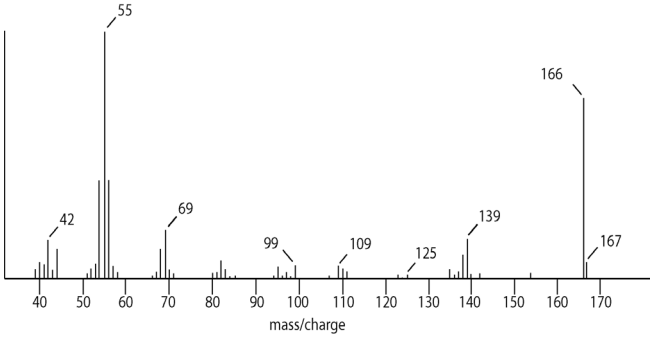
MS 20: 2-(1'-Methoxyethyl)-4-methyl-5-ethenylpiperazinedione



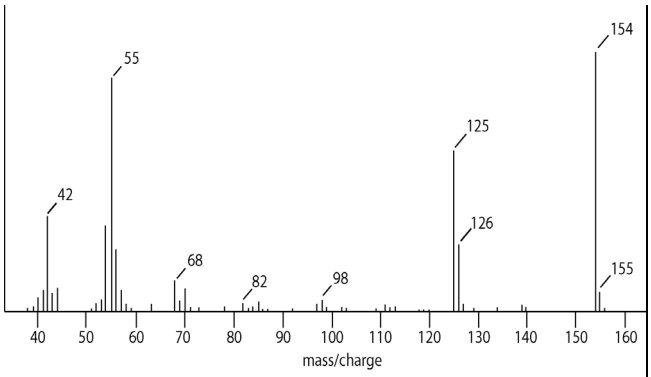
MS 21: 2,5-Dimethylidene-3-methoxypiperazine-6-one



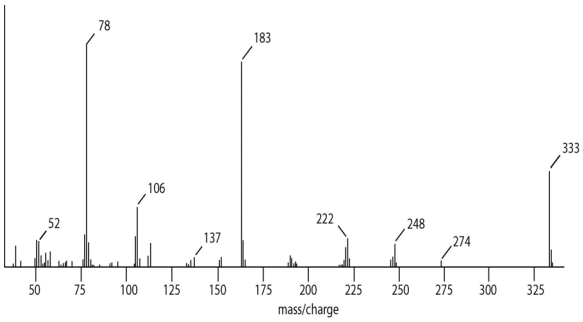
MS 22: 2,5-Dimethylidene-3-methoxy-1-methylpiperazine-6-one



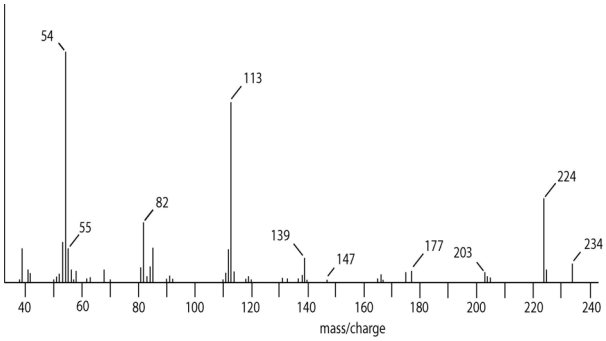
MS 23: 2,5-Dimethylidene-3-methoxy-1-methyl-3,4-dehydropiperazine-6-one



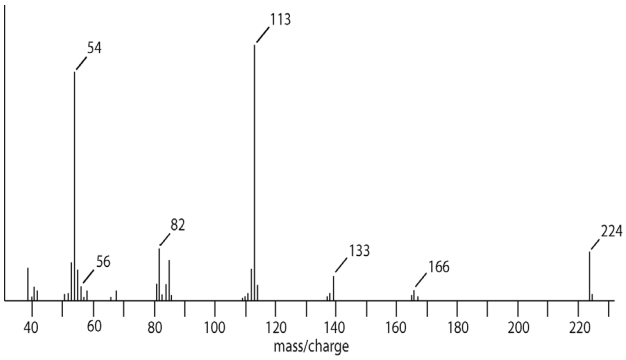
MS 24: (i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 or 4)



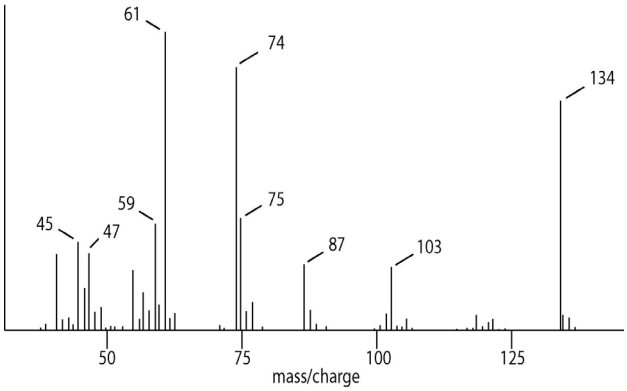
MS 25: trimer of pyrrolidinediore



MS 26: dimer of pyrrolidinediore



MS 27: dimer of pyrrolidinediore



MS 28: 3-(Methylthio)propanoic acid methyl ester

Chapitre 3 :
Py-GC-MS de 17 dipeptides en présence de TMAH

1. Dipeptides vs. mélanges d'acides aminés 109

1.1. Pyrolyse de mélanges binaires d'acides aminés 109

1.2. Pyrolyse des dipeptides correspondants 115

1.2.1. Pyrolyse de Val-Phe 117

1.2.2. Pyrolyse de Ala-Tyr 121

1.2.3. Pyrolyse de Ala-Trp 125

1.3. Comparaison des pyrolyses de dipeptides et des mélanges 128

2. La pyrolyse de dipeptides 129

2.1. Dipeptides aliphatiques 131

2.1.1. Pyrolyse de Gly-Gly en présence de TMAH 131

2.1.2. Pyrolyse de Gly-Leu en présence de TMAH 135

2.2. Dipeptides contenant un acide aromatique 139

2.2.1. Pyrolyse de Leu-Trp en présence de TMAH 139

2.3. Dipeptides hydroxylés 143

2.3.1. Pyrolyse de Thr-Ser en présence de TMAH 143

2.3.2. Pyrolyse de Gly-Ser en présence de TMAH 147

2.3.3. Pyrolyse de Val-Thr en présence de TMAH 153

2.3.4. Pyrolyse de Val-Ser en présence de TMAH 159

2.3.5. Pyrolyse de Thr-Leu en présence de TMAH 163

2.4. Dipeptide aromatique hydroxylé 169

2.4.1. Pyrolyse de Ser-Tyr en présence de TMAH 169

2.5. Comparaison de dipeptides symétriques 173

2.5.1. Val-Phe et Phe-Val 173

2.5.2. Leu-Tyr et Tyr-Leu 178

2.5.3. Met-Leu et Leu-Met 184

2.5.4. Conclusions sur la pyrolyse de dipeptides symétriques 193

3. Discussion des résultats de pyrolyse de dipeptides 195

3.1. Conclusion sur le rôle de la liaison peptidique 195

3.1.1. Dipeptide vs. acide aminé individuel 195

3.1.2. Considérations sur les produits de pyrolyse 195

3.2. Des diketopiperazines complexes 196

3.3. Influence de la nature des acides aminés sur les produits de pyrolyse du dipeptide 198

3.3.1. Les dipeptides aromatiques 199

3.3.2. Les dipeptides hydroxylés 199

3.3.3. Les dipeptides aliphatiques 200

3.4. Discussion en terme de mécanismes 200

3.4.1. Les mécanismes de pyrolyse sont-ils conservés ? 200

La formation de diketopiperazines 202

L'homolyse 203

La méthylation 204

La déshydratation 204

Déamination, décarboxylation 205

Dimérisation 205

Rupture de la liaison peptidique 205

D'autres mécanismes ? 206

3.4.2. Implications pour l'étude d'échantillons de Matière Organique Naturelle 206

4. Des hypothèses sur la multiplicité de certains spectres de masse 207

4.1. Equilibre céto-énolique 208

4.2. Séparation de stéréoisomères 209

4.3. Conclusion 210

5. Un possible biais d'interprétation 211

5.1. Introduction 211

5.2. Results and discussion 213

Comme cela été présenté dans le chapitre précédent, la pyrolyse systématique des vingt acides aminés constitutifs des protéines a permis de mieux appréhender les mécanismes de pyrolyse de ces briques élémentaires d'ensembles macromoléculaires. L'objectif ultime de cette étude étant d'améliorer la caractérisation des constitutants azotés d'échantillons naturels macromoléculaires par pyrolyse, l'étude du comportement pyrolytique des acides aminés libres ne représente qu'une première étape. Dans ce chapitre, nous abordons le rôle de la liaison peptidique dans la pyrolyse de dipeptides.

Par pyrolyse conventionnelle (sans agent de dérivation) d'échantillons naturels, peu de produits caractéristiques d'acides aminés sont observés même lorsque la teneur en protéines est relativement élevée, ce qui a conduit les auteurs à attribuer un rôle important à la liaison peptidique (Reeves & Francis, 1997; Reeves & Francis, 1998). Ainsi le produit dominant de la pyrolyse de l'asparagine n'est pas détecté dans la gélatine. Il a toutefois été proposé, à partir d'études de végétaux présentant des teneurs différentes en protéines, que l'utilisation de TMAH dans la pyrolyse améliore la détection des acides aminés constitutifs des protéines (Reeves & Francis, 1998). Ainsi de nombreux composés ont pu être identifiés dans les graines de soja (83 % de protéines) par pyrolyse en présence de TMAH (Reeves & Francis, 1998) et la pyrolyse de la soie révèle la présence de tyrosine, acide aminé de la fibroïne (Challinor, 1991).

Seul un nombre limité d'études a été publié sur la pyrolyse de dipeptides en dehors de celles de Gly-Gly et Ala-Ala (Hendricker & Voorhees, 1998; Voorhees *et al.*, 1997). La pyrolyse de l'aspartame (dipeptide d'acide aspartique et de phénylalanine) libère de nombreux composés caractéristiques de la phénylalanine même en l'absence de TMAH mais pas les produits dominants de la pyrolyse de l'acide aspartique (Galletti *et al.*, 1995). Il semble donc que la nature de l'acide aminé soit déterminante sur l'influence de la liaison peptidique. Ceci a été confirmé dans une étude systématique des 39 dipeptides comportant la glycine comme acide aminé C- ou N-terminal associée aux 19 autres acides aminés protéiques (Hendricker & Voorhees, 1996). Si la formation de diketopiperazines à partir de dipeptides est mentionnée depuis longtemps dans la littérature (1929), il semble également que cette dernière dépende fortement de la nature des acides aminés et qu'elle soit favorisée par l'addition de TMAH (Voorhees *et al.*, 1997).

Nous avons donc réalisé la pyrolyse en présence de TMAH de 17 dipeptides dans les mêmes conditions que celles utilisées dans le chapitre précédent. Ces dipeptides ont été sélectionnés selon plusieurs critères parmi lesquels : la plus grande diversité d'acides aminés possible, l'existence de paires symétriques du dipeptide (AA_1-AA_2 et AA_2-AA_1), la disponibilité commerciale et le prix.

L'analyse exhaustive des 20^2-20 = 380 dipeptides n'aurait pas été possible, même si ils avaient été disponibles commercialement à prix raisonnables.

Dans un premier temps, le comportement pyrolytique des dipeptides est comparé à celui du mélange des acides aminés impliqués dans le dipeptide. Puis, les résultats des pyrolyses des dipeptides sont discutés en termes de produits de pyrolyse majoritaires, sur les plans qualitatif et semi-quantitatif, ainsi qu'en termes de mécanisme de pyrolyse.

Le travail présenté dans la suite de ce document s'est focalisé sur les produits majoritaires des pyrochromatogrammes et sur les produits de pyrolyse des acides aminés déjà identifiés dans la pyrolyse des acides aminés individuels. Les produits majoritaires de la pyrolyse des acides aminés libres ont été systématiquement recherchés dans les pyrochromatogrammes des dipeptides étudiés.

1. Dipeptides vs. mélanges d'acides aminés

Il est apparu assez rapidement que l'interprétation de la pyrolyse de mélanges binaires d'acides aminés pouvait être généralisée. Par conséquent, seuls quelques mélanges ont été réalisés et pyrolysés.

1.1. Pyrolyse de mélanges binaires d'acides aminés

Parmi les différentes possibilités, les mélanges suivants ont été analysés : Val + Phe, Ala + Tyr et Ala + Trp. Ils correspondent aux premiers dipeptides pyrolysés dans le cadre de ce travail. Les produits majoritaires des pyrolyses de ces mélanges sont reportés dans les tableaux 2-1 à 2-3. Il apparaît clairement que les composés majoritaires des pyrochromatogrammes des mélanges sont également ceux des pyrochromatogrammes des acides aminés considérés individuellement. Comme l'illustre la figure 1-1, le pyrochromatogramme d'un mélange (ici, Val + Phe) résulte principalement de la superposition des deux pyrochromatogrammes des acides aminés pyrolysés individuellement.

Cependant, les mélanges Ala + Tyr et Ala + Trp (figure 1-2 et figure 1-3), indiquent que les abondances relatives des produits de pyrolyse majoritaires des deux acides du mélange peuvent varier. En effet, la participation de Val et Phe est équivalente dans les produits de pyrolyse du mélange Val + Phe, alors que les produits de pyrolyse de Tyr et Trp sont environ trois fois plus intenses que ceux de Ala dans les pyrolyses des mélanges Ala + Tyr et Ala + Trp respectivement.

Ainsi, on peut déduire de ces observations que le pyrochromatogramme de mélanges binaires d'acides aminés peut être assimilé à une superposition qualitative des deux pyrochromatogrammes des acides individuels.

Notons cependant dans le pyrochromatogramme du mélange Val + Phe, la présence de la 1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-piperazine-2,5-dione, qui est le composé majoritaire de la pyrolyse du dipeptide Val-Phe (voir paragraphe 1.2.1) ; sa formation implique l'association complexe de trois acides aminés individuels pour former une molécule sur laquelle nous reviendrons dans le paragraphe concernant la pyrolyse de Val-Phe. Toutefois, aucun autre composé découlant de la formation d'un dipeptide n'a été détecté en abondance significative pour l'ensemble des trois mélanges d'acides aminés. La formation de la liaison peptidique au cours de la

pyrolyse en présence de TMAH semble donc être un évènement secondaire. Cette interprétation semble opposée à celle proposée par Sharma (Sharma *et al.*, 2004) en pyrolyse conventionnelle, pour qui la formation de la liaison peptidique pour aboutir à des dipeptides et des polypeptides est un mécanisme très important. Il indique néanmoins que les dipeptides sont peu détectés pour des raisons de stabilité. Dans notre cas, la formation d'une liaison peptidique est nécessaire pour expliquer la formation de dipeptides et de diketopiperazines pour la pyrolyse d'acides aminés individuels et des diketopiperazines à trois acides aminés à partir de dipeptides.

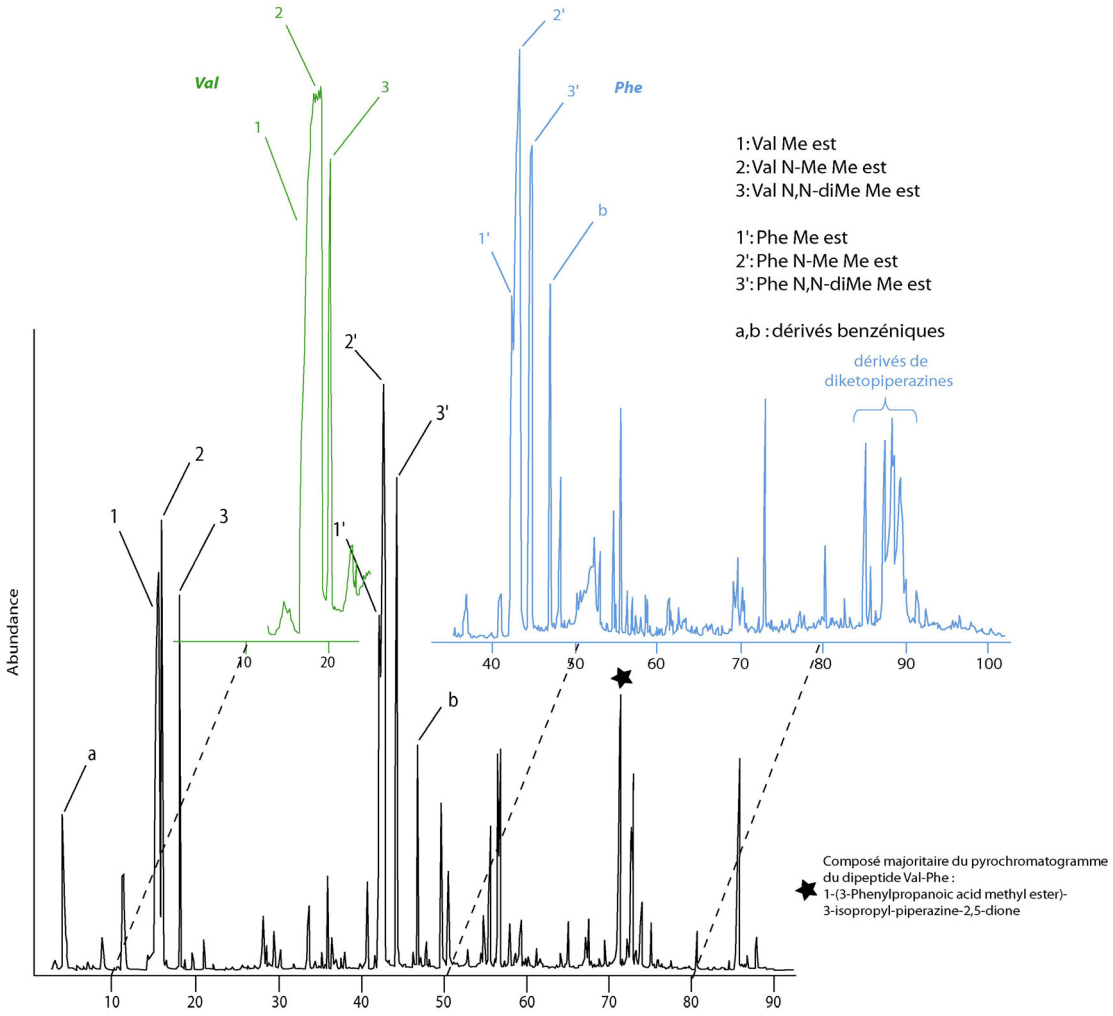


figure 1-1 : pyrochromatogramme du mélange Val+Phe en présence de TMAH, et correspondance en arrière plan avec les pyrochromatogrammes des acides aminés libres pour les temps de rétention des composés majoritaires.

Tableau 1-1 : Produits principaux de la pyrolyse en présence de TMAH du mélange équimolaire de Val et Phe

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Val	% Phe
15,5	100	72	55	88				131	Valine methyl ester	100	
42,89	96	102	134	42	91			193	N-Methylphenylalanine methyl ester		100
42,27	49	88	120	91				179	Phenylalanine methyl ester		33
16,16	49	86	102	42	55	70		145	N-Methylvaline methyl ester	100	
44,32	44	116	148	133	42	56	91	207	N,N-Dimethylphenylalanine methyl ester		42
18,3	25	100	116	44	42	85	84	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester	15	
71,23	22	162	114	131	42	163	318	318	1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-Isopropyl-piperazine-2,5-dione		
4,23	21	91	92	65				92	Toluene		46
56,4	18	42	168	157	114	211	86				
85,64	15	42	91	162	163	275	131		inconnu		2
11,36	14	104	103	78	51	77		104	Ethenylbenzene		18
46,75	10	91	182	65				182	1,2-Diphenylethane		17
40,69	6	131	103	162	77	51	161	162	3-Phenylprop-2-enoic acid, methyl ester		2
33,62	4	91	131	65	51	128	39	131	Benzenepropanenitrile		8
28,13	4	117	90	116	89	51	63	117	Benzeneacetonitrile		10
8,94	4	91	106	65	51	77		106	Ethylbenzene		5

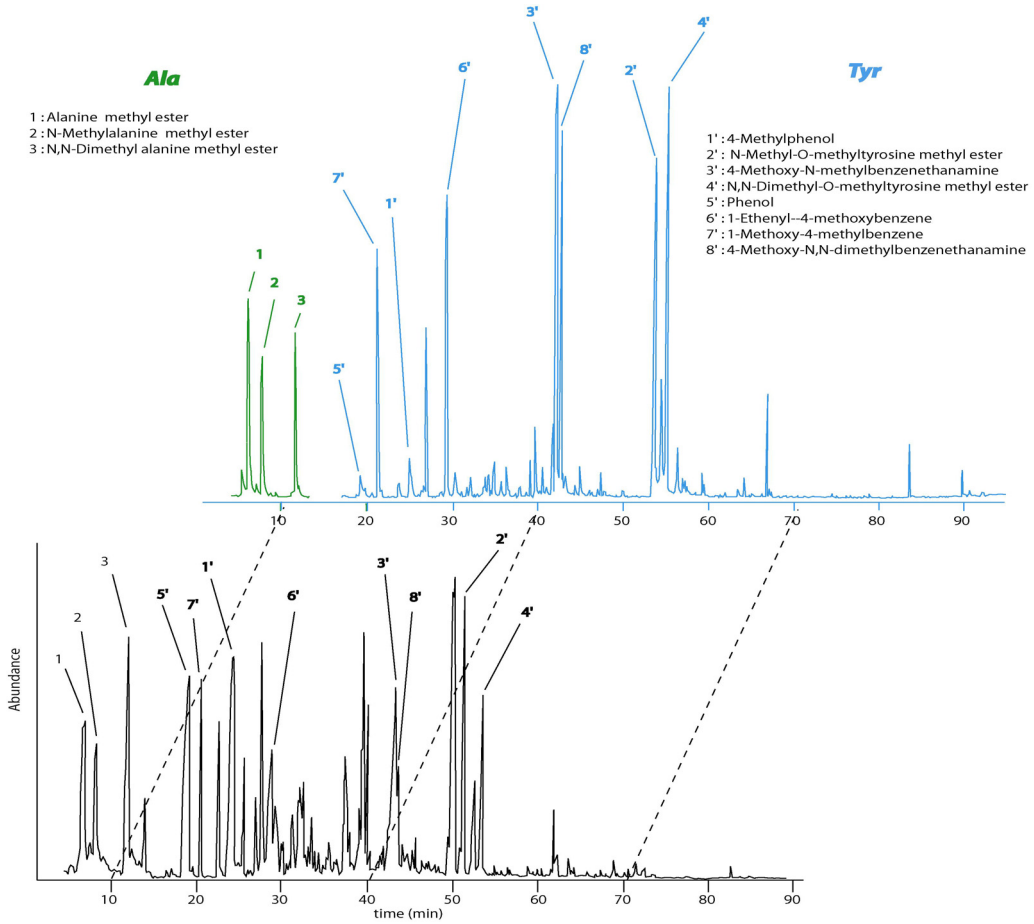


figure 1-2 : pyrochromatogramme du mélange Ala+Tyr en présence de TMAH, et correspondance en arrière plan avec les pyrochromatogrammes des acides aminés libres pour les temps de rétention des composés majoritaires.

Tableau 1-2 : Produits principaux de la pyrolyse en présence de TMAH du mélange équimolaire de Ala et Tyr

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Ala	% Tyr
25,61	100	107	108	77	79	53	80	108	4-Methylphenol		14
53,64	70	102	121	122	42			223	N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester		100
12,07	60	72	44	42	56	131		131	N,N-Dimethylalanine methyl ester	30	
42,33	58	44	122	91	77			165	4-Methoxy-N-methylbenzenethanamine		88
55,26	56	116	178	117	42	56		237	N,N-dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester		79
20,03	44	94	66	65	39	40	55	94	Phenol		7
29,31	42	107	122	121	77	79	123	122	3,4-Dimethylphenol		
29,37	42	134	119	91	65	89	135	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene		48
57,68	41	116	164	42	56	149	107	223	N,N-Dimethyltyrosine methyl ester		
7,98	38	58	42	56	117			117	N-Methylalanine methyl ester	34	
21,45	33	122	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene		57
6,39	33	44	42	88				103	Alanine methyl ester	61	
40,25	32	122	121	77	78	91	107				
30,45	29	107	122	77	39	44	91	122	2-Ethylphenol		
46,03	27	58	121	77	91	107		165	N-Methyl-4-methoxybenzenethanamine		
46,49	26	44	107	77	91	151		151	4-Methoxybenzenethanamine		
31,16	17	107	122	77	91			122	3-Ethylphenol		
42,79	17	58	42	91	120			179	N,N-Dimethyl-4-methoxybenzenethanamine		53
23,81	13	108	107	79	77	90	80	108	2-Methylphenol		4
27,01	12	121	136	77	91	65	105	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene		34
28,6	12	107	122	77	79	39	51	122	3-Ethylphenol		

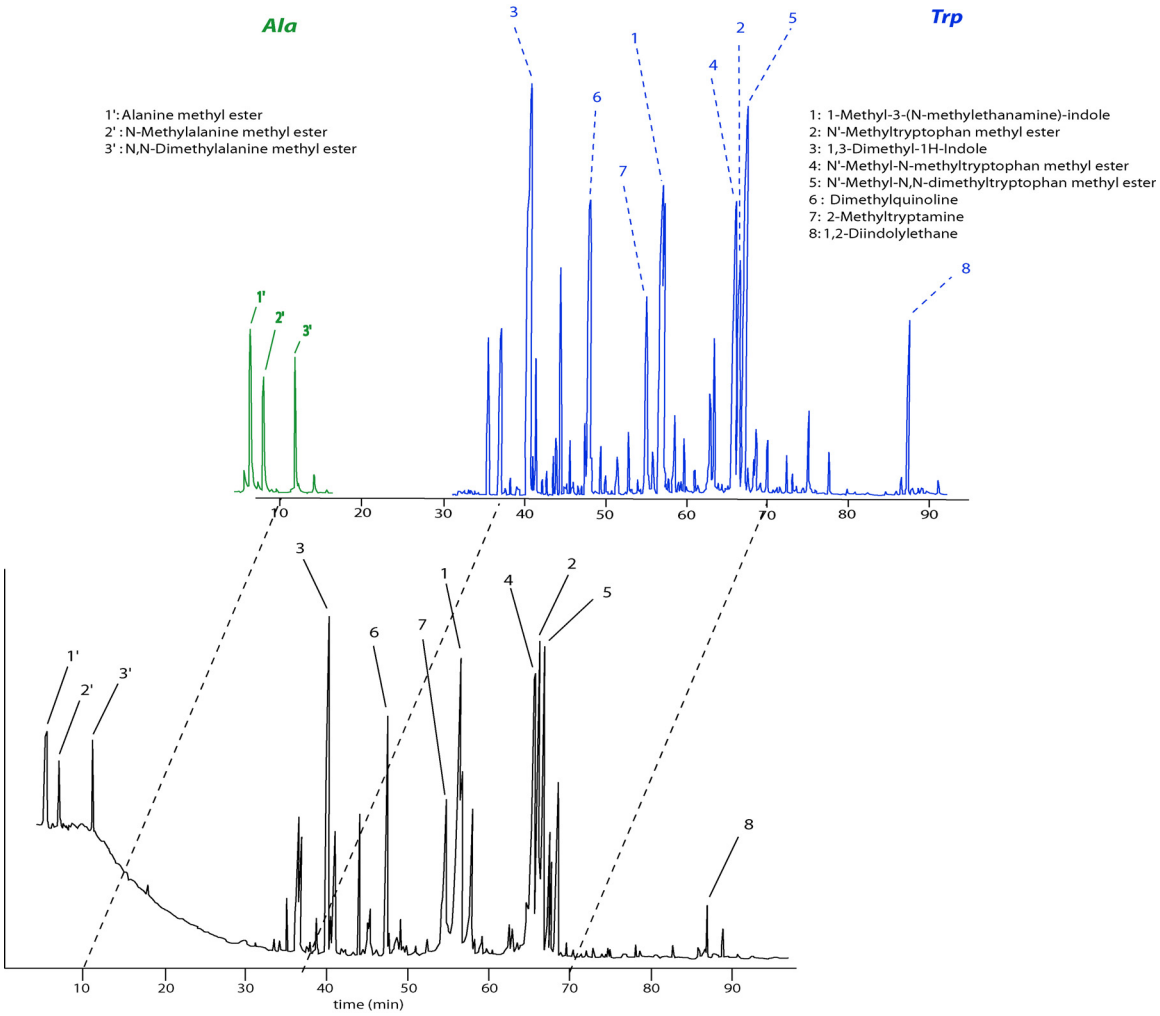


figure 1-3 : pyrochromatogramme du mélange Ala+Trp en présence de TMAH, et correspondance en arrière plan avec les pyrochromatogrammes des acides aminés libres pour les temps de rétention des composés majoritaires.

Tableau 1-3 : Produits principaux de la pyrolyse en présence de TMAH du mélange équimolaire de Ala et de Trp

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Ala	% Trp
56,44	100	**145**	144	44	188			188	1-Methyl-3-(N-methylethanamine)-indole		55
66,21	89	**144**	145	143	232	77		232	N'-Methyltryptophan methyl ester		33
40,15	89	**144**	145	77	128	143	115	145	1,3-Dimethyl-1H-Indole		100
65,55	89	**144**	145	246	102	77		246	N'-Methyl-N-methyltryptophan methyl ester		53
66,78	82	**144**	116	145	260	201		260	N'-Methyl-N,N-dimethyltryptophan methyl ester		85
47,51	49	**157**	156	115	128	142	78	157	Dimethylquinoline		54
54,71	42	**144**	145	174	77	115		174	2-Methyltryptamine		21
41,02	34	**130**	131	77	103	51		131	3-Methyl-1H-Indole		10
57,91	30	**44**	131	130	77	132	103	174	3-(alpha-Methylethanamine)-1H-Indole		
68,53	29	**116**	130	187	42	246	93	246	N,N-dimethyltryptophan methyl ester		5
11,13	27	**72**	44	42	56	131		131	N,N-Dimethylalanine methyl ester	30	
5,42	20	**44**	42							8	
44	14	**144**	159	143	145	115	77	159	5,6,7-Trimethyl-1H-indole		16
6,96	13	**58**	56	42	117			117	N,N-Dimethylglycine methyl ester		
56,56	12	**58**	169	144	170	115	202	202	1-Methyl-3-(N,N-dimethylethanamine)-indole		28
36,45	10	**117**	90	89	58	63	118	117	1H-Indole		20
35,1	6	**131**	130	89	77	65	103	131	1-Methyl-1H-indole		10
86,98	6	**144**	288	145	143			288	1,2-Diindolylethane		14

1.2. Pyrolyse des dipeptides correspondants

Dans ce paragraphe, seuls les pyrochromatogrammes des dipeptides correspondants aux mélanges abordés précédemment sont décrits : Val-Phe, Ala-Tyr, Ala-Trp, afin de comparer la pyrolyse des acides aminés engagés dans une liaison peptidique par rapport à des acides aminés libres.

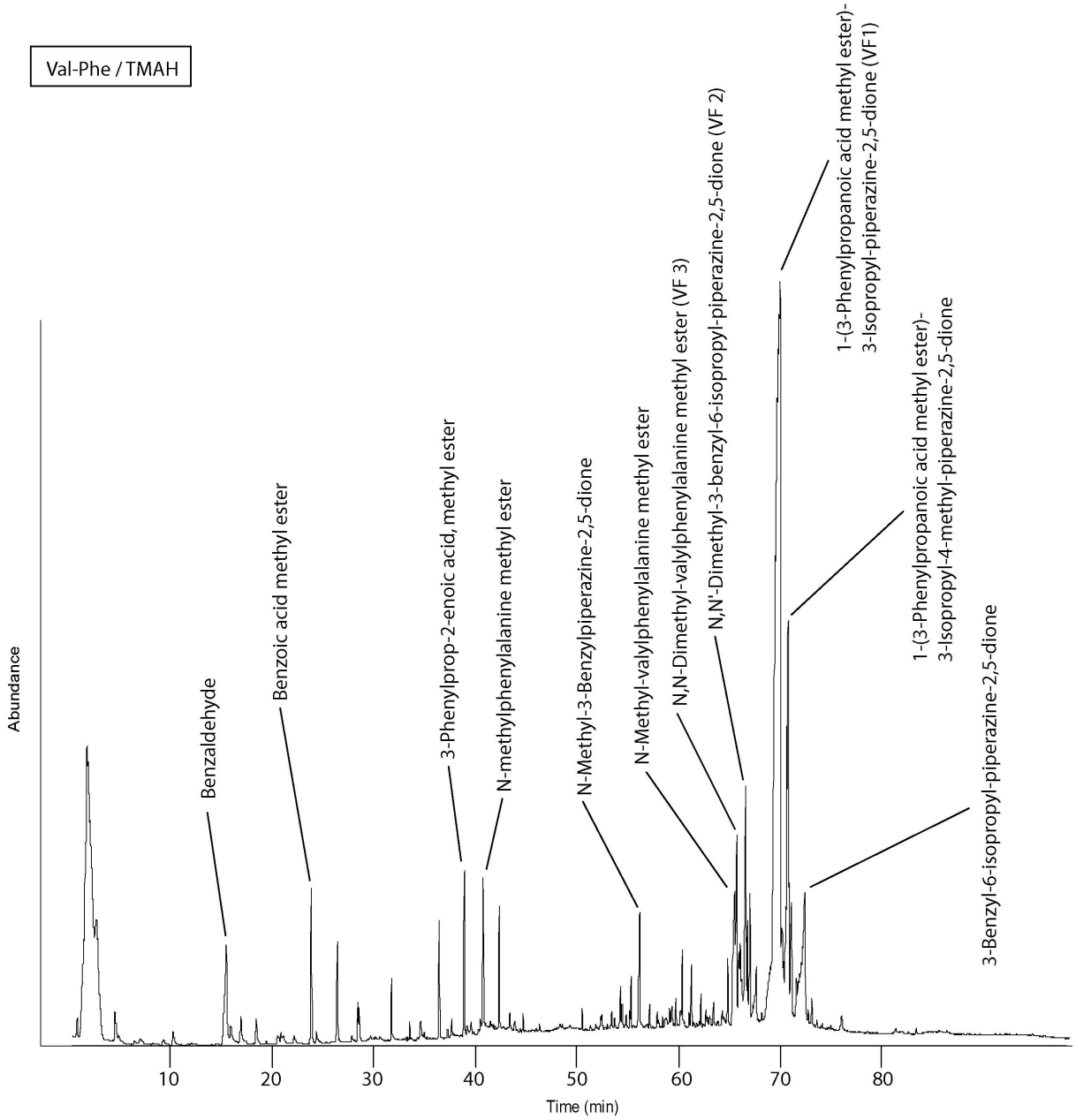


figure 1-4 : pyrochromatogramme de Val-Phe en présence de TMAH

tableau 1-4 : Produits principaux de la pyrolyse de Val-Phe en présence de TMAH

tr (min)	A. R. S	m/z						Masse molaire (g/mol)	composés	% Val	% Phe
70,1	100	**162**	114	131	163	161	104	318 *	1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 1)		
70,9	22	**155**	305	183	42	72	113	332 *	1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-4-methyl-piperazine-2,5-dione		
15,6	10	**105**	106	77	51			106	Benzaldehyde		
72,6	9	**91**	127	246	162	72		246	3-Benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione		
66,8	9	**155**	183	113	86	42		274	N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 2 = FV 2)		
65,7	8	**86**	87	71	55	189		292 *	N-Methyl-valylphenylalanine methyl ester		
65,9	5	**86**	100	55	71	189		306 *	N,N-Dimethyl-valylphenylalanine methyl ester (VF3)		
24	5	**105**	77	136	51			136	Benzoic acid methyl ester		
40,9	5	**102**	134	91	77			193 *	N-Methylphenylalanine methyl ester		100
56,3	4	**127**	91	42	218			218 *	N-Methyl-3-benzylpiperazine-2,5-dione		
39,1	4	**131**	103	162	161	77		162 *	3-Phenylprop-2-enoic acid, methyl ester		2

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

1.2.1. Pyrolyse de Val-Phe

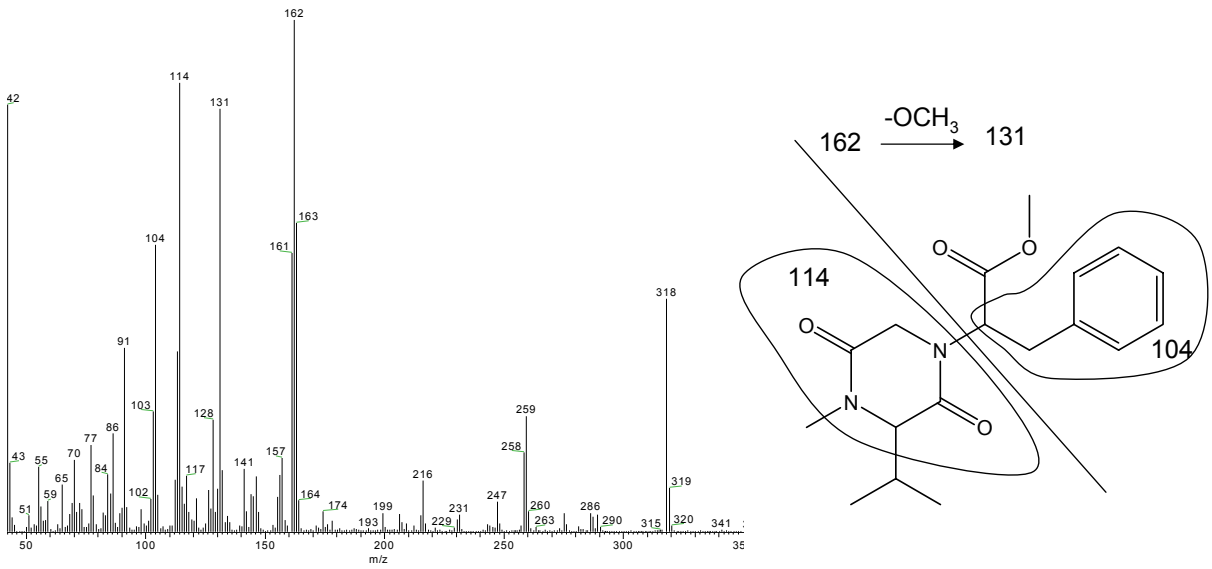
Le pyrochromatogramme du dipeptide diffère fondamentalement de celui des acides aminés individuels (figure 1-4 et Tableau 1-1).

La pyrolyse de Val-Phe en présence de TMAH (figure 1-4) produit principalement la 1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 1) et son homologue méthylé la 1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-4-methyl-piperazine-2,5-dione. Il s'agit de diketopiperazines constituées à partir de trois acides aminés, dont la formation diffère de celles décrites dans ce document jusque-là, et dont les mécanismes possibles seront discutés plus loin dans ce chapitre (paragraphe 3.2).

La pyrolyse de Val-Phe en présence de TMAH produit également des dérivés de la phénylalanine. Le benzaldéhyde, bien que non détecté dans la pyrolyse de la phénylalanine, apparaît clairement comme dérivant de cet acide aminé, de même que l'ester methylique de l'acid 3-phenylprop-2-enoïque. Seuls quelques dérivés directs de la phénylalanine ont été détectés parmi les produits de pyrolyse du dipeptide Val-Phe, et en très faible abondance relative. Il s'agit notamment du N-methylphenylalanine methyl ester (qui était le produit majoritaire de la pyrolyse de la phenylalanine).

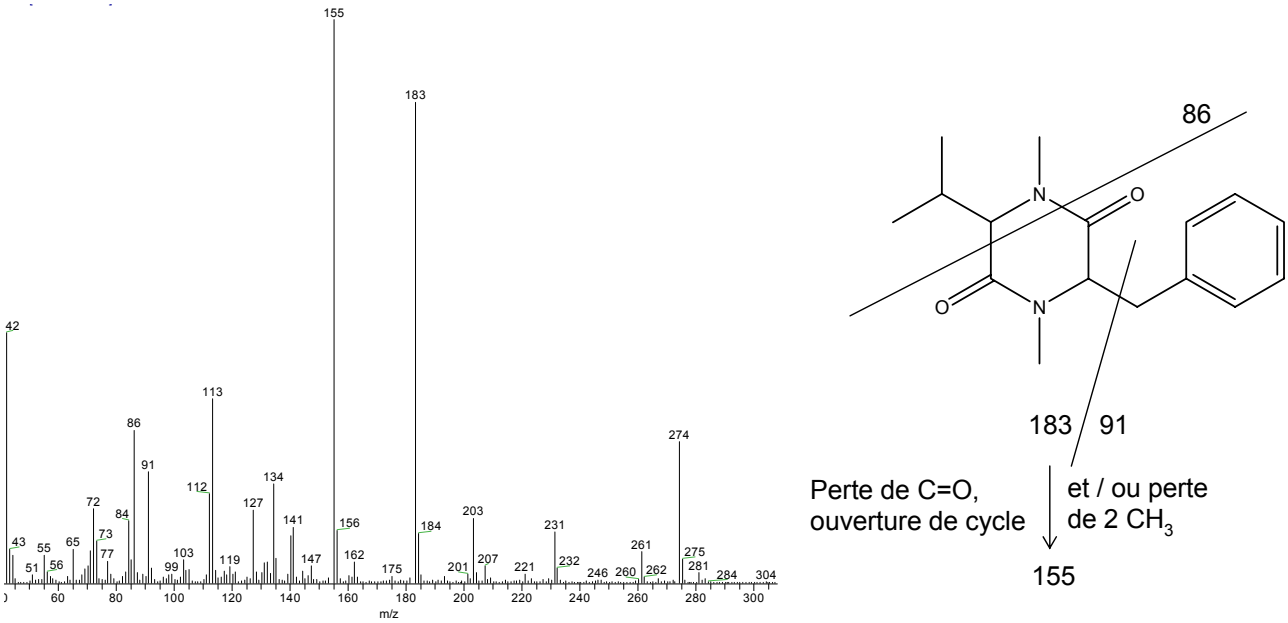
Enfin, des dérivés du dipeptide ont été détectés parmi les produits de pyrolyse en plus faible abondance relative. Il s'agit de diketopiperazines (« classiques ») résultant de la cyclisation du dipeptide et présentant différents degrés de méthylation, comme la N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 2) ainsi qu'une diketopiperazine résultant de l'élimination d'une chaîne latérale benzyle ou isopropyle (N-Methyl-3-benzylpiperazine-2,5-dione). Notons également la présence de plusieurs dérivés méthylés du dipeptide tels que le N,N-Dimethyl-valylphenylalanine methyl ester (VF 3). L'abondance relative cumulée des des diketopiperazines « classiques » additionnée à celle des dérivés méthylés du dipeptide représente 33 % de l'abondance relative cumulée des diketopiperazines formées de trois acides aminés.

Aucun des produits de pyrolyse importants de la valine n'a été détecté parmi ceux du dipeptide.



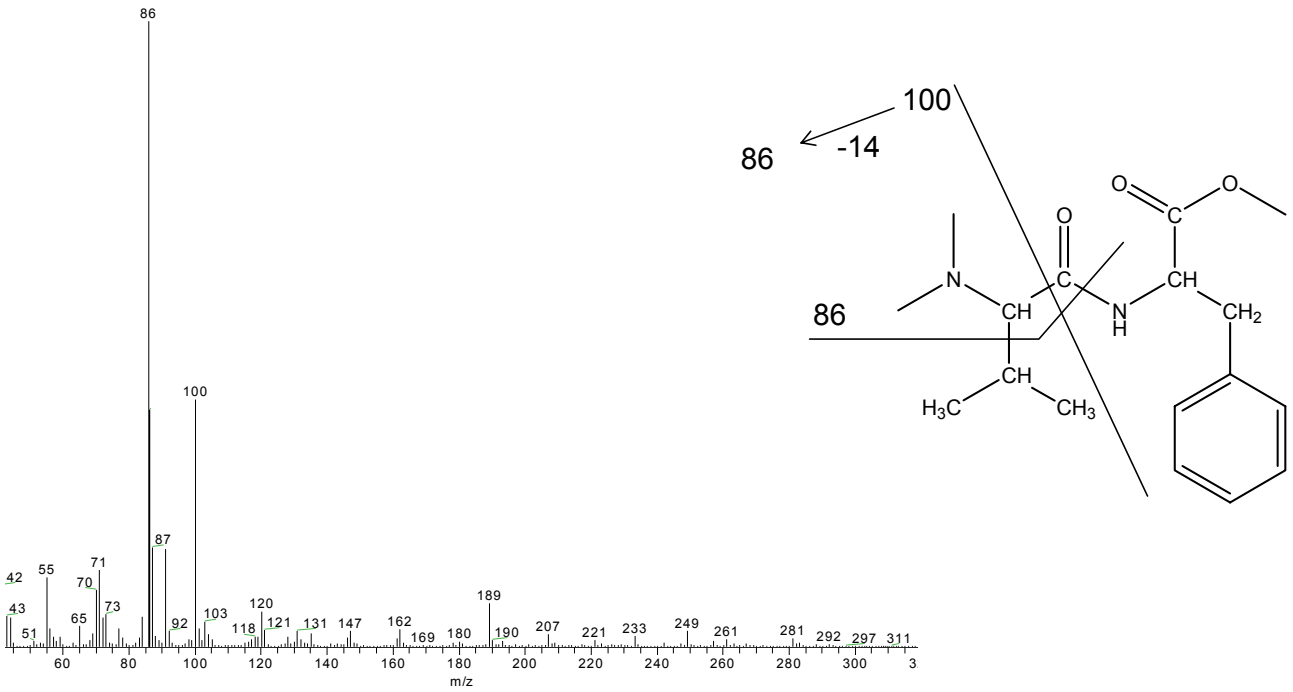
1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-Isopropyl-4-methyl-piperazine-2,5-dione (VF 1)

figure 1-5 : spectre de masse et structure de VF 1



N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF2)

figure 1-6 : spectre de masse et structure de VF 2



N,N-Dimethyl-valylphenylalanine methyl ester (VF3)

figure 1-7 : spectre de masse et structure de VF 3

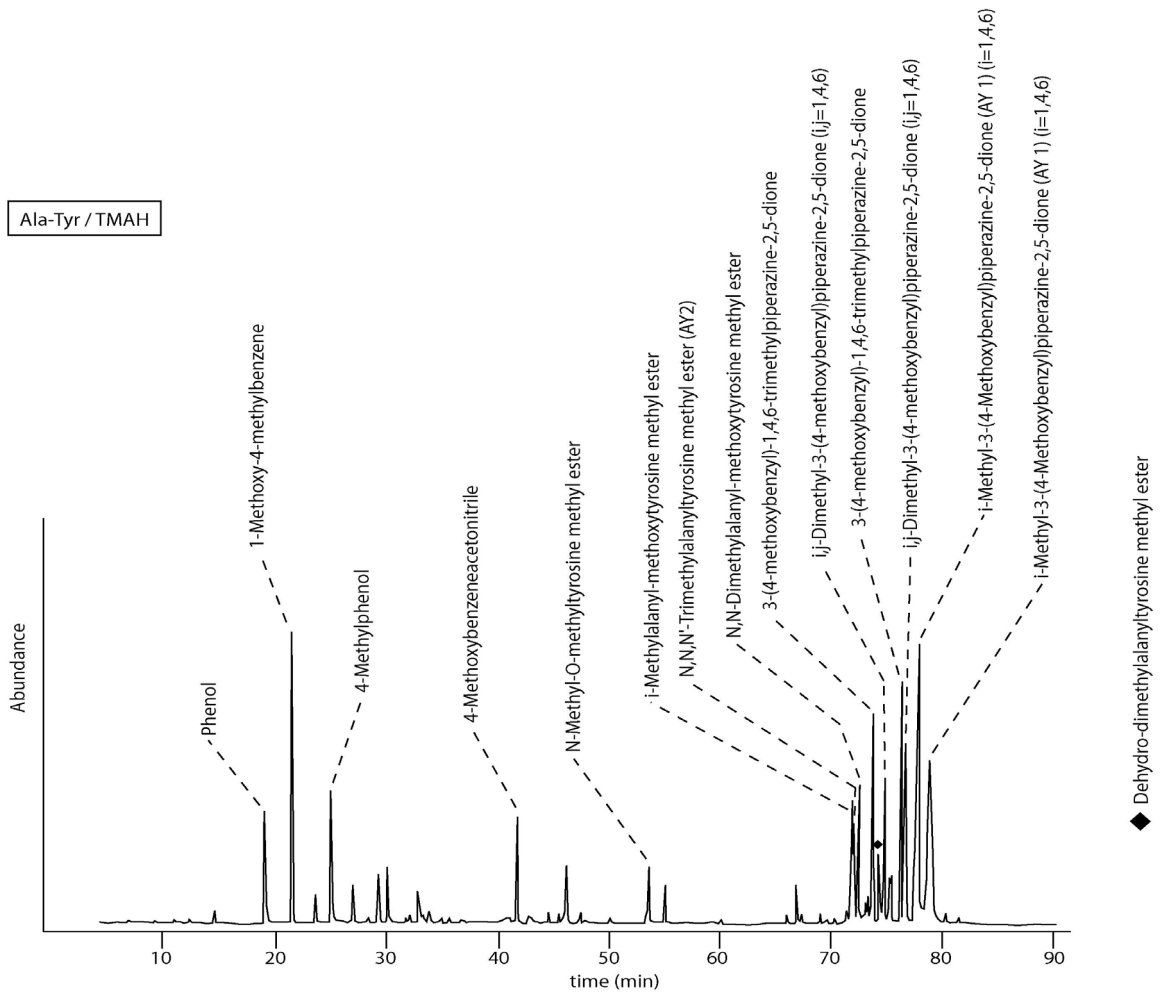


figure 1-8 : pyrochromatogramme de Ala-Tyr en présence de TMAH

tableau 1-5: Produits principaux de la pyrolyse de Ala-Tyr en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Ala	% Tyr
77,80	100	**121**	122	77	91	44	78	248	i-Methyl-3-(4-Methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (AY 1) (i=1,4,6)		
78,90	92	**121**	122	77	44	91	78	248	i-Methyl-3-(4-Methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (AY 1) (i=1,4,6)		
76,35	43	**121**	42	58	122	276	91	276	3-(4-methoxybenzyl)-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione		
21,51	42	**122**	121	77	107	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene		57
76,78	39	**121**	122	77	91	42	78	262	i,j-Dimethyl-3-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (i,j=1,4,6)		
74,89	37	**121**	122	42	44	77	91	262	i,j-Dimethyl-3-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (i,j=1,4,6)		
73,89	37	**121**	42	122	58			276	3-(4-methoxybenzyl)-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione		
25,01	35	**107**	108	77	79	39	53	108	4-Methylphenol		
19,09	28	**94**	66	39	65	55	95	94	Phenol		7
72,22	21	**72**	73	44	121	164	42	308	N,N,N'-Trimethylalanyltyrosine methyl ester (AY 2)		
72,03	19	**58**	121	59	56			294	i-Methylalanyl-methoxytyrosine methyl ester		
72,53	17	**72**	121	73	44	42		308	N,N-Dimethylalanyl-methoxytyrosine methyl ester		
71,91	15	**58**	121	192	44	56		294	i-Methylalanyl-methoxytyrosine methyl ester		
41,74	14	**147**	77	146	132	107	116	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile		12
53,61	14	**102**	121	122	42	164	161	223	N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester		100
74,42	12	**192**	121	56	161	57	193	292	Dehydro-dimethylalanyltyrosine methyl ester		
30,15	10	**107**	122	77	39	51	53	122	2-Ethylphenol		2
29,41	6	**134**	119	91	65	39	63	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene		48
23,64	5	**108**	107	79	77	90	80	108	2-Methylphenol		4
78,46	5	**121**	192	161	77	44	91	306	Dehydro-trimethylalanyltyrosine methyl ester		
27,11	5	**121**	136	77	91	122	65	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene		34
67,04	5	**121**	242	122	77	78		242	1,2-Di-(paramethoxyphenyl)ethane		11
55,10	4	**116**	178	121	42	56	117	237	N,N-dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester		79
29,13	4	**107**	122	121	77	91	39		2,4-Dimethylbenzene		
32,94	3	**42**	127	142	57	56	70	142	1,3,5-Trimethylimidazolidine-2,4-dione		
14,57	3	**108**	78	65	39	51	93	108	Methoxybenzene		8

1.2.2. Pyrolyse de Ala-Tyr

Le pyrochromatogramme de Ala-Tyr (figure 1-8) est dominé par des pics intenses en fin de chromatogramme, de 70 à 80 minutes. Entre 73 et 80 minutes, il s'agit de dérivés de la diketopiperazine résultant de la cyclisation du dipeptide Ala-Tyr. Cette diketopiperazine est présente à des degrés de méthylation plus ou moins élevés. L'abondance relative cumulée de ces diketopiperazines s'élève à 350 % du pic majoritaire. Le dérivé majoritaire, élué à 77,80 minutes, étant identifié comme une diketopiperazine méthoxylée : la i-Methyl-3-(4-Methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (AY 1) (i=1,4,6). Le pic de base en spectrométrie de masse à m/z : 121, très fréquent dans le tableau, est caractéristique de la tyrosine et correspond au fragment méthoxyméthylbenzène. De plus les temps de rétention très élevés sont en accord avec une masse moléculaire élevée. La position du méthyle n'est pas déterminée avec certitude, le spectre de masse ne permettant pas une telle information. Cependant, étant donnée la structure de l'alanine, l'hypothèse la plus probable est la position 6, qui conserve la structure initiale, ce qui est suggéré par la présence de la diketopiperazine Ala-Tyr totalement méthylée (la 3-(4-methoxybenzyl)-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione).

Remarquons dans le tableau 1-5, que certaines diketopiperazines apparaissent plus d'une fois, à des temps de rétention différents et avec des abondances relatives différentes. C'est ici le cas notamment de la 3-(4-methoxybenzyl)-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione. Ce cas de duplicité voire de multiplicité a été observé dans d'autres pyrochromatogrammes. Or, a priori, un spectre de masse est spécifique d'une molécule, qui ne peut éluer qu'à un seul temps de rétention. Ces observations seront discutées plus en détails à la fin de ce chapitre (partie 4).

Outre les diketopiperazines, des dérivés directs du dipeptide, méthylés trois à quatre fois (comme AY2), ont également été détectés, à des temps de rétention un peu plus courts (70 à 75 minutes). Cependant ces dérivés directs du dipeptide sont moins abondants que les diketopiperazines : leur abondance relative cumulée représente 72 % du pic majoritaire, soit 20 % de l'abondance relative cumulée des diketopiperazines.

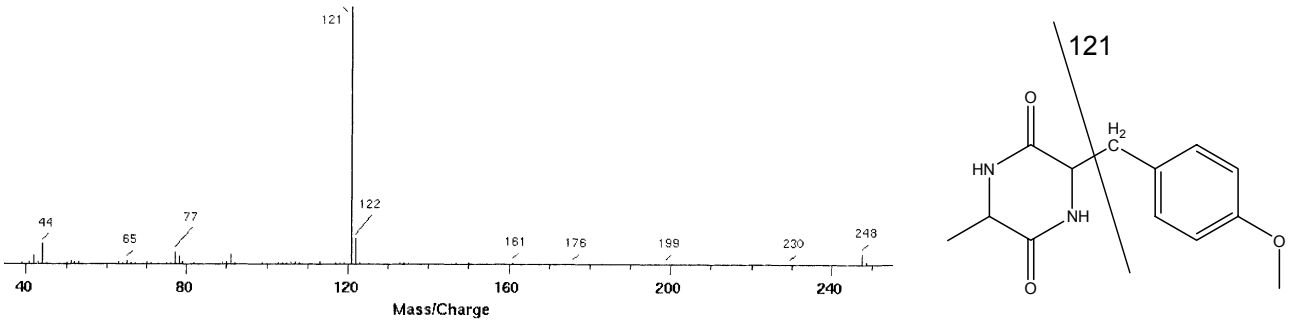
L'ensemble des dérivés de la tyrosine est plus abondant que celui des dérivés directs du dipeptide, puisque la somme de leur abondance relative atteint 165 % du pic majoritaire (soit 50 % des diketopiperazines). Cependant les dérivés de la tyrosine restent beaucoup plus faibles que dans la pyrolyse de l'acide aminé individuel. Le 1-Methoxy-4-methylbenzene, produit caractéristique de la tyrosine reste toutefois en proportion importante. D'autres composés liés à la pyrolyse de la

tyrosine sont également identifiés, tels que le 4-Methoxybenzeneacetonitrile, le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, le 1-Ethyl-4-methoxybenzene, et le 1,2-Di-(paramethoxyphenyl)ethane (tableau 1-5).

Deux dérivés directs de la tyrosine ont également été détectés vers 53-55 minutes. Il s'agit du N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester et du N,N-Dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester. Leur abondance relative a fortement diminué, puisque ces composés dominaient le pyrolysat de la tyrosine.

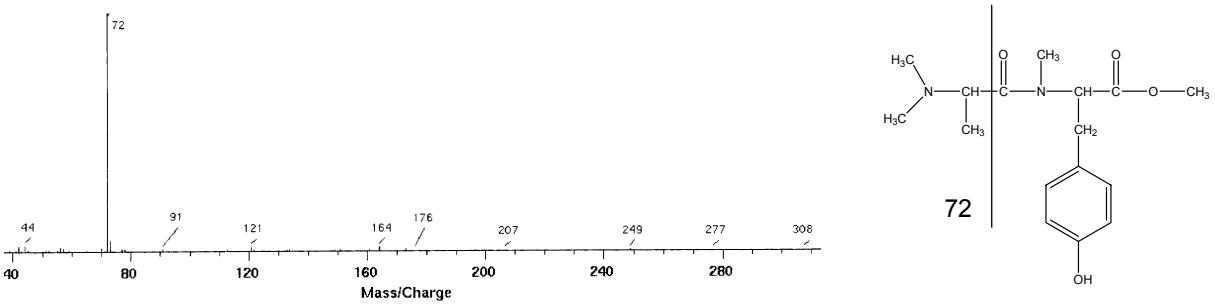
De façon globale, les proportions relatives des composés présents dans le pyrochromatogramme de Tyr et également détectés dans celui de Ala-Tyr varient. Le composé majoritaire de la pyrolyse de Tyr (le N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester) est moins abondant que le phénol dans les produits de pyrolyse de Ala-Tyr.

Enfin, de façon comparable à Val-Phe, aucun dérivé de l'alanine, c'est-à-dire de l'acide aminé aliphatique, n'est détecté.



i-Methyl-3-(4-Methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (AY 1) (i=1,4,6) (tr: 77,80 min)

figure 1-9 : spectre de masse et structure de AY 1



N,N,N'-Trimethylalanyltyrosine methyl ester (AY 2)

figure 1-10 : spectre de masse et structure de AY 2

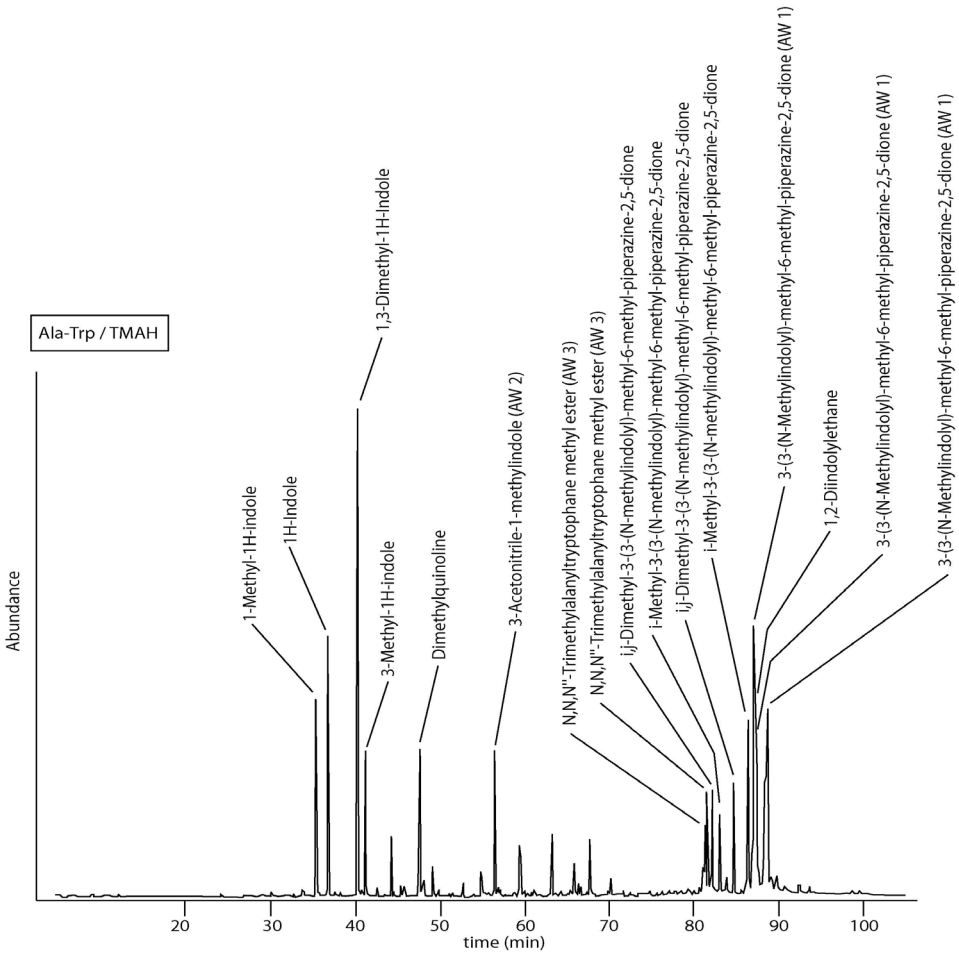


figure 1-11 : pyrochromatogramme de Ala-Trp en présence de TMAH

tableau 1-6 : Produits principaux de la pyrolyse de Ala-Trp en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Ala	% Trp
87,24	100	**144**	145	143	77	115	271	271	3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1)		
40,37	75	**144**	145	77	143	128	115	145	1,3-Dimethyl-1H-Indole		100
88,85	61	**144**	145	143	77	271	115	271	3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1)		
87,45	38	**144**	145	77	288	115	44	288	1,2-Diindolylethane		14
86,46	33	**144**	145	77	42	285	128	285	i-Methyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione		
36,87	25	**117**	90	89	58	63	118	117	1H-Indole		20
56,55	15	**169**	170	144	85	115	128	170	3-Acetonitrile-1-methylindole (AW 2)		
35,47	14	**131**	130	77	89	103	65	131	1-Methyl-1H-indole		10
87,64	11	**144**	145	143	77	115	271	271	3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1)		
82,20	11	**144**	145	143	42	77	299	299	i,j-Dimethyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione		
47,66	10	**157**	156	115	142	78	128	157	Dimethylquinoline		54
41,24	10	**130**	131	77	65	51	103	131	3-Methyl-1H-indole		10
84,81	10	**144**	145	143	42	77	299	299	i,j-Dimethyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione		
81,73	9	**72**	144	73	44	42	215	331	N,N,N''-Trimethylalanyltryptophane methyl ester (AW 3)		
83,19	9	**144**	145	143	77	42	285	285	i-Methyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione		
81,42	9	**72**	144	73	44	42	215	331	N,N,N''-Trimethylalanyltryptophane methyl ester (AW 3)		
63,25	5	**182**	181	91	127	183	140	182	1-Methyl-9H-Pyrido[3,4-b]indole (AW 4)		15
44,31	4	**144**	159	143	115	72	77	159	5,6,7-Trimethyl-1H-indole		16
54,85	3	**144**	145	174	143	77	138	174	2-Methyltryptamine		21
65,85	3	**144**	145	143	77	232		232	N'-Methyltryptophan methyl ester		33
49,11	2	**143**	115	142	116	58	89	143	3-Methylquinoline		2
47,44	2	**158**	159	144	44	143	79	159	1,2,3-Trimethyl-1H-Indole		4
42,60	1	**144**	145	115	72	77	143	145	Dimethylindole		
65,51	1	**144**	145	142	77			246	N'-Methyl-N-methyltryptophan methyl ester		53
66,69	1	**144**	116	145	42	100	260	260	N'-Methyl-N,N-dimethyltryptophan methyl ester		85

1.2.3. Pyrolyse de Ala-Trp

Les produits majoritaires de la pyrolyse de Ala-Trp se divisent en deux classes : les dérivés de la diketopiperazine de Ala-Trp et ceux du noyau indole (tableau 1-6). Les dérivés de la diketopiperazine de Ala-Trp ont été détectés en forte proportion en fin de pyrochromatogramme (entre 80 et 90 minutes) (figure 1-11) alors que les dérivés indoles éluent entre 35 et 45 minutes.

Les diketopiperazines sont les produits de pyrolyse les plus abondants, ce sont les dérivés plus ou moins méthylés de la diketopiperazine de Ala-Trp : la 3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1) est le produit majoritaire. Sont également détectés en forte abondance les produits homologues : i-Methyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione, i,j-Dimethyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione. Comme dans le cas de Ala-Tyr, ces diketopiperazines sont détectées à plusieurs temps de rétention nettement différents.

Parmi les dérivés indoliques, le 1,3-Dimethyl-1H-Indole, le 1,2-Diindolylethane, le 1H-Indole, 1-Methyl-1H-indole, 3-Methyl-1H-indole, ainsi que le Dimethylindole, le 5,6,7-Trimethyl-1H-indole et le 1,2,3-Trimethyl-1H-Indole sont identifiés. Ils sont formés par homolyse de la chaîne latérale de l'acide aminé tryptophane.

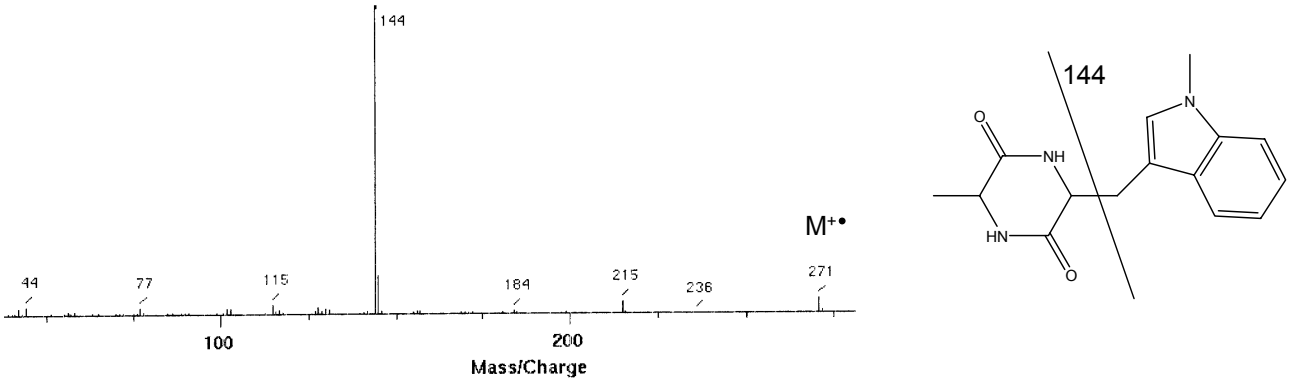
Bien que le produit de pyrolyse majoritaire du tryptophane, le 1,3-Dimethyl-1H-Indole, soit également très abondant dans le pyrochromatogramme du dipeptide, la proportion des produits de pyrolyse du tryptophane n'est pas reproduite dans la pyrolyse du dipeptide. Ainsi, les dérivés méthylés du tryptophane, qui représentent les produits majoritaires dans la pyrolyse de l'acide aminé individuel ne sont présents qu'à l'état de traces dans la pyrolyse du dipeptide (tableau 1-6). Notons que les proportions relatives se sont inversées entre l'acide aminé individuel et le dipeptide : le dérivé totalement méthylé, le N'-Methyl-N,N-dimethyltryptophane methyl ester, qui est le plus important dans l'acide aminé, devient le dérivé méthylé direct le moins intense détecté parmi les produits de pyrolyse de Ala-Trp. L'abondance de la dimethylquinoline diminue également fortement de l'acide aminé seul au dipeptide : elle passe de 54 % à 10 %.

Dans ce pyrochromatogramme, un nitrile a été identifié : le 3-Acetonitrile-1-methylindole (AW 2). Il résulte d'un mécanisme de rupture de la liaison peptidique du dipeptide suivi d'une décarboxylation de la partie tryptophane.

Les dérivés méthylés du dipeptide (comme AW 3) sont présents en faible proportion relativement aux produits de cyclisation, ils sont du même ordre de grandeur que pour Val-Phe et nettement moins abondants que dans Ala-Trp.

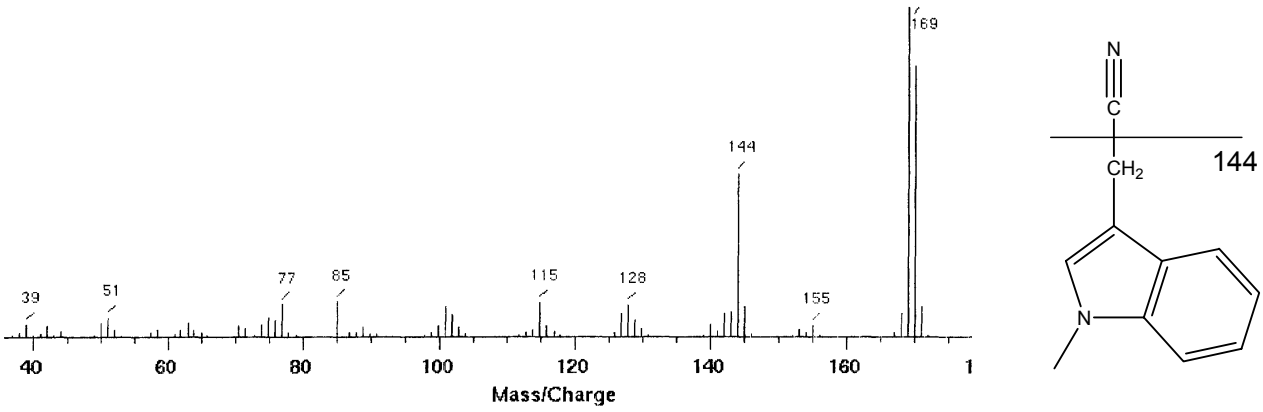
La formation du 1-Methyl-9H-Pyrido[3,4-b]indole (AW 4) n'est pas facile à expliquer mais repose certainement sur un mécanisme de cyclisation ayant lieu après la rupture de la liaison peptidique et décarboxylation de l'acide terminal.

Enfin, de même que dans les cas précédents, aucun produit de pyrolyse important de l'alanine n'a été détecté dans la pyrolyse de Ala-Trp.



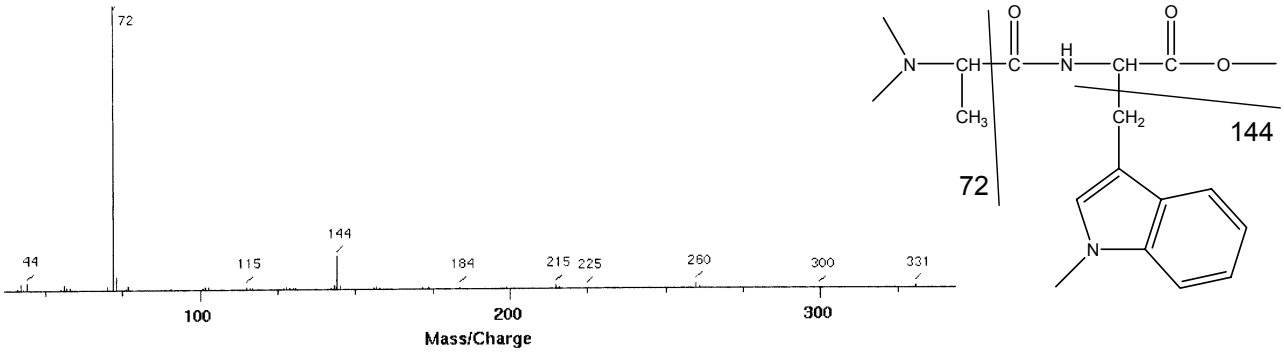
3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1) (tr: 87,24 min)

figure 1-12 : spectre de masse et structure de AW 1



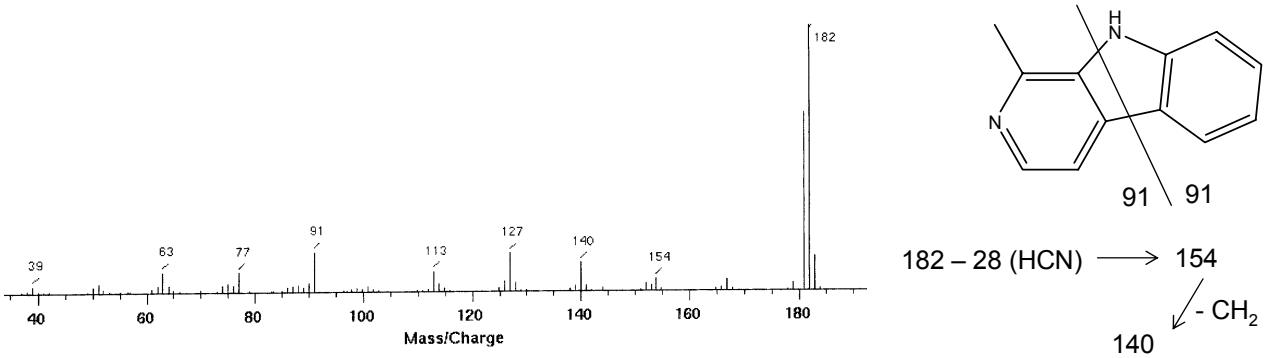
3-Acetonitrile-1-methylindole (AW 2)

figure 1-13 : spectre de masse et structure de AW 2



N,N,N''-Trimethylalanyltryptophane methyl ester (AW 3) (tr: 81,73 min)

figure 1-14 : spectre de masse et structure de AW 3



1-Methyl-9H-Pyrido[3,4-b]indole (AW 4)

figure 1-15 : spectre de masse et structure de AW 4

1.3. Comparaison des pyrolyses de dipeptides et des mélanges

La première conclusion qui s'impose à l'examen des données exposées dans les paragraphes précédents est que la liaison peptidique joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de pyrolyse des acides aminés. Lorsque ceux-ci sont engagés dans un dipeptide, le comportement pyrolytique des deux acides aminés se trouve fondamentalement modifié. Les produits majoritaires de la pyrolyse du peptide sont différents de ceux de la pyrolyse des acides aminés individuels, contrairement aux mélanges d'acides aminés. Dans les conditions de pyrolyse utilisées, la rupture de la liaison peptidique suivie de la méthylation des acides aminés à nouveau individualisés, ne représente qu'un mécanisme marginal.

Ainsi, il apparaît un grand nombre de composés aux temps de rétention élévés, après 60 minutes. Ces composés sont identifiés comme des dérivés du dipeptide, ou de sa cyclisation en diketopiperazines. En l'absence de coupure de la liaison peptidique, la formation des diketopiperazines est naturellement favorisée à partir des dipeptides par rapport aux acides aminés libres.

Pour les trois dipeptides Val-Phe, Ala-Tyr et Ala-Trp, on remarque que la chaîne latérale aromatique des diketopiperazines classiques est systématiquement conservée, ce qui n'est pas toujours le cas pour la chaîne aliphatique.

Par ailleurs, les échantillons pyrolysés contenaient un acide à chaîne latérale aliphatique et un acide à chaîne latérale aromatique. Nous pouvons constater à partir de ces échantillons que la chaîne latérale aromatique produit un grand nombre de composés observés dans les pyrochromatogrammes des dipeptides. Il est fort probable que l'aromaticité procure à la fois une meilleure stabilité lors de la pyrolyse, et une meilleure détection par spectrométrie de masse. Ceci se traduit par la présence des composés aromatiques en forte abondance dans le pyrochromatogramme. Très peu de produits issus des chaînes latérales des acides aminés aliphatiques sont détectés du fait de leur faible masse moléculaire. L'étude d'autres dipeptides doit permettre de confirmer ou d'infirmer cette tendance.

Cette comparaison –dipeptide / mélange / acides aminés-, souligne bien les conséquences de l'implication des acides aminés dans la liaison peptidique sur leur comportement pyrolytique.

2. La pyrolyse de dipeptides

L'étude de la pyrolyse de quelques dipeptides par rapport à celle des mélanges d'acides aminés correspondants a révélé le changement de comportement pyrolytique des acides aminés, une fois engagés dans une liaison peptidique, et notamment la faible détection des dérivés d'acides aminés individuels.

La comparaison de la pyrolyse de dipeptides avec celle de mélanges a donc soulevé plusieurs questions concernant les mécanismes de pyrolyse. De façon plus générale, les composés majoritaires de la pyrolyse d'un acide aminé individuel sont-ils présents parmi les produits de pyrolyse de dipeptides dans lesquels il est impliqué ? Si oui, en quelle quantité ? La nature de l'acide aminé joue-t-elle un rôle ? Les proportions des produits de pyrolyse de l'acide aminé individuel sont-elles conservées ? Peut-on observer une tendance générale dans le comportement pyrolytique des dipeptides?

Dans les paragraphes suivants, le rôle de la liaison peptidique est discuté plus en détails, sur une gamme de dipeptides plus large.

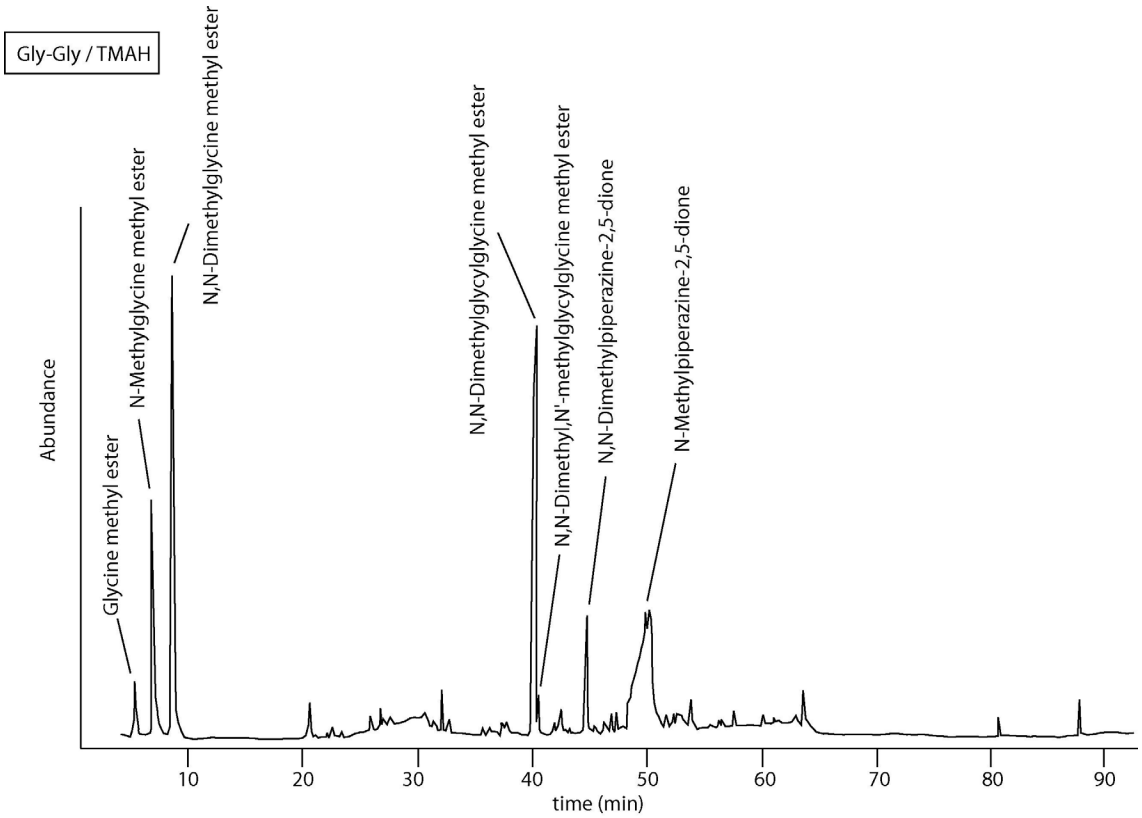


figure 2-1 : pyrochromatogramme de Gly-Gly en présence de TMAH

tableau 2-1 : Produits principaux de la pyrolyse de Gly-Gly en présence de TMAH

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Gly
50,36	100	**128**	42	71	43	44		128	N-Methylpiperazine-2,5-dione	20
40,23	80	**58**	42	115	174			174	N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester	33
8,75	65	**58**	117	42				117	N,N-Dimethylglycine methyl ester	40
6,95	28	**44**	103	42				103	N-Methylglycine methyl ester	24
44,77	14	**142**	42	43	44	57	85	142	N,N'-Dimethylpiperazine-2,5-dione	11
5,44	8	**89**	42	90				89	Glycine methyl ester	28
40,48	2	**58**	42	188	116			188	N,N-Dimethyl,N'-methylglycylglycine methyl ester	

2.1. Dipeptides aliphatiques

2.1.1. Pyrolyse de Gly-Gly en présence de TMAH

Le pyrochromatogramme de Gly-Gly (figure 2-1) paraît beaucoup moins complexe que la majorité des pyrochromatogrammes présentés jusqu'alors dans ce manuscrit. Celui-ci est dominé par un pic non résolu autour de 50 min, dont le spectre de masse a été attribué à une diketopiperazine : la N-Methylpiperazine-2,5-dione. Son équivalent mono-méthylé a été détecté à 44,77 min, en faible abondance. Ces produits étaient présents dans le pyrochromatogramme de la glycine avec des abondances plus faibles.

D'autre part, le dérivé méthylé du dipeptide (N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester) représente également un produit majeur de la pyrolyse de Gly-Gly en présence de TMAH. Il contribuait déjà de manière significative au pyrolysat de la glycine.

Enfin, les trois dérivés directs de méthylation de la glycine sont présents dans le pyrochromatogramme de Gly-Gly. Le dérivé entièrement méthylé constitue le signal le plus intense, suivi de la N-Methylglycine methyl ester et de la glycine methyl ester. La proportion de ces produits de pyrolyse de la glycine ne correspond pas à celle obtenue pour l'acide aminé seul; bien que le dérivé entièrement méthylé demeure majoritaire, la proportion relative pour les deux autres dérivés se trouve inversée.

L'abondance relative cumulée des dérivés directs de la glycine s'élève à près de 90% de l'abondance relative cumulée des diketopiperazines. Dans le cas présent, la coupure de la liaison peptidique est très efficace puisque les produits de pyrolyse qui en résultent représentent environ 50 % de l'ensemble formé des diketopiperazines et des dérivés méthylés et directs du dipeptide. Le comportement pyrolytique de la glycine est donc très particulier. La pyrolyse de l'acide aminé seul conduit à la production importante de produits nécessitant la création d'une liaison peptidique (les produits de dimérisation représentant 33 % des produits monomériques) alors que la pyrolyse du dipeptide mène à des produits nécessitant la rupture de cette liaison (50 % de produits monomériques par rapport aux produits du dipeptide). Toutefois, il faut noter que tous les produits de pyrolyse du dipeptide sont présents, avec des abondances relatives différentes dans le pyrochromatogramme de l'acide aminé seul.

C'est le seul cas de notre étude où la rupture de la liaison peptidique est aussi importante, elle reste minoritaire dans les autres cas étudiés.

La moindre complexité de ce chromatogramme peut trouver deux explications : le dipeptide est constitué de deux fois le même acide aminé, de surcroît il est le plus simple des vingt acides aminés protéiques. La glycine ne portant pas de chaîne latérale, aucun des mécanismes de pyrolyse décrits dans le chapitre précédent ne peut se produire au cours de la pyrolyse de Gly-Gly. Seules la méthylation et la cyclisation, induites par la présence de TMAH, peuvent se produire. Par conséquent, le nombre de produits de pyrolyse de Gly-Gly est plus limité que celui des autres dipeptides.

Hendricker a montré que la pyrolyse de Gly-Gly sans TMAH produit aussi la diketopiperazine en forte abondance (Hendricker & Voorhees, 1996).

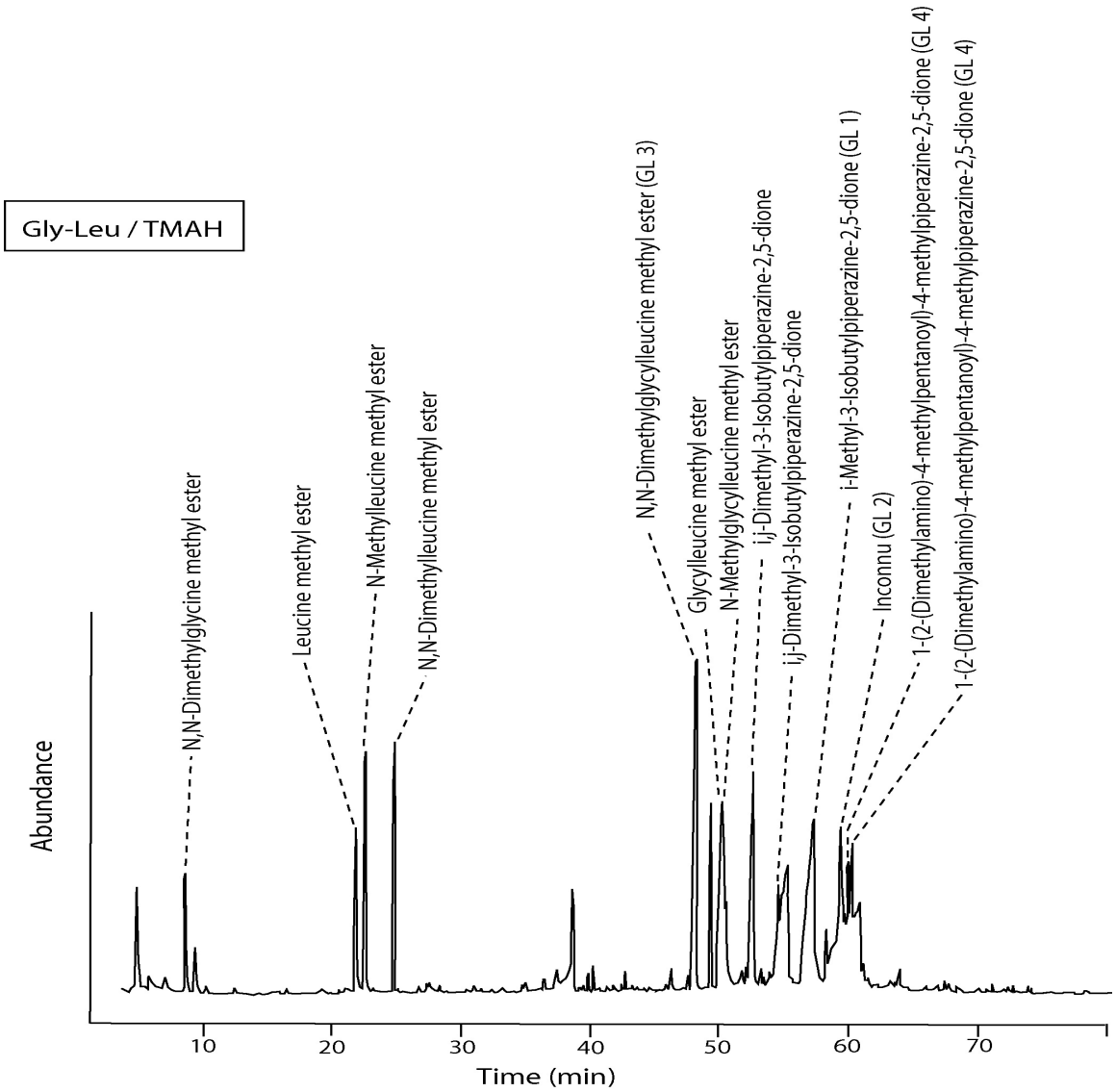


figure 2-2 : pyrochromatogramme de Gly-Leu en présence de TMAH

tableau 2-2 : Produits principaux de la pyrolyse de Gly-Leu en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Gly	% Leu
57,34	100	**128**	99	127	42	57	44	184	1-Methyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione (GL 1)		
48,24	72	**58**	59	42	171	230		230	N,N-Dimethylglycylleucine methyl ester (GL 3)		
52,65	58	**142**	113	141	42	44	57	198	N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione		
59,46	52	**42**	131	86	56	213	98	255	Inconnu (GL 2 = TL 2)		
50,38	45	**44**	216	86	157			216	N-Methylglycylleucine methyl ester		
50,22	40	**114**	146	86	100	143	58	202	Glycylleucine methyl ester		
22,61	34	**100**	58	44	42	102	41	159	N-Methylleucine methyl ester		63
60,33	29	**213**	86	214	185	154	42	269	1-(2-(Dimethylamino)acetyl)-3-isobutyl-4-methylpiperazine-2,5-dione (GL 4)		
21,83	27	**86**	44	43	88	41	87	145	Leucine methyl ester		90
24,84	26	**114**	72	42	58	116	115	173	N,N-Dimethylleucine methyl ester		47
60,02	22	**213**	86	214	185	154	42	269	1-(2-(Dimethylamino)acetyl)-3-isobutyl-4-methylpiperazine-2,5-dione (GL 4)		
49,45	18	**58**	114	42	244	59		244	N,N,N'-Trimethylglycylleucine methyl ester		
8,58	16	**58**	117	42				117	N,N-Dimethylglycine methyl ester	40	
55,33	14	**128**	44	99	43	42	84	184	4-Methyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione		
9,35	8	**55**	41	43	54	57	39	83	3-Methylbutanenitrile		3

2.1.2. Pyrolyse de Gly-Leu en présence de TMAH

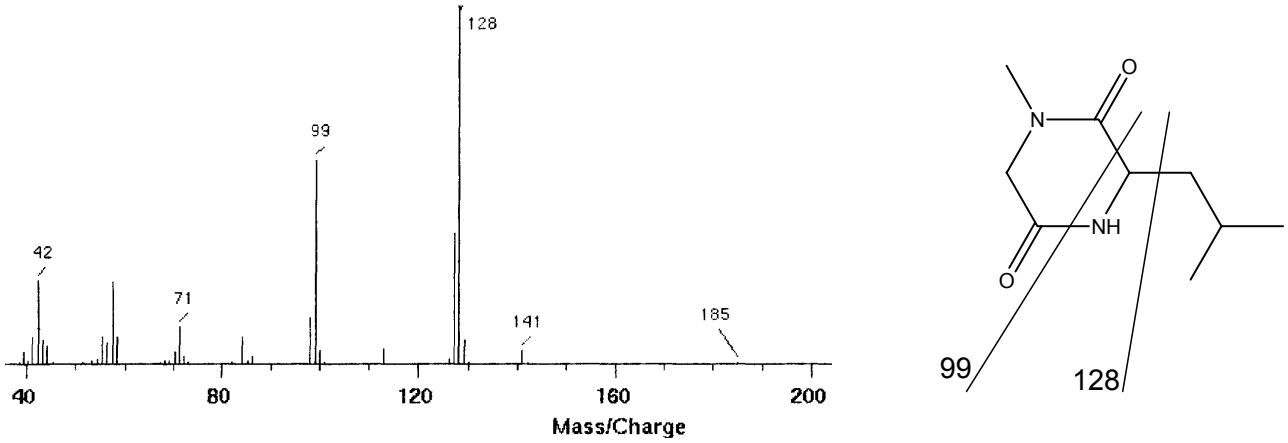
Dans le pyrochromatogramme de Gly-Leu (figure 2-2),(tableau 2-2), on peut distinguer deux zones où se concentrent les pics les plus intenses. La zone la plus importante couvre la gamme de temps de rétention de 48 à 61 minutes, dans laquelle se trouvent les six produits majoritaires. Ces produits sont des dérivés de la diketopiperazine ou du dipeptide, à des degrés de méthylation différents. Ainsi le produit de pyrolyse majoritaire est une diketopiperazine, la 1-Methyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione (GL 1), qui est détectée avec son homologue supérieur : la N,N-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione. Des diketopiperazines constituées de trois acides aminés contribuent également fortement au pyrolysat : 1-(2-(Dimethylamino)acetyl)-3-isobutyl-4-methylpiperazine-2,5-dione (GL 4). Le composé inconnu (GL 2), également détecté dans Thr-Leu, contient trois atomes d'azote et le spectre de masse laisse suppposer une structure de diketopiperazine constituée de trois acides aminés.

Les autres produits importants de la pyrolyse de Gly-Leu sont des dérivés méthylés du dipeptide : N,N-Dimethylglycylleucine methyl ester (GL 3), N-Methylglycylleucine methyl ester et Glycylleucine methyl ester.

Dans la zone des temps de rétention inférieurs à 30 minutes éluent les dérivés méthylés de la leucine, qui constituaient les produits de pyrolyse majoritaires de la leucine et représentent encore ici environ 20 % de l'ensemble des dérivés du dipeptide. Cependant, dans le cas de la pyrolyse de Gly-Leu, la leucine methyl ester n'est plus le dérivé majoritairement formé. Les proportions respectives de ces dérivés varient par rapport à la pyrolyse de l'acide aminé seul. De plus, le principal produit de pyrolyse de la leucine libre (la 4-Isobutyl-2-(N,N-dimethylmethanamine)-imidazolidine-5-one) n'est pas détecté.

Le seul dérivé issu de la pyrolyse de Gly détecté dans le pyrochromatogramme de Gly-Leu est le N,N-Dimethylglycine methyl ester. Ce composé peut toutefois aussi résulter de l'homolyse de la leucine, comme discuté dans le dernier paragraphe de ce chapitre.

D'après les travaux de Hendricker et Voorhees (Hendricker & Voorhees, 1996), la pyrolyse de Gly-Leu sans TMAH produit moins de diketopiperazines que Gly-Gly. Dans notre cas, les diketopiperazines sont les produits majoritaires et il semble donc que l'ajout de TMAH favorise leur formation.



1-Methyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione (GL 1)

figure 2-3 : spectre de masse et structure de GL 1

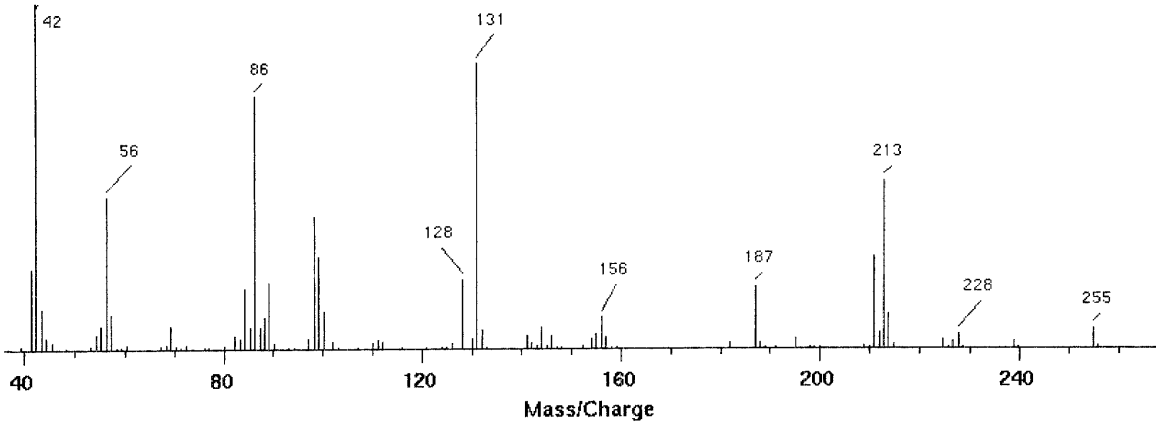
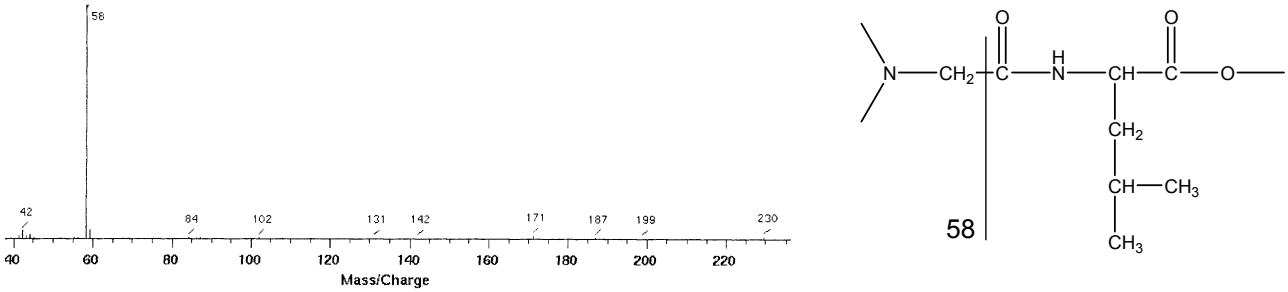
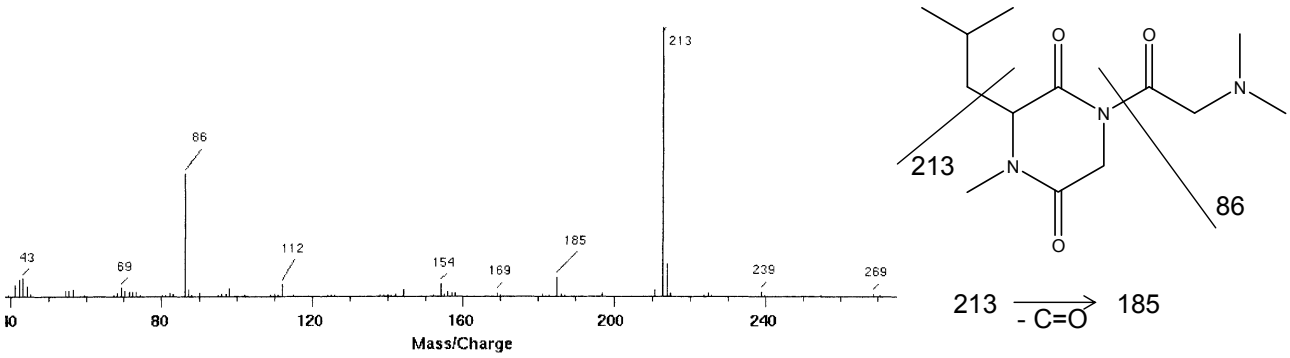


figure 2-4 : spectre de masse de GL 2



N,N-Dimethylglycylleucine methyl ester (GL 3)

figure 2-5 : spectre de masse et structure de GL 3



1-(2-(Dimethylamino)acetyl)-3-isobutyl-4-methylpiperazine-2,5-dione (GL 4) (tr: 60,33)

figure 2-6 : spectre de masse et structure de GL 4

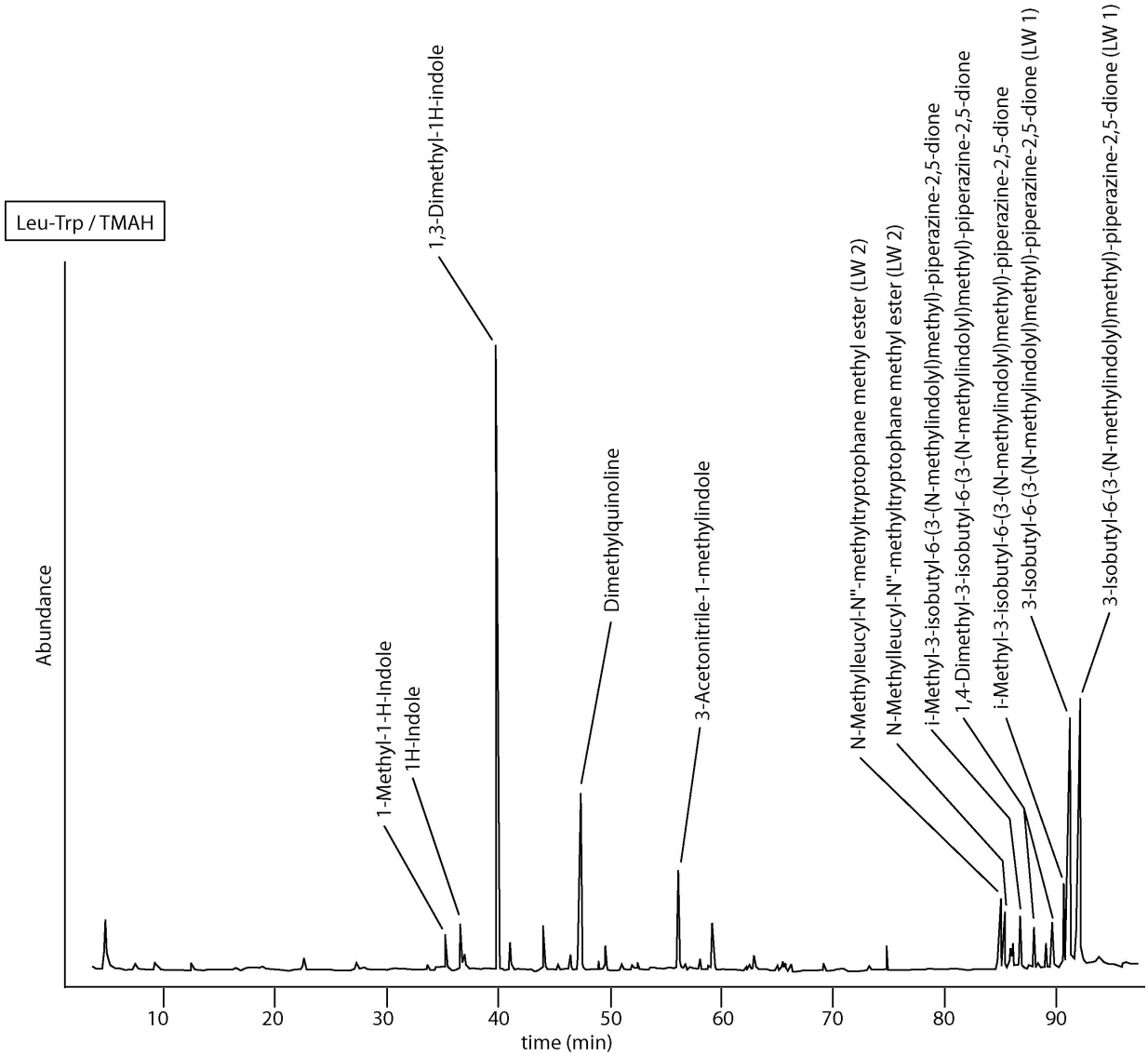


figure 2-7 : pyrochromatogramme de Leu-Trp en présence de TMAH

tableau 2-3 : Produits principaux de la pyrolyse de Leu-Trp en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Leu	% Trp
39,91	100	**144**	145	77	143	128	115	145	1,3-Dimethyl-1H-indole		100
92,08	80	**144**	145	313	115	77		313	3-Isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (LW 1)		
91,15	72	**144**	145	317	77			313	3-Isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (LW 1)		
47,29	21	**157**	156	115	128	142	78	157	Dimethylquinoline		54
90,59	19	**144**	145	327	77			327	i-Methyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (i=1,4)		
56,13	17	**169**	170	144	115	101	128	170	3-Acetonitrile-1-methylindole		
85,09	11	**100**	144	260	215	58	44	359	N-Methylleucyl-N"-methyltryptophane methyl ester (LW 2)		
86,77	11	**144**	145	143	128	327		327	i-Methyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (i=1,4)		
89,72	10	**144**	215	145	216	341	154	341	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione		
36,56	9	**117**	90	89	59	116	118	117	1H-Indole		20
85,43	9	**100**	144	260	215	58	44	359	N-Methylleucyl-N"-methyltryptophane methyl ester (LW 2)		
87,98	6	**144**	145	215	115	341	77	341	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione		
35,17	5	**131**	130	89	77	65	103	131	1-Methyl-1-H-Indole		10
41,00	5	**130**	131	77	51	103	65	131	3-Methyl-1H-indole		10
43,97	5	**144**	159	143	145	115	77	159	5,6,7-Trimethyl-1H-indole		16
89,13	4	**144**	145	327				327	i-Methyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (i=1,4)		

2.2. Dipeptides contenant un acide aromatique

Dans les paragraphes précédents, la pyrolyse de trois dipeptides contenant un acide aminé aromatique a déjà été présentée : Val-Phe, Ala-Tyr et Ala-Trp. Dans ces trois cas, nous avons observé une forte abondance de diketopiperazines, de produits aromatiques, et dans une moindre mesure de dérivés méthylés du dipeptide. Le paragraphe ci-dessous aborde la pyrolyse d'un quatrième dipeptide possédant un acide aminé aromatique.

2.2.1. Pyrolyse de Leu-Trp en présence de TMAH

La pyrolyse de Leu-Trp (figure 2-7, tableau 2-3) produit majoritairement des dérivés de la diketopiperazine du dipeptide Leu-Trp et des dérivés du noyau indole, déjà présents dans le pyrochromatogramme du tryptophane.

Ainsi de nombreux dérivés du dipeptide ont été identifiés en fin de chromatogramme, entre 85 et 95 minutes de temps de rétention. Il s'agit principalement de produits de cyclisation du dipeptide, dérivés methylés de la diketopiperazinedione de Leu-Trp, le plus abondant étant la 3-Isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (LW 1) à 92 minutes. Deux isomères de dérivés méthylés du dimère sont également identifiés (le N-Methylleucyl-N"-methyltryptophane methyl ester (LW 2) à 85,09 et 85,43 min.).

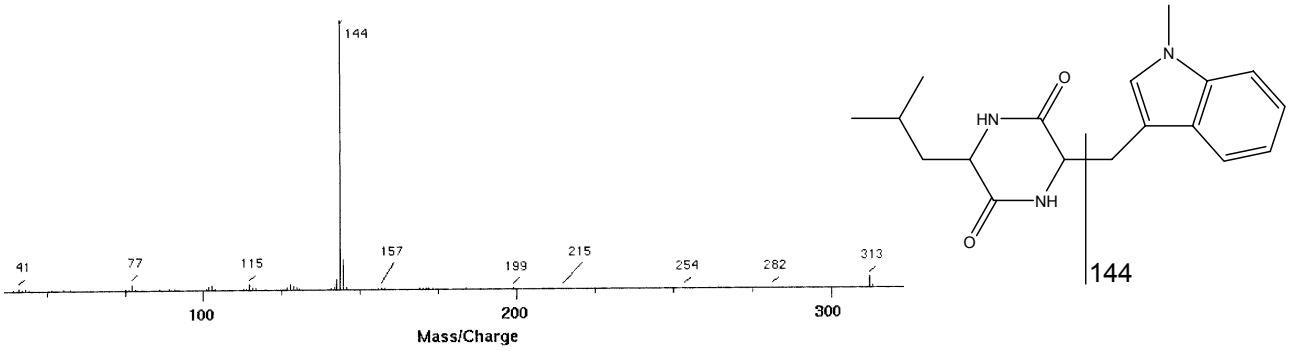
Par ailleurs, le produit majoritaire de la pyrolyse de l'acide aminé aromatique, le 1,3-Dimethyl-1H-indole, est également celui de la pyrolyse du dipeptide Leu-Trp. De même, des composés indoliques (indoles plus ou moins substitués, détectés entre 35 et 45 minutes de rétention), ainsi que la dimethylquinoline, provenant de la pyrolyse du tryptophane, ont été identifiés parmi les produits de pyrolyse de Leu-Trp. On constate que les proportions relatives de ces composés issus de la pyrolyse du tryptophane sont globalement conservées pour la pyrolyse de Leu-Trp (tableau 2-3). Par exemple, le 1H-indole représente 50% de la dimethylquinoline dans le pyrochromatogramme du dipeptide ou du tryptophane seul. Cependant, l'abondance relative de ces composés vis-à-vis du 1,3-Dimethyl-1H-indole diminue de moitié environ.

L'abondance relative cumulée des dérivés indoliques représente près de 75 % de celle des dérivés du dipeptide.

Notons que le 3-Acetonitrile-1-methylindole avait aussi été détecté dans le pyrochromatogramme de Ala-Trp, en proportions équivalentes.

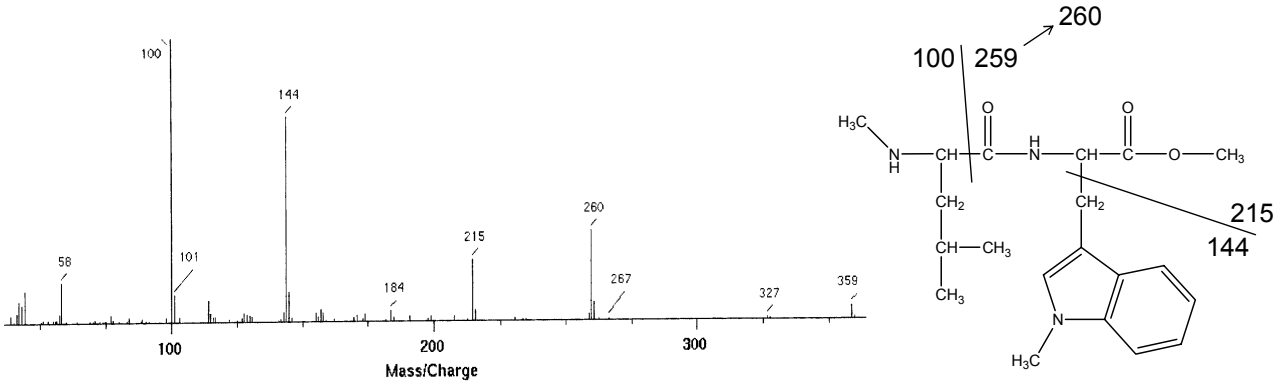
Enfin, aucun composé identifié dans la pyrolyse de la leucine n'a été détecté parmi les produits de pyrolyse de Leu-Trp, comme cela avait été observé pour l'alanine dans Ala-Trp et Ala-Tyr.

Le pyrochromatogramme de Leu-Trp est similaire à celui de Ala-Trp. Les dérivés indoliques sont les produits majoritaires de la première partie du pyrochromatogramme (jusqu'à 60 min), alors que les diketopiperazines et les dérivés méthylés du dipeptide sont ceux de la seconde partie du pyrochromatogramme. De plus, les proportions entre l'abondance relative cumulée des produits indoliques et celle des dérivés du dipeptide sont équivalentes (environ 90% pour Ala-Trp et 75% pour Leu-Trp). La principale différence entre les deux pyrochromatogrammes est la présence du 1,2-Diindolylethane pour Ala-Trp.



3-Isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (LW 1) (tr: 92,08 min)

figure 2-8 : spectre de masse et structure de LW 1



N-Methylleucyl-N''-methyltryptophane methyl ester (LW 2) (tr: 85,09 min)

figure 2-9 : spectre de masse et structure de LW 2

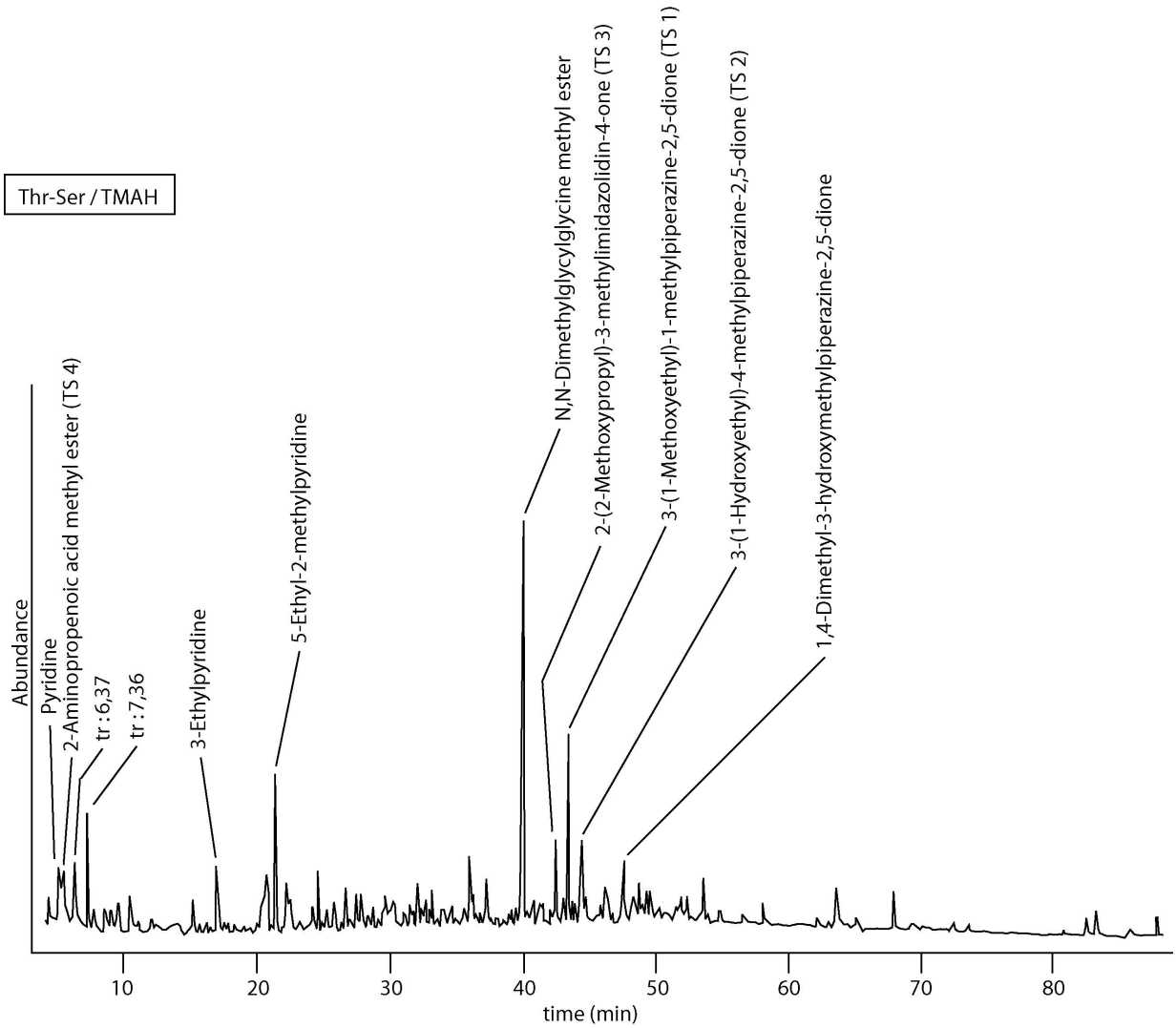


figure 2-10 : pyrochromatogramme de Thr-Ser en présence de TMAH

tableau 2-4 : Produits principaux de la pyrolyse de Thr-Ser en présence de TMAH

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Thr	% Ser
40,08	100	**58**	42	59				174 *	N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester		
43,46	42	**44**	171	56	42	127	71	186 *	3-(1-Methoxyethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (TS 1)	traces	
6,37	25	**69**	42	84	57	56		84?	inconnu X		
44,52	24	**56**	99	157	57	42	113	172	3-(1-Hydroxyethyl)-4-methylpiperazine-2,5-dione (TS 2)		
21,43	24	**106**	121	77	120	79	39	121	5-Ethyl-2-methylpyridine		
7,36	23	**83**	98	42	56	72	44	98?	homologue en +14 de l'inconnu X		
5,22	18	**79**	52	51	50	78	39	79	Pyridine		
42,56	17	**99**	42	44	57	85	171	172 *	2-(2-Methoxypropyl)-3-methylimidazolidin-4-one (TS 3)		
17,02	17	**107**	92	106	65	79	39	107	3-Ethylpyridine		
47,66	17	**172**	44	42	57	43	85	172	1,4-Dimethyl-3-hydroxymethylpiperazine-2,5-dione		
5,59	14	**86**	58	43	42	65	70	101	2-Aminopropenoic acid methyl ester (TS 4)		34
36,1	12	**146**	147	132	117	131	118	147	3-Methyl-5,6,7,8-tetrahydroquinoline		
9,66	9	**80**	81	53	73			81	i-Methyl-1-H-pyrrole		
22,3	9	**108**	79	107	77	51	91	108	Benzenemethanol		
15,25	9	**107**	106	79	77	39	92	107	2,6-Dimethylpyridine		
46,23	7	**154**	55	125	126	54	68	154 *	(i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 ou 4) (TS 5)		
9,16	6	**80**	81	53				81	i-Methyl-1-H-pyrrole		
8,66	3	**58**	117	42				117 *	N,N-Dimethylglycine methyl ester		

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

2.3. Dipeptides hydroxylés

2.3.1. Pyrolyse de Thr-Ser en présence de TMAH

Le pyrochromatogramme de Thr-Ser (figure 2-10, tableau 2-4) est dominé par un pic à 40 min, dont le spectre de masse correspond à un dérivé du dipeptide qui a perdu, suite à un mécanisme d'homolyse, les chaînes latérales des deux acides aminés qui le constituent. Il s'agit du N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester.

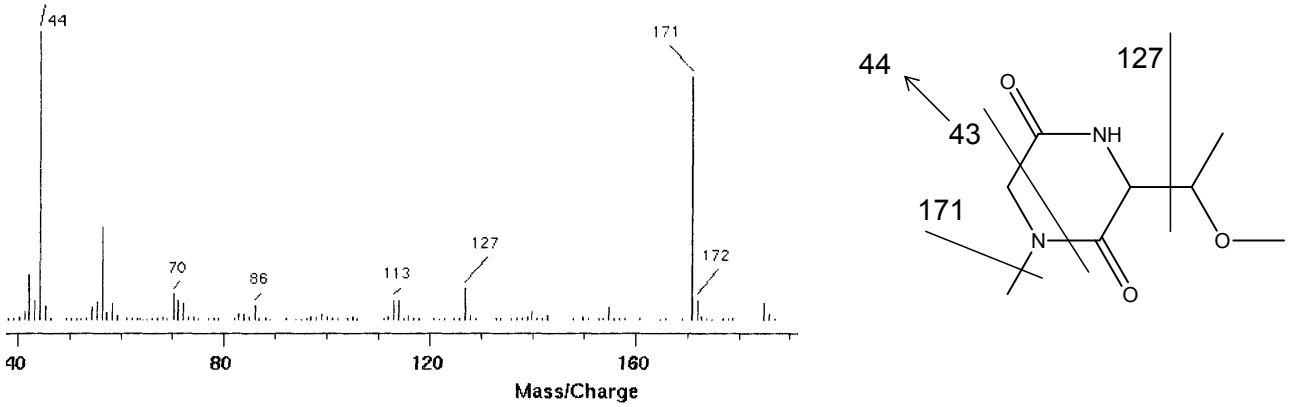
La pyrolyse de Thr-Ser produit également de nombreuses diketopiperazines qui éluent entre 43 et 48 min. Cette diversité est due au fait que les acides aminés portent des fonctions hydroxyles qui peuvent aussi être méthylées, et les possibilités de méthylation sont donc multiples. Les identifications suivantes sont ainsi proposées : la 3-(1-Methoxyethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (TS 1), la 3-(1-Hydroxyethyl)-4-methylpiperazine-2,5-dione (TS 2), la N,N'-Dimethyl-3-hydroxymethylpiperazine-2,5-dione et la (i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 ou 4) (TS 5). Remarquons que les diketopiperazines observées perdent plus souvent la chaîne latérale de la serine (présente une seule fois sur les cinq diketopiperazines classiques détectées), alors que la chaîne latérale de la thréonine est conservée dans tous les autres cas. Outre ces diketopiperazines, un autre composé de cyclisation, la 2-(2-Methoxypropyl)-3-methylimidazolidin-4-one (TS 3) a aussi été détectée.

D'autres produits de pyrolyse ont pu être identifiés, sans que leur formation puisse être expliquée de façon simple et rapide, comme la pyridine et ses dérivés, dont les abondances relatives ne sont pas négligeables.

Par ailleurs, deux composés relativement importants sont détectés en début de chromatogramme (6,37 et 7,36 min) ; leurs spectres de masse permettent d'affirmer qu'il s'agit de deux homologues différant d'un groupement méthyle sans pouvoir leur attribuer de structure.

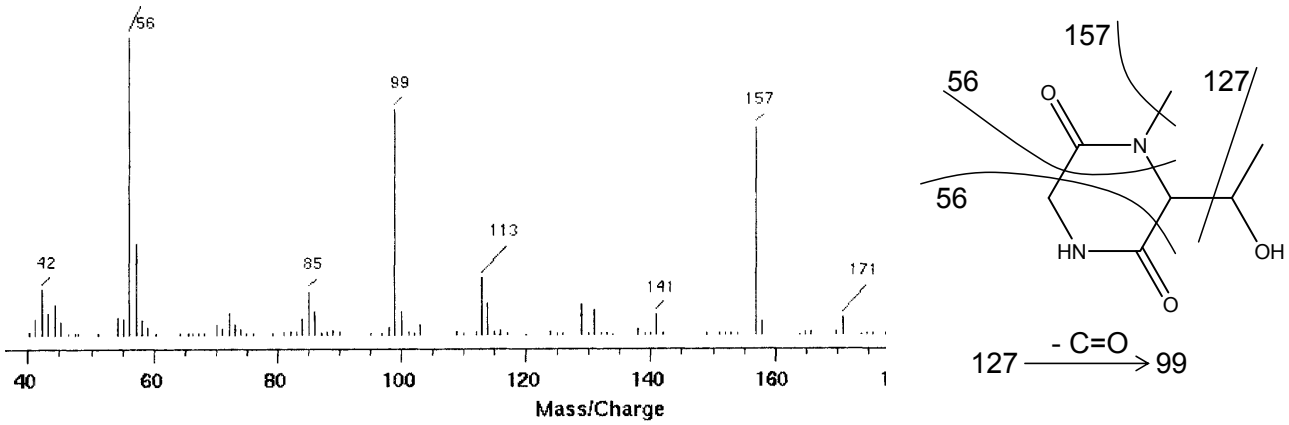
Enfin, dans ce pyrochromatogramme, un seul composé a été identifié comme provenant de la pyrolyse d'un des deux acides aminés individuels : il s'agit du 2-Aminopropenoic acid methyl ester (TS 4), issu de la pyrolyse de la serine. Cependant, la structure de la (i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 ou 4) (TS 5) peut être rapprochée de celle de la 2,5-Dimethylidene-3-methoxypiperazine-6-one, déjà identifiée dans le pyrochromatogramme de la serine. Aucun produit de pyrolyse de la thréonine n'a été détecté dans la pyrolyse de Thr-Ser.

Globalement, nous constatons une perte d'informations concernant la serine nettement plus importante que pour la thréonine, car les abondances du 2-Aminopropenoic acid methyl ester (TS 4) et de la (i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 ou 4) (TS 5) sont faibles.



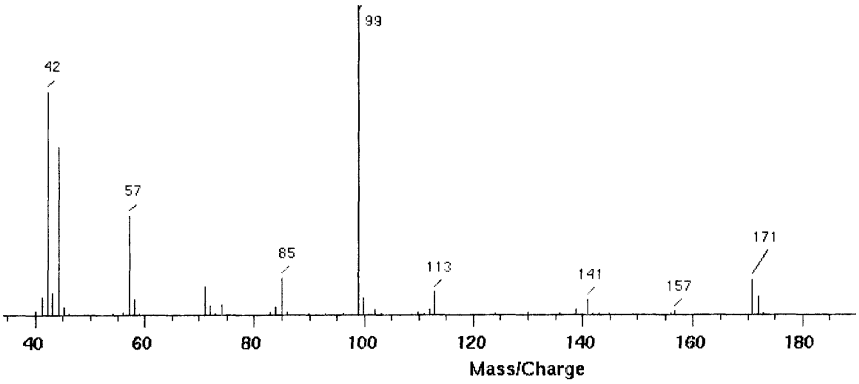
3-(1-Methoxyethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (TS 1)

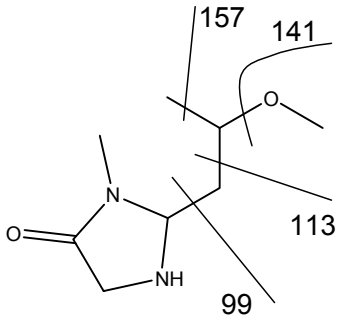
figure 2-11 : spectre de masse et structure de TS 1



3-(1-Hydroxyethyl)-4-methylpiperazine-2,5-dione (TS 2)

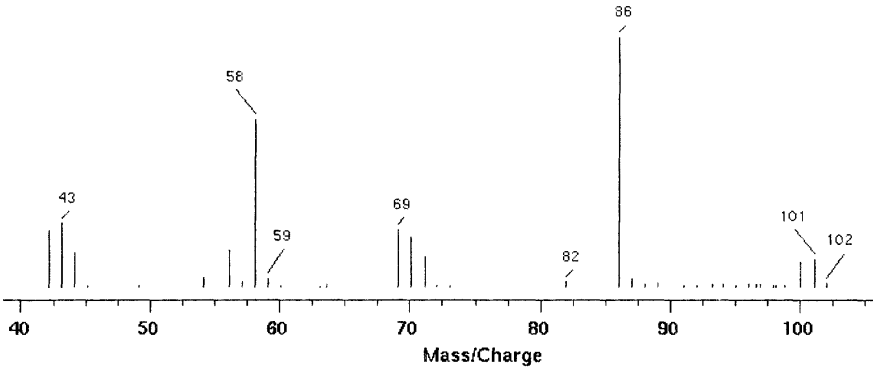
figure 2-12 : spectre de masse et structure de TS 2

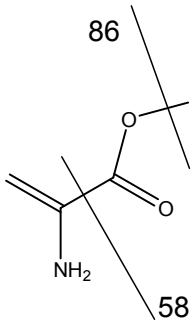




2-(2-Methoxypropyl)-3-methylimidazolidin-4-one (TS 3)

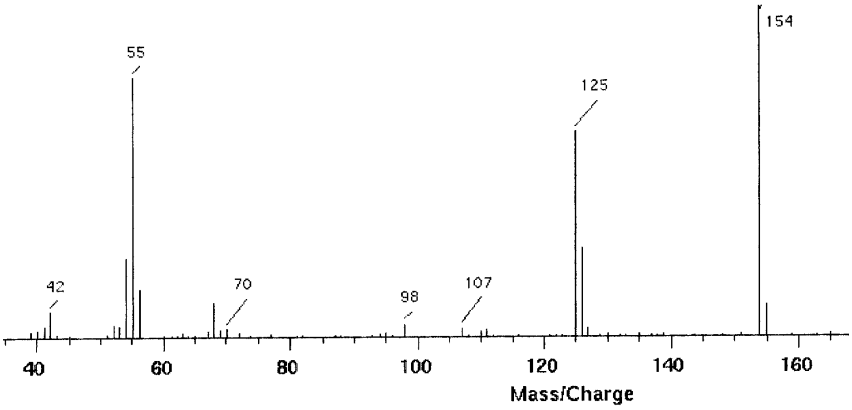
figure 2-13 : spectre de masse et structure de TS 3

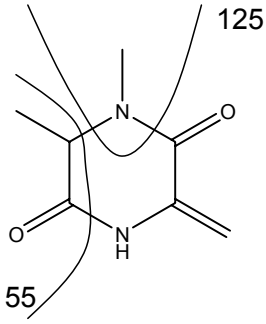




2-Aminopropenoic acid methyl ester (TS 4)

figure 2-14 : spectre de masse et structure de TS 4





(TS 5) si i=1

(i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 ou 4) (TS 5)

figure 2-15 : spectre de masse et structure de TS 5

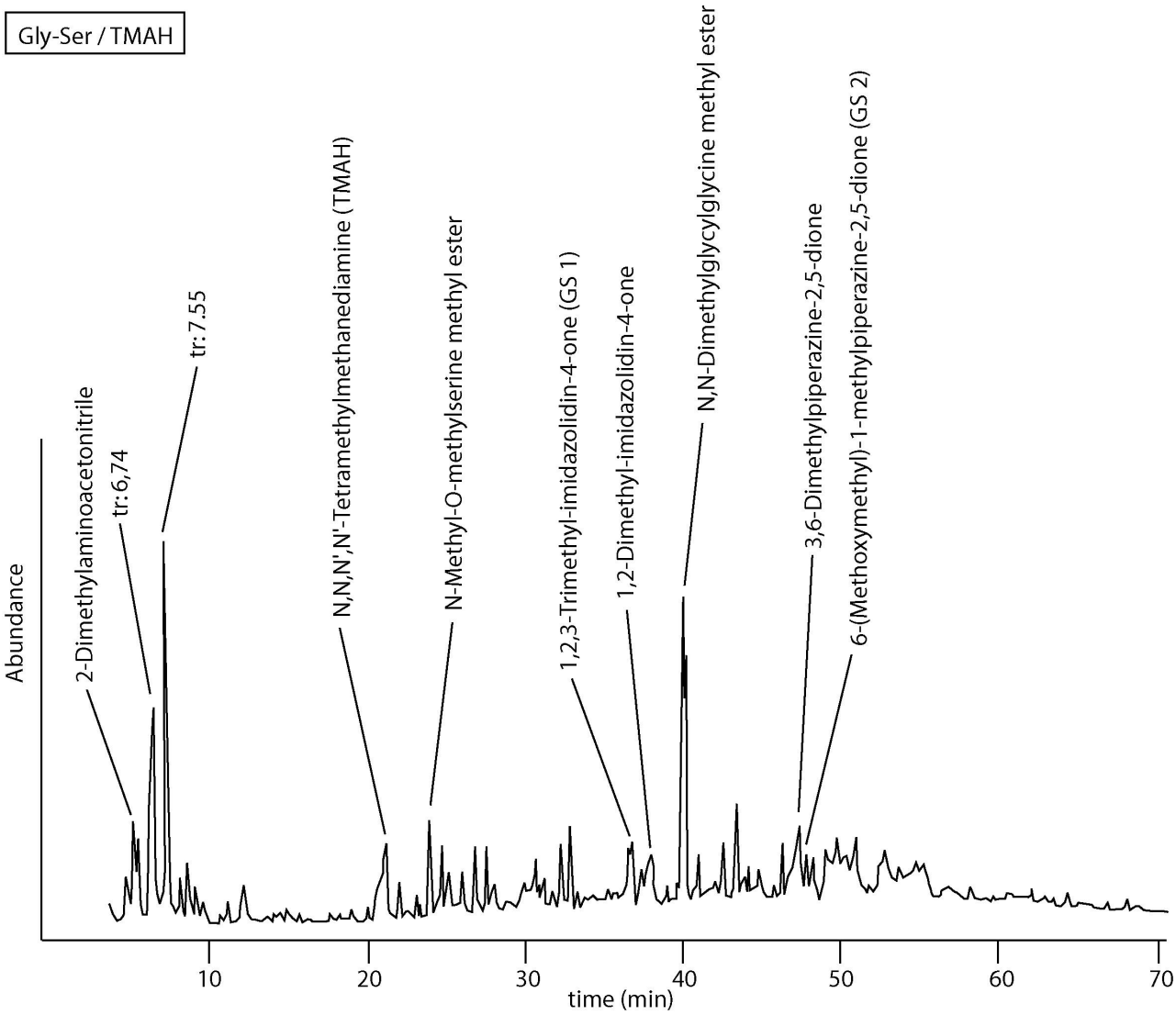


figure 2-16 : pyrochromatogramme de Gly-Ser en présence de TMAH

tableau 2-5 : Produits principaux de la pyrolyse de Gly-Ser en présence de TMAH

tr (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Gly	% Ser
40,20	100	**58**	115	114	124			174	N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester		
7,55	100	**83**	42	98	56	72	97				
6,74	83	**44**	42	88							
5,47	60	**83**	42	84	58	67	41	84	2-Dimethylaminoacetonitrile		
21,31	58	**58**	42	44	102	74		102	N,N,N',N'-Tetramethylmethanediamine		
37,90	45	**114**	58	42	56	86	128	114	1,2-Dimethyl-imidazolidin-4-one		
36,96	35	**128**	43	58	43	100	42	128	1,2,3-Trimethyl-imidazolidin-4-one (GS 1)		
49,21	24	**58**	99	42	142	57	56				
47,10	24	**44**	142	85	42	57	43	142	3,6'-Dimethylpiperazine-2,5-dione	3	
24,00	16	**88**	116	44	42	58	147	161	N-Methyl-O-methylserine methyl ester		70
47,94	15	**172**	42	44	57	43	85	172	6-(Methoxymethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (GS 2)		
26,08	12	**113**	56	112	42	68	55	113	1-Methyl-2,5-pyrrolidinedione	2	
8,79	12	**58**	117	42				117	N,N-Dimethylglycine methyl ester	40	
9,29	11	**80**	81	53	73	43	83	81	i-Methyl-1-H-pyrrole		
46,41	7	**154**	55	125	126	54	42	154	(i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 or 4) (GS 3)		7

2.3.2. Pyrolyse de Gly-Ser en présence de TMAH

Le pyrochromatogramme de Gly-Ser (figure 2-16) est caractérisé par l'absence de produits lourds : en effet, la totalité des produits de pyrolyse de Gly-Ser en présence de TMAH éluent avant 50 minutes de rétention.

Les deux produits majoritaires sont d'une part un composé non identifié déjà observé au début du pyrochromatogramme de Thr-Ser (à 7,5 min. de temps de rétention), et d'autre part le dipeptide méthylé issu de l'homolyse de Ser dans Gly-Ser (N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester) qui élue à 40 minutes. L'équivalent cyclique de ce dernier (3,6-Dimethylpiperazinedi-2,5-one) est détecté à 47 minutes. C'est la diketopiperazine de la glycine. Deux autres diketopiperazines sont identifiées : la 6-(Methoxymethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (GS 2)et la (i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 or 4) (GS 3).

En tout début de chromatogramme, le 2-Dimethylaminoacetonitrile est détecté en forte abondance. Il résulte d'un mécanisme de coupure de la liaison peptidique suivie de la méthylation de l'amine ainsi obtenue et d'une décarboxylation.

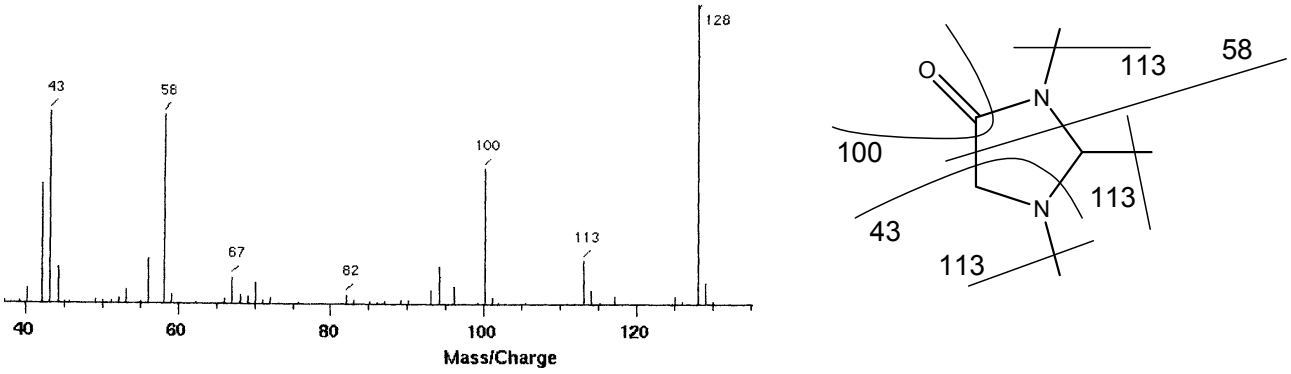
Les dérivés majoritaires des acides aminés individuels ne sont pas détectés dans la pyrolyse du dipeptide, à l'exception de deux d'entre eux : le N-Methyl-O-methylserine methyl ester, et le N,N-Dimethylglycine methyl ester, qui sont des dérivés directs des acides aminés. Cependant les abondances relatives sont beaucoup plus faibles dans le cas du dipeptide par rapport à celles mesurées pour la pyrolyse de l'acide aminé individuel (tableau 2-5).

La 1,2-Dimethyl-imidazolidin-4-one et la 1,2,3-Trimethyl-imidazolidin-4-one (GS 1) sont deux composés homologues et sont détectés à 38 et 37 min respectivement. Leur formation a été abordée dans le chapitre précédent et repose sur la formation puis la décomposition d'amidines bicycliques.

On note aussi la présence de la 1-Methyl-2,5-pyrrolidinedione (26,08 min de temps de rétention) détectée en proportion plus faible dans le pyrolysat de la glycine.

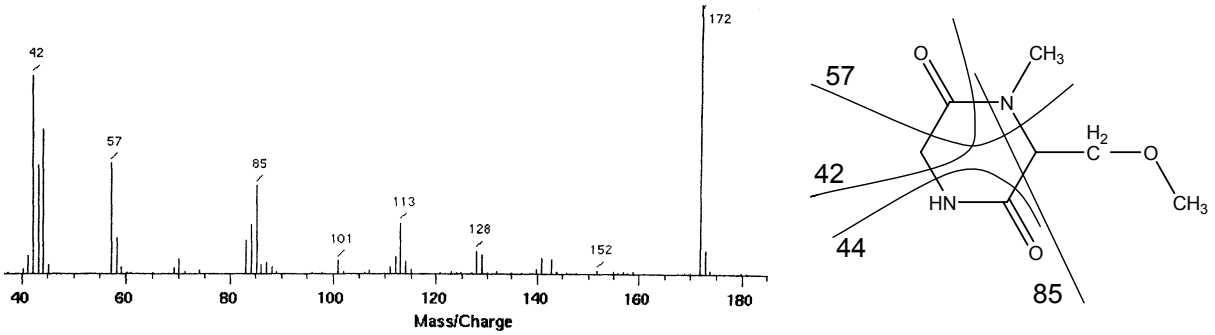
Ainsi, la pyrolyse de Gly-Ser ne produit que très peu de dérivés issus de la pyrolyse des acides aminés individuels, mais également très peu de produits lourds, tels que dipeptides methylés ou diketopiperazines, ayant conservé la chaîne latérale de la sérine et pouvant révéler la présence de cet acide aminé dans le composé initial. Il en résulte une perte d'informations concernant la présence de sérine dans l'échantillon pyrolysé, perte d'information déjà notée dans la pyrolyse de Thr-Ser.

D'après Hendricker et Voorhees (Hendricker & Voorhees, 1996), la formation de diketopiperazines est plus importante pour Gly-Ser que pour Gly-Gly. Dans notre cas, elle est au contraire moins importante pour Gly-Ser que pour Gly-Gly. Cependant, ces auteurs soulignaient l'influence des différentes fonctions des substituants sur la formation des diketopiperazines. L'ajout de TMAH modifie profondément la nature des fonctions hydroxyles et peut donc influencer la formation de diketopiperazines de Gly-Ser.



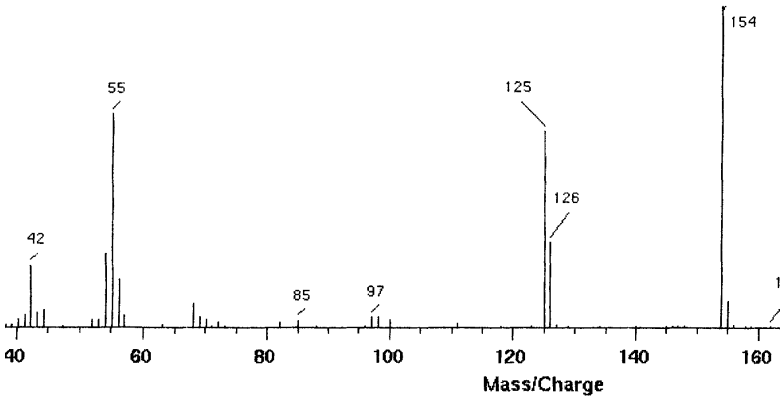
1,2,3-Trimethyl-imidazolidin-4-one (GS 1)

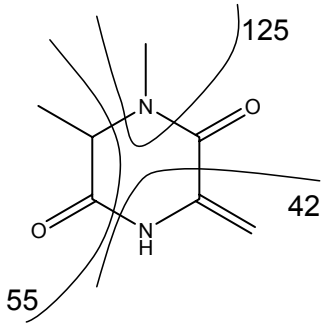
figure 2-17 : spectre de masse et structure de GS 1



6-(Methoxymethyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (GS 2)

figure 2-18 : spectre de masse et structure de GS 2





(i),6-Dimethyl-3-methylidenepiperazine-2,5-dione (i=1 or 4) (GS 3 = TS 5)

figure 2-19 : spectre de masse et structure de GS 3

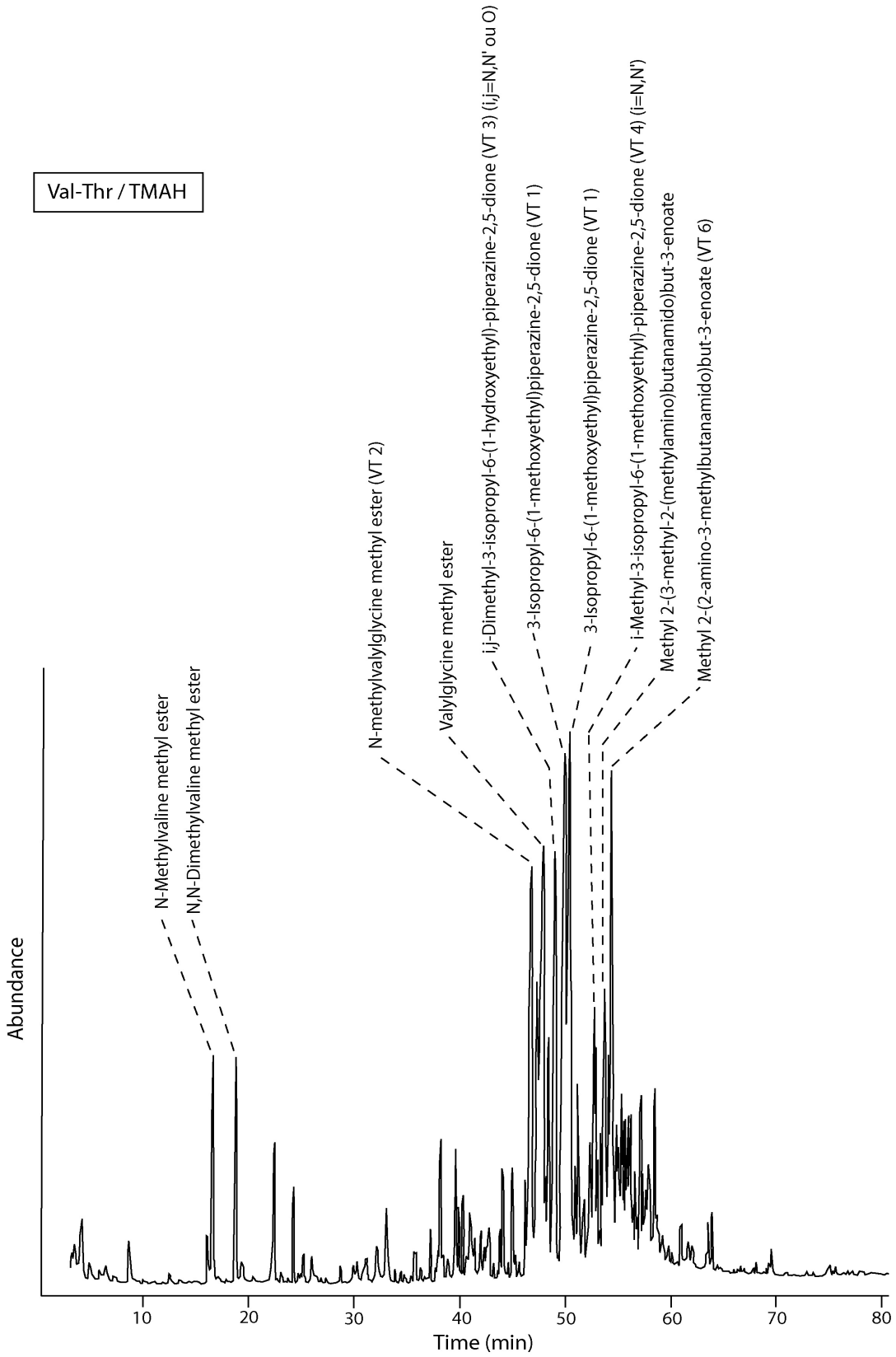


figure 2-20 : pyrochromatogramme de Val-Thr en présence de TMAH

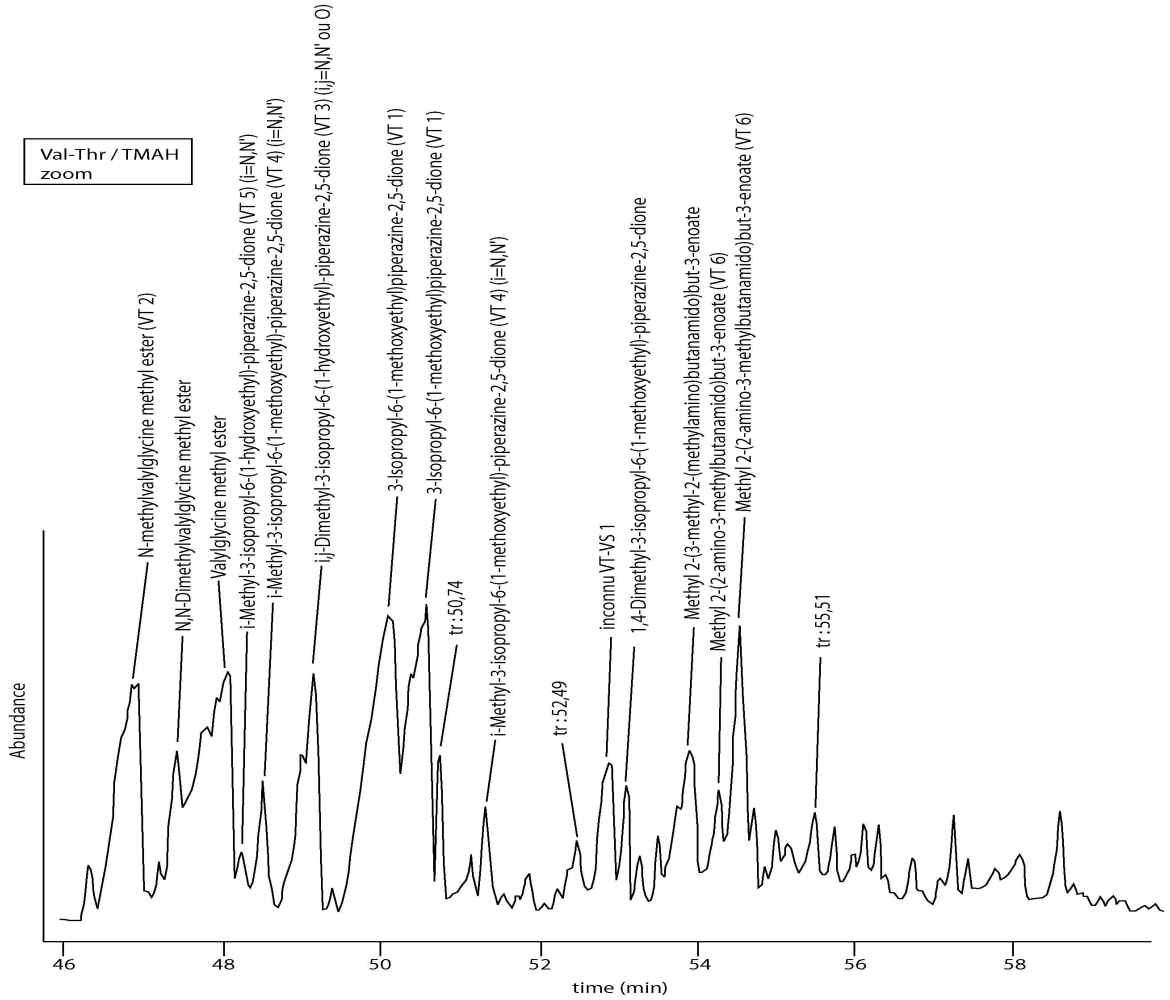


figure 2-21 : partie agrandie du pyrochromatogramme de Val-Thr en présence de TMAH

tableau 2-6 : Produits principaux de la pyrolyse de Val-Thr en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Val	% Thr
50,10	100	**171**	72	56	199	139	141	214 *	3-Isopropyl-6-(1-methoxyethyl)piperazine-2,5-dione (VT 1)		
50,60	70	**171**	72	199	56	139	141	214 *	3-Isopropyl-6-(1-methoxyethyl)piperazine-2,5-dione (VT 1)		
46,95	61	**86**	55	71	87	42		202 *	N-methylvalylglycine methyl ester (VT 2)		
49,20	50	**70**	169	127	42			228 *	i,j-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 3) (i,j=N,N' ou O)		
48,00	46	**72**	55	113	85			188	Valylglycine methyl ester		
54,57	45	**72**	55	59	171			214	Methyl 2-(2-amino-3-methylbutanamido)but-3-enoate (VT 6)		
53,92	28	**86**	59	185				228 *	Methyl 2-(3-methyl-2-(methylamino)butanamido)but-3-enoate		
52,89	24	**126**	186	42	154	185	199	228 *	inconnu VT-VS 1		
47,48	24	**100**	44	84	85			216	N,N-Dimethylvalylglycine methyl ester		
54,32	16	**72**	59	55	171			214	Methyl 2-(2-amino-3-methylbutanamido)but-3-enoate (VT 6)		
48,54	16	**185**	153	56	116	42	86	228 *	i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 4) (i=N,N')		
55,51	14	**167**	112	172	139	140	211				
16,63	12	**86**	102	42	55	70	71	145	N-Methylvaline methyl ester	100	
18,86	12	**100**	116	44	85	42	84	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester	15	
53,11	10	**199**	72	185	70	55	41	242 *	1,4-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione		
52,49	10	**126**	55	199	158	72	173				
50,74	10	**157**	125	42	70	127	85				
51,33	10	**185**	153	116	56	42	213	228 *	i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 4) (i=N,N')		
48,23	7	**171**	139	42	98	172		214	i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 5) (i=N,N')		
53,73	7	**199**	72	171	126			242 *	inconnu VT-VS 2		
16,13	6	**72**	55	88				131	Valine methyl ester	100	
8,72	5	**58**	117	42	84	57		174	N,N-Dimethylglycylglycine methyl ester		

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

2.3.3. Pyrolyse de Val-Thr en présence de TMAH

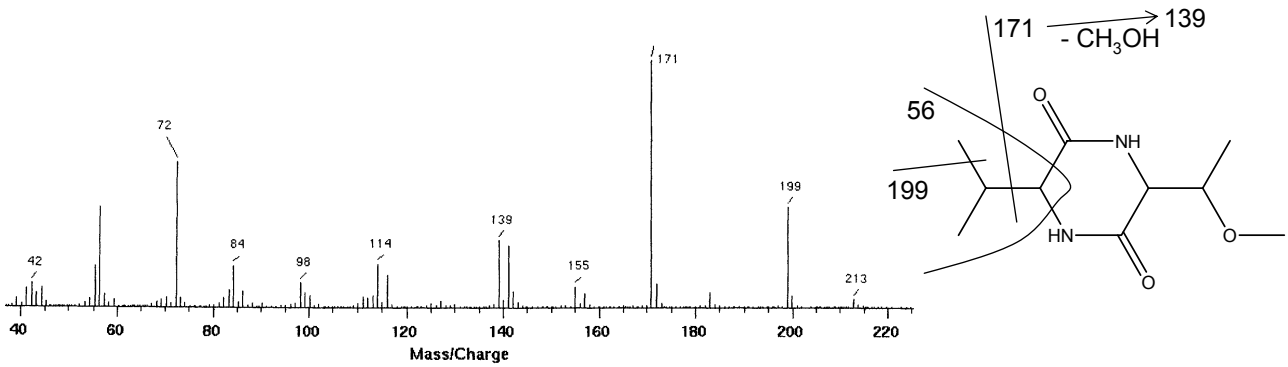
Le pyrochromatogramme de Val-Thr (figure 2-20) est dominé par un massif entre 40 et 60 minutes. Certains de ces pics peuvent être attribués à des dérivés du dipeptide Val-Thr et de sa diketopiperazine, à des degrés de méthylation différents (tableau 2-6). Ainsi deux représentants de la 3-Isopropyl-6-(1-methoxyethyl)piperazine-2,5-dione (VT 1) constituent les produits majoritaires (figure 2-21) de la pyrolyse de Val-Thr. D'autres diketopiperazines sont également détectées dans ce massif : la i,j-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 3) (i,j=N,N' ou O), la i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 4) (i=N,N'), la i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 5) (i=N,N'), la 1,4-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione ou encore la 3-Isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione. Notons que la fonction hydroxyle n'est pas toujours méthylée dans les diketopiperazines précédentes.

Outre les diketopiperazines, produites en grand nombre et en grandes quantités, les dérivés méthylés du dipeptide modifié par homolyse de la thréonine ont également été détectés : il s'agit de l'ester méthylique du dipeptide ainsi modifié et méthylé 0, 1 ou 2 fois. Des dérivés du dipeptide ayant subi une déshydratation sont également détectés : le Methyl 2-(2-amino-3-methylbutanamido)but-3-enoate (VT 6) et son homologue supérieur.

Toutefois certains pics moins intenses de ce massif très complexe n'ont pas pu être identifiés sur la base leur spectre de masse, appelés inconnus VT-VS 1 et VT-VS 2, car détectés dans les pyrochromatogrammes de Val-Thr et Val-Ser.

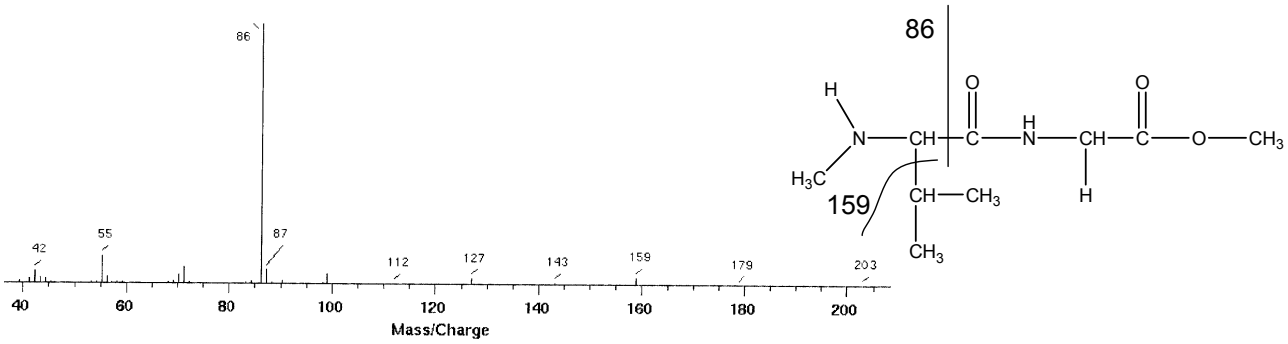
Dans le pyrochromatogramme de Val-Thr, plusieurs dérivés méthylés de la valine ont été identifiés en quantité significative, mais bien moins grande que lors de la pyrolyse de l'acide aminé seul. En revanche, aucun composé issu de la pyrolyse de la thréonine n'a été détecté.

La pyrolyse de Val-Thr en présence de TMAH produit donc de nombreux produits lourds élués entre 40 et 60 min, en particulier des diketopiperazines ayant conservé les chaînes latérales des acides aminés constitutifs du dipeptide. Il est probable que la réactivité de la fonction alcool joue un rôle important dans la formation de ces produits de cyclisation, comme l'ont déjà mentionné Hendricker et Voorhees (Hendricker & Voorhees, 1996) lorsqu'ils décrivent l'influence de la présence d'hétéroatomes sur la formation de diketopiperazines.



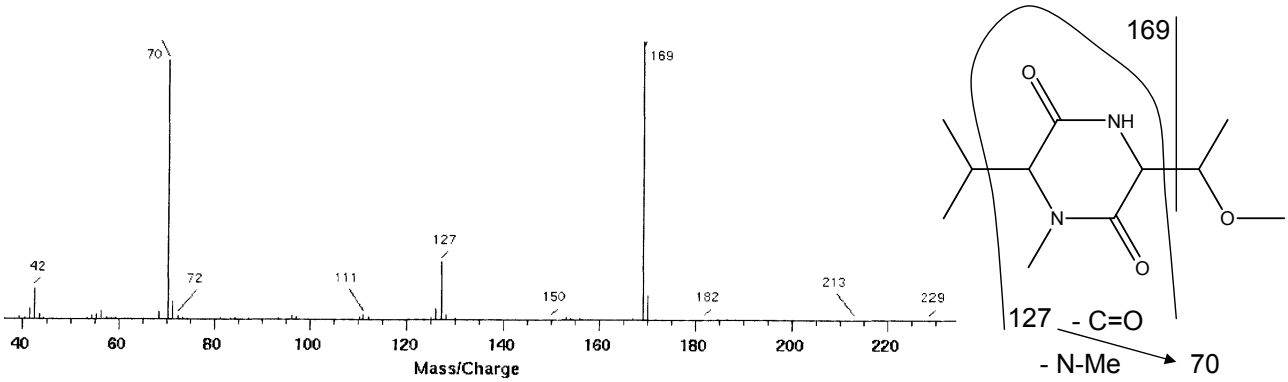
3-Isopropyl-6-(1-methoxyethyl)piperazine-2,5-dione (VT 1) (tr: 50,10 min)

figure 2-22 : spectre de masse et structure de VT 1



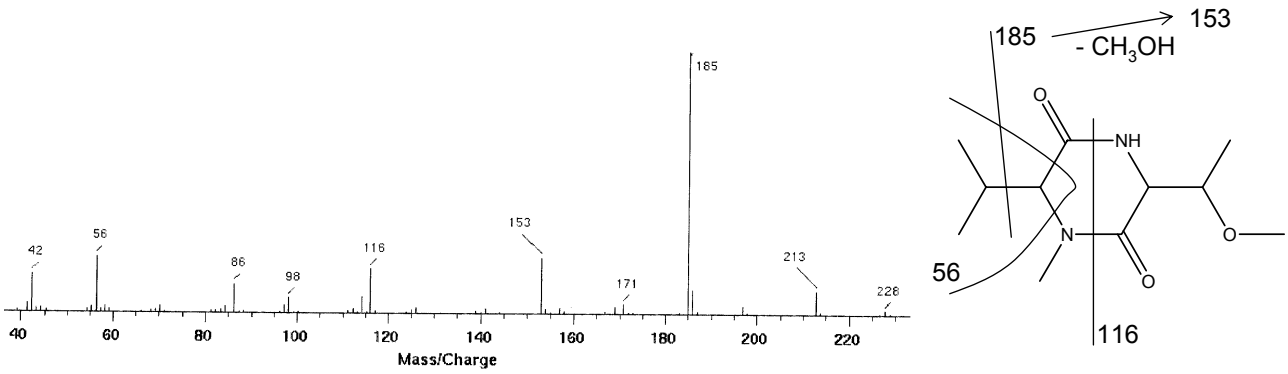
N-methylvalylglycine methyl ester (VT 2)

figure 2-23 : spectre de masse et structure de VT 2



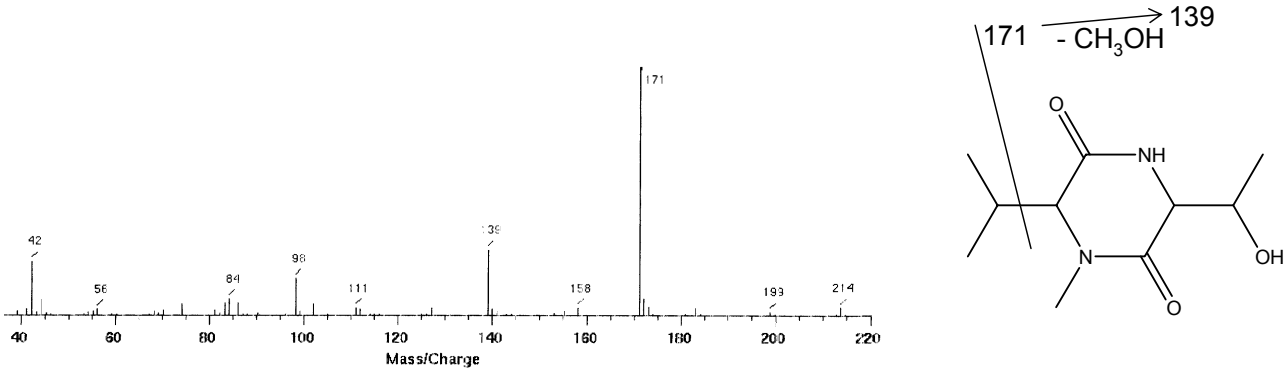
i,j-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 3)

figure 2-24 : spectre de masse et structure de VT 3



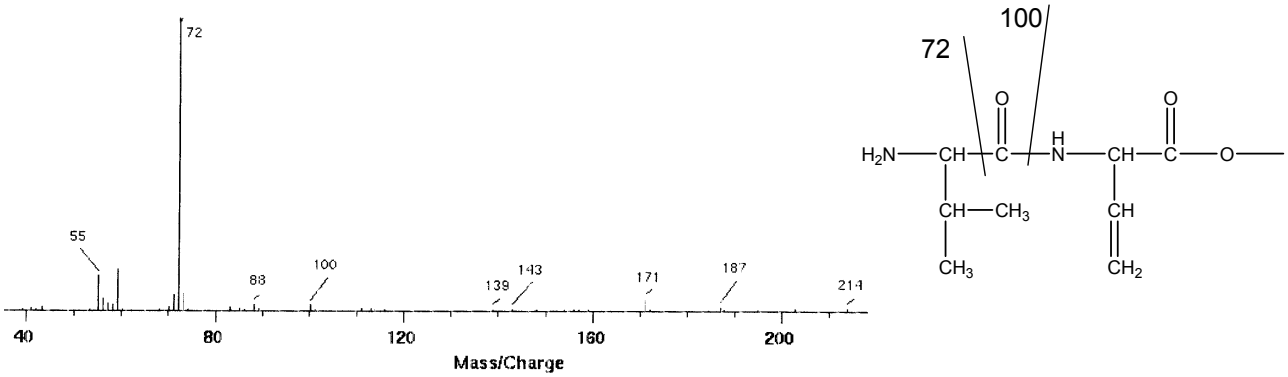
i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-methoxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 4) (tr: 48,54 min)

figure 2-25 : spectre de masse et structure de VT 4



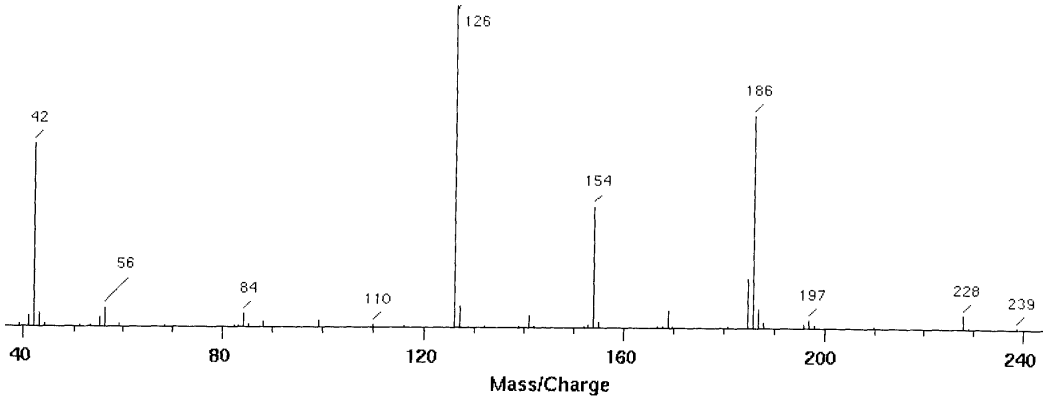
i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 5)

figure 2-26 : spectre de masse et structure de VT 5



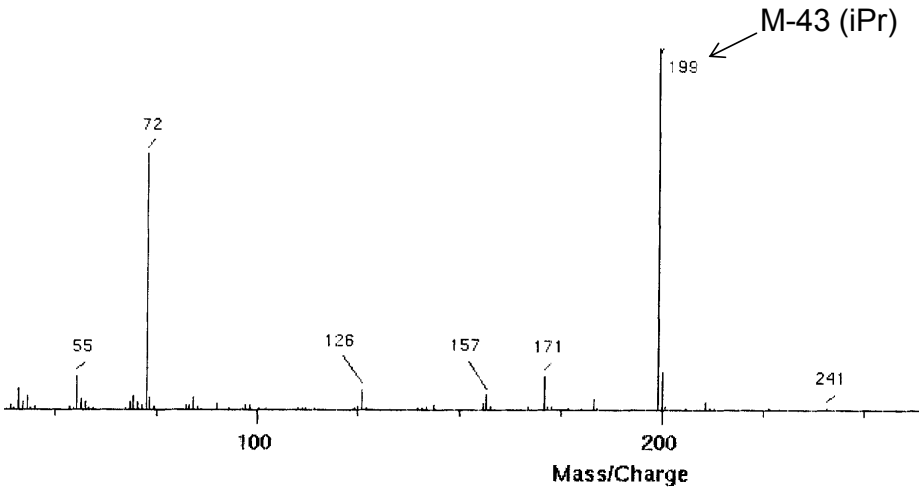
Methyl 2-(2-amino-3-methylbutanamido)but-3-enoate (VT 6) (tr: 54,32 min)

figure 2-27 : spectre de masse et structure de VT 6



Inconnu VT-VS 1

figure 2-28 : spectre de masse de VT-VS 1



Inconnu VT-VS 2

figure 2-29 : : spectre de masse de VT-VS 2

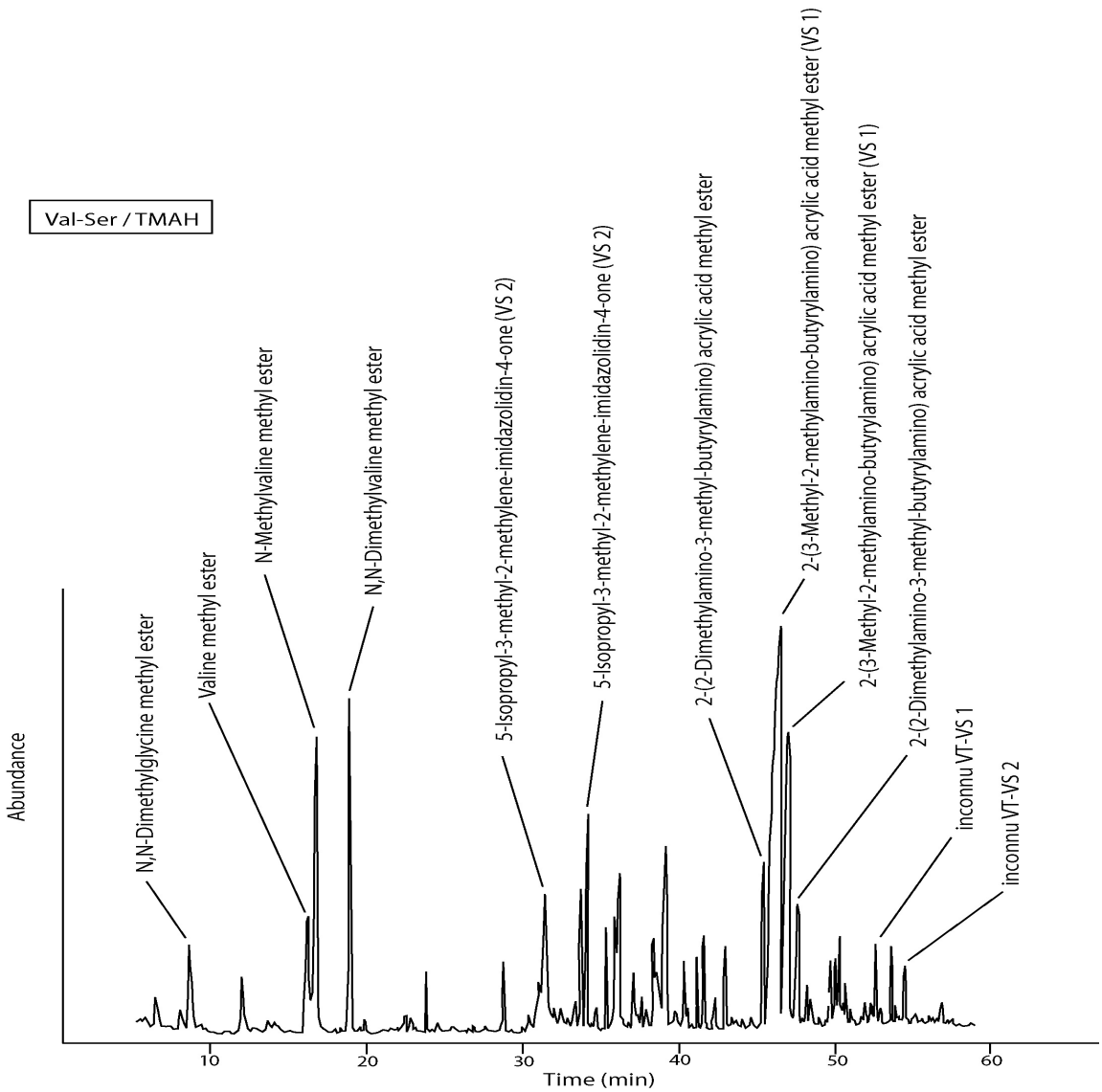


figure 2-30 : pyrochromatogramme de Val-Ser en présence de TMAH

tableau 2-7 : Produits principaux de la pyrolyse de Val-Ser en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Val	% Ser
46,45	100	**56**	155	113	156			214	2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1)		
47,04	43	**56**	155	113	156			214	2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1)		
16,86	27	**86**	102	42	55			145	N-Methylvaline methyl ester	100	
19,04	21	**100**	116	44	42	85	84	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester	15	
31,59	18	**72**	55	57	42	56	126	154	5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2)		
34,26	17	**112**	56	111	42			154	5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2)		
16,3	15	**72**	88	55				131	Valine methyl ester	100	
39,21	14	**126**	115	100	55	58	141				
45,52	10	**169**	127	56	185	86		228	2-(2-Dimethylamino-3-methyl-butyrylamino) acrylic acid methyl ester		
8,73	9	**58**	42	117				117	N,N-Dimethylglycine methyl ester		
47,63	8	**169**	56	127	185	126	42	228	2-(2-Dimethylamino-3-methyl-butyrylamino) acrylic acid methyl ester		
52,73	4	**126**	186	42	154	185	100	228	inconnu VT-VS 1		
54,56	4	**199**	72	200	171	55	157		inconnu VT-VS 2		
53,69	4	**199**	72	171	200	55	126		inconnu VT-VS 2		
28,85	4	**126**	55	142	82	41	59	185	2-((Dimethylamino)methyl)-5-isopropylimidazolidin-4-one (VS 3)	20	
23,82	2	**116**	102	42	56	59	161	161	N,N-Dimethyl-O-methylserine methyl ester		70

2.3.4. Pyrolyse de Val-Ser en présence de TMAH

La pyrolyse de Val-Ser, tout comme celle de Val-Thr, produit de nombreux produits lourds, qui éluent entre 35 et 60 min (figure 2-30, tableau 2-7).

Cependant, contrairement à Val-Thr, ce massif n'est pas dominé par des diketopiperazines, mais par des structures correspondant au dipeptide Val-Ser, dont la chaîne latérale de l'acide hydroxylé a subi une déshydratation. Ainsi le 2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1) constitue le produit de pyrolyse majoritaire, et son homologue supérieur est aussi détecté : le 2-(2-Dimethylamino-3-methyl-butyrylamino) acrylic acid methyl ester.

La présence de ce type de composés est liée à la réactivité du groupement hydroxyle. Il est cependant intéressant de noter que des structures homologues n'ont pas été identifiées parmi les produits de pyrolyse de Val-Thr. Ceci est vraisemblablement dû à une différence de réactivité entre les fonctions alcools primaires et secondaires.

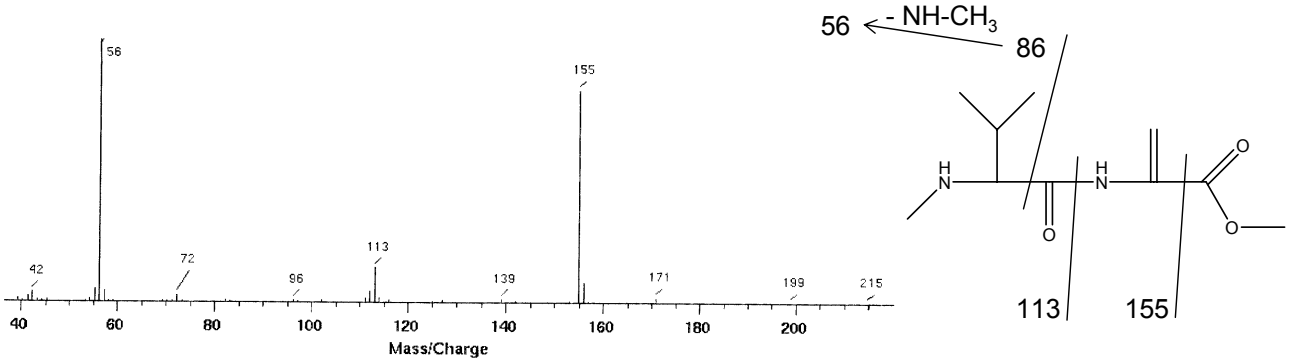
Un autre type de structure, très particulière, a été identifié pour deux autres produits de la pyrolyse de Val-Ser : la 5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2) et la 2-((Dimethylamino)methyl)-5-isopropylimidazolidin-4-one (VS 3). Cette dernière provient de la valine, puisqu'elle avait déjà été identifiée dans le pyrochromatogramme de cet acide aminé où elle était plus abondante. Pour le premier composé, la présence du groupe méthylidene indique la participation des deux acides aminés. Leur formation a été abordée dans le chapitre précédent et a aussi été observée dans Gly-Ser et Thr-Ser.

Contrairement à Val-Thr, un dérivé direct de l'acide aminé hydroxylé a été identifié parmi les produits de pyrolyse de Val-Ser : le N,N-Dimethyl-O-methylserine methyl ester mais en très faible proportion, alors qu'il représentait 70 % du pic majoritaire du pyrochromatogramme de la sérine. Comme dans le cas de Val-Thr, les dérivés méthylés de la valine ont été détectés, mais en plus fortes proportions que dans le cas de Val-Thr.

Enfin, deux composés déjà détectés (inconnu VT-VS 1 et inconnu VT-VS 2) dans le pyrochromatogramme de Val-Thr sont aussi détectés pour Val-Ser, mais en abondances plus faibles. Il pourrait s'agir de dérivés du dipeptide deshydraté ou de diketopiperazine à trois acides aminés, mais les spectres de masse n'ont pas permis de proposer une structure.

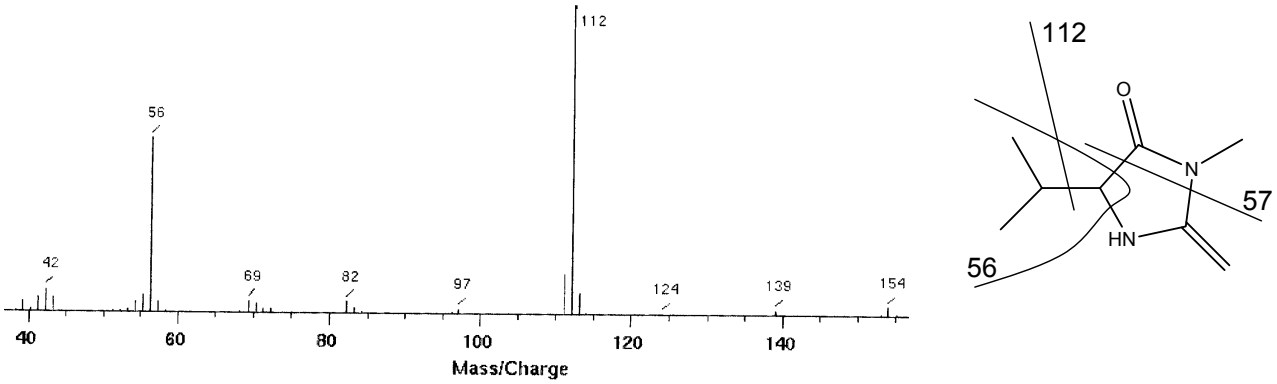
Il faut noter que le changement d'acide aminé hydroxylé, remplacement de la thréonine par la sérine, affecte considérablement le comportement pyrolytique du dipeptide, en particulier en bouleversant l'abondance des diketopiperazines. La réaction de cyclisation du dipeptide est

fortement diminuée avec la sérine. Cette moindre réactivité peut être reliée à l'importance de la réaction de déshydratation de la chaîne latérale de la sérine, qui n'est pas observée dans le cas de la thréonine. La même tendance, bien que moins marquée, a été observée par Hendricker et Voorhees (1996) en comparant Gly-Thr et Gly-Ser. Ils notent la tendance inverse pour Ser-Gly et Thr-Gly.



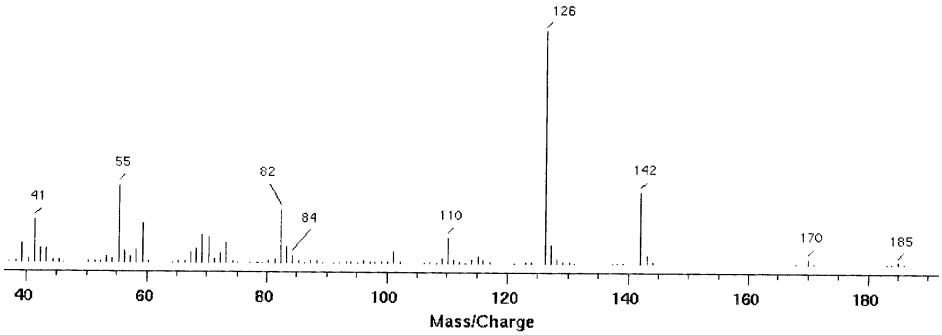
2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1) (tr: 46,45 min)

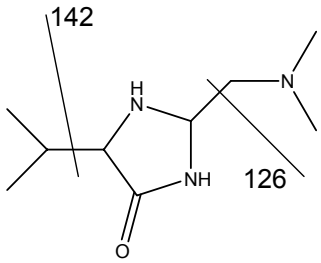
figure 2-31 : spectre de masse et structure de VS 1



5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2) (tr: 34,26 min)

figure 2-32 : spectre de masse et structure de VS 2





2-((Dimethylamino)methyl)-5-isopropylimidazolidin-4-one (VS 3)

figure 2-33 : spectre de masse et structure de VS 3

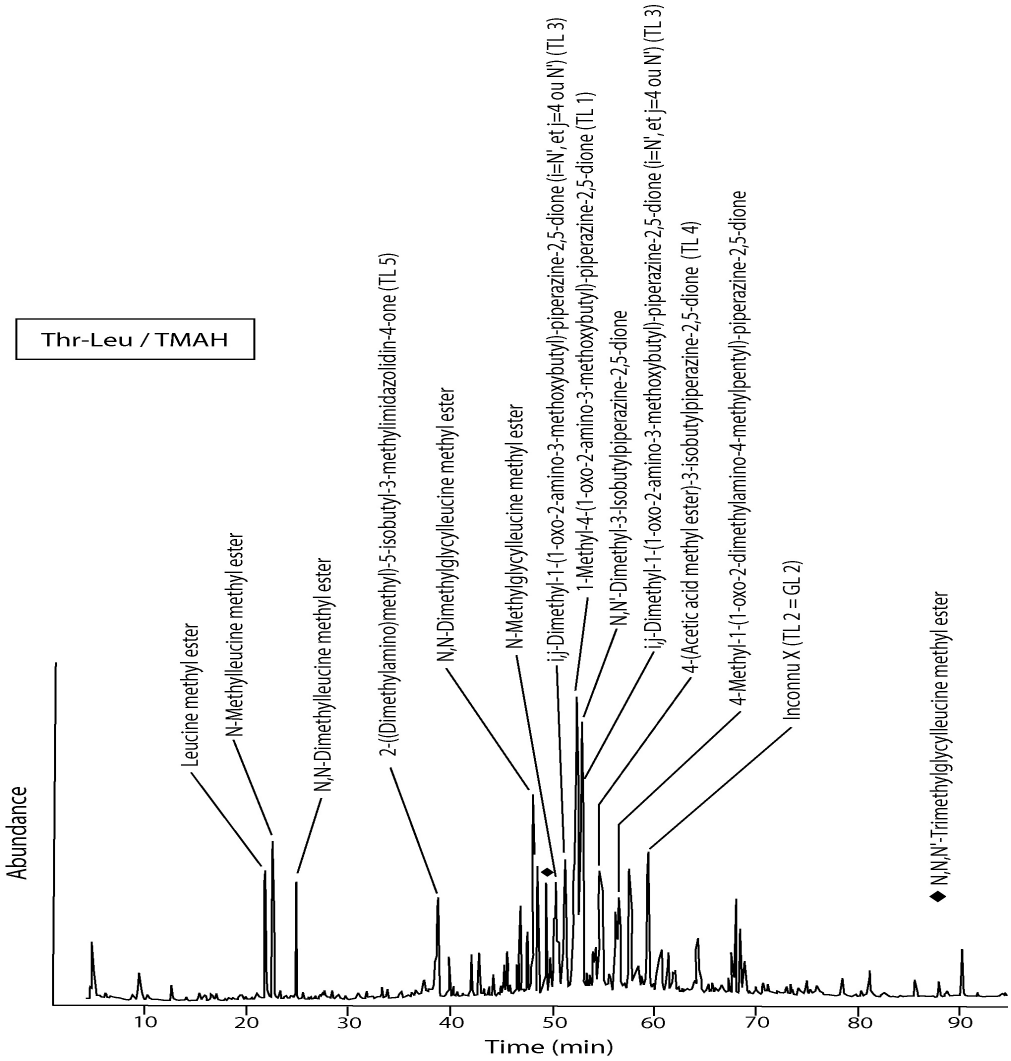


figure 2-34 : pyrochromatogramme de Thr-Leu en présence de TMAH

tableau 2-8 : Produits principaux de la pyrolyse de Thr-Leu en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Thr	% Leu
52,69	100	**71**	99	187	184	72	41	243 *	1-Methyl-4-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (TL 1)		
53,07	51	**142**	113	141	44	42	57	198 *	N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione		
50,51	24	**44**	216	86				216	N-Methylglycylleucine methyl ester		
48,24	24	**58**	42					230 *	N,N-Dimethylglycylleucine methyl ester		
59,55	20	**42**	131	86	56	213	98	255	Inconnu X (TL 2 = GL 2)		
56,74	20	**42**	57	210	154	71	269	269	4-Methyl-1-(1-oxo-2-dimethylamino-4-methylpentyl)-piperazine-2,5-dione		
53,19	19	**69**	85	257	182	112	70	257 *	i,j-Dimethyl-1-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (i=N', et j=4 ou N') (TL 3)		
38,82	19	**112**	154	115	69	41	156	213 *	2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one (TL 5)		100
22,70	18	**100**	58	44	42	102		159 *	N-Methylleucine methyl ester		63
51,45	17	**71**	97	42	142	198	171	257	i,j-Dimethyl-1-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (i=N', et j=4 ou N') (TL 3)		
21,95	15	**86**	44	88	43	41	42	145	Leucine methyl ester		90
54,94	14	**115**	183	186	154	113	42	242 *	4-(Acetic acid methyl ester)-3-isobutylpiperazine-2,5-dione (TL 4)		
49,55	13	**58**	42	114				244	N,N,N'-Trimethylglycylleucine methyl ester		
24,96	11	**114**	72	58	116			173 *	N,N-Dimethylleucine methyl ester		47
9,50	6	**55**	41	43	54	57	82	83	3-Methylbutanenitrile		3
8,79	1	**58**	117	42				117	2-(N,N-Dimethylamino)ethanoic acid methyl ester	100	

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

2.3.5. Pyrolyse de Thr-Leu en présence de TMAH

Il s'agit d'un dipeptide dont la structure est proche des dipeptides précédents (Val-Thr et Val-Ser) : un acide aminé aliphatique lié à un acide aminé hydroxylé, bien que l'acide aminé hydroxylé soit cette fois-ci engagé par sa fonction acide, alors qu'il l'était par sa fonction amine dans les cas précédents.

La majorité des produits de pyrolyse de Thr-Leu éluent entre 40 et 70 minutes (figure 2-34, tableau 2-8). Le composé principal est la 1-Methyl-4-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (TL 1), dont le noyau diketopiperazine ne porte pas de chaîne latérale et est engagé dans une liaison amide avec une thréonine, comme c'est aussi le cas de la i,j-Dimethyl-1-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (i=N', et j=4 ou N') (TL 3) qui diffère du composé précédent par la position des groupes méthyles. On suppose que le composé inconnu X (TL 2), déjà détecté dans Gly-Leu, est également une diketopiperazine constituée de trois acides aminés, mais le spectre de masse n'a pas permis de proposer une structure. Les autres produits de pyrolyse importants sont d'autres diketopiperazines, telles que la N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione qui a perdu la chaîne latérale de la thréonine, et la 4-(Acetic acid methyl ester)-3-isobutylpiperazine-2,5-dione (TL 4), diketopiperazine qui porte également un substituant sur l'azote mais résultant de la cyclisation du dipeptide et de l'acylation d'une amine. La formation de ces deux types particuliers de diketopiperazines est discutée en fin de chapitre.

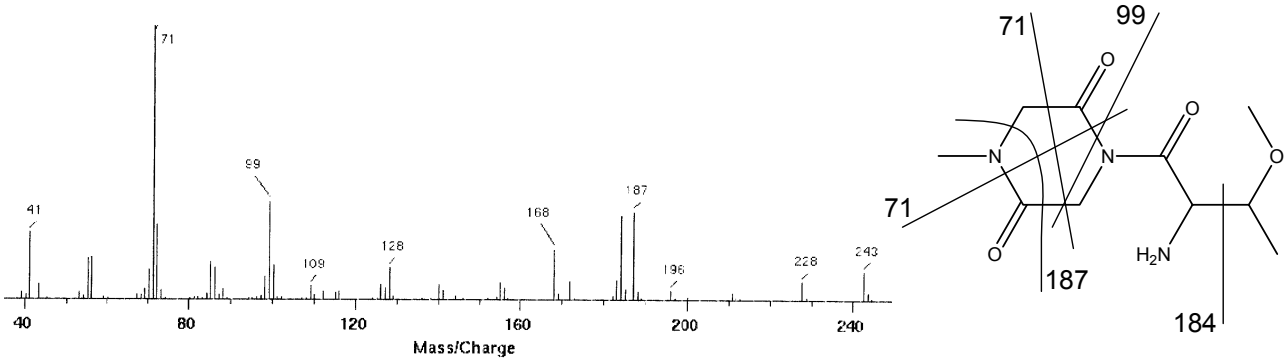
Parmi les produits de pyrolyse abondants, on distingue aussi plusieurs dérivés du dipeptide qui a perdu la chaîne latérale de la thréonine : le N-Methylglycylleucine methyl ester, et le N,N-Dimethylglycylleucine methyl ester et le N,N,N'-Trimethylglycylleucine methyl ester.

Les principaux produits de la pyrolyse de la leucine sont également présents parmi les produits de pyrolyse de Thr-Leu. Le produit majoritaire de la pyrolyse de la leucine, le 2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one (TL 5), reste significatif dans la pyrolyse de Thr-Leu. De plus, comme observé pour la valine dans Val-Thr et Val-Ser, les dérivés méthylés de la leucine ne sont pas négligeables dans le pyrochromatogramme de Thr-Leu. Bien que présent en faible proportion, le 3-Methylbutanenitrile, qui est formé par la rupture de la liaison peptidique suivie de la décarboxylation de la leucine, a été détecté dans le pyrochromatogramme de Thr-Leu. A l'exception de la leucine methyl ester, les proportions relatives des produits de pyrolyse de la leucine sont conservées dans la pyrolyse du dipeptide Thr-Leu.

Aucun produit de pyrolyse de la thréonine n'a été détecté dans le pyrochromatogramme du dipeptide Thr-Leu, sauf le majoritaire présent en trace ici.

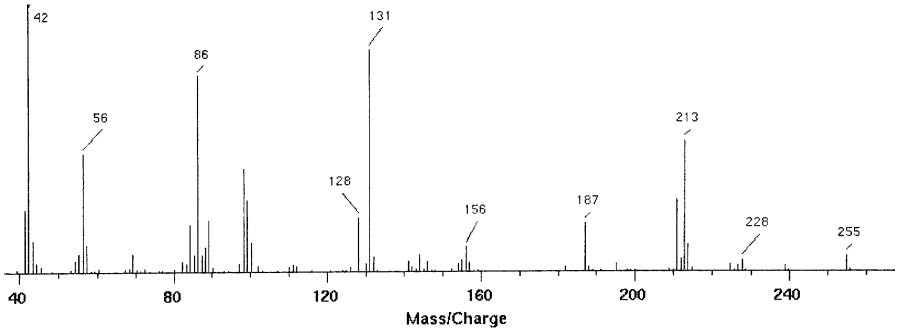
Il est intéressant de noter que la pyrolyse de Thr-Leu mène à la production d'un grand nombre de diketopiperazines formées de trois acides aminés. Ceci n'est pas le cas pour Val-Thr dont les produits majoritaires sont des diketopiperazines classiques.

Cependant, ces deux dipeptides sont constitués de la thréonine et d'un acide aminé aliphatique, valine ou leucine, qui sont des homologues. La principale différence entre Thr-Leu et Val-Thr est la position de la thréonine, N ou C-terminale. La formation de dérivés de cyclisation plus complexes n'est observée que lorsque la thréonine est en position N-terminale. Ces remarques rejoignent celles de Hendricker et Voorhees (1996) qui ont observé une production de diketopiperazine plus importante dans Gly-Thr que dans Gly-Ser, et plus importante dans Ser-Gly que dans Thr-Gly. Nous observons donc la même tendance.



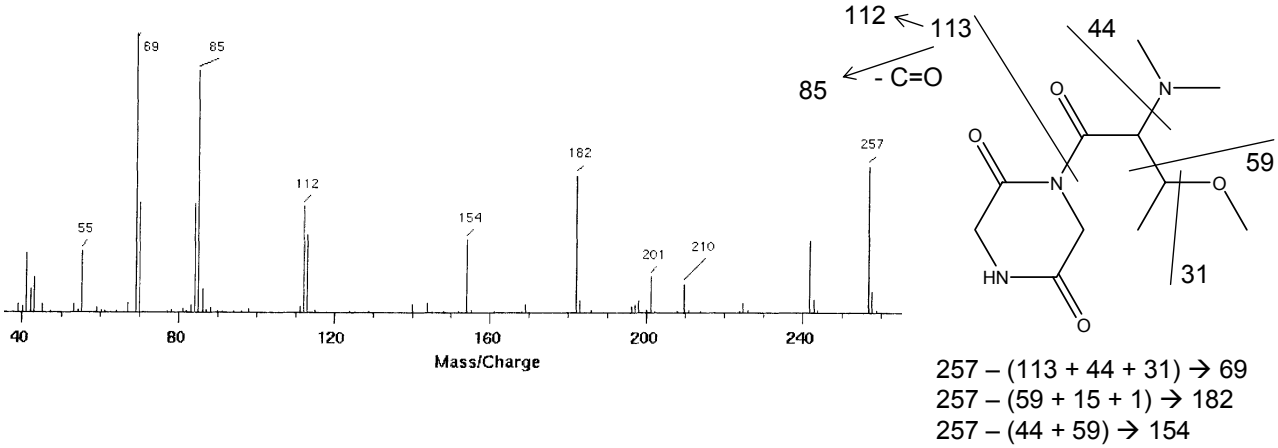
1-Methyl-4-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (TL 1)

figure 2-35 : spectre de masse et structure de TL 1



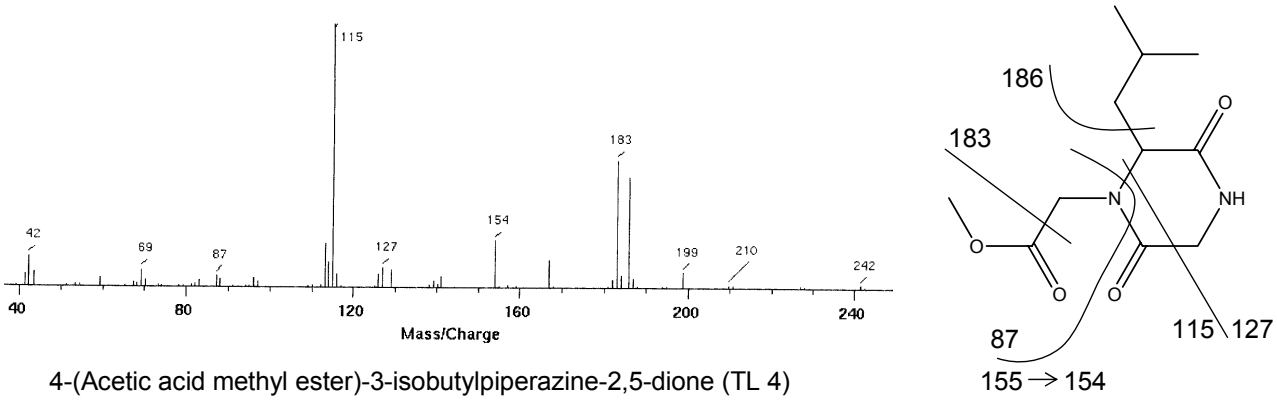
Inconnu X (GL 2)

figure 2-36 : spectre de masse et structure de TL 2



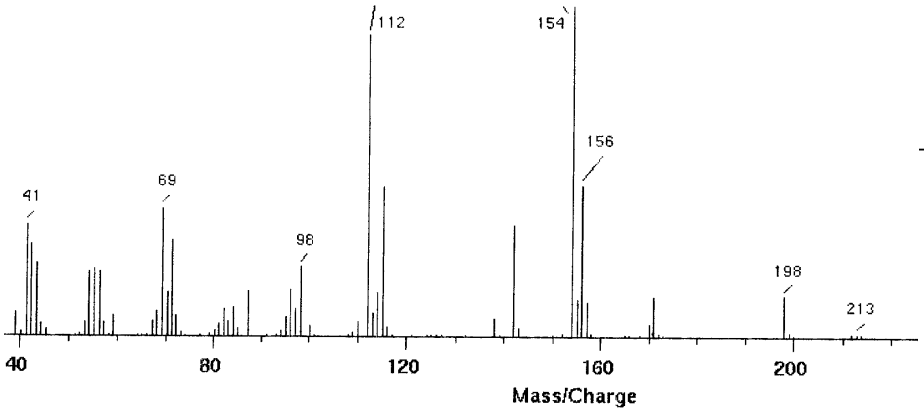
i,j-Dimethyl-1-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (TL 3) (tr: 53,19 min)

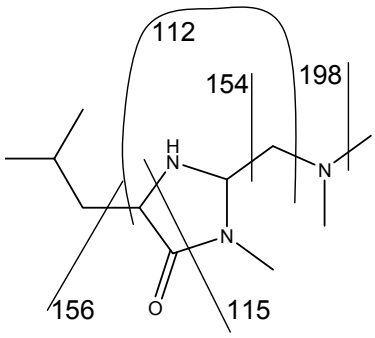
figure 2-37 : spectre de masse et structure de TL 3



4-(Acetic acid methyl ester)-3-isobutylpiperazine-2,5-dione (TL 4)

figure 2-38 : spectre de masse et structure de TL 4





2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one (TL 5)

figure 2-39 : spectre de masse et structure de TL 5

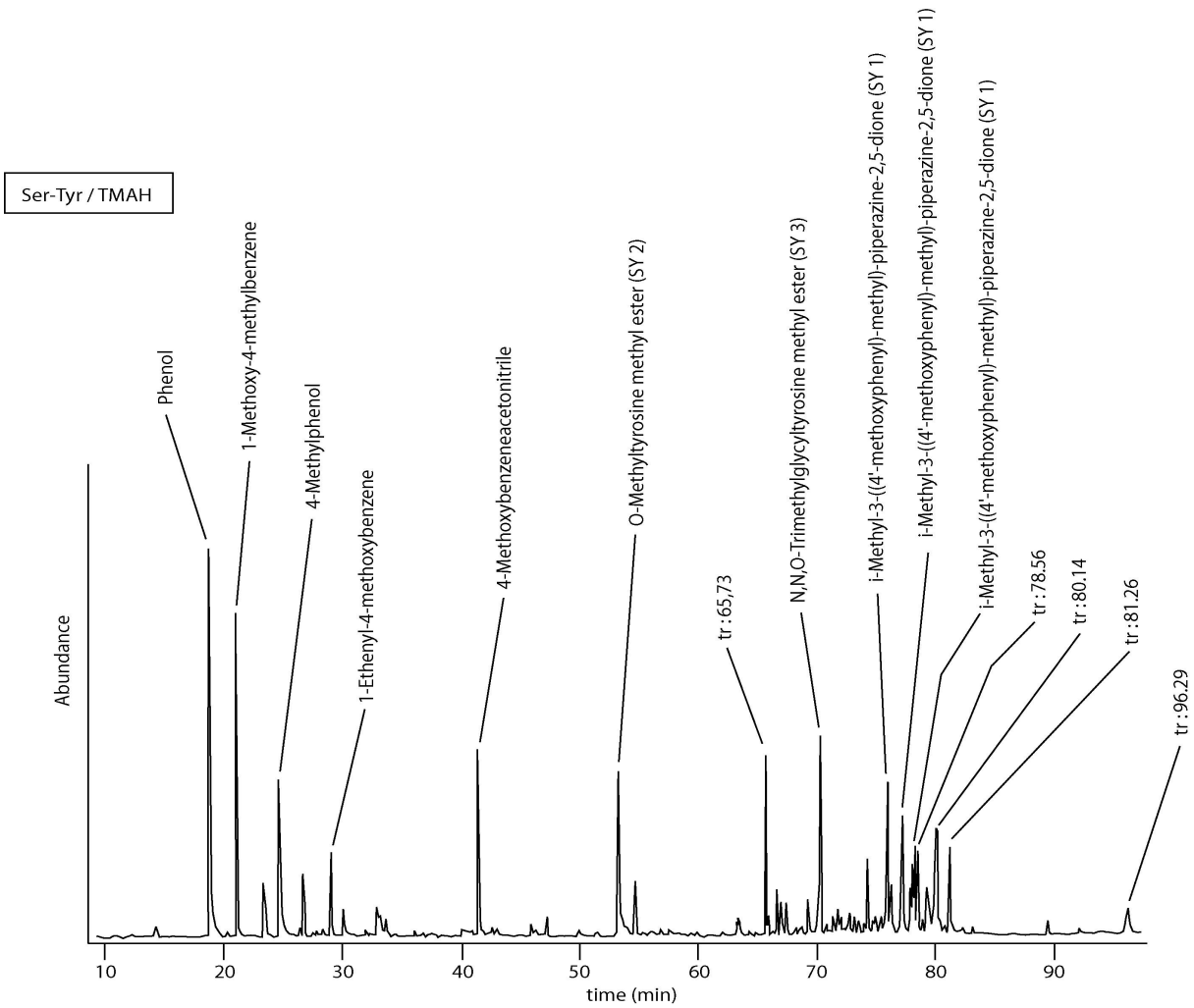


figure 2-40 : pyrochromatogramme de Ser-Tyr en présence de TMAH

tableau 2-9 : Produits principaux de la pyrolyse de Ser-Tyr en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Ser	% Tyr
18,89	100	**94**	66	65	39	55		94	Phenol		7
21,21	47	**122**	121	77	107	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene		57
24,74	45	**107**	108	77	79	80	39	108	4-Methylphenol		14
77,25	45	**121**	248	122	77			248	i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1)		
53,27	44	**121**	150	122	88	209		209	O-Methyltyrosine methyl ester (SY 2)		
76,04	36	**121**	248	122	77			248	i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1)		
41,46	33	**147**	146	77	107	132	116	108	4-Methoxybenzeneacetonitrile		12
70,32	28	**58**	121	294				294	N,N,O-Trimethylglycyltyrosine methyl ester (SY 3)		
78,25	27	**121**	122	77	248			248	i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1)		
80,14	26	**260**	217	58	132	245	77	260	homologue de l'inconnu X en M+14		
65,73	23	**259**	274	121	231	56	77				
81,26	21	**246**	203	132	44	147	148	246	inconnu X		
29,08	20	**134**	119	91	65	39		134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene		48
96,29	15	**221**	147	355	73	281	429				
78,56	15	**274**	231	146	161	275	273	274	homologue de l'inconnu X en M+28		
78,03	14	**192**	121	161	193	306	77	306	N,N-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-6-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 4)		
23,44	13	**108**	107	79	77	90	80	108	3-Methylphenol		
26,82	9	**121**	136	91	77	122		136	1-Ethyl-4-methoxybenzene		34
30,05	9	**107**	122	77	108	91		122	2-Ethylphenol		2
54,76	7	**116**	178	42	56	84		237	N,N-dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester		79
66,66	7	**121**	242					242	1,2-Di(paramethoxyphenyl)ethane		11
14,30	3	**108**	78	65	77	39	93	108	Methoxybenzene		9

2.4. Dipeptide aromatique hydroxylé

2.4.1. Pyrolyse de Ser-Tyr en présence de TMAH

Le chromatogramme de la pyrolyse de Ser-Tyr (figure 2-40) est dominé par les produits de pyrolyse de la tyrosine (tableau 2-9). Le composé majoritaire est le phénol, composé dérivé de la tyrosine, mais qui n'est produit qu'en faible abondance par la pyrolyse de l'acide aminé libre. Deux autres produits de pyrolyse de la tyrosine font partie des produits majoritaires : le 1-Methoxy-4-methylbenzene et le 4-Methylphenol.

Parmi les composés de pyrolyse de Ser-Tyr, d'autres produits provenant de la pyrolyse de la tyrosine ont été identifiés. Cependant, de manière générale, les proportions relatives ne sont pas conservées entre l'acide aminé libre et le peptide. Ainsi les dérivés directs de la tyrosine, produits majoritaires de la pyrolyse de la tyrosine, sont peu, voire non détectés : l'ester méthylique de la N,N-dimethyl-O-methyltyrosine, qui faisait partie des produits majoritaires de la pyrolyse de la tyrosine devient minoritaire. Seul le O-Methyltyrosine methyl ester (SY 2) est abondant, mais il n'était pas détecté dans la pyrolyse de la tyrosine seule. De même, les principaux produits de la pyrolyse de la tyrosine tels que le 1-Methoxy-4-methylbenzene et le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene qui étaient détectés à des abondances équivalentes dans la pyrolyse de la tyrosine sont détectés à des abondances différentes : le premier reste très abondant alors que le second voit son abondance diminuer fortement.

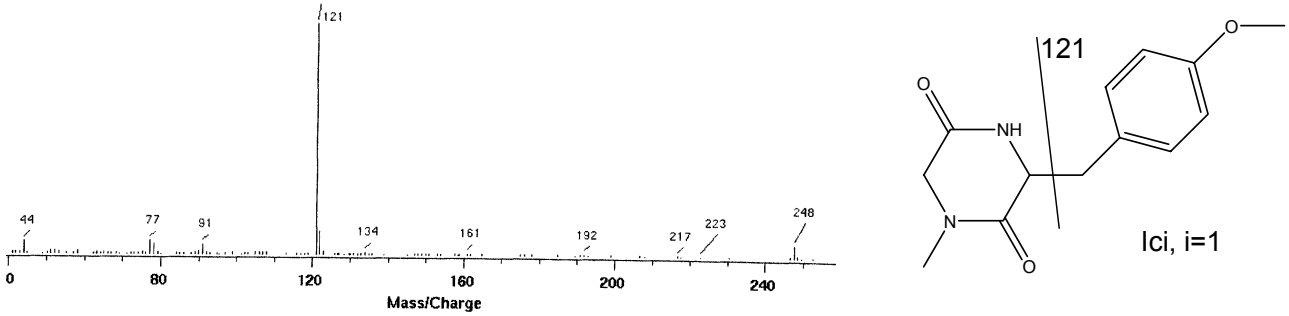
Parmi les composés très abondants, différentes diketopiperazines ont été identifiées : la i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1) à plusieurs reprises, -dans laquelle la chaîne latérale de la serine a été éliminée-, et la diketopiperazine entièrement méthylée , la N,N-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-6-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 4).

D'autre part, trois composés importants non identifiés, éluent après les diketopiperazines. Compte tenu des résultats obtenus précédemment pour d'autres dipeptides, les temps de rétention semblent compatibles avec des produits de cyclisation complexes.

Par ailleurs, un seul dérivé du dipeptide a été détecté : il s'agit du N,N,O-Trimethylglycyltyrosine methyl ester (SY 3), obtenu par homolyse de la chaîne latérale de la sérine.

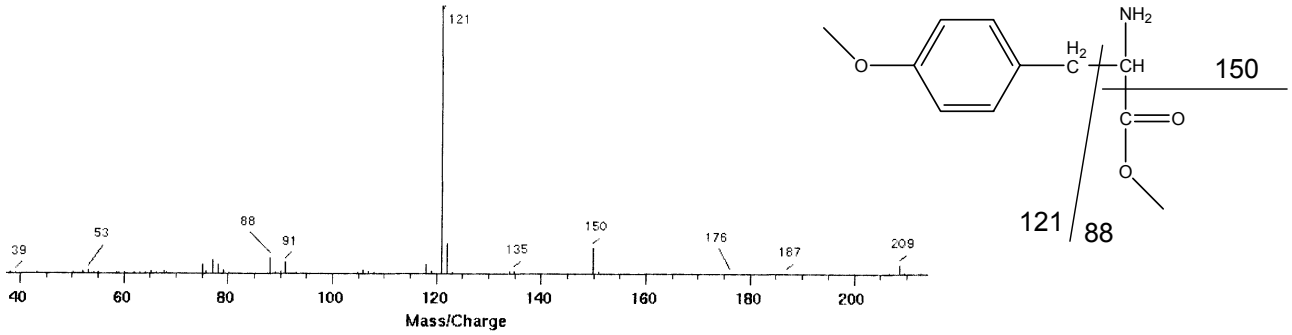
Ainsi, outre les produits aromatiques caractéristiques de la tyrosine, les diketopiperazines sont une fois de plus très abondantes dans le pyrochromatogramme de Ser-Tyr.

Notons qu'aucun produit de pyrolyse de la serine n'a été détecté parmi ceux de la pyrolyse du dipeptide Ser-Tyr. Parmi les produits de pyrolyse identifiés, seule la diketopiperazine SY 4 révèle la présence de la serine dans le dipeptide.



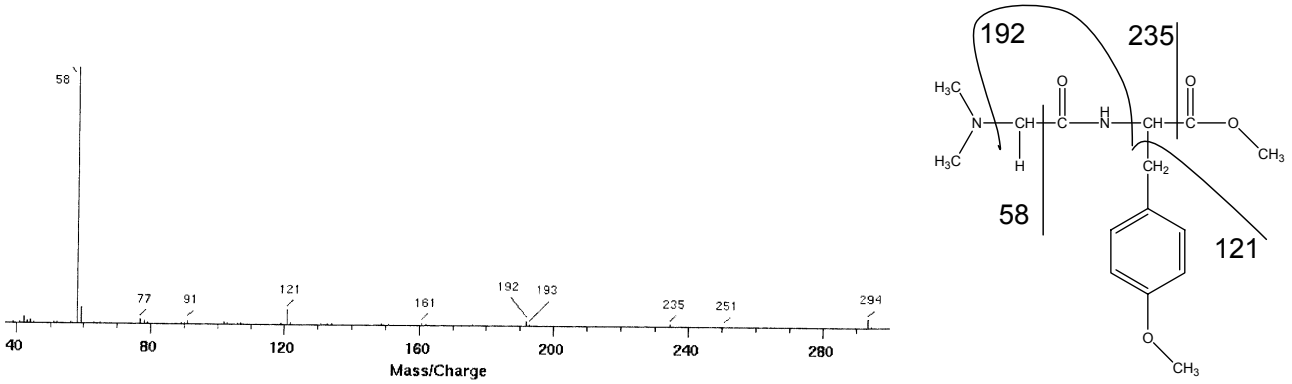
i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1) (tr : 77,25)

figure 2-41 : spectre de masse et structure de SY 1



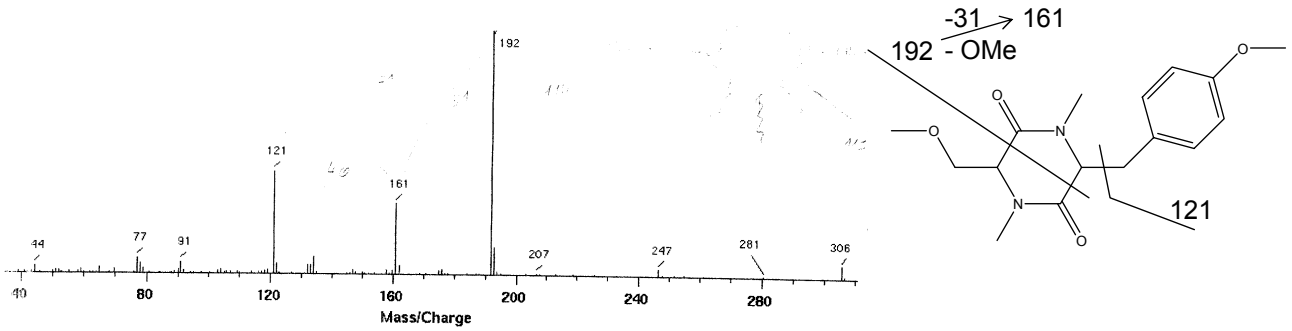
O-Methyltyrosine methyl ester (SY 2)

figure 2-42 : spectre de masse et structure de SY 2



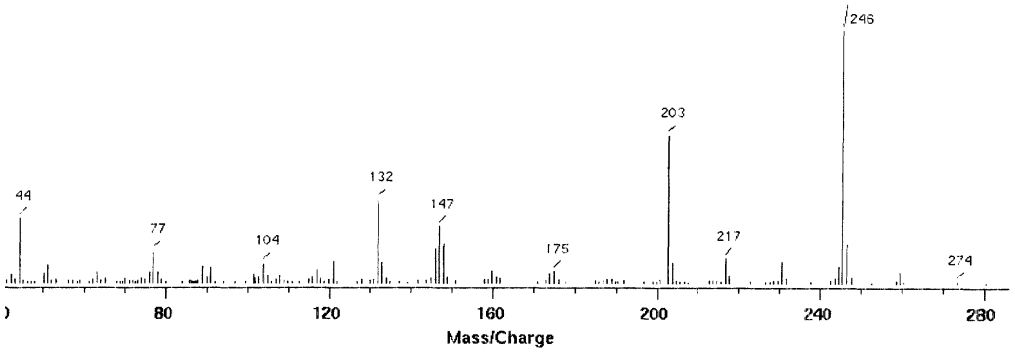
N,N,O-Trimethylglycyltyrosine methyl ester (SY 3)

figure 2-43 : spectre de masse et structure de SY 3



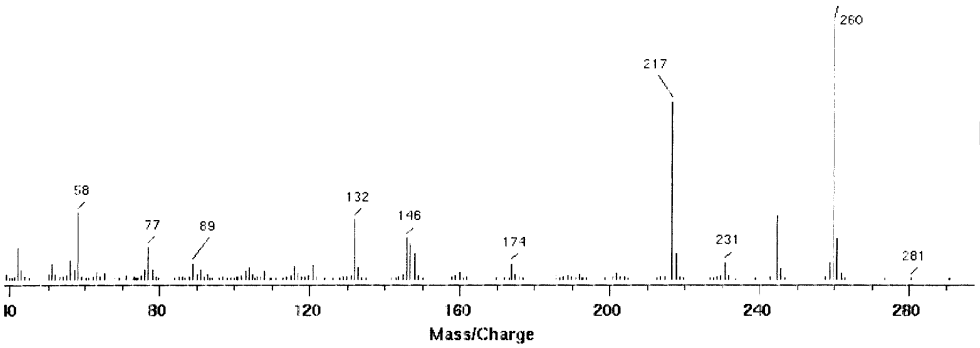
N,N-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-6-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 4)

figure 2-44 : spectre de masse et structure de SY 4



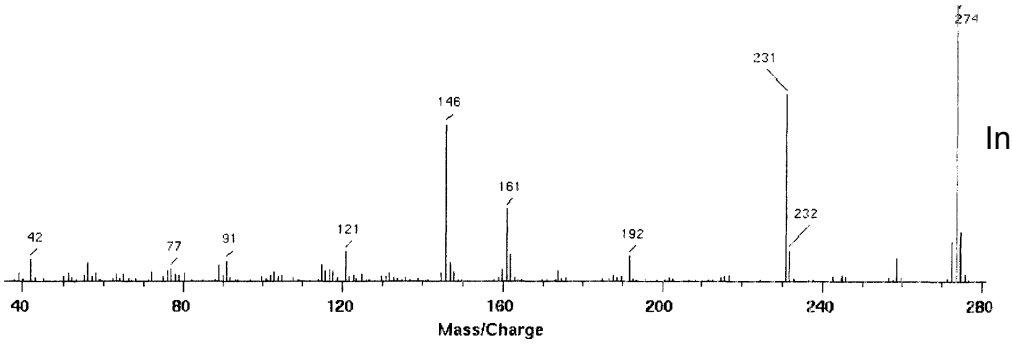
Inconnu X

figure 2-45 : spectre de masse et structure du composé inconnu X



Inconnu X + 14

figure 2-46 : spectre de masse et structure du composé inconnu X+14



Inconnu X + 28

figure 2-47 : spectre de masse et structure du composé inconnu X+28

2.5. Comparaison de dipeptides symétriques

Pour mieux comprendre le comportement pyrolytique des acides aminés engagés dans une liaison peptidique, il nous a semblé pertinent de nous intéresser à des dipeptides symétriques. Nous avons comparé les produits de pyrolyse de couples d'acides aminés de type AA_1-AA_2 / AA_2-AA_1 afin de déterminer si la position N ou C-terminale de l'acide influait sur les mécanismes de pyrolyse. Hendricker et Voorhees (1996) ont déjà observé des différences de comportement pyrolytique pour les 39 dipeptides de Gly, en particulier sur la formation de diketopiperazines, comme mentionné précédemment pour Gly-Ser, Ser-Gly, Thr-Gly et Gly-Thr.

2.5.1. Val-Phe et Phe-Val

En comparant le pyrochromatogramme obtenu pour Phe-Val (figure 2-53) à celui déjà décrit pour Val-Phe (paragraphe 1.2.1, figure 2-52) respectivement, nous observons dans les deux cas la prédominance de produits de pyrolyse éluant entre 65 à 80 minutes, ainsi que quelques pics relativement isolés avant ces massifs. Cependant, les produits de pyrolyse de ces deux dipeptides sont différents (tableau 2-10, tableau 2-11).

Dans le cas de Val-Phe, les principaux composés obtenus sont des produits de cyclisation, notamment formés à partir de trois acides aminés, les dérivés méthylés du dipeptide initial étant présent en faible proportion. Inversement, les dérivés méthylés du dipeptide Phe-Val (FV 4) dominent les produits de cyclisation.

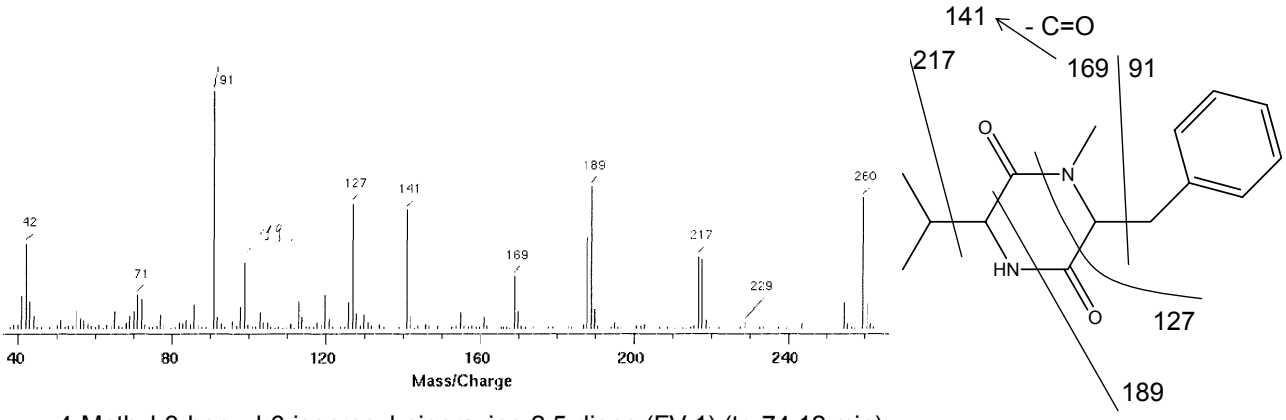
Quand la phénylalanine est en position C-terminale, on observe une plus grande réactivité de la phénylalanine, qui influence la formation de composés plus complexes.

Notons que le mécanisme de formation des diketopiperazines efface l'ordre des acides aminés dans le dipeptide et celles-ci sont donc communes aux deux dipeptides. Ainsi la 3-Benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione et la N,N'-Dimethyl-3-Benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 2) sont observées dans les deux cas, avec cependant une différence importante dans l'abondance relative. Toutes les diketopiperazines portent les chaînes latérales des deux acides aminés et conservent donc l'information initiale. Toutefois, un certain nombre de diketopiperazines (FV 1, FV 3) ne sont pas détectées dans Val-Phe.

En ce qui concerne les dérivés méthylés du dipeptide, malgré des différences dans les abondances relatives, la correspondance entre les deux pyrochromatogrammes est réelle. L'ester méthylique N-méthylé du dipeptide (le N-Methyl-phenylalanylvaline methyl ester pour Phe-Val et le N-Methyl-valylphenylalanine methyl ester pour Val-Phe) est identifié dans les deux chromatogrammes. L'homologue supérieur est également détecté dans les deux cas. De plus, les homologues moins méthylés ont aussi été observés pour Phe-Val.

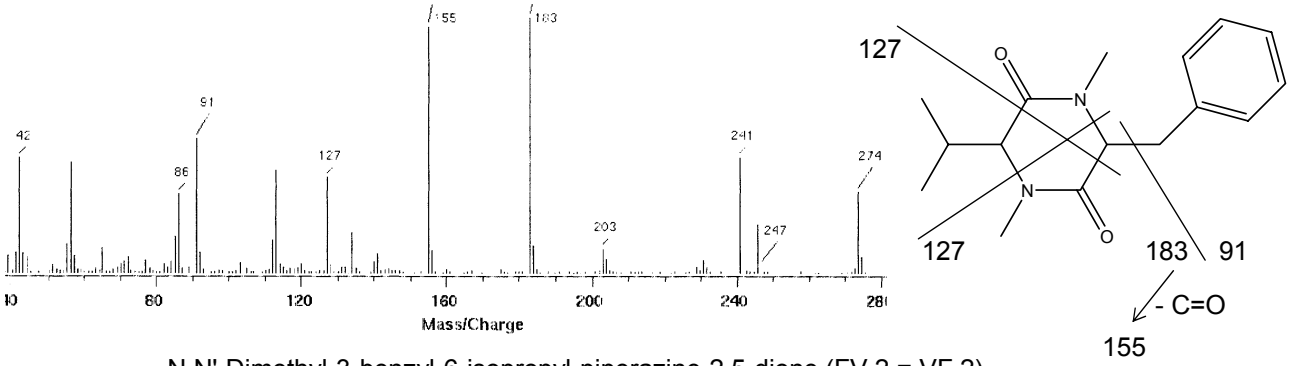
Par ailleurs, des composés caractéristiques de la pyrolyse de la phénylalanine sont détectés dans chacun des deux pyrochromatogrammes. Cependant, il ne s'agit pas des mêmes produits et ils sont plus nombreux dans Phe-Val. Ainsi, le toluène est le produit majoritaire du pyrochromatogramme de Phe-Val, dans lequel on distingue aussi de l'éthenylbenzène, du benzenacetonitrile et du 1,2-Diphenylethane. D'autre part, la pyrolyse de Val-Phe produit du benzaldéhyde et de l'ester méthylique de l'acide benzoïque.

Les composés majoritaires des acides aminés individuels ne sont présents qu'en faible quantité, voire ne sont pas détectés. Les dérivés méthylés de la phénylalanine qui représentaient une partie importante des produits majoritaires de la pyrolyse de l'acide aminé libre sont très faiblement détectés aussi bien dans la pyrolyse de Val-Phe que dans celle de Phe-Val. Les produits de dérivation directe de la valine, qui étaient les produits majoritaires dans la pyrolyse de cet acide aminé, ne sont pas détectés dans Val-Phe et faiblement dans Phe-Val. Notons enfin que les dérivés directs de la valine sont observés quand l'acide aminé est en position C-terminale, alors que les dérivés directs de méthylation de la phénylalanine sont observés quelle que soit sa position : N-terminale ou C-terminale.



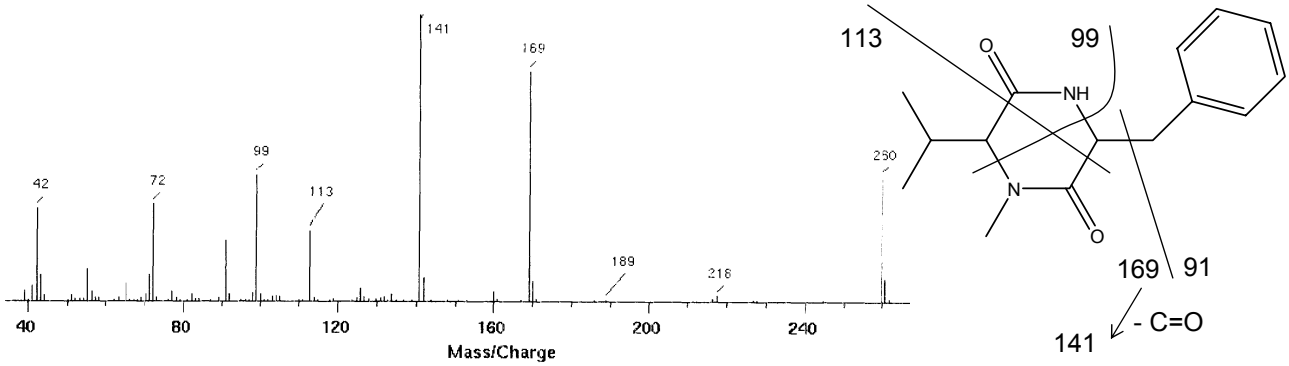
4-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 1) (tr: 74,12 min)

figure 2-48 : spectre de masse et structure de FV 1



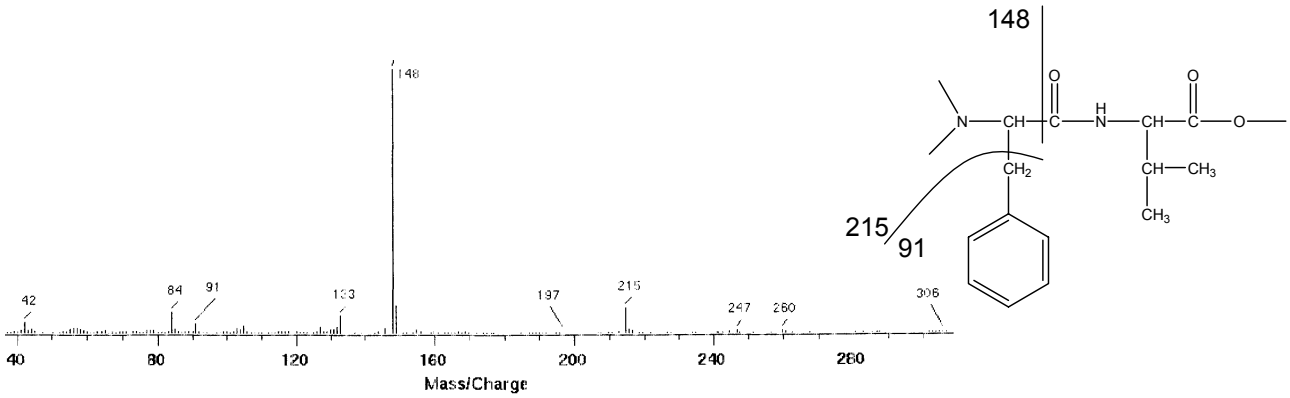
N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 2 = VF 2)

figure 2-49 : spectre de masse et structure de FV 2



1-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 3)

figure 2-50 : spectre de masse et structure de FV 3



N,N-Dimethyl-phenylalanylvaline methyl ester (FV 4)

figure 2-51 : spectre de masse et structure de FV 4

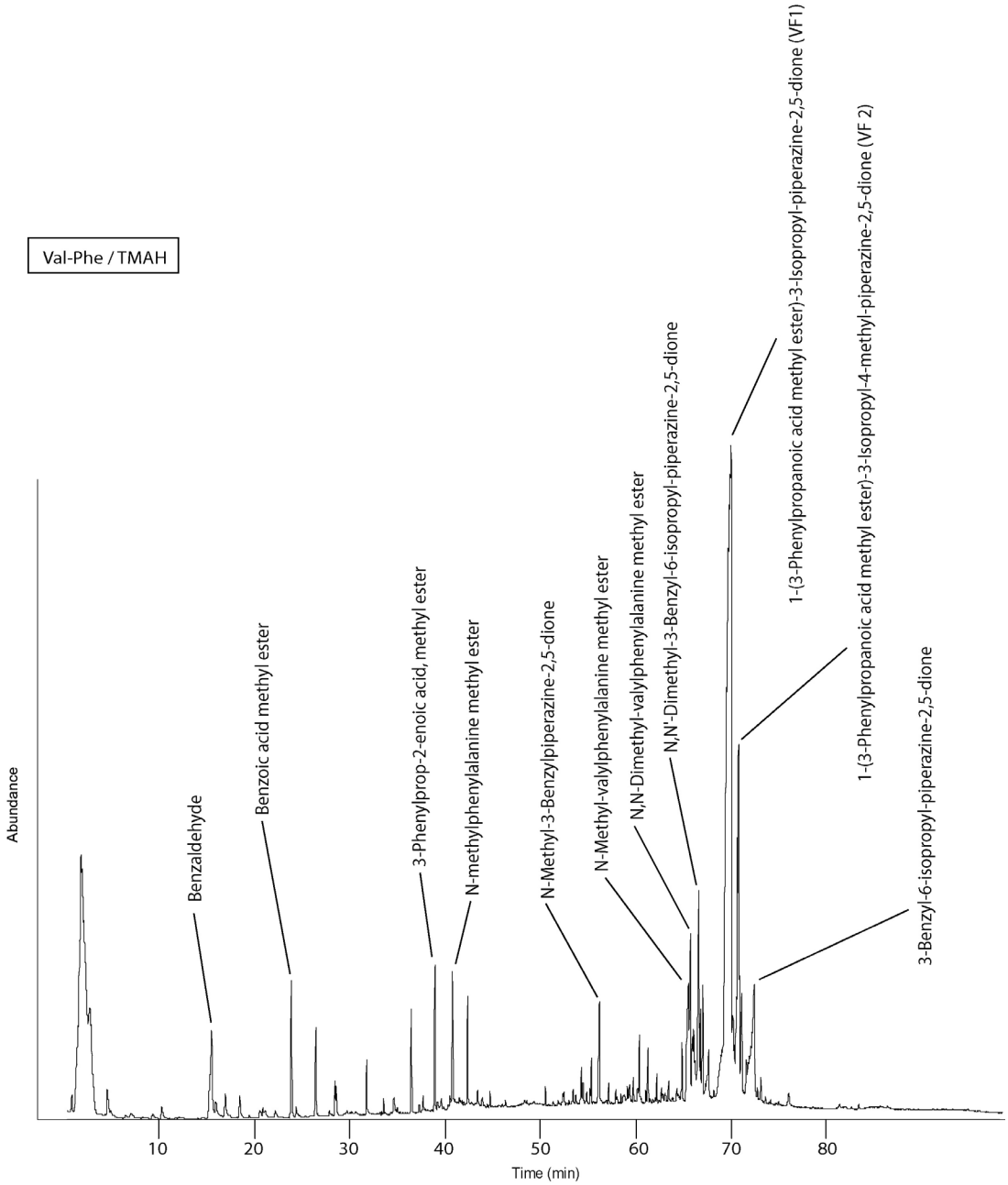


figure 2-52 : pyrochromatogramme de Val-Phe en présence de TMAH

tableau 2-10 : Produits principaux de la pyrolyse de Val-Phe en présence de TMAH

tr (min)	A. R. S	m/z						Masse molaire (g/mol)	composés	% Val	% Phe	% Phe/Val
70,1	100	**162**	114	131	163	161	104	318 *	1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 1)			
70,9	22	**155**	305	183	42	72	113	332 *	1-(3-Phenylpropanoic acid methyl ester)-3-isopropyl-4-methyl-piperazine-2,5-dione			
15,6	10	**105**	106	77	51			106	Benzaldehyde			
72,6	9	**91**	127	246	162	72		246	3-Benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione			47
66,8	9	**155**	183	113	86	42		274	N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (VF 2 = FV 2)			10
65,7	8	**86**	87	71	55	189		292 *	N-Methyl-valylphenylalanine methyl ester			
65,9	5	**86**	100	55	71	189		306 *	N,N-Dimethyl-valylphenylalanine methyl ester (VF3)			
24	5	**105**	77	136	51			136	Benzoic acid methyl ester			
40,9	5	**102**	134	91	77			193 *	N-Methylphenylalanine methyl ester		100	4
56,3	4	**127**	91	42	218			218 *	N-Methyl-3-benzylpiperazine-2,5-dione			
39,1	4	**131**	103	162	161	77		162 *	3-Phenylprop-2-enoic acid, methyl ester		2	

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

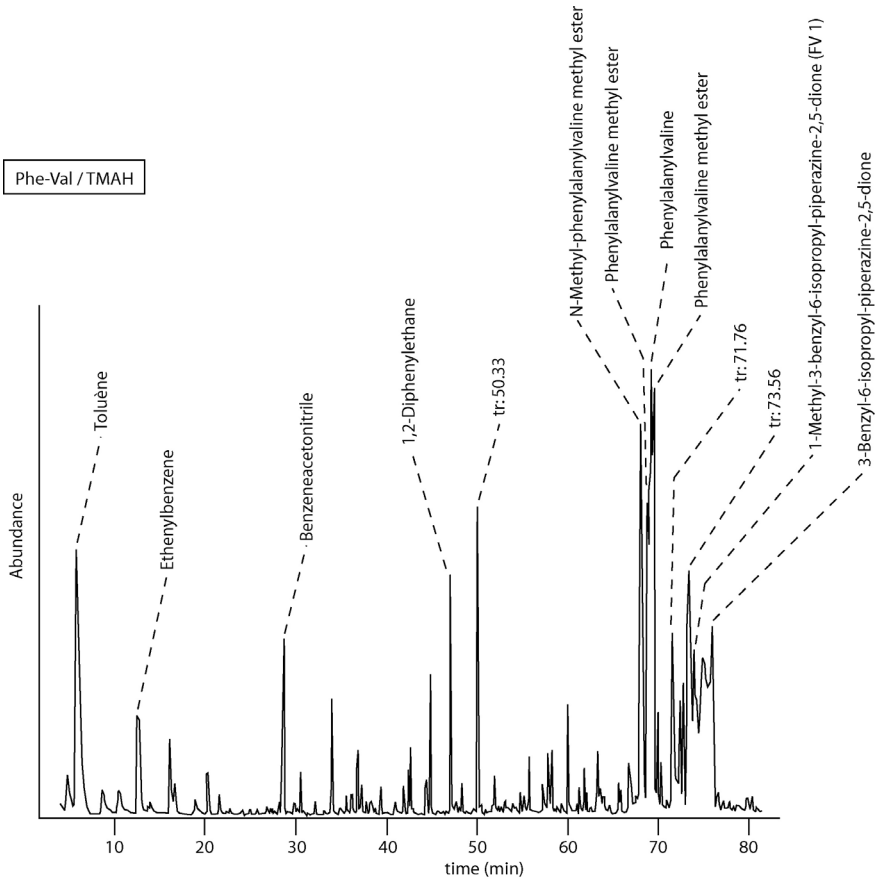


figure 2-53 : pyrochromatogramme de Phe-Val en présence de TMAH

tableau 2-11 : Produits principaux de la pyrolyse de Phe-Val en présence de TMAH

tr (min)	R.A.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Phe	% Val	% Val-Phe
5,90	100	**91**	92	65	39	45	51	92	Toluène	46		
69,61	99	**120**	187	121	127	91		264	Phenylalanylvaline			
68,36	86	**134**	201	135	141	42	91	292	N-Methyl-phenylalanylvaline methyl ester			
69,17	63	**120**	187	121	127	91		278	Phenylalanylvaline methyl ester			
69,82	52	**120**	187	121	127	91		278	Phenylalanylvaline methyl ester			
50,33	48	**170**	185	153	143	171	128					
76,12	47	**91**	127	246	155	85	99	246	3-Benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione			9
71,76	45	**174**	289	132				332?				
73,56	39	**91**	42	227	127	246	113					
74,12	37	**91**	189	260	127	141	42	260	4-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 1)			
12,70	25	**104**	103	78	51	77		104	Ethenylbenzene	18		
28,83	21	**117**	90	116	89	51	63	117	Benzeneacetonitrile	10		
47,19	17	**91**	182	65	92			182	1,2-Diphenylethane	17		
16,17	15	**72**	88	55				131	Valine methyl ester		100	
34,14	11	**91**	131	65	129	51	77	131	Benzenepropanenitrile	8		
72,88	10	**183**	155	91	241	42	56	274	N,N'-Dimethyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 2)			9
70,11	10	**141**	169	260	99	72	42	260	1-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 3)			
68,58	9	**148**	215	149	84	138	91	306	N,N-Dimethyl-phenylalanylvaline methyl ester (FV 4)			
72,63	8	**260**	189	127	91	141	217	260	4-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 1)			
20,42	6	**91**	92	134	59	43	65	134	2-Methylpropylbenzene			
16,73	6	**86**	102	42				145	N-Methylvaline methyl ester		100	
42,81	4	**102**	134	42	42			193	N-Methylphenylalanine methyl ester	100		5
55,83	4	**194**	115	193	179	116	178	194	1-Methyl-2-(2-phenylethenyl)benzene			
42,47	3	**88**	120	91	77	65		179	Phenylalanine methyl ester	33		
44,49	2	**116**	148	133	42	56	91	207	N,N-Dimethylphenylalanine methyl ester	42		
18,93	2	**100**	116	44	42	85	117	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester		15	

2.5.2. Leu-Tyr et Tyr-Leu

Les pyrochromatogrammes de Leu-Tyr et Tyr-Leu (figure 2-59 et figure 2-61, respectivement) présentent des profils similaires. Un premier groupe de pics de forte intensité est détecté entre 20 et 30 minutes, mais un massif important, entre 75 et 85 minutes constitue la majeure partie du chromatogramme.

Les produits majoritaires des deux dipeptides sont communs (Tableau 2-12 et Tableau 2-13) : il s'agit de dérivés de diketopiperazines. Ainsi, la 3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 1 et LY 1), en doublet, constitue le produit principal de la pyrolyse à la fois de Leu-Tyr et de Tyr-Leu. Les autres diketopiperazines observées dans le pyrochromatogramme de Leu-Tyr sont : la 3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-i-methylpiperazine-2,5-dione (LY 2) (i=1,4), la 3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-j-methylpiperazine-2,5-dione (LY 3) (j=1,4) et la 3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (LY 4). Les diketopiperazines LY 2 et LY 3 diffèrent par la position du groupement méthyle, mais les spectres de masse n'ont pas permis de fixer ce groupement pour l'une ou l'autre. Pour Tyr-Leu, des diketopiperazines similaires ont également été identifiées, mais leur spectre de masse ne permet pas de connaître aussi précisément la position des différents groupes méthyles. On peut remarquer que dans le cas de ces dipeptides, comme pour Val-Phe et Phe-Val, les chaînes latérales de la leucine et de la tyrosine sont conservées.

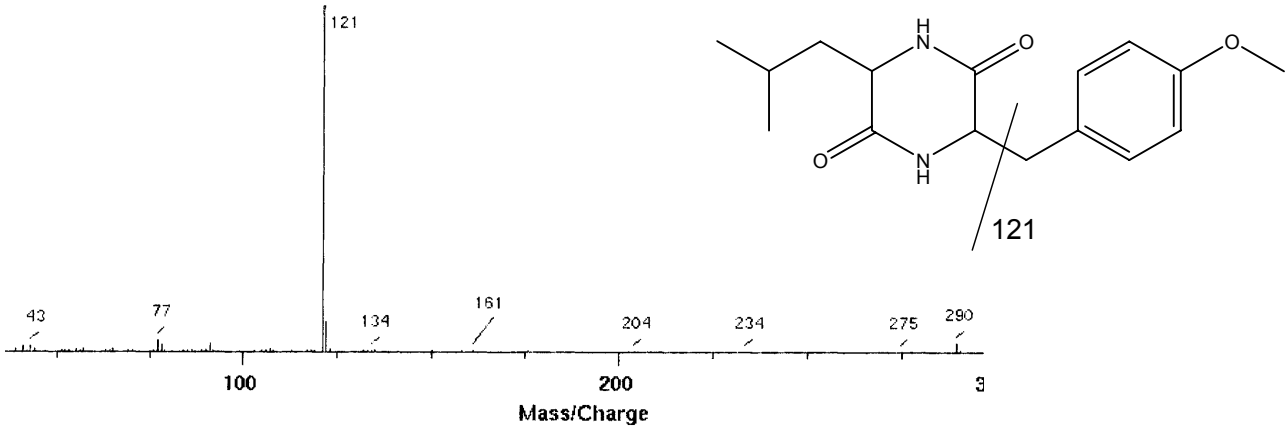
Outre les diketopiperazines, certains composés de la pyrolyse de la tyrosine, parfois même les majoritaires, sont détectés en abondance notable dans les pyrochromatogrammes des deux dipeptides symétriques. C'est en particulier le cas du 1-Methoxy-4-methylbenzene, ainsi que du phenol, du 4-Methoxybenzeneacetonitrile et du 1-Ethyl-4-methoxybenzène, bien que ces composés soient moins abondants que dans le cas de l'acide aminé libre. Les distributions des produits de pyrolyse, entre les diketopiperazines et les produits de pyrolyse de la tyrosine, en particulier pour Leu-Tyr, sont tout à fait comparables à celle d'Ala-Tyr.

Notons aussi que quelques dérivés du dipeptide ont été détectés dans chacun des pyrochromatogrammes, avec des sites de méthylation différents selon le dipeptide initial. On peut citer le i,j-Dimethylleucyltyrosine methyl ester et le i-Methylleucyltyrosine methyl ester pour Leu-Tyr, et le N-Methyl-O-Methyl-tyrosylleucine methyl ester (YL 3) pour Tyr-Leu.

Les composés majoritaires de la pyrolyse de la leucine ne sont pas détectés dans les pyrochromatogramme de ces dimères, ou sont présents en quantité négligeable. Ainsi, seul le dérivé

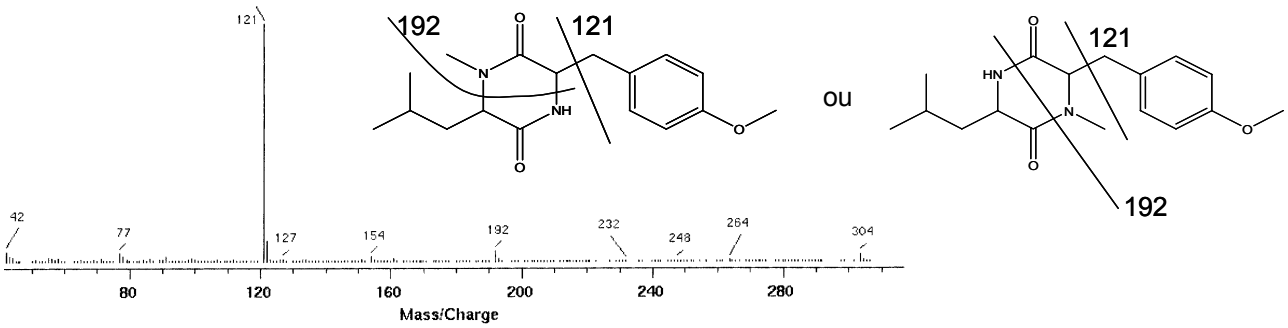
direct majoritaire de la pyrolyse de cet acide aminé, le N-Methylleucine methyl ester (1 %) dans Leu-Tyr, et le 3-Methylbutanenitrile (2 %) pour les deux dipeptides ont été mis en évidence.

Ainsi, les deux pyrochromatogrammes sont très semblables. Ils sont dominés par une large gamme de diketopiperazines, auxquelles s'adjoignent des produits de pyrolyse caractéristiques de la tyrosine. Ils sont également comparables, surtout Leu-Tyr, au pyrochromatogramme d'Ala-Tyr, bien que dans ce dernier cas les diketopiperazines aient perdu la chaîne latérale de l'alanine, alors que celle de la leucine est conservée. Or, ceci est contraire au fait que la formation des diketopiperazines est défavorisée par une augmentation de la gêne stérique engendrée par la chaîne latérale de l'acide aminé (Hendricker & Voorhees, 1998).



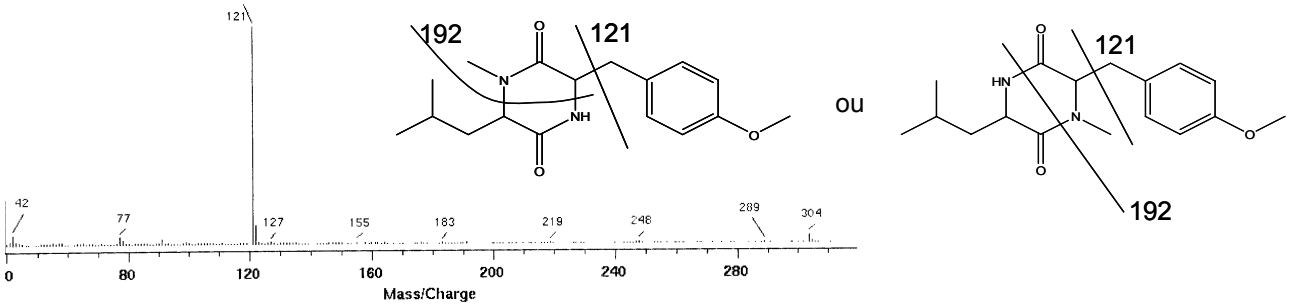
3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (LY 1 = YL 1) (tr: 84,15 min)

figure 2-54 : spectre de masse et structure de LY 1



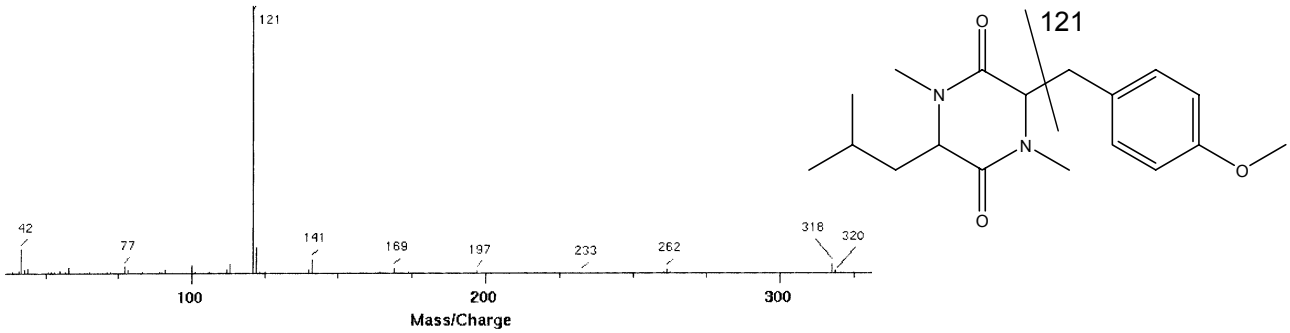
3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (LY 2)

figure 2-55 : spectre de masse et structure de LY 2



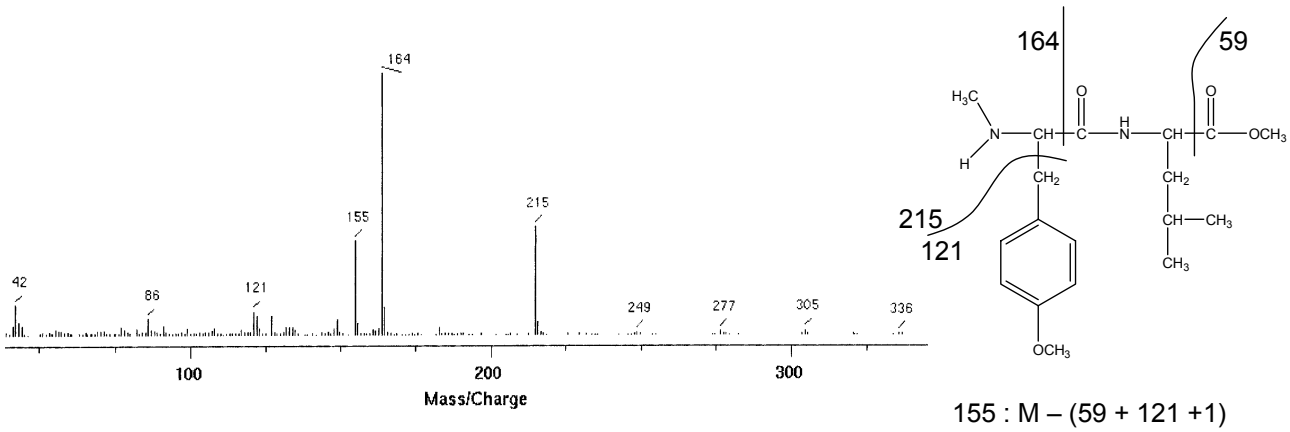
6-Isobutyl-3-(4-methoxybenzyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (LY 3) (tr: 81,65 min)

figure 2-56 : spectre de masse et structure de LY 3



3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (LY 4) (tr: 80,08 min)

figure 2-57 : spectre de masse et structure de LY 4



155 : M – (59 + 121 +1)

N-Methyl-O-Methyl-tyrosylleucine methyl ester (YL 3)

figure 2-58 : spectre de masse et structure de YL 3

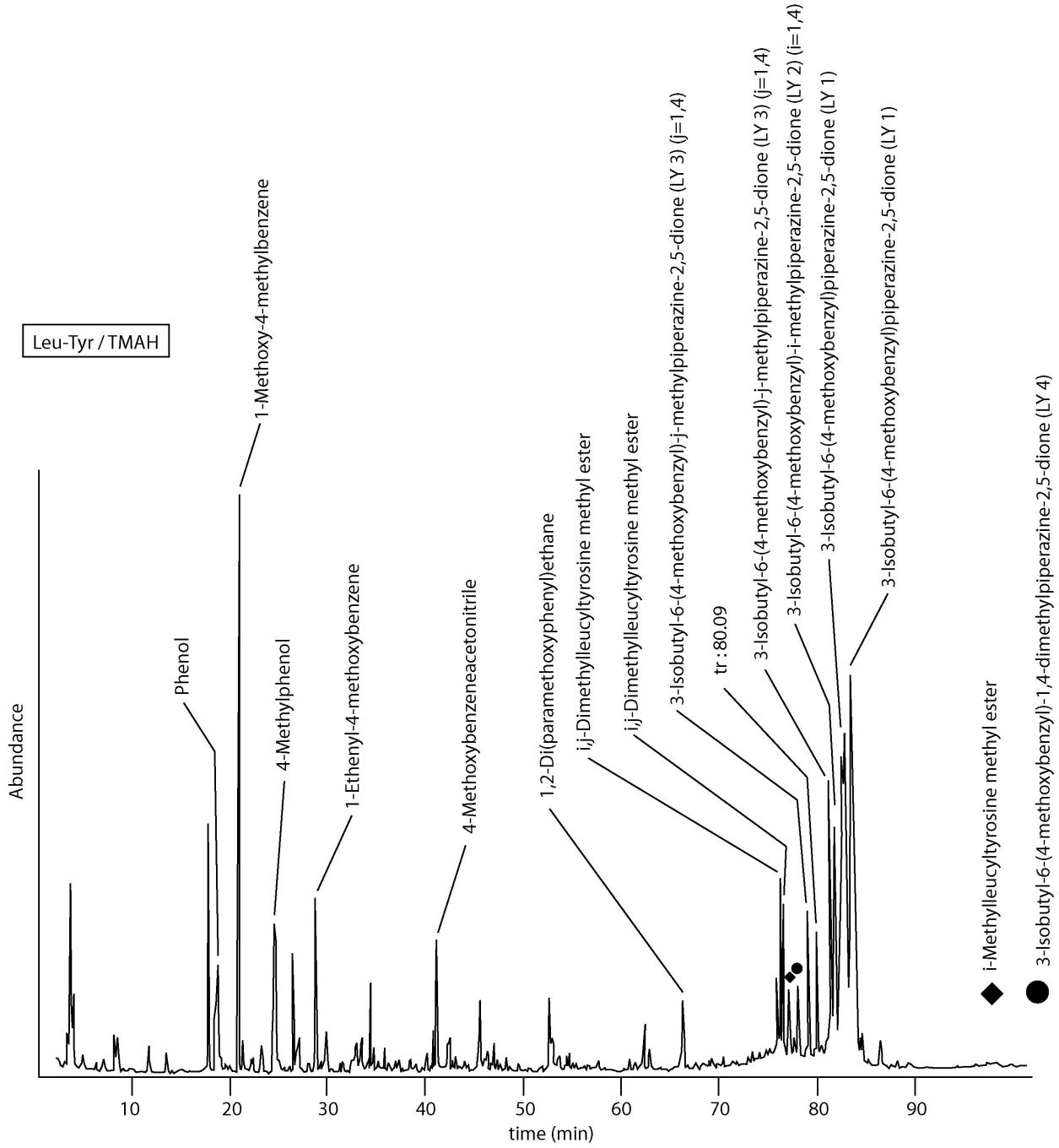


figure 2-59 : pyrochromatogramme de Leu-Tyr en présence de TMAH

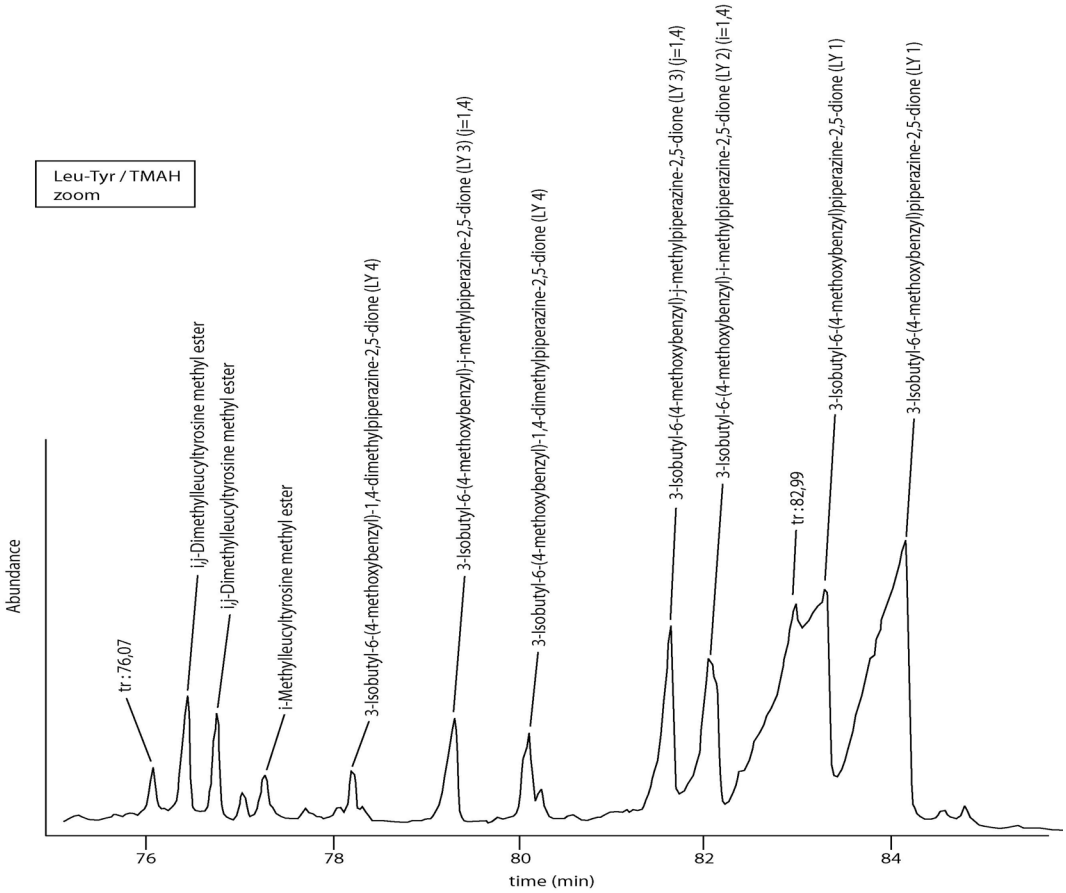


figure 2-60 : partie agrandie du pyrochromatogramme de Leu-Tyr en présence de TMAH

Tableau 2-12 : Produits principaux de la pyrolyse de Leu-Tyr en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Leu	% Tyr	% Tyr-Leu
83,36	100	**121**	122	290	91			290	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (LY 1)			100
84,15	83	**121**	122	290	77			290	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (LY 1)			85
21,04	39	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene		57	12
82,15	27	**121**	122	304	77			304	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-i-methylpiperazine-2,5-dione (LY 2) (i=1,4)			12
24,73	25	**107**	108	77	79	39	53	108	4-Methylphenol		14	26
81,65	23	**121**	122	304	77	42		304	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-j-methylpiperazine-2,5-dione (LY 3) (j=1,4)			
18,84	14	**94**	66	65	39	95		94	Phenol		7	21
79,31	13	**121**	122	42	304	77		304	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-j-methylpiperazine-2,5-dione (LY 3) (j=1,4)			
76,45	11	**100**	58	44	114	121		336	i,j-Dimethylleucyltyrosine methyl ester			
41,31	11	**147**	146	132	77	107	116	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile		12	4
76,76	9	**100**	58	44	121	101		336	i,j-Dimethylleucyltyrosine methyl ester			
28,92	8	**134**	119	91	65	39		134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene		48	1
80,09	8	**121**	192	42	122	141	318	318	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (LY 4)			6
77,32	7	**86**	121	192	44	237	44	322	i-Methylleucyltyrosine methyl ester			
78,25	6	**121**	42	122	318	141		318	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (LY 4)			2
66,49	6	**121**	242	122	77			242	1,2-Di(paramethoxyphenyl)ethane		11	2
34,48	5	**121**	164	77	91	122		164	1-(4-Methoxyphenyl)-propan-2-one			
26,59	5	**121**	136	77	91			136	1-Ethyl-4-methoxybenzene		34	2
53,12	4	**102**	121	122	42	164	77	223	N-Methyl-O-methyltyrosine methyl ester		100	
27,25	3	**59**	72	44	43	57	41	115	4-Methylpentanamide			
23,34	3	**108**	107	79	77	90	39	108	2-Methylphenol		4	2
8,29	2	**55**	41	43	54	57	82	83	3-Methylbutanenitrile	3		2
29,55	1	**107**	122	77				122	2-Ethylphenol		2	2
54,55	1	**116**	178	42	56	84	117	237	N,N-dimethyl-O-methyltyrosine methyl ester		79	
22,19	1	**100**	58	44	42	102	41	159	N-Methylleucine methyl ester	63		

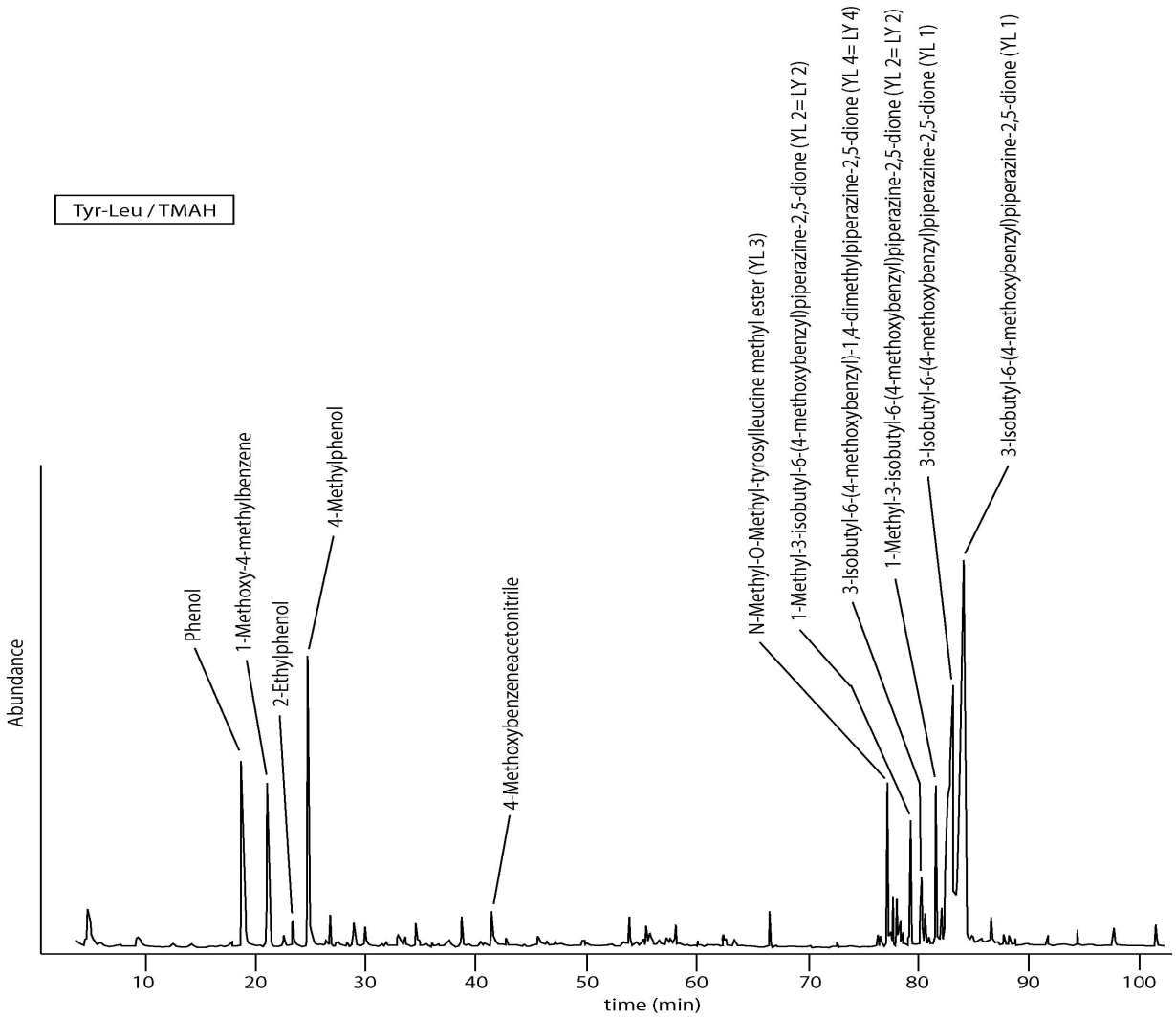


figure 2-61 : pyrochromatogramme de Tyr-Leu en présence de TMAH

Tableau 2-13 : Produits principaux de la pyrolyse de Tyr-Leu en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Tyr	% Leu	% Leu-Tyr
84,18	100	**121**	122	77	290			290	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 1=LY 1)			100
83,22	85	**121**	122	77	290			290	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 1=LY 1)			83
24,85	26	**107**	108	77	79	90	53	108	4-Methylphenol	14		25
18,92	21	**94**	66	65	39	55	95	94	Phenol	7		14
81,66	12	**121**	122	42	77	304		304	1-Methyl-3-isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 2= LY 2)			27
21,22	12	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	57		39
77,24	10	**164**	215	155	42	121	165	336	N-Methyl-O-Methyl-tyrosylleucine methyl ester (YL 3)			
79,42	10	**121**	122	42	304			304	1-Methyl-3-isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 2= LY 2)			27
80,26	6	**121**	141	100	113	318	42	318	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (YL 4= LY 4)			8
41,44	4	**147**	77	132	146	107	51	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile	12		11
23,45	2	**108**	107	79	77	90	51	108	2-Methylphenol	4		3
82,10	2	**121**	122	42	77	304		304	1-Methyl-3-isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 2= LY 2)			27
29,99	2	**107**	122	77	39	108	51	122	2-Ethylphenol	2		1
9,37	2	**55**	41	43	54	57	39	83	3-Methylbutanenitrile		3	2
78,36	2	**121**	122	42	318			318	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (YL 4= LY 4)			6
66,66	2	**121**	242	122	77			242	1,2-Di(paramethoxyphenyl)ethane	11		6
26,86	2	**121**	136	77	91	122		136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	34		5
28,94	1	**122**	107	121	77	79	51	122	2,4-Dimethylphenol			
29,13	1	**134**	119	91	65	135		134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	48		8

2.5.3. Met-Leu et Leu-Met

Comme pour les dipeptides de Leu et Tyr, les pyrochromatogrammes de Met-Leu et Leu-Met (figure 2-68 et figure 2-69) présentent un profil chromatographique caractérisé par un massif important en fin de chromatogramme, entre 65 et 75 minutes.

Comme dans le cas précédent, le produit majoritaire est commun aux deux pyrochromatogrammes (tableau 2-14 et tableau 2-15) : il s'agit de la 3-Isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 1) (LM 1), que Noguerola (1992) avait déjà identifiée par pyrolyse des dipeptides Met-Leu et Leu-Met. Cette diketopiperazine est formée des deux acides aminés ayant conservé leur chaîne latérale. Comme dans les deux cas précédents, les composés correspondant à différents degrés de méthylation de cette diketopiperazine figurent parmi les dérivés majoritaires de pyrolyse. Dans les deux pyrochromatogrammes, deux couples de diketopiperazines mono-méthylées ont été détectés. Le couple commun aux deux pyrochromatogrammes est prépondérant, il s'agit de la diketopiperazine avec le pic de base à m/z : 184 que nous appellerons la i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 2) (i=1 ou 4). Pour les deux autres couples de diketopiperazines, les spectres de masse sont proches mais pas identiques et mènent à une structure de diketopiperazine mono-méthylée, la j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 3) et (LM 3) (j=1 ou 4). Pour ces trois couples de diketopiperazines, i est différent de j sans que les spectres de masse permettent de déterminer la position du méthyle.

La différence majeure entre les deux dipeptides est la formation d'une diketopiperazine comportant trois acides aminés dans le cas de Met-Leu : le Methyl 2-(2,4-dimethyl-5-(2-(methylthio)ethyl)-3,6-dioxopiperazin-1-yl)-4-methylpentanoate (ML 5). Le cycle de cette diketopiperazine porte la chaîne latérale de la méthionine et un méthyle, l'un des atomes d'azote du cycle est acylé par la leucine totalement méthylée, l'autre atome d'azote est méthylé.

Dans la même zone de temps de rétention, des dérivés plus ou moins méthylés des dipeptides ont aussi été détectés, en particulier les dérivés mono-méthylés de l'ester du dipeptide : le N-Methyl-methionylleucine methyl ester pour Met-Leu et le N-Methylleucylmethionine methyl ester pour Leu-Met. Leur abondance relative les place entre les différentes diketopiperazines. Notons toutefois une proportion relative plus importante de dérivés du dipeptide dans le cas de Met-Leu. Comme dans le cas de Leu-Tyr et Tyr-Leu, les deux dipeptides présentent les mêmes degrés de

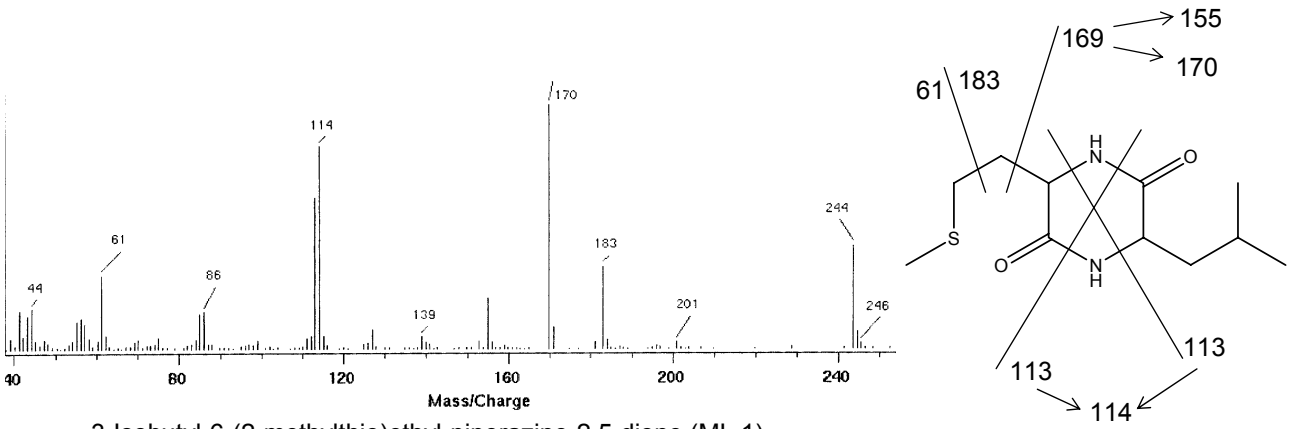
méthylation, les dérivés identifiés sont peu méthylés, une fois sur la fonction carboxylique plus une fois sur l'amine terminale pour les deux dipeptides.

Le produit dominant de la pyrolyse de la leucine (2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one) n'a pas été détecté parmi les produits de pyrolyse des dipeptides. Cependant les dérivés directs de la leucine, qui étaient des composés majoritaires de sa pyrolyse, ont été identifiés parmi les produits de pyrolyse des dipeptides. Bien qu'en proportions beaucoup plus faibles qu'à partir de l'acide aminé individuel, ils ne sont pas négligeables, particulièrement dans Met-Leu, où en valeur cumulée ils sont du même ordre de grandeur que les dérivés directs du dipeptide. Concernant les dérivés directs, ces résultats sont comparables à ceux obtenus à partir de Thr-Leu, et sont analogues à ceux de Gly-Leu. En revanche, ils sont très différents de ceux observés pour Leu-Tyr / Tyr-Leu et Leu-Trp, où les dérivés méthylés de la leucine sont extrêmement faibles, voire non détectés.

Les dérivés directs de méthylation de la méthionine ont également été détectés dans les pyrochromatogrammes de chacun des dipeptides, mais en quantité très faible comparée à l'acide aminé libre.

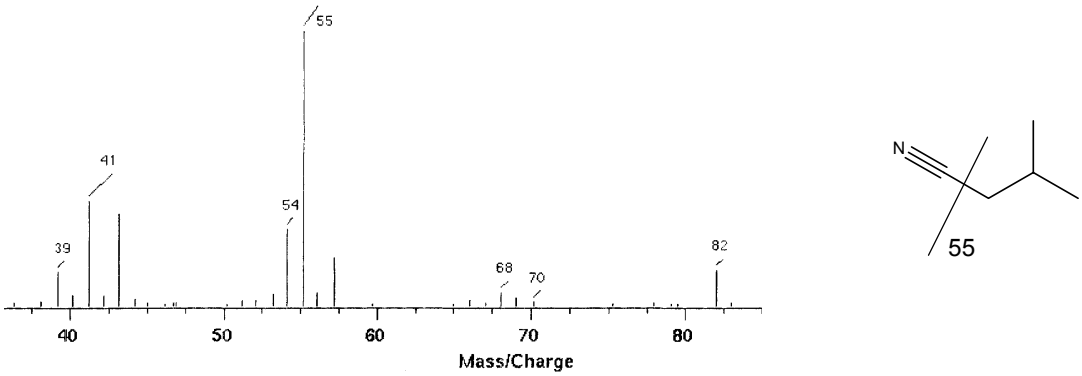
Par ailleurs, certains produits éluant avant 30 min ont été détectés et sont caractéristiques des acides aminés engagés dans le dipeptide. Le 3-Methylbutanenitrile (ML 4 et LM 6) et le 4-Methylpentanamide (LM 5) sont caractéristiques de la leucine par la longueur et la structure de leur chaîne aliphatique ; le 4-Methylthiobutanenitrile (LM 4) est caractéristique de la méthionine dans une liaison peptidique. Le 3-Methylbutanenitrile et le 4-Methylthiobutanenitrile sont produits par la rupture de la liaison peptidique suivie d'une décarboxylation, alors que le 4-Methylthiobutanenitrile est produit par un mécanisme de déamination de l'amine terminale et d'une coupure en alpha de la liaison peptidique.

Dans les pyrochromatogrammes de ces deux dipeptides, les dérivés du dipeptide, que ce soit sous forme linéaire ou cyclique (diketopiperazine), constituent les produits de pyrolyse majoritaires. Cependant, les produits dominants de la pyrolyse des deux acides aminés libres, qui sont les dérivés directs de méthylation de ces acides, sont également présents ; ce qui n'était pas le cas pour les deux autres paires de dipeptides étudiés dans ce paragraphe.



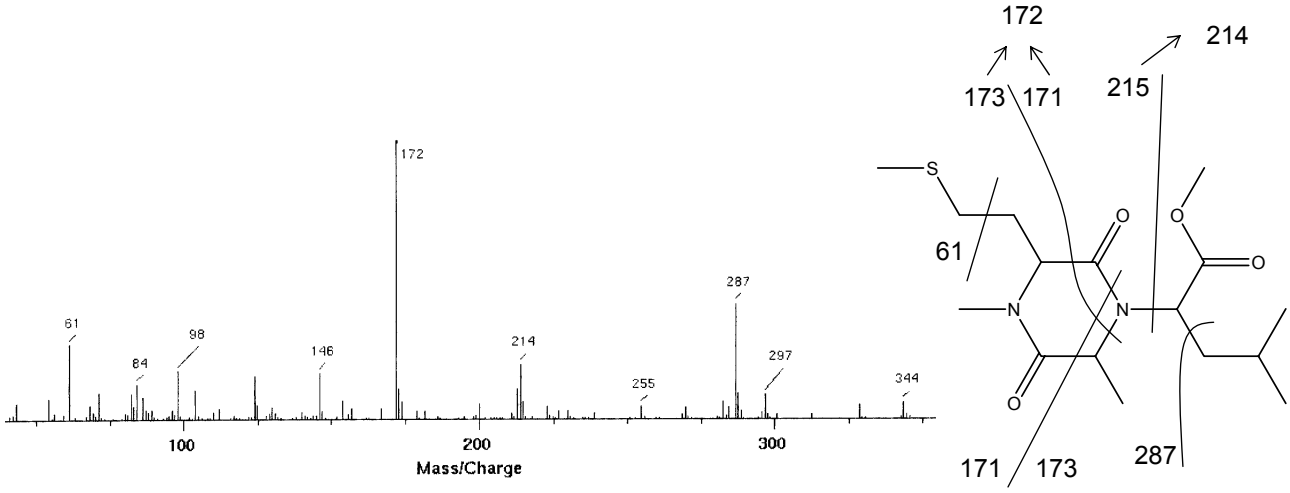
3-Isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 1)

figure 2-62 : spectre de masse et structure de ML 1



3-Methylbutanenitrile (ML 4)

figure 2-63 : spectre de masse et structure de ML 4 et LM 6



Methyl 2-(2,4-dimethyl-5-(2-(methylthio)ethyl)-3,6-dioxopiperazin-1-yl)-4-methylpentanoate (ML 5)

figure 2-64 : spectre de masse et structure de ML 5

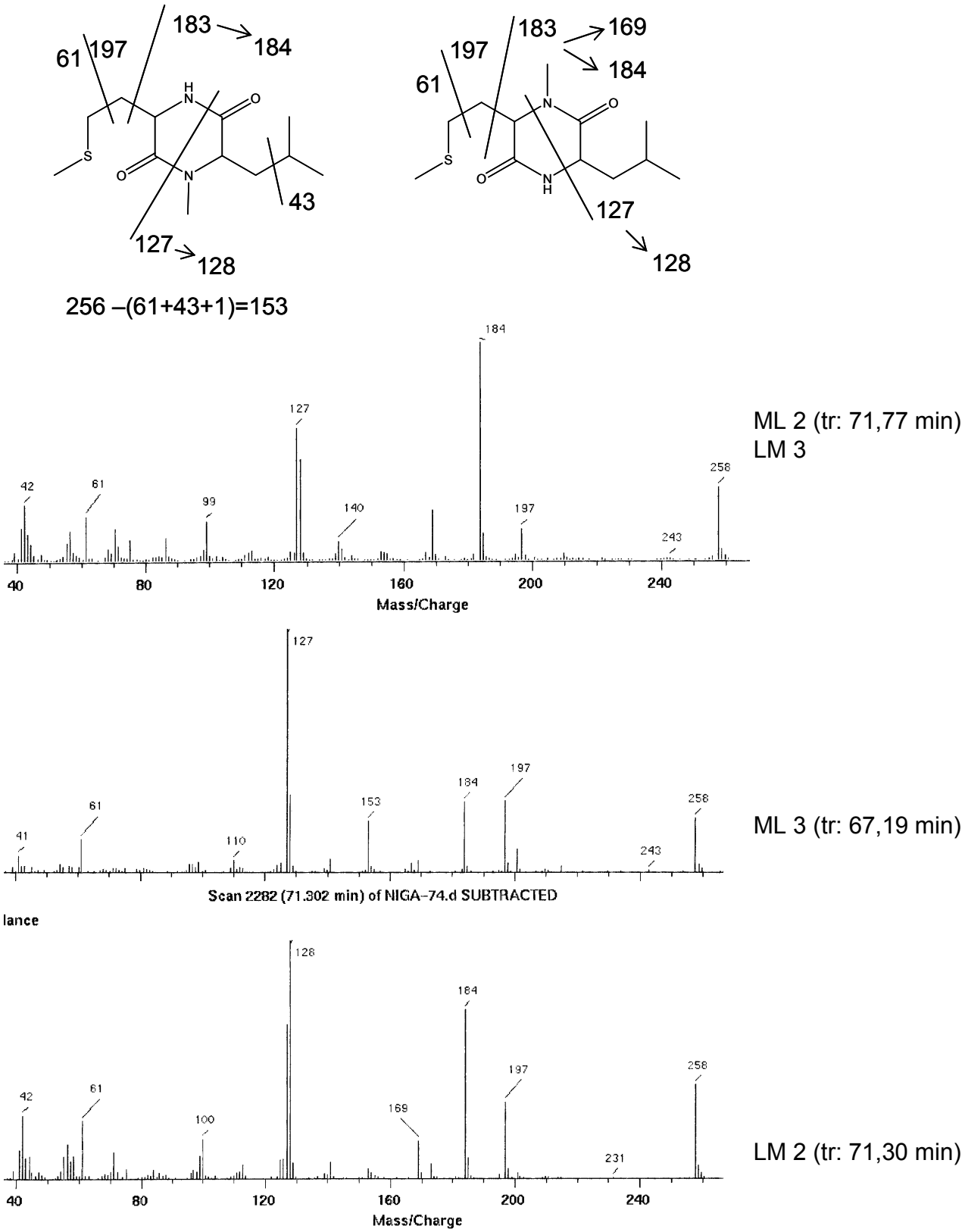
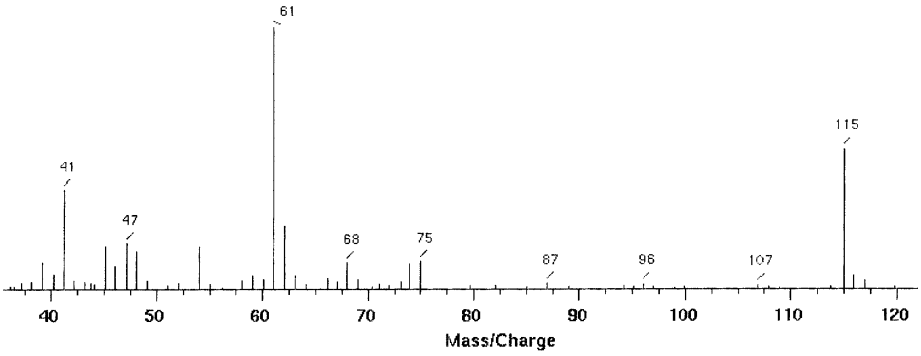
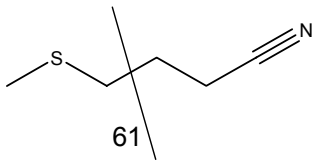


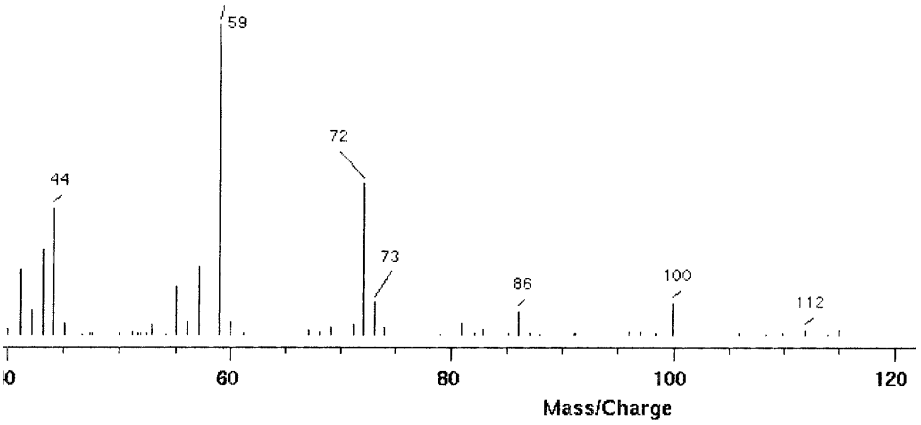
figure 2-65 : spectres de masse et structures proposées de ML 2, ML 3, LM 2 et ML 3.

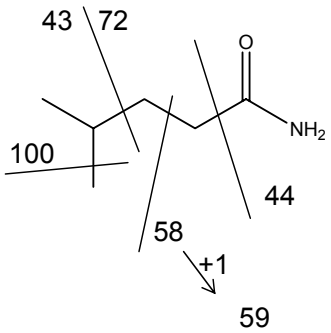




4-Methylthiobutanenitrile (LM 4)

figure 2-66 : spectre de masse et structure de LM 4





4-Methylpentanamide (LM 5)

figure 2-67 : spectre de masse et structure de LM 5

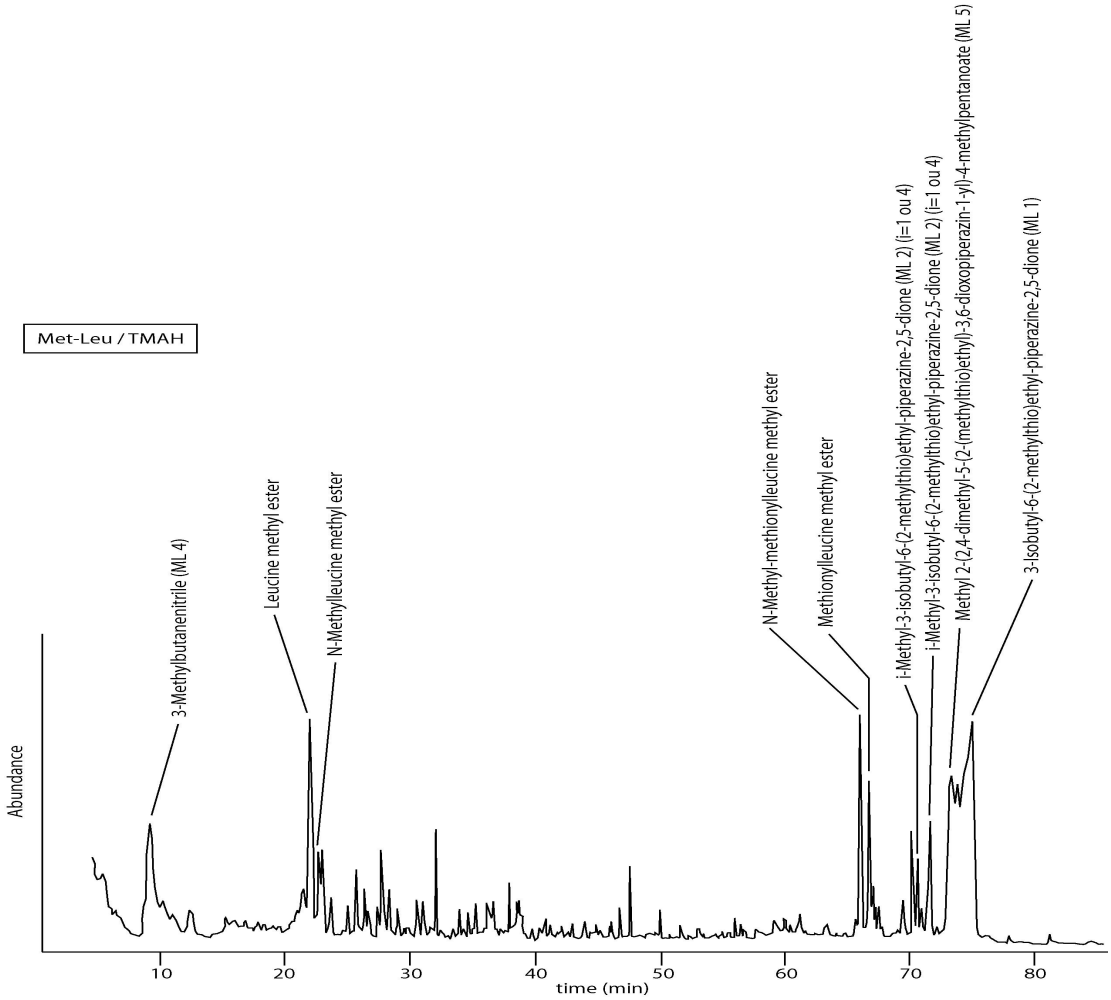


figure 2-68 : pyrochromatogramme de Met-Leu en présence de TMAH

tableau 2-14 : Produits principaux de la pyrolyse de Met-Leu en présence de TMAH

tr (min)	R.A.S.	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Met	% Leu	% Leu-Met
75,17	100	**170**	114	113	244	183	61	244	3-Isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 1)			100
73,39	36	**172**	287	61	214	98	124	344	Methyl 2-(2,4-dimethyl-5-(2-(methylthio)ethyl)-3,6-dioxopiperazin-1-yl)-4-methylpentanoate (ML 5)			
22,14	31	**86**	44	88	43	41	87	145	Leucine methyl ester		90	9
66,19	19	**118**	70	61	42	119	290	290	N-Methyl-methionylleucine methyl ester			
66,97	15	**104**	56	61	131	146	86	276	Methionylleucine methyl ester			
71,77	12	**184**	127	128	258	42	169	258	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 2) (i=1 ou 4)			6
9,16	12	**55**	41	43	54	57	80	83	3-Methylbutanenitrile (ML 4)		3	6
22,79	7	**100**	58	44	102	42	43	159	N-Methylleucine methyl ester		63	7
66,32	7	**118**	70	61	42	119	290	290	N-Methyl-methionylleucine methyl ester			
70,74	7	**184**	127	128	258	42	169	258	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 2) (i=1 ou 4)			4
67,19	3	**127**	197	258	128	184	153	258	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 3) (j=1 ou 4)			
36,25	2	**61**	56	104	163	115	88	163	Methionine methyl ester	77		5
25,06	2	**114**	72	42	58	116	98	173	N,N-Dimethylleucine methyl ester		47	4
36,77	2	**118**	70	61	42	102	145	177	N-Methylmethionine methyl ester	71		9
67,47	2	**127**	197	258	128	184	153	258	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 3) (j=1 ou 4)			
38,55	2	**132**	84	61	116	42	70	191	N,N-Dimethylmethionine methyl ester	100		4

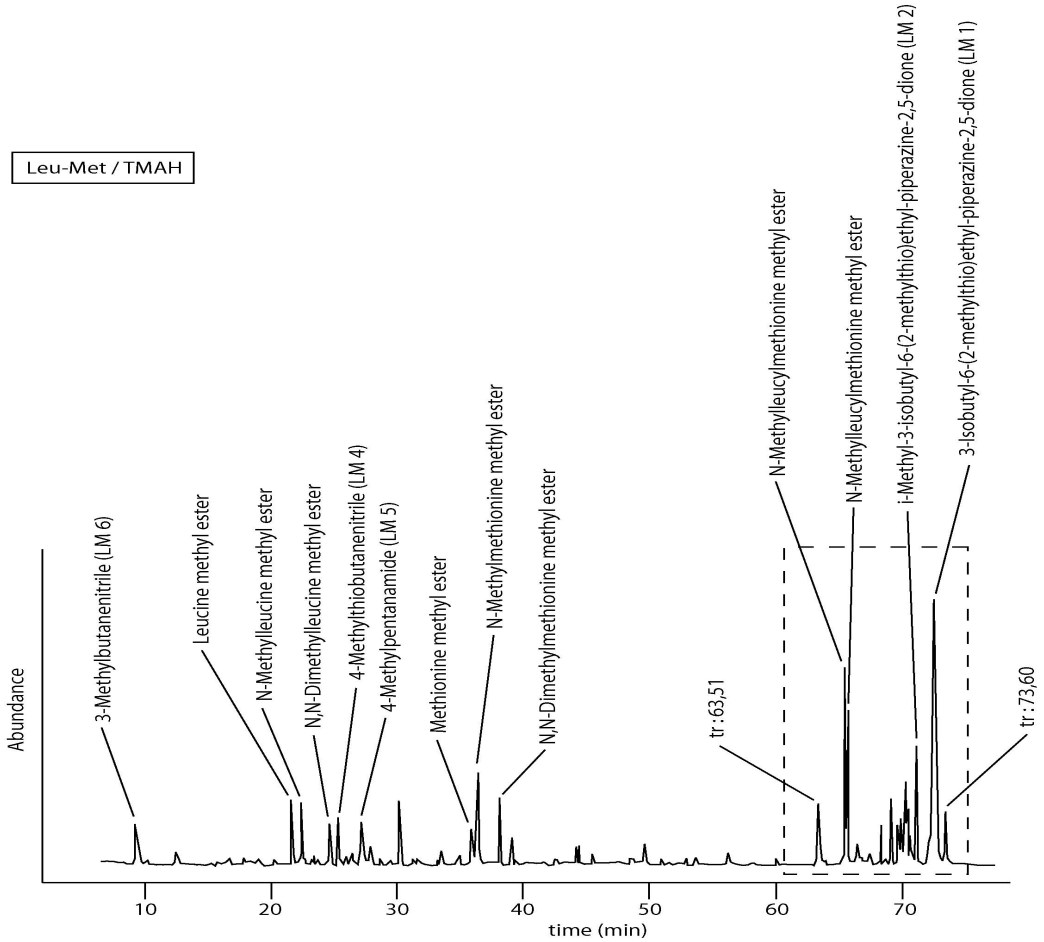


figure 2-69 : pyrochromatogramme de Leu-Met en présence de TMAH

tableau 2-15 : Produits principaux de la pyrolyse de Leu-Met en présence de TMAH

tr (min)	A.R.S	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	% Leu	% Met	% Met-Leu
72,83	100	**170**	114	113	244	183	61	244	3-Isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 1 = ML 1)			100
65,69	14	**100**	58	44	101			290	N-Methylleucylmethionine methyl ester			
65,87	12	**100**	58	44	101			290	N-Methylleucylmethionine methyl ester			
71,30	12	**128**	184	127	258	197	42	258	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 2) (i=1ou 4)			
21,65	9	**86**	44	88	43	41	87	145	Leucine methyl ester	90		31
36,44	9	**118**	70	61	42	102	145	177	N-Methylmethionine methyl ester		71	2
70,43	8	**128**	127	184	258	197	61	258	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 2) (i=1ou 4)			
73,60	8	**228**	196	61	168	91	153		inconnu			
25,28	7	**61**	115	41	62	47	45	115	4-Methylthiobutanenitrile (LM 4)			
22,40	7	**100**	58	44	42	102	43	159	N-Methylleucine methyl ester	63		7
27,17	6	**59**	72	44	43	41	58	115	4-Methylpentanamide (LM 5)			
70,12	6	**184**	127	126	258	42	61	258	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 3 = ML 2) (j=1 ou 4)			12
9,28	6	**55**	41	43	54	57	82	83	3-Methylbutanenitrile (LM 6 = ML 4)	3		12
69,22	5	**141**	198	142	42	272	113	272	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione			
35,91	5	**61**	56	104	115	163	88	163	Methionine methyl ester		77	2
38,21	4	**132**	84	61	42	116	70	191	N,N-Dimethylmethionine methyl ester		100	2
24,72	4	**114**	72	58	42	116	113	173	N,N-Dimethylleucine methyl ester	47		2
70,93	4	**184**	128	127	258	169	42	258	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 3 = ML 2) (j=1 ou 4)			7
68,42	3	**141**	198	142	42	272	113	272	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione			
66,65	2	**86**	104	57	41	44	43	276	Leucylmethionine methyl ester			

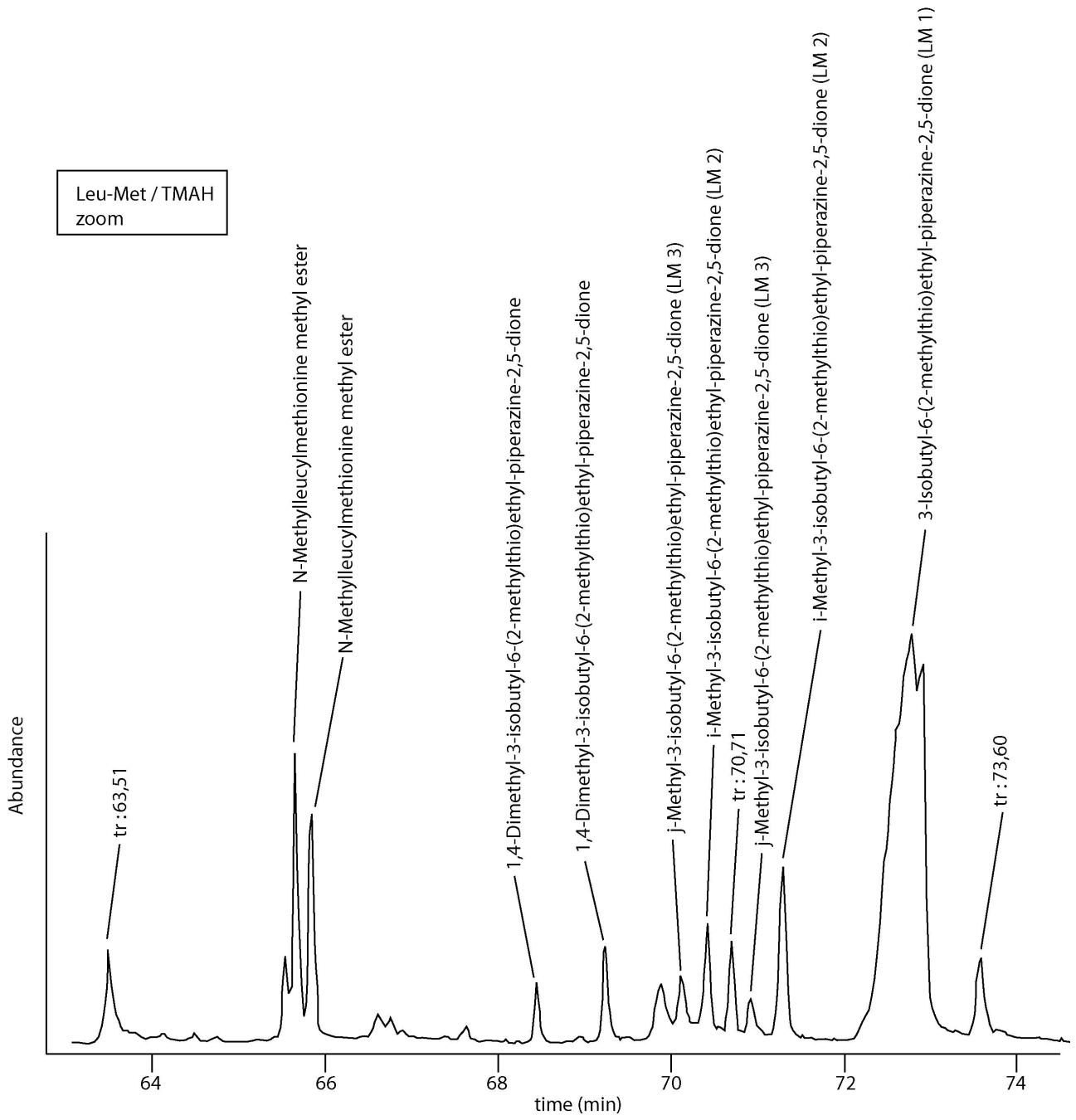


figure 2-70 : partie agrandie du pyrochromatogramme de Leu-Met en présence de TMAH

2.5.4. Conclusions sur la pyrolyse de dipeptides symétriques

A partir de l'ensemble des résultats obtenus lors des pyrolyses des dipeptides symétriques, nous pouvons considérer l'importance de la position de l'acide aminé dans le dipeptide, et ainsi évaluer si le groupe fonctionnel resté libre influe sur les réactions mises en jeu lors de la pyrolyse, et donc sur la nature des produits formés. Nous inclurons dans nos observations les dipeptides Val-Thr et Thr-leu qui ne sont pas exactement symétriques mais dont les acides aminés aliphatiques sont homologues.

Tous les dipeptides comportent un acide aminé aliphatique, Val ou Leu, ne différant que d'un méthylène. L'acide aliphatique est lié dans deux exemples à un acide aminé aromatique, simple (Phe) ou hydroxylé (Tyr), dans les deux autres cas à un acide aminé aliphatique soufré (Met) ou hydroxylé (Thr).

Excepté pour Phe-Val, pour lequel les dérivés méthylés du dipeptide sont dominants, les produits de cyclisation (DKP) sont majoritaires quel que soit l'ordre des acides aminés.

Dans le cas du couple Tyr/Leu l'ordre des acides aminés n'influe pas sur la nature et les proportions des produits formés, on observe les mêmes diketopiperazines pour les deux peptides symétriques.

En revanche, pour les couples Phe/Val, Thr/Leu et Met/Leu, l'ordre des acides aminés induit des différences de produits formés. Dans le premier cas, quand Phe est en position N-terminale on obtient principalement les dérivés méthylés du dipeptide et dans une moindre mesure des diketopiperazines simples, alors que Phe en position C-terminale conduit essentiellement à la formation de produits de cyclisation complexes incluant trois acides aminés. Inversement, dans les deux autres exemples des produits de cyclisation complexes ne sont formés qu'avec Thr ou Met en position N-terminale. La réactivité de ces acides aminés varie suivant le groupe fonctionnel libre.

Il est également possible de discerner des différences dans les produits de pyrolyse dérivés uniquement d'un acide aminé. Ainsi des produits de pyrolyse sont observés pour le dipeptide AA_1-AA_2 sans l'être dans le dipeptide AA_2-AA_1, par exemple le benzaldéhyde et l'ethenylbenzene pour Val-Phe et Phe-Val respectivement.

Ces différences peuvent être induites par la position des acides aminés dans le dipeptide, qui pourrait autoriser, favoriser ou interdire certains mécanismes.

Enfin, une certaine discrimination était attendue pour les dérivés directs des acides aminés présents dans les dipeptides. En effet, il semblait plus difficile de générer les esters méthyliques de

AA_1 et donc les dérivés directs de AA_1, que ceux de AA_2 dans la pyrolyse de AA_1-AA_2, puisque AA_1 avait perdu sa fonction acide. Au contraire AA_2, dont la fonction acide avait été préservée, devait produire plus facilement les esters N-méthylés, grâce à la thermochemolyse par le TMAH de la fonction peptidique, qui régénère la fonction amine méthylée. Les cas étudiés ici, ne confirment pas cette hypothèse, même si dans certains cas, la position C-terminale favorise quantitativement la production de dérivés méthylés des acides aminés. Ceci n'exclut pas la formation d'esters méthyliques de l'AA_1. Par ailleurs il n'y a pas de différence notable dans la nature des dérivés N-méthylés d'AA_1 ou AA_2. On note également le cas particulier de Leu-Tyr, où le N-Methylleucine methyl ester est détecté dans le pyrochromatogramme de Leu-Tyr, alors qu'aucun dérivé direct de la leucine n'est détecté dans Tyr-Leu.

Il apparaît donc que la position N- ou C-terminale d'un acide aminé dans un dipeptide modifie sa réactivité et peut entrainer la formation de produits plus complexes. Par ailleurs, la nature du second acide aminé doit également intervenir. Par conséquent il n'est pas possible de dégager de règle générale, définissant a priori et de façon précise la nature des produits de pyrolyse attendus. Ceci souligne la complexité de l'étude des produits de pyrolyse de structures peptidiques et la nécessité d'augmenter le nombre de données d'analyse.

3. Discussion des résultats de pyrolyse de dipeptides

3.1. Conclusion sur le rôle de la liaison peptidique

3.1.1. Dipeptide vs. acide aminé individuel

La première remarque au vu des résultats de pyrolyse des dipeptides en présence de TMAH concerne les composés majoritaires. En effet, exceptés quelques rares cas, les composés majoritaires de la pyrolyse des dipeptides ne correspondent pas à ceux obtenus lors de la pyrolyse des acides aminés individuels impliqués dans ces dipeptides.

3.1.2. Considérations sur les produits de pyrolyse

En observant les pyrochromatogrammes des dipeptides, il apparaît clairement que les composés majoritaires sont élués en fin de chromatogramme, plus tard que ceux des pyrolyses des acides aminés individuels, et correspondent à des composés de haut poids moléculaire. Ceci est confirmé par les tableaux récapitulatifs des composés identifiés dans les chromatogrammes.

Une étude approfondie de ces tableaux montre que la quasi-totalité de ces produits lourds sont des dérivés méthylés du dipeptide pyrolysé et de ses produits de cyclisation, les diketopiperazines.

Notons par ailleurs que nous avons observé des diketopiperazines en forte abondance pour des dipeptides constitués d'acides aminés aromatiques. Ces résultats sont différents de ceux d'Hendricker et Voorhees (1996), qui lors de pyrolyse réalisée à 510 °C, observaient la formation préférentielle de diketopiperazines à partir de dimères aliphatiques. La présence de ces composés infirme donc l'hypothèse qu'ils avaient émise que la formation de diketopiperazines était limitée par la gêne stérique.

Enfin, des diketopiperazines d'une nouvelle forme ont été identifiées dans plusieurs pyrochromatogrammes. Elles sont construites sur un assemblage d'au moins trois acides aminés, comme discuté au paragraphe suivant.

3.2. Des diketopiperazines complexes

Au cours de ce chapitre, des diketopiperazines particulières ont été mentionnées à plusieurs reprises. Ces diketopiperazines impliquant trois acides aminés ont été détectées dans plusieurs pyrochromatogrammes : Val + Phe, Val-Phe, Gly-Leu, Thr-Leu, et Met-Leu (VF 1 et son homologue supérieur, GL 4, TL 1, TL 3, TL 4 et ML 5, ainsi que GL 2, également appelée TL 2 dont le spectre de masse n'a pas permis l'identification précise de la structure). Dans tous ces cas, un des atomes d'azote du cycle porte une chaîne latérale correspondant à un des deux acides aminés du dipeptide. Il est possible d'en distinguer deux types : le premier porte la chaîne latérale via une liaison amine (que nous appellerons type 1) et le deuxième porte la chaîne via une liaison peptidique (type 2). On obtient uniquement des dikétopipérazines de type 1 dans les cas de Val + Phe, Val-Phe et Met-leu, et de type 2 pour Gly-leu, en revanche les types 1 et 2 sont formés pour Thr-leu. Plusieurs voies de formation de ces diketopiperazines peuvent être proposées.

La formation de ces diketopiperazines peut mettre en jeu au minimum un tripeptide AA_i-AA_j-AA_k (i,j,k= 1 ou 2) avec comme composition la plus probable i=1, j=2 ou j=1, k=2. La formation des diketopiperazines de type 1 implique une cyclisation à partir d'un atome d'azote engagé dans une liaison peptidique vers l'atome de carbone porteur de l'amine terminale. La formation des diketopiperazines de type 2 implique une cyclisation à partir d'un atome d'azote engagé dans une liaison peptidique vers l'atome de carbone porteur de la fonction acide terminale figure 3-1.

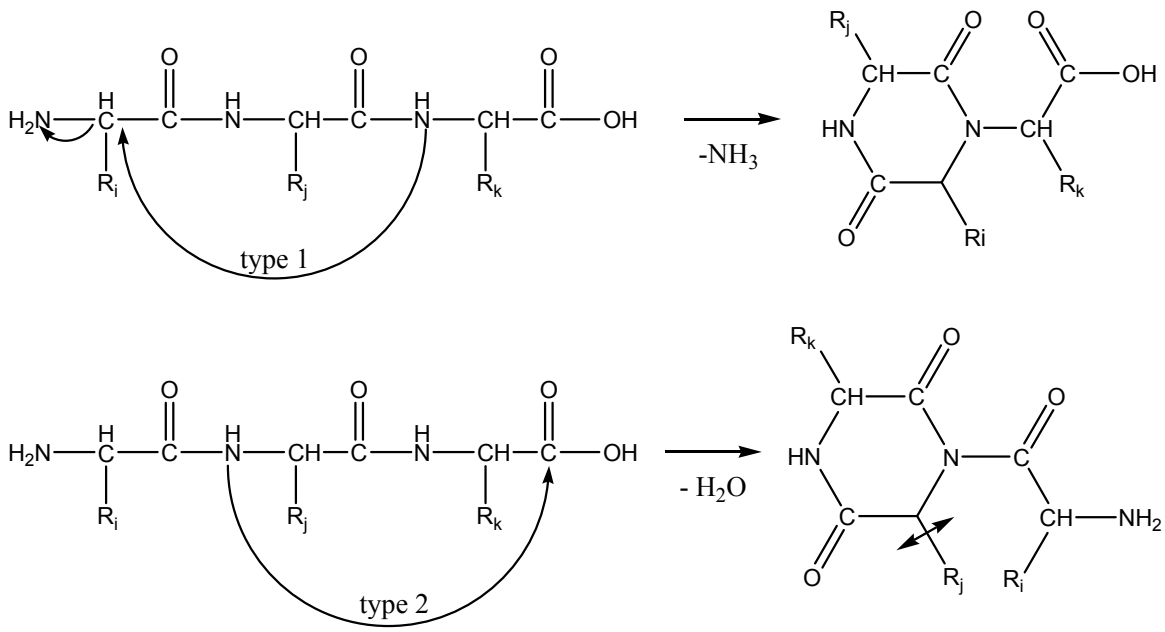


figure 3-1 : mécanisme de formation d'une diketopiperazine par cyclisation interne d'un tripeptide.

La nature des chaînes présentes dans les diketopiperazines à trois acides aminés identifiées fournit des indications sur l'enchaînement AA_i-AA_j-AA_k. Ainsi, pour le type 1, dans le cas de Val-Phe et Met-Leu, on a k=2 et j=1, i ne peut être précisé, car la chaîne latérale R_i est éliminée en partie ou totalement. Dans le cas de TL 4, la chaîne latérale R_k est éliminée et R_i provient de Leu donc i=2 et vraisemblablement j=1 et k=2.

Pour le type 2, dans le cas de TL 1 et TL 3, on a i=1 mais R_j et R_k sont éliminées alors qu'à partir de Gly-Leu (GL 4) k=2, et donc vraisemblablement j=1. Comme R_1=H, on ne peut pas savoir si R_i correspond à Gly ou s'il provient de Leu avec perte de la chaîne latérale.

Ces tripeptides peuvent résulter, soit de la formation d'un tétrapeptide AA_1-AA_2-AA_1-AA_2 par dimérisation de AA_1-AA_2 suivie de la coupure d'une liaison peptidique, soit de la condensation d'un acide aminé libre sur le dipeptide. Si les cyclisations se faisaient à partir du tetrapeptide, elles conduiraient à conserver préférentiellement la chaîne de AA_1 sur le cycle, ce qui n'est pas observé avec TL 4. Enfin, il faut noter que VF 1 est également formée à partir du mélange Val + Phe, ce qui est très surprenant car, dans ce cas la formation de la diketopiperazine ne peut s'envisager qu'à partir d'un tripeptide issu d'additions d'acides aminés libres.

Dans le cas du type 2, les diketopiperazines peuvent également résulter de la première étape de la formation d'amidine bicyclique déjà décrite dans le chapitre précédent. Cette première étape

suppose la formation d'une liaison peptidique entre une diketopiperazine et un acide aminé libre, avec obtention d'une dialkylamide.

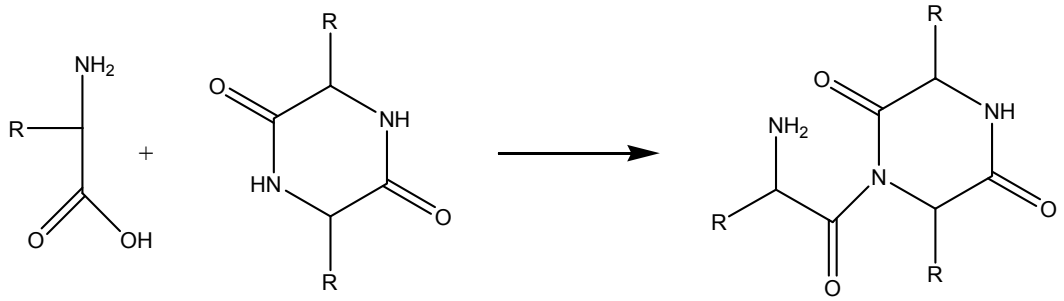


figure 3-2 : formation d'une diketopiperazine de type 2

En comparant ces différentes diketopiperazines, il apparaît que les diketopiperazines de type 1 perdent la chaîne latérale en alpha de la liaison amine du dipeptide initial, mais conservent la chaîne latérale de l'acide aminé en bêta, alors que celles du type 2 perdent les deux chaînes latérales. En effet, la chaîne latérale de la valine est conservée (diketopiperazine de type 1), alors que celle de la leucine, pourtant très proche en terme de propriétés chimiques est absente pour la diketopiperazine de type 2 de Gly-Leu et Thr-Leu. Dans Thr-Leu, la seule diketopiperazine ayant conservé une chaîne latérale est de type 1. Par ailleurs il n'y a que pour Thr-Leu que les deux types de diketopiperazines coexistent, avec pour le type 1 une chaine AA_2 sur le cycle et une chaine latérale non-identifiable et pour le type 2 l'AA_1 ou l'AA_2 en chaine latérale. Dans les autres exemples c'est toujours l'AA_2 qui est chaine latérale quel que soit le type de diketopiperazine.

Ceci pourrait indiquer des voies de synthèse différentes, suivant le type de diketopiperazines observé. Cependant, il ne s'agit à ce stade que d'hypothèses, le nombre de ces diketopiperazines complexes n'étant pas suffisant pour généraliser ces observations.

3.3. Influence de la nature des acides aminés sur les produits de pyrolyse du dipeptide

L'analyse des pyrochromatogrammes des dipeptides pyrolysés dans ce travail permet d'obtenir un certains nombre d'informations concernant l'influence de la nature de l'acide aminé – aliphatique, aromatique, hydroxylé- sur les produits de pyrolyse du dipeptide.

3.3.1. Les dipeptides aromatiques

La pyrolyse de dipeptides contenant une chaîne latérale aromatique produit de nombreux produits aromatiques en forte abondance.

Il en résulte que les pyrochromatogrammes reflètent la présence de deux types de produits. En milieu de chromatogramme éluent les produits aromatiques résultant de l'homolyse de l'acide aminé aromatique. La fin de chromatogramme est dominée par des produits issus du dipeptide et surtout de sa cyclisation en diketopiperazines, les diketopiperazines simples ayant conservé la chaîne aromatique. Ainsi, dans la première partie du chromatogramme, il est possible de retrouver la trace de produits issus de la pyrolyse de l'acide aminé individuel, alors que la seconde partie du chromatogramme est plus caractéristique du dipeptide. La présence de ces deux types de dérivés (acide aminé simple ou dipeptide) permet de croiser les données et de confirmer la nature des produits initiaux.

Les acides aminés aromatiques sont donc toujours particulièrement bien détectés, même à partir de dipeptides.

3.3.2. Les dipeptides hydroxylés

Comme constaté précédemment, la pyrolyse de dipeptide incluant un acide aminé hydroxylé peut produire un grand nombre de composés.

Les produits de pyrolyse des acides aminés individuels sont rarement détectés parmi ceux des dipeptides. Les informations relatives aux acides aminés hydroxylés se retrouvent essentiellement dans les dérivés des dipeptides, avec une perte importante en ce qui concerne la sérine. Ce résultat peut trouver son explication dans la réactivité particulière de la fonction alcool de la sérine et de la thréonine, en présence de TMAH, et qui avait déjà été notée pour les acides aminés individuels. Le protocole expérimental d'imprégnation du TMAH débute par une mise en solution de l'acide aminé dans une solution aqueuse de TMAH. Bien que les mécanismes mis en jeu lors de la pyrolyse en présence de TMAH ne sont pas encore parfaitement connus, le TMAH étant une base forte il est possible que celle-ci déprotone l'alcool, cette réactivité pouvant être exacerbée lorsque l'acide aminé hydroxylé est lié à un autre acide. Dans ce cas il est envisageable que de nouveaux mécanismes prennent place au cours de la pyrolyse du dipeptide alors qu'ils n'intervenaient pas pour l'acide aminé individuel. Ainsi, les deux acides aminés hydroxylés perdent facilement leur

chaîne latérale pour donner la glycine, le principal produit formé au cours de la pyrolyse de Thr-Ser étant le N,N-dimethylglycylglycine methyl ester.

Par ailleurs la structure de certains de ces composés indique que la déshydratation, mécanisme propre aux acides aminés hydroxylés, a lieu pendant la pyrolyse de dipeptides contenant la sérine. Ainsi les produits de pyrolyse dominants de Val-Ser sont les dérivés déshydratés du dipeptide (VS1, VS3, VS2), on note également la présence d'une methylidenepiperazine-2,5- dione (TS 5) pour Thr-Ser et d'une 5-isopropyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2) pour Val-Ser. De tels composés peuvent être utilisés comme marqueurs de la sérine. Aucun produit de déshydratation de la thréonine n'a été identifié, cette différence est vraisemblablement due au fait que la thréonine est un alcool secondaire, moins réactif que la sérine.

3.3.3. Les dipeptides aliphatiques

En ce qui concerne les acides aminés aliphatiques non fonctionnalisés il apparaît clairement que les dérivés de la méthylation directe des acides aminés sont peu détectés. De même, peu de composés résultants de la décarboxylation ou de l'homolyse de la chaîne latérale des acides aminés aliphatiques, tels que le 3-Methylbutanenitrile (ML 4, présent aussi dans Leu-Tyr et Tyr-Leu), ou le Benzenepropanenitrile (Phe-Val) ont été détectés. Cependant dans la plupart des exemples étudiés, la chaîne latérale de l'acide aminé aliphatique est présente dans les dikétopipérazines et les dipeptides méthylés qui représentent les composés dominants, et dans certains cas dans des imidazolidinones (5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2) et 2-((Dimethylamino)methyl)-5-isobutyl-3-methylimidazolidin-4-one (TL 5)).

La présence initiale d'acides aminés aliphatiques est donc à rechercher dans les structures complexes.

3.4. Discussion en terme de mécanismes

3.4.1. Les mécanismes de pyrolyse sont-ils conservés ?

La réponse à la question du titre est à nuancer. Même s'il est évident que les principaux mécanismes observés pour la pyrolyse des acides aminés n'ont plus la même importance pour la

pyrolyse de dipeptides, la méthylation, la cyclisation et l'homolyse restent des mécanismes très importants au cours de la pyrolyse de dipeptides en présence de TMAH.

La cyclisation et l'homolyse sont les mécanismes qui sont certainement les plus observés dans la pyrolyse des dipeptides étudiés au cours de ce travail. Les différents mécanismes ayant lieu au cours de la pyrolyse de dipeptides en présence de TMAH sont présentés dans le tableau suivant (cf. tableau 3-1). La cyclisation correspond à la formation d'imidazolidinones, elle est différenciée de la formation de diketopiperazines, pour mieux souligner l'importance de ces diketopiperazines. Par méthylation, il est entendu la formation des dérivés méthylés des dipeptides sans l'intervention d'un autre mécanisme. L'homolyse produit à la fois des dérivés des chaînes latérales des acides aminés et les dipeptides privés d'une de ces chaînes.

tableau 3-1 :Mécanismes observés au cours de la pyrolyse de dipeptides en présence de TMAH

Dipeptide	DKP	méthy-lation	cyclisation	homolyse	dm AA		$-H_2O$
					AA_1	AA_2	
Val-Phe	+ + +	+				+	
Ala-Tyr	+ + +	+ +		+ +		+	
Ala-Trp	+ + +	+		+ + +		+	
Gly-Gly	+ + +	+ +			+ +		
Gly-Leu	+ + +	+ +			+	+ +	
Leu-Trp	+ + +	+		+ +			
Thr-Ser	+ + +		+ +	+ + +			+
Gly-Ser	+		+ +	+ +		+	
Val-Thr	+ + +			+ +	+		+
Val-Ser			+ +		+	traces	+ + +
Thr-Leu	+ + +		+	+ +		+	
Ser-Tyr	+ +			+ + +		+	
Phe-Val	+ +	+ + +		+ +	+	+	
Leu-Tyr	+ + +	+		+ +	traces	+	
Tyr-Leu	+ + +	+		+ +	+	traces	
Met-Leu	+ + +	+ +			+	+ +	
Leu-Met	+ + +	+ +			+ +	+ +	

légende du tableau :
DKP : formation de diketopiperazine
cyclisation : cyclisatoin autre que la formation de diketopiperazine
dm AA : formation de dérivés méthylés d'un acide aminé
$-H_2O$: déshydratation
$-H_2$: déshydrogénation

La formation de diketopiperazines

Ces composés sont observés dans de nombreux pyrochromatogrammes. Bien souvent, ces diketopiperazines subissent des réactions de méthylation et/ou des réactions d'homolyse. Pour les dipeptides pyrolysés dans cette étude, il est évident que la production de diketopiperazines

représente le mécanisme le plus important, à la fois en terme de nombre de composés produits par les dipeptides mais aussi par l'abondance de ces composés.

Ce résultat est logique puisque la formation de diketopiperazines à partir des dipeptides ne nécessite qu'une étape de cyclisation (suivie ou non d'autres mécanismes, méthylation ou homolyse par exemple), alors qu'elle nécessitait une étape préalable de dimérisation pour la pyrolyse des acides aminés individuels.

De plus, cette étude a mis en évidence de nouvelles formes de diketopiperazines comportant trois acides aminés qui, à notre connaissance, n'avaient pas encore été décrites. Ces diketopiperazines portent un substituant sur l'atome d'azote, en plus d'une des chaînes latérales qui peut être éliminée.

D'autres mécanismes de cyclisation conduisent à des composés différents, dont l'abondance est beaucoup plus faible, notamment différentes imidazolidinones formées à partir de dipeptides contenant un acide aminé hydroxylé. On distingue deux types d'imidazolidinones. Le premier est obtenu par cyclisation à partir du groupe NH_2 libre de—l'acide aminé N-terminal, dont le doublet libre attaque le CH en α du groupe carboxylique de l'acide C-terminal, suivie d'une décarboxylation (figure 3-3). On peut ainsi expliquer la formation des imidazolidinones de Gly-Ser (GS 1) et de Val-Ser (VS2).

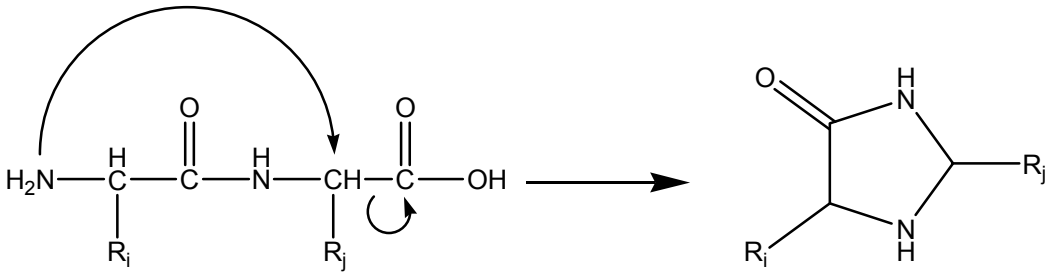


figure 3-3 : mécanisme de formation d'une imidazolidinone à partir d'un dipeptide

La formation du second type, qui comporte trois atomes d'azote et qui est présent dans Val-Ser (VS3) et Thr-Leu (TL5), résulte de la formation et de la décomposition d'amidines bicycliques déjà décrites dans le chapitre précédent.

L'homolyse

L'homolyse se manifeste essentiellement par la production de composés aromatiques, tels que le toluène, les méthoxybenzenes ou les noyaux indoles pour les dipeptides comportant respectivement de la phenylalanine, de la tyrosine et du tryptophane, et par des diketopiperazines et des dipeptides ayant perdu certaines, voire la totalité, de leurs chaînes latérales. Elle est

majoritairement observée pour les dipeptides à chaîne latérale aromatique, mais est aussi un mécanisme très important pour d'autres dipeptides. Ainsi le produit de pyrolyse prédominant de Thr-Ser est le dipeptide correspondant à Gly-Gly.

Ce mécanisme présente donc un intérêt pour la détection d'acides aminés aromatiques, ce qui est illustré par les études d'échantillons naturels publiées jusqu'ici (Knicker *et al.*, 2001; Kögel-Knabner, 2000; Mannino & Harvey, 2000), qui s'appuient sur les produits d'homolyse des acides aminés aromatiques pour indiquer leur présence dans l'échantillon étudié.

Ainsi ce mécanisme était déjà utilisé pour détecter la présence de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane en pyrolyse en présence de TMAH.

La méthylation

Si l'on considère uniquement le mécanisme de méthylation directe des dipeptides, sans intervention d'un autre mécanisme, celui-ci est moins important que dans le cas des acides aminés individuels. Ce mécanisme n'est important que dans quelques cas (Gly-Gly, Gly-Leu, Phe-Val), alors qu'il l'était de façon majoritaire pour les acides aminés libres.

Toutefois, le mécanisme de méthylation ne se limite pas à la production des dérivés méthylés de dipeptides. Tous les produits formés au cours de la pyrolyse des dipeptides et qui peuvent être méthylés le sont à des degrés divers.

Ainsi, le mécanisme de méthylation perd un peu de son importance en tant que mécanisme unique mais est concomitant aux autres mécanismes importants de la pyrolyse des dipeptides.

La déshydratation

Elle ne peut se produire que pour les acides aminés hydroxylés, et parmi les dipeptides hydroxylés étudiés, seuls ceux contenant de la sérine forment les homologues déshydratés. Il est intéressant de noter que ce mécanisme ne se produit pas sur la sérine libre. En revanche, des composés formés par d'autres mécanismes, comme les diketopiperazines, peuvent subir des déshydratations, dans les dipeptides comme dans les acides aminés libres.

Ainsi, la pyrolyse de Val-Ser est dominée par des produits de déshydratation : le 2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1) et 2-(2-Dimethylamino-3-methyl-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 2).

Déamination, décarboxylation

Les produits résultants de la déamination ou de la décarboxylation, en tant que mécanisme unique, ne sont peu, ou pas détectés dans les pyrochromatogrammes des dipeptides pyrolysés dans cette étude. Seuls des produits résultant de l'homolyse d'acides aminés aromatiques et d'un de ces deux mécanismes sont observés parmi les produits de pyrolyse de dipeptides aromatiques.

Dimérisation

Dans le cas des dipeptides et contrairement aux acides aminés individuels la dimérisation n'est pas nécessaire à la formation des diketopiperazines classiques. Cependant le même type de réaction est mis en jeu pour la formation des diketopiperazines comportant trois acides aminés. Par ailleurs la dimérisation des dipeptides si elle se produit, conduit à des composés de poids moléculaire élevé et /ou de polarité variables en fonction du degré de méthylation, qui ne permettent pas leur détection dans les conditions de chromatographie utilisées.

Cependant, les hypothèses de formation de diketopiperazines portant un substituant sur l'atome d'azote, nécessitent la formation d'un tripeptide. Ce tripeptide peut être produit, comme discuté précédemment, à partir d'un tetrapeptide, qui perdrait alors un acide aminé, soit à partir du dipeptide et d'un fragment de dipeptide généré par la pyrolyse.

Rupture de la liaison peptidique

Des dérivés méthylés de l'un des deux acides aminés ont été observés pour tous les dipeptides sauf pour Leu-Trp et Thr-Ser. La rupture de la liaison peptidique est donc un des mécanismes de la pyrolyse des dipeptides en présence de TMAH mais reste néanmoins un mécanisme mineur. Comme mentionné dans le paragraphe 2.5.4, la production de dérivés méthylés de l'acide aminé ne semble pas dépendre de sa position dans le dipeptide, même si la position C-terminale parait un peu plus favorable. La nature des acides aminés ne semble pas non plus influencer la production de dérivés méthylés. En effet, des dérivés méthylés du tryptophane ont été détectés dans Ala-Trp, mais pas dans Leu-Trp. Mais des dérivés de la tyrosine ont été systématiquement observés pour les dipeptides contenant de la tyrosine. De même pour les acides aminés aliphatiques : des dérivés méthylés de la valine et de la leucine ont été détectés respectivement pour Val-Thr, Val-Ser, et Gly-Leu, Thr-Leu, mais pas pour Val-Phe ou Leu-Trp.

Ainsi, il est difficile de proposer des paramètres qui influenceraient ce mécanisme de rupture de la liaison peptide qui aboutit à la formation des dérivés méthylés d'un ou des deux acides aminés constitutifs du dipeptide.

D'autres mécanismes ?

Au cours de cette étude un nombre important de dipeptides a été pyrolysé. Cependant tous ces dipeptides sont constitués d'acides aminés neutres, aucun d'entre eux ne comporte de diacide ou d'acide avec une chaîne latérale aminée. La liste des mécanismes reportés dans ce travail n'est donc vraisemblablement pas exhaustive.

3.4.2. Implications pour l'étude d'échantillons de Matière Organique Naturelle

Etant données la variabilité des produits majoritaires obtenus pour les acides aminés individuels et pour les dipeptides, et l'utilisation que nous souhaitons faire des informations acquises au cours de cette étude, il est nécessaire de se poser la question : quels produits de pyrolyse peuvent révéler la présence de matériel protéique dans un échantillon naturel ? Les produits majoritaires de la pyrolyse des acides aminés individuels ne sont généralement pas ceux détectés dans les pyrochromatogrammes des dipeptides. Observés dans la pyrolyse d'échantillons naturels, les composés majoritaires de la pyrolyse des acides aminés individuels traduisent donc la présence de ces acides aminés à l'état libre, voire encapsulés dans du matériel organique réfractaire (Knicker & Hatcher, 1997) ou emprisonnés dans un édifice macromoléculaire, et libérés par la pyrolyse en présence de TMAH. Ceci rend quantitativement difficile la détection de ces acides aminés libres à partir des mélanges complexes qui constituent les matières organiques des sols ou des eaux.

D'autre part, des composés détectés dans la plupart des pyrochromatogrammes de dipeptides, tels que les diketopiperazines, les dérivés méthylés des dipeptides et les produits d'homolyse, révèleraient la présence d'acides aminés impliqués dans des édifices moléculaires plus gros que les acides aminés.

Il apparaît au cours de cette discussion que les composés qui peuvent servir de marqueurs de matériel azoté protéique sont principalement des produits cycliques (diketopiperazines) et/ou des dérivés aromatiques (produits d'homolyse)

4. Des hypothèses sur la multiplicité de certains spectres de masse

Au cours de ce travail, nous avons remarqué l'élution à des temps de rétention différents des composés dont les spectres de masse sont rigoureusement identiques. Le tableau 4-1 récapitule les cas de détection multiple du même composé dans les pyrochromatogrammes de dipeptides.

tableau 4-1 : les composés détectés plusieurs fois

Dipeptide	Composés détectés	nom-bre	temps de rétention (min)
Ala-Tyr	i-Methyl-3-(4-Methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (AY 1)	2	77.80 // 78.90
	3-(4-methoxybenzyl)-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione	2	76.35 // 73.89
	i,j-Dimethyl-3-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione	2	76.78 // 74.89
	i-Methylalanyl-methoxytyrosine methyl ester	2	72.03 // 71.91
Ala-Trp	3-(3-(N-Methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione (AW 1)	3	87.24 // 88.85 // 87.64
	i-Methyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione	2	86.46 // 83.19
	i,j-Dimethyl-3-(3-(N-methylindolyl)-methyl-6-methyl-piperazine-2,5-dione)	2	82.20 // 84.81
	N,N,N"-Trimethylalanyltryptophane methyl ester (AW 3)	2	81.73 // 81.42
Gly-Leu	1-(2-(Dimethylamino)acetyl)-3-isobutyl-4-methylpiperazine-2,5-dione (GL 4)	2	60.33 // 60.02
Leu-Trp	3-Isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione (LW 1)	2	92.08 // 91.15
	i-Methyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione	3	90.59 // 86.77 // 89.13
	N-Methylleucyl-N"-methyltryptophane methyl ester (LW 2)	2	85.09 // 85.43
	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(3-(N-methylindolyl)methyl)-piperazine-2,5-dione	2	89.72 // 87.98
Val-Thr	i-Methyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 1)	2	50.10 // 50.60
	Methyl 2-(2-amino-3-methylbutanamido)but-3-enoate (VT 6)	2	54.57 // 54.32
	i,j-Dimethyl-3-isopropyl-6-(1-hydroxyethyl)-piperazine-2,5-dione (VT 4)	2	48.54 // 51.33
Val-Ser	2-(3-Methyl-2-methylamino-butyrylamino) acrylic acid methyl ester (VS 1)	2	46.45 // 47.04
	5-Isopropyl-3-methyl-2-methylene-imidazolidin-4-one (VS 2)	2	31.59 // 34.26
	2-(2-Dimethylamino-3-methyl-butyrylamino) acrylic acid methyl ester	2	45.52 // 47.63
Thr-Leu	i,j-Dimethyl-1-(1-oxo-2-amino-3-methoxybutyl)-piperazine-2,5-dione (TL 3)	2	53.19 // 51.45
Ser-Tyr	i-Methyl-3-((4'-methoxyphenyl)-methyl)-piperazine-2,5-dione (SY 1)	3	77.25 //76.04 // 78.25
Phe-Val	Phenylalanylvaline methyl ester	2	69.17 // 69.82
	4-Methyl-3-benzyl-6-isopropyl-piperazine-2,5-dione (FV 1)	2	74.12 // 72.63
Leu-Tyr	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (LY 1)	2	83.36 // 84.15
	6-Isobutyl-3-(4-methoxybenzyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione (LY 3)	2	81.65 // 79.31
	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (LY 4)	2	80.08 // 78.25
Tyr-Leu	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 1)	2	84.18 // 83.22
	1-Methyl-3-isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione (YL 2)	3	81.66 // 79.42 // 82.10
	3-Isobutyl-6-(4-methoxybenzyl)-1,4-dimethylpiperazine-2,5-dione (YL 4)	2	80.26 // 78.36
Met-Leu	N-Methyl-methionylleucine methyl ester	2	66.19 // 66.32
	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 2)	2	71.77 //70.74
	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (ML 3)	2	67.19 // 67.47
Leu-Met	N-Methylleucylmethionine methyl ester	2	65.69 // 65.87
	i-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 2)	2	71.30 // 70.43
	j-Methyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione (LM 3)	2	70.12 // 70.93
	1,4-Dimethyl-3-isobutyl-6-(2-methylthio)ethyl-piperazine-2,5-dione	2	69.22 // 68.42

A priori, un spectre de masse correspond à la fragmentation d'une molécule de structure donnée. En théorie, à un spectre de masse ne correspond qu'une seule molécule. Les composés qui

présentent le même spectre de masse mais éluent à plusieurs temps de rétention sont donc nécessairement différents.

Pour expliquer ces observations, plusieurs hypothèses peuvent être émises, tout d'abord en considérant les propriétés physico-chimiques des composés considérés. Ces derniers sont exclusivement des diketopiperazines et quelques dérivés méthylés de dipeptides.

4.1. Equilibre céto-énolique

Les diketopiperazines portent toutes deux atomes d'azote et deux fonctions cétones. Il est connu que la fonction cétone peut être impliquée dans un équilibre céto-énolique. Appliqué à une diketopiperazine (cf. figure 4-1), cet équilibre permet d'obtenir des formes moléculaires dont la rétention sur une colonne chromatographique apolaire est différente (Hendricker & Voorhees, 1998).

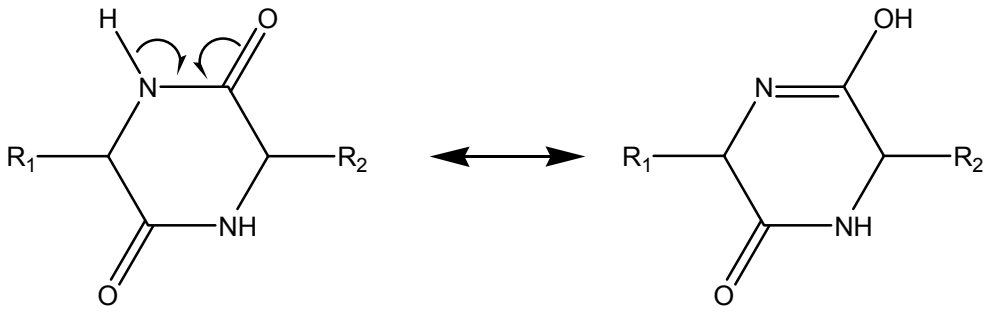


figure 4-1 : équilibre céto-énolique appliqué à une diketopiperazine.

Ainsi, l'équilibre mènerait à deux formes distinctes et séparées en chromatographie gazeuse. On peut imaginer que les conditions de pression et de température régnant au sein de la chambre d'ionisation du spectromètre de masse sont très favorables à l'une des deux formes, qui serait alors l'unique forme à être détectée en spectrométrie de masse. Zamir *et al.* ont montré l'influence de la température de la source sur la prépondérance d'une des deux formes de l'équilibre céto-énolique (Zamir *et al.*, 1969). De deux formes moléculaires en chromatographie, un seul signal de spectrométrie de masse serait ainsi obtenu.

De plus, les deux formes peuvent être méthylées. Il est donc possible d'imaginer des formes « mixtes », avec une méthylation sur l'azote et une méthylation sur l'hydroxyle, ce qui augmente encore le nombre de formes moléculaires possibles.

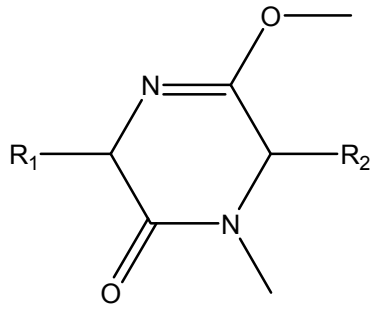


figure 4-2 : méthylation « mixte » d'une diketopiperazine.

Ces considérations sont également valables dans le cas des dipeptides, qui portent une seule fonction cétone pouvant intervenir dans un équilibre céto-énolique.

4.2. Séparation de stéréoisomères

Une autre hypothèse repose sur la séparation de stéréoisomères. En considérant des chaînes latérales différentes du proton (c'est-à-dire quand les acides aminés constitutifs sont différents de Gly), les diketopiperazines et les dipeptides portent au moins deux centres chiraux.

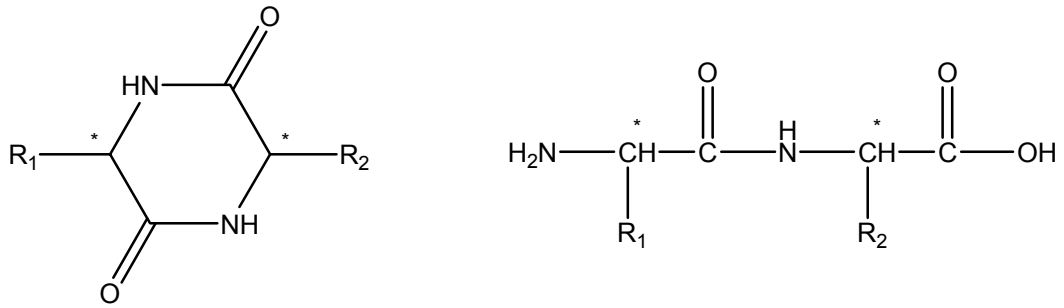


figure 4-3 : les deux centres chiraux d'une diketopiperazine et d'un dipeptide.

Il en découle quatre stéreoisomères : RR, SS, RS, et SR. Notons aussi que l'isoleucine, et la thréonine portent un carbone chiral sur leur chaîne latérale, ce qui peut multiplier les formes différentes.

Il semble peu probable de séparer les énantiomères : la littérature portant sur la séparation d'énantiomères par chromatographie gazeuse reporte systématiquement l'utilisation de phases stationnaires particulières. La séparation d'énantiomères requiert des phases chirales qui interagissent via des liaisons hydrogène et des mécanismes de coordination ou d'inclusion (Bicchi *et al.*, 1999; Schurig, 2001). Ces phases stationnaires particulières sont basées sur le greffage à leur

surface d'agents chiraux : des dérivés d'acides aminés, des dérivés de terpènes liés à des métaux de coordination, et des cyclodextrines modifiées.

Dans notre cas, la séparation chromatographique est assurée par une colonne capillaire apolaire classique. Il serait donc assez surprenant qu'elle puisse permettre la séparation d'énantiomères.

Cependant, sur les quatre stéréo-isomères possibles, seuls deux sont énantiomères. Les deux autres stéréo-isomères sont des diastéréoisomères dont les propriétés physico-chimiques et la réactivité peuvent être différentes. Par conséquent, il est tout à fait possible de séparer des diastéréoisomères par chromatographie gazeuse sur une colonne capillaire apolaire, si ces diastéréoisomères ont des températures d'ébullition ou une affinité pour la phase stationnaire différentes. Ainsi les diastéréoisomères de l'acide tartrique sont très bien séparés dans nos conditions (Allard & Derenne, 2007).

4.3. Conclusion

Il reste impossible de trancher pour l'une ou l'autre des hypothèses précédentes. On peut donc envisager l'équilibre céto-énolique et la séparation de diastéréo-isomères selon les cas.

De plus, devant le nombre parfois élevé de ces composés multiples (jusqu'à trois), une unique hypothèse ne suffit pas pour expliquer cette multiplicité. Il s'agit donc certainement d'une conjonction de ces hypothèses.

5. Un possible biais d'interprétation

"Limitations in interpreting TMAH thermochemolysis of natural organic matter considering glycine and alanine derivatives." *

5.1. Introduction

Nitrogen-containing organic compounds represent the second most abundant reservoir of nitrogen of the earth. Geochemical organic nitrogen occurs mainly in soil organic matter (SOM) in terrestrial pools and in dissolved or particulate organic matter (DOM, POM) in aquatic ones. Despite the important implication of these forms of nitrogen in environmental processes, their chemical structure and origin remain widely unknown likely due to the refractory nature of their source macromolecules (30 to 50% of total nitrogen in humic substances) (Schulten & Schnitzer, 1998). Recent studies (del Rio *et al.*, 2004; Knicker & Hatcher, 2001), using ^{15}N NMR spectroscopy, pointed to the occurrence of amide functions in these natural environments, thus suggesting that N is engaged in polar building blocks of proteinaceous origin. Pyrolysis in the presence of tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH), called thermochemolysis, appears as a powerful tool for the study of nitrogen-containing moieties. Indeed, the addition of TMAH, which is a base reactant and a methylating agent, was shown to considerably increase pyrolysis efficiency and improve the detection of polar pyrolysis products as their methylated derivatives (Challinor, 1989).

In a few recent studies, TMAH-Py-GC-MS has been used to investigate the chemical composition of refractory OM from different sources, and especially focused on the origin of refractory nitrogen-containing macromolecules. Although it was pointed out that direct identification of amino acid derivatives is generally difficult and that secondary products are often used as indicators of proteinaceous origin (Frazier et al., 2003), the detection of methylated amino acids through TMAH-Py-GC-MS was reported. from dissolved and particulate organic matter (Mannino and Harvey, 2000), humic acids (Zang *et al.*, 2000) (Knicker *et al.*, 2001). (Zang *et al.*, 2001) and sediments (Garcette-Lepecq *et al.*, 2001; Riboulleau *et al.*, 2002); (del Rio *et al.*, 2004). Such a detection was used as an additional evidence for the occurrence of proteinaceous moieties,

* *Le texte présenté ici est un projet de note pour Organic Geochemistry*

as source macromolecule of the studied natural organic matter. Due to the labile character of proteins, such a preservation was unexpected and a mechanism involving encapsulation into hydrophobic domains of the organic matter was put forward to account for the survival of the proteinaceous moieties in the geological record ((Knicker & Hatcher, 1997; Zang *et al.*, 2000). In sulphur-rich sediments, these hydrophobic domains may result from lipid natural sulphurization (del Rio *et al.*, 2004; Mongenot *et al.*, 2001; Nguyen & Harvey, 2003; Riboulleau *et al.*, 2002).

Among the methylated amino acids, those derived from glycine and alanine appeared to be detected more frequently and often in relatively higher amount than the other amino acids. As these two amino acids are the simplest ones, this was interpreted as a diagenetic effect, glycine and alanine being common diagenetic products of several other amino acids (Riboulleau *et al.*, 2002). The preferential release of the same two amino acids from the tertiary Pula oil shale upon hydrolyses was interpreted in the same way (Nguyen & Harvey, 2003).

However, in a recent survey of the behaviour of the 20 proteinaceous amino acids, upon TMAH-Py-GC-MS, the methylated derivatives from glycine and alanine were shown to be produced from other amino acids than glycine and alanine themselves (Gallois *et al.*, 2007). This led to question the specificity of these derivatives as markers of their amino acid precursors and, more generally, to consider the limits of this methodology in the identification of oligopeptides in comples natural organic matter.

Analysis of TMAH pyrolysis products from dipeptides revealed the role of the peptidic bond, as the main products are generally different from those previously observed from individual amino acids (unpublished data). The production of methylated counterparts of glycine and alanine through TMAH-Py-GC-MS is hereby discussed in terms of source.

5.2. Results and discussion

In agreement with previous studies of amino acid pyrolysis in the presence of TMAH (Zang *et al.*, 2001) or HMDS (Chiavari & Galletti, 1992) as derivatizing agents, the directly derived products, e.g. successively methylated (sylilated for HMDS) counterparts of the amino acids, constitute the main signals of the pyrochromatograms of most of the 20 proteinaceous amino acids (Gallois *et al.*, 2007). Thus the pyrochromatogram of threonine exhibits intense signals corresponding to O-Methylthreonine methyl ester, N-Methyl-O-methylthreonine methyl ester, N,N-dimethylthreonine methyl ester, N-Methyl-O-methylthreonine methyl ester and N,N-Dimethyl-O-methylthreonine methyl ester (Fig. 1).Similarly, Gly and Ala methylated counterparts are the main products in the pyrochromatograms of their amino acid precursor.

In some cases, although not directly derived from the amino acid by methylation, the pyrolysis products can be unambiguously assigned to a given amino acid. This is observed with the aromatic amino acids, which undergo homolysis of the side chain, hence the formation of aromatic products such as benzene or indole derivatives from Phe, Tyr or Trp. Some cyclisation products, such as diketopiperazinediones (DKP), can also be characteristic of their precursor, when they keep the side chain of the amino acid, as observed from proline, Phe, Leu or Thr, for example.

Beside the direct derivatives and characteristic compounds of the precursor amino acids, peaks have been assigned to N,N-Dimethylglycine methyl ester and N,N-Dimethylalanine methyl ester on the basis of their mass spectra and retention time in pyrochromatograms of amino acids different from Gly and Ala. We termed A and B these compounds. Compound A is characterized by a base peak at m/z 58 and fragments at m/z 117 (molecular ion) and 42 and it is eluted at 8.3 minutes under the used GC temperature program ; compound B shows a base peak at m/z : 72, a molecular ion at 131 and a fragment at m/z 56, eluting at 11.8 min.

The second most intense peak of the pyrochromatogram of threonine (Thr) is thus assigned to compound A and traces of B can be detected (Fig. 1) and the same signals have also been detected in serine (Ser) although with a lower intensity. The formation of A can be explained by the cleavage of the side chain of the amino acid upon thermochemolysis. It must be noted that, contrary to what is observed from aromatic amino acids, homolysis from these two hydroxylated amino acids yield the remaining de-alkylated amino acid but the side chain itself was not detected. The formation of B would involve the elimination of the hydroxyl group from serine along with the cleavage of the adjacent methyl group in threonine. The elimination of the side chain and

subsequent methylation on the carbon bearing the amino and carboxyl groups cannot be excluded too.

The formation of A and B compounds from two amino acids (Thr and Ser) different from Gly and Ala indicates that caution must be exercised in interpreting their occurrence when such products are observed in pyrolysates of natural organic matter. However, major differences are noted in the behaviour of free amino acids and of those engaged in a peptidic bond upon TMAH pyrolysis. In order to study the molecular structure of complex samples, such as refractory proteinaceous material, it is therefore necessary to determine if compound A or/and B could also arise from other amino acids than Gly and Ala when linked by a peptidic bond.

In the course of our study of TMAH pyrolysis of dipeptides, we investigated the pyrolysis products of several dipeptides containing Ser or Thr (the amino acids which were shown to be A and B precursors when free), without Gly or Ala. They are Val-Thr, Val-Ser, Thr-Leu, Ser-Tyr and Thr-Ser.

In these dipeptides, Ser or Thr is located either in C- or N-terminal position. Amino acids engaged in the peptidic linkage by their amine group (C-terminal) are expected to release more easily their direct methylated counterparts and therefore A and B compounds than those engaged by their carboxylic acid group (N-terminal). The pyrochromatograms of Val-Thr and Val-Ser do contain A and B compounds but no direct methylated homologues of Thr and Ser although significant amounts of methylated derivatives of Val are observed (Fig. 2). When dipeptides with N-terminal Thr or Ser are considered, such as Ser-Tyr and Thr-Leu, methylated derivatives of Tyr and Leu are observed along with low amounts of compound A in the case of Thr-Leu. Neither A nor B was detected from Ser-Tyr, which is not surprising as pyrochromatograms of dipeptides containing an aromatic amino acid are generally dominated by more stable aromatic products.

Finally, Thr-Ser was also pyrolysed and it yielded A compound in the same proportion as from Val-Ser. It thus appears that no relationship can be drawn between the production of A or B compounds and the position (N- or C-terminal) of its precursor amino acid. This is further supported by the release of A from Gly-Leu, in higher abundance than from Gly-Ser.

However, this clearly shows the production of A and B compounds from dipeptides that do not contain Gly or Ala as constituting amino acids and reveals that even engaged in a peptidic bond, hydroxylated amino acids such as Thr or Ser can be precursors of A and B. As a result, the detection of A or B in natural samples cannot be straightly related to the presence of Gly or Ala. Moreover, it does not indicate that amino acids occur as free molecules. The interpretation of the

occurrence of A and B compounds in TMAH pyrolysates of natural organic matter should be revised as only indicative of amino acid moiety.

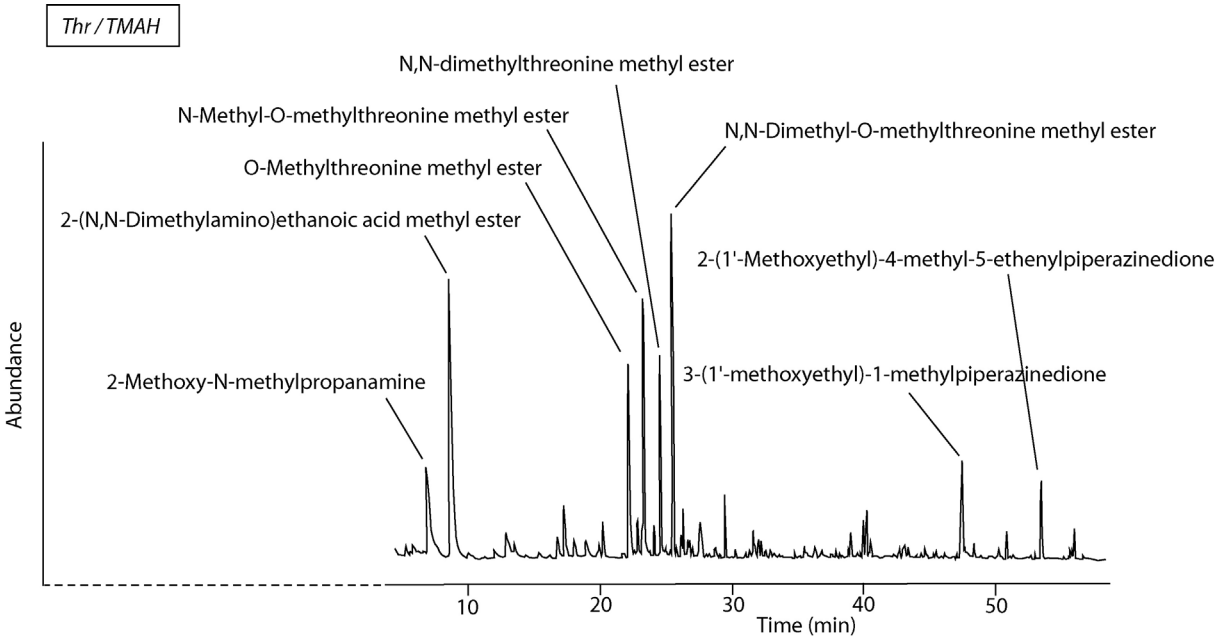


Fig. 1 : Pyrochromatogram of Thr in the presence of TMAH

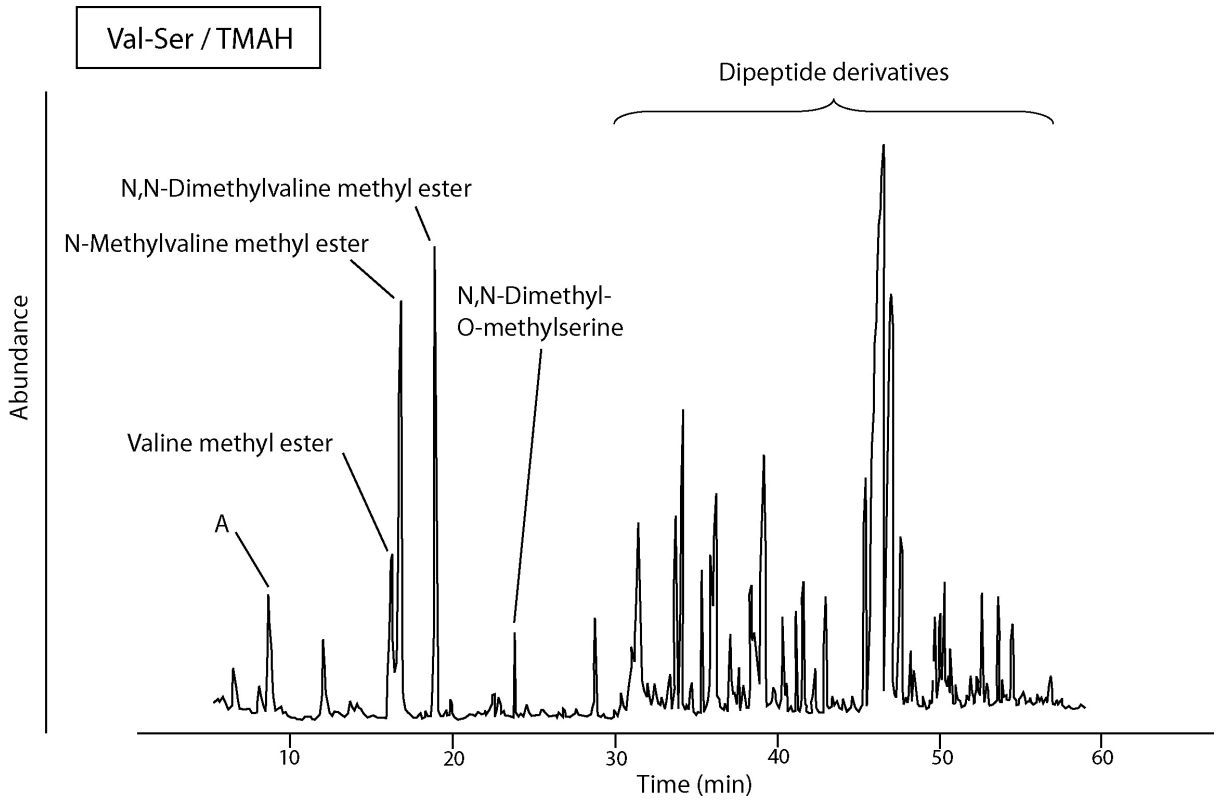


Fig. 2: Pyrochromatogram of Val-Ser in the presence of TMAH

Chapitre 4 :
Py-GC-MS en présence de TMAH de polypeptides et de macromolécules

1. La pyrolyse de polypeptides 221

1.1. Val-Ala-Ala-Phe 223

1.2. Arg-Lys-Asp-Val-Tyr 227

1.3. Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH_2 231

1.4. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg 235

1.5. Pyrolyse de SAB 238

1.6. Discussion 243

2. La pyrolyse de macromolécules 245

2.1. La lignine 247

2.2. Mélanges SAB/lignine 249

2.2.1. Mélange SAB/lignine, 50/50 251

2.2.2. Mélange SAB/lignine, 80/20 255

2.2.3. Discussion 255

2.3. La cellulose 259

2.4. Mélanges SAB/cellulose 262

2.4.1. Mélange 50/50 265

2.4.2. Mélange 80/20 269

2.5. Mélange SAB / lignine / cellulose 273

2.6. Conclusion 275

Les chapitres précédents ont permis d'établir une base de données sur les produits de la pyrolyse en présence de TMAH des acides aminés individuels et de mettre en évidence l'importance de la liaison peptidique dans le comportement pyrolytique des acides aminés engagés dans un dipeptide. L'objectif final de ce travail étant de parvenir à caractériser les produits de pyrolyse d'échantillons naturels macromoléculaires, la suite des deux premiers chapitres est naturellement l'étude de la pyrolyse en présence de TMAH d'entités encore plus grandes, à savoir des polypeptides.

Ce dernier chapitre est développé selon deux axes successifs autour de l'analyse de matériel protéique par pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse à détection de spectrométrie de masse en présence de TMAH.

La première partie de ce chapitre aborde la pyrolyse de peptides constitués de plus de deux acides aminés. C'est la première utilisation de la base de données constituée par l'analyse des acides aminés et des dipeptides. Elle propose ensuite une application du travail décrit dans ce manuscrit à l'analyse d'une protéine connue, la Sérum Albumine Bovine (SAB). Cet exemple a pour objectif de replacer dans un contexte plus général le travail réalisé dans ce manuscrit.

La seconde partie de ce chapitre compare les comportements de différentes macromolécules, la lignine et la cellulose, qui constituent la biomasse.

1. La pyrolyse de polypeptides

La pyrolyse de polypeptides est peu décrite dans la littérature. Les articles abordant ce sujet concernent essentiellement, soit des protéines naturelles, telles que la kératine (Marshall & Gillespie, 1977; Munson & Fetterolf, 1987; Munson & Vick, 1985), des enzymes (Danielson *et al.*, 1978; Danielson & Rogers, 1978; Tsuge & Matsubara, 1985), la soie (Challinor, 1991), des microcystines (Camean *et al.*, 2005) ou encore la Sérum Albumine Bovine (Boon & De Leeuw, 1987; Zang *et al.*, 2001), soit des microorganismes entiers, comme des cyanobactéries (Boon & De Leeuw, 1987) ou des bactéries (Dworzanski *et al.*, 2005; Voorhees *et al.*, 1997), soit des polypeptides constitués de la répétition d'un même acide aminé (Basiuk & Douda, 2000; Basiuk & Douda, 2001; Berwick *et al.*, 2007; Meetani *et al.*, 2003).

La détection de matériel protéique est également mentionnée par des études pyrolytiques de matière organique particulaire (Brock *et al.*, 1985) ou de certaines fractions de matière organique du sol (humine et acides humiques) (Saiz-Jimenez & De Leeuw, 1986).

Certains travaux s'intéressent à la détermination de la séquence des acides aminés dans le polypeptide étudié. Ainsi Boon et de Leeuw (1987) ont observé la production de pyrrolediones et de pyrrolidinediones issu de la combinaison de deux acides aminés adjacents. Ces composés informent donc sur la séquence du polypeptide pyrolysé, tout comme les chaînes latérales des diketopiperazines (Voorhees *et al.*, 1994).

Peu d'articles abordent la pyrolyse de peptides constitués de 3 à 9 acides aminés et s'intéressent aux mécanismes de pyrolyse. Voorhees décrit la formation de diketopiperazines à partir de petits peptides sans TMAH (Voorhees *et al.*, 1994) et avec (Hendricker *et al.*, 1998). Knicker (2001) propose l'analyse de plusieurs peptides, allant du dipeptide jusqu'à l'octapeptide afin de mieux interpréter les résultats obtenus avec des échantillons naturels. Dans ce dernier cas, il s'agit de thermo-chemolyse en tube scellé. Plus récemment, Meetani étudie la pyrolyse (sans TMAH) d'un heptapeptide (Meetani *et al.*, 2003), et met en évidence l'importance de produits de cyclisation.

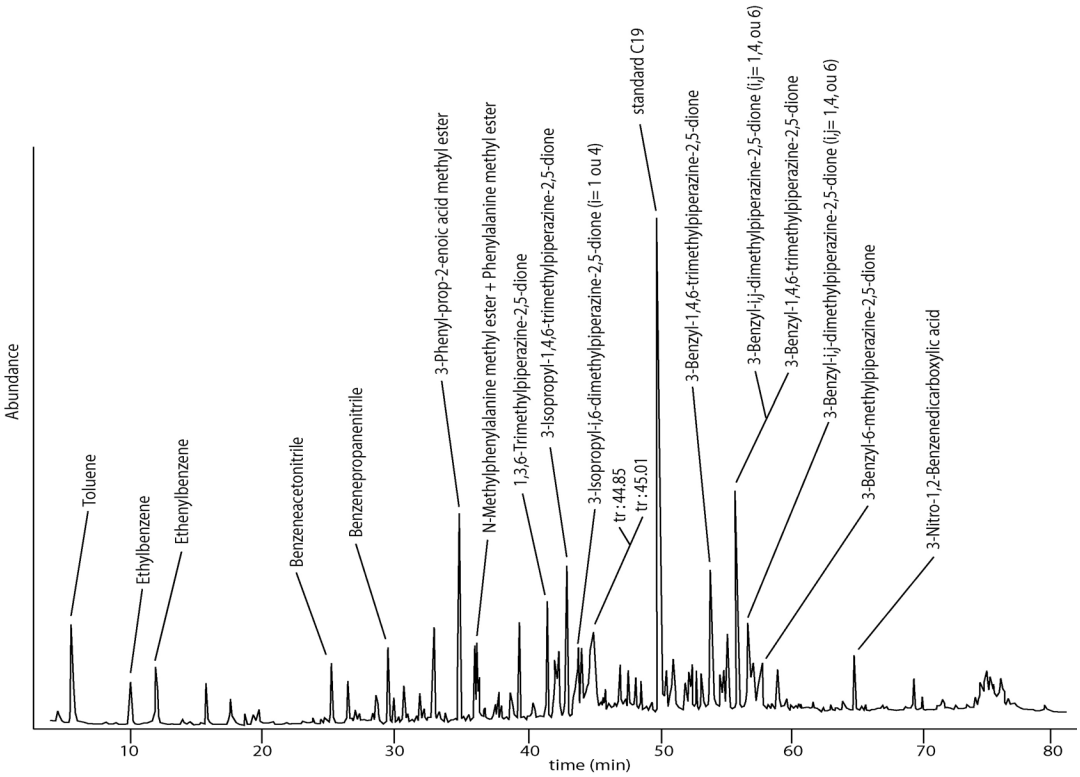


figure 1-1 : pyrochromatogramme de VAAP en présence de TMAH, obtenu avec des conditions chromatographiques légèrement différentes des autres pyrochromatogrammes. La rampe de température est de 4°C.min^{-1} au lieu de 3°C.min^{-1} et un standard a été ajouté (alcane en C_{19}).

tableau 1-1 : Produits principaux de la pyrolyse de VAAP en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine (**)
34,85	100	**131**	103	77	162	51	161	162	3-Phenyl-prop-2-enoic acid methyl ester	Phe
43,05	98	**127**	58	156	42	155	141	198	3-Isopropyl-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione	Val-Ala
5,62	75	**91**	92	65	39	51	63	92	Toluene	Phe
56,88	73	**91**	113	58	141	44	42	232	3-Benzyl-i,j-dimethylpiperazine-2,5-dione (i,j= 1,4, ou 6)	Phe
53,99	71	**155**	127	58	42	99	256	246	3-Benzyl-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione	Ala-Phe
56,01	71	**91**	113	141	232	58	44	232	3-Benzyl-i,j-dimethylpiperazine-2,5-dione (i,j= 1,4, ou 6)	Phe
56,07	71	**127**	155	99	246	58	91	246	3-Benzyl-1,4,6-trimethylpiperazine-2,5-dione	Ala-Phe
43,86	67	**58**	142	127	42	72	184	184	3-Isopropyl-i,6-dimethylpiperazine-2,5-dione (i= 1 ou 4)	Val-Ala
45,01	63	**86**	44	128	55	113	72			
41,53	56	**42**	58	127	156	155	141	156	1,3,6-Trimethylpiperazine-2,5-dione	Ala-Ala
57,81	51	**91**	44	99	127	218	65	218	3-Benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione	Ala-Phe
44,85	47	**86**	44	128	113	55	42			
51,04	43	**42**	127	184	58	113	155			
32,93	37	**128**	42	127	43	41	71			
42,4	36	**58**	142	42	127	72	56	184	3-Isopropyl-i,6-dimethylpiperazine-2,5-dione (i= 1 ou 4)	Val-Ala
12,04	35	**104**	78	103	51	77	50	104	Ethenylbenzene	Phe
10,08	31	**91**	106	51	65	77	39	106	Ethylbenzene	Phe
29,55	29	**91**	131	65	39	51	56	131	Benzenepropanenitrile	Phe
36,25	28	**102**	42	134	119	91	70	193	N-Methylphenylalanine methyl ester	Phe
54,89	26	**113**	42	44	141	91	232	232	3-Benzyl-i,j-dimethylpiperazine-2,5-dione (i,j= 1,4, ou 6)	Phe
36,03	25	**88**	120	91	60	65	103	179	Phenylalanine methyl ester	Phe
39,41	24	**91**	65	182	39	92	41	182	1,2-Diphenylethane	Phe
25,27	20	**117**	90	116	89	51	39	117	Benzeneacetonitrile	Phe
26,48	12	**116**	131	89	51	69	59	131	i-Methylbenzeneacetonitrile	***Phe***
30,69	11	**104**	91	105	44	51	164	164	Benzenepropanoic acid methyl ester	***Phe***
31,87	9	**117**	131	103	77	51	162	162	3-Phenyl-prop-2-enoic acid methyl ester	Phe
17,68	7	**100**	116	103	76	85	56	159	N,N-Dimethylvaline methyl ester	Val
19,79	5	**117**	118	115	91	39	59	118	2-Propenylbenzene	***Phe***
18,76	3	**91**	92	134	43	41	65	134	Butylbenzene	***Phe***

** : l'origine en ***italique gras*** indique que le composé n'a pas été détecté pour l'acide aminé individuel, mais qu'il en est caractéristique

1.1. Val-Ala-Ala-Phe

Le premier polypeptide pyrolysé dans cette étude est un tétrapeptide, constitué de trois acides aminés différents : deux acides aminés aliphatiques à courte chaîne latérale (Ala et Val) et un acide aminé aromatique (Phe).

Le groupe de produits qui domine le pyrochromatogramme de VAAP (figure 1-1, tableau 1-1) est une série de diketopiperazines. Ces diketopiperazines sont des diketopiperazines classiques, sans substituant sur un atome d'azote. Elles présentent des degrés de méthylation variés. Les diketopiperazines qui portent une chaîne latérale aromatique, caractéristiques de la phénylalanine, sont les plus nombreuses. On observe deux diketopiperazines diméthylées, résultant de Ala-Phe, trois diketopiperazines monométhylées et la diketopiperazine de Ala-Phe. De plus, on identifie la diketopiperazine provenant de Val-Ala diméthylée (la plus abondante), et monométhylée (deux isomères). Les principales diketopiperazines identifiées sont celles découlant des couples Val-Ala et Ala-Phe. Ces observations corrèlent celles de Voorhees *et al.* (1994) qui reportaient la formation de diketopiperazines dans les polypeptides par paire d'acides aminés en commençant par l'acide N-terminal. Cependant, nous identifions également la 1,3,6-Trimethylpiperazine-2,5-dione, qui est la diketopiperazine formée de deux alanine. Bien que cela soit peu probable au vu de nos données sur les dipeptides concernant la valine, il ne peut pas être totalement exclu que cette diketopiperazine soit le résultat d'homolyse d'une diketopiperazine formée par la valine et l'alanine.

Outre ces diketopiperazines, de nombreux produits caractéristiques de la pyrolyse de la phénylalanine ont été détectés en abondance importante. Le 3-Phenyl-prop-2-enoic acid methyl ester est le produit majoritaire de la pyrolyse de VAAP en présence de TMAH. Ce composé avait été détecté dans le pyrochromatogramme de la phénylalanine, mais en faible abondance ; il n'apparaît donc pas dans le tableau 2 du chapitre sur la pyrolyse des acides aminés. Sa formation à partir du tetrapeptide implique la coupure en alpha de la liaison peptidique. En tout début de chromatogramme, le toluène a aussi été détecté en très forte abondance et marque aussi la présence de la phénylalanine. D'autres produits, comme l'Ethenylbenzene, l'Ethylbenzene, le 1,2-Diphenylethane, ou le Benzeneacetonitrile ont, pour la plupart, été détectés dans le pyrochromatogramme de l'acide aminé libre. Mais certains d'entre eux n'ont pas été détectés dans la pyrolyse de l'acide individuel. Il s'agit du

Benzenepropanenitrile, le i-Methylbenzeneacetonitrile, le Benzenepropanoic acid methyl ester par exemple, et du 2-Propenylbenzene et du Butylbenzene, même si la formation de ces deux derniers composés reste inexpliquée.

Enfin, quelques dérivés d'acides aminés ont été détectés en faible abondance. Ainsi, le Phenylalanine methyl ester, et le N-Methylphenylalanine methyl ester, ont été détectés pour la phénylalanine, et le N,N-Dimethylvaline methyl ester pour la valine. La présence de ces acides aminés libres indiques les coupures de V-/-AAP et VAA-/-P, ce qui justifie la formation de la diketopiperazine Ala-Ala. Ces coupures n'avaient pas été observées par Voorhees *et al.* (1994).

La présence des diketopiperazines, et dans une moindre mesure des dérivés directs des acides aminés individuels, montre que la coupure de la liaison peptidique est effective, et qu'elle semble favorisée par la cyclisation ultérieure en diketopiperazines.

Ainsi, le pyrochromatogramme de VAAP est dominé par des diketopiperazines qui reflètent les enchaînements des acides aminés.

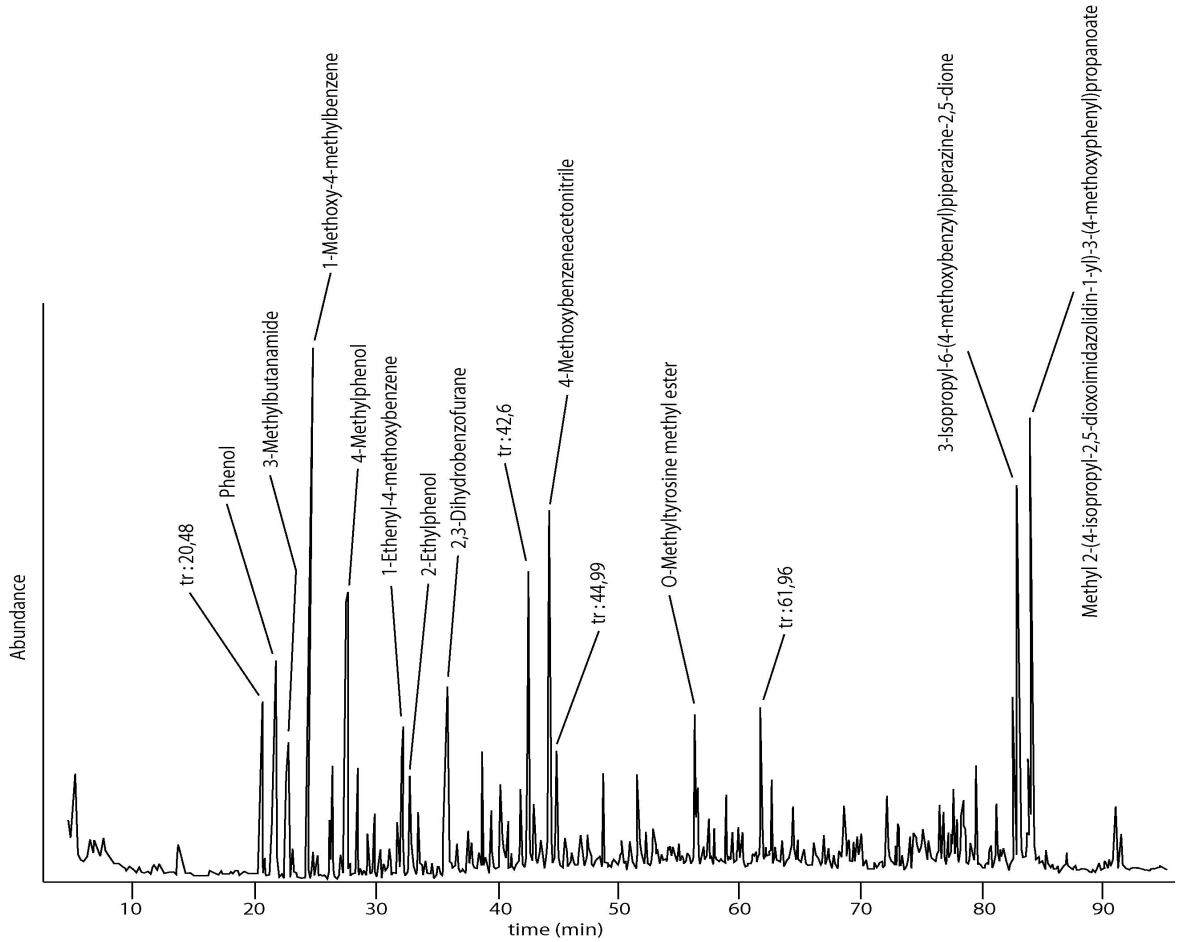


figure 1-2 : pyrochromatogramme de la thymopentine en présence de TMAH

tableau 1-2 : Produits principaux de la pyrolyse de la thymopentine en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine (**)
84,37	100	**121**	192	122	161	77		334 *	Methyl 2-(4-isopropyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-3-(4-methoxyphenyl)propanoate	***Val-Tyr***
83,32	91	**121**	122	276	77			276 *	3-Isopropyl-6-(4-methoxybenzyl)piperazine-2,5-dione	Val-Tyr
24,26	90	**122**	121	107	77	91	79	122 *	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr
27,55	84	**106**	107	77	79	90	39	108	4-Methylphenol	Tyr
21,53	83	**94**	66	64	39			94 *	Phenol	Tyr
44,4	56	**147**	146	132	77	107	116	147 *	4-Methoxybenzeneacetonitrile	Tyr
22,77	48	**59**	44	43	41	57	86	101 *	3-Methylbutanamide	***Val***
35,74	48	**120**	91	119	65	121	39	120	2,3-Dihydrobenzofurane	
42,6	44	**122**	121	77	91	151	107			
82,88	33	**121**	230	272	42	122		290 *		
20,48	30	**82**	109	110	42	67	55			Arg
32,17	26	**134**	119	91	65	39	51	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	Tyr
56,32	25	**121**	122	150	88			209	O-Methyltyrosine methyl ester	Tyr
44,99	24	**114**	44	42	122	43	41			
32,79	24	**107**	122	77	108	86		122	2-Ethylphenol	Tyr
61,96	23	**58**	213	42						
38,62	20	**56**	57	69	111	44	43	111	1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one	Arg
79,65	17	**121**	122	77	290			290 *	6-Isopropyl-3-(4-methoxybenzyl)-1-methylpiperazine-2,5-dione	***Val-Tyr***
72,31	15	**121**	122	77	78	234		234	1-methoxybenzylpiperazine-2,5-dione	***Tyr***
28,48	15	**113**	56	58	85	55	57	113	1-Methylpyrrolidinedi-2,5-one	Asp Asn
26,21	12	**108**	107	77	79	90	39	108	i-Methylphenol	Tyr
33,56	10	**99**	42	43	55	41	70	99	Piperidin-2-one	Arg
29,94	10	**121**	136	91	77	122	108	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	Tyr
81,42	9	**192**	121	161	152	193	134	348 *		

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

** : l'origine en ***italique gras*** indique que le composé n'a pas été détecté pour l'acide aminé individuel, mais qu'il en est caractéristique

1.2. Arg-Lys-Asp-Val-Tyr

Le peptide dont la pyrolyse est discutée dans ce paragraphe est la thymopentine, pentapeptide de séquence est Arg-Lys-Asp-Val-Tyr.

Le produit majoritaire du pyrochromatogramme (figure 1-1) a été identifié sur la base de son spectre de masse, qui présente le fragment caractéristique de la tyrosine (m/z = 121). Etant donnés le temps de rétention très élevé et la masse molaire (334 $g.mol^{-1}$), il s'agit d'un édifice moléculaire construit sur au moins deux acides aminés. La structure proposée pour ce composé est un cycle à cinq atomes, et qui est formée sur la base de trois acides aminés : le Methyl 2-(4-isopropyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-3-(4-methoxyphenyl)propanoate, dont la structure est présentée ci-après (figure 1-3). Elle révèle l'enchaînement Val-Tyr. Le mécanisme de formation de ce composé repose sur une cyclisation interne, résultant de l'attaque de l'azote de la tyrosine sur le carbonyle de l'acide aspartique, comme proposé en figure 1-4.

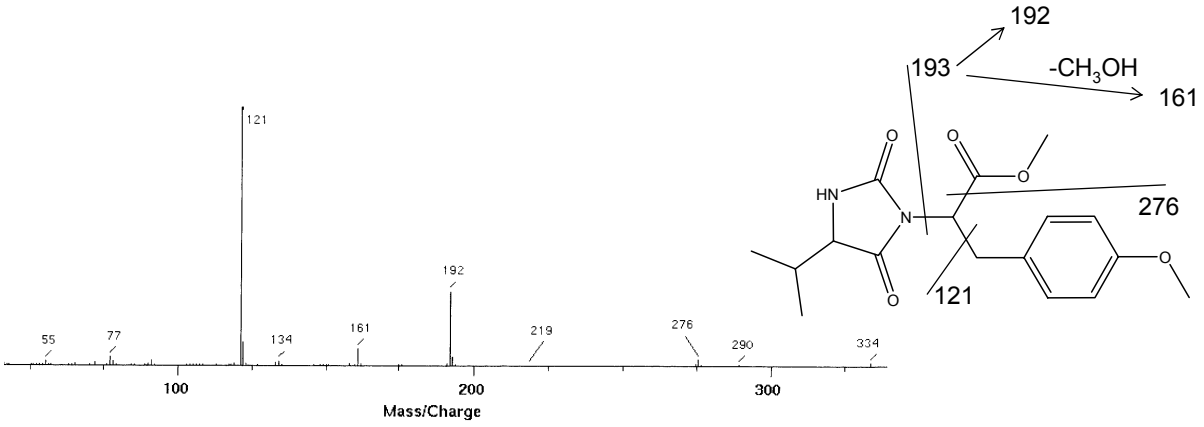


figure 1-3 : spectre de masse et structure du Methyl 2-(4-isopropyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-3-(4-methoxyphenyl)propanoate.

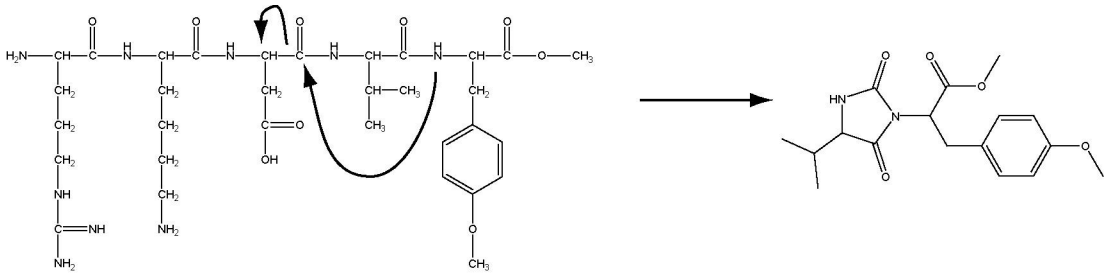


figure 1-4 : mécanisme de formation du Methyl 2-(4-isopropyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)-3-(4-methoxyphenyl)propanoate.

Des diketopiperazines, toutes formées par l'association de la valine et de la tyrosine avec des degrés de méthylation différents sont aussi détectées en fortes abondances. Une seule diketopiperazine pourrait provenir de l'association de la tyrosine avec un autre acide aminé, la 1-Methoxybenzylpiperazine-2,5-dione, puisque la perte de la chaîne latérale de ce deuxième acide nous empêche de l'identifier, mais étant donné que la tyrosine est terminale, cet acide aminé ne peut être que la valine.

L'observation de diketopiperazines basées sur Val-Tyr contredit les observations de Voorhees *et al.* (1994). La production de diketopiperazines à partir d'un peptide ne semble donc pas dépendre de la parité du nombre d'acides aminés qu'il contient, ni de la position relative dans le peptide des acides aminés adjacents impliqués dans la diketopiperazine.

La première partie du pyrochromatogramme (figure 1-2) est dominée par des produits liés à la tyrosine (tableau 1-2) : le 1-Methoxy-4-methylbenzene, le 4-Methylphenol, le Phenol, le 4-Methoxybenzeneacetonitrile, et le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, le 2-Ethylphenol, le i-Methylphenol et le 1-Ethyl-4-methoxybenzene.

Le 4-Methoxybenzeneacetonitrile, bien que n'étant pas un produit de pyrolyse de l'acide aminé individuel, traduit également la présence de la tyrosine dans l'échantillon étudié. Il est produit par décarboxylation de la tyrosine et rupture de la liaison peptidique entre la tyrosine et la valine.

D'autres composés peuvent être liés aux acides aminés constitutifs du pentapeptide. Ainsi, le 1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one et le Piperidin-2-one ont été détectés dans la pyrolyse de l'arginine, ainsi qu'un produit non identifié à 20,48 minutes ; la 1-Methylpyrrolidinedi-2,5-one a été observée dans le pyrolysat de l'acide aspartique et de l'asparagine, mais cette dernière n'est pas présente dans le peptide pyrolysé, donc ce composé traduit la présence de l'acide aspartique. Le 3-Methylbutanamide est caractéristique de la

valine et est produit par coupure des liaisons amines entre la valine et ses deux voisins : l'acide aspartique et la tyrosine.

Le O-Methyltyrosine methyl ester est le seul dérivé méthylé d'un acide aminé individuel qui a été détecté pour la pyrolyse de la thymopentine.

Nous n'avons identifié aucun produit de pyrolyse dont la structure pouvait être liée à la lysine.

Pour ce peptide contenant un acide aminé aromatique, la distribution des produits de pyrolyse majoritaires est semblable à celle observée pour les dipeptides contenant un acide aminé aromatique : dans la première partie du pyrochromatogramme sont détectés principalement des produits d'homolyse de l'acide aromatique tandis que dans la seconde partie les diketopiperazines sont les produits majoritaires.

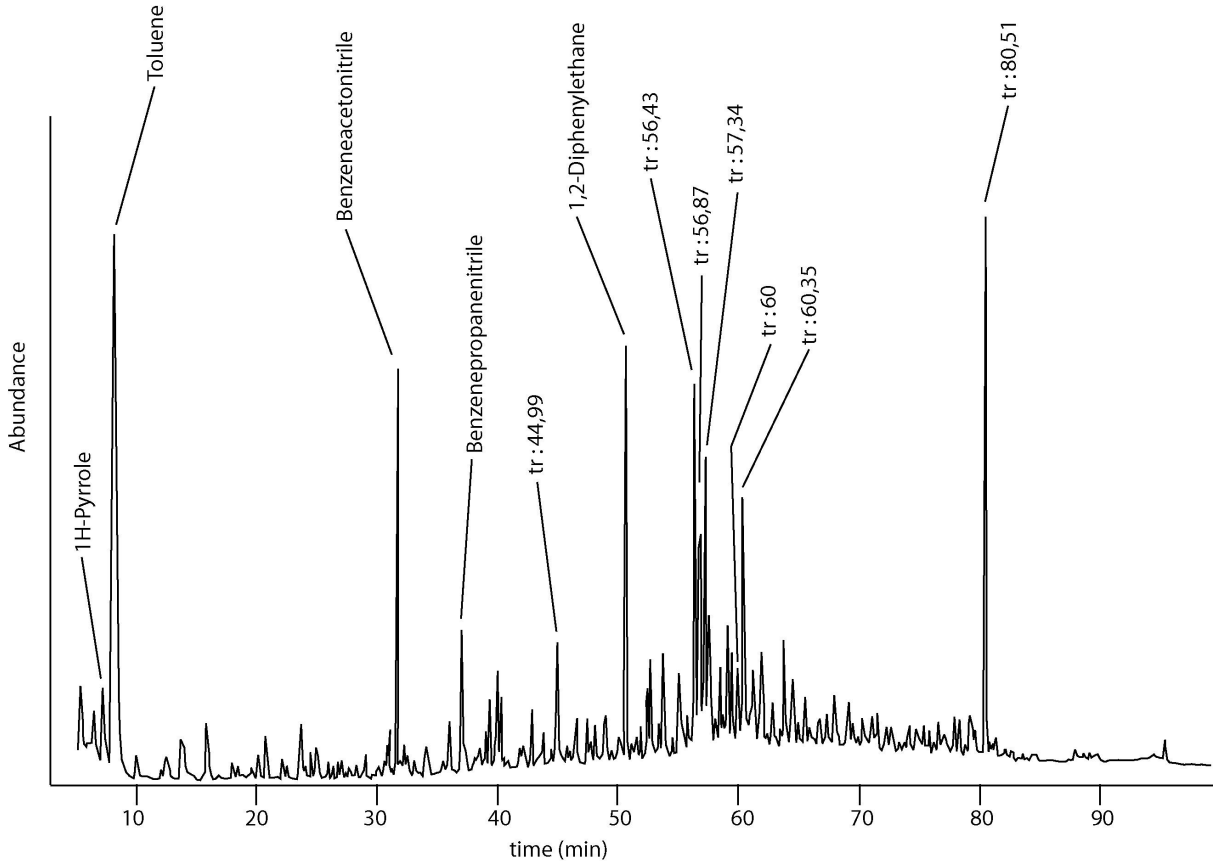


figure 1-5 : pyrochromatogramme de la leucopyrokinine en présence de TMAH

tableau 1-3 : Produits principaux de la pyrolyse de la leucopyrokinine en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
7,99	100	**91**	92	65	39			92	Toluene	Phe
57,34	30	**162**	91	131	161	120	65			
56,43	25	**151**	138	82	152	123	55			Arg
31,71	22	**117**	90	116	89	91	116	117	Benzeneacetonitrile	Phe
80,51	21	**129**	57	112	147	70	71			
50,67	20	**91**	182	65	92			182	1,2-Diphenylethane	Phe
56,87	19	**192**	177	150	149	54	191			
60,35	17	**151**	192	82	177	191	55			
57,66	15	**163**	57	71	43	85	135			
37,1	10	**117**	90	116	89	91	116	131	Benzenepropanenitrile	Phe-Val
60	10	**188**	111	42						
7,18	10	**67**	41	39	40	38	66	67	1H-Pyrrole	Ser
60	10	**91**	162	216						
61,23	9	**150**	70	91	154	41	58			
63,87	8	**179**	180	136	123					
44,99	8	**111**	69	154	42	41	98			
59,07	8	**91**	188	92	42	65				
61,89	8	**176**	129	148	177	56	105			
55,12	7	**153**	154	111	98	140	43			
5,36	7	**41**	69	68	42	39				Arg
64,57	6	**180**	193	124	70	202	153			
15,89	6	**104**	78	103	51	77		104	Ethenylbenzene	Phe
58,53	5	**179**	180	178	165	89	76	180	1,2-Diphenylethene	Phe
23,75	5	**91**	92	134	43	65	41	134	2-Methylpropylbenzene	Phe-Val
13,82	4	**91**	106	77	65	51		106	Ethylbenzene / Dimethylbenzene	Phe
20,84	3	**82**	42	109	110	67				Arg
36,06	3	**84**	42	82	55	85	41	129	N-Methylproline	Pro

1.3. Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH_2

Le peptide dont la pyrolyse est présentée ci-après est également un pentapeptide, la leucopyrokinine, Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH_2, qui a la particularité de posséder un groupement amine aux deux extrémités.

Le pyrochromatogramme de la leucopyrokinine (figure 1-5) est dominé par le toluène, produit que l'on attribue à la phénylalanine (tableau 1-3).

Parmi les composés identifiés, la plupart sont caractéristiques de la phénylalanine et ont déjà été identifiés dans le pyrochromatogramme de l'acide aminé individuel : le Benzeneacetonitrile, le 1,2-Diphenylethane, l'Ethenylbenzene, et le 1,2-Diphenylethene par exemple.

D'autres produits caractéristiques des acides aminés qui constituent la leucopyrokinine ont été détectés dans le pyrochromatogramme. Deux produits non identifiés, aux temps de rétention de 5,36 min. et 20,84 min. ont été détectés à des temps de rétention équivalents dans le pyrochromatogramme de l'arginine (données non présentées dans le chapitre sur les acides aminés individuels, car il s'agissait de composés détectés en faible abondance). De la même façon, le produit éluant à 36,06 min. a été détecté dans la pyrolyse de la proline, et est caractéristique de cet acide aminé individuel.

Le 1H-Pyrrole, déjà détecté dans le pyrochromatogramme de la sérine n'est pas caractéristique de cet acide qui ne fait pas partie du peptide étudié, mais peut être généré par la proline, l'arginine ou la leucine qui porte l'amine terminale par cyclisation intramoléculaire de la chaîne latérale de ces deux derniers acides aminés.

Dans ce pyrochromatogramme, aucune diketopiperazine n'a pu être mise en évidence. Le chromatogramme de l'ion 91, caractéristique du noyau benzylique ne présente pas de pics très intenses après 50 min. Ainsi, aucune diketopiperazine portant un substituant benzylique n'a pu être détectée dans le pyrochromatogramme de la leucopyrokinine. Or, jusqu'ici dans le travail présenté, les diketopiperazines d'acides aminés aromatiques étaient les plus faciles à identifier et bien souvent les plus abondantes. Il est donc fort probable que peu de diketopiperazines aient été formées.

Il est possible d'avancer plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat. La présence de fonctions amines aux deux extrémités peut affecter la réactivité du peptide : les fonctions libres n'étant plus les mêmes, le comportement réactionnel du peptide se trouve forcément

affecté. Enfin, la nature de l'arginine peut aussi être ajoutée à cette hypothèse, car cet acide aminé a un comportement pyrolytique très particulier, comme il l'a été constaté dans le chapitre sur les acides aminés individuels.

Ces deux hypothèses peuvent également être proposées pour expliquer l'identification incomplète des produits majoritaires. Ceux-ci étant de nature différentes de celles des produits obtenus pour les acides aminés individuels et pour les dipeptides, notre connaissance de ces produits est moins aboutie et notre base de données moins utilisable.

Cependant, il reste possible d'affirmer que les produits d'homolyse de l'acide aminé aromatique font partie des produits majoritaires du pyrochromatogramme.

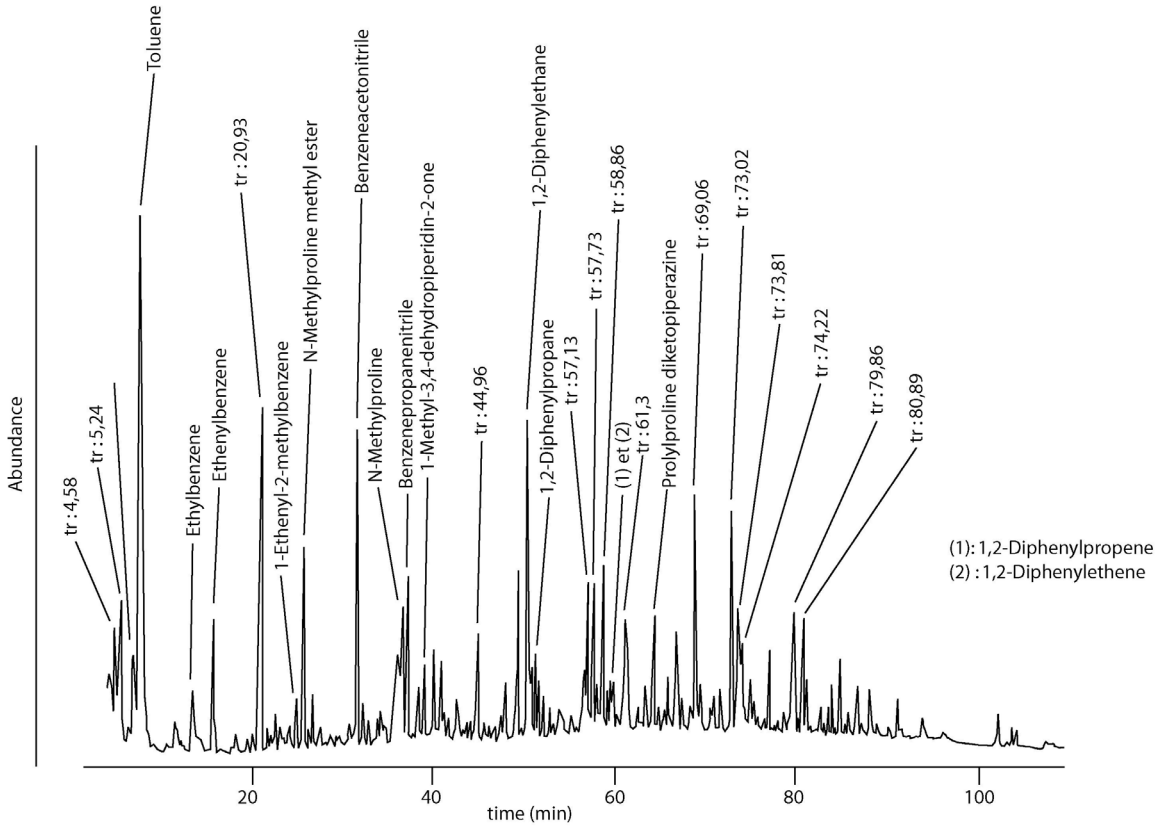


figure 1-6 : pyrochromatogramme de la bradykinine en présence de TMAH

tableau 1-4 : Produits principaux de la pyrolyse de la bradykinine en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine (**)
7,52	100	**91**	92	65				92	Toluene	Phe
20,93	49	**82**	109	42	110	67	41	84 *		Arg
31,74	39	**117**	90	116	89	51	63	117 *	Benzeneacetonitrile	Phe
58,86	27	**131**	103	161	160	77	51	161 *		
73,02	27	**58**	253	73	45	42	84	253 *		
69,06	22	**207**	137	228	82	179	150			
50,51	19	**91**	182	65				182 *	1,2-Diphenylethane	Phe
73,81	18	**44**	168	70	239	59	42			
57,73	18	**168**	83	70	140	42	111	168 *		
5,24	17	**84**	85	57	42	82				
74,22	15	**58**	73	44						
15,61	15	**104**	103	78	51			104	Ethenylbenzene	Phe
61,3	14	**185**	84	184	154	111	42			
57,13	14	**91**	56	202	111	92	203			
44,96	14	**69**	154	41	68	126	42			
79,86	13	**125**	153	244	70	91	41	244 *	isomère	
80,89	13	**125**	153	244	70	91	41	244 *	isomère	
25,75	12	**84**	42	82	85	143	102	143	N-Methylproline methyl ester	Arg, Pro
4,58	12	**41**	69	68	42	39	41			Arg
64,6	11	**91**	204	92	65			204 *		
13,41	9	**91**	106	65				106	Ethylbenzene	Phe
39,1	7	**56**	57	111	69	44	43	111	1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one	Arg
66,86	6	**70**	194	41	96	69	166	194	Prolylproline diketopiperazine	Pro
51,7	3	**105**	143	115	104	77	196	196	1,2-Diphenylpropane	Phe
48,13	3	**70**	153	125	41	69	68			Arg
59,23	3	**194**	115	193	179	178	114	194	1,2-Diphenylpropene	Phe
36,8	3	**84**	42	82	85	55	41	129 *	N-Methylproline	Pro
24,76	3	**117**	118	115	91	58	103	118	1-Ethenyl-2-methylbenzene	Phe
58,32	2	**179**	180	178	165	89	77	180	1,2-Diphenylethene	***Phe***
37,16	2	**91**	131	65	92			131 *	Benzenepropanenitrile	***Phe***
6,8	1	**67**	41	40	39	38	66	67	1H-Pyrrole	Ser

* : masses molaires déterminées ou confirmées par ionisation chimique

** : l'origine en ***italique gras*** indique que le composé n'a pas été détecté pour l'acide aminé individuel, mais qu'il en est caractéristique

1.4. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Dans ce paragraphe, nous abordons la pyrolyse d'un nonapeptide, la bradykinine, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Il s'agit donc d'un niveau de complexité supplémentaire, par rapport aux peptides précédents.

Comme dans le cas précédent, le pyrochromatogramme de la bradykinine (figure 1-6) est dominé par le toluène, produit attribué à la pyrolyse de la phénylalanine (tableau 1-4).

Plusieurs composés, tels que le Benzeneacetonitrile, le 1,2-Diphenylethane, l'Ethenylbenzene, l'Ethylbenzene, le 1,2-Diphenylpropane, le 1,2-Diphenylpropene et le 1,2-Diphenylethene, sont des produits de la pyrolyse de la phénylalanine. D'autres produits de pyrolyse sont caractéristiques de cet acide aminé même s'ils n'ont pas été détectés dans la pyrolyse de l'acide aminé indviduel : le 1-Ethenyl-2-methylbenzene, le 1,2-Diphenylethene et le Benzenepropanenitrile.

Par ailleurs, certains produits de la pyrolyse de la bradykinine permettent de reconnaître d'autres acides aminés constitutifs de ce peptide. Ainsi la présence de l'arginine est traduite par la 1-Methyl-3,4-dehydropiperidin-2-one, et la N-Methylproline methyl ester (donnée non présentée dans le chapitre 2, car il s'agissait de composés détectés en faible abondance) et par des composés dont la structure n'est pas élucidée (aux temps de rétention suivants 20,93 min., 4,58 min., et 48,13 min.) mais qui ont été détectés dans le pyrochromatogramme de l'acide aminé individuel (données non présentées dans le chapitre 2, car il s'agissait de composés détectés en faible abondance).

Le N-Methylproline methyl ester est aussi caractéristique de la proline, dont la présence est également trahie par la diketopiperazine constituée de deux proline (que nous appellons Prolylproline-diketopiperazine et dont la structure est présentée en figure 1-7) et par la N-Methylproline. Notons d'ailleurs que c'est la seule diketopiperazine identifiée et le seul dérivé méthylé d'acide aminé individuel détecté dans ce pyrochromatogramme.

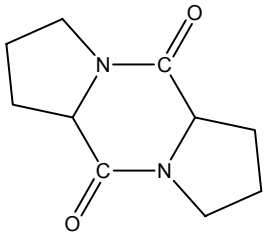


figure 1-7 : structure de la Prolylproline diketopiperazine

En tout début de pyrochromatogramme, le 1H-Pyrrole peut être attribué à la serine.

Finalement, pour ce peptide, seule la glycine reste « muette » puisque c'est le seul acide aminé auquel aucun produit de pyrolyse n'a pu être attribué. Cette absence est d'autant plus remarquable que l'homolyse des autres acides aminés aboutit à la structure de la glycine.

Le chromatogramme de l'ion 91 met en évidence la présence de deux produits aux temps de rétention 57,13 et 64,6 minutes. Ces produits n'ont pas été identifiés, mais les temps de rétention et le pic de base à m/z : 91 de leur spectre de masse laissent imaginer des produits constitués de deux acides aminés, dont une phénylalanine. La formation de diketopiperazines à trois acides aminés basée sur Phe-Ser peut être envisagée ; la présence de la serine peut induire des structures complexes, qui n'ont pas été identifiées.

Ainsi, ce pyrochromatogramme met en évidence l'importance des produits d'homolyse de l'acide aromatique présent dans le dipeptide. Certaines diketopiperazines restent identifiables. De plus, la plupart des acides aminés constitutifs du dipeptide conduisent à des produits qui leur sont caractéristiques et qui traduisent donc la présence de l'acide aminé dans le peptide.

1.5. Pyrolyse de SAB

Après avoir pyrolysé des petits peptides, nous nous sommes intéressés à une protéine. Par sa taille et le nombre d'acides aminés constitutifs, la pyrolyse d'une protéine relève d'un degré de complexité supérieur à celle de peptides. La pyrolyse d'une protéine a permis de tester la base de données élaborée au cours de ce travail.

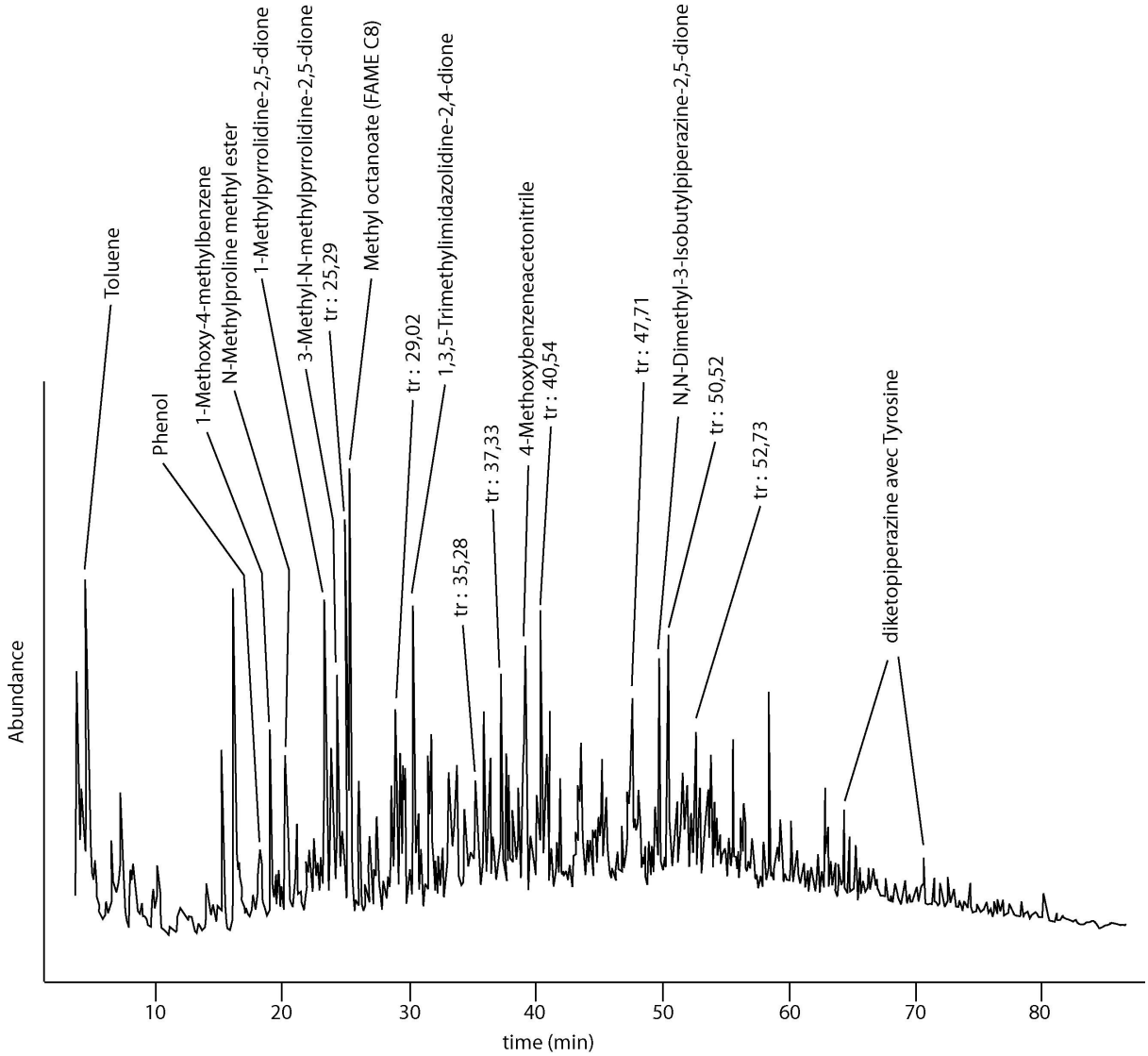


figure 1-8 : pyrochromatogramme de la SAB en présence de TMAH

tableau 1-5 : Produits principaux de la pyrolyse de la SAB en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
23,58	100	**56**	113	55	58	42	57	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly
47,71	77	**98**	41	42	56	70	165			
4,67	76	**91**	92	65				92	Toluene	Phe
30,48	71	**42**	127	142	57	56	70	142	1,3,5-Trimethylimidazolidine-2,4-dione	Ala-Tyr
25,29	66	**56**	54	42	126	139	39			
25,54	65	**74**	43	87	41	55	59	158	Ester méthylique d'acide gras en C8	
40,54	64	**128**	42	127	57	71				Val-Phe
24,51	60	**42**	127	58	41	39		127	3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly
29,02	58	**42**	57	127	153	67	39			
50,52	53	**152**	55	41	42	137	165			
20,37	52	**84**	42	82	55	143		143	N-Methylproline methyl ester	Pro, Arg
49,86	49	**142**	113	42	44	57	141	198	N,N-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione	Gly-Leu,Thr-Leu
23,98	47	**56**	42	108	140	107	77			
52,73	42	**131**	103	77	161	160	51			
37,33	41	**56**	125	112	41	42	98			
39,17	40	**147**	114	77	132	146	103	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile	Tyr
35,28	40	**54**	83	55	126	41	111			
39,33	39	**69**	41	154	42	68	126			
33,16	34	**100**	58	70	44	126	101			
19,07	33	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr
18,23	32	**94**	59	39	66	65	91	94	Phenol	Tyr
15,27	32	**82**	42	109	110	67	41			Arg
28,65	29	**58**	42	86	41	97	39			
16,21	29	**44**	42	43	86	128	57			
29,33	29	**70**	140	42	83	68	56	140	Dimere Pro-Pro	
45,25	28	**68**	165	56	138	153	42			
58,56	27	**70**	168	139	42	57	41			
53,95	25	**70**	150	165	55	127	41			
41,01	25	**166**	70	56	151	42	125			
37,93	25	**56**	152	39	55	153	137			
27,58	24	**73**	58	43	41	86	55			
29,55	23	**56**	112	68	140	41	39			
10,24	23	**104**	78	51	103	77	74	104	Ethenylbenzene	Phe
56,66	22	**70**	58	127	43	144	41			
33,84	22	**42**	128	43	58	127	57			
55,7	21	**42**	91	127	218	65	41			
31,72	21	**56**	112	41	42	122	55			
36,4	20	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl-5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu
26,19	17	**117**	90	116	89	39	51	117	Benzeneacetonitrile	Phe
37,67	17	**144**	145	56	77	128	42	145	1,3-Dimethylindole	Trp
29,7	17	**43**	128	42	100					
21,24	16	**42**	84	70	43	124	123			
38,74	16	131	103	162	77	41	51	162	3-Phenylprop-2-enoic acid methyl ester	Phe
62,93	14	**56**	161	200	191	133	89			
56,35	14	**86**	161	70	137	55	187			
6,53	13	**43**	58	73	42	56	41			
59,41	11	**84**	101	164	42	115	149			
14,06	10	**55**	98	44	42	58	99			
8,06	10	**43**	44	63	78	58	42			
64,43	10	**121**	42	77	122	78	91		diketopiperazine avec Tyrosine	
9,83	10	**72**	44	42	56	70	131	131	N,N-Dimethylalanine methyl ester	Ala
60,31	9	**186**	154	155	229	70	42			
63,09	9	**113**	42	141	44	209	232			
70,88	8	**121**	42	44	122	95	77		diketopiperazine avec Tyrosine	
4,23	7	**67**	39	40	41	38	37	67	1H-Pyrrole	Ser
65,36	7	**151**	242	91	241	95	41			
26,99	7	**44**	42	134	91	113	119			
64,83	6	**70**	42	214	213	43	215			
7,28	5	**55**	41	43	54	39	82	83	3-Methylbutanenitrile	Leu
74,34	4	**70**	42	244	121	165	86			
3,86	4	**43**	41	42	57	39				multiple
3,11	3	**41**	69	68	44	39				Arg

Nous avons donc pyrolysé un échantillon de SAB, la Serum Albumine Bovine dont la séquence en acides aminés et la structure 3D sont connues (Huang *et al.*, 2004).Tous les acides aminés protéiques sont présents dans cette protéine, constituée de 607 acides aminés, mais ils ne sont pas tous présents en mêmes proportions, qui varient de 0,49% (en nombre) pour le tryptophane à 10,71% pour la leucine. Tous les produits de pyrolyse n'ont pas pu être identifiés grâce à notre base de données interne.

La pyrolyse de la SAB en présence de TMAH produit un très grand nombre de composés dont les temps de rétention se répartissent sur la totalité du pyrochromatogramme (cf. figure 1-8).

Le produit majoritaire de ce pyrochromatogramme (tableau 1-5) est la 1-Methylpyrrolidine-2,5-dione, que l'on peut attribuer à trois acides aminés différents : la glycine, l'asparagine et l'acide aspartique. Son homologue méthylé sur l'atome d'azote, la 3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione, a également été détecté, en abondance deux fois moins importante. L'abondance de la Methylpyrrolidine-2,5-dione s'explique peut-être par ses origines multiples.

Parmi les composés très abondants, le toluène marque la présence de la phénylalanine dans la SAB. En abondance équivalente au toluène, un produit, déjà détecté dans le pyrochromatogramme de Ala-Tyr, le 1,3,5-Trimethylimidazolidine-2,4-dione (figure 1-9), élue à 30,48 minutes. Sa formation repose sur une cyclisation intramoléculaire.

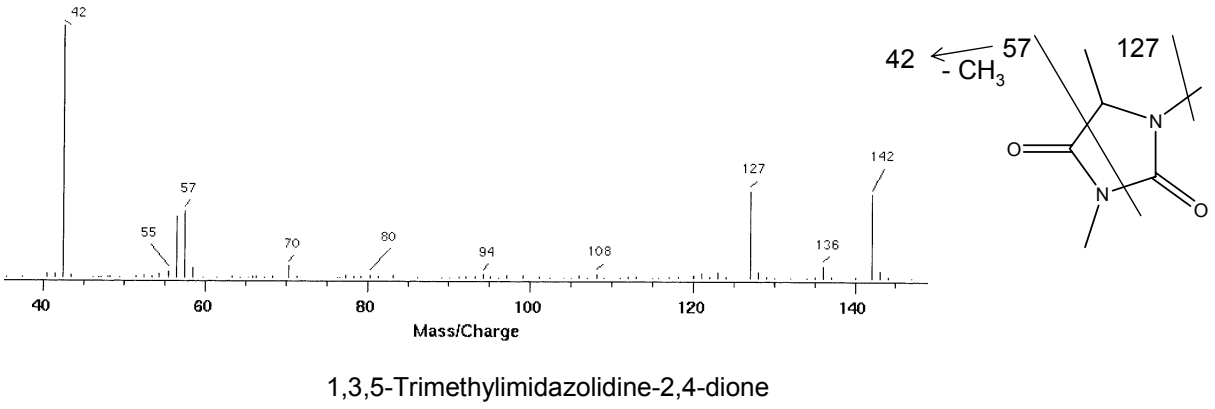


figure 1-9 : spectre de masse et structure de la 1,3,5-Triméthylimidazolidine-2,4-dione

Avec une abondance égale à la moitié de celle du composé majoritaire, le N-Methylproline methyl ester est le premier dérivé méthylé d'acide aminé individuel détecté

dans ce pyrochromatogramme. Cependant, son origine est équivoque puisque ce dérivé a été détecté à la fois dans le pyrochromatogramme de la proline mais aussi dans celui de l'arginine.

En abondance équivalente (c'est-à-dire la moitié du produit majoritaire), une diketopiperazine, la N,N-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione, déjà détectée dans les pyrochromatogrammes de Gly-Leu et Thr-Leu, traduit donc la présence de la leucine. Dans la SAB, le dimère Gly-Leu est présent 1 fois, Leu-Gly 3 fois, Leu-Thr 3 fois et Thr-Leu 5 fois. Notons que c'est la seule diketopiperazine identifiée en abondance aussi importante.

Dans la suite du tableau, les produits identifiés les plus abondants sont caractéristiques d'acides aminés aromatiques. Le 4-Methoxybenzeneacetonitrile, le 1-Methoxy-4-methylbenzene et le phénol sont caractéristiques de la tyrosine, l'Ethenylbenzene, le Benzeneacetonitrile et le 3-Phenylprop-2-enoic acid methyl ester traduisent la présence de la phénylalanine, déjà mise en évidence par le toluène. Enfin, le 1,3-Dimethylindole est attribué au tryptophane.

A 29,33 minutes, une structure de dimère de proline (deux cycles liés) est proposée pour un composé dont l'abondance est environ le tiers du produit majoritaire.

Un autre dérivé de la proline, le N-Methyl-5-oxoproline methyl ester, qui n'est pourtant pas caractéristique de l'acide aminé individuel, mais de la glutamine et de l'acide glutamique est détecté à 36,4 minutes avec une abondance plus faible.

En faible abondance (moins de 10 %), le N,N-Dimethylalanine methyl ester et le 3-Methylbutanitrile peuvent être attribuées respectivement à la pyrolyse de l'alanine et de la leucine. Bien que le pyrrole ait été détecté dans un polypeptide sans serine, le 1H-Pyrrole peut vraisemblablement être attribué à la serine.

Enfin, certains produits dont le spectre de masse possède un pic de base très intense à m/z : 121 et qui ont un temps de rétention élevé peuvent vraisemblablement être attribués à des diketopiperazines constituées de tyrosine d'une part et d'un autre acide aminé d'autre part, ce second acide aminé ne pouvant pas être identifié car le spectre de masse obtenu par impact électronique ne permet pas de déterminer la masse de la diketopiperazine suspectée.

Ainsi, même certains composés très abondants n'ont pas été identifiés, il est possible de tirer quelques conclusions de la pyrolyse de la SAB. Les produits identifiés sont majoritairement de deux types.

D'une part, les produits de cyclisation, que ce soit à partir d'un acide aminé, comme c'est le cas pour la 1-Methylpyrrolidine-2,5-dione, soit à partir de deux acides aminés, comme

le cas classique des diketopiperazines sont les plus importants, en terme d'abondance par composé.

D'autre part, les produits d'homolyse, tels que le toluène ou le 4-Methoxybenzeneacetonitrile, caractéristiques d'acides aminés aromatiques sont très importants.

Enfin quelques produits détectés dans ce pyrochromatogramme l'ont déjà été dans le pyrochromatogramme de l'acide individuel dont ils sont issus.

Alors que les premiers articles abordant la pyrolyse de la SAB (Boon & De Leeuw, 1987; Reeves & Francis, 1997; van de Meent *et al.*, 1982) n'apportent pas beaucoup d'informations sur les produits obtenus, ceux de Zang *et al.* (2001) et Knicker *et al.* (2001) décrivent beaucoup plus en détails les produits de pyrolyse de la SAB. Notons que les premiers auteurs cités ont réalisé des pyrolyses sans TMAH, alors que Zang et Knicker ont utilisé cet agent de dérivation. Ces deux auteurs reportent la présence de la majorité des acides aminés (16 pour Zang et 12 pour Knicker) principalement sous la forme de leurs dérivés méthylés, et sous forme déaminée pour la phénylalanine et la tyrosine. Dans notre cas, 13 acides aminés ont été détectés (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr). La détection des acides aminés ne semble pas dépendre de leur proportion dans la SAB, puisque la lysine, qui représente près de 10 % des acides aminés de la SAB n'est pas détectée, alors que le tryptophane (moins de 0,5 % des acides aminés de la SAB) est détecté. Les acides aminés sont principalement sous la forme de diketopiperazines ou de produits caractéristiques, comme le pyrrole pour la serine ou le 3-Methylbutanenitrile pour la leucine. Notons, que certains composés, tels que le N-Methyl-5-oxoproline methyl ester ou le 3-Phenylprop-2-enoic acid methyl ester sont également détectés par Zang et Knicker. Il est probable que le mode opératoire, en particulier la température de pyrolyse (300°C pour Zang et 250°C pour Knicker) puisse expliquer la nature différente des produits observés.

1.6. Discussion

La pyrolyse des peptides et de la SAB présentée dans ce manuscrit permet de tirer quelques conclusions et de soulever quelques hypothèses quant aux mécanismes pyrolytiques des acides aminés impliqués par liaison peptidique dans des édifices moléculaires de taille supérieure aux dipeptides.

En observant simplement l'allure des pyrochromatogrammes en fonction du nombre d'acides aminés constitutifs du peptide, il apparaît assez clairement que la structuration du pyrochromatogramme est de moins en moins marquée lorsque la taille du peptide augmente. Pour les dipeptides, la fin des pyrochromatogrammes constituait une partie importante de celui-ci, voire la partie où éluaient les produits de pyrolyse majoritaires, à savoir les dérivés méthylés du dipeptide et les diketopiperazines à différents degrés de méthylation. Au fur et à mesure que le nombre d'acides aminés constitutifs augmente, la distribution des produits de pyrolyse majoritaires s'étend sur la totalité du pyrochromatogramme. Ce constat visuel est confirmé par un examen attentif des tableaux de produits de pyrolyse, qui révèle que l'abondance relative des diketopiperazines diminue lorsque la taille des peptides augmente.

L'examen des tableaux permet aussi d'établir que les produits d'homolyse des acides aminés aromatiques sont toujours détectés en fortes abondances. De plus, d'autres produits caractéristiques de ces acides aminés aromatiques, tels que le 1,2-Diphenyléthane (très abondant dans la pyrolyse de la bradykinine) sont également détectés dans la plupart des peptides dont la pyrolyse est présentée dans ce document.

Enfin, la base de données a permis d'identifier rapidement un nombre conséquent de produits de pyrolyse et de les relier ainsi à ou aux acide(s) aminé(s) qui les génère(nt). Il est évident que la pyrolyse de peptides génère des produits qui n'étaient pas produits par la pyrolyse d'un dipeptide, d'autant plus que dans les dipeptides étudiés, nous n'avions pas toutes les combinaisons présentes dans les polypeptides. Par conséquent, la base de données ne pouvait pas permettre l'identification systématique de tous les produits des pyrochromatogrammes des peptides et de la SAB. Cependant, la démarche d'étude systématique de la pyrolyse des acides aminés et d'étude approfondie des dipeptides a abouti à poser des bases pratiques pour l'identification de composés inconnus. Le travail sur les diketopiperazines illustre bien cet état d'esprit. Des diketopiperazines ayant été détectées et identifiées dans certains pyrochromatogrammes d'acides aminés individuels, ce type de

composés a été recherché pour les dipeptides. Des diketopiperazines constituées de trois acides aminés ont ainsi été mises en évidence. Une étude plus poussée des spectres de masse des produits non identifiés pourrait révéler la présence de produits à la structure proche d'une diketopiperazine constituée de trois acides aminés. De plus, cette étude nécessiterait l'utilisation systématique des deux modes d'ionisation (impact électronique et ionisation chimique) afin de connaître la masse molaire du composé et d'associer cette information au spectre de masse obtenu en impact.

Ce même type de raisonnement a permis de proposer la structure du produit majoritaire de la thymopentine. L'hypothèse initiale d'une diketopiperazine basée sur trois acides aminés a permis d'aboutir à une structure cyclique à 5 atomes, sur la base d'un mécanisme de formation proche de celui proposé pour les diketopiperazines formées de trois acides aminés.

2. La pyrolyse de macromolécules

Dans cette partie, nous abordons la pyrolyse de macromolécules modèles. Deux échantillons, de lignine et de cellulose, ont été pyrolysés pour établir leur trace pyrochromatographique. Ce sont des macromolécules abondantes dans la biomasse et qui sont plus ou moins altérées dans les échantillons de matière organique naturelle. Ces échantillons ont ensuite été pyrolysés en mélange avec la SAB, en différentes proportions afin de mimer un échantillon naturel complexe, dont la partie protéique est mêlée à d'autres géomacromolécules, telles que la lignine et la cellulose, régulièrement identifiées dans les échantillons naturels. L'objectif de l'étude de ces mélanges est de déterminer les réponses relatives des différents types de macromolécules, pour les extrapoler au cas des échantillons naturels. Galetti *et al.* (1995) avait déjà procédé à l'étude d'un mélange fructose/aspartame (9 :1, w :w) dans la même optique d'évaluer des coefficients de réponse et constatait que la distribution des produits de pyrolyse de l'aspartame était affectée par la présence du fructose. De même, Gauthier *et al.* (2003) ont procédé à la pyrolyse d'un mélange de lignine et de cellulose et constataient une sous-estimation de la cellulose par rapport à la lignine. Plus récemment, Berwick *et al.* (2007) ont pyrolysé un mélange tyrosine/glucose (sans agent de dérivation) et observé une nette prédominance des produits de pyrolyse de l'acide aminé.

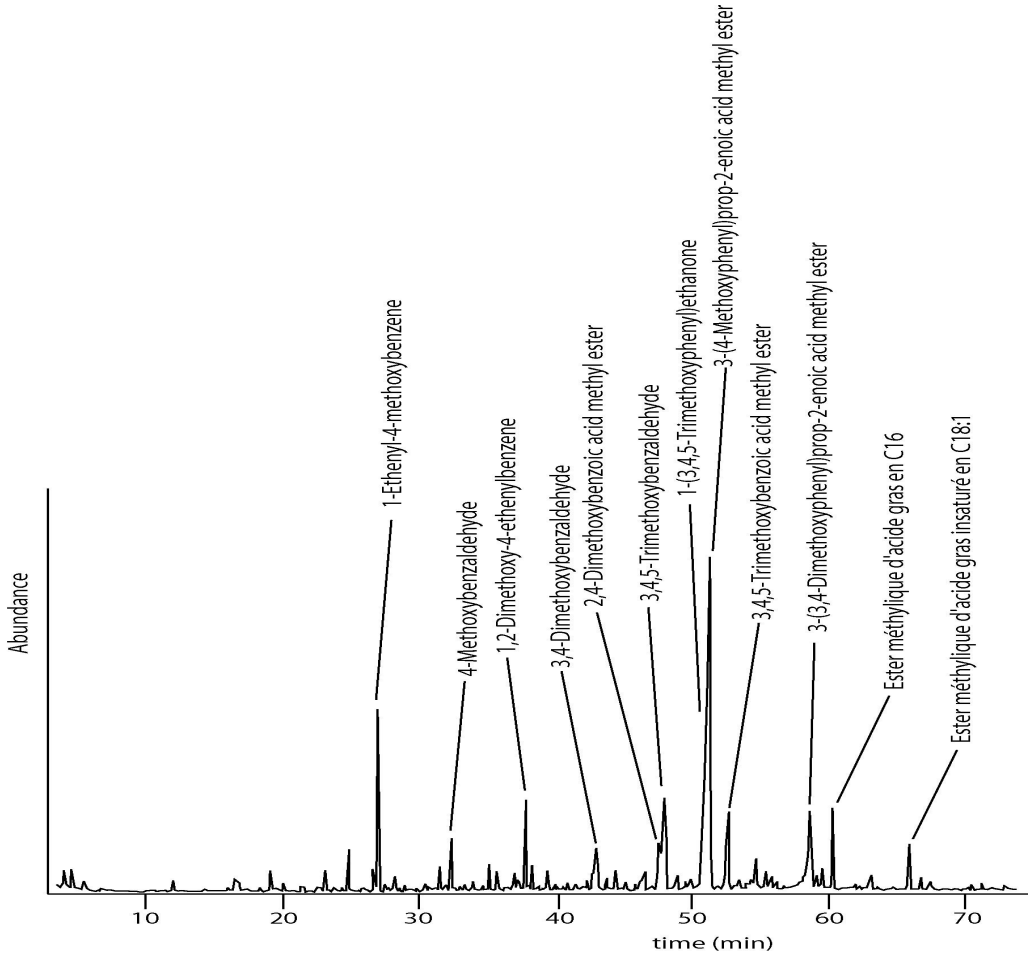


figure 2-1 : pyrochromatogramme de la lignine en présence de TMAH

tableau 2-1 : Produits principaux de la pyrolyse de la lignine en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés
51,3	100	**161**	192	133	89	118	134	192	3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester
27,06	24	**134**	119	91	65	39	51	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene
47,69	23	**165**	196	161	79	59	77	196	2,4-Dimethoxybenzoic acid methyl ester
48,87	23	**196**	181	125	39	93	110	196	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde
51,24	20	**195**	210	43	191	139	81	210	1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethanone
52,64	15	**226**	211	155	195	151	59	226	3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester
42,98	12	**166**	165	95	77	51	79	166	3,4-Dimethoxybenzaldehyde
58,66	12	**222**	191	147	119	77	51	222	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester
37,88	11	**164**	149	91	77	103	121	164	1,2-Dimethoxy-4-ethenylbenzene
32,44	8	**135**	136	77	107	39	92	136	4-Methoxybenzaldehyde
60,25	8	**74**	87	43	55	41	75	270	Ester méthylique d'acide gras en C16
66,04	5	**55**	43	74	41	69	83	296	Ester méthylique d'acide gras insaturé en C18:1
24,85	4	**121**	136	77	91	65	39	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene
35,14	4	**168**	153	110	39	125	93	168	1,2,3-Trimethoxybenzene
37,01	3	**154**	139	93	39	65	96	154	2,6-Dimethoxyphenol
38,29	3	**135**	166	77	107	92	64	166	4-Methoxybenzoic acid methyl ester
48,99	3	**151**	210	194	107	91	189	210	3,4-Dimethoxybenzeneacetic acid methyl ester
23,11	3	**109**	124	81	53	39	51	124	4-Methoxyphenol
19,13	3	**122**	77	121	107	79	91	122	1-Methoxy-4-methylbenzene
16,58	3	**94**	66	39	65	40	55	94	Phenol
37,19	2	**135**	77	150	107	92	64	150	1-(4-methoxyphenyl)ethanone
46,54	2	**165**	180	43	79	77	137	180	1-(-2,5-Dimethoxyphenyl)ethanone
39,41	2	**167**	182	53	139	107	124	182	1,2,3-Trimethoxy-5-methylbenzene
12,01	2	**108**	65	78	39	51	44	108	Methoxybenzene

2.1. La lignine

La lignine est un biopolymère naturel présent dans les végétaux supérieurs. Elle est constituée de monomères phénoliques alkylés en C_3. Les trois principaux précurseurs de la lignine sont les alcools synapique, coniférique et p-coumarique (cf. partie bibliographique, paragraphe 1.3.2.2). La pyrolyse d'échantillons à caractère ligneux est abondamment abordée par la littérature, depuis les années 1990 (Ralph & Hatfield, 1991) jusque plus récemment (Greenwood *et al.*, 2002). Elle produit de nombreux dérivés benzéniques, dans lesquels la chaîne en position para du groupe phenol est plus ou moins longue (jusqu'en C_3) et/ ou fonctionnalisée, et dont le nombre de groupements méthoxy en position ortho dépend de la nature du précurseur phénolique. L'ajout de TMAH est connu pour limiter les mécanismes de décarboxylation, et bien évidemment pour la méthylation des fonctions présentant un proton labile. Cet agent de dérivation a été très largement utilisé pour la pyrolyse d'échantillons naturels contenant de la lignine (Clifford *et al.*, 1995; del Rio *et al.*, 2007; del Rio *et al.*, 1998; Gauthier *et al.*, 2003; Hatcher *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995; McKinney *et al.*, 1995; Templier *et al.*, 2005).

Nous ne ferons pas de discussion fine de ce pyrochromatogramme (figure 2-1), l'objectif de cette pyrolyse étant de jeter les bases pour une discussion de la pyrolyse d'un mélange SAB/lignine. Dans le cas présent, la pyrolyse de la lignine produit une série de composés benzéniques (cf. tableau 2-1), largement dominés par la 3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, déjà identifié en proportions très importantes par de nombreux auteurs (Clifford *et al.*, 1995; del Rio *et al.*, 2007; del Rio *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1995; Templier *et al.*, 2005). Tous les composés majoritaires présentés dans le tableau ont déjà été reportés dans la littérature (citée ci-dessus), l'abondance relative des différents produits dépendant de la nature de la lignine, de la nature de l'échantillon et des conditions expérimentales (pyrolyse en ampoule ou en ligne, températures de pyrolyse, proportion TMAH/échantillon). Ainsi, les dix produits les plus abondants de ce pyrochromatogramme ont tous été reportés comme étant des produits de pyrolyse de la lignine abondants dans les articles précédemment cités.

2.2. Mélanges SAB/lignine

Après avoir pyrolysé la SAB et la lignine séparément, nous nous sommes intéressés au comportement de ces deux macromolécules en mélange pour évaluer leur réponse relative.

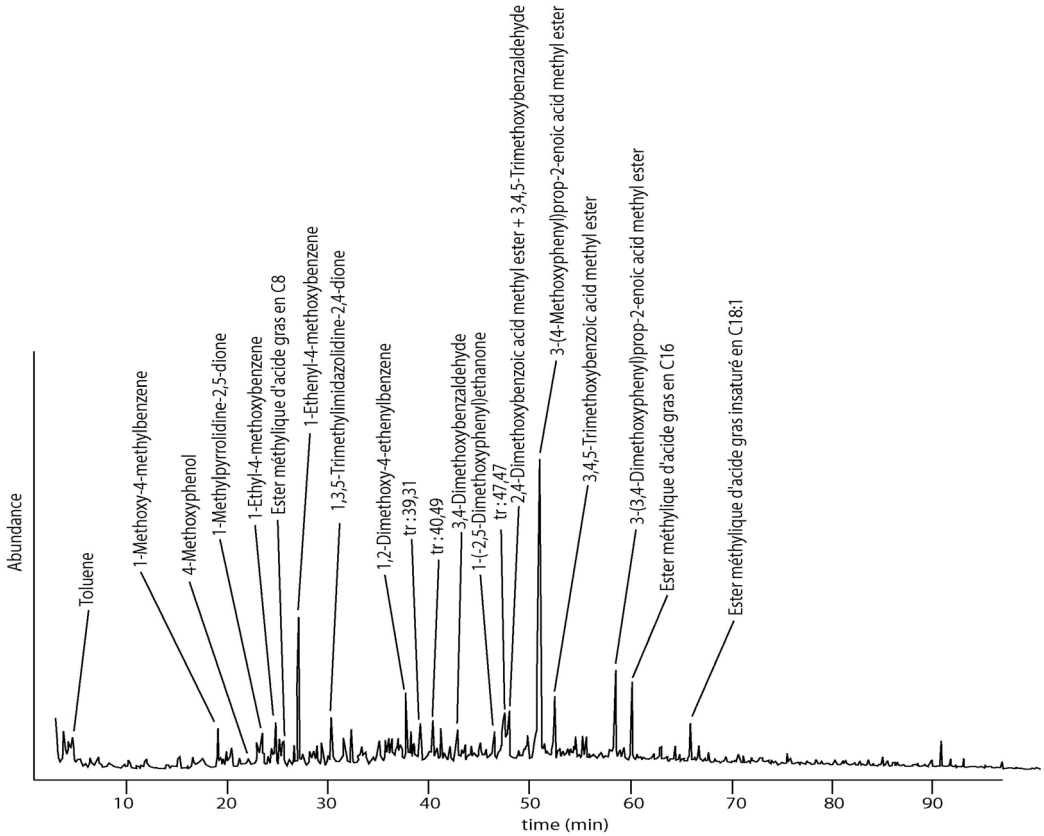


figure 2-2 : pyrochromatogramme du mélange SAB / lignine (50 : 50) en présence de TMAH

tableau 2-2 : Produits principaux de la pyrolyse d'un mélange SAB : lignine (50 : 50) en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
51,15	100	**161**	192	133	89	118	134	192	3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester	lignine
27	21	**134**	119	91	65	39	51	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	tyr/ lignine
30,33	14	**42**	127	142	57	56	70	142	1,3,5-Trimethylimidazolidine-2,4-dione	Ala-Tyr
47,47	13	**98**	41	42	70	99				SAB
52,61	12	**226**	211	155	195	151	59	196	3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester	lignine
58,58	12	**222**	191	168	70	147	91	222	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester	lignine
37,81	11	**164**	149	91	77	103	121	164	1,2-Dimethoxy-4-ethenylbenzene	lignine
39,31	11	**69**	41	154	42	68	126			SAB
40,49	10	**128**	42	127	57	71				Val-Phe SAB
60,22	10	**74**	87	43	55	41	75	270	Ester méthylique d'acide gras en C16	lignine
42,95	9	**166**	165	95	77	51	79	166	3,4-Dimethoxybenzaldehyde	lignine
4,67	8	**91**	92	65				92	Toluene	SAB
24,85	8	**121**	136	77	91	65	39	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	Tyr/ lignine
23,42	7	**56**	113	55	58	42	57	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione	SAB
46,47	6	**165**	180	43	79	77	137	180	1-(-2,5-Dimethoxyphenyl)ethanone	lignine
65,95	6	**55**	43	41	69	74	83	296	Ester méthylique d'acide gras insaturé en C18:1	lignine
19,12	6	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr/ lignine
23,04	6	**109**	124	81	53	39	51	124	4-Methoxyphenol	lignine
47,6	6	**165**	196	161	79	59	77	196	2,4-Dimethoxybenzoic acid methyl ester	lignine
47,97	6	**196**	181	125	39	93	110	196	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	lignine
38,22	6	**135**	166	77	107	92	64	166	4-Methoxybenzoic acid methyl ester	lignine
25,54	5	**74**	43	87	41	55	59	158	Ester méthylique d'acide gras en C8	SAB
32,39	5	**135**	136	77	107	39	92	136	4-Methoxybenzaldehyde	lignine
23,6	5	**42**	111	68	108	107	53			
41,24	5	**43**	139	81	41	77	99			
25,25	5	**56**	54	42	126	139	39			SAB
31,55	5	**91**	152	137	109	65	77			
35,13	5	**168**	153	110	39	125	93	168	1,2,3-Trimethoxybenzene	lignine
20,41	4	**84**	42	82	55	143		143	N-Methylproline methyl ester	Pro, Arg SAB
7,28	4	**55**	41	43	54	39	82	83	3-Methylbutanenitrile	Leu SAB
35,94	3	**42**	128	43	58	127	57			SAB
36,41	3	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl- 5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu
90,83	3	**57**	43	55	97	83	69			

2.2.1. Mélange SAB/lignine, 50/50

Le premier mélange que nous avons réalisé est un mélange 50 :50 en masse de SAB et de lignine. Le pyrochromatogramme de ce mélange est présenté ci-après (figure 2-2) et est dominé, de façon générale, par les produits de pyrolyse de la lignine (tableau 2-2). Le 3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester est le composé très majoritaire du pyrochromatogramme. Le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene est équivoque car il est généré lors de la pyrolyse de la SAB où il traduit la présence de tyrosine, et de la lignine. En terme d'abondance, les autres produits ne dépassent pas 15% du pic majoritaire. Deux produits aux temps de rétention de 30,33 et 47,47 minutes, bien que non indentifiés, sont caractéristiques de la SAB. Ainsi, même si les produits détectés ont des abondances relatives proches, les produits caractéristiques de la lignine sont beaucoup plus nombreux que ceux issus de la pyrolyse de la SAB.

Les produits majoritaires de la pyrolyse de la lignine seule sont détectés dans le pyrochromatogramme du mélange et les abondances relatives sont globalement du même ordre de grandeur, malgré quelques intercalations (le 2,4-Dimethoxybenzoic acid methyl ester perd de son importance par exemple). Notons toutefois que certains produits abondants de la pyrolyse de la lignine ne sont plus détectés dans le pyrochromatogramme du mélange. Il s'agit par exemple de la 1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethanone, du 2,6-Dimethoxyphenol, du 3,4-Dimethoxybenzeneactic acid methyl ester pour ne citer que les plus abondants. Il est possible que ces produits se recombinent avec des produits de la pyrolyse de la SAB, en particulier pour les deux premiers cités dont les fonctions oxygénées n'ont pas été méthylées et restent donc très réactives.

Quant aux produits de pyrolyse de la SAB, même si les produits détectés dans le pyrochromatogramme du mélange font partie des produits majoritaires de la pyrolyse de la SAB seule, leur abondance relative est très faible dans le pyrochromatogramme du mélange. Le produit le plus abondant attribué à la SAB ne représente que 14% du produit majoritaire, qui, lui, provient de la lignine. L'abondance relative pour les 11 produits que l'on peut attribuer à la SAB dépassait 20 % du pic majoritaire de la pyrolyse de SAB et ne dépasse pas 15 % du pic majoritaire du mélange. De plus, les abondances relatives sont bouleversées dans le pyrochromatogramme du mélange. Ainsi, le 1-Methylpyrrolidine-2,5-dione, composé majoritaire pour la pyrolyse de la SAB est moins abondant que le composé inconnu éluant à 30,33 minutes.

Ainsi, de par le produit majoritaire et par le nombre de ses produits de pyrolyse et leur abondance relative, la lignine est beaucoup mieux représentée que la SAB dans le pyrochromatogramme de ce mélange 50 : 50. Le rapport de la somme des abondances relatives des produits caractéristiques de la lignine et de celle des produits caractéristiques de la SAB est supérieur à 2.

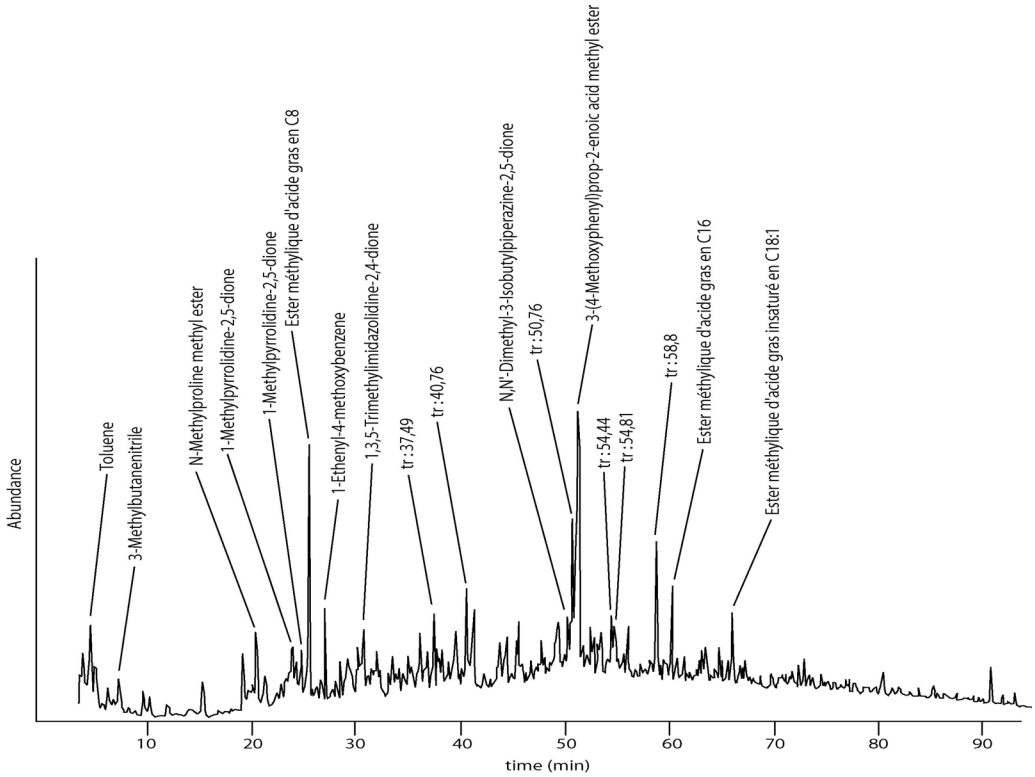


figure 2-3 : pyrochromatogramme du mélange SAB / lignine (80 : 20) en présence de TMAH

tableau 2-3 : Produits principaux de la pyrolyse d'un mélange SAB : lignine (80 : 20) en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
51,26	100	**161**	192	133	89	118	134	192	3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester	lignine
50,76	61	**152**	98	41	42	55	137			
25,68	49	**74**	43	87	41	55	59	158	Ester méthylique d'acide gras en C8	SAB
40,76	35	**128**	42	127	57	71				Val-Phe SAB
30,85	33	**42**	127	142	57	56	70	142	1,3,5-Trimethylimidazolidine-2,4-dione	Ala-Tyr SAB
20,42	28	**84**	42	82	55	143		143	N-Methylproline methyl ester	Pro, Arg SAB
58,8	27	**222**	91	191	168	70	147			
4,67	26	**91**	92	65				92	Toluene	SAB
37,49	22	**56**	55	154	125	139	42			
54,81	21	**224**	209	84	70	44	41			
24,03	20	**56**	113	55	58	42	57	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
7,35	20	**55**	41	43	54	39	82	83	3-Methylbutanenitrile	Leu SAB
27,17	19	**134**	119	91	65	39	51	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	lignine
60,29	19	**74**	87	43	55	41	75	270	Ester méthylique d'acide gras en C16	lignine
50,26	17	**142**	113	42	44	57	141	198	N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione	SAB
54,44	17	**58**	150	244	165	229	41			
24,4	16	**42**	127	58	41	39		127	3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
36,83	16	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl-5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu SAB
19,21	16	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr / lignine
66,03	15	**55**	43	41	69	74	83	296	Ester méthylique d'acide gras insaturé en C18:1	lignine
24,9	13	**121**	136	77	91	65	39	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	lignine
39,63	12	**69**	41	154	42	68	126			SAB
55,99	11	**42**	91	127	218	65	41			SAB
30,25	11	**43**	128	42	100					SAB
15,35	10	**82**	42	109	110	67	41			Arg SAB
52,72	9	**226**	211	155	195	151	59	226	3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester	lignine
6,39	9	**58**	117	42				117	2-(N,N-Dimethylamino)ethanoic acid methyl ester	AA
39,51	9	**147**	114	77	132	146	103	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile	Tyr SAB
9,72	9	**72**	44	42	56	70	131	131	N,N-Dimethylalanine methyl ester	Ala SAB
53,41	7	**131**	103	77	161	160	51			SAB
12,08	4	**108**	65	78	39	51	44	108	Methoxybenzene	lignine

2.2.2. Mélange SAB/lignine, 80/20

Pour évaluer à quel point la lignine est mieux détectée que la SAB, nous avons augmenté la proportion de SAB dans le mélange. Le pyrochromatogramme présenté ci-après (figure 2-3) est celui d'un mélange 80 : 20 en masse en faveur de la SAB.

Ainsi, même si le 3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, caractéristique de la lignine, reste le produit majoritaire, il domine moins largement le pyrochromatogramme que précédemment (tableau 2-3). De plus, cette fois, les composés relatifs à la SAB, qu'ils soient identifiés ou non, sont beaucoup plus nombreux et d'abondances relatives plus importantes que ceux relatifs à la lignine. Comme pour le mélange 50 : 50 les abondances relatives des produits de la SAB sont différentes de celles observées pour la SAB seule. Elles ne correspondent pas non plus à celles observées pour le mélange 50 : 50.

Les composés univoques issus de la pyrolyse de la lignine sont : le 3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, le 1-Ethyl-4-methoxybenzene, 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester. On peut constater une inversion de l'ordre de ceux derniers composés en fonction de leur abondance relative.

Ainsi, lorsque les proportions du mélange sont portées à 80 : 20 en masse (SAB : lignine), la SAB est mieux détectée que la lignine par ses produits caractéristiques, mais le composé majoritaire reste caractéristique de la lignine. Le rapport de la somme des abondances relatives des produits caractéristiques de la lignine et de celle des produits caractéristiques de la SAB vaut environ 0,6. Par rapport au mélange 50/50, ce rapport est donc affecté d'un facteur multiplicatif proche de 4, qui correspond au changement de proportions SAB/lignine.

2.2.3. Discussion

Il apparaît donc clairement que la lignine est plus facilement détectable que la SAB et qu'elle risque de « masquer » celle-ci dans la pyrolyse d'échantillons naturels. Cette caractéristique peut s'expliquer par le fait que les produits de pyrolyse de la lignine sont tous aromatiques. Or les produits aromatiques sont très bien détectés en spectrométrie de masse.

La SAB est plus facilement détectable lorsqu'elle est en quantité 4 fois supérieure à la lignine. Cependant, cette proportion est très éloignée de celle observée dans les échantillons

naturels pour lesquels la teneur en azote est de quelques pourcents. Par conséquent, il faut rester attentif et méticuleux dans le dépouillement de pyrochromatogramme, pour ne pas passer à côté d'un marqueur de matière organique protéique.

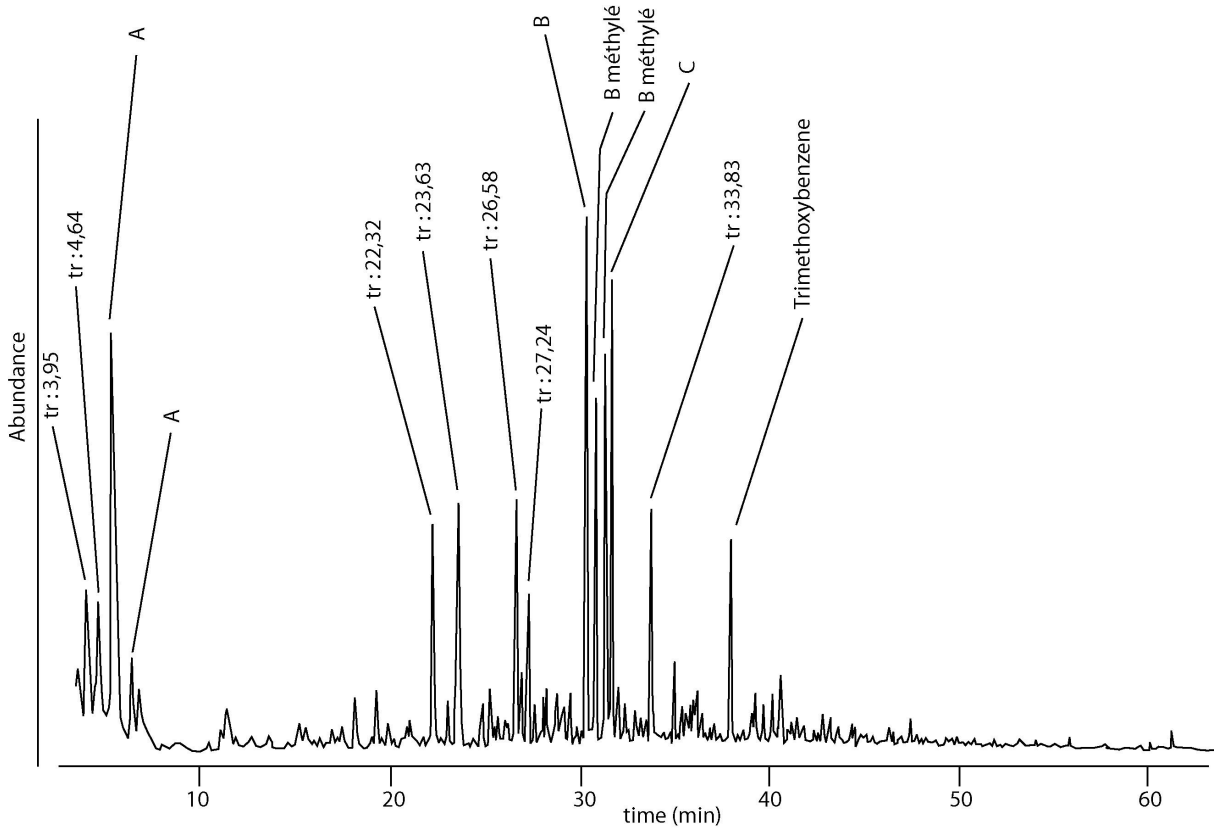


figure 2-4 : pyrochromatogramme de la cellulose en présence de TMAH

tableau 2-4 : Produits principaux de la pyrolyse de la cellulose en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés
5,38	100	**41**	100	70	56	39	69		A
30,41	74	**142**	57	41	82	71	54		B
31,72	46	**154**	53	39	83	125	40		C
23,63	42	**44**	41	57	112	43	39		
31,37	41	**156**	53	55	57	95	41		B méthylé
30,87	33	**156**	41	55	141	53	43		B méthylé
3,95	31	**45**	43	61	40				
26,58	28	**85**	138	45	77	95	123		
4,64	26	**61**	45	43	57	41	75		
22,32	24	**126**	55	41	67	83	39		
33,83	19	**154**	139	53	39	40	68		
37,92	17	**168**	153	125	69	11	52		Trimethoxybenzene (positions inconnues)
6,35	16	**41**	100	70	56	39	71		A
27,24	14	**41**	140	125	69	97	39		
26,89	10	**71**	45	43	58	102	41		
18,18	10	**71**	43	41	39	59	102		
19,25	8	**112**	55	41	69	43	56		
40,56	8	**182**	167	139	53	124	39	182	1,2,3-Trimethoxy-5-methylbenzene
24,9	7	**71**	41	46	97	144	140		
40,18	6	**45**	141	55	186	113	68		
25,27	6	**71**	58	41	45	55	100		
35,08	6	**168**	153	110	93	39	125	168	1,2,3-Trimethoxybenzene
23,07	5	**109**	124	81	53	39	52	124	guaiacol (i-methoxyphenol)
11,47	5	**42**	41	86	56	85	39	86	Butyrolactone

2.3. La cellulose

Tout comme la lignine, la cellulose a fait l'objet de nombreuses études, dont certaines utilisant la pyrolyse, en présence d'un agent de dérivation ou non. Les travaux de Pouwels *et al.* (1989), de Pastorova *et al.* (1994) et de Challinor (1996) sont parmi les premiers à aborder la pyrolyse de la cellulose. Dans le contexte de l'étude présentée ici, la pyrolyse de la cellulose, comme celle de la lignine doit permettre de discuter du comportement pyrolytique de mélanges de SAB et de cellulose en différentes proportions. C'est pourquoi la pyrolyse de cellulose ne sera pas abordée en détails dans ce document, la littérature étant suffisamment riche par ailleurs.

Le travail d'identification des produits de la pyrolyse de la cellulose s'est appuyé, outre les travaux mentionnés, sur les résultats publiés par Fabbri *et al.* (1999), Schwarzinger *et al.*(2004; 2001; 2002), Tanczos *et al.* (2003), Gauthier *et al.* (2003) et Templier *et al.* (2005).

Le pyrochromatogramme de la cellulose (figure 2-4) est dominé par des produits non identifiés, mais déjà rapportés par Fabbri *et al.* (1999) et Schwarzinger *et al.* (2004; 2001; 2002), (tableau 2-4). Le produit majoritaire, appelé A, semble identique au composé 4 de l'article de Schwarzinger *et al.* (2002) d'après son spectre de masse (figure 2-5). Un isomère est également détecté en plus faible abondance à 6,35 minutes de rétention. Les deux produits suivant le majoritaire, appelés B et C, ont été également décrits dans les articles de Fabbri et Helleur (1999) et de Schwarzinger *et al.* (2002) (figure 2-5). Ils sont caractérisés par un pic de base à m/z 142 et 154 respectivement. Sur la base de leurs spectres de masse, nous proposons que les composés éluants à 30,87 et 31,37 minutes soient des composés méthylés homologues (pic de base à m/z 156) du produit B.

Par ailleurs, certains produits plus largement décrits dans la littérature sont également détectés dans notre pyrochromatogramme, mais en abondance beaucoup moins forte, comme un Trimethoxybenzene, détecté à 37,92 minutes et dont la position des substituants n'a pas être déterminée. Mentionnons aussi le 1,2,3-Trimethoxy-5-methylbenzene, le 1,2,3-Trimethoxybenzene (pour lesquels la position des substituants proposée par la bibliothèque du spectromètre de masse est renforcée par celle proposée dans la littérature), et le guaiacol qui sont détectés en abondance souvent plus importante dans la littérature. Cette dernière indique une grande variabilité dans la nature des produits.

D'après les travaux de Schwarzinger *et al.*(2002), la proportion de TMAH joue un rôle très important dans la nature des produits de pyrolyse observés. Cet auteur publie trois pyrochromatogrammes très différents pour des rapports molaires (unités anhydroglucose) / TMAH variant de 1 / 2,3 à 1 / 45 (figure 2-6).

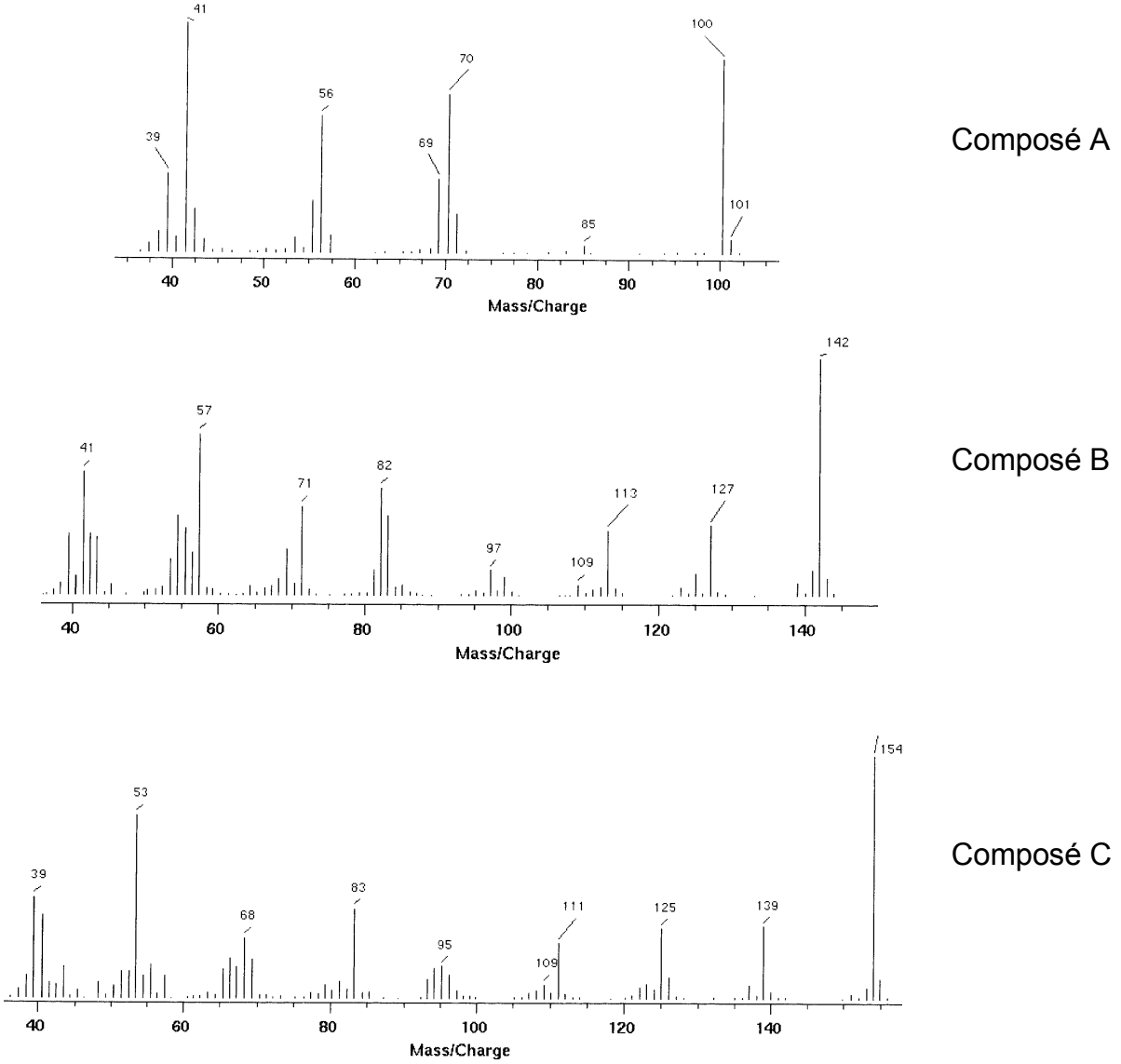


figure 2-5 : spectres de masse des composés A, B, et C

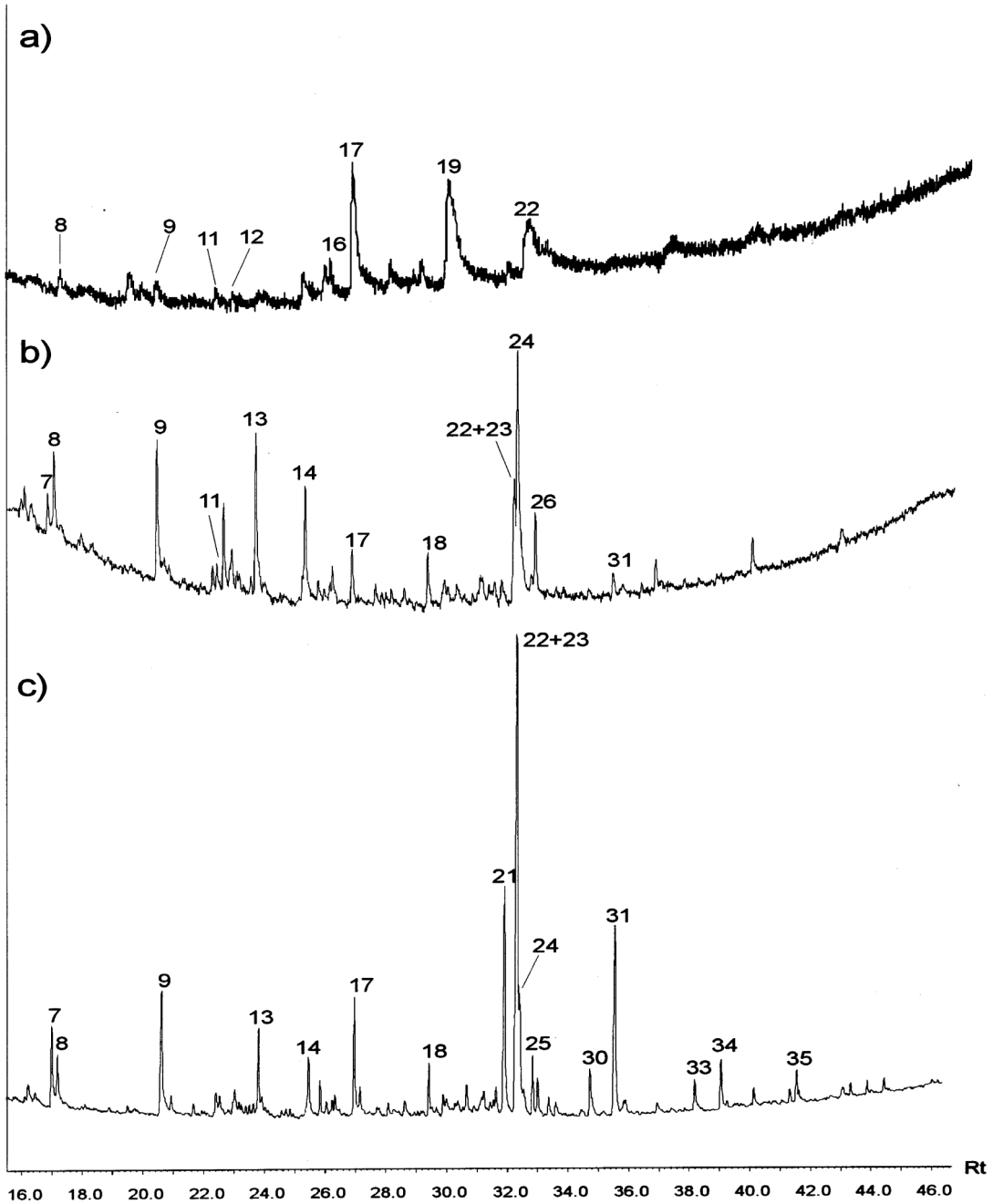


figure 2-6 : comparaison des trois pyrochromatogrammes de la cellulose en présence de TMAH pour des rapports molaires (unités anhydroglucose) / TMAH de : 1 / 2,3 (a), 1 :4,5 (b) et 1 :45 (c), tels que publiés par Schwarzinger et al. (2002) (correspondance entre produits : composé A = produit 4, composé B = produit 19 et composé C = produit 17)

2.4. Mélanges SAB/cellulose

Après avoir pyrolysé la SAB en mélange avec de la lignine, nous avons réalisé deux mélanges de SAB avec de la cellulose, avec le même objectif. Les proportions massiques des deux mélanges que nous avons pyrolysé sont identiques à celles utilisées dans le paragraphe précédent : un mélange 50 : 50 et un mélange 80 : 20 en faveur de la SAB.

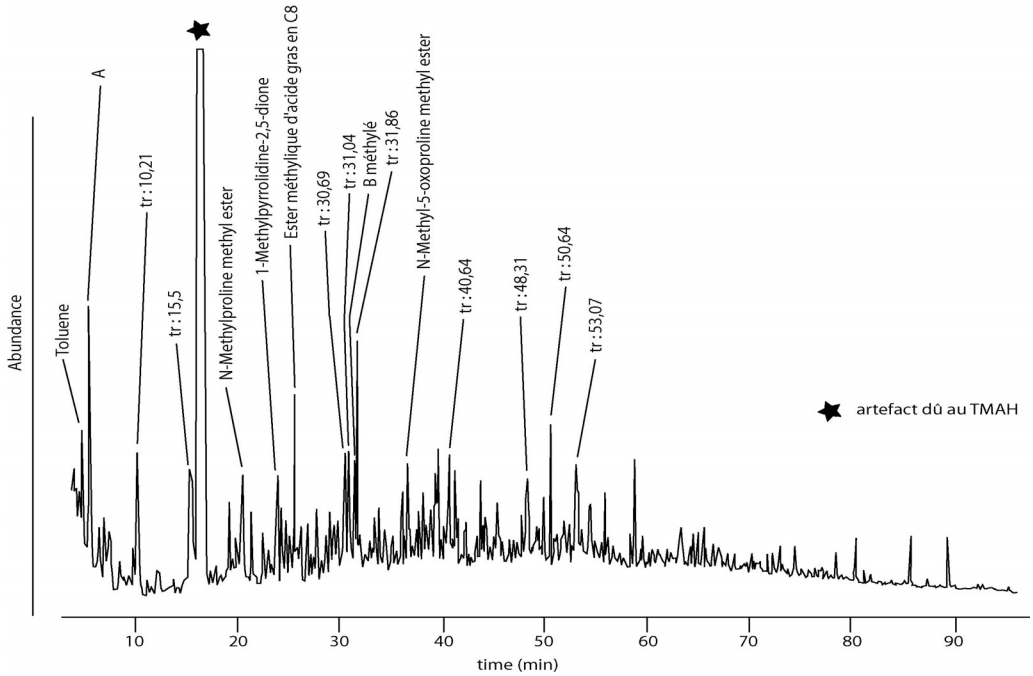


figure 2-7 : pyrochromatogramme du mélange SAB / cellulose (50 : 50) en présence de TMAH

tableau 2-5 : Produits principaux de la pyrolyse d'un mélange de SAB/cellulose (50 : 50) en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
5,48	100	**41**	100	70	56	39	69		A	cellulose
25,59	66	**74**	43	87	41	55	59	158	Ester méthylique d'acide gras en C8	SAB
10,21	65	**44**	42	43	115	41	104			BSA/cellulose (80/20)
31,86	64	**56**	112	154	53	39	83			BSA/cellulose (80/20)
31,04	63	**84**	156	42	68	55	41			Ala SAB
15,5	53	**82**	42	109	110	67	41			Arg SAB
23,78	52	**56**	113	55	58	42	57	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
30,69	52	**42**	142	57	127	56	41			SAB
36,62	46	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl-5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu SAB
53,07	44	**131**	103	77	161	160	51			SAB
4,73	40	**91**	92	65				92	Toluene	SAB
20,42	40	**84**	42	82	55	143		143	N-Methylproline methyl ester	Pro, Arg SAB
50,64	39	**152**	55	41	42	137	165			SAB
48,31	37	**138**	58	55	44	42	128			
31,51	36	**156**	53	41	56	55	57		B méthylé	cellulose
40,64	31	**128**	42	127	57	71				SAB
39,3	30	**84**	41	56	46	147	77			
36,06	29	**42**	128	127	43	41	55			BSA/cellulose (80/20)
58,72	28	**70**	168	139	42	57	41			SAB
39,49	28	**69**	41	154	42	68	126			SAB
19,17	28	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr SAB
41,11	26	**56**	166	151	125	42	165			BSA/cellulose (80/20)
34,01	24	**42**	57	83	127	154	53			
43,66	23	**121**	56	70	42	139	168			BSA/cellulose (80/20)
50,02	21	**142**	113	42	44	57	141	198	N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione	SAB
24,66	18	**42**	127	58	41	39		127	3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
45,41	15	**111**	154	42	44	56	55	154	2,5-Dimethylidene-3-methoxypiperazine-6-one	Ser
21,32	15	**42**	84	70	43	124	123			SAB
38,05	15	**56**	152	137	54					SAB
38,12	15	**168**	153	110	93	39	125	168	1,2,3-Trimethoxybenzene	cellulose
22,41	14	**126**	55	41	67	83	39			cellulose
55,85	13	**42**	91	127	218	65	41			SAB
65,01	8	**70**	42	214	213	43	215			SAB
64,61	8	**121**	42	77	122	78	91			SAB
16,56		**44**	42	86	43	128	57	129	Hexahydro-1,3,5-trimethyl-1,3,5-triazine	TMAH

2.4.1. Mélange 50/50

Le pyrochromatogramme du mélange 50/50 (figure 2-7) est dominé par le produit A qui était dominant dans la pyrolyse de la cellulose. On détecte aussi le produit B méthylé. Le produit qui le suit dans le tableau (tableau 2-5) en terme d'abondance est observé dans le pyrochromatogramme de la SAB, mais il s'agit d'un ester méthylique d'acide gras présent dans l'échantillon de SAB. La plupart des composés détectés dans la suite du tableau sont caractéristiques de la SAB, qu'ils soient identifiés ou non. Ainsi, on peut citer le 1-Methylpyrrolidine-2,5-dione, produit majoritaire de la pyrolyse de la SAB, mais aussi le N-Methyl-5-oxoproline methyl ester, le Toluene, ou le N-Methylproline methyl ester. Les produits les plus abondants de la pyrolyse de la SAB sont pour la plupart détectés dans le pyrochromatogramme du mélange.

Notons par ailleurs les deux produits abondants élués respectivement à 10,21 et 31,86 minutes. Ils n'avaient été détectés ni dans la SAB ni dans la cellulose seule.

En faible proportion, le 1,2,3-Trimethoxybenzene est caractéristique de la cellulose dans ce pyrochromatogramme. Outre le composé majoritaire et B méthylé, c'est l'un des seuls composés caractéristiques de la cellulose présent à la fois dans le pyrochromatogramme de la cellulose seule et celui du mélange.

A part le composé A, les produits majoritaires de la cellulose seule ne sont pas détectés dans le pyrochromatogramme du mélange. Les produits B et C ne sont plus détectés, sauf le composé B méthylé. Comme déjà mentionné, la proportion de TMAH peut être évoquée pour expliquer ces différences. En effet, il est possible que le TMAH soit préférentiellement consommé par la cellulose au détriment de la SAB. La proportion relative de TMAH serait alors plus importante dans le cas du mélange comparée à la proportion de TMAH pour l'échantillon seul. L'augmentation relative de la concentration en TMAH mènerait à la disparition des produits déjà décrits par Schwarzinger, comme lui-même a pu l'observer. Cette différence peut également être expliquée par la réactivité de la cellulose, qui porte de nombreuses fonctions oxygénées, et peut donc réagir avec la SAB, qui possède également de nombreux sites réactionnels libres, comme les fonctions amines par exemple.

Dans nos conditions, la SAB semble être plus facilement détectée que la cellulose, puisque les produits abondants caractéristiques de la SAB sont plus nombreux que ceux caractéristiques de la cellulose. Le rapport de la somme des abondances relatives des produits

caractéristiques de la cellulose et de celle des produits caractéristiques de la SAB vaut environ 0,26, confirmant donc que la SAB est mieux détectée que la cellulose dans ces conditions.

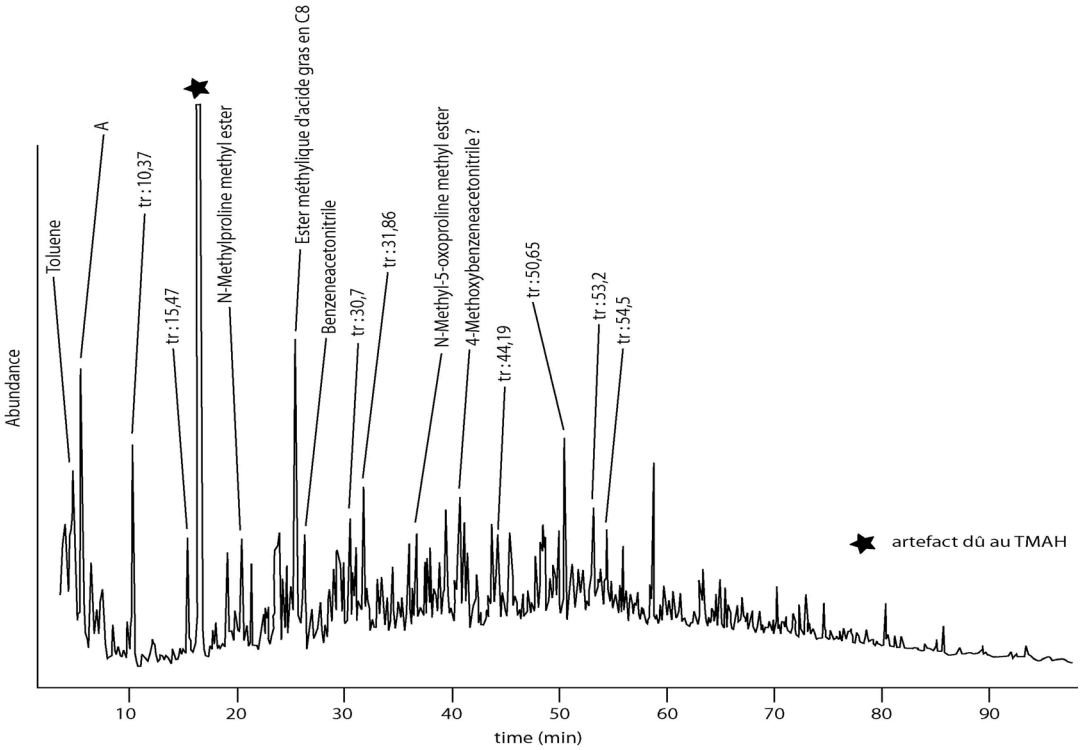


figure 2-8 : pyrochromatogramme du mélange SAB / cellulose (80 : 20) en présence de TMAH

tableau 2-6 : Produits principaux de la pyrolyse d'un mélange de SAB/cellulose (80 : 20) en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
5,45	100	**41**	100	70	56	39	69		A	cellulose
25,62	55	**74**	43	87	55	41	57	158	Ester méthylique d'acide gras en C8	SAB
10,37	51	**44**	42	43	115	41	104			BSA/cellulose (50/50)
4,7	50	**91**	92	65				92	Toluene	SAB
31,86	49	**56**	112	53	154	39	83			BSA/cellulose (50/50)
30,7	47	**42**	127	142	57	56	70			Ala SAB
15,47	41	**42**	82	109	110	67	41			Arg SAB
20,45	40	**84**	42	82	55	143		143	N-Methylproline methyl ester	Pro, Arg SAB
54,5	39	**244**	70	91	229	56	127			
26,37	38	**117**	90	116	89	39	51	117	Benzeneacetonitrile	SAB
53,2	38	**131**	103	77	161	160	51			SAB
50,65	34	**152**	55	41	42	137	165			SAB
36,65	31	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl-5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu SAB
44,19	30	**114**	43	57	58	41	127			
39,36	30	**84**	147	56	77	146	132	147	4-Methoxybenzeneacetonitrile	SAB
48,59	28	**98**	68	41	179	140	97			
58,78	27	**70**	168	139	42	57	41			SAB
19,21	27	**122**	121	107	77	91	79	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	Tyr SAB
43,7	26	**121**	56	70	42	139	161			BSA/cellulose (50/50)
41,1	23	**56**	166	125	151	42	165			BSA/cellulose (50/50)
48,34	23	**138**	58	70	68	151	152			
40,67	23	**128**	42	127	57	71				SAB
39,52	20	**69**	41	154	42	68	126			SAB
50,06	19	**142**	113	42	44	57	141	198	N,N'-Dimethyl-3-Isobutylpiperazine-2,5-dione	SAB
38,09	18	**56**	152	153	125	168	41			
36,12	14	**42**	128	127	55	41	71			BSA/cellulose (50/50)
21,32	14	**42**	84	70	43	124	123			SAB
24,72	14	**42**	127	58	41	39		127	3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
41,32	14	**43**	139	81	41	71	99			
55,91	11	**42**	91	127	218	65	41			SAB
23,91	10	**56**	113	55	58	42	57	113	1-Methylpyrrolidine-2,5-dione	Asn, Asp, Gly SAB
16,56	nd	**44**	42	86	43	128	57	129	Hexahydro-1,3,5-trimethyl-1,3,5-triazine	TMAH

2.4.2. Mélange 80/20

Le pyrochromatogramme du mélange 80 : 20 (figure 2-8) est dominé par le même produit A que le mélange 50 : 50 et la cellulose. L'ester méthylique d'acide gras en C_8, détecté pour la SAB (que nous considérons comme un polluant), est aussi détecté en grande proportion dans le pyrochromatogramme de ce mélange (tableau 2-6). Les deux produits déjà mentionnés dans la pyrolyse du mélange 50/50 (tr : 10,37 et 31,86 minutes) sont aussi détectés en grande abondance pour ce mélange. D'autres composés non identifiés sont présents dans les pyrochromatogrammes des deux mélanges sans être détectés dans le pyrochromatogramme de la SAB ou de la cellulose. N'étant présents ni dans le pyrochromatogramme de la SAB seule, ni dans celui de la cellulose seule, il est difficile de leur attribuer une origine. Cependant, la cellulose ayant un comportement beaucoup plus versatile que la SAB, il semble plus probable que ces deux produits aient la cellulose pour source.

Des composés issus de la pyrolyse de la SAB complètent la suite du tableau. La proportion de SAB ayant augmenté, il est normal que les produits de pyrolyse tels que le Toluene, le N-Methylproline methyl ester, le Benzeneacetonitrile, le N-Methyl-5-oxoproline methyl ester, le 1-Methoxy-4-methylbenzene, la 3-Methyl-N-methylpyrrolidine-2,5-dione et la 1-Methylpyrrolidine-2,5-dione soient détectés en proportions plus importantes que précédemment. Cependant, les proportions relatives de ces produits ne sont pas conservées, entre la SAB seule et les mélanges.

Ainsi, la SAB reste relativement facile à identifier dans les mélanges avec de la cellulose. Les pyrochromatogrammes de ces mélanges sont très difficiles à exploiter, en particulier à cause du changement de comportement pyrolytique de la cellulose.

Le rapport de la somme des abondances relatives des produits caractéristiques de la cellulose et de celle des produits caractéristiques de la SAB vaut environ 0,17. Le changement de rapport (de 0,26 à 0,17) n'est pas proportionnel au changement de proportions du mélange et souligne le changement de comportement pyrolytique de la cellulose en fonction des proportions de TMAH.

Notons que pour les deux mélanges contenant de la cellulose, un pic chromatographique très intense et très large, aux alentours de 16 minutes de rétention n'est pas pris en considération. Il s'agit d'un artéfact dû au TMAH : le spectre de masse est attribué

à l'Hexahydro-1,3,5-trimethyl-1,3,5-triazine. La présence de ce composé en très forte abondance peut être corrélée au changement de comportement pyrolytique de la cellulose. Ce composé n'est pas détecté dans le pyrochromatogramme de la cellulose seule, alors qu'il l'est dans les pyrochromatogrammes des mélanges, pour lesquels les produits B et C décrits par Schwarzinger ne sont plus détectés.

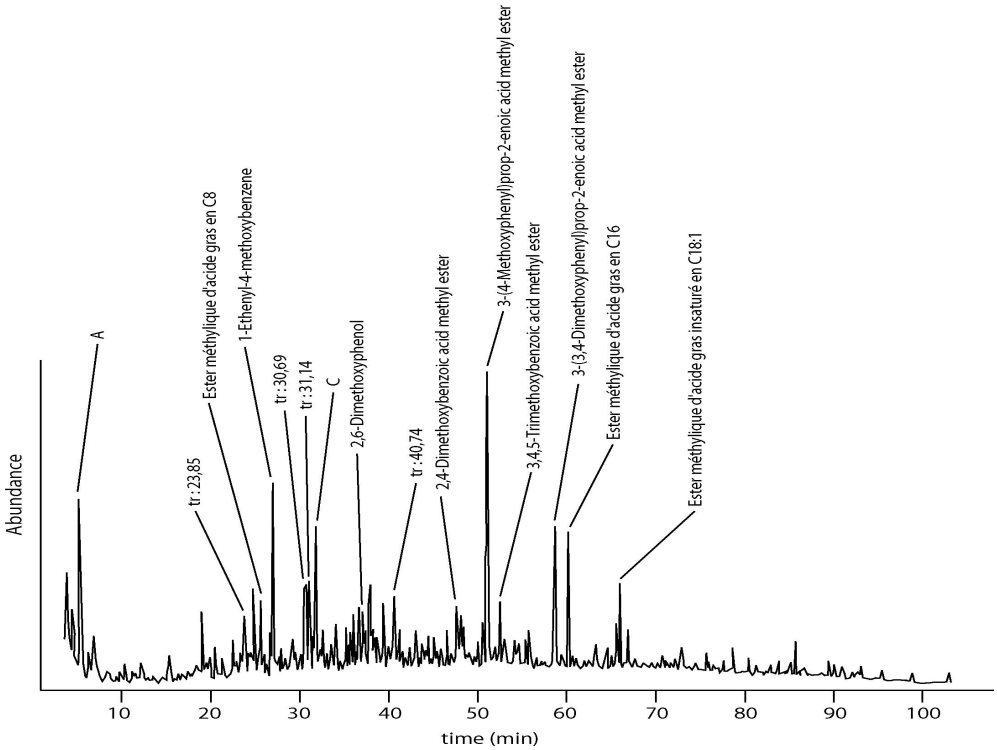


figure 2-9 : pyrochromatogramme du mélange SAB / lignine / cellulose (1 : 1 : 1) en présence de TMAH

tableau 2-7 : Produits principaux de la pyrolyse d'un mélange de SAB / lignine /cellulose en présence de TMAH

Temps de rétention (min)	Abondance relative (surface)	m/z						masse molaire (g/mol)	composés	origine
51,21	100	**161**	192	133	89	118	134	192	3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester	lignine
5,51	44	**41**	100	70	56	39	69		A	cellulose
27,28	36	**134**	119	91	65	39	51	134	1-Ethenyl-4-methoxybenzene	lignine / Tyr
30,73	32	**42**	142	57	127	41	82			cellulose
31,98	32	**154**	53	112	56	39	83		C	cellulose
58,82	26	**222**	191	147	119	77	51	222	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester	lignine
37,14	22	**154**	139	93	39	65	96	154	2,6-Dimethoxyphenol	lignine
40,74	21	**128**	42	127	57	71				
23,85	21	**44**	41	57	112	43	39			cellulose
31,14	20	**156**	84	55	42	41	141			
47,76	20	**165**	196	161	79	59	77	196	2,4-Dimethoxybenzoic acid methyl ester	lignine
52,77	20	**226**	211	155	195	151	59	226	3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester	lignine
39,53	19	**69**	41	167	182	42	68			
31,64	18	**156**	57	85	55	41	71		B méthylé	cellulose
38,03	16	**164**	149	91	77	103	121	164	1,2-Dimethoxy-4-ethenylbenzene	lignine
34,13	16	**154**	57	139	53	39	42		C	cellulose
36,72	15	**98**	41	42	157	70		157	N-Methyl-5-oxoproline methyl ester	Gln, Glu SAB
6,88	15	**59**	39	82	54	53	96			
60,31	14	**74**	87	43	55	41	75		Ester méthylique d'acide gras en C16	lignine
66,01	13	**55**	41	69	43	74	83		Ester méthylique d'acide gras insaturé en C18:1	lignine
19,21	13	**122**	77	121	107	79	91	122	1-Methoxy-4-methylbenzene	SAB lignine
24,94	13	**121**	136	77	91	65	39	136	1-Ethyl-4-methoxybenzene	lignine
43,14	13	**166**	165	95	77	51	79	166	3,4-Dimethoxybenzaldehyde	lignine
4,01	12	**45**	81	80	43					
32,7	12	**135**	136	77	107	39	92	136	4-Methoxybenzaldehyde	lignine
22,51	10	**126**	55	41	67	83	39			cellulose
4,73	10	**91**	92	65				92	Toluene	SAB
46,7	10	**165**	180	137	77	79	43	180	1-(-2,5-Dimethoxyphenyl)ethanone	lignine
36,19	9	**42**	128	127	43	41	71			SAB
48,13	9	**196**	181	125	39	93	110	196	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	lignine
25,66	9	**74**	43	87	41	55	59		Ester méthylique d'acide gras en C8	SAB
35,29	8	**168**	153	110	93	39	125	168	1,2,3-Trimethoxybenzene	lignine / cellulose
6,44	7	**41**	100	70	56	39	71			cellulose

2.5. Mélange SAB / lignine / cellulose

Le mélange SAB / lignine / cellulose répond à la logique suivie dans ce chapitre. Il marque une nouvelle étape de complexité et tend à reproduire la matrice d'un échantillon naturel. Il s'agit d'un mélange équimassique.

Le pyrochromatogramme de ce mélange (figure 2-9) est fortement dominé par le 3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, produit caractéristique de la lignine. Le composé A majoritaire de la cellulose est encore présent en grande abondance, puisqu'il représente le deuxième produit de pyrolyse (tableau 2-7).

Ce pyrochromatogramme est dominé par les produits de pyrolyse de la lignine, que ce soit en nombre ou en abondance. Ainsi, le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, le 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, le 2,6-Dimethoxyphenol, le 2,4-Dimethoxybenzoic acid methyl ester, le 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester sont des produits caractéristiques de la lignine et font partie des 12 produits majoritaires.

Outre le composé non identifié en tout début de pyrochromatogramme, les produits B et C, décrits par Schwarzinger, traduisent la présence de la cellulose dans notre échantillon. Alors que ces produits n'étaient plus détectés dans les mélanges SAB/cellulose, ils le sont à nouveau pour ce mélange plus complexe.

Les produits caractéristiques de la SAB ne sont pas nombreux et présents en faible abondance. Le plus abondant d'entre eux est le N-Methyl-5-oxoproline methyl ester. On peut lui associer le toluène. Notons deux composés dont l'origine peut être attribuée de façon équivoque à des produits peptidiques ou à la lignine : le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene et le 1-Methoxy-4-methylbenzene. L'information traduisant la présence de la SAB est donc particulièrement pauvre, alors qu'elle restait relativement abondante dans les mélanges binaires. Elle soufre également de l'ambiguïté de certains marqueurs, tel que le 1-Ethenyl-4-methoxybenzene, qui peuvent être générés aussi bien par la SAB que par la lignine.

Dans ce cas de mélange SAB/lignine/cellulose, le rapport de la somme des abondances relatives des produits caractéristiques de la lignine et de celle des produits caractéristiques de la SAB vaut 3,7 environ et celui de la somme des abondances relatives des produits caractéristiques de la cellulose et de celle des produits caractéristiques de la SAB vaut 2 environ. Ceci indique clairement que la lignine est la macromolécule la mieux détectée, et que

la détection de la cellulose semble profiter d'un effet de matrice. La détection de la SAB paraît donc être la moins favorisée pour ce type de mélange.

2.6. Conclusion

Au vu du pyrochromatogramme, la difficulté à caractériser du matériel protéique au sein d'une matrice naturelle complexe reste un défi à part entière.

Les produits de pyrolyse de la lignine dominent le pyrochromatogramme du mélange avec la SAB et la cellulose, et masquent ceux de la SAB. Gauthier *et al.* (2003) a montré que la détection de la cellulose était aussi défavorisée par la présence de lignine. Dans un mélange tel que celui qui a été pyrolysé, la détection de matériel protéique devient donc difficile.

Cependant, le travail présenté dans ce document, et en particulier la base de données qui en découle, reste un outil de recherche de produits caractéristiques de matériel protéique, et pour certains déjà recensés dans la littérature de façon parsemée.

Cette banque de données doit également être testée par l'analyse d'un ou plusieurs échantillons naturels.

Conclusion générale
Perspectives

Conclusion générale

Alors que la matière organique naturelle (MON) joue un rôle important dans de nombreux processus environnementaux, sa structure reste mal caractérisée et tout particulièrement la nature de ses structures azotées. Des études spectroscopiques ont révélé dans cette MON la présence de fonctions amides, supposées héritées de matériel protéique, mais non-hydrolysables. La caractérisation au niveau moléculaire de ces unités azotées réfractaires est un réel défi analytique. La pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-CG-SM) ne permet de détecter qu'un faible nombre de composés azotés de la MON et ne permet pas de relier la nature des produits de pyrolyse à celle de macromolécules sources. L'utilisation de TMAH, agent méthylant et base forte, améliore l'efficacité de la pyrolyse, minimise les réactions de décarboxylation et améliore la détection de produits polaires. Nous avons donc utilisé cette technique pour étudier des composés azotés modèles, en commençant par les « briques élémentaires des protéines » : les acides aminés.

La première partie du travail présenté dans ce document a donc porté sur la Py-CG-SM des 20 acides aminés protéiques en présence de TMAH. Elle a permis de mettre en évidence les principaux mécanismes de pyrolyse des acides aminés : la méthylation directe, la cyclisation, la dimérisation, l'homolyse, la décarboxylation et la déamination.

La pyrolyse de 17 dipeptides en présence de TMAH a ensuite montré l'influence de la liaison peptidique sur les mécanismes de pyrolyse. Ainsi, seuls les mécanismes de méthylation directe et de cyclisation (en particulier la formation de diketopiperazines) restent très importants. Les autres mécanismes sont peu, voire plus du tout, observés. La détection de diketopiperazines est donc un élément essentiel pour identifier du matériel protéique. Ainsi deux nouveaux types de diketopiperazines, formées à partir de trois acides aminés, et qui n'avaient pas encore été décrits dans la littérature, ont été mis en évidence.

Nous avons également étudié la pyrolyse de polypeptides, contenant de trois à neuf acides aminés et celle de la Sérum Albumine Bovine (SAB). Pour cela nous avons utilisé la base de données constituée par les résultats obtenus sur les acides aminés et les dipeptides. La pyrolyse de ces polypeptides a confirmé l'importance des produits de cyclisation, en particulier les diketopiperazines, et des produits d'homolyse pour les acides aminés aromatiques.

Enfin, la pyrolyse de la SAB en mélange avec deux autres macromolécules naturelles (lignine et cellulose) a permis d'estimer les coefficients de réponse de ces différentes macromolécules, particulièrement favorables à la lignine. La pyrolyse de ces mélanges illustre la difficulté d'analyser et de caractériser du matériel protéique dans un échantillon naturel complexe.

Perspectives

Malgré les résultats obtenus au cours de ce travail, il semble nécessaire d'approfondir notre connaissance des mécanismes de pyrolyse mis en jeu lors de la pyrolyse en présence de TMAH de polypeptides. L'identification d'un plus grand nombre de produits de pyrolyse des polypeptides permettrait d'affiner notre connaissance des mécanismes de pyrolyse. La pyrolyse d'autres polypeptides, de taille équivalente et supérieure et constitués d'acides aminés non présents dans les 4 polypeptides de cette étude, permettrait également de confirmer et d'étendre les observations reportées dans ce manuscrit. Le recours à l'ionisation chimique en spectrométrie de masse devrait faciliter le travail d'identification des produits de pyrolyse. Ces informations supplémentaires permettraient de discuter plus précisément des mécanismes mis en jeu lors de la pyrolyse de polypeptides.

D'après les résultats obtenus sur l'ensemble de ce travail, il semble pertinent de porter un intérêt particulier aux produits de cyclisation, en particulier les diketopiperazines, mais aussi les pyrrolidinidiones et les imidazolidinones, qui portent à la fois la trace azotée de l'échantillon et qui apportent des informations potentielles sur l'enchaînement des acides aminés dans la structure étudiée.

Il paraît également essentiel de pyrolyser des échantillons naturels, en utilisant la base de données créée au cours de ce travail, pour corréler la distribution des produits de pyrolyse à la nature des échantillons et à leur teneur en azote. Les nouvelles informations permettent-elles de rendre compte de la teneur en azote de l'échantillon ? Les produits de pyrolyse nouvellement mis en évidence (et particulièrement les diketopiperazines) reflètent-ils le type de liaison dans lesquelles l'azote est impliqué ?

Enfin, d'un point de vue analytique, il semble intéressant de mettre en place une détection spécifique de l'azote pour le couplage de la pyrolyse à la chromatographie gazeuse (Py-GC-NDP). Ce type de couplage permettrait de réaliser des analyses semi quantitatives

avec un seuil de détection beaucoup plus bas qu'avec une détection par spectrométrie de masse. L'idéal serait de pouvoir corréler cette trace azotée aux informations de spectrométrie de masse grâce à un montage en Y en sortie de colonne chromatographique.

Annexe :

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes 285

1.1. Echantillons 285

1.2. Préparation de l'échantillon 285

1.3. Pyrolyse de l'échantillon 286

1.4. Identification des produits 287

1.5. Intégration 288

1. Matériel et méthodes

1.1. Echantillons

Les différents échantillons analysés dans cette etude ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, Fluka ou Prolabo.

Pour les acides aminés, Gly, Val, Leu, Thr, Met, Trp, Pro, His, Lys, Asp, Glu, Gln proviennent de Sigma-Aldrich, Ala, Ile, Ser, Cys, Phe, Tyr, Asn de Fluka et Arg de Prolabo. La pureté de ces acides aminés est supérieure à 98%

Les dipeptides, sauf Ala-Trp, ont été obtenus auprès de Sigma, mais leur pureté n'est pas connue. Ala-Trp a été acheté chez Fluka, et sa pureté est supérieure à 99 %.

Les polypeptides ont tous été achetés chez Sigma, avec les critères de pureté suivants : Val-Ala-Ala-Phe, pureté supérieure à 98 %, thymopentine, pureté supérieure à 99 %, leucopyrokinine, pureté supérieure à 97 % et bradykinine, pureté supérieure à 98 %.

Enfin, la SAB, la lignine et la cellulose proviennent également de Sigma. Seule la pureté de la SAB, comprise entre 96 et 99 %, est connue.

1.2. Préparation de l'échantillon

Les échantillons ont été systématiquement préparés de la même façon.

Chaque échantillon est mélangé en proportions massiques 1 :1 à une solution aqueuse de TMAH de titre 5 % en masse. En général, 5 à 10 mg d'échantillon sont utilisés pour

l'imprégnation au TMAH (et donc 100 à 200 µL de solution de TMAH à 5% sont ajoutés). Le mélange est agité jusqu'à la solubilisation complète de l'échantillon. Le mélange est ensuite congelé dans un bain d'azote liquide puis lyophilisé.

1.3. Pyrolyse de l'échantillon

Environ 2 à 3 mg d'échantillon imprégné sont ensuite placés dans une nacelle, fabriquée dans un alliage ferromagnétique, de température de Curie de 650°C, et constituée d'un cylindre fermé à sa base par écrasement. La nacelle est ensuite introduite dans un tube en verre (inlet). L'ensemble est introduit dans la chambre de pyrolyse, qui possède une aiguille permettant l'injection directe des produits de pyrolyse en chromatographie gazeuse, comme décrit par la figure 1-1 ci-dessous.

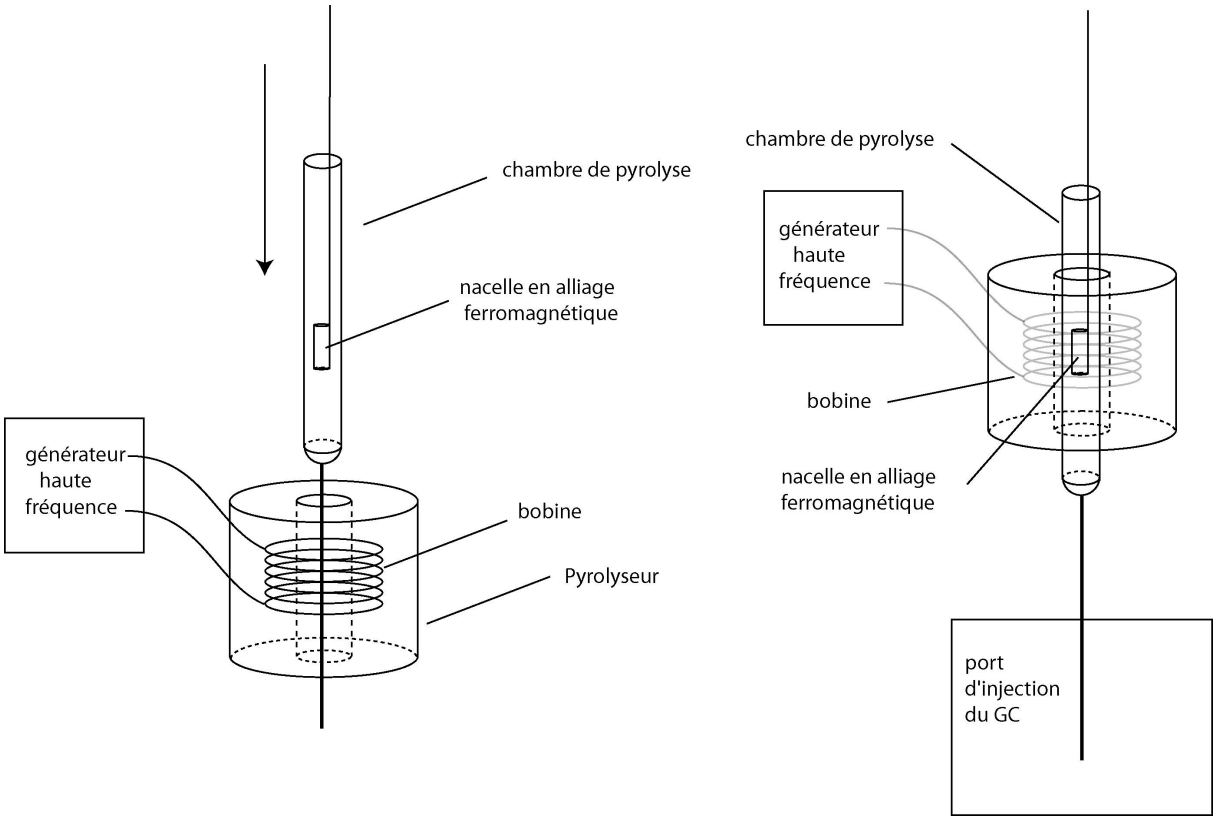


figure 1-1 : schéma simplifié du système de pyrolyse

La nacelle ferromagnétique est soumise au champ magnétique du pyrolyseur au point de Curie (Fisher 0316M), et l'échantillon est ainsi pyrolysé à 650°C. Le pyrolyseur est

directement connecté à l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard HP 5890, couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5889 A qui assure la détection des produits de pyrolyse (cf. figure 1-2). La colonne chromatographique est une colonne capillaire Resteck Rtx-5 Sil MS, de 30 mètres de long, de diamètre interne 0.25 mm, et de 0.5 µm d'épaisseur de film. Le gaz vecteur est l'hélium dont la pression est maintenue constante et égale à 15 psi. Le four chromatographique est programmé en température suivant la séquence suivante : après un palier de 10 min à 50°C, la rampe de température est fixée à 3°C.min^{-1}, à laquelle succède un nouveau palier à 300°C suffisamment long pour laisser les produits les plus lourds éluer. L'interface au spectromètre de masse est chauffée à 250°C, la source du spectromètre à 220°C et l'analyseur quadripolaire à 120°C. L'énergie d'ionisation est de 70eV en impact électronique, et l'acquisition des spectres de masse est réalisée sur la gamme de 35 à 650 amu à une fréquence d'acquisition de 0,7 spectres par seconde.

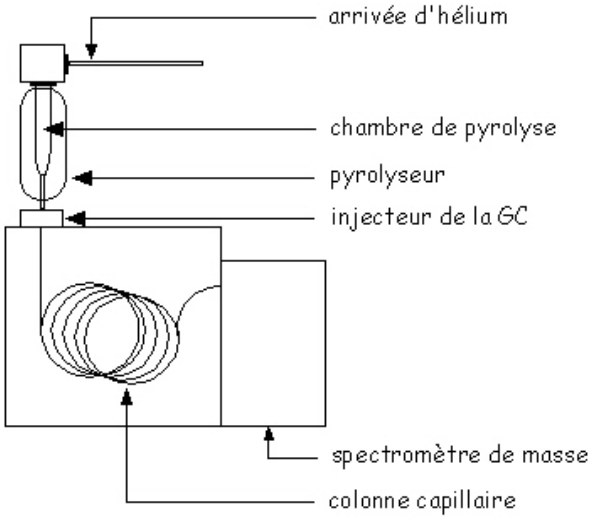


figure 1-2 : schéma du pyrolyseur couplé directement à la GC-MS

1.4. Identification des produits

Les produits de pyrolyse sont identifiés par leur spectre de masse et leur temps de rétention. Cependant, il s'est avéré que la grande majorité des produits à identifier ne figurait pas dans les bibliothèques de spectres de masse commerciales à notre disposition. Dans ce

cas, des structures ont été proposées sur la base de la fragmentation des produits considérés. Cependant, le mode d'ionisation utilisé au cours de cette étude (impact électronique à -70 eV) ne permettant pas toujours de connaître avec certitude l'ion moléculaire, il a été dès lors très difficile de proposer une structure pour certains composés détectés. Cette difficulté est d'autant plus importante que le produit est lourd, l'identification de certains produits, même très abondants, n'a pas toujours été possible. Il s'agit de composés de hauts poids moléculaires correspondant vraisemblablement à des produits de cyclisation de dérivés des dipeptides (les dicétopiperazines).

C'est pourquoi, l'ionisation chimique a été utilisée pour certains échantillons (Val-Phe, Thr-Leu, Thr-Ser, Val-Thr, thymopentine et bradykinine) pour lesquels le pyrochromatogramme était particulièrement difficile à interpréter. Dans le cas de l'ionisation chimique, le gaz réactant utilisé est l'ammoniac. Les paramètres sont alors les suivants : le débit d'ammoniac est de 2,5 mL.min-1, la température de la source est conservée à 220°C, mais l'énergie d'ionisation est portée à 120 eV.

1.5. Intégration

Notons que les pourcentages de surface des pics ne constituent que des informations semi-quantitatives mais permettent de réaliser des comparaisons (informations quantitatives relatives). En effet, compte tenu du temps considérable que cela aurait nécessité, aucun coefficient de réponse n'a été calculé dans cette étude. Par ailleurs, dans le cas de coélutions, certaines surfaces ont été estimées, la répartition des surfaces relatives aux différents pics étant alors estimée grâce aux chromatogrammes des ions caractéristiques des deux composés coélués.

Références bibliographiques

Allard, B., Derenne, S., (2007) Oxidation of humic acids from an agricultural soil and a lignite deposit: Analysis of lipophilic and hydrophilic products. *Organic Geochemistry*, 38(12), 2036-2057.

Almendros, G., Martin, F., Gonzalez-vila, F.J., (1987) Depolymerization and degradation of humic acids with sodium perborate. *Geoderma*, 235-247.

Amir, S., Hafidi, M., Lemee, L., Merlina, G., Guiresse, M., Pinelli, E., Revel, J.C., Bailly, J.R., Ambles, A., (2006) Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Process Biochemistry*, 41(2), 410-422.

Baas, M., Briggs, D.E.G., van Heemst, J.D.H., Kear, A.J., De Leeuw, J.W., (1995) Selective preservation of chitin during the decay of shrimp. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(5), 945-951.

Bajc, S., Amblès, A., Largeau, C., Derenne, S., Vitorovic, D., (2001) Precursor biostructures in kerogen matrix revealed by oxidative degradation of kerogen from estonian kukersite. *Organic Geochemistry*, 32, 773-784.

Baldock, J.A., Masiello, C.A., Gelinas, Y., Hedges, J.I., (2004) Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry*, 92(1-4), 39-64.

Bange, H.W., Naqvi, S.W.A., Codispoti, L.A., (2005) The nitrogen cycle in the Arabian Sea. *Progress In Oceanography*, 65(2-4), 145-158.

Basiuk, V.A., Douda, J., (2000) Pyrolysis of poly-glycine and poly-L-alanine: analysis of less-volatile products by gas chromatography / Fourier transform infrared spectroscopy / mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 55, 235-246.

Basiuk, V.A., Douda, J., (2001) Analysis of less-volatile products of poly--valine pyrolysis by gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 60(1), 27-40.

Basiuk, V.A., Navarro-Gonzalez, R., (1997) Identification of [1,2-a]pyrazine-3,6-diones and hexahydroimidazo[1,2-a]imidazo[1,2-d]pyrazine-3,8-diones, unusual products of silica-catalyzed amino acid thermal condensation and products of their thermal decomposition using coupled high-performance liquid chromatography-particule beam mass spectrometry and gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 776, 255-273.

Beirle, S., Platt, U., Wenig, M., Wagner, T., (2004) NOx production by lightning estimated with GOME. *Advances in Space Research*, 34(4), 793-797.

Benner, R., Biddanda, B., Black, B., McCarthy, M., (1997) Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Marine Chemistry*, 57(3-4), 243-263.

Bernards, M.A., Lewis, N.G., (1998) The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm. *Phytochemistry*, 47(6), 915-933.

Berwick, L., Greenwood, P., Kagi, R., Croue, J.-P., (2007) Thermal release of nitrogen organics from natural organic matter using micro scale sealed vessel pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 38(7), 1073-1090.

Bicchi, C., D'Amato, A., Rubiolo, P., (1999) Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *Journal of Chromatography A*, 843(1-2), 99-121.

Blazso, M., (1997) Recent trends in analytical and applied pyrolysis of polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 39(1), 1-25.

Boon, J., De Leeuw, J.W., (1987) Amino acid sequence information in proteins and complex proteinaceous material revealed by pyrolysis-capillary gas chromatography low and high resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 11, 313-327.

Brassell, S.C., Lewis, C.A., de Leeuw, J.W., de Lange, F., Sinninghe Damste, J.S., (1986) Isoprenoid thiophenes: novel products of sediments diagenesis? *Nature*, 320, 160-162.

Brock, T.C.M., Boon, J.J., Paffen, B.G.P., (1985) The effects of the season and of water chemistry on the decomposition of Nymphaea alba L.; Weight loss and pyrolysis mass spectrometry of the particulate matter. *Aquatic Botany*, 22(3-4), 197-229.

Bruan, V., Halim, M., Ziyad, M., Largeau, C., Ambles, A., (2001) Characterization of the Moroccan Timahdit (X-layer) oil shale kerogen using pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61(1-2), 165-179.

Camean, A., Moreno, I., Verdejo, T., Gonzalez-Vila, F.J., Gonzalez-Perez, J.A., (2005) Pyrolytic behaviour of microcystins and microcystin-spiked algal blooms. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 74(1-2), 19-25.

Cegelski, L., Steuber, D., Mehta, A.K., Kulp, D.W., Axelsen, P.H., Schaefer, J., (2006) Conformational and Quantitative Characterization of Oritavancin-Peptidoglycan Complexes in Whole Cells of *Staphylococcus aureus* by in Vivo 13C and 15N Labeling. *Journal of Molecular Biology*, 357(4), 1253-1262.

Challinor, J.M., (1989) A Pyrolysis-Derivatisation-Gas Chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 16, 323-333.

Challinor, J.M., (1991) The scope of pyrolysis methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 20, 15-24.

Challinor, J.M., (1995) Characterisation of wood by pyrolysis derivatisation--gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 35(1), 93-107.

Challinor, J.M., (1996) Characterisation of wood extractives by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of quaternary ammonium hydroxide extracts. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 37(1), 1-13.

Challinor, J.M., (2001) Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61(1-2), 3-34.

Chanaa, M.B., Lallemant, M., Mokhlisse, A., (1994) Pyrolysis of Timahdit, Morocco, oil shales under microwave field. *Fuel*, 73(10), 1643-1649.

Chandumpai, A., Singhpibulporn, N., Faroongsarng, D., Sornprasit, P., (2004) Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, Loligo lessoniana and Loligo formosana. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 467-474.

Chiavari, G., Fabbri, D., Prati, S., (2001) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of products arising from pyrolysis of amino acids in the presence of hexamethyldisilazane. *Journal of Chromatography A*, 922, 235-241.

Chiavari, G., Galletti, G.C., (1992) Pyroysis-gas chromatography / mass spectrometry of amino-acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 24, 123-137.

Christian, R.R., Fores, E., Comin, F., Viaroli, P., Naldi, M., Ferrari, I., (1996) Nitrogen cycling networks of coastal ecosystems: influence of trophic status and primary producer form. *Ecological Modelling*, 87(1-3), 111-129.

Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., (1995) A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants:

thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry*, 23(2), 169.

Cowie, G.L., Hedges, J.I., (1994) Biochemical indicators of diagenetic alteration in natural organic matter mixtures. *Nature*, 369, 304-307.

Danielson, N.D., Glajch, J., Rogers, L.B., (1978) Pyrolysis Gas Chromatography of enzymes. *Journal of Chromatographic Science*, 10(16), 455-461.

Danielson, N.D., Rogers, L.B., (1978) Determination of tryptophan in Proteins by Pyrolysis Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 50(12), 1680-1683.

de Leeuw, J.W., Baas, M., (1993) The behaviour of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures; flash pyrolysis or flash chemolysis? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 26(3), 175-184.

de Leeuw, J.W., Largeau, C., (1993) *Organic Geochemistry. Principles and Applications.*

del Rio, J.C., Gutierrez, A., Rodriguez, I.M., Ibarra, D., Martinez, A.T., (2007) Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 79(1-2), 39.

del Rio, J.C., Martin, F., Gonzalez-Vila, F.J., (1996) Thermally assisted hydrolysis and alkylation as a novel pyrolytic approach for the strucutural characterization of natural biopolymers and geomacromolecules. *Trends in analytical chemistry*, 15(2), 70-79.

del Rio, J.C., Martin, F., Gonzalez-Vila, F.J., Verdejo, T., (1995) Chemical structural investigation of asphaltenes and kerogens by pyrolysis-methylation. *Organic Geochemistry*, 23(11-12), 1009-1022.

del Rio, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D., Hatcher, P.G., (1998) Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 433-448.

del Rio, J.C., Olivella, M.A., Knicker, H., de las Heras, F.X.C., (2004) Preservation of peptide moieties in three Spanish sulfur-rich Tertiary kerogens. *Organic Geochemistry*, 35, 993-999.

Derenne, S., Knicker, H., Largeau, C., Hatcher, P., (1997) Timing and Mechanisms of Changes in Nitrogen Functionality During Biomass Fossilization. In: B.A. Stankiewicz, P.F. Van Bergen (Eds.), *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere* (Ed. by B.A. Stankiewicz, P.F. Van Bergen), pp. 244-245. American Chemical Society.

Derenne, S., Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., Rousseau, B., (1991) Chemical evidence of kerogen formation in source rocks and oil shales via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae: Origin of ultralaminae. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55(4), 1041-1050.

Dittmar, T., Fitznar, H.P., Kattner, G., (2001) Origin and biogeochemical cycling of organic nitrogen in the eastern Arctic Ocean as evident from D- and L-amino acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(22), 4103-4114.

Dominguez, A., Menendez, J.A., Inguanzo, M., Pis, J.J., (2006) Production of bio-fuels by high temperature pyrolysis of sewage sludge using conventional and microwave heating. *Bioresource Technology*, 97(10), 1185.

Durand, B., (1980) *Kerogen. Insoluble Organic Matter from Sedimentary Rocks.*, Paris.

Dworzanski, J.P., Tripathi, A., Snyder, A.P., Maswdeh, W.M., Wick, C.H., (2005) Novel biomarkers for Gram-type differentiation of bacteria by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 73(1), 29-38.

El harfi, K., Mokhlisse, A., Chanaa, M.B., Outzourhit, A., (2000) Pyrolysis of the Moroccan (Tarfaya) oil shales under microwave irradiation. *Fuel*, 79(7), 733-742.

Fabbri, D., Helleur, R., (1999) Characterization of the tetramethylammonium hydroxyde thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49, 277-293.

Filley, T.R., Hatcher, P.G., Shortle, W.C., Praseuth, R.T., (2000) The application of 13C-labeled tetramethylammonium hydroxide (13C-TMAH) thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. *Organic Geochemistry*, 31(2-3), 181-198.

Fitznar, H.P., Lobbes, J.M., Kattner, G., (1999) Determination of enantiomeric amino acids with high-performance liquid chromatography and pre-column derivatisation with o-phthaldialdehyde and N-isobutyrylcysteine in seawater and fossil samples (mollusks). *Journal of Chromatography A*, 832(1-2), 123-132.

Flannery, M.B., Stott, A.W., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., (2001) Chitin in the fossil record: identification and quantification of -glucosamine. *Organic Geochemistry*, 32(5), 745-754.

Frazier, S.W., Nowack, K.O., Goins, K.M., Cannon, F.S., Kaplan, L.A., Hatcher, P.G., (2003) Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxyde thermochemolysis GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 70, 99-128.

Galletti, G.C., Chiavari, G., Bocchini, P., (1995) Thermal decomposition products of aspartame as determined by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 32, 137-151.

Gallois, N., Templier, J., Derenne, S., (2007) Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of the 20 protein amino acids in the presence of TMAH. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 80(1), 216-230.

Galloway, J.N., (2004) The Global Nitrogen Cycle. In: W.H. Schlesinger (Ed.), *Biogeochemistry*, *8* (Ed. by W.H. Schlesinger), pp. 557-583. Elsevier.

Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi, I., Saliot, A., (2001) Thermally assisted hydrolysis and methylation of kerogen-like organic matter in a recent sediment off the Danube delta (northwestern Black Sea). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61, 147-164.

Gauthier, A., Derenne, S., Largeau, C., Dupont, L., Guillon, E., Dumonceau, J., Aplincourt, M., (2003) Comparative study of ligno-cellulosic material from wheat straw and of pure and mixed standard compounds via solid state 13C NMR spectroscopy, conventional pyrolysis and TMAH thermochemolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 67(2), 277-293.

Gonzalez-Vila, F.J., Lankes, U., Ludemann, H.D., (2001) Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58-59, 349-359.

Grasset, L., Guignard, C., Ambles, A., (2002) Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate. *Organic Geochemistry*, 33(3), 181-188.

Greenwood, P.F., van Heemst, J.D.H., Guthrie, E.A., Hatcher, P.G., (2002) Laser micropyrolysis GC-MS of lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 62(2), 365.

Hatcher, P.G., Minard, R.D., (1996) Comparison of dehydrogenase polymer (DHP) lignin with native lignin from gymnosperm wood by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry*, 24(6-7), 593-600.

Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dible, S.D., Carson, D.M., (1995) Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm

wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry*, 23(10), 881-888.
Hatcher, P.G., Spiker, E.C., Szeverenyi, N.M., Maciel, G.E., (1983) Selective preservation: the origin of petroleum-forming aquatic kerogen. *Nature*, 305, 498-501.
Havey, C.D., Basile, F., Mowry, C., Voorhees, K.J., (2004) Evaluation of a micro-fabricated pyrolyzer for the detection of Bacillus anthracis spores. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 72(1), 55-61.
Hedges, J.I., (1990) Compositional indicators of organic acid sources and reactions in natural environments. In: E.M. Perdue, Gjessing (Eds.), *Organic Acids in Aquatic Environments* (Ed. by E.M. Perdue, Gjessing), pp. 43-63. Wiley and Sons.
Hedges, J.I., Keil, R.G., (1995) Sedimentary organic matter preservation: an assesment and speculative synthesis. *Marine Chemistry*, 49, 81-115.
Hedges, J.I., Keil, R.G., Benner, R., (1997) What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry*, 27(5-6), 195-212.
Hendricker, A.D., Basile, F., Voorhees, K.J., (1998) A study of protein oxidative products using a pyrolysis-membrane inlet quadrupole ion trap spectrometer with air as buffer gas. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 46, 65-82.
Hendricker, A.D., Voorhees, K.J., (1996) An investigation into the Curie-point pyrolysis-mass spectrometry of glycyl dipeptides. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 36, 51-70.
Hendricker, A.D., Voorhees, K.J., (1998) Amino Acids and oligopeptide analysis using Curie-point pyrolysis mass spectrometry with in situ thermal hydrolysis and methylation: mechanistic considerations. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 48, 17-33.
Hernes, P.J., Hedges, J.I., (2004) Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(6), 1293-1307.
Hild, L., Richter, A., Rozanov, V., Burrows, J.P., (2002) Air mass factor calculations for GOME measurements of lightning-produced NO2. *Advances in Space Research*, 29(11), 1685-1690.
Hita, C., Parlanti, E., Jambu, P., Joffre, J., Ambles, A., (1996) Triglyceride degradation in soil. *Organic Geochemistry*, 25(1-2), 19-28.
Huang, B.X., Kim, H.-Y., Dass, C., (2004) Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1237-1247.
Ikan, R., Rubinsztain, Y., Nissenbaum, A., Kaplan, I.R., (1996) Geochemical aspects of the Maillard Reaction. In: R. Ikan (Ed.), *The Maillard reaction. Consequences for the chemical and life sciences.* (Ed. by R. Ikan), pp. 1-25. John Wiley & sons.
Ishida, Y., Wakamatsu, S., Yojoi, H., Ohtani, H., Tsuge, S., (1999) Compositional analysis of polyunsaturated fatty acid oil by one-step thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of trimethyl sulfonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49, 267-276.
Jimenez, M.A., Schmid, H., von Lutzow, M., Gutser, R., Munch, J.C., (2002) Evidence for recycling of N from plants to soil during the growing season. *Geoderma*, 105(3-4), 223-241.
Keil, R.G., Mayer, L.M., Quay, P.D., Richey, J.E., Hedges, J.I., (1997) Loss of organic matter from riverine particles in deltas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(7), 1507-1511.
Kelly, K.R., Stevenson, F.J., (1996) Organic Form of N in soil. In: A. Piccolo (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems.* (Ed. by A. Piccolo), pp. 407-427, Amsterdam.

Knicker, H., (2004) Stabilization of N-compounds in soil and organic-matter-rich sediments--what is the difference? *Marine Chemistry*, 92(1-4), 167-195.

Knicker, H., del Rio, J.C., Hatcher, P.G., Minard, R.D., (2001) Identification of protein remnants in insoluble geopolymers using TMAH thermolysis / GC-MS. *Organic Geochemistry*, 32, 397-409.

Knicker, H., Fründ, R., Lüdemann, H.-D., (1993) The Chemical Nature of Nitrogen in Native Soil Organic Matter. *Naturwissenschaften*, 80, 219-221.

Knicker, H., Hatcher, P.G., (1997) Survival of Protein in an Organic-Rich Sediment: Possible Protection by encapsulation in Organic Matter. *Naturwissenschaften*, 84, 231-234.

Knicker, H., Hatcher, P.G., (2001) Sequestration of organic nitrogen in the sapropel from Mangrove Lake, Bermuda. *Organic Geochemistry*, 32, 733-744.

Knicker, H., Scaroni, A.W., Hatcher, P.G., (1996) 13C and 15N NMR spectroscopic investigation on the formation of fossil algal residues. *Organic Geochemistry*, 24(6-7), 661-669.

Kögel-Knabner, I., (2000) Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry*, 31, 609-625.

Kolattukudy, P.E., Croteau, R., Buckner, J.S., (1976) *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*.

Kralert, P.G., Alexander, R., Kagi, R.I., (1995) An investigation of polar constituents in kerogen and coal using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with in situ methylation. *Organic Geochemistry*, 23(7), 627-639.

Kuypers, M.M.M., Sliekers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G., Damsté, J.S.S., Strous, M., Jetten, M.S.M., (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422(6932), 608-611.

Largeau, C., Casadevall, E., Kadouri, A., Metzger, P., (1984) Formation of Botryococcus-derived kerogens--Comparative study of immature torbanites and of the extent alga Botryococcus braunii. *Organic Geochemistry*, 6, 327-332.

Largeau, C., Derenne, S., Casadevall, E., Kadouri, A., Sellier, N., (1986) *Pyrolysis of immature torbadonite and of the resistant biopolymer (PRB A) isolated from extant alga Botryococcus braunii. Mechanism of formation and structure of torbanite.*

Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K., (2000a) Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different solid techniques: tetramethylammonium hydroxyde treatment and pyrolysis-gas chromatography / mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 424, 91-103.

Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K., (2000b) Degradation of TMAH treated aquatic humic matter at different temperatures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 55, 151-160.

Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K., (2003) Comparison of quaternary methyl-, ethyl- and butylammonium hydroxides as alkylating reagents in pyrolysis-GC/MS studies of aquatic fulvic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69, 315-329.

Maillard, L., (1916) Synthèse de matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Annales de Chimie*, 5, 258-317.

Mannino, A., Harvey, H.R., (2000) Terrigenous dissolved organic matter along an estuarine gradient and its flux to the coastal ocean. *Organic Geochemistry*, 31, 1611-1625.

Marshall, R.C., Gillespie, J.M., (1977) The keratin proteins of wool, horn, and hoof from sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*, 30(5), 389-400.

Martin, F., del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, F.J., Verdejo, T., (1995) Thermally assisted hydrolysis and alkylation of lignins in the presence of tetra-alkylammonium hydroxides. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 35(1), 1-13.

Martinez, A.T., Gonzalez-Perez, J.A., Valmaseda, M., Dale, B.E., Lambregts, M.J., Haw, J.F., (1991) Solid-state NMR studies of lignin and plant polysaccharide degradation by fungi. *Holzforschung*, 45, 49-54.

McCarthy, M., Hedges, J., Benner, R., (1996) Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Marine Chemistry*, 55(3-4), 281-297.

McCarthy, M.D., Benner, R., Lee, C., Hedges, J.I., Fogel, M.L., (2004) Amino acid carbon isotopic fractionation patterns in oceanic dissolved organic matter: an unaltered photoautotrophic source for dissolved organic nitrogen in the ocean? *Marine Chemistry*, 92(1-4), 123-134.

McKinney, D.E., Carson, D.M., Clifford, D.J., Minard, R.D., Hatcher, P.G., (1995) Off-line thermochemolysis versus flash pyrolysis for the in situ methylation of lignin: Is pyrolysis necessary? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 34(1), 41-46.

Meetani, M.A., Basile, F., Voorhees, K.J., (2003) Investigation of pyrolysis residues of poly(amino acids) using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69, 101-113.

Menendez, J.A., Inguanzo, M., Pis, J.J., (2002) Microwave-induced pyrolysis of sewage sludge. *Water Research*, 36(13), 3261-3264.

Mercier, F., Moulin, V., Guittet, M.J., Barre, N., Gautier-Soyer, M., Trocellier, P., Toulhoat, P., (2002) Applications of new surface analysis techniques (NMA and XPS) to humic substances. *Organic Geochemistry*, 33(3), 247-255.

Mongenot, T., Riboulleau, A., Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Pouet, Y., Baudin, F., Largeau, C., (2001) Occurence of proteinaceous moieties in S- and O-rich Late Tithonian kerogen (Kashpir oil Shales, Russia). *Organic Geochemistry*, 32, 199-203.

Monteil-Rivera, F., Brouwer, E.B., Masset, S., Deslandes, Y., Dumonceau, J., (2000) Combination of X-ray photoelectron and solid-state 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural characterisation of humic acids. *Analytica Chimica Acta*, 424(2), 243-255.

Munson, T.O., Fetterolf, D.D., (1987) Evidence for the formation of 2,4-imidazolidinediones and pyrrolidino[1,2a]-3,6-piperazinediones in human hair pyrolyzate by pyrolysis-gas chromatography-mass spectroscopy-mass spectroscopy. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 11, 15-24.

Munson, T.O., Vick, J., (1985) Comparison of human hair by pyrolysis-capillary column gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8, 493-501.

Nguyen, R.T., Harvey, H.R., (2001) Preservation of protein in marine systems: hydrophobic and other non-covalent associations as major stabilizing forces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 1467-1480.

Nguyen, R.T., Harvey, H.R., (2003) Preservation via macromolecular associations during Botryococcus braunii decay: proteins in the Pula Kerogen. *Organic Geochemistry*, 34(10), 1391-1403.

Noguerola, A.S., Murugaverl, B., Voorhees, K.J., (1992) An investigation of dipeptides containing polar and non polar side-groups by Curie-point Pyrolysis tandem Mass-Spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 3, 750-756.

Page, D.W., J.A., V.L., Spark, K.M., Mulcahy, D.E., (2002) Pyrolysis characterisation of plant, humus and soil extracts from Australian catchments. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 65, 269-285.

Parlanti, E., Morin, B., Vacher, L., (2002) Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the

characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Organic Geochemistry*, 33(3), 221-236.

Pastorova, I., Botto, R.E., Arisz, P.W., Boon, J.J., (1994) Cellulose char structure: a combined analytical Py-GC-MS, FTIR, and NMR study. *Carbohydrate Research*, 262(1), 27-47.

Personeni, E., Loiseau, P., (2005) Species strategy and N fluxes in grassland soil: A question of root litter quality or rhizosphere activity? *European Journal of Agronomy*, 22(2), 217-229.

Post, W.M., Emmanuel, W.R., Zinke, P.J., Stangenberg, A.G., (1982) Soil carbon pools and world life zones. *Nature*, 298, 156-159.

Pouwels, A.D., Eijkel, G.B., Boon, J.J., (1989) Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 14(4), 237-280.

Pulchan, J., Abrajano, T.A., Helleur, R., (1997) Characterization of tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of near-shore marine sediments using gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 42(2), 135-150.

Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., (2005) Spectroscopic and pyrolytic features and abundance of the macromolecular refractory fraction in a sandy acid forest soil (Landes de Gascogne, France). *Organic Geochemistry*, 36(3), 349-362.

Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., (2006) Influence of change in land use on the refractory organic macromolecular fraction of a sandy spodosol (Landes de Gascogne, France). *Geoderma*, 136(1-2), 136-151.

Ralph, J., Hatfield, D.R., (1991) Pyrolysis-GC-MS Characterization of Forage Materials. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1426-1437.

Ratcliff, M.A., Ratcliff, M.A.J., Medley, E.E., Simmonds, P.G., (1974) Pyrolysis of Amino Acids. Mechanistic Considerations. *Journal of Organic Chemistry*, 39, 1481-1490.

Reeves, J.B., Francis, B.A., (1997) Pyrolysis-gas-chromatography-mass-spectrometry for the analysis of forages and by-products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 40-41, 243-265.

Reeves, J.B., Francis, B.A., (1998) Pyrolysis-gas chromatography for the analysis of proteins: with emphasis on forages. In: A.C. Society (Ed.), *Nitrogen-Containing Macromolecule in the Bio- and Geosphere.* (Ed. by A.C. Society), pp. 47-62.

Riboulleau, A., Derenne, S., Sarret, G., Largeau, C., Baudin, F., Connan, J., (2000) Pyrolitic and spectroscopic study of a sulphur-rich kerogen from the "Kashpir oil shales" (Upper Jurassic, Russian platform). *Organic Geochemistry*, 31, 1641-1661.

Riboulleau, A., Montgenot, T., Baudin, F., Derenne, S., Largeau, C., (2002) Factors controlling the survival of proteinaceous material in Late Tithonian kerogens (Kashpir Oil Shales, Russia). *Organic Geochemistry*, 33, 1127-1130.

Ridley, B.A., Pickering, K.E., Dye, J.E., (2005) Comments on the parameterization of lightning-produced NO in global chemistry-transport models. *Atmospheric Environment*, 39(33), 6184-6187.

Rixen, T., Ittekkot, V., (2005) Nitrogen deficits in the Arabian Sea, implications from a three component mixing analysis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 52(14-15), 1879-1891.

Rullkötter, J., Michaelis, W., (1989) The structure of kerogen and related materials. A review of recent progress and future trends. *advances in organic geochemistry*, 16(4-6), 829-852.

Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W., (1986) Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 9(2), 99-119.

Schulten, H.R., (1999) Analytical pyrolysis and computational chemistry of aquatic humic substances and dissolved organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49(1-2), 385-415.

Schulten, H.R., Leinweber, P., Theng, B.K.G., (1996) Characterization of organic matter in an interlayer clay-organic complex from soil by pyrolysis methylation-mass spectrometry. *Geoderma*, 69(1-2), 105-118.

Schulten, H.R., Schnitzer, M., (1992) A contribution to solving the puzzle of the chemical structure of humic substances: pyrolysis-soft ionization mass spectrometry. *The Science of The Total Environment*, 117-118, 27-39.

Schulten, H.R., Schnitzer, M., (1998) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol Fertil Soils*, 26, 1-15.

Schurig, V., (2001) Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 906(1-2), 275-299.

Schwarzinger, C., (2004) Identification of methylated saccharinolactones and partially methylated saccharinic acids in the thermally assisted hydrolysis and methylation of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71(2), 501-514.

Schwarzinger, C., Tanczos, I., Schmidt, H., (2001) Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) analysis of various cellulose esters. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58-59, 513-523.

Schwarzinger, C., Tanczos, I., Schmidt, H., (2002) Levoglucosan, cellobiose and their acetates as model compounds for the thermally assisted hydrolysis and methylation of cellulose and cellulose acetate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 62(2), 179-196.

Sharma, R.K., Chan, W.G., Seeman, J.I., Hajaligol, M.R., (2003) Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of alpha-amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 66, 97-121.

Sharma, R.K., Chan, W.G., Wang, J., Waymack, B.E., Wooten, J.B., Seeman, J.I., Hajaligol, M.R., (2004) On the role of peptides in the pyrolysis of amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 72(1), 153-163.

Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J., (2005) Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*, 58(6), 715-733.

Simmonds, P.G., Medley, E.E., Ratcliff, M.A., Schulman, J., Schulman, G.P., (1972) Thermal Decomposition of Aliphatic Monoamino-Monocarboxylic Acids. *Analytical Chemistry*, 44, 2060-2066.

Sinninghe Damste, J.S., de las Heras, F.X.C., van Bergen, P.F., de Leeuw, J.W., (1993) Characterization of Tertiary Catalan lacustrine oil shales: Discovery of extremely organic sulphur-rich Type I kerogens. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(2), 389-415.

Soetaert, K., Middelburg, J.J., Herman, P.M.J., Buis, K., (2000) On the coupling of benthic and pelagic biogeochemical models. *Earth-Science Reviews*, 51(1-4), 173-201.

Solidoro, C., Pastres, R., Cossarini, G., (2005) Nitrogen and plankton dynamics in the lagoon of Venice. *Ecological Modelling*, 184(1), 103-124.

Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., (1996) Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, 74(1-2), 65-105.

Stankiewicz, A.B., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., Duncan, I.J., (1997) Chemical preservation of insect cuticle from the Pleistocene asphalt deposits of California, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(11), 2247-2252.

Stankiewicz, B.A., Bergen, P.F.v., Smith, M.B., Carter, J.F., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., (1998a) Comparison of the analytical performance of filament and Curie-point pyrolysis devices. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 45, 133-151.

Stankiewicz, B.A., Mastalerz, M., Hof, C.H.J., Bierstedt, A., Flannery, M.B., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., (1998b) Biodegradation of the chitin-protein complex in crustacean cuticle. *Organic Geochemistry*, 28(1-2), 67-76.

Stankiewicz, B.A., van Bergen, P.F., (1998) Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere: An Introduction, *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*, pp. 1-12. American Chemical Society, Washington.

Stankiewicz, B.A., van Bergen, P.F., Duncan, I.J., Carter, J.F., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., (1996) Recognition of Chitin and Proteins in Invertebrate Cuticles Using Analytical Pyrolysis/Gas Chromatography and Pyrolysis/Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 10, 1747-1757.

Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446-449.

Tanczos, I., Pokol, G., Borsa, J., Toth, T., Schmidt, H., (2003) The effect of tetramethylammonium hydroxide in comparison with the effect of sodium hydroxide on the slow pyrolysis of cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68-69, 173-185.

Tegelaar, E.W., De Leeuw, J.W., Derenne, S., Largeau, C., (1989) A reappraisal of kerogen formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53, 3103.

Templier, J., Derenne, S., Croué, J.-P., Largeau, C., (2005a) Comparative study of two fractions of riverine dissolved organic matter using various analytical pyrolytic methods and a ^{13}C CP/MAS NMR approach. *Organic Geochemistry*, 36(10), 1418-1442.

Templier, J., Derenne, S., Mercier, F., Barré, N., Miserque, F., Largeau, C., (2005b) Nitrogen functionality in various fractions of riverine dissolved organic matter. In: *22nd IMOG*, *2*, pp. 961-962, Seville, Spain.

Tinoco, P., Almendros, G., Sanz, J., Gonzalez-Vazquez, R., Gonzalez-Vila, F.J., (2006) Molecular descriptors of the effect of fire on soils under pine forest in two continental Mediterranean soils. *Organic Geochemistry*, 37(12), 1995-2018.

Tissot, B.P., Welte, D.H., (1978) *Petroleum formation and occurence.* Springer-Verlag.

Tsuge, S., Matsubara, H., (1985) High-resolution pyrolysis-gas chromatography of proteins and related materials. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8, 49-64.

Tyson, R.V., (1995) *Sedimentary organic Matter: Sedimentary organic Matter.*, London.

van de Meent, D., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Windig, W., Haverkamp, J., (1982) Quantitative analysis of biopolymer mixtures by pyrolysis-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 4(2), 133-142.

Vitorovic, D., Ambles, A., Djordjevic, M., (1984) Relationship between kerogens of various structural types and the products of their multistep oxidative degradation. *Organic Geochemistry*, 6, 333-342.

Voorhees, K.J., (1984) *Analytical Pyrolysis. Techniques and Applications.* Butterworths.

Voorhees, K.J., Basile, F., Beverly, M.B., Abbas-Hawks, C., Hendricker, A.D., Cody, R.B., Hadfeld, T.L., (1997) The use of biomarker compounds for the identification of bacteria by pyrolysis-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 40-41, 111-134.

Voorhees, K.J., Zhang, W., Hendricker, A.D., Murugaverl, B., (1994) An investigation of the pyrolysis of oligopeptides by Curie-point pyrolysis-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 30, 1-16.

Voss, M., Dippner, J.W., Montoya, J.P., (2001) Nitrogen isotope patterns in the oxygen-deficient waters of the Eastern Tropical North Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 48(8), 1905-1921.

Wakeham, S.G., Lee, C., Hedges, J.I., Hernes, P.J., Peterson, M.J., (1997) Molecular indicators of diagenetic status in marine organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(24), 5363-5369.

Wang, W.J., Chalk, P.M., Chen, D., Smith, C.J., (2001) Nitrogen mineralisation, immobilisation and loss, and their role in determining differences in net nitrogen production during waterlogged and aerobic incubation of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(10), 1305-1315.

Wanjun, T., Cunxin, W., Donghua, C., (2005) Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 389-394.

Ward, B.B., (2003) Significance of anaerobic ammonium oxidation in the ocean. *Trends in Microbiology*, 11(9), 408-410.

Yamashita, Y., Tanoue, E., (2003) Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*, 82, 255-271.

Yang, H., Huang, Y., Leng, Q., LePage, B.A., Williams, C.J., (2005) Biomolecular preservation of Tertiary Metasequoia Fossil Lagerstatten revealed by comparative pyrolysis analysis. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 134(3-4), 237-256.

Zamir, L., Jensen, B.S., Larsen, E., (1969) An investigation of tautomeric equilibria by means of mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 2(1), 49-61.

Zang, X., Brown, J.C., van Heemst, J.D.H., Palumbo, A., Hatcher, P.G., (2001) Characterization of amino acids and proteinaceous materials using online tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and gas chromatography-mass spetrometry technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61, 181-193.

Zang, X., van Heemst, J.D.H., Dria, K.J., Hatcher, P.G., (2000) Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurence of organic nitrogen in soil and sediment. *Organic Geochemistry*, 31, 679-695.

Zhou, Y., Soula, S., Pont, V., Qie, X., (2005) NOx ground concentration at a station at high altitude in relation to cloud-to-ground lightning flashes. *Atmospheric Research*, 75(1-2), 47-69.

Résumé

Malgré son implication importante dans de nombreux processus environnementaux, la matière organique naturelle (MON) reste mal caractérisée, principalement à cause du caractère réfractaire des structures dans lesquelles elle est impliquée. Si des fonctions amides ont été mises en évidence dans la MON, la structure moléculaire des unités associées est encore inconnue. La pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS) en présence de Tetra-Methyl-Ammonium Hydroxyde (TMAH) est a priori un outil pertinent pour l'analyse de ces structures. Pour mieux comprendre le comportement des structures azotées de la MON au cours de la Py-GC-MS/TMAH, nous avons étudié par cette méthode, les 20 acides aminés protéiques, 17 dipeptides, 4 polypeptides et une protéine, la Sérum Albumine Bovine (SAB). Cette étude a permis de mettre en évidence les principaux mécanismes de pyrolyse des acides aminés (méthylation directe, cyclisation, dimérisation, homolyse, décarboxylation, et déamination), et l'influence de la liaison peptidique sur ces mécanismes. La Py-GC-MS/TMAH des dipeptides et des polypeptides a montré l'importance des produits de cyclisation, en particulier des diketopiperazines et de structures plus complexes basées sur 3 acides aminés, et des produits d'homolyse pour les acides aminés aromatiques. De plus, cette étude a permis d'établir une base de données des produits de pyrolyse des acides aminés et des 17 dipeptides. Enfin, la pyrolyse de la SAB en mélange avec les deux principales macromolécules présentes dans la biomasse (lignine et cellulose) montre que les coefficients de réponse sont défavorables à la protéine.

Mots clefs
Azote, acide aminé, peptide, protéine, Py-GC-MS, TMAH, mécanisme, diketopiperazine

Abstract

Despite its implication in many environmental processes, Natural Organic Matter (NOM) is only partially characterised, mainly due to its refractory nature. Amide functions have been revealed by spectroscopic studies, but the molecular structure of the concerned units remains unknown. Pyrolysis coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Py-GC-MS), in the presence of Tetra-Methyl-Ammonium Hydroxyde (TMAH) is considered to be a convenient tool to investigate these structures. For a better understanding of the behaviour of nitrogen-containing structures of NOM upon Py-GC-MS/ TMAH, we used this technique to analyse the 20 proteic amino acids, 17 dipeptides, 4 polypeptides and a protein, the Bovin Serum Albumin (BSA). This study allowed highlighting the main pyrolysis mechanisms undergone by the amino acids (direct methylation, cyclisation, dimerisation, homolysis, decarboxylation and deamination) and the influence of the peptidic bond on these mechanisms. Py-GC-MS/TMAH of dipeptides and polypeptides pointed to the importance of cyclisation products, mainly diketopiperazines and more complex compounds based on 3 amino acids, and homolysis products for aromatic amino acids. Morever, this study allowed creating a database for the pyrolysis products arising from amino acids and dipeptides. Finally, pyrolysis of mixtures of BSA with the main two macromolecules of the biomass (lignin and cellulose) showed that response factors are unfavourable to the protein.

Key-words
Nitrogen, amino acid, peptide, protein, Py-GC-MS, TMAH, mechanism, diketopiperazine