

Archive ouverte UNIGE

https://archive-ouverte.unige.ch

Thèse 1994

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Géochimie et spectrométrie de masse des pigments chlorophylliens

Chillier, Xavier

How to cite

CHILLIER, Xavier. Géochimie et spectrométrie de masse des pigments chlorophylliens. Doctoral Thesis, 1994. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:105344

This publication URL:https://archive-ouverte.unige.ch/unige:105344Publication DOI:10.13097/archive-ouverte/unige:105344

© This document is protected by copyright. Please refer to copyright holder(s) for terms of use.

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Département de Chimie Physique Laboratoire de Spectrométrie de masse

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur A. BUCHS Professeur F. O. GÜLAÇAR

Géochimie et Spectrométrie de masse des pigments chlorophylliens

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de GENÈVE pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

раг

Xavier François Denis CHILLIER

de Vernier (GE)

Thèse N° 2726

GENÈVE Imprimerie Nationale 1994

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Département de Chimie Physique Laboratoire de Spectrométrie de masse FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur A. BUCHS Professeur F. O. GÜLAÇAR

Géochimie et Spectrométrie de masse des pigments chlorophylliens

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de GENÈVE pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

par

Xavier François Denis CHILLIER

de Vernier (GE)

Thèse N° 2726

GENÈVE Imprimerie Nationale 1994 La Faculté des Sciences, sur le préavis de Messieurs A. BUCHS, professeur ordinaire et directeur de thèse, F. GULAÇAR, professeur titulaire et codirecteur de thèse (Département de chimie physique - Laboratoire de spectrométrie de masse), H. BILL, professeur ordinaire (Département de chimie physique) et G.J. VAN BERKEL, professeur (Oak Ridge National Laboratory, Tennessee), autorise l'Impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 30 novembre 1994

Thèse - 2726 -

Le Doyen, Plerre MOESCHLER

Cette thèse a fait l'objet d'un certain nombre de publications dans des revues scientifiques. Ayant reçu la mention "très bien", ce travail a pu par conséquent bénéficier de fonds privés pour faciliter sa publication.

> T. 14 - Gamma - - -

Les recherches faisant l'objet de cette thèse ont été effectuées de janvier 1992 à octobre 1994 dans le Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université de Genève (Département de Chimie Physique), sous la direction du **Professeur Armand Buchs** (directeur de thèse) et du **Professeur Fazil O. Gülaçar** (co-directeur de thèse). La partie pratique concerçant la spectrométrie "Ion Trap" a été effectuée lors d'un stage dans les laboratoires du **Dr Scott A. McLuckey** (Head of the Analytical Spectroscopy Section, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA), sous la direction du **Dr Gary J. Van Berkel** (Research Staff).

Au moment de conclure, je tiens à remercier:

chaleureusement les professeurs A. Buchs et F. O. Gülaçar de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir laissé jouir d'une grande liberté d'action, tout en m'offrant un environnement scientifique et humain excellent. Je les remercie également pour leur disponibilité et leur encouragements, lors des nombreuses discussions que nous avons eues.

très vivement le Dr G. J. Van Berkel d'avoir rendu possible notre collaboration, en mettant à ma disposition des méthodes analytiques prototypes; je remercie aussi l'ensemble du groupe de l'Analytical Spectroscopy de ORNL pour leur aimables conseils, et plus spécialement les Drs S. A. McLuckey, D. Goeringer ainsi que M. K. J. Asano.

Je tiens aussi à remercier le Dr Gary J. Van Berkel de ORNL (Tennessee, USA) et le Professeur Hans Bill (département de Chimie Physique de notre Université) d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de thèse.

Ma gratitude va également au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique qui a subventionné une partie de ces travaux.

J'adresse encore mes remerciements au groupe de spectroscopie NMR pour l'enregistrement des spectres et en particulier au Professeur U. Burger et à M. A. Pinto, pour leurs conseils. Enfin, j'adresse mes plus vifs remerciements aux collaborateurs du groupe de Spectrométrie de Masse et particulièrement à M.M. W. Kloeti et R. Biondina pour leur assistance technique et leur aide lors des prélévements d'échantillons, ainsi qu'au Dr G. Klink, mon collègue, pour son initiation à certaines méthodes analytiques.

.

"...Et il me sembla que vous étiez Semblable au terrain où lentement Par hasard et par mille chimies Se forment ces pierres précieuses Qui taillées et polies sont si belles,"

Apollinaire

Je dédie cette thèse à la mémoire de mes grandsparents, premiers de notre famille à avoir fait une incursion dans le monde de la chimie, ainsi qu'à mes parents, pour leur soutien. .

Table des matières

INTRODUCTION

5

PARTIE A: Géochimie des pigments chlorophylliens du Voua de la Motte

I) Les pigments chlorophylliens:	13
I.1) Matière organique et traceurs biologiques	13
I.2) Géochimie de la chlorophylle:	18
I.2.1) Géochimie classique	18
I.2.1) Géochimie moins classique	23
II) Les chlorine stéryl esters:	30
II.1) Echantillons et analyses des chlorines:	30
II.1.1) Les échantillons	30
II.1.2) L'extraction	30
II.1.3) L'isolement	31
II.1.4) Spectrophotométrie (UV/Visible)	34
II.1.5) Spectrométrie de masse (D/EI-MS)	34
II.1.6) Synthèses d'échantillons standards	40
II.2) Analyse des distributions stéroliques:	41
II.2.1) Hydrolyse des chlorine stéryl esters et dérivatisation	41
II.2.2) Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	42
II.3) Analyses complémentaires	45
II.4) Aspects géochimiques	47
III) La chlorophyllone-a, une nouvelle chlorine sédimentaire:	55
III.1) Echantillon et caractérisations spectroscopiques:	55
III.1,1) Echantillon, extraction et isolement	55
III. 1:2) Spectrophotométrie (UV/Visible)	56

III.1.3) Spectrométrie de masse (D/EI-MS)	56
III.1.4) Spectrométrie de masse en haute résolution (HR-MS)	59
III.1,5) Résonance magnétique nucléaire	59
III.2) Aspects géochimiques	63
IV) Références	71

PARTIE B: Application de la spectrométrie Ion trap couplée à une source électrospray pour l'analyse de chlorines sédimentaires.

I) Théorie Ion trap:	79
I.1) Description du potentiel	79
I.2) Mouvement des ions en fonction du temps	81
I.3) Solution de l'équation de Mathieu (approche mathématique)	82
I.4) Solutions approximées de l'équation de Mathieu:	84
I.4.1) Méthode de Wuerker et al.	84
I.4.2) Méthode de Major et Dehmelt	88
I.5) Notion de pseudo-potentiel	90
II) Isolement, excitation et éjection des ions:	93
II.1) Notions de résonance:	94
II.1.1) Fonctionnement de la trappe en mode "resonance ejection"	94
II.1.2) Solution approximée de l'équation de Mathieu dirigée	95
II.2) Spectrométrie de masse en tandem:	98
II.2.1) Notion d'activation par collisions dans un "ion trap":	98
II.2.2) Séquences de pulses de tensions radiofréquences	102
III) Partie expérimentale:	107
III.1) Description de l'instrument:	107

III.1.1) Introduction de l'échantillon:	107
III.1.2) Source électrospray et interface liquide-phase gazeuse:	109
III.1.3) Entrée des ions dans le haut vide du spectromètre et trappage	112
III.2) Conditions operationnelles typiques	113
IV) Chlorings motor for at free montations in hitse and a litician	
Application de la technique:	115
r pproducor do la cominque.	115
IV.1) Fragmentation des chlorines du type pyrophéophéorbide-a	117
IV.2) Fragmentation des chlorines du type phéophorbide-a	123
IV.3) Fragmentation de la chlorophyllone-a	126
IV.4) Application de la technique et des règles de fragmentations des composés modèles à l'analyse d'un mélange de chlorines	
de structures inconnues	129
V) Expériences complémentaires et aspects géochimiques	139
MD D (0)	
V1) References	143
CONCLUSION	147
	11/
Annexes	149

INTRODUCTION

La géochimie organique est la science qui étudie le sort des molécules organiques après la mort des êtres biologiques qui les ont engendrés. En d'autres mots, c'est l'étude de la partie abiotique du cycle du carbone. Dès lors, on peut légitimement se demander pourquoi s'évertuer à étudier des produits de dégradation des espèces vivantes? Est-ce un plaisir intellectuel pour quelques nécrophiles avertis ou une fascination pour le retour des êtres à la poussière? On peut également se demander pourquoi développer de gros efforts pour l'analyse structurale de ces composés. C'est à ces questions que nous allons tenter de répondre dans cette introduction.

Parmi les diverses molécules résistant partiellement aux influences physicochimiques, bactériennes et autres, tout en étant suffisamment stables pour garder en leur structure l'historique de leur dégradation, les pigments chlorophylliens occupent une place à part, puisque ces traceurs biologiques, ou biomarqueurs, sont à l'origine de la géochimie organique. En 1934, le chimiste allemand Treibs (Treibs, 1934) fait l'hypothèse que certains pigments rouges trouvés dans les pétroles sont des produits de dégradation de la chlorophylle. La Figure θ retrace le lien entre la chlorophylle (1) et les métallo-désoxophylloérythréoétioporphyrines (métallo-DPEP) (2), ainsi que celui entre l'hème (3) et les métallo-étioporphyrines. Vu que les quantités d'étioporphyrines trouvées dans les pétroles sont souvent trop importantes comparées aux biomasses respectives de départ, Corwin complète l'hypothèse de Treibs par une possible dégradation des métallo-DPEP (2) en métallo-étioporphyrines (4) (Corwin, 1960). Ces corrélations apportent une preuve de l'origine organique du pétrole, chose qui à l'époque n'était pas encore bien admise. Les géoporphyrines ainsi que d'autres biomarqueurs permirent de faire des connections pétrole-roche mère, pétrole-pétrole et roche mère-roche mère. Ces connections eurent, ces dernières décades, un impact important pour la recherche et la localisation des gisements pétrolifères.



Figure 0: Hypothèse de Treibs-Corwin (Filby et Van Berkel, 1987) liant la chlorophylle et l'hème aux pétroporphyrines 2 et 4. La nomenclature de Fischer sera utilisée pour la numérotation des atomes de carbone des macrocycles tétrapyrroliques comme indiqué sur la chlorine 1.

Par des recoupements d'informations géochimiques et géologiques, on peut prédire la probabilité d'une accumulation d'hydrocarbures dans une zone déterminée sans devoir procéder à des forages coûteux, un peu au hasard. A l'heure actuelle, un pôle d'activité de la pétrochimie est la maîtrise des étapes clés de la dégradation de la matière organique en pétrole. Depuis un peu moins d'une vingtaine d'années, l'évolution des techniques analytiques a permis de suivre un biomarqueur spécifique au travers de ses

transformations géochimiques jusqu'à son incorporation dans les huiles pétrolifères. Le but de ces efforts est "la synthèse de pétrole" à partir de roches sédimentaires, du kérogène ou des bitumes. Lorsque les paramètres physico-chimiques et bactériens seront parfaitement connus, on pourra envisager de les modifier pour en accélérer les processus.

Hors de la pétrochimie, la géochimie organique connaît un essor croissant en chimie de l'environnement. L'analyse de certains biomarqueurs présents dans les sédiments de surface ou dans la colonne d'eau peut présenter un intérêt pour la description de l'état de pollution d'un lac, sonder les causes de cette pollution et s'assurer de l'efficacité des mesures et des lois anti-pollutions. On peut citer à titre d'exemple le cas d'une étude qui, en suivant l'évolution de la concentration de biomarqueurs spécifiques d'une algue responsable de l'eutrophication d'un lac, a permis de démontrer que cette concentration est minime pour un sédiment de l'époque préindustrielle, augmente régulièrement depuis le début du siècle et régresse depuis 1974, date correspondant à l'introduction de mesures d'assainissement des eaux dans la région (Aritztegui et *al.*, 1993). Des graines traitées avec des pesticides et des herbicides ont montré que les chlorophylles et leurs produits de dégradations pouvaient subir des altérations durables. Différents groupes (Rüdiger et Benz, 1979; Schoch et Schäfer, 1978) ont montré, entre autres, la sensibilité de l'hydrogénation du géranylgéraniol en phytol pour des plantes entrées en contact avec des pesticides (DDT ou aminotriazole).

La recherche sur les origines de la vie et plus particulièrement sur la formation des premières molécules organiques est également un champ d'investigation auquel s'intéresse la géochimie organique. Dans les sédiments du précambrien, un grand nombre de composés organiques ont été isolés. Ces molécules sont celles, ou les produits de dégradation de celles, qui ont participé à l'initiation de la vie sur terre, il y a environ 4 milliards d'années (Imbus et McKirdy, 1993). La synthèse purement chimique de certains de ces composés essentiels à la vie, postulée par Urey et vérifiée par Miller (1993), à partir d'une atmosphère primitive artificielle, a montré que les acides aminés et certaines bases nucléiques pourraient avoir une origine abiotique. Par contre certains pigments,

dont les porphyrines, ne semblent pas pouvoir être synthétisés par ce biais sous les conditions réactionnelles qui régnaient à l'âge prébiotique. C'est pourquoi certains (Engel et *al.*, 1993; Chyba, 1990; Anders et *al.*, 1973) cherchent l'origine de la matière organique dans des roches extraterrestres, météorites ou poussières cosmiques qui auraient pu tomber sur la terre à un moment opportun et contribuer à initier le processus de la vie. Si des acides aminés, des alcanes branchés et linéaires, ainsi que des molécules polycycliques aromatiques ont été découverts dans certains échantillons météoriques, il semble qu'aucune porphyrine ni d'autres composés essentiels à l'initiation d'une vie autotrophe ou hétérotrophe n'aient été trouvés à ce jour. Là encore, les molécules tétrapyrroliques jouent un rôle clé entre le monde prébiotique et le début de la vie sur terre.

Avant de cerner plus précisément la recherche effectuée dans le cadre de ce travail, j'aimerais encore citer deux domaines en marge de la géochimie pour lesquels la caractérisation des chlorines et des porphyrines par spectrométrie de masse est importante, et peut justifier à part entière une étude approfondie de leur fragmentation. En médecine, les chlorines/porphyrines sont utilisées entre autres pour les thérapies photodynamiques. En résumé, ces molécules colorées ont la propriété de se fixer plus ou moins spécifiquement sur des tumeurs de la peau, lorsqu'elles sont injectées chez un patient malade. Lorsque la tumeur contenant les chlorines/porphyrines est excitée par une lumière monochromatique les pigments deviennent toxiques et sont capables de détruire des cellules malades, des bactéries ou des virus (Spikes et Bommer, 1991). Enfin, en chimie physique, l'étude de la conversion de la lumière en énergie chimique et des transferts électroniques qui y sont associés suscite un intérêt évident et implique souvent des complexes contenant plus d'un macrocycle tétrapyrrolique (Gosztola et Wasielewski, 1993). Dans ces deux derniers exemples, l'analyse par spectrométrie de masse de ce type de composés demande des méthodes de désorption et d'ionisation très douces pour caractériser les complexes tétrapyrroliques, souvent fortement polaires et de masses moléculaires supérieures à 1000 daltons (Zenobi, 1994).

L'étude menée dans ce travail porte sur l'identification des produits de dégradation des chlorophylles et des bactériochlorines présents dans le sédiment de surface et dans la colonne d'eau d'un petit lac alpestre, le Voua de la Motte. Un certain nombre de travaux effectués par notre groupe ont décrit la composition lipidique de ce lac (Mermoud, 1982; Wünsche, 1987; Mendoza, 1987). En particulier, des études de la composition stérolique sédimentaire ont permis de mettre en évidence la présence de 4méthyl-stérols, dont l'origine restait incertaine jusqu'à la découverte de leur précurseur dans une plante aquatique saisonnière par Klink et al. en 1992. Le lien entre les travaux antérieurs de notre laboratoire et la géochimie des chlorines/porphyrines s'effectue au travers des chlorine stéryl esters. Ces composés furent découverts pour la première fois à peu près conjointement par Prowse et Maxwell (1991) dans un sédiment du Miocène et par King et Repeta (1991) dans un sédiment contemporain de la mer Noire. Leur existence, insoupçonnée jusqu'alors, ne pouvait apparemment être expliquée ni comme le produit d'une biosynthèse, ni comme celui d'une simple réaction chimique entre la pyrophéophorbide-a et les stérols présents dans le sédiment. La découverte de ces composés nous a laissé penser que la dégradation des chlorophylles, outre les chemins déjà établis (Baker et Louda, 1981, Keely et al., 1990) passait par un certain nombre d'autres voies qui pourraient expliquer la présence ou l'absence de certains composés dans des sédiments plus anciens que celui de surface, voire dans des pétroles. La connaissance de ces voies est cruciale si on veut utiliser les produits de dégradation de la chlorophylle comme traceurs de pollution xénobiotique ou encore mieux comprendre l'incorporation des porphyrines et des autres matières organiques dans le kérogène.

Enfin, une partie importante de ce travail est consacrée à la caractérisation de chlorines protonées par spectrométrie de masse "Ion trap", couplée à une source électrospray (ES/ITMS), permettant l'obtention de "spectres de masse de spectres de masse" (MSⁿ). Les particularités et les aspects théoriques de la technique y sont également abordés.

PARTIE A: GEOCHIMIE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DU VOUA DE LA MOTTE.

12.1

 $\left| \mathbf{x} \right|$

I) Les pigments chlorophylliens

I.1) Matière organique et traceurs biologiques

La chlorophylle permet de fixer le CO_2 atmosphérique (ou dissous dans l'eau pour le phytoplancton) et le transforme en carbone organique. Les réactions photochimiques et enzymatiques impliquées dans ce processus sont du domaine de la biochimie (Mathis et Rutherford, 1994). Par contre, le tribut de cette synthèse intéresse particulièrement le géochimiste puisqu'elle est la source de la matière organique de la biosphère. Schématiquement, pour nos besoins, on peut réduire les produits biosynthétisés par les plantes à quelques classes présentées dans la Figure I.1.



Figure I.1: Schéma représentant les différentes classes de précurseurs biologiques susceptibles de fournir des biomarqueurs sédimentaires.

Avant de passer en revue les différentes classes de composés et de peser leur potentiel comme traceurs biologiques, j'aimerais rappeler ce qu'est un traceur biologique, souvent

appelé biomarqueur. Un biomarqueur est une molécule synthétisée par un organisme vivant qui est à la fois suffisamment altérable pour être marquée par les conditions physico-chimiques et bactériennes qu'elle a connues au cours des temps géologiques et suffisamment résistante pour permettre de remonter jusqu'à son précurseur biologique. Ces deux conditions sont fondamentales pour permettre de reconstituer les conditions paléontologiques au moment de la déposition ainsi que pour mieux comprendre comment et sous quelles conditions géologiques la "maturation" a eu lieu.

Parmi les différentes classes de composés biosynthétisés présentés dans la Figure I.1, les lipides sont certainement les molécules les plus utilisées comme biomarqueurs. On peut les subdiviser en quatre sous-classes:

i) Les glycérides sont des esters du glycérol (1,2,3-propan-triol) avec des acides gras. Les deux types de glycérides quantitativement les plus importants sont les graisses (triglycérides) servant de réserves énergétiques et les phospholipides, qui sont des diesters d'acides gras et du glycérol dont la troisième fonction hydroxyle est liée à un groupe phosphate, lui-même lié à une amine quaternaire, ce qui leur confère une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ces composés sont des constituants des parois cellulaires. Dans certaines bactéries (archébactéries), les phospholipides sont remplacés par des éthers lipidiques du type phytanol ou diphytanol-diéthers. On peut également noter que les bactéries ont des distributions d'acides gras impairs branchés souvent en iso et antéiso (Mendoza, 1987) alors que les plantes supérieures possèdent une distribution binomiale centrée en C_{16} et en C_{24} . Mis à part ces quelques spécificités, les acides gras ne sont pas d'excellents biomarqueurs; peu spécifiques et relativement vite altérés, ils n'apportent qu'une information générale sur l'environnement paléontologique.

ii) Les terpénoïdes sont une sous-classe de lipides dérivant tous de l'isoprène (2méthyl-trans-butadiène). Ils sont synthétisés à partir d'unités d'acétate-coenzyme-A et sont transformés successivement en isopentényl pyrophosphate (C_5), puis en transgéranyl pyrophosphate ($C_{10} \rightarrow$ monoterpènes), puis, pour les plus lourds, en transfarnesyl pyrophosphate ($C_{15} \rightarrow$ sesquiterpènes, dont le plus connu est certainement le

farnesol; $2x \rightarrow C_{30}$, terpénoïdes et stéroïdes via le squalène) et enfin pour les lourds en trans-géranylgéranyl pyrophosphate ($C_{20} \rightarrow$ diterpènes, par exemple le phytol, $2x \rightarrow C_{40}$ les caroténoïdes). Leur fonction est variée; les plus légers entrent dans la composition des huiles essentielles tandis que les plus lourds, comme les stéroïdes, jouent un rôle important dans les membranes cellulaires. Ils leur confèrent une rigidité en jouant le rôle de "squelette cellulaire" Ils peuvent également avoir le rôle d'hormones régulatrices et de lipoprotéines. Les isoprénoïdes du types farnesol ou phytol forment les chaînes latérales des chlorophylles et des bactériochlorophylles. Comme biomarqueurs, le farnesol (C_{15}) est plutôt un indicateur d'une activité bactérienne alors que le phytol est plutôt un indicateur de la présence de plantes supérieures et/ou de phytoplancton. Si des hydrocarbures linéaires, branchés et polyaromatiques ont été trouvés dans des météorites carbonées, ce n'est pas le cas pour les isoprénoïdes. Ils sont considérés jusqu'à présent comme exclusivement biosynthétiques.

La synthèse des stéroïdes est encore plus complexe que celles des isoprénoïdes acycliques (Wünsche, 1987). Par conséquent, les modifications structurales entre les stérols d'origines différentes deviennent marquées et il est alors possible de différencier un stérol d'une plante supérieure de ceux des micro-planctons. Certains stérols sont si spécifiques qu'ils sont le témoin de la présence d'une sorte de micro-plancton bien précise (Robinson et *al.*, 1984). Ces différences persistent au cours du temps géologique, si bien que cette sous-classe de composés lipidiques procure à la géochimie ses biomarqueurs les plus étudiés, les plus utiles et les plus facilement accessibles.

Les caroténoïdes, ou pigments auxiliaires de la chlorophylle, sont des tétraterpénoïdes. Leur fonction biologique est de protéger la chlorophylle contre l'oxydation mais également de capter de la lumière dans les endroits sombres afin de rendre possible la photosynthèse. Leur utilité comme biomarqueurs était limitée à cause des difficultés de les isoler sans modifier la structure de leur système conjugué π . Les progrès effectués dans les techniques d'analyse, d'isolement et d'extraction ont permis des études prometteuses. iii) Les cires et composés apparentés: Leur fonction biologique essentielle est de protéger l'organisme des intempéries, des oxydations, des attaques enzymatiques, des blessures et autres meurtrissures. Les cires ou "wax esters" se trouvant dans les plantes supérieures sont des esters d'acides et d'alcools gras saturés et linéaires. Quelques stérols estérifiés par des acides gras sont présents dans les graisses animales et quelques esters de tocophérols ont été trouvés dans certaines plantes aquatiques (Klink et *al.*, 1994). Les esters d'hydroxy-acides forment le polymère des cutines, ultime couche de protection

entre la plante et le milieu extérieur. La position de la fonction hydroxyle est caractéristique de l'origine de ces acides (Mendoza, 1987). Les subérines sont également un polymère de protection, contenant des α - ω di-acides et des ω -hydroxy-acides avec une distribution comprise entre C₁₆ et C₂₆ (Holloway, 1982).

iv) Les pigments tétrapyrroliques: Considérés comme lipides au sens large du terme car extractibles par des solvants organiques chlorés, ces composés, et plus particulièrement les chlorophylles (et les bactériochlorophylles) du type-a, sont les agents photosynthétiques des organismes autotrophes. Leur existence fut et reste cruciale pour le développement et la préservation de la vie sur terre. Outre le fait que la photosynthèse est le seul moyen biologique de fixer le gaz carbonique et de le transformer en matière organique, et par conséquent le passage obligé de toute biosynthèse; on doit rappeler que l'oxygène constituant l'atmosphère terrestre est un sous-produit de la photosynthèse, provenant de la dissociation des molécules d'eau lors d'une des toutes premières étapes du processus (Mathis et Rutherford, 1994). Les (bactério)chlorophylles du type-b et la plupart des autres (bactério)chlorophylles sont des pigments accessoires ne fixant pas le gaz carbonique (Scheer, 1991). Un peu au même titre que les caroténoïdes, leur but est de protéger les pigments photosynthétiques de la photo-oxidation et de capter de la lumière lorsque celle-ci est déficiente. Pour immobiliser les chlorophylles dans les parties hydrophobes des granum, une chaîne isoprénoïque est utilisée, leur conférant ainsi une bonne liposolubilité. Lorsque l'organisme photosynthétique arrive à sa sénescence, la chlorophylle est autodétruite. Les premières étapes de cette destruction sont la perte du

magnésium chelaté puis de la chaîne latérale. Ces dégradations biologiques sont décrites comme étant du type I (Brown et al., 1991) et préparent, ou plutôt activent, la chlorophylle pour l'ouverture du macrocycle par photo-oxidation. Ces dernières dégradations sont décrites comme étant du type II. Seules les molécules avant échappé à ces dégradations (<0.1-1%) ont une chance d'être incorporées dans les sédiments. Les aspects géochimiques de la dégradation de la chlorophylle seront traités dans le chapitre suivant (I.2), mais on peut déjà mieux comprendre que les produits de dégradation de la chlorophylle ne sont trouvés que comme composés très minoritaires, voire en traces, dans les sédiments et les huiles. Plusieurs types de chlorines/porphyrines¹ ont été identifiées dans des organismes vivants autotrophes et hétérotrophes (Scheer, 1991). Les produits de dégradation de ces composés gardent parfois dans leur structure les caractéristiques d'un précurseur spécifique permettant alors d'identifier l'organisme porteur du pigment photosynthétique (Callot et al., 1990). Ces connections entre biomarqueurs et précurseurs donnent des informations précieuses sur l'environnement paléontologique au moment de la déposition de la matière organique dans le sédiment. D'autres pigments tétrapyrroliques, comme l'hème (3), ont le rôle de transporter l'oxygène vers les mitochondries, véritables centrales énergétiques cellulaires. Ces

pigments tétrapyrroliques, de biomasse initiale beaucoup moins grande que celle des chlorophylles, sont très persistants. Les deux dernières classes de composés biosynthétisés par les plantes et

Les deux dernières classes de composes biosynthètises par les plantes et présentées dans ce rapide tour d'horizon de la matière organique végétale sont la lignine et les polysaccharides. Ces composés forment des polymères très rigides et entrent dans la composition des bois. Ils sont difficiles à analyser autrement que par pyrolyse. Cette méthode ne donne qu'une vague information sur les monomères composant les polymères. Les polysaccharides, par exemple la cellulose, sont formés de sucres du type glucose, arabinose, galactose, xylose, mannose, etc., tandis que les lignines sont formées de monomères apparentés à l'alcool coumarique. Bien que pas forcément dénués d'intérêt

¹ Chlorine est le terme générique pour toutes les 17,18-dihydroporphyrines.

sur le plan géochimique, ces composés restent cependant nettement moins étudiés, essentiellement à cause des difficultés d'extraction, de purification et d'analyse couplées à leur peu de stabilité vis à vis du milieu environnant.

I.2) Géochimie de la chlorophylle

Suite aux hypothèses de Treibs et Corwin reliant la chlorophylle aux étioporphyrines trouvées dans les huiles, les géochimistes se sont intéressés aux molécules dont le degré de dégradation est intermédiaire afin de lier indubitablement la chlorophylle aux pétroporphyrines.

I.2.1) Géochimie classique de la chlorophylle

La Figure I.2.1. *I* retrace les principaux intermédiaires mis en évidence au cours de ces dernières années (Callot, 1991; Keely et $al_{,}$ 1990; Filby et Van Berkel, 1987; Baker et Louda, 1981). La chlorophylle-a (1) provenant du phytoplancton ou ayant échappé à la destruction programmée lors de la sénescence des plantes supérieures (Brown et $al_{,}$ 1991) se retrouve dans la colonne d'eau d'un lac ou d'une mer, dans laquelle des réactions chimiques et enzymatiques vont avoir lieu. Les premières transformations sont la perte de Mg²⁺ pour donner le composé 5, appelé la phéophytine-a. Certains auteurs relatent la présence dans la colonne d'eau du composé 6, le chlorophyllide-a (Barwise et Roberts, 1984). En général, on admet que la perte du phytyl à partir de la chlorophylle-a (1) pour donner le chlorophyllide-a (6) est une réaction due aux enzymes de dégradation de la chlorophylle du type chlorophyllase qui s'activent à la sénescence des plantes (Brown et $al_{,}$, 1991). Par contre, la perte du magnésium chélaté pour donner la phéophytine-a (5) peut aussi bien être catalysée par ces mêmes enzymes que par des prédateurs tel que le zooplancton. La dégradation de 5, la phéophytine-a, en 8, le phéophorbide-a,



Figure L2.1. *I* : Dégradations enzymatiques ou chimiques dans la colonne d'eau et diagenése de la chlorophylle-*a* en milieu anoxique.

se fait au travers de prédations diverses (zooplancton etc.). Il est également relaté que la prédation de la chlorophylle-a par le zooplancton peut donner directement le phéophorbide-a (8) (Keely et al., 1990). La perte du méthyl carboxylate en C-13² de la phéophytine-a (5) pour donner la pyrophéophytine-a (7) semble passer par une dégradation enzymatique ayant lieu dans des organismes photosynthétiques plongés trop longtemps dans l'obscurité. La même dégradation est observée sur la chlorophylle-a pour donner la pyrochlorophylle-a. Quoiqu'il en soit, il semble que le groupe méthyl carboxylate soit enlevé d'un bloc, sans passer par une hydrolyse préliminaire comme Treibs le décrivait (Keely et al., 1990). Le même type d'attaque enzymatique transforme le phéophorbide-a (8) en son homologue "pyro" (9).

Les réactions transformant le pyrophéophorbide-a (9) en 10 puis ultérieurement en 2, voire plus loin en étioporphyrines (4) (cf. Figure I.2.1. 1) sont une succession d'étapes dégradatives appartenant à la diagenèse proprement dite de la chlorophylle dans un sédiment anoxique. Ces étapes sont divisées un peu arbitrairement en: diagenèse précoce, diagenèse moyenne, diagenèse tardive, catagenèse et métagenèse. Bien que ces termes cloisonnent de manière un peu trop stricte les phénomènes naturels, ils permettent de classer les différentes réactions de la diagenèse.

Les transformations ayant lieu durant **la diagenèse précoce** sont la réduction du vinyl en C-3 dans le pyrophéophorbide-a (9), pour donner son analogue méthylé, communément appelé mésopyrophéophorbide-a (11). Cette réaction semble avoir lieu très rapidement dans une région frontière entre la colonne d'eau et le sédiment. La seconde transformation est la réduction de la cétone en C-13¹. Comme le sédiment de la région, dans lequel un désoxomésopyrophéophorbide-a (12) a été isolé, est encore très immature et que l'agitation thermique n'est pas assez importante pour expliquer ces réactions, il a été suggéré que ces transformations sont le résultat d'une ingestion par des herbivores (Hendry et al_{+} , 1987).

Les réactions de **la diagenèse moyenne** sont l'aromatisation du désoxomésopyrophéophorbide-*a* (12) qui devient alors la porphyrine 13, ainsi que la

décarboxylation de la chaîne propionate en C-17 pour donner le DPEP (2). Les molécules 12 et 13 ont été découvertes conjointement dans le même sédiment par Keely et *al.* (1990). La présence relativement durable de la fonction acide peut avoir des conséquences sur l'incorporation des macrocycles tétrapyrroliques dans le kérogène (Tissot et Welte, 1984; Behar et Vanderbroucke, 1987).



Figure I.2.1. 2: Structures des composés cités dans le texte.

Les mécanismes d'aromatisation sont encore mal connus, mais on est sûr que, contrairement aux dégradations relatées précédemment, la température joue un rôle important. Baker et Louda (1981) ont montré que les rapports chlorines /porphyrines varient en fonction de la profondeur du sédiment dans lequel l'échantillon est prélevé. L'aromatisation commence à des températures de l'ordre de 20-30°C pour s'achever vers 50-60°C, qui marque le début de la fenêtre correspondant à la formation des pétroles. On possède moins d'information sur la décarboxylation qui doit néanmoins se faire sous l'effet de la température et de la pression.

Au cours de la diagenèse tardive, les porphyrines du type DPEP ou "étio" sont chélatées par un métal. Bien que plusieurs métaux ont été reportés, les plus importants et les plus étudiées sont certainement les Ni(porphyrines) et les VO(porphyrines). Les mécanismes de la chélation sont encore relativement mal connus. La température joue un rôle important, la métallation ne commencant que vers 50-60°C. L'environnement géologique définissant le pH et le potentiel Ox-Red, de même que les argiles, la qualité du kérogène et la matrice minérale semblent aussi avoir une importance. De plus, pour Baker et Louda (1981), le chemin de chélation pourrait être différent pour les porphyrines liées au kérogène et celles qui sont libres (c.-à-d. extractibles avec des solvants organiques). Une meilleure connaissance de ces mécanismes et des paramètres qui les l'influencent devrait permettre d'expliquer la métallation spécifique des étioporphyrines des pétroles par l'oxyde de vanadyl et la préférence marquée des DPEP des sédiments peu matures pour le. nickel Le rapport Ni(porphyrines)/Ni+VO(porphyrines) est utilisé comme indicateur des conditions redox au moment de la déposition. Si ce rapport est petit, on dira que les conditions sont réductrices; si ce rapport s'approche de 1, la déposition s'est faite dans un milieu nettement moins réducteur, voir sub-oxique (Filby et Van Berkel, 1987).

La catagenèse est marquée par l'altération des substituants des porphyrines sans que leur macrocycle ne soit détruit. Suite à l'hypothèse de Corwin sur la transformation des DPEP en étioporphyrines, des études en laboratoire ont montré que sous l'effet de la température, seulement environ 5% de DPEP pouvait être converti en étioporphyrines. Ce résultat ne peut expliquer les grandes quantités d'étioporphyrines présentes dans les huiles. Barwise et Roberts (1984) proposèrent alors pour expliquer les observations, un certain nombre de mécanismes annexes. Parmi ceux-ci, on retiendra i) un clivage oxydatif de l'isocycle durant la diagenèse précoce, ii) une génération préférentielle d'étioporphyrines à partir du kérogène au cours de la catagenèse. Le rapport DPEP/ étioporphyrines¹ est un indicateur de maturité thermique du sédiment (PMP). Lorsqu'il s'approche de 1, le sédiment est considéré comme "mature". Néanmoins, l'altération thermique ne s'arrête pas à l'ouverture de l'isocycle des DPEP mais s'attaque également aux substituants alkyles du macrocycle pour former des étioporphyrines de bas poids moléculaires (LMWE) dont les groupes éthyles et méthyles sont partiellement arrachés

 $^{^1}$ Ce rapport est basé plus précisement sur les étioporphyrines avec 28 atomes de carbones (C₂₈E) et les DPEP avec 32 atomes de carbones (C₃₂D), tel que PMP= C₂₈E/C₂₈E+C₃₂D.

du macrocycle par effet thermique. Sundararaman et Moldavan (1993) ont montré l'utilité de les prendre en considération pour définir un nouveau paramètre de maturité PMP-2, défini comme étant le rapport LMWE/LMWE+ $C_{28}E$. Ce nouveau paramètre permet de continuer à prospecter les zones pour lesquelles l'ancien paramètre de maturité PMP avait déjà atteint sa valeur maximale, c'est-à-dire 1.

La métagenèse est la dernière phase de dégradation des chlorines/porphyrines. L'effet thermique au cours de cette phase devient très grand. La perte des substituants alkyles continue puis le macrocycle lui-même est détruit, son carbone étant transformé en méthane lorsque les conditions sont suffisamment anoxiques. La température pour la destruction totale des pigments est de l'ordre de 350-400°C pour des expériences "in vitro", mais elle est peut être influencée assez fortement par les conditions physicochimiques et géologiques (Baker et Louda, 1981).

I.2.2) Géochimie moins classique des chlorines

Outre les chlorines et porphyrines intégrées dans les chemins de dégradation classiques de la chlorophylle-*a* dans un sédiment anoxique (Figure I.2.1. *I*), un certain nombre de



Figure I.2.2. 1: Réarrangement permettant de lier spécifiquement la pétroporphyrine 16 à la chlorophylle-c (d'après Ocampo et al., 1992).

géoporphyrines ont pu être reliées soit à des précurseurs spécifiques, soit sont synonymes de conditions physico-chimiques particulières ou encore d'une activité bactérienne plus ou moins développée.

La Figure I.2.2 *1* présente la conversion de la chlorophylle-*c* (14) en porphyrine 16, isolée dans une argile de Messel (Ocampo et *al.*, 1992). L'intermédiaire 15 expliquant cette transformation a été obtenu en laboratoire dans un mélange d'acide chlorhydrique et de méthanol. Le réarrangement de l'exocycle en C-13, C-15 vers les positions C-15, C-17 est rendu possible par la présence en C-17 d'un acide propionique α - β insaturé. Ce réarrangement intramoléculaire est entropiquement favorisé car il en résulte la formation d'un cycle à cinq maillons; il est caractéristique des chlorines possédant en C-17 une chaîne propionique α - β insaturée. Or le seul précurseur découvert à l'heure actuelle possédant une telle fonction est la chlorophylle-*c*.

Pour expliquer la présence dans des sédiments peu matures de métalloporphyrines apparentées au type "étio" (composé **18** de la Figure I.2.2. 2) et de poids moléculaire $\leq C_{30}$, on a du imaginer que l'ouverture de l'exocycle du phéophorbide-*a* pouvait avoir lieu avant ou lors de sa déposition dans des conditions oxiques.



Figure I.2.2. 2: Dégradation de la chlorophylle-a à partir du phéophorbide-a dans un sédiment oxique.

La Figure I.2.2. 2 montre le mécanisme proposé: L'isocycle du phéophorbide-a (8) est clivé par oxydation de la liaison C-13¹ et C-13² pour donner le composé 17, puis suit une décarboxylation et une métallation pour donner des métallo-porphyrines (18) d'apparences plus matures qu'elles ne le sont réellement (Killops et Killops, 1993). Des clivages oxydatifs similiaires pourraient expliquer les fortes proportions d'étioporphyrines trouvées dans certaines huiles (Barwise et Roberts, 1984).

Parmi les contributions mineures, encore mal comprises mais certainement informatives, les produits de dégradation des bactériochlorophylles, et plus spécialement celles du type c, d, et e (19-21) possédant des extensions alkylées sur les carbones C-8 et



Figure I.2.2. 3: Structures des bactériochlorophylles du type -c, d et e.

C-12 ainsi que sur le carbone C-20 pour celles du type c et e, sont à même de conserver ces particularités au moins jusqu'au début de la catagenèse. Dans un premier temps, on a pensé que ces composés pouvaient être à l'origine des benzo-porphyrines (22) et des



Figure I.2.2. 4: Chlorines et porphyrines de précurseur biologique inconnu ou incertain.

Les arguments contre cette théorie viennent du fait qu'aucune benzo-porphyrine et analogue tétrahydro possédant un éthyle en C-12 ou un méthyle en C-20 n'a été isolée à ce jour. De plus, on aurait du trouver des méthyl benzo-porphyrines provenant des bactériochlorines possédant une chaîne iso-butyl en C-8. Une autre voie proposée initialement par Baker et reprise par Lash (1993) est la formation du cycle benzénique

tétrahydrobenzo-porphyrines (23) isolées, entres autres, d'un sédiment relativement peu

par réaction de Diels-Alder sur des composés C-8 vinyl tels que la divinyl chlorophylle- a^1 ainsi que la chlorophylle- c_2 (Bidigare et al., 1990) en présence d'une des doubles liaisons d'un composé du type quinonique provenant de l'environnement. Filby et Van Berkel (1987) pencheraient plutôt pour une interaction entre les porphyrines liées au kérogène qui au moment du "cracking" formeraient des espèces avec plus 32 atomes de carbone. Le problème est qu'on trouve des benzoporphyrines dans les sédiments très peu matures. D'autres composés comme les di-DPEP (24) et les porphyrines avec un exocycle à 7 membres (25) posent problème quant à leur origine. Enfin l'estérification des pyrophéophorbide-a stéryl esters (26) est encore assez mystérieuse. Ce sont ces deux derniers aspects de la chimie des chlorines/porphyrines que nous allons développer.

²⁷

¹ intermédiaire biosynthétique de la chlorophylle-a
II) Les chlorine stéryl esters

Comme nous l'avons dit dans la partie précédente, les pyrophéophorbide-a stéryl esters ont été découverts à peu près conjointement par Prowse et Maxwell (1991) ainsi que par King et Repeta (1991) respectivement dans une argile brésilienne datant du miocène et dans un sédiment de surface de la mer Noire. L'intérêt que suscitent ces composés provient, dans un premier temps, du fait qu'ils ne semblent pas résulter d'une biosynthèse. Personne n'a isolé des chlorophylle stéryl esters dans des organismes photosynthétiques. De plus, biologiquement on s'explique mal "l'alliance" du chlorophyllide et d'un stérol. La biosynthèse des stérols est trop complexe pour qu'un organisme puisse se permettre d'utiliser ces stérols comme "simples chaînes latérales" d'un pigment. D'autre part, si l'on considère que l'estérification du pyrophéophorbide-a avec les stérols présents dans le sédiment est une simple réaction chimique¹, alors la distribution des stérols liés aux chlorines doit refléter la distribution des stérols libres du dit sédiment, ce qui n'est pas le cas pour les observations faites jusqu'à présent. En comparant la distribution des stérols libres du sédiment de surface et de la colonne d'eau (trappe à sédiment), on montre que l'estérification ne peut avoir lieu que dans la colonne d'eau. Sous réserve de certaines hypothèses, les chlorine stéryl esters peuvent être considérées comme des sondes conservant en mémoire la distribution stérolique du lieu de leur formation. Ces informations peuvent être utilisées, soit pour reconstruire l'environnement biologique de la colonne d'eau au moment de la formation de ces composés, -les stérols sont des biomarqueurs suffisamment typiques pour pouvoir différencier des apports zoo/phytoplanctoniques, des microplanctons (exemple: les diatomés) ou des plantes supérieures, soit pour obtenir une information sur la façon de sédimenter de certains biomarqueurs, pouvant parfois expliquer leur conservation préférentielle. Bien que tous les aspects soient loin d'être compris, les chlorine stéryl esters sont une classe de

¹ en négligeant tout éventuel effet cinétique du aux différences structurales des stérols sédimentaires.

biomarqueurs à part, puisque chaque molécule est formée par l'association de deux biomarqueurs très utiles et distincts, à savoir: d'un produit de dégradation de la chlorophylle (chlorine) et d'un stérol.

II.1) Echantillons et analyses des chlorines

Le Voua de la Motte est un petit lac eutrophique se trouvant près de Thonon en France. Les aspects géologiques et géographiques ont déjà été décrits dans plusieurs thèses (Serra-Bertral, 1976; Wünsche, 1987; Klink, 1994), aussi ne m'y attarderais-je pas.

II.1.1) Les échantillons

Le sédiment de surface a été prélevé sous une colonne d'eau de 9 mètres dans la zone anoxique du lac avec une pelle mécanique du type Ekman et a été rapidement congelé à -28°C. La matière organique de la colonne d'eau est récoltée dans une trappe à sédiment placée pendant une année (printemps 91-printemps 92) à la limite supérieure de la zone anoxique, vers 8 mètres. Immédiatement avant l'extraction, le sédiment est décongelé dans l'obscurité. Entre chaque manipulation, on prendra soin d'évaporer le solvant à sec sous un flux d'azote, d'exposer un minimum les échantillons à la lumière et de les conserver à -28°C dans l'obscurité.

II.1.2) L'extraction

L'extraction du sédiment de surface a été effectuée suivant la méthode décrite par King et Repeta (1991). Environ 500 g de sédiment de surface est extrait par ultrasons (5 min.) avec 4 portions de 250 ml d'acétone suivi de 3 portions de 250 ml de chlorure de méthylène. Les extraits combinés sont concentrés à 200 ml et un même volume d'un mélange 30/70 hexane/diéthyléther est ajouté. L'extrait organique est séché sur Na₂SO₄ et évaporé à sec sous un flux d'azote. Environ 100 mg d'un produit brun foncé sont obtenus. L'extraction de la trappe à sédiment est effectuée de manière similaire après la lyophilisation d'un demi-litre d'échantillon.

II.1.3) L'isolement

La séparation primaire des différentes classes de composés est effectuée par TLC¹ préparative en phase normale (Merck, Kieselgel 60). La plaque est lavée à l'acétone et activée 2 h à 120°C. L'extrait total, en solution dans l'acétone, est alors déposé sur la plaque puis est évaporé avant de faire migrer les composés dans un mélange 25/75 acétone/hexane. Un standard (Sigma) de pyrophéophorbide-a (9) estérifié à un méthyle (ppme) migre en parallèle comme référence. Ce standard permet également de mieux cerner la polarité des chlorines contenues dans la bande X. En définissant le rapport Ippme = Rf(bande X)/Rf(ppme), on obtient une indication précieuse sur la polarité des chlorines contenues dans la bande X. En effet, si $I_{ppme} > 1$ alors les chlorines contenues dans la bande X sont moins polaires que la ppme. Par conséquent on peut s'attendre à y trouver des pyrophéophorbide possédant des chaînes latérales plus grandes qu'un méthyle. Quatre bandes vertes avec des $R_f \ge 0.2$ et dont les I_{ppme} sont égaux à 1.7; 1.5; 1.2; 0.7, sont récupérées, filtrées, séchées sur Na2SO4, puis sous un flux d'azote pour donner la fraction des chlorines non-polaires (12 mg) sur la laquelle nous allons travailler. Chaque bande verte et son combinat sont analysées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative en phase inverse (RP-18 lichrosolv, 250mm x 10mm i.d.). Le détecteur UV est réglé à 366 nm, proche du λ_{max} du Soret, bande d'absorption très intense et caractéristique des chlorines/porphyrines. Le combinat des bandes vertes isolées de la TLC est injecté dans le HPLC et élué avec un mélange 20/80 n-propanol/méthanol au débit de 3ml/min. Ce chromatogramme (Figure II.1. 3. 1) montre les pics identifiés par les lettres B et C qui d'après leur temps de rétention sont suspectés d'être respectivement la phéophytine-a et la pyrophéophytine-a. Le pic A contient une substance inconnue, tandis que les pyrophéophorbide-a stéryl esters, dont la masse moléculaire est plus grande et la polarité moindre, ne sortent de la colonne qu'après des temps de rétention plus grand que 90 minutes, les pics étant très larges et quasiment confondus avec la ligne de base. Afin de travailler dans de meilleures

¹ Un dictionnaire des abbréviations est donné dans l'annexe I.

conditions les deux bandes vertes migrant le plus haut sur la plaque TLC ($I_{ppme} = 1.7$ et 1.5) sont combinées et analysées en utilisant un mélange d'éluant 50/50 méthanol/acétone au débit de 3 ml/min. Cette fois, le chromatogramme obtenu (Figure II.1.3. 2) permet d'observer nettement la fraction des pyrophéophorbide-*a* stéryl esters. Aux temps de rétention plus petits, on retrouve la phéophytine-*a* et la pyrophéophytine-*a*.



Figure II.3.1. *1*: Chromatogramme HPLC des bandes vertes combinées de l'extrait sédiment de surface purifié sur TLC (20/80 n-propanol/méthanol, 3ml/min., 366 nm),

Ces dernières conditions sont adoptées pour isoler ces composés, tandis que les premières conditions HPLC citées (20/80 n-propanol/méthanol) sont conservées pour isoler les constituants des deux bandes vertes migrant moins rapidement sur la TLC (voir partie A III et partie B). Les pics B, C et la fraction contenant les chlorine stéryl esters sont séparés, séchés et conservés suivant cette procédure pour isoler environ 0.4 mg de

phéophytine-a, 0.3 mg de pyrophéophytine-a et moins de 0.2 mg de pyrophéophorbide-a stéryl esters. La séparation de la matière organique de la colonne d'eau prise dans la trappe à sédiment, a directement été faite par HPLC (50/50 acétone/méthanol, 3ml/min., 366nm). On y trouve la phéophytine-a et la pyrophéophytine-a, sans que les pyrophéophorbide-a stéryl esters ne puissent être à coup sûr identifiés (traces peut-être?). L'absence apparente de ces composés dans la colonne d'eau sera discutée plus tard sous l'aspect géochimique. La fraction totale est conservée pour l'analyse des stérols présents dans la colonne d'eau.



Figure IL1.3. 2: Chromatogramme HPLC des fractions I_{ppme} =1.7 et 1.5 sous les conditions 50/50 méthanol/acétone, 3ml/min., 366 nm.

II.1.4) Spectrophotométrie (UV/Visible)

Les chlorines et porphyrines possèdent des spectres UV/Visible extrêmement riches entre 300 et 700 nm. La théorie des quatre orbitales (HOMO-1, HOMO, LUMO, LUMO+1) permet qualitativement de comprendre le déplacement du Soret vers l'UV et de la bande d'absorption de plus basse énergie vers le rouge, lorsqu'on passe des porphyrines aux dihydroporphyrines (chlorines) jusqu'aux tétrahydroporphyrines (bactériochlorines). Ces déplacements sont liés à la rupture de symétrie du système π par les hydrogénations partielles de certains cycles pyrroliques (Hoff et Amesz, 1991). Un certain nombre de spectres typiques sont présentés dans les annexes. Les spectres UV/Visible sont enregistrés entre 300 et 800 nm dans l'acétone à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer lambda 5 (balayage 120 nm/min, bande passante 2 nm, chemin parcouru par le rayon lumineux dans la cellule: 1 cm). Par la suite l'aquisition par notre laboratoire d'un système HPLC couplé à un détecteur à barrettes de diode (Merck-Hitachi L-4500) permit de n'isoler que les fractions dont les spectres UV/Visible étaient susceptibles de nous intéresser.

Les spectres UV/Visible des 3 fractions isolées montrent des bandes d'absorption très similaires à un standard de pyrophéophorbide-*a* méthyl ester: λ_{max} [nm] 665, 605, 532, 503, 407 (407/663 = 2.33). Le spectre de ce standard comparé à ceux des chlorines des fractions soupçonnées de contenir la pyrophéophytine-*a* et les stéryl esters sont quasiment superposables { λ_{max} [nm] 665, 605, 532, 503, 407 (407/663 = 2.36)}, attestant bien que le seul chromophore présent est le pyrophéophorbide-*a*. La phéophytine-*a*, ne différant que par un carboxylate de méthyle en C-13², possède un spectre très similaire sans être identique: λ_{max} [nm] 667, 610, 536, 505, 409.

II.1.5) Spectrométrie de masse (D/EI-MS)

Les chlorines sont des composés sensibles à la chaleur et souvent, de par leur poids moléculaire et leur polarité, elles sont très peu volatiles. C'est pourquoi, souvent les spectres de masse obtenus à partir d'échantillons introduits dans la source à l'aide d'une sonde d'introduction directe classique "à creuset", ne présentent essentiellement que des fragments de décomposition thermique. Vers la fin des années '70, plusieurs groupes (Cotter, 1980) ont développé des nouvelles sondes dites "étendues" pénétrant à l'intérieur de la source et où l'échantillon n'est plus contenu dans un creuset mais est directement déposé sur un filament porte-échantillon chauffé par effet Joule. L'avantage de cette technique est de diminuer le chemin que la molécule doit parcourir jusqu'à l'endroit où elle est ionisée d'une part et d'autre part cette technique permet d'augmenter considérablement les vitesses de chauffage. Or, des études faites dans ce domaine, passées rapidement en revue dans mon travail de diplôme (Chillier, 1992), ont montré que le pourcentage des molécules désorbées intactes par rapport à celles décomposées durant la désorption est proportionnel à la vitesse de chauffe de la sonde.

King et Repeta (1991) utilisent une telle sonde en conjonction avec l'ionisation chimique (D/CI) dans leurs travaux sur les chlorine stéryl esters. Par la littérature, on sait que cette technique fut largement utilisée pour trouver la structure isomérique des porphyrines sédimentaires (Tolf et al., 1986). Lorsque l'ionisation est effectuée avec des gaz tels que le méthane, l'isobutane et surtout l'ammoniac, la porphyrine ou la chlorine est transformée en un ion porphyrinogène (M+4H)⁺ qui va se fragmenter en unités pyrroliques, di- ou tri- pyrroliques permettant de séquencer la structure du macrocycle. D'études préliminaires (Chillier, 1992), nous savons que pour les chlorines, cette technique fonctionne moins bien que pour les porphyrines sédimentaires matures, essentiellement à cause des fonctions carboxyliques qui provoquent des fragmentations occultant passablement la lecture du spectre. La désorption en mode d'impact électronique (D/EI) ne donne, contrairement à la D/CI, aucun fragment utile au séquençage du macrocycle et par conséquent est moins informative sur les isomères possibles des macrocycles tétrapyrroliques. Les seuls fragments observés proviennent de la fragmentation des substituants périphériques du macrocycle. La Figure II.1.5. 1(a) montre le spectre D/EI d'un échantillon (standard commercial) de pyrophéophorbide-a méthyl ester. Le pic moléculaire est le pic de base à m/z 548; quelques fragments apparaissent a = m/z533 [M-CH₁]. 461 [M-CH₂CH₂COOCH₃], 447

[M-(CH₂CH₂COOCH₃+CH₃)], 433 [m/z 461-C₂H₄]; ce dernier probablement dû à la perte du substituant éthyle en C-8 du macrocycle. Dans la région des petites masses quelques ions doublement chargés sont observables à m/z 274 [M⁺⁺], 237 [M-CH₂C(OH)OCH₃]⁺⁺ (réarrangement de McLafferty inverse). L'absence de fragments significatifs dans les basses masses provient du caractère aromatique du macrocycle, très stable sous ces conditions de ionisations.

Le spectre de masse de la pyrophéophytine-*a* [Figure II.1.5. I(b)] montre le pic moléculaire à m/z 812. Le fragment à m/z 534 est produit par la perte de la partie phytyle avec migration d'un atome d'hydrogène pour donner un fragment correspondant formellement à la pyrophéophorbide-*a*. Mis à part quelques légères différences dans leurs abondances relatives, les fragments de la région 400-534 sont les mêmes que pour l'échantillon standard précédemment analysé. Par contre, la région des basses masses contient les fragments d'un hydrocarbure identifiable comme étant le néophytadiène, par comparaison avec le spectre donné par Enzell et *al.*(1984). Cet ion peut être produit, soit par un mécanisme analogue à celui donnant naissance à m/z 534 mais avec une rétention de charge sur l'oléfine, soit par une décomposition thermique de la pyrophéophytine-a durant la désorption. L'évolution des abondances relatives des ions dans le spectre de masse enregistré à différents endroits de la courbe de désorption suggèrent que les deux procédés interviennent.

Le spectre de masse de la phéophytine-*a* [Figure II.1.5. I(c)] montre l'influence du groupe carboxylate de méthyle en C-13² sur la fragmentation. L'ion moléculaire est déplacé de 58 u, à m/z 870. Les ions à m/z 838 (M-CH₃OH) et 812 [M-(CO+CH₂O)] proviennent de la fragmentation de ce substituant supplémentaire. Par ailleurs, la perte du phytadiène à partir de l'ion moléculaire donne le fragment m/z 592, formellement le phéophorbide-*a*. L'ion à m/z 534 semble provenir de la perte du phytadiène depuis m/z812. Quant à m/z 533, il provient de la perte du groupe carboxylate de méthyl (-59 u) en C-13² à partir de m/z 592. m/z 532 et 531 proviennent respectivement de la perte d'une molécule de formiate de méthyle (-60 u) ou de son analogue protoné (-61 u) à partir de m/z 592. La combinaison de ces mécanismes explique l'allure du spectre de masse obtenu entre m/z 400-520, sur lequel on peut observer plusieurs pics d'intensités comparables et distants d'une ou deux unités de masse (par exemple: m/z 459-461). Des analyses effectuées sur ces composés, il ressort que la désorption en impact électronique est une méthode de choix pour l'analyse des chlorines possédant des chaînes latérales hydrocarbonées, car elle permet non seulement de caractériser le macrocycle dans ses grandes lignes mais elle produit également des sous-spectres des alcènes, formés par réarrangement de McLafferty inverse, qui sont très similaires aux spectres EI des alcènes libres. A notre connaissance, cette technique de désorption de l'échantillon est la méthode permettant de fournir le plus d'information pour la caractérisation des chlorine stéryl esters.

La fraction, jusqu'alors supposée contenir des pyrophéophorbide-*a* stéryl esters est dissoute dans 50 µl d'acétone. 1 µl de cette solution est déposé sur le filament porteéchantillon (platine, $\emptyset = 0.127$ mm). Le programme de chauffe de la sonde est soigneusement ajusté, on précisera que la vitesse de chauffe du filament est le paramètre le plus important de cette technique pour l'obtention de spectres de bonne qualité. On a opté, après divers essais: 0.5 min. sans chauffage, 10000 mA/min. jusqu'à 1200 mA/min., puis le courant est maintenu 0.7 min., à cette valeur. La vitesse de balayage totale (total scan rate) est d'une seconde par balayage de 50 à 1000 daltons. La source EI opère à 70 eV (nominal, 200 µA trappé) et à la température de 220°C. Ces conditions sont suffisamment souples pour ne pas avoir besoin de les modifier pour la plupart des chlorines analysées dans la partie A de ce travail.

La Figure II.1.5. 2(a) présente le spectre de masse de la fraction des pyrophéophorbide-a stéryl esters. Les ions moléculaires à m/z 930, 928, 916, et 902 indiquent la présence de plusieurs composés. Cependant, les fragments dans la région m/z 400-600 sont caractéristiques d'un seul type de macrocycle indiquant que tous les composés du mélange possèdent le même macrocycle, c'est-à-dire le pyrophéophorbidea, ce qui confirme le résultat obtenu par spectrophotométrie UV/Visible. En soustayant,



Figure II.1.5. 1: Spectres de masse (D/EI, 70eV, source: 220°C) (a) pyrophéophorbide-a méthyl ester (b) pyrophéophytine-a et (c) phéophytine-a.





Figure II.1.5. 2: Spectres de masse (D/EI, 70 eV, 220°C) (a) du mélange de chlorine stéryl esters (b) de la pyrophéophorbide-*a* stigmastéryl ester.

du poids moléculaire celui du macrocycle, on peut déduire le poids moléculaire des alcools estérifiés: MW= 412, 410, 400, 386. Dans la région 50-400 daltons, on observe les ions m/z 396, 394, 382 et 368 correspondant aux oléfines formées à partir des alcools mentionnés plus hauts par le mécanisme de McLafferty inverse. De plus, un ion à m/z 380 suggère la présence en petite proportion d'un alcool de poids moléculaire MW= 398 et dont l'ion moléculaire à m/z 914 n'est pas visible. Le caractère stéroïdal de ces oléfines peut être déduit des ions m/z 255 (noyau stéroïdique) et m/z 213 (noyau stéroïdique moins le cycle D). En conclusion, les pyrophéophorbide-a stéryl esters comprennent un mélange de stérols C_{29:1}, C_{29:2}, C_{28:1}, C_{28:2}, C_{27:1}. Tous ces stérols possèdent une double liaison dans le squelette cyclique, et pour certains une seconde sur la chaîne latérale. L'absence d'un fragment à m/z 257 exclut la présence de stanols comme alcools estérifiés.

II.1.6) Synthèses de composés standards

Afin de prouver le comportement des pyrophéophorbide-a stéryl esters en D/EI-MS sur lequel se base nos identifications, nous avons préparé des échantillons standards de pyrophéophorbide-a stigmastéryl et cholestéryl ester. Le pyrophéophorbide-a est obtenu par hydrolyse d'un standard commercial de pyrophéophorbide-a méthyl ester. 2 mg de ce standard sont dissous dans 100 μ l de THF et ajouté à 2 ml d'un mélange KOH_{sat}/méthanol, porté à reflux 1/2 h. Après avoir ajouté du dichlorométhane (10 ml) pour obtenir 2 phases, la phase organique est séparée et lavée avec 3 portions (10 ml) d'acide acétique 5%, suivies de 5 portions (10 ml) d'eau distillée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec sous un flux d'azote. L'estérification du pyrophéophorbide-a avec le stigmastérol (ou le cholestérol) est une adaptation de l'estérification de Hassner et al. (1978): Environ 1 mg de pyrophéophorbide-a (9) est dissous dans 2 ml de THF anhydre avec environ 2 équivalents de stérol, 1 équivalent de dicarbocyclohexyldiimide (DCC) et 0.12 équivalent de 4-pyrrolidinopyridine (4-PP). La solution est chauffée à reflux pendant 6 h. sous atmosphère inerte (N₂). Après

Une fois que la phase organique est séparée, comme précédemment, elle est lavée avec 3 portions (10 ml) d'acide acétique 5% afin d'éliminer les résidus de DCC et de 4-PP, puis avec 5 portions d'eau distillée (10 ml), avant d'être séchée et évaporée à sec sous un flux d'azote. Le pyrophéophorbide-a stigmastéryl ester est purifié par HPLC (50/50 acétone/méthanol, 3 ml/min., 366 nm), avant d'être déposé sur la sonde de désorption. Le spectre de masse est enregistré dans les mêmes conditions que pour le mélange d'origine naturel. Ce spectre [Figure II.1.5. 2(b)] montre une fragmentation tout à fait semblable à celle obtenue précédemment et atteste le bien fondé de notre interprétation. Comme attendu, l'échantillon standard de pyrophéophorbide-a cholestéryl ester donne également des résultats semblables à ceux obtenus avec le produit naturel.

II.2) Analyse des distributions stéroliques

Pour identifier individuellement les stérols liés au pyrophéophorbide-*a*, les chlorine stéryl esters ont été hydrolysées et leur partie stérolique analysée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Parallèlement, les distributions des stérols libres du sédiment de surface et de la colonne d'eau sont également étudiées.

II.2.1) Hydrolyse des chlorine stéryl esters et dérivatisation

Comme nous nous attendons à ce que la labilité des esters stéroliques soit moindre que celle des esters méthyliques, le temps de réaction est augmenté à 6 h. de reflux. L'extraction et la récupération des stérols se fait comme la récupération du pyrophéophorbide-*a*, vue précédemment. Brièvement, du dichlorométhane est ajouté, les stérols migrent vers la phase organique qui est extraite, traitée avec de l'acide acétique 5%, de l'eau distillée, séchée sur Na₂SO₄ anhydre et évaporée à sec sous N₂. Avant dêtre injectés dans le GC/MS, les stérols sont transformés en triméthylsilyl éthers. Pour cela, on utilise le N,O-bis- triméthylsilyl trifluoroacétamide (BSTFA, Fluka). Dans un tube capillaire, 10 µl de BSTFA sont ajoutés à 10 µl d'une solution de stérols dans du dichlorométhane sec ($\approx 1 \mu g/\mu L$). Le tube est scellé et chauffé à 80°C, pendant 20 minutes.

II.2.2) Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La séparation est faite sur une colonne capillaire Altech SE-54 en siliçe fondue (initialement 30m x 0.32mm, épaisseur de la phase 0.25μ m, pré-colonne 50 cm), avec l'hélium comme gaz vecteur, à la pression de 50 kPa. Les stérols dérivatisés sont injectés "on column" à 40°C et le programme de température utilisé est le suivant: 10°C/min. jusqu'à 200°C puis 3°C/min. jusqu'à 280°C; enfin 30 minutes à 280°C. La colonne GC pénètre dans l'entrée de la source au travers d'une ligne de transfert chauffée à 300°C. Les conditions typiques du spectromètre de masse sont EI (70 eV nominal, courant trappé 200 μ A), source 220°C et un balayage de masse entre 50-650 daltons à la vitesse de l balayage par seconde.

La distribution des stérols liés aux chlorines [Figure II.2.2. 1(a)] montre de grandes quantités de cholestérol (C27), de stigmastérol, de β-sitostérol (C29) ainsi que des stérols C28, le brassicastérol et le campestérol. L'origine de ces stérols est connue; le cholestérol provient essentiellement du phyto/zooplancton, les C29 de l'apport allochtone des plantes supérieures, tandis que les C28 sont considérés comme des indicateurs de la présence de micro-organismes photosynthétiques, les diatomées. Les stérols libres du sédiment de surface [Figure II.2.2. 1(b)] montrent une distribution très différente. Ces différences peuvent être résumée ainsi: (i) le cholestérol, stérol majeur de la fraction des chlorine stéryl esters est très peu abondant dans le sédiment de surface. (ii) La plupart des stérols de la fraction des chlorine stéryl esters sont également présents dans le sédiment de surface tout en étant associés à leur stanol correspondant. Le rapport stérol/stanol associé est proche de 1 dans le sédiment de surface (stérols libres) alors que dans la fraction des stérols liés aux chlorines les stanols sont absents, (iii) On notera la présence dans le sédiment de surface de deux 4a-méthyl stérols, le dinostérol et le citrostanol¹. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Mermoud (1982). Le dinostérol est généralement considéré comme un indicateur des dinoflagéllés tandis que le citrostanol est un indicateur d'une plante carnivore, Utricularia Neglecta (Klink et al., 1992).

¹ La structure des différents stérols discutés dans cette partie est présentée dans l'annexe II.



Figure II.2.2. 1: GC/MS de la distribution des stérols (a) liés au pyrophéophorbide-a (b) libres du sédiment de surface (conditions données dans le texte).
1. cholestérol 2. brassicastérol 3. campéstérol 4. stigmastérol 5. β-sitostérol 6. dinostérol (Δ⁵²²) 7. citrostanol . Xa: signifié stanol associé au stérol X. (Les structures sont données dans les annexes).



Figure II.2.2. 2: GC/MS de la distribution stérollque de la colonne d'eau (a) fragmentogramme de m/z 129
(b) courant ionique total (conditions données dans le texte). La numérotation des stérols se réfère à la Figure II.2.2. 1.

L'analyse des stérols libres de la colonne d'eau est présentée sur la Figure II.2.2. 2. Le fragmentogramme de m/z 129 met en évidence la ressemblance entre cette distribution et celle de stérols liés aux chlorines. Le chromatogramme du courant ionique total montre qu'il n'y a pas de stanols ni de 4 α -méthyl stanols. La conclusion qui s'impose est une indubitable ressemblance entre la distribution des stérols libres de la colonne d'eau et celles de chlorine stéryl esters.

II.3) Analyses complémentaires

ş

L'analyse HPLC/DAD de la fraction totale des chlorines de la colonne d'eau (Figure II.3. I) a permis de mettre en évidence, en plus de la phéophytine-a et de la pyrophéophytine-a, un certain nombre de chlorines dont le spectre UV/Visible et le temps de rétention s'apparenteraient assez bien à des bactériochlorines du type d (19).









Figure II.3. 2: Spectres de masse D/EI-MS (a) de la première fraction de la chromatographie sur colonne (RP-18) (b) de la deuxième fraction contenant les bactériopyrophéophorbide-d stéryl esters(?).

Suite à ces analyses, l'extrait brut est purifié par chromatographie sur colonne en phase inverse (RP-18) en utilisant comme éluant du méthanol puis un mélange 50/50 acétone/méthanol, et pour finir, de l'acétone pur. Trois fractions sont collectées et analysées par HPLC et D/EI-MS. La première fraction contient énormément de pigments jaunes et des bactériochlorines relativement polaires. Le spectre de masse de la Figure II.3. 2(a) met en évidence la série de la bactériopyrophéophorbide-d (19) dont les extensions alkylées en C-8 et C-12 s'étendent de m/z 552 (C-8 éthyl; C-12 méthyl) à m/z636 (C-8 néo-pentyl; C-12 éthyl). m/z 770 et 784 sont certainement les pics moléculaires de la 8,12 diéthyl bactériopyrophéophorbide-d et de son analogue n-propylé en C-8 liées au farnésyl, la chaîne latérale la plus courante des bactériochlorines de ce type. La troisième fraction contient essentiellement de la phéophytine-a et de la pyrophéophytinea, tandis que la deuxième fraction contient de la phéophytine-a et des composés assimilables à des bactériochlorines moins polaires. Sur le spectre de la Figure II.3. 2(b). la région entre m/z 490-650 montre les mêmes pics que le spectre (a) de la même Figure. Nous en déduisons que nous sommes en présence d'une série de bactériopyrophéophorbide-d liée à des chaînes plus lourdes. La région du pic moléculaire présente trois pics m/z 762, 788 et 802 montrant que certaines de ces bactériochlorines possèdent une chaîne latérale plus lourde que le farnésol. De plus, dans la région des petites masses entre m/z 50-400, on peut deviner la fragmentation de chaînes hydrocarbonées du type isoprénoïde, dont peut-être celle d'un stérol mis en évidence par la présence des ions m/z 368, 255, 213. En l'absence du pic moléculaire de cette hypothétique bactériochlorine stéryl ester, on se gardera de surinterpréter ce résultat en tirant des conclusions hâtives.

II.4) Aspects géochimiques

La formation des chlorine stéryl esters: Dans les premiers travaux concernant les chlorine stéryl esters (King et Repeta, 1991; Prowse et Maxwell, 1991; Eckardt et *al.*, 1992), trois hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer leur formation.

48

Première hypothèse: La formation de ces composés pourrait avoir lieu durant la diagenèse précoce. Les travaux précédents et les nôtres semblent prouver le contraire. En effet, dans le cas où cette estérification est une simple réaction chimique se passant dans le sédiment, on peut s'attendre à ce que la distribution des stérols liés aux chlorines ressemble à celle des stérols libres du sédiment de surface. Or, comme nous le montrons sur la Figure II.2.2. 1, ces distributions sont très différentes. Si certaines de ces différences pourraient être expliquées par des empêchements stériques et des préférences cinétiques, d'autres seraient plus difficiles à comprendre. Comment rationaliser des différences de vitesse d'estérification si marquées entre le cholestérol et le stigmastérol ou encore entre le cholestérol et le cholestanol ? Les résultats obtenus sur les chlorine stéryl esters du Voua de la Motte sont très clairs et conduisent à abandonner définitivement cette idée. Deuxième hypothèse: Les chlorine stéryl esters pourraient être le produit de la biosynthèse d'une nouvelle forme de chlorophylle possédant une fonction biologique propre au sein de l'organisme photosynthétique l'ayant créé. Cette réaction serait catalysée par la chlorophyllesynthétase, l'enzyme responsable de l'estérification du phytol au chlorophyllide intervenant dans l'ultime phase de la synthèse de cette chlorophylle. Cette hypothèse ne semble pas meilleure que la précédente, pour des considérations aussi bien biologiques que géochimiques. Premièrement, la chlorophyllesynthétase est une enzyme extrêmement spécifique. Des expériences ont montré qu'une petite modification de la structure du macrocycle ou de la chaîne latérale entraîne des vitesses d'estérification tendant très vite vers zéro (Rüdiger et Schoch, 1991). Deuxièmement, aucune analyse d'organisme photosynthétique n'a révélé jusqu'à présent des chlorophylles ou des bactériochlorophylles possédant une chaîne latérale stéroïdique (Scheer, 1991). Même si les chlorophylle stéryl esters ne sont pas la forme majeure des chlorophylles présentes dans l'organisme les biosynthétisant, on aurait du en trouver des traces dans des plantes, vu les quantités non négligeables trouvées dans le sédiment. Troisièmement, la fonction biologique de ces composés resterait douteuse. La fonction des chaînes latérales des chlorophylles est d'ancrer le macrocycle tétrapyrrolique

assez hydrophile dans une structure plus lipophile. Pour les stérols, une de leur fonction principale est de conférer une structure plus ou moins rigide aux parois cellulaires. Leur biosynthèse est trop complexe et leur structure trop raffinée pour qu'un organisme photosynthétique puisse se permettre le luxe d'utiliser cette molécule comme une "simple ancre lipophile". Le surplus d'encombrement stérique du au groupe stéroïdique pourrait bien gêner les interactions chlorophylle-protéine plutôt que favoriser l'ancrage du pigment (Smith et Bobe, 1987). Si on considère les choses sous un angle plus géochimique, on constate qu'aussi bien la distribution des stérols liés aux chlorines de la mer Noire que celle du Voua de la Motte ressemblent plutôt à la superposition de distributions stéroliques provenant de plusieurs organismes-source, plutôt qu'à la distribution stérolique d'un organisme spécifique. La troisième hypothèse citée dans la littérature propose que l'estérification des chlorines par les stérols est biologiquement catalysée et qu'elle a lieu à la sénescence de l'organisme porteur de la chlorophylle et du stérol, par le truchement de la chlorophyllase. Cette enzyme est connue pour être une enzyme de dégradation de la chlorophylle. Elle entre en action seulement à la sénescence de la plante comme une des premières réactions de destruction de la chlorophylle, l'hydrolysant avant que le macrocycle subisse un clivage oxydatif. Des expériences menées en laboratoire ont montré que cette enzyme pouvait également catalyser l'estérification de petites chaînes latérales alcools; elle serait ainsi moins spécifique que la chlorophyllesynthétase vue précédemment et par conséquent pourrait jouer un rôle actif dans l'estérification de chlorines par des stérols (Brown et al., 1991). Bien que cette hypothèse puisse paraître plus séduisante que les deux précédentes, elle ne permet pas d'expliquer tous les résultats observés à ce jour (Prowse et Maxwell, 1991). Une variante de cette hypothèse, citée en premier par Eckardt et al. (1992) et que nous nous proposons d'étayer, semble mieux rendre compte des observations. Elle prévoit que l'organisme photosynthétique porteur du pigment tétrapyrrolique soit mangé par un organisme hétérotrophe (du type planctonique). Une fois absorbés, les pigments chlorophylliens et les débris des parois cellulaires contenant des stérols se retrouvent

intimement mélangé dans le tube digestif du dit organisme. Les enzymes du système digestif des zooplanctons (entres autres) sont connues pour transformer la chlorophylle en pyrophéophorbide comme nous l'avons vu dans la partie A.I. Une transestérification du phytol par un stérol n'est dès lors plus à exclure, bien qu'aucune observation directe de ce mécanisme n'ait été portée à ce jour à notre connaissance. Les résultats obtenus au Voua de la Motte montrent que la distribution des stérols de la colonne d'eau, Figure II.2.2. 2, correspond bien à la distribution de stérols liés aux chlorines [Figure II.2.2. 1 (a)]. De cette similitude, nous déduisons que la formation des chlorine stéryl esters a lieu dans la colonne d'eau et nous supposons que cette réaction est catalysée par un intermédiaire biologique, par exemple le zooplancton se nourrissant d'organismes autotrophes pélagiques. Si on admet cette dernière variante, on doit se demander pourquoi on n'a pas isolé des chlorine stéryl esters dans la trappe à sédiment? Pourquoi les stérols sont-ils, semble-t-il, les seuls alcools estérifiables? Pourquoi le pyrophéophorbide-a est il la seule chlorine estérifiée?

Nous pouvons répondre à la première question de la manière suivante: La concentration des composés accumulés dans la trappe à sédiment en une année est trop faible pour espérer isoler et caractériser les chlorine stéryl esters par les moyens utilisés. Pour répondre aux deuxième et troisième objections, nous pouvons nous appuyer sur les observations faites par Eckardt et al., (1992) et par nous-mêmes. Le pyrophéophorbide*b* est également estérifiée par les stérols; des traces ont été découvertes par HPLC-MS dans un sédiment lacustre. De plus, dans les expériences complémentaires de la partie A, on met en évidence la découverte possible d'une bactériopyrophéophorbide-*d* stéryl ester, ce qui paraît en accord avec la théorie de l'estérification dans le système digestif d'un organisme hétérotrophe, étant donné que la colonne d'eau du Voua de la Motte contient passablement de bactéries photosynthétiques, au vu de la quantité de bactériochlorines détectées sur le chromatogramme HPLC de la Figure II.³. *I*, Quant aux alcools, je dirai, en anticipant quelque peu sur la suite du travail, que l'on a pu mettre en évidence une bactériopyrophéophorbide-*d* liée à une chaîne latérale C₁₆ linéaire dont l'origine purement biosynthétique peut être mis en doute mais aucun macrocycle du type pyrophéophorbide-a, lié à un autre alcool que le phytol ou des stérols, n'a été isolé à notre connaissance.

Les 4-méthyl-stérols et les chlorine stéryl esters: Un autre aspect géochimique intéressant soulevé par les chlorine stéryl esters du Voua de la Motte est l'absence de citrostanol estérifié aux chlorines, alors que le sédiment de ce lac en regorge. Notre groupe a démontré que le citrostanol du Voua de la Motte provient d'une plante aquatique, Utricularia Neglecta (Klink, 1994). Cette plante d'eau douce est connue pour être carnivore, saisonnière, d'aspect filamenteuse et vivant entre deux eaux. Dès lors, si le lieu d'estérification des chlorine stéryl esters est la colonne d'eau et que la réaction est médiatée biologiquement comme postulé précédemment, on est en devoir de se demander pourquoi on ne trouve pas de citrostanol lié aux chlorines? Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour l'expliquer: (i) Une réaction enzymatique pourrait favoriser l'estérification des desméthyl-stérols au détriment des 4-méthyl-stérols. (ii) Les utricules d'Utricularia Neglecta pourraient être le site des estérifications des chlorine stéryl esters. Dans ce cas, l'absence du citrostanol s'expliquerait par le fait que la plante ne peut jouer le rôle de "dévoreur et de dévoré". En effet, pour que le citrostanol soit estérifié, il faudrait qu'Utricularia Neglecta soit à la fois dans un état avancé de sénescence (destruction des parois cellulaires pour en libérer le citrostanol) et encore capable de digérer les composés ingérés. Or, Utricularia Neglecta est une plante saisonnière, qui lorsqu'elle arrive à son terme, coule, ne se désagrégeant qu'une fois dans le sédiment. Cette affirmation est confirmée par l'analyse des stérols libres de la colonne d'eau dans laquelle on notera une absence notoire de 4-méthyl-stérols. (iii) La réaction serait catalysée par un (ou des) micro-organisme(s) hétérotrophe(s) (exemple: le zooplancton). L'absence de citrostanol est alors expliquée par le fait que ce ou ces microorganismes hétérotrophes ne peuvent s'attaquer à un macro-organisme pluricelluraire comme Utricularia Neglecta qui est la source de 4-méthyl-stérols du Voua de la Motte.

Si on évalue maintenant les hypothèses, on s'aperçoit que la première ne semble pas la bonne, étant donné que Prowse et Maxwell (1991) ont montré l'existence de chlorines liées au citrostanol. Certes, le sédiment analysé par ces auteurs date du Miocène et par conséquent une conservation préférentielle des chlorines citrostanol ester n'est pas à exclure, nous pensons néanmoins que cette hypothèse ne peut expliquer l'absence de chlorine 4-méthyl-stéryl esters dans le sédiment du Voua de la Motte. La deuxième hypothèse est séduisante car elle permet d'expliquer de manière assez élégante pourquoi le citrostanol n'est pas estérifié aux chlorines. Malheureusement, Utricularia Neglecta est une plante d'eau douce et des chlorine stéryl esters ont été trouvées dans des sédiments marins. La troisième hypothèse nous semble la plus raisonnable car intégrant le mieux toutes les observations. Elle n'implique pas la présence d'un microorganisme particulier pour la synthèse des chlorine stéryl esters mais par contre elle exige que la source des 4-méthyl-stérols du Voua de la Motte ne soit pas des microorganismes phytoplanctoniques vivant dans la colonne d'eau comme les dinoflagéllés, pourtant considérés jusqu'aux travaux de Klink et al. (1992) comme l'unique source de 4-méthyl-stérols. Ce résultat est en accord avec les tentatives de pêches de dinoflagéllés restées, jusqu'à aujourd'hui, infructueuses au Voua de la Motte.

En résumant, on tend à montrer, sous réserve de la validité de nos hypothèses, que l'étude des stérols liés aux chlorines peut permettre de repérer l'origine microplanctonique d'un biomarqueur. En effet, si la théorie ci-dessus est confirmée, on démontrerait qu'il existe plusieurs sources de citrostanol, et que celui lié aux chlorines découvert par Prowse et Maxwell (1991) pourrait avoir une origine biologique différente du citrostanol sédimentaire du Voua de la Motte dont l'origine a été établie par Klink et *al.* (1992).

Les chlorine stéryl esters et le kérogène: Dans le sédiment, la fraction des chlorine stéryl esters peut atteindre 20% de la fraction totale des chlorines sédimentaires (Eckardt et al., 1992). Au Voua de la Motte cette fraction est estimée à plus d'une dizaine de pourcents de la fraction contenant la phéophytine-a et la pyrophéophytine-a.

Or, si ce rapport était constant de la colonne au sédiment, on devrait être à même d'isoler des chlorine stéryl esters dans la trappe à sédiment ou d'en observer par HPLC le dixième des quantités de phéophytine-*a* et pyrophéophytine-*a* présentes dans la colonne d'eau. Vu que ce n'est pas le cas, nous pensons qu'il y a soit une conservation sélective des chlorine stéryl esters par rapport aux autres formes de chlorines, soit une incorporation préférentielle des autres chlorines au kérogène qui deviennent par ce fait inextractibles avec la méthode utilisée. Cette fuite met en évidence que l'on est encore loin de tout connaître des interactions chlorines/porphyrines avec le kérogène.

D'autre part, les modélisations du kérogène à partir de données spectroscopiques effectuées par Behar et Vandenbroucke (1987) montrent une composition moléculaire possible du kérogène. Suivant ce modèle, l'incorporation des macrocycles tétrapyrroliques se fait essentiellement au travers des fonctions alcools ou acides libres rescapées des premières dégradations biologiques ou diagénétiques. De nos observations et des modélisations de Behar et Vandenbroucke (1987), nous postulons que les chlorine stéryl esters sont plus résistantes à l'hydrolyse que les phéophytine-*a* et les pyrophéophytine-*a* sédimentaires. La présence du stérol empêche ou ralentit l'hydrolyse de ces composés, empêchant peut-être au moment propice l'incorporation des macrocycles tétrapyrroliques au kérogène. En pétrochimie, cette hypothèse peut être intéressante car la non-incorporation de 10-20% des chlorines sédimentaires pourrait favoriser la formation du kérogène de type I, c'est-à-dire le kérogène le plus pauvre en cycles polyaromatiques.

Enfin, une hydrolyse significativement retardée des chlorine stéryl esters pourrait avoir des conséquences intéressantes sur la métallation (et/ou l'ouverture de l'exocycle ?) si ces réactions sont catalysées par des argiles, relativement tôt dans la diagénèse comme Filby et Van Berkel (1987) en font l'hypothèse. Ce retard introduirait la possibilité qu'un même macrocycle (le pyrophéophorbide-*a*) subisse simultanément des réactions catalytiques conduisant à des produits différents, suivant si le macrocycle est encore lié au stérol ou déjà acidifié durant la phase catalytique. La sélectivité des sites catalytiques en fonction de l'encombrement stérique de la chlorine en addition avec une incorporation facilitée des chlorines/porphyrines acides libres dans le kérogène pourraient contribuer à expliquer la présence dominante des VO porphyrines dans les huiles.

III) La chlorophyllone-*a*, une nouvelle chlorine sédimentaire

Dans la partie "Géochimie moins classique des chlorines" (partie A: I.2.2) nous avons mis en évidence un certain nombre de porphyrines sédimentaires ne possédant pas de précurseur connu. Lors de nos travaux, nous avons identifié une chlorine pouvant être la source de certaines géoporphyrines possédant un exocycle à 7 membres (24, 25). Dans ce chapitre, nous nous proposons de montrer que la chlorine contenue dans le pic A de la Figure II.3.1. *1* est la chlorophyllone-*a*, une chlorine possédant un exocycle à 7 membres et n'ayant été observée qu'une fois auparavant, dans un mollusque marin, à état de trace, où elle semblerait être utilisée pour son activité anti-oxidante (Sakata et *al.*, 1990). Sa caractérisation est effectuée par UV/Visible, D/EI-MS, spectrométrie de masse en haute résolution (HRMS) et par résonance magnétique nucléaire (NMR) 1D et 2D. Un chemin de dégradation conduisant aux porphyrines 24 et 25 est postulé. Vu que la chlorophyllone-*a* est la chlorine la plus abondante du Voua de la Motte, une discussion géochimique et environnementale est également abordée.

III.1) Echantillon et caractérisations spectroscopiques

III.1.1) Echantillon, extraction et isolement

L'échantillon utilisé est le même que celui qui a servi à l'isolement des chlorine stéryl esters. L'extraction et la séparation primaire sont identiques à ce qui est décrit en II.1. L'analyse individuelle des fractions isolées sur TLC préparative montre que la chlorophyllone-*a* (pic A, Figure II.3.1. *1*) est la bande possédant un $I_{ppme} \approx 0.7$, attestant bien d'une polarité accrue par rapport au pyrophéophorbide-*a* méthyl ester. L'isolement de la chlorophyllone-*a* du reste de la fraction s'effectue par HPLC semi-préparative en utilisant une élution isocratique 20/80 n-propanol/méthanol (v/v) à 3 ml/min et en réglant le détecteur UV à 366 nm. On peut repasser l'extrait sur plaque TLC préparative (phase

normale, 25/75 acétone/hexane, avant de poursuivre les analyses. Environ 0,6 mg de chlorophyllone-*a* sont isolés.

III.1.2) Spectrophotométrie UV/Visible

Le spectrophotomètre et les conditions opérationnelles furent les mêmes que celles utilisées précédemment (II.1.4). La chlorophyllone-*a* (27) possède des maxima d'absorption aux longueurs d'onde: λ_{max} [nm] 662, 605, 529, 500, 407 (407/662 = 2.06). Le composé de référence, le pyrophéophorbide-*a* méthyl ester, montre des absorptions très similaires λ_{max} [nm] 665, 605, 532, 503, 407 (407/665 = 2.36). Ces spectres d'absorption attestent que les variations de structures entre le standard et la chlorine inconnue n'ont que très peu d'effet sur le chromophore de la molécule.

III.1.3) Spectrométrie de masse (D/EI-MS)

Le spectromètre de masse utilisé pour enregistrer les spectres de la chlorophyllone-a (27) et de son dérivé triméthyl silylé (28) est un VG Mass Lab Trio-2 quadrupole, utilisant une sonde de désorption.



Figure III.1.3. 1: Structure des composés cités dans le texte.

L'échantillon est dissous dans 50 µl d'acétone; 1 µl de cette solution est déposé sur un fil de platine ($\emptyset = 0.127$ mm) chauffé suivant le programme utilisé pour l'analyse des chlorine stéryl esters. La vitesse de balayage est de 1 s pour balayer l'échelle de masse de m/z 50-650. La source d'impact électronique opère à 70 eV (nominal, trappé 200 μ A) et à la température de 220°C. Le spectre de masse de la chlorophyllone-a [Figure III.1.3. 2(a)] exhibe le pic moléculaire à m/z 532 [M]⁺. et des ions fragments à m/z 515 [M-OH]⁺, *m/z* 514 [M-OH₂]⁺, *m/z* 504 [M-CO]⁺, *m/z* [M-(CO+CH₂CH₂)]⁺. A *m/z* 490, on observe un pic avec une intensité plus grande en fin d'évaporation, lorsque la température de la sonde est très élevée [Figure III.1.3. 2(a')]. Nous attribuons ce pic à la perte de cétène (CH2CO) à partir de l'ion moléculaire, par effet thermique. Sur un spectre de masse (non reproduit) obtenu en utilisant la technique d'ionisation FAB (bombardement par des atomes rapides), on observe la même fragmentation que sur le spectre D/EI, excepté m/z 490. Le spectre de masse de la chlorophyllone-a obtenu par électrospray (ES) sera discuté dans la partie B de ce travail. La dérivatisation de 27 avec BSTFA (Fluka Chemicals) dans du chlorure de méthylène anhydre (2h, 80°C) donne son dérivé TMS, 28. La chlorophyllone-a TMS éther est purifiée par HPLC (mêmes conditions que pour l'isolement) avant d'être déposée en solution dans l'acétone, comme pour la chlorophyllone-a non-dérivatisée. Le spectre de masse du dérivé TMS est très similaire au spectre de masse obtenu pour la chlorophyllone, bien que toutes les masses soient déplacées de 72 u, attestant bien de la présence d'une fonction hydroxyle libre. Le pic moléculaire apparaît à m/z 604 (532+72). La fragmentation du dérivé TMS est analogue à celle de la chlorophyllone non-dérivatisée: m/z 514 [M-HOTMS]+, m/z 548 $[M-(CH_2CH_2+CO)]^+$, m/z 576 $[M-CO]^+$, on notera cependant que m/z 562 (analogue de m/z 490) n'apparaît pas même en fin de courbe d'évaporation. Nous attribuons cette absence de dégradation thermique à de meilleures conditions de désorption due à un accroissement de la volatilité du substrat, ce qui lui permet de quitter la sonde avant que les réactions de dégradation thermique ne se produisent.

Figure III.1.3. 2: Spectres de masse (D/EI) obtenus pour: (a) et (a') la chlorophyllone-a. (b) son dérivé TMS éther (conditions MS données dans le texte).

III.1. 4) Spectrométrie de masse en haute résolution (HRMS)

Un spectre de masse du dérivé TMS (28) a été enregistré sur un spectromètre VG 70-70E, double focalisation, avec une résolution de 7000 ($\Delta m/m$, 10% valley). Le standard interne utilisé lors de cette mesure est du perfluorokérosène. Les ions de l'échantillon sont comparés aux ions fragments du standard dont la masse exacte est connue et moyennées sur 10 balayages. La vitesse de balayage de l'échelle de masse de m/z 50-650 est de 3s/scan. La source EI opère à 70 eV (nominal, 200 µA trappé) à la température de 180°C. Une sonde d'introduction directe refroidie à l'eau est utilisée pour introduire l'échantillon dans le spectromètre. 10 µl d'une solution de l'échantillon dans l'acétone (50 μL) sont déposés dans un creuset en aluminium. Le creuset est alors chauffé à 450°C à la vitesse de 10°/min. Le maximum de température est maintenu durant 3 minutes. La formule élémentaire du dérivé TMS de la chlorophyllone est $C_{36}H_{40}N_4O_3Si$. La masse exacte observée est 604.2830 u et celle calculée correspondante à cette formule brute est de 604.2869 (erreur: $\Delta m = 3.9$ mmu). Le spectre de masse confirme les pertes neutres observées: A m/z 576.2979 $\rightarrow C_{35}H_{40}N_4O_2Si$ [-CO] ; m/z 548.2665 $\rightarrow C_{33}H_{36}N_4O_2Si$ $[-(CO+CH_2CH_2)]$; et à m/z 514.2416 $\rightarrow C_{33}H_{30}N_4O_2$ [-HOTMS], confirmant ainsi le chemin de fragmentation proposé.

III.1.5) Résonance magnétique nucléaire (NMR)

Les spectres ¹H-NMR ont été enregistrés sur un spectromètre Brucker AMX 400 dans le chloroforme-d₁ et l'acétone-d₆. Le spectre COSY homonucléaire a été enregistré dans l'acétone. Le chloroforme est passé sur Alox-basique afin d'enlever son acidité, avant de mettre en solution l'échantillon.

Le spectre ¹H-NMR de la chlorophyllone-*a* (Figure III.1.5, *I*) confirme la présence d'une base libre à haut champs et de trois protons *méso* à bas champs. Les protons H-17 et H-18 possèdent des déplacements chimiques quasiment inversés par rapport à ceux du pyrophéophorbide-*a* Les protons H_a -17¹, H_b -17¹, et H_a -17², H_b -17², montrent des déplacements chimiques éloignés les uns des autres, observations

24

Proton •	δ(ppm) dans le		Multiplicité	COSY(¹ H- ¹ H)
	chloroforme	acétone	(J Hz)	connectivités
H-10	9.65	9.8	s	
H-5	9,55	9,72	s	
H-20	8.68	9,2	s	
H-31	8.03	8,7	dd(18,11)	$H_a - 3^2$, $H_b - 3^2$
H _a -3 ²	6,31	6.5	dd(18, 1,5)	H-3 ¹ , H _b -3 ²
H _b -3 ² (E)	6.25	6.8	dd(12, 1,5)	H-3 ¹ , H _a -3 ²
H-17	4.92	5	dt(13, 3,5)	H-18, H _b -17 ¹ , H _a -17 ¹
H-18	4.4	4,5	m(→dq)	H-17, CH ₃ -18 ¹
ОН	4.32	6.8	s	
CH ₃ -12	3 75	3,78	S	
CH ₃ -2	3.45	3.55	S	
CH ₃ -7	3.3	3.32	S	
CH ₂ -8 ¹	3,74	3.85	q(9)	CH ₃ -8 ²
CH ₃ -8 ²	1.78	1,75	t(9)	CH ₂ -8 ¹
H _a -17 ²	4.4	4.48	$m(\rightarrow dddt)$	H _b -17 ² , H _a -17 ¹ , H _b -17 ¹ , H-17
H _b -17 ¹	2,9	3_02	m(-→dddd)	H _a -17 ² , H _b -17 ² , H _b -17 ¹ H-17
H _b -17 ²	2.82	2.7	m(→dddd)	H _a -17 ² , H _a -17 ¹ , H _b -17 ¹
H _a -17 ¹	2,25	2,26	$m(\rightarrow dddd)$	H _a -17 ² , H _a -17 ¹ , H _b -17 ² , H-17
CH ₃ -18 ¹	2.2	2.28	d(8)	H-18
NH	+0.7 - 1.88	+0.48, -2	1 s	

 Table III.1.5: Identification des protons de la chlorophyllone-a dans le chloroforme et l'acétone et mise en évidence des connectivités.

compatibles avec la présence d'un exocycle incluant CH_2-17^1 et CH_2-17^2 , rigidifiant la chaîne propronique, et rendant par ce biais les protons non-équivalents. Les déplacements chimiques de tous les protons relatés dans la Table III.1.5 sont similaires à



Figure III.1.5. 1: Spectre ¹H-NMR de la chlorophyllone-a dans le chloroforme-d_{1*}



Figure III.1.5. 2: Aggrandissement du spectre NMR 2D ¹H-¹H COSY homonucléaire de la chlorophyllone-*a* dans l'acétone-d₆.

ceux donnés par Sakata et *al.* Le spectre COSY homonucléaire (Figure III.1.5) est utile pour distinguer les signaux du cycle à 7 membres. On notera néanmoins que H-18 et H_a -17² possèdent quasiment le même déplacement chimique, ce qui complique quelque peu la lecture des connectivités. La stéréochimie de l'alcool en C-13² ne peut pas être résolue avec certitude par ces expériences. Néanmoins, on observe pour le proton de cet alcool le même déplacement chimique que Sakata et *al.* observent sur "leur chlorophyllone" qui a fait l'objet d'une étude NOE afin de déterminer la stéréochimie de ce carbone(13- α -ol). Dans une région où de forts courants anisotropiques circulent, on peut penser que "notre chlorophyllone" possède la même stéréochimie car dans le cas contraire, on pourrait certainement s'attendre à un déplacement significatif du signal de l'alcool.

III.2) Aspects géochimiques

A notre connaissance, la chlorophyllone-a du Voua de la Motte est la première évidence de l'existence d'une chlorophyllone sédimentaire. Bien que Sakata et al. (1990) l'ait découverte comme trace dans un mollusque marin (une clam) où elle semble tenir le rôle d'anti-oxydant, la découverte de cette chlorine dans un sédiment en concentration importante par rapport à la phéophytine-a et à la pyrophéophytine-a, relance la géochimie de la chlorophylle, car ni l'origine, ni le chemin de dégradation de cette chlorine et ses implications ne sont encore vraiment compris. De cette connaissance, un bon nombre d'informations sont certainement à glaner sur les conditions physicochimiques et bactériennes régnant dans le milieu environnant.

Origine et destin de la chlorophyllone: Quelques hypothèses sont à considérer pour l'origine de la chlorophyllone. (i) Une biosynthèse totale par la clam marine *Ruditapes philippinarum*? Nous n'avons jamais vraiment cru à une biosynthèse totale de la chlorophyllone par un organisme hétérotrophe. Cette molécule est trop complexe pour qu'une clam la synthétise comme simple anti-oxydant. De plus, sa structure est trop proche de la chlorophylle pour que ce soit une simple coïncidence.


Figure III 2: Intégration de la chlorophyllone dans le cycle géochimique des pétroporphyrines. Présentation d'une voie oxique et anoxique. M = Ni ou VO et R = H, Me ou Et.

(ii) Transformation d'un précurseur par une réaction chimique pure ou catalysée par une argile? La chlorophyllone dériverait alors de la chlorophylle ou d'un de ses produits de dégradation. Bien que Falk et al. (1975) aient montré qu'il est possible en laboratoire de synthétiser la chlorine 29 (Figure III.2) à partir du pyrophéophorbide-a méthyl ester, les conditions réactionnelles exigées semblent inadéquates pour se produire, même lentement, dans un milieu aqueux. Falk et al. ont également étudié l'équilibre cétoénolique du phéophorbide-a. Celui-ci est assez déplacé vers la forme cétonique dans des conditions normales, alors que la forme énolique est l'entité réactive. Cependant, on ne peut exclure qu'une argile interagisse pour déplacer l'équilibre suffisamment vers la forme énolique afin d'amorcer la condensation donnant le cycle à 7 membres. Une contribution de ce genre de réaction ne peut pas être totalement exclue, mais elle ne peut expliquer toutes les observations. En effet, une telle réaction serait purement diagénétique, or nous avons détecté également de la chlorophyllone dans la colonne d'eau du Voua de la Motte, où les interactions catalytiques avec les argiles sont à exclure. Ce qui nous amène à la dernière hypothèse: (iii) Une synthèse enzymatique ou bactérienne à partir de produits de dégradation de la chlorophylle. La chlorophyllone-a serait alors le produit d'une biosynthèse partielle par une bactérie qui l'utiliserait comme anti-oxydant ou à d'autres fins. Cette bactérie pourrait être ultérieurement absorbée par d'autres organismes (telle une "clam"). Si le problème de cyclisation peut être résolu de cette façon, il est par contre assez difficile de se prononcer sur la présence d'une fonction alcool en C-13². Estce une modification de la structure du produit de dégradation de la chlorophylle utilisée par la bactérie responsable de la synthèse partielle de la chlorophyllone ou simplement une hydroxylation photocatalysée dans la zone photique de la colonne d'eau ? Dans le cas où l'action bactérienne se limite à la cyclisation pour donner la chlorine 29, composé déjà isolé dans une éponge marine (Karuso et al., 1986), on devrait trouver une quantité importante de cette chlorine (29) soit dans la colonne d'eau ou dans le sédiment du Voua de la Motte, ce qui n'est pas le cas. L'hypothèse de la formation d'un artefact au cours des manipulations peut être écartée car une étude récente de Rahmani et al. (1993)

montre que l'oxydation en C-13² de la chlorophylle-*a* et de la phéophytine-*a* par voie photochimique demande des conditions oxydantes sévères (flux d'O₂, lumière puissante, et une température de 40°C durant 2 h) pour ne convertir que de petites quantités de chlorophylle ou de phéophytine en leur analogues C-13² hydroxylés. De plus, des tests de stabilité aux conditions d'extraction de la chlorophylle et de la phéophytine ont été effectués et n'ont montré aucune altération de ces produits.

Pour expliquer le destin possible de la chlorophyllone, il faut aborder le problème à l'envers. Historiquement, les porphyrines 24 et 25 (Figure III.2) ont été découvertes avant la chlorophyllone, à peu de chose près conjointement par Wolff et al. (1983) et Fookes, (1983) pour les analogues de 25 (R= H, Me, Et ; Figure III.2) et par Prowse et al. (1987) pour la chlorine 24. Immédiatement, Fookes a envisagé que cette porphyrine pourrait provenir d'un précurseur inconnu possédant déjà le cycle à 7 membres ou de la chlorophylle-a à travers une réaction diagénétique de fusion de la chaîne proplonate et du cycle à 5 membres. La découverte de la chlorophyllone-a, puis de sa présence en quantité importante dans un sédiment renforce cette hypothèse. Nous pensons même que la chlorophyllone peut être la source principale de porphyrines possédant un cycle à 7 membres. En reprenant l'idée de Fookes, la chlorophyllone est liée à la porphyrine 25, via un chemin de dégradation oxique (Figure III.2). De plus, la chlorophyllone peut également être liée à la porphyrine 24 (métallo di-DPEP) à travers une voie de dégradation anoxique qui permettrait de conserver les 2 exocycles (même Figure). Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que la chlorine 31 a été isolée d'un sédiment lacustre par le groupe de Bristol (Prowse et al., 1990) et la porphyrine 33 d'une argile bitumineuse (du centre de la Jordanie; Prowse et al., 1987). Ne possédant pas d'études isotopiques pour ces composés et la chlorophyllone du Voua de la Motte nous ne pouvons pas prouver la relation entre ces différentes chlorines/porphyrines. Néanmoins, les intermédiaires constituant le chemin de dégradation anoxique de la chlorophyllone au métallo di-DPEP (24) ayant été isolées antérieurement dans des sédiments ce qui rend le chemin de décomposition proposé est tout à faire raisonnable.

Rapport isotopique (${}^{13}C/{}^{12}C$) et porphyrines possédant un exocycle à 7 membres en 15-17³: Une étude de la composition isotopique de différentes porphyrines provenant principalement d'argiles bitumineuses de "Condor lake" et de "Julia Creek" (Boreham et *al.*, 1990) montre que certaines porphyrines du type 24 ou 25 ont la même composition isotopique que la porphyrine 16 (Figure I.2.2. *1*) connue pour dériver spécifiquement de la chlorophylle-*c* (14). De cette similitude, Boreham et *al.* proposent que la chlorophylle-*c* est à l'origine de toutes les porphyrines possédant un exocycle à 7 membres, au travers de dégradations impliquant entre autre, une hydrogénation spécifique de la double liaison de la chaîne propionique α - β insaturée puis une condensation de la chaîne latérale. Cette théorie, bien que séduisante, devrait être partiellement revue depuis la découverte de la chlorophyllone-*a* comme constituant majeur de la fraction des chlorines non-acides du Voua de la Motte. En effet, la chlorophylle-*c* étant une porphyrine, nous pensons qu'une hydrogénation spécifique des positions 17-18 au cours de la diagenèse est très peu probable.

Chlorophyllone et kérogène: La chlorophyllone-*a* est très abondante dans le sédiment de surface du Voua de la Motte. Sans vouloir dire que cette abondance doit être uniforme quelle que soit la provenance du sédiment de surface, si la chlorophyllone*a* est bien un produit de transformation de la chlorophylle se dégradant en les porphyrines 24 et 25, on devrait trouver des porphyrines possédant un exocycle à 7 membres en quantité raisonnable, un peu partout. Or, ces produits de dégradation n'ont été isolés qu'en quantité très faible par rapport au DPEP et au étioporphyrines, dans quelques rares sédiments. Certes, on peut penser que les conditions physico-chimiques et bactériennes nécessaires à la formation ou à la conservation du cycle à 7 membres ne sont pas réunies dans tous les sédiments. Reste que cette explication n'est pas satisfaisante.

D'autre part, des travaux récents de Schaeffer et al. (1993) montrent qu'une certaine quantité de porphyrines sont liées au kérogène via des ponts soufrés. Les principales porphyrines libérées par un traitement réducteur au Ni(Ra) sont des métallo di-DPEP du type 24 et des homologues 15-17³ deshydrogénés du type 34.



R = Et, Me, H

R = Et, Me

Figure III.2 2: Structure des composés cités dans le texte.

Le sédiment étudié datant du Miocène (5-7 millions d'années), ainsi que le traitement réducteur qu'il a subi, font que l'on ne s'étonnera pas trop de la maturité (apparente?) de ces porphyrines. L'intérêt de cette étude réside dans le fait qu'il existe de grandes quantités de métallo di-DPEP (24 et 34) liées au kérogène par des ponts soufrés et qui, par conséquent, étaient jusqu'alors inextractibles et ignorés. La mise en évidence de la porphyrine 34 est particulièrement intéressante car sa structure laisse entendre que le pont soufré se trouvait avant le traitement réductif en C-15 (ou C-173). Or, cette position est celle occupée par l'alcool de la chlorophyllone. Les études de de Leew et Sinninghe Damsté (1990) sur l'incorporation de soufre dans les alcools linéaires et les stérols nous montrent que les ponts de soufre, intra ou intermoléculaires, se font par l'intermédiaire de doubles liaisons souvent créées par l'élimination d'une molécule d'eau durant la diagénèse. Nous proposons de ces études et de nos résultats, que la chlorophyllone-a s'incorpore au kérogène moins rapidement que les chlorines/porphyrines possédant des fonctions acides ou des alcools libres stériquement peu encombrés. Sa dégradation en milieu anoxique va jusqu'à la porphyrine 34, qui est un bon candidat pour incorporer le soufre et alors être immobilisée dans le kérogène. Bien que purement hypothétique, ce

modèle peut expliquer dans un premier temps la concentration de la chlorophyllone-*a* dans le sédiment de surface et dans un second temps la quasi disparition des porphyrines à 7 membres des sédiments plus anciens.

IV) Références

Anders E., Hayatsu R., Studier M. H. (1973) Organic Compounds in Meteorites, Science, 182, 781-790.

- Ariztegui D., McKenzie J. A., Farrimond P. (1993) Fatty acid distribution in Holocene sediments from lake St Moritz, Switzerland: A record of fluctuating conditions, in "Organic Geochemistry: 16th International Meeting, Stavanger" edited by Öygard, 470-473.
- Baker E. W. and Louda J. W. (1981) Thermal Aspects in Chlorophyll Geochemistry, Advances in Organic Geochemistry, 401-421.
- Barwise A. J. G. and Roberts I. (1984) Diagenetic and catagenetic pathways for porphyrins in sediments, Org. Geochem., 6, 167-176.
- Behar F. and Vandenbroucke M. (1987) Chemical modeling of kerogens, Org. Geochem., 11, 15-24.
- Bidigare R. R., Kennicutt II M. C., Ondrusek M. E., Keller M. D., Guillard R. R. L. (1990) Novel Chlorophyll-Related Compounds in Marine Phytoplancton: Distributions and Geochemical Implications, *Energy Fuel*, 4, 653-657.
- Boreham C. J., Fookes C. J. R., Popp B. N., Hayes J. M. (1990) Origin of Petroporphyrins 2. Evidence from Stable Carbon Isotopes, *Energy Fuel*, 4, 658-661.
- Brown S. B., Houghton J. D., Hendry G. A. F. (1991) Chlorophyll breakdown, in"*Chlorophylls*" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 465-489.
- Callot H. J. (1991) Geochemistry of chlorophylls, in"Chlorophylls" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 339-364.
- Callot H. J., Ocampo R., Albrecht P. (1990) Sedimentary Porphyrins: Correlations with Biological Precursors, Energy Fuel, 4, 635-639.
- Chillier X. Fr. D. (1992) Spectrométrie de masse de la protoporphyrine IX diméthyl ester et extension aux chlorines, Extraction, localisation et isolement de produits de dégradation de la chlorophylle, Mémoire du Diplôme de Chimiste, Université de Genève.

- Chyba C. F., Thomas P. J., Brookshaw L., Sagan C. (1990) Cometary Delivery of Organic Molecules to the Early Earth, *Science*, 249, 366-373.
- Corwin A. H. (1960) Petroporphyrins, in "Proc. 5th World Petr. Congr.", New York, paper V-10, 119-129.
- Cotter R. J. (1980) Mass Spectrometry of Nonvolatile Compounds, Desorption from Extended Probes, Anal. Chem., **52**, 1589A-1606A.
- de Leeuw J. W., Sinninghe Damsté (1990) Organic Sulfur Compounds and Other Biomarkers as Indicators of Palaeosalinity, in "Geochemistry of Sulfur in Fossil Fuels" edited by W. L. Orr and C. M. White, ACS Symposium Series 429, Washington, DC, 417-443.
- Eckardt C. B_e, Pearce G_e E. S_e, Keely B_e J_e, Kowalewska G_e, Jaffé R., Maxwell J. R_i (1992) A widespread chlorophyll transformation pathway in the aquatic environment, Org. Geochem., 19, 217-227.
- Engel M. H., Macko S. A., Bartholomew N. (1993) The Organic Geochemistry of Carbonaceous Meteorites; Amino acids and Stable Isotopes, in"Organic Geochemistry, Principles and Applications" edited by Engel M. H. and Macko S. A., Plenum, New York and London, 685-695.
- Enzell C. R., Wahlberg I., Ragnar R. (1984) Mass Spectra of tobacco isoprenoïds, *Mass Spectrom. Rev.*, **3**, 395-458,
- Falk H:, Hoornaert G., Isenring H-P., Eschenmoser A. (1975) Über Enolderivate der Chlorophyllreihe -Darstellung von 13², 17³ Cyclophäophorbid-enolen, *Helv. Chim. Acta*, 58, 2347-2356.
- Filby R. H. and Van Berkel G. J. (1987) Geochemistry of Metal Complexes in petroleum Source Rocks and Coals: an Overview, in "Metal Complexes in Fossil Fuels" ACS Symposium Series, Washington DC, 2-39.
- Fookes C. J. R. (1983) Identification of a homologous series of Ni(II) 15,17-butanoporphyrins from an oil shale, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1474-1476.
- Gosztola D. and Wasielewski M.R. (1993) Resonance Raman Spectroscopy of Chlorophyll-Porphyrin Heterodimer: Excitation profile in the 400-450 nm Region, J. Phys. Chem., 97, 9599-9602.

- Hassner A., Alexanian V. (1978) Direct room temperature esterification of carboxyxlic acids, *Tetrahedron lett.*, 46, 4475-4478.
- Hendry G. F. A., Houghton J. D., Brown S. B. (1987) The degradation of Chlorophyll -a biological enigma, New Phytol., 107, 255-302.
- Hoff A. J. and Amesz J. (1991) Visible absorption spectroscopy of chlorophylls, in"*Chlorophylls*" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 723-738.
- Holloway P. J. (1982) The chemical constitution of plant cutins, in "The plant Cuticle" edited D.F. Cutler, K. L. Alvin and C. E. Price, Linnean Soc. Lond. Academic Press, London, 45-85.
- Imbus S. W. and McKirdy D. M. (1993) Organic Geochemistry of Precambran Sedimentary Rocks, in"Organic Geochemistry, Principles and Applications" edited by Engel M. H. and Macko S. A., Plenum, New York and London, 657-684.
- Karuso P., Bergquist P. R., Buckleton J. S., Cambie R. C., Clark G. R., Rickard C. E. F. (1986) 13², 17³ cyclopheophorbide enol, the first porphyrin isolated from a sponge, *Tetrahedron lett.*, 27, 2177-2178.
- Kaur S., Chicarelli M. I., Maxwell J. R. (1986) Naturally Occuring Benzoporphyrins: Bacterial marker pigments? J. Am. Chem. Soc., 108, 1347-1348.
- Keely B. J., Prowse W. G., Maxwell J.R. (1990) The Treibs Hypothesis: An Evaluation Based on Structural Studies, *Energy Fuel*, 4, 628-634.
- Klink G. (1994) Analyse des lipides de plantes aquatiques et recherche des 4-méthyl-stérols -Application de l'extraction en phase supercritique aux stérols et acides gras, Thèse N° 2685, Université de Genève.
- Klink G., Buchs A., Gülaçar F.O. (1994) Tocopheryl esters from Nymphea Alba and Nuphar Luteum, *Phytochemistry*, 36, 813-814.
- Klink G., Dreier F., Buchs A., 'Gülaçar F. O. (1992) A new source for 4-methyl sterols in freshwater sediments: Utricularia Neglecta. (Lentibulariaceae), Org. Geochem., 18, 757-763.
- Killops S. D. and Killops V. (1993) An Introduction to Organic Geochemistry, Longman, Harlow-

- King L. L. and Repeta D. J. (1991) Novel pyropheophorbide steryl esters in Black Sea sediment, Geochim. Cosmochim Acta, 55, 2067-2074.
- Lasch T. D. (1993) Geochemical Origins of Sedimentary Benzoporphyrins and Tetrahydrobenzoporphyrins, *Energy Fuel*, 7, 166-171.
- Mathis P. et Rutherford W. (1994) La production d'oxygène par les plantes, La Recherche, 25, 46-54.
- Mendoza Y. (1987) Géochimie des acides carboxyliques dans deux sédiments lacustres récents, Thèse N°2267, Université de Genève.
- Mermoud F. (1982) Géochimie des des stérols et des acides gras dans les sédiments du lac Léman et du Voua de la Motte, Thèse N°2060, Université de Genève.
- Miller S. L. (1993) The prebiotic Synthesis of Organic Compounds on the Early Earth, in"Organic Geochemistry, Principles and Applications" edited by Engel M. H. and Macko S. A., Plenum, New York and London, 625-637.
- Ocampo R., Bauder C., Callot H. J., Albrecht P. (1992) Porphyrins from Messel oil shale (Eocene, Germany): Structure elucidation, geochemical and biological signifiance, and distribution as function of depth, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 56, 745-761.
- Prowse W. G. and Maxwell J. R. (1991) High molecular weight chlorins in a lacustrine shale, Org. Geochem., 17, 877-886.
- Prowse W. G., Keely B. J., Maxwell J. R. (1990) A novel sedimentary metalloporphyrin, Org. Geochem., 16, 1059-1065.
- Prowse W, G., Chicarelli M. I., Keely B. J., Kaur S., Maxwell J. R. (1987) Characterisation of fossil porphyrins of the "di-DPEP" type, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51, 2875-2877.
- Rahmani A., Eckardt C. B., Brereton R. G., Maxwell J. R. (1993) The use of liquid chromatographymass spectrometry to monitor the allorimerization reactions of chlorophyll-a and pheophytin-a: Identification of the allomers of pheophytin-a, *Photochem. Photobiol.*, 57, 1048-1052.
- Robinson N., Eglinton G., Brassell S. C., Cranwell P. A. (1984) Dinoflagellate origin for sedimentary 4α-methylsteroids and 5α (H)-stanols, *Nature*, 308, 439-442.

- Rüdiger W. and Schoch S. (1991) The last steps of chlorophyll biosynthesis, in"*Chlorophylls*" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 451-464.
- Rüdiger W. and Benz J. (1979) Influence of aminotriazol on the biosynthesis of chlorophyll and phytol; Z. Naturforsch., 34c, 1055-1057.
- Sakata K., Yamamoto K., Ishikawa H., Yagi A., Etoh H., Ina K. (1990) Chlorophyllone-a, a new pheophorbide-a related compound isolated from Ruditapes Philipparum, as an antioxidative compound, *Tetrahedron lett.*, 31, 1165-168.
- Schaeffer P., Ocampo R., Callot H. J., Albrecht P. (1993) Extraction of bound porphyrins from sulphurrich sediments and their use for reconstruction of palaeoenvironments, *Nature*, 364, 133-136.
- Scheer H. (1991) Structure and occurence of chlorophylls, in"Chlorophylls" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 3-30.
- Schoch S. and Schäfer W. (1978) Tetrahydrogeranylgeraniol a precursor of phytol in the biosynthesis of chlorophyll-a, Z. Naturforsch., 33c, 408-412.
- Serra-Bertral G. (1976) Etude morphométrique, physico-chimique et sédimentologique de quelques lacs de montagne des préalpes du Chablais (Haute-Savoie), Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- Smith K. M., and Bobe F. W. (1987) ILght adaption of bacteriochlorophyll-d by enzymatic methylation of antenna pigments, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 276-277.
- Spikes J. D. and Bommer J. C. (1991) Chlorophyll and related pigments as photosensitizers in biology and medecine, in "Chlorophylls" edited by H. Scheer, CRC press, Florida, 1181-1203.
- Sundararaman P. and Moldovan J. M. (1993) Comparaison of maturity based on steroids and vanadyl porphyrin parameters: A new vanadyl porphyrin maturity parameter for higher maturities, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 57, 1379-1386.

Tissot B. P. and Welte D. H. (1984) Petroleum Formation and Occurence, Springer-Verlag, Berlin.

- Tolf B., Jiang X., Wegmann-Szente A., Kehres L. A., Bunnenberg E., Djerassi C. (1986) Enhanced Structural Determination of Substitued Porphyrins by Ammoniac Desorption Chemical Ionization Mass Spectrometry, J. Am. Chem. Soc., 108, 1363-1374.
- Treibs A. (1934) Über das Vorkommen von Chlorophyll-derivaten in einem Ölschiefer aus dem öberen Trias, Liebigs Ann., 509, 103-114.
- Wolff G. A., Murray M., Maxwell J. R., Hunter B. K., Sanders J. K. M. (1983) 15, 17-butano-3,8diethyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin -a novel naturally occuring tetrapyrrole, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 922-924.
- Wünsche L. (1987) Géochimie des lipides neutres et diagenèse précoce dans les sédiments du bassin lémanique, Thèse N°2260, Université de Genève.
- Zenobi R. (1994) Advances in surface Analysis and Mass Spectrometry using Laser Desorption Methods, Chimia, 48, 64-71.

PARTIE B :

APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE ION TRAP COUPLEE A UNE SOURCE ELECTROSPRAY POUR L'ANALYSE DE CHLORINES SEDIMENTAIRES

I) Théorie Ion trap

Le spectromètre "Ion trap" ou "quistor" (quadrupole ion storage) est un cas particulier de spectrométrie quadrupolaire. Il est composé de trois électrodes emboîtées les unes dans les autres, l'une est dite circulaire et les deux autres sont dites hyperboliques, bien que toutes présentent des surfaces hyperboliques lorsqu'on les observe du centre de la trappe (Figure I. 1). Son mode de fonctionnement et ses performances sont par contre assez différents d'un appareil à faisceau ionique classique. L'utilisation de cet appareil pour l'obtention de spectres MS^n ($n \ge 2$) ou pour l'extension de l'échelle de masse à quelques dizaines de milliers de daltons par charge requiert une bonne compréhension des aspects théoriques (Goeringer et *al.*, 1992; Louris et *al.*, 1991 et 1987).

I.1) Description du potentiel

Lorsqu'on a qu'une particule chargée dans une enceinte soumise à potentiel ϕ_0 (Figure I. *I*), le champ électrique n'est pas perturbé par d'autres charges. On peut le considérer comme "idéal" (March et Hughes, 1991) et il est égal à l'expression suivante :

$$\phi_{xyz} = \frac{\phi_o}{r_o^2} (\lambda x^2 + \sigma y^2 + \gamma z^2)$$
(1)

où : λ , σ , γ sont des constantes dépendant de la configuration des électrodes. ϕ_0 est la différence de potentiel appliquée entre l'électrode circulaire et les électrodes hyperboliques. Il a la forme :

$$\phi_{\alpha} = U - V \cos \Omega t \tag{2}$$

où : U : tension d'un courant continu (DC)

- V : tension d'un courant alternatif radiofréquence (RF)
- Ω : fréquence angulaire du courant RF.



Figure L 1: Coupe présentant la configuration des électrodes et définitions de ro et zo.

Considérons le potentiel en un point particulier en appliquant ϕ_0 sur l'électrode circulaire et - ϕ_0 sur l'électrode hyperbolique; on a alors :

$$\phi_{r_{o},o,o} = \frac{\phi_{o}}{r_{o}^{2}} \lambda r_{o}^{2}$$
(3)

par symétrie : $\phi_{o,r_o,o} = \frac{\phi_o}{r_o^2} \sigma r_o^2$ (4)

tandis que sur la coordonnée z on a : $\phi_{o,o,z} = -\frac{\phi_o}{r_o^2} \gamma z_o^2$ (5)

Les constantes doivent avoir les valeurs: $\lambda = \sigma = 1$ et $\gamma = -2$ pour satisfaire le Laplacien

 $\left(\frac{\delta^2 \phi}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 \phi}{\delta y^2} + \frac{\delta^2 \phi}{\delta z^2} = 0\right)$, exprimant le lien entre les vecteurs, d'où l'équation :

$$\lambda + \sigma + \gamma = 0 \tag{6}$$

et en remplaçant dans (1) on a :

$$\phi_{xyz} = \frac{\phi_o}{r_o^2} (x^2 + y^2 - 2z^2)$$
(7)

Cette équation est transformée en coordonnées polaires par les transformations standards $(x = r \cos\theta, y = r \sin\theta, z = z)$, puis avec l'identité $\cos^2\theta + \sin^2\theta = 1$, pour donner :

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_o}{r_o^2} (r^2 - 2z^2)$$
(8)

I.2) Mouvement des ions en fonction du temps

La force agissant sur les ions trappés est une force électrique dont l'expression est : $F_e = -e \cdot E(9)$, en sachant que:

$$\phi_z = \int E_z \, dz \tag{10}$$

$$\dot{F} = ma = m \frac{d^2 z}{dt^2} \tag{11}$$

où : E : est le champ électrique créé par l'application du potentiel ϕ sur les électrodes et

e, la charge élémentaire.

En utilisant la forme donnée à ϕ_0 (2), l'expression du potentiel (8) et l'équation (10), on écrit que :

$$E_{z} = \frac{-4z}{r_{o}^{2}} (U - V \cos \Omega t)$$
 (12)

et en remplaçant dans l'équation (9), on a:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = \frac{-4 e z}{r_o^2} (U - V \cos \Omega t)$$
(13)

Cette équation est une équation différentielle du 2^{ème} ordre dont la solution est dite nontriviale. En introduisant un paramètre sans dimension, on peut lui donner la forme d'une équation différentielle dont la solution, trouvée au XVIII^e siècle par le mathématicien anglais Mathieu, est connue. Pour ce faire, on pose :

et

$$\xi = \frac{\Omega t}{2} \quad (14) \quad \Leftrightarrow \quad t = \frac{2 \cdot \xi}{\Omega} \quad \Rightarrow \ dt = \frac{2}{\Omega} d\xi \quad \text{et} \quad dt^2 = \frac{4}{\Omega^2} d\xi^2 \quad \Rightarrow$$

$$\frac{d}{dt^{2}} = \frac{\Omega^{2}}{4} \frac{d}{d\xi^{2}} \quad (15)$$

En introduisant l'opérateur (15) dans l'équation (13), on a alors:

$$m\frac{\Omega^2}{4}\frac{d^2z}{d\xi^2} = \frac{-4ez}{r_o^2}(U - V\cos 2\xi) \iff \frac{d^2z}{d\xi^2} = -\frac{16ez}{mr_o^2\Omega^2}U + \frac{16ez}{mr_o^2\Omega^2}V\cos 2\xi$$
(16)

En posant : $a_z = \frac{16eU}{mr_o^2 \Omega^2}$ (17), $q_z = \frac{8eV}{mr_o^2 \Omega^2}$ (18), et en faisant un raisonnement

analogue pour la variable r: $a_r = -\frac{8eU}{mr_a^2\Omega^2}$ (19), $q_r = -\frac{4eV}{mr_a^2\Omega^2}$ (20), on peut écrire

une équation différentielle généralisée (u = z, r) dite de Mathieu :

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$$
(21)

I.3) Solution de l'équation de Mathieu (approche mathématique)

La solution a la forme:

$$u(\xi) = \Gamma \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \exp((2ni\xi)) + \Gamma \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \exp((-2ni\xi))$$
(22)

où C_{2n} sont des coefficients qui décrivent l'amplitude du mouvement des ions et ne dépendent que de a'_u et q_u .

 $\mu = \alpha + i\beta$ peut être purement réel, imaginaire ou complexe.

Les solutions sont de deux types: appelées stables si u n'est pas infini lorsque ξ croît et appelées instables si u croît sans limite lorsque ξ croît. On constate que si $\alpha \neq 0$ les termes $e^{\mu\xi}$ et $e^{-\mu\xi}$ tendent vers l'infini, donc $\mu = i\beta$. D'autre part, on peut démontrer que les solutions sont périodiques mais instables si β est entier. En résumé, pour que les ions restent à l'intérieur de la trappe et que les solutions soient stables, μ doit être purement imaginaire et β non-entier.



Figure I.3: Graphique imageant la solution mathématique dans l'espace a_u, q_u. Adapté d'après March et Hughes (1991).

Le graphique ci-dessus montre les différentes régions de stabilité en r et en z des ions. Les ions stables dans la trappe sont ceux dont le rapport a_u/q_u se situe dans une zone de stabilité commune à r et z.

N'étant intéressé qu'aux solutions stables dans le temps, on peut réécrire (22) comme:

$$u(\xi) = \Gamma \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \exp\left(2n+\beta\right) i\xi + \Gamma' \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \exp\left(-2n+\beta\right) i\xi$$
(23)

qui peut être transformée avec l'identité trigonométrique : $(\exp i\theta = \cos \theta + i \sin \theta)$

$$u(\xi) = A \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \cos((2n+\beta)\xi) + B \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \sin((2n+\beta)\xi)$$
(24)

L'équation (24), décrit le mouvement des ions trappés (de trajectoires stables uniquement) par rapport à ξ (le temps). La dérivée de cette expression par rapport à ξ , équation (25), nous donne la vitesse instantanée des ions dans la trappe.

$$u'(\xi) = A \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n}(2n+\beta) \sin((2n+\beta)\xi) - B \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n}(2n+\beta) \cos((2n+\beta)\xi)$$
(25)

I.4) Solutions approximées de l'équation de Mathieu

Ces solutions ont pour but de mieux nous faire comprendre le mouvement des ions de la trappe. Dans la fin des années cinquante, Wuerker *et al.*(1959) qui travaillaient sur la sustentation de particules électriquement chargées par des champs électriques radiofréquences, ont pu observer une seule de ces particules dans une trappe et la photographier. Major et Dehmelt, un peu plus tard (1968) donnent également une approximation basée sur le résultat mathématique de l'équation de Mathieu qui permet de mieux visualiser le mouvement et la vitesse des ions trappés.

I.4.1) Méthode de Wuerker et al.

De photographies, obtenues en observant une particule phosphorescente et chargée dans une trappe, Wuerker fait l'hypothèse que la fonction décrivant le mouvement de la particule peut être décomposée en 2 mouvements tels que :

$$z = Z + \delta \tag{26}$$



Figure I.4.1: Reproduction de la photographie du mouvement des ions dans la trappe prise par Wuerker et al. (1959), fondement de leur approximation.

où δ est la composante de plus petite amplitude et gouvernée par une force 2q alors que Z décrit un mouvement d'amplitude bien plus grande mais de fréquence bien plus faible. Comme Z change beaucoup plus lentement que δ , la solution, lorsque le mouvement est stable, consiste en une vibration lente sur laquelle est superposée un mouvement rapide. Sous ces hypothèses, on peut effectuer les approximations suivantes :

$$\delta \ll Z$$
, $\frac{dZ}{dt} \ll \frac{d\delta}{dt}$, $a \ll q$, $Z \approx ct$ (27)

Ces approximations permettent des simplifications de l'équation de Mathieu qui peut alors être réécrite comme (28) :

$$\frac{d^2z}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)z = 0$$
(28)

En remplaçant (26) dans (28), on obtient

$$\frac{d^2(Z+\delta)}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u\cos 2\xi) (Z+\delta) = 0$$
(29)

qui peut être réécrite comme (30) en utilisant les approximations mentionnées en (27) :

$$\frac{d^2\delta}{d\xi^2} + (2q_u \cos 2\xi)Z = 0$$
(30)

L'équation (30) devient alors facilement intégrable :

$$\delta = \iint 2q_u Z \cos(2\xi) . d\xi \tag{31}$$

$$\delta = -\frac{q_u Z}{2} \cos 2\xi \tag{32}$$

Le signe négatif devant l'expression indique que lorsque la particule est stable dans la trappe, le micro-mouvement δ est déphasé de 180° par rapport au mouvement séculaire Z. En remplaçant (32) dans (29) on obtient l'expression de l'accélération instantanée sous forme différentielle :

$$\frac{d^2z}{d\xi^2} = -a_u Z + Zq_u \cos 2\xi + \frac{a_u q_u Z}{2} \cos 2\xi - q_u^2 Z \cos^2(2\xi)$$
(33)

qui, lorsqu'elle est moyennée sur une demi-période (un demi-cycle), donne l'expression de l'accélération résultante :

$$\langle \frac{d^2 Z}{d\xi^2} \rangle = \frac{1}{\pi} \int_0^{\pi} \frac{d^2 z}{d\xi^2}$$
(34)

En laissant tomber les signes de moyennage et en intégrant de $0 \rightarrow \pi$, on obtient (35) :

$$\frac{d^2 Z}{d\xi^2} = -(a_u + \frac{q_u^2}{2})Z$$
(35)

Cette équation différentielle est celle d'un mouvement harmonique. En effet, mathématiquement une fonction dérivée 2 fois redonnant à un facteur près la fonction de départ, comme (36) le met en évidence, ne peut être que de la forme :

$$Z(\xi) = B \sin \beta \xi$$

$$Z'(\xi) = B \beta \cos \beta \xi$$

$$Z''(\xi) = -B \beta^{2} \sin \beta \xi = -\beta^{2} Z(\xi)$$
(36)

La solution de l'équation (35) peut alors être écrite comme:

$$Z(\xi) = B . \sin\left[\left(a_{u} + \frac{q_{u}^{2}}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \xi\right]$$
(37)

en posant :
$$\beta_u = (a_u + \frac{q_u^2}{2})^{\frac{1}{2}}$$
 (38)

En substituant à l'aide de (14), le terme $\beta\xi$ de l'équation (36) pour revenir dans le domaine du temps :

$$\omega t = \beta \xi \to \omega = \beta \frac{\Omega}{2}$$
(39)

et alors :

$$\omega_{u} = \left(a_{u} + \frac{q_{u}^{2}}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \frac{\Omega}{2}$$
(40)

L'équation (40) montre que, pour un jeu de valeurs U, V, Ω , r_o constant, chaque ion d'un rapport m/z défini possède sa propre fréquence séculaire dans la direction de l'axe z et sur celui de r. Ce résultat est fondamental pour la suite des opérations comme on le verra plus tard.

Calculons, par exemple, ω_z , en prenant $a_z = 0$ pour simplifier et en remplaçant q_z par son identité définie en (18) :

$$\omega_z = \frac{\sqrt{2} eV}{mr_o^2 \Omega}$$
 (41) par analogie et à cause de la forme du potentiel $\omega_r = \frac{1}{2} \omega_z$ (42)

(41) et (42) mettent en évidence que la fréquence séculaire (ω_u) est proportionnelle à la charge de la particule trappée et inversement proportionnelle à sa masse pour un jeu de valeurs U, V, Ω, r_o constant. Les approximations utilisées pour trouver ce résultat ne sont valables que si $q_u \leq 0.4$. Le rapport 2:1 entre les fréquences ω_z et ω_r correspond au rapport de la force du champ électrique dans les directions orthogonales. En l'absence de tension continue (dc) $\rightarrow a_u = 0$, on aura des vibrations du type "figure de Lissajou" de rapport 2:1.

I.4.2) Méthode de Major et Dehmelt

La méthode de Major et Dehmelt (1968) part de la solution de Mathieu (24). Cette méthode est plus mathématique que l'approche de Wuerker et par conséquent, il est moins facile de visualiser physiquement ce qui se passe dans la trappe. Elle débouche, néanmoins, après approximations, sur une expression relativement simple décrivant le mouvement des ions trappés et leurs vitesses.

$$u(\xi) = A \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \cos((2n+\beta)\xi) + B \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} \sin((2n+\beta)\xi)$$
(24)

En faisant l'hypothèse que $a_u = 0$, $q_u \ll 1$, ce qui implique que $\beta \ll 1$, on peut négliger tous les termes supérieurs à n = 1 de l'équation (24) et en prenant comme condition initiale B = 0, on a :

$$u(\xi) = A \Big[C_{-2} \cos(2-\beta)\xi + C_0 \cos\beta\xi + C_2 \cos(2+\beta)\xi \Big]$$
(43)

Major et Dehmelt ont montré que sous les approximations utilisées, $C_{-2} \cong C_2 \cong \frac{9}{4}$.qu pour $C_0 = 1$. D'où (43) peut être réécrit comme :

$$u(\xi) = A\left[\frac{9}{4}, q_u \cos(2-\beta)\xi + 1 \cos(\beta\xi) + \frac{9}{4}, q_u \cos(2+\beta)\xi\right]$$
(44)

En utilisant les transformations trigonométriques somme \rightarrow produit, $\left[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta) = 2\cos\alpha \cdot \cos\beta\right]$ (44) peut être écrit comme :

$$u(\xi) = A(1 + \frac{1}{2}q_u \cos 2\xi) \cdot \cos \beta_u \xi$$
(45)

En remplaçant ξ par son identité (14) dans l'équation (45):

$$u(t) = A(1 + \frac{1}{2}q_u \cos\Omega t) \cdot \cos\beta_u \frac{\Omega}{2}t$$
(46)

On voit clairement que cette équation est celle d'un mouvement harmonique de fréquence $\omega_u = \beta_u \frac{\Omega}{2}$ (analogue au résultat trouvé par Wuerker *et al.*) sur lequel est superposé un mouvement de haute fréquence Ω .

L'expression (46) dérivée une fois permet de trouver la vitesse moyenne d'un ion sur son orbite.

$$\langle u' \rangle^2 = A^2 \beta^2 \sin^2 \Omega t + \frac{1}{2} A^2 q_u \cos^2 \Omega t$$
 (47)

Ayant fait l'hypothèse que $a_u = 0$ d'où $\beta_u^2 = \frac{1}{2}q_u^2$ et en utilisant l'identité trigonométrique ($\cos^2 \theta + \sin^2 \theta = 1$), il est aisé de voir que la vitesse moyenne de l'ion sur son orbite est constante pour un q_u donné. En effet :

$$\langle u' \rangle^2 = 2 A^2 q^2 = ct$$
 (48)

Si la vitesse de l'ion est constante, on a la possibilité de le garder indéfiniment en sustentation dans la trappe.

I.5) Notion de pseudo-potentiel

La théorie d'un pseudo-potentiel a été développée principalement par Major et Dehmelt (1968) à partir de l'approximation de Wuerker *et al.* (1959) sur le mouvement des ions dans la trappe. Ce travail permet de trouver une expression simple d'un pseudo-potentiel représentant la profondeur du puits d'énergie dans lequel les ions sont trappés. Autrement dit, c'est l'énergie cinétique qu'un ion d'un rapport m/z défini doit acquérir pour pouvoir sortir de la trappe (Todd et *al.*, 1976).

Pour arriver à l'expression de ce potentiel on utilise l'équation différentielle (36), résultat de l'approximation de Wuerker et *al*. On ne considère dès maintenant que le mouvement séculaire des ions sur l'axe z. On peut donc écrire:

$$\frac{d^2 Z}{d \xi^2} = -\beta_z^2 Z \tag{36}$$

En convertissant (36) dans le domaine du temps à l'aide de (14) et (39), on écrit :

$$\frac{d^2 Z}{dt^2} = -\omega_z^2 Z \tag{49}$$

En se rappelant que l'on a posé: $a_z = 0$, que $r_0^2 = 2z_0^2$ (8) et à l'aide des relations

 $q_{z} = \frac{8eV}{mr_{\sigma}^{2}\Omega^{2}} (18); \beta_{u}^{2} = (a_{u} + \frac{q_{u}^{2}}{2})^{\frac{1}{2}} (38) \text{ et } \omega_{u}^{2} = \beta_{u}^{2} \frac{\Omega^{2}}{4} (39), \text{ on peut écrire}:$

$$\frac{d^2 Z}{dt^2} = -\frac{e^2 V^2}{2 m^2 z_e^4 \Omega^2} Z$$
(50)

Les relations entre l'expression de la force résultante et la force électrique permettent de poser :

$$F = m \frac{d^2 Z}{dt^2} = -e \frac{d\overline{D}_z}{dz}$$
(51)

Où $\frac{d\overline{D_z}}{dz}$ est le champ électrique dérivé du pseudo-potentiel $\overline{D_z}$; en combinant (50)

et (51) on peut écrire

$$\frac{d\overline{D}_z}{dz} = \frac{eV^2}{4mz \frac{4}{2}\Omega^2}$$
(52)

$$\overline{D}_{z} = \int_{a}^{z_{o}} \frac{eV^{2}}{4 m z_{o}^{4} \Omega^{2}} z dz$$
(53)

$$\overline{D}_z = \frac{eV^2}{4\,mz^2_{\sigma}\Omega^2} \tag{54}$$



Figure I.5: Représentation graphique du pseudo-potentiel $\overline{D_{\rm z}}$

Par un raisonnement analogue, on pourrait montrer que $\overline{D}_z = 2\overline{D}_r$ (55). L'expression (54) est celle du pseudo-potentiel. Ce modèle montre que l'ion peut être considéré comme une particule "roulant" sur la paroi d'un bol parabolique à une dimension sur l'axe z, et de hauteur \overline{D}_z , avec une fréquence égale à la fréquence séculaire dans cette direction, ω_z .

Ce modèle prend toute son importance lors d'expériences dans lesquelles l'énergie cinétique des ions trappés est augmentée pour modifier leur énergie interne, via des collisions avec les atomes du bain d'hélium. Lorsque l'énergie interne des ions atteint leur énergie de dissociation, ils se fragmentent. A condition, et c'est là que la notion de pseudo-potentiel intervient, que l'énergie de dissociation à atteindre ne soit pas plus grande que celle du pseudo-potentiel \overline{D}_z . Dans le cas contraire l'ion serait éjecté de la trappe avant de se fragmenter. Le cas opposé extrême serait celui où un ion est si profondément trappé que l'on n'arrive pas à lui donner suffisamment d'énergie cinétique pour augmenter son énergie interne jusqu'à sa dissociation. Dans ce cas, l'ion ne se dissocie pas mais son énergie interne est augmentée. Ces dernières conditions sont impropres pour nos buts mais sont souvent utilisées pour l'étude des ions dans des états vibrationnellement ou électroniquement excités (Todd et *al.*, 1976).

II) Isolement, excitation et éjection des ions

Nous avons vu jusqu'à présent de quelle manière les ions sont trappés. Nous devons maintenant les manipuler afin d'être capable de les isoler, de les exciter et de les éjecter de la trappe sélectivement suivant leur rapport m/z. Les premiers pas dans ce domaine furent effectuées par Fischer (1959), qui proposa une première éjection des ions suivant leur rapport m/z. La méthode consiste "à pousser" les ions hors de leur région de stabilité en balayant l'amplitude du champ radio-fréquence V. Sur le schéma ci-dessous, cela consiste à amener l'ion au delà du point I (mode de fonctionnement de la trappe décrit dans la littérature comme "mode I")



Figure II: Schéma dans l'espace a_u, q_u de la région de stabilité de la trappe la plus proche de l'origine.

Dans les années 1968-82, plusieurs groupes, dont les travaux ont été pour la plupart passés en revue par Todd, (1991), ont montré la possibilité d'isoler un ion de rapport m/z défini en jouant sur la tension continue U et la tension alternative radio-fréquence V de manière à amener l'ion au point J représenté sur le schéma ci-dessus.

A partir de 1984, une nouvelle ère s'ouvre pour le spectromètre ion trap, avec l'éjection sélective par résonance. Dès lors, il est possible d'exciter seulement les ions d'un rapport m/z défini sans perturber les autres ou encore de n'isoler que les ions d'un rapport m/z choisi et d'éjecter tous les autres sans devoir jouer avec la tension continue pour amener les ions au point J du schéma précédent.

II.1) Notions de résonance

L'approximation de Wuerker et *al.* a permis de démontrer relativement facilement que tous les ions d'un rapport m/z défini possèdent une fréquence séculaire qui leur est propre dans la direction z et une autre dans la direction r. Cette section va nous montrer comment tirer parti de cette discrimination (Cooks et *al.*, 1991).

II.1.1) Fonctionnement de la trappe en mode "resonance ejection"

Pour éjecter un ion de la trappe sur l'axe z sans éjecter des ions de masse supérieure ou inférieure, on modifie le fonctionnement de la trappe en ajoutant une tension radiofréquence supplémentaire sur les électrodes hyperboliques



Figure II.1.1: Schéma simplifié de la trappe en mode "résonance".

V et Ω sont respectivement la tension et la fréquence angulaire du champ radiofréquence principal appliqué sur l'électrode circulaire (typiquement : V = 500 V, $\Omega/2\pi = 1,1$ MHz)

 V_S et Ω_S sont respectivement la tension et la fréquence angulaire du champ radiofréquence supplémentaire ou auxiliaire appliqué sur les électrodes hyperboliques. (typiquement : $V_S = 12$ V et $\omega_S/2\pi \cong 500$ MHz)

Ces modifications du mode de fonctionnement de la trappe entraînent une modification du potentiel; par un raisonnement analogue à celui qui nous a conduit à l'équation (8), on a :

$$\phi_{r,z} = \frac{V \cos \Omega t - V_s \cos \omega_s t}{2r_o} (r^2 - 2z^2) + \frac{V \cos \Omega t + V_s \cos \omega_s t}{2}$$
(56)

A l'aide des relations (10), (11) et (14), on obtient une nouvelle équation de Mathieu appelée "équation de Mathieu dirigée" qui a la forme:

$$\frac{d^2 z}{d\xi^2} - 2q_z \cos\left(2\xi\right) \cdot z = \frac{4eV_s}{\sqrt{2mr_s\Omega^2}} \cdot \exp\left(i2\xi\frac{\omega_s}{\Omega}\right)$$
(57)

En posant : $F_s = \frac{eV_s}{\sqrt{2r_o}}$ (58), on peut réécrire l'équation (57) comme :

$$\frac{d^2 z}{d\xi^2} - 2q_z \cos(2\xi) \cdot z = \frac{4F_s}{m\Omega^2} \exp\left(i2\xi\frac{\omega_s}{\Omega}\right)$$
(59)

II.1.2) Solution approximée de l'équation de Mathieu dirigée

A partir de leur approximation (26), élaborée pour résoudre l'équation du mouvement des ions dans la trappe (21), Wuerker et *al.*, (1959) ont développé une solution pour une situation où un champ électromagnétique continu serait appliqué dans la direction de

l'axe z. Mathématiquement, cela revient à trouver une solution particulière au noyau, équation (37), solution de l'équation différentielle (30). Je propose moyennant une approximation supplémentaire de montrer qu'en assimilant, durant un court instant la tension alternative auxiliaire appliquée sur les électrodes hyperboliques à un champ électromagnétique continu, il est possible de comprendre pourquoi seuls les ions de fréquence séculaire ω_z se trouvent perturbés et pourquoi l'échelle de masse peut être étendue à plusieurs milliers de uma.

En partant de l'équation dirigée de Mathieu (59) :

$$\frac{d^2z}{d\xi^2} - 2q_z \cos\left(2\xi\right) \cdot z = \frac{4F_s}{m\Omega^2} \cdot \exp\left(i2\xi\frac{\omega_s}{\Omega}\right)$$
(59)

En posant : A = $\frac{4F_s}{m\Omega^2}$, exp $(i2\xi\frac{\omega_s}{\Omega}) = cte$ (60)

On peut écrire en première approximation que si ξ varie peu sur un $d\xi$ suffisamment grand, A est un paramètre qui pour des raisons mathématiques peut être maintenu constant (60). L'équation (59) peut alors être réécrite comme ;

$$\frac{d^2 z}{d\xi^2} - 2q_z \cos(2\xi) \cdot z = A$$
(61)

Or mathématiquement et en utilisant les approximations en (27), nous avons déjà trouvé le noyau de cette équation différentielle (Ker(f) \Rightarrow A = 0), il reste à trouver une solution particulière qui a la forme :

$$Z(\xi) = B \sin\left[\left(a_{z} + \frac{q_{z}^{2}}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \xi\right] + \frac{A}{\left(a_{z} + \frac{q_{z}^{2}}{2}\right)}$$
(62)

En introduisant la valeur de A dans l'équation (62) et en transformant Ω à l'aide de (39), on écrit :

$$Z(\xi) = B \sin\left[\left(a_z + \frac{q_z^2}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \xi\right] + \frac{4F_s}{m\Omega^2 \beta_z^2} \exp\left(i\frac{\beta_z \omega_s}{\omega_z}\xi\right) \quad (63)$$

En posant : $\Delta = \frac{4 F_z}{m \Omega^2 \beta_z^2} \exp\left(i \frac{\beta_z \omega_s}{\omega_z} \xi\right)$ (64)

On peut écrire (63) comme

$$Z(\xi) = B \sin\left[(a_{z} + \frac{q_{z}^{2}}{2})^{\frac{1}{2}} \xi \right] + \Delta$$
 (65)

De l'équation (63), deux cas sont à distinguer

(i)
$$\omega_{\rm Z} = \omega_{\rm S} \qquad \Rightarrow \qquad \exp\left(i\beta_z\frac{\Omega}{2}t\right) = \exp\left(i\omega_z t\right) \qquad (66)$$

(ii)
$$\omega_{\mathbf{Z}} \neq \omega_{\mathbf{S}} \implies \exp\left(i\beta_{z}\frac{\omega_{s}}{\omega_{z}}\frac{\Omega}{2}t\right) = \exp\left(i\omega_{s}t\right)$$
 (67)

En sachant de l'électrodynamique qu'une force électromagnétique oscillante ne peut interagir constructivement avec une particule chargée oscillante que s'ils ont la même fréquence d'oscillation, on en déduit que seules les particules ayant la même fréquence que le champ auxiliaire bénéficieront du surplus d'énergie apporté par F_s . Ce mode d'éjection , connu sous le nom d'éjection par résonance, va permettre une extension de l'échelle de masse. Comme on l'a vu auparavant, pour éjecter un ion de la trappe l'amplitude du champ radiofréquence principal (V) est balayée de façon à amener les ions au delà du point I représenté dans le schéma de l'introduction de la partie B II.

Si V est balayé de manière tout à fait similaire mais cette fois-ci en présence d'un champ radiofréquence auxiliaire V_s appliqué sur les électrodes hyperboliques, tous les ions vont être amenés successivement selon leur rapport m/z à avoir la même fréquence que V_s , donc à entrer en résonance avec le champ auxiliaire. Lorsque la fréquence séculaire ω_z est égale à ω_s , cas (i), le surplus d'énergie apporté par F_s peut être absorbé par l'ion $(\Delta > 0)$. Dans le cas contraire (ii), les fréquences d'oscillations n'étant pas les mêmes, l'interaction n'est pas possible et les ions trappés n'acquièrent donc pas l'énergie supplémentaire et par conséquent Δ est égal à 0.

Suivant l'amplitude de V_s , les ions trappés peuvent soit simplement accroître leur énergie cinétique, permettant s'ils entrent en collisions avec les atomes du bain d'hélium d'induire des produits de décompositions comme on le verra plus tard, soit, si l'amplitude de V_s est beaucoup plus grande, être éjectés de la trappe.

II.2) Spectrométrie de masse en tandem (MSn , n≥2)

Comme on l'a vu au paragraphe précédent, lorsqu'on travaille en mode "résonance", il est possible d'exciter, d'isoler ou d'éjecter les ions d'un m/z défini sans perturber les autres ions présents dans la trappe. Les ions avec le rapport m/z choisi, nommés dès lors "ions parents", peuvent être accélérés de façon que leur énergie cinétique soit augmentée suffisamment pour que lors de collisions avec les atomes du bain d'hélium, indispensable au bon fonctionnement de la trappe (p = 0.03 mTorr), il en résulte une décomposition du ion parent en ions en fragments, appelés alors "ions-fils" (Busch et *al.*, 1988). La possibilité d'obtenir "des spectres de masse de spectres de masse" n fois (MSⁿ), rend la spectrométrie de masse "ion trap" particulièrement attractive pour la détermination des chemins de fragmentation et pour l'isolement "in situ" d'une substance d'un mélange.

II.2.1) Notions d'activation par collisions dans un "ion trap"

Les énergies de collision en jeu dans un spectromètre "ion trap" interdisent de penser que la conversion de l'énergie cinétique du ion en énergie interne puisse avoir lieu via des mécanismes dit de haute énergie (quelques kV). Il reste donc les mécanismes de basse énergie, c.-à-d. de quelques V à quelques centaines de V (Dawson et Douglas, 1983). Ces mécanismes expliquent la conversion directe de l'énergie cinétique en énergie vibrationnelle. Il en existe au moins trois relativement bien admis, décrit par Shirts (1986) et repris par McLuckey dans sa revue (1992). Avant de chercher à comprendre ces mécanismes, nous devons décrire de manière correcte la situation. Imaginons que l'observateur de la collision soit assis sur le centre de masse du complexe "ion-cible" et qu'il voit arriver d'un côté un ion et de l'autre la cible. La distance séparant les particules est r. Si on dessine le profil de la courbe - Energie interne du complexe en fonction de la distance séparant les particules r, on obtient une courbe de l'allure montrée dans le schéma suivant et dont l'équation est donnée par :



Figure II.2.2: Schéma représentant la variation de l'énergie du complexe en fonction de la distance ion-cible (d'après McLuckey, 1992).

Le premier terme représente la répulsion aux petites valeurs de r (A = 7000 eV, Γ varie entre 1-10 Å⁻¹). Le second terme représente l'attraction aux distances plus grandes due à la polarisabilité de la cible lors de l'approche d'une particule chargée ($\alpha =$ polarisabilité en Å³, *e* est la charge élémentaire). Armés de ces quelques notions de physique des collisions, on peut maintenant décrire les différents types de mécanismes généralement admis pour expliquer la transformation de l'énergie cinétique en énergie interne.
i) "par formation d'un complexe de longue durée": C'est certainement le moyen le plus efficace de convertir de l'énergie cinétique en énergie interne (voir remarque). Un complexe de "longue vie" est formé entre l'ion et la cible. On dit alors qu'ils subissent une collision captive. L'énergie cinétique relative est distribuée dans tout le complexe, qui doit alors se dissocier avant que l'ion puisse se fragmenter; ainsi la fragmentation reflète la structure du ion-précurseur et non du complexe. La durée de vie du complexe croît avec la profondeur du puits de potentiel créé par l'attraction ion-dipôle induit à l'approche du ion de la cible et mathématiquement engendré par le second terme de l'équation (68). La formation d'un tel complexe est favorisée par l'utilisation de cibles polarisables, polyatomiques et par une énergie cinétique faible.

A l'intérieur de la trappe, les fragmentations obtenues par collisions avec les atomes d'hélium n'ont certainement pas été produites par un mécanisme de "formation d'un complexe de longue vie", étant donné que l'hélium est à peu de chose près la cible la moins polarisable que l'on puisse trouver. Par contre, lorsque le gradient de tension entre les lentilles électrostatiques (A1 et A2)¹ croît, accélérant ainsi les ions par rapport aux molécules neutres dans l'interface d'une source électrospray ou ion-spray, les fragmentations en résultant passent certainement via un mécanisme de transfert d'énergie impliquant la formation d'un complexe de longue vie.

Remarque: Si l'on est habitué à sonder la probabilité d'un transfert d'énergie à l'aide du paramètre de Massey :

$$P_M = \frac{t_c}{\tau} \tag{69}$$

où: t_c est le temps d'interaction ion-cible \cong durée de vie du complexe τ est la période du mode de mouvement en question (ici rotationnel)

4

on sait alors que la probabilité d'un transfert d'énergie cinétique en énergie interne sera la plus grande si $P_M \cong 1$. Or expérimentalement, on observe (McLuckey, 1992) que pour ce genre de mécanisme, plus la durée de vie du complexe est grande, plus le transfert d'énergie est efficace. Comment concilier le fait que le paramètre de Massey soit bien plus grand que 1 et que l'efficacité du transfert d'énergie croît lorsque le temps de vie du complexe augmente ? Comme les plus grandes efficacités rotationnelles, la

¹ se réfère à la description du spectromètre donnée ultérieurement.

formation d'un complexe peut alors être considérée comme une collision multiple entre l'ion et la même cible. On peut alors réécrire le paramètre de Massey suivant :

$$P_M = \frac{t_c}{n_+ \tau} \tag{70}$$

où : n est le nombre de périodes écoulées durant t_c

Dans ce cas, on obtient une valeur pour le paramètre de Massey semblable à 1, il n'y a donc pas contradiction.

ii) par chocs entre sphères dures, appelé également "mécanisme de collisions binaires": Ce mécanisme est particulièrement important pour l'activation par collisions dans les conditions MS/MS utilisées communément. Ce mécanisme implique la partie répulsive du potentiel [1^{er} terme de l'équation (68)] et est, par conséquent, du type "sphères dures". Autrement dit, il s'agit d'une collision élastique entre la cible et une partie de l'ion, le reste de la molécule jouant le rôle de spectateur. A l'endroit où la collision a effectivement lieu, la liaison est tordue, et de cette torsion résulte une modification des modes de vibrations de tout l'ion. Par collisions successives, on introduit de plus en plus d'énergie vibrationnelle et par conséquent la molécule finit par se fragmenter lorsqu'on atteint son énergie de dissociation. Bien que l'efficacité de ce mécanisme de conversion de l'énergie cinétique en énergie interne, par choc soit moins grande que celle pour le mécanisme vu précédemment, la quantité d'énergie introduite pour une seule collision est remarquable et peut atteindre 4-5 eV.

Lorsque les ions sont excités avec la tension auxiliaire (V_s) , les collisions se produisant dans la trappe avec les atomes d'hélium conduisent à des fragmentations dont le transfert de l'énergie cinétique en énergie interne se fait certainement par ce genre de mécanisme.

iii) par induction directe de vibrations: Un moyen classique d'excitation vibrationnelle est d'induire un changement rapide des forces de polarisation présentes pendant la collision et il en résulte alors une excitation de l'un ou de plusieurs modes vibrationnels de l'ion. Dans ce cas, l'excitation est due à la variation des dipôles lors du choc. Ce mécanisme est très limité dans les applications MS/MS possibles dans un

spectromètre ion trap car les ions précurseurs n'approchent pas la cible à la bonne vitesse, l'hélium n'est pas une cible assez polarisable, peu de quantité de mouvement peut être transférée lors du choc et enfin ce mécanisme est très dépendant du temps d'interaction.

II.2.2) Séquences de pulses de tensions radiofréquences

Comme on l'a vu auparavant lorsqu'on travaille en mode "éjection par résonance", il est possible d'isoler les ions d'un rapport m/z défini en éjectant tous les autres. Pour ce faire, une séquence de pulses (ou fonction de scans) est appliquée sur l'amplitude du champ radiofréquence principal (V) et sur l'amplitude du champ radiofréquence auxiliaire (V_s). Ces séquences ont la forme:



Figure II.2.2. 1: Représentation typique d'une séquence de pulse appliquée sur V et V_s utilisée lors d'expériences MS/MS est montrée. La signification des différents segments est donnée ci-dessous :

A) Initiation de la séquence de pulse et introduction des ions dans la trappe: Un signal électronique (trigger) initie le début de la séquence de pulse. V est petit permettant ainsi de trapper tous les ions possédant un rapport $m/z \ge 50$ uma. Les deux

demi-lentilles électrostatiques de focalisation (décrites ultérieurement comme L2)¹ possèdent la même tension en leurs hémi-cercles, pendant un temps variant de quelques micro-secondes à quelques centaines de milli-secondes, permettant ainsi aux ions de pénétrer dans la trappe. V_s est alors arrêté.

B) et D) Etapes d'éjection: V est balayé vers le haut et simultanément V_s est enclenché et maintenu constant à une valeur suffisamment élevée pour éjecter tous les ions de rapport $m_i/z < m/z$ (segment B) et $m_i/z > m/z$ (segment D). Remarque: La fréquence du champ radiofréquence ω_s n'est, bien évidemment, pas la même dans les rampes B et D.

C) Isolement de l'ion d'intérêt: L'ion de rapport m/z est isolé en coupant V à la valeur $V_{(m)}$ correspondant à l'amplitude du champ rf qu'il faut appliquer pour faire entrer cet ion en résonance avec la fréquence du champ rf auxiliaire ω_s et par conséquent l'éjecter de la trappe. Pour éjecter les ions de rapport $m_j/z > m/z$, la fréquence ω_s du champ rf auxiliaire est ajustée telle que $\omega_{s(i)} < \omega_{s(m)}$ évitant ainsi que l'ion puisse entrer en résonance lorsque V est balayé vers le haut.

E) Etape d'excitation: V est réglé de façon à amener les ions de rapport m/z à avoir un $q_Z \approx 0.3$. La fréquence du champ rf auxiliaire (ω_s) est ajustée de façon à être égale à $\omega_{(m)}$, fréquence séculaire du ion de rapport m/z sous la tension V. Enfin, V_s est diminué de façon à accélérer les ions du rapport m/z choisi sans les éjecter de la trappe. Par un procédé de collisions successives décrit précédemment [en B *II.2.2*] l'ion va accroître son énergie interne et finir par se fragmenter. Les fragments résultants restent dans la trappe, sans être excités puisque leur fréquence séculaire n'est pas celle de leur précurseur.

F) Enclenchement de l'électromultiplicateur.

G) Phase de détection des ions: V est balayé vers le haut en présence de V_s , maintenu constant à une valeur élevée (6000 mV), les ions sont alors successivement éjectés de la trappe vers le détecteur et les données enregistrées. Une fois que V a atteint

¹ voir description du spectromètre en III 1

sa valeur maximale, il est immédiatement abaissé à la valeur fixée par le signal d'initiation de la séquence de pulses et celle-ci répétée n fois.

Lorsque l'on veut obtenir des spectres de masse du type MS^n (où n>2), les étapes $B \rightarrow E$ sont répétées n fois afin de choisir un nouveau précurseur (ion-fils de l'étape précédente) que l'on excite à son tour afin qu'il se fragmente, donne des ions-fils parmi lesquels on choisira l'ion-parent de l'étape MS/MS suivante.

Une séquence de pulses alternative peut être utilisée dans certaines expériences MS/MS. Schématiquement, elle est très similaire à la séquence décrite ci-dessus. Les segments A, E, F et G demeurent inchangés. La seule différence réside dans l'isolement de l'ion précurseur. Dans ce cas "on n'isole pas vraiment les ions d'un rapport m/z défini" mais "on nettoie l'échelle de masse" jusqu'à la valeur du rapport m/z choisi, en balayant simplement V. Le précurseur est alors excité, se décompose et ses fragments sont expulsés de la trappe et détectés. Vu que l'étape d'excitation est effectuée par résonance, elle est sélective: seuls les ions du précurseur choisi et possédant la bonne fréquence séculaire seront excités. On peut noter toutefois que cette séquence est hybride. En effet, elle mélange deux modes de fonctionnement de la trappe: L'isolement s'effectue en mode I (instabilité sélective des ions) tandis que l'excitation et l'éjection s'effectuent en mode résonance.



Figure II.2.2. 2: Représentation de la séquence alternative de pulses sur les canaux V et V_s.

B), C) et D) Nettoyage de l'échelle de masse: Ces segments permettent de "nettoyer" l'échelle de masse jusqu'à la valeur du rapport m/z choisi, en poussant successivement les ions hors de la trappe (mode I, instabilité sélective).

A), E), F) et G) décrivent les mêmes étapes d'introduction, d'excitation, d'éjection et de détection que celles vues dans la séquence précédente.

III) Partie expérimentale

III.1) Description de l'instrument

Le spectromètre de masse Electrospray-Ion trap (ES/ITMS) sur lequel les expériences ont été effectuées est une version modifiée du spectromètre Finigan-MAT ITMS. L'électronique et les programmes d'exploitation sont restés quasiment d'origine. Les modifications et les recherches pour l'adaptation de la source électrospray ont été effectuées ces dernières années, par les chercheurs d'Oak Ridge et ont fait l'objet de plusieurs publications (McLuckey et *al.*, 1992, Van Berkel et *al.*, 1993, 1992, 1991, 1990). Par contre, l'analyse et la rationalisation de la fragmentation de chlorines protonées par cette méthode, permettant leur caractérisation est à notre connaissance nouvelle. Un schéma du spectromètre est présenté sur la page suivante (Figure III.1). On différencie trois zones:

III.1.1) Introduction de l'échantillon

L'échantillon peut être introduit de trois façons. *i) par infusion continue:* L'échantillon est alors simplement dilué à une concentration adéquate dans un mélange de solvants "sprayables". La seringue contenant le mélange est placée sur un pousse-seringue automatique (Harvard Apparatus) injectant en continu un débit programmé de solution. *ii) par injection directe:* La solution est injectée au travers d'une boucle HPLC, une solution ionique pousse le contenu de la boucle vers l'aiguille afin d'être "sprayé". L'avantage de cette méthode par rapport à l'infusion continue est de faciliter l'analyse des molécules peu stables sous forme ionique, en les protonant par réaction acide-base juste avant leur analyse ou encore de résoudre parfois un problème de solubilité. *iii) au travers d'une méthode de séparation en ligne:* Deux méthodes de séparation en ligne ont fait l'objet de couplage; il s'agit de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et de la chromatographie électrophorèse capillaire (CE). Dans les deux cas, le but est de séparare en ligne un mélange de composés, avant l'analyse de masse.



Figure III.1: Schéma du système ES/ITMS utilisé.

Le moyen le plus naturel d'introduire l'échantillon lorsqu'on travaille en mode MS/MS est l'infusion continue car elle permet de régler la stabilité du spray, de trouver les conditions d'excitation et de calibrer l'échelle de masse sur des pics stables.

III.2.2) Source électrospray et interface liquide-phase gazeuse

En appliquant, à pression atmosphérique, une tension positive de quelques kV sur une aiguille capillaire pleine d'une solution ionique, le diamètre étant très petit, le champ électrique ainsi créé à l'intérieur de l'aiguille est très grand (106 V/m). Les anions contenus dans la solution vont migrer jusqu'à la surface intérieure de l'aiguille pour y échanger leurs électrons. Au contraire, les charges positives vont s'accumuler vers l'extrémité de l'aiguille provoquant une excroissance, de la forme d'un cône et nommé "cône de Taylor". Si la tension appliquée sur l'aiguille est suffisamment grande, ce cône devient instable à cause de l'accumulation des cations en tête d'aiguille. La charge du cône devient plus grande que les forces de tensions de surface, et par conséquent, le cône éclate en gouttelettes de 1 à 2 µm. C'est ce qu'on appelle "électrosprayer une solution". Ce phénomène est connu depuis longtemps; c'est celui qui est utilisé pour disperser certaines peintures. Si ces gouttelettes apparaissent relativement fines à l'échelle macroscopique, ce n'est plus le cas à l'échelle moléculaire. En effet chacune de ces gouttelettes peut contenir facilement 50000 charges. Cependant, sous certaines conditions, il est possible de transformer ces macro-gouttelettes en des petites gouttelettes mono-chargées. Les mécanismes de ce passage (phase liquide-phase gazeuse) sont encore mal connus. Les tentatives de rationalisation de ce transfert de phase sont connues sous le nom de mécanismes de désolvatation des ions. La plupart des théories actuelles ont été passées en revue par Kebarle et Tang en 1993, Deux théories aujourd'hui relativement bien admises et plus ou moins complémentaires sont résumées ici: i) théorie du rétrécissement des gouttelettes (ou Single Ion Droplets Theory): Initialement, la charge et la taille des gouttelettes formées dépendent des conditions opérationnelles, c'est-à-dire de la tension appliquée sur l'aiguille, de la taille du capillaire, du débit de solvant et de la distance entre l'aiguille et la contre-électrode. En général les

conditions typiques utilisées pour la spectrométrie de masse nous amènent donc à avoir des gouttelettes de rayon $R_0 \cong 1.5 \ \mu m$ et d'une distribution assez serrée autour de cette valeur. Leur charge est de environ $Q_0 \cong 10^{-14}$ [C] ce qui correspond à N \cong 50000 charges élémentaires. L'équation de Rayleigh (71) donne la condition limite pour laquelle la charge de la gouttelette devient juste assez grande pour que la tension de surface (γ) soit compensée par les forces de répulsions électrostatiques.

$$Q_R^2 = 64 \ \pi^2 \varepsilon_o \gamma R_R^3 \tag{71}$$

où: Q_R [C] est la charge de la gouttelette, ε_o est la constante de perméabilité du vide, γ [N/m] représente les forces de tension de surface, et R_R [m], le rayon de la gouttelette. Au delà de cette charge limite, la gouttelette n'est plus stable et éclate. Lorsque le méthanol est utilisé comme solvant, la valeur de la tension de surface est $\gamma = 0.0226$ N/m. et par conséquent, la charge limite en fonction du rayon sera de $Q_R^2 \cong 1.264.10^{-10}$. R_R^3 [C²]. Lorsque les gouttelettes sont "sprayées", le solvant (molécules neutres) la constituant va s'évaporer quelque peu d'abord dans l'air du laboratoire puis dans le vide partiel de l'interface, si bien que le volume de la gouttelette va diminuer, augmentant du même coup le rapport de la charge/rayon de la gouttelette (Q_R/R). Lorsque la gouttelette s'est suffisamment rétrécie pour approcher la limite de Rayleigh, elle éclate de manière asymétrique, afin de donner naissance à une gouttelette de rayon sensiblement moins grand mais de charge nettement plus faible et à une vingtaine de gouttelettes beaucoup plus petites mais de rapport Q_R/R à nouveau proche de la limite de Rayleigh. Les séquences d'évaporation et d'éclatement des gouttelettes vont se succéder jusqu'à ce qu'on obtienne une gouttelette contenant un seul ion plus ou moins entouré de sa sphère de solvatation, ii) mécanisme d'Iribarne, l'évaporation des ions: La théorie d'Iribarne (Thomson et Iribarne, 1976) est basée sur l'hypothèse qu'un ion avec sa sphère de solvatation peut être émis d'une gouttelette chargée. Pour décrire le phénomène, on utilise la théorie de l'état de transition. L'ion pour être émis de la gouttelette doit franchir une certaine énergie d'activation et passer par un complexe activé. En ajoutant une

hypothèse supplémentaire sur la forme de cet état (état de transition tardif \rightarrow les produits ressemblent au complexe activé), on peut écrire grâce à l'équation d'Eyring, une équation (72) permettant d'exprimer la constante de vitesse pour l'émission des ions à partir de gouttelettes chargée:

$$k_1 = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{RT}\right) \tag{72}$$

où: k_1 est la constance de vitesse de l'émission.

T: la température de la gouttelette.

h: la constance de Plank.

R: la constance des gaz parfaits.

 ΔG^* : l'énergie libre d'activation évaluée sur la base d'un état de transition tardif et dont l'expression est donnée en (73).

$$\Delta G^* = -\Delta G_s^o - e^2 \left[\frac{N(x_m + d)}{(R_R + x_m).(R_R - d)} + \frac{1}{4x_m} \right]$$
(73)

où: ΔG_s^o est l'énergie de solvatation.

N: le nombre de charges élémentaires contenues dans la gouttelette-mère.

 R_R : rayon de la gouttelette-mère.

d : le rayon de la sphère de solvatation.

 x_m : distance entre la gouttelette et l'ion solvaté à l'état de transition.

Ces équations permettent de faire le lien entre la constante de vitesse d'émission des ions (cte cinétique) et l'énergie de solvatation des ions (cte thermodynamique). Les expressions (72 et 73) permettent donc de prédire à partir de données physico-chimiques, la vitesse, ou autrement dit la rapidité ou encore, la facilité pour un ion de passer de la phase liquide en phase gazeuse¹. Cette théorie, bien que peu utilisée dans les applications

¹On notera de l'équation (73) que plus l'énergie de solvatation de l'ion est grande, plus grande sera l'énergie necéssaire pour former le complexe activé (étant donné que $\Delta G_s^o < 0 \rightarrow -\Delta G_s^o > 0$). Le terme suivant, entre parenthèses, modère l'effet du premier suivant la géométrie de l'état de transition.

pratiques de l'électrospray permet néanmoins aux chercheurs de mieux comprendre les paramètres qu'ils manipulent et le sens dans lequel chercher des solutions, lorsqu'ils sont confrontés à des problèmes de qualité du spray.

Dans l'interface, les lentilles électrostatiques A1, A2 (alors que AL1, AL2 ne sont là que pour modifier la forme du faisceau ionique afin d'améliorer la sensibilité) permettent, suivant la tension qui leur est appliquée d'accélérer les ions désolvatés par rapport aux molécules neutres présentes dans la région (solvants, azote, oxygène, vapeur d'eau, etc.). Les collisions ions-molécules neutres (solvants principalement), suivant un processus de transfert de l'énergie cinétique en énergie interne du type "par formation d'un complexe de longue vie" comme défini précédemment, vont induire la dissociation de l'ion échantillon et produire ainsi des fragments caractéristiques de la structure de l'ion précurseur. Ces fragments sont nommés fragments d'interface ou "interface fragments", par opposition aux fragments obtenus dans la trappe lors d'expériences MS/MS.

III.1.3) Entrée des ions dans le haut vide du spectromètre et trappage

Les ions à analyser sont en phase gazeuse partiellement solvatés ou totalement désolvatés lorsqu'ils pénètrent dans le spectromètre de masse proprement dit. Deux lentilles électrostatiques (L1 et L3) permettent de modifier la vitesse des ions pour les amener à la valeur offrant le trappage le plus efficace. La lentille L2 est en fait composée de deux demi-lentilles (L2A, L2B). La tension appliquée sur L2A est choisie en fonction de L1 et L3 tandis que L2B ne possède la même tension que L2A que pendant le temps de l'introduction des ions dans la trappe (défini par le segment A du schéma représentant la séquence de pulse, Figures II.2.2. *1* et *2*). L2 joue en quelque sorte, le rôle de "robinet à ions". Elle permet le passage des ions de l'interface vers la trappe au début de la séquence d'analyse ou interdit ce passage en défocalisant totalement le faisceau ionique lorsque l'analyse est commencée.

Une fois que les ions sont trappés, ils sont manipulés à souhait pour isoler les ions d'intérêt, les exciter afin de les fragmenter, et les éjecter selon leur rapport m/z vers le détecteur constitué d'une dynode et de l'électromultiplicateur. Les opérations

d'introduction, d'isolation, d'excitation et de détection sont séquentielles et sont répétées toutes les 0.1-1 s, suivant la fonction de pulse utilisée.

III.2) Conditions opérationnelles typiques

Dans cette partie sont regroupées toutes les conditions expérimentales typiques pour l'ensemble des expériences effectuées.

- concentration de la solution analysée: 10-200 µM (10-200 picomole/µl)
- débit de la solution: 1-5 µl/min.
- tension appliquée à l'aiguille (needle): +4 kV (pour des ions positifs)
- pression de co-gaz (N₂): 100-300 kPa (valeurs typiques pour l'instrument)
- distance entre l'aiguille et A1: 2 cm
- tension appliquée sur les lentilles électrostatiques lors des expériences :

(pour des ions positifs)

	gradient normal	gradient élevé	gradient faible
A1 (V)	110	178	85
AL1 (V)	97	169	75
AL2 (V)	110	175	85
A2 (V)	0	0	0
L1 (V)	-252	-252	-252
L2A (V)	-182	-182	-182
L3 (V)	-133	-133	-133

- fréquence de la tension rf principale, Ω : 1.1 MHz
- fréquence de la tension rf auxiliaire, $\omega_s/2\pi \cong \Omega/2$
- amplitude de la tension rf principale, V: $0 \rightarrow 7500$ V
- amplitude de la tension rf auxiliaire, $V_s: 0 \rightarrow 6 V$

- vide: 10⁻⁵ torr,

- vide en présence du bain d'hélium: 10-3 torr (condition de travail)
- temps d'excitation des ions: 10 ms
- dynode: 5-10 kV
- résolution à m/z 500 : 1500 (à la moitié du pic \approx 300 à 10% valley)

10.00

IV) Chlorines protonées et fragmentations induites par collisions: Application de la technique.

L'étude des chlorines sédimentaires par ES/MSⁿ est une application intéressante de cette méthode d'analyse car elle permet sans purification excessive d'identifier des chlorines co-éluantes et/ou difficilement isolables de par leur quantité. Par ailleurs, la diversité des structures des produits de dégradation des chlorophylles, de l'hème et d'autres biotétrapyrroles font qu'il serait hasardeux d'assigner une structure uniquement sur la base de la masse moléculaire. C'est pour cette raison qu'il est intéressant de fragmenter les molécules soit dans l'interface, en modifiant le gradient de tension des lentilles électrostatiques (cas pratique mais limité aux substances purifiées en ligne ou hors ligne). soit en excitant l'ion moléculaire du rapport m/z choisi afin d'obtenir, après sa dissociation, un spectre de masse de ses ions-fils (MS²). Pour l'analyse des chlorines de haut poids moléculaire possédant une chaîne latérale du type phytyl, stéryl, ou encore farnésyl, géranyl etc., la meilleure combinaison possible est l'obtention d'un spectre MS/MS/MS (ou MS³). La première excitation porte sur l'ion moléculaire. Elle permet d'isoler l'ion choisi du milieu, de trouver la relation entre le poids moléculaire et celui du macrocycle "acide", fragment principal formé via un réarrangement de McLafferty. De cette fragmentation principale, la masse moléculaire de la chaîne latérale peut être déduite. Cette information sur l'alcool lié au macrocycle est unique mais néanmoins extrêmement précieuse car, combinée à d'autres analyses, elle permettra d'identifier indubitablement la chaîne latérale¹. La seconde excitation porte sur l'ion correspondant au fragment "macrocycle acide". Elle apporte une information sur les différents substituants du macrocycle et permet par conséquent de l'identifier.

¹ A l'exception des stérols, les chaînes latérales alcools des chlorines ne sont que peu nombreuses, si bien que la connaissance de la masse moléculaire de la chaîne latérale est déjà une bonne indication sur son identité.



Figure IV: Chromatogramme HPLC de la fraction des chlorines non-acides du sédiment de surface du Voua de la Motte. (Conditions HPLC: RP-18, 20:80 n-propanol:méthanol, 3ml/min., détecteur UV 366nm):

Sur le chromatogramme HPLC de la Figure IV, un certain nombre de composés ont déjà été isolés, analysés et identifiés précédemment dans la partie A. Il s'agit de la chlorophyllone, de la phéophytine-*a* et de la pyrophéophytine-*a*. D'autres substances, comme les composés dont la fraction est coloriée en noir sur ce même chromatogramme, n'ont pas pu être isolés individuellement. En effet, leur présence en faible quantité ne permettait pas de multiplier les étapes de purification ni de diminuer la polarité de la phase mobile pour augmenter la résolution, sans en perdre des quantités non-négligeables. De plus, les spectres de l'ensemble de la fraction inconnue de D/EI-MS

montraient que l'échantillon était fortement contaminé par des graisses ainsi que par des pigments jaunâtres co-éluants, ressemblant à des caroténoïdes, et compliquant les spectres au point de les rendre inutilisables. Or, comme nous l'avons dit précédemment, la source électrospray utilisée ne produit pas par elle-même des ions. Tous les ions détectés sont préformés en solution soit par utilisation d'un solvant protique, soit par l'ajout d'un acide. Les échantillons à analyser sont dilués à la concentration 50-200 picomole/µl dans un mélange 50/50 dichlorométhane/méthanol contenant 0.1% (v/v) d'acide trifluoroacétique pour protoner le macrocycle. Dans le cas de mélanges contenant des composés sensibles aux acides ou inconnus, on évitera de mettre un acide, en se contentant de l'acidité du solvant utilisé. Des mélanges 50/50 dichlorométhane/méthanol ou 80/20 méthanol/dichlorométhane ont permis de travailler dans de bonnes conditions de stabilité du spray et avec une sensibilité tout à fait acceptable. La conséquence, et dans notre cas l'avantage d'utiliser une source du type électrospray se situe non seulement dans le fait d'obtenir des fragmentations utiles mais également une "ionisation" sélective des composés du mélange de chlorines inconnues. Eliminant par ce biais non seulement les fragments des contaminations graisseuses par exemple mais aussi leur ions moléculaires. En dernier lieu, cette technique va nous permettre d'étudier et d'établir la séquence de fragmentation des chlorines protonées possédant de faibles excès d'énergie interne, chose qui, à notre connaissance, n'avaient pu être faite auparavant.

IV.1) Fragmentation des chlorines du type pyrophéophorbide-a

Les chlorines dont le macrocycle est du type pyrophéophorbide-*a* sont étudiées à l'aide de la pyrophéophytine-*a*, qui sera notre composé modèle pour rationaliser la fragmentation inhérente à ce genre macrocycle. La pyrophéophytine-*a* utilisée pour cette analyse a préalablement été isolée du sédiment de surface du Voua de la Motte, par chromatographie HPLC hors ligne (conditions chromatographiques détaillées dans la partie A¹). La caractérisation a été effectuée par D/EI-MS, par spectrophotométrie

¹ voir partie expérimentale partie A chapitre III)

UV/visible, par résonance magnétique nucléaire (NMR) et enfin par comparaison des temps de rétention avec des échantillons standards lors des expériences décrites dans la partie A. Le spectre de masse de la pyrophéophytine-a, présenté dans la Figure IV.1. I(a), enregistré lorsque la tension des lentilles électrostatiques de l'interface est réglée pour minimiser la fragmentation, est constitué de l'ion moléculaire $(M+H)^+$ à m/z 813 et d'un seul fragment à m/z 535. Ce fragment correspond à la perte de la chaîne latérale phytyl sous forme de phytadiène, suite à un réarrangement de McLafferty. Notons que ce réarrangement est très courant et apparaît sur les spectres de masse de la plupart des composés possédant une fonction ester, spécialement lorsque le poids moléculaire de l'alcool estérifié devient grand (C>10), et ceci quelle que soit la méthode d'ionisation utilisée. Lorsque le gradient entre les lentilles électrostatiques de l'interface devient grand, le rapport (m/z 535)/(m/z 813) augmente, mais aucun autre fragment significatif n'est observé. La simplicité de ce spectre permet de déduire immédiatement le poids moléculaire de la chaîne latérale et celui du macrocycle acide. Le spectre MS³ de la Figure IV.1. 1(b) nous montre la fragmentation obtenue après les excitations successives de m/z 813 \rightarrow 535 \rightarrow ?. Les fragments résultant permettent de caractériser certains substituants du macrocycle. En effet, la perte de 72 u à partir de m/z 535 est caractéristique de la perte d'acide crotonique (CH₂CHCOOH), qui elle-même dénote de la présence de la chaîne propionique rattaché à l'atome de carbone C-17. La perte de 28 u à partir de m/z 535 peut être interprétée soit comme la perte de C_2H_4 formé à partir du groupe éthyle en C-8 ou la perte de CO en C-13¹. Deux spectres MS⁴ (non-reproduits ici, $813 \rightarrow 535 \rightarrow 507 \rightarrow$? et $813 \rightarrow 535 \rightarrow 463 \rightarrow$?) ont permis d'établir le chemin de fragmentation aboutissant à m/z 435, présenté sur la Figure IV.1. 3. Le mécanisme de fragmentation rationalisant la perte de 72 u est montré sur la Figure IV.1. 4. Les mécanismes rationalisant les pertes de 28 u demanderaient des études en haute-résolution ou avec des marquages isotopiques sur des sites spécifiques; nous proposons néanmoins (Figure IV.1. 4) deux chemins relativement raisonnables permettant d'illustrer les pertes observées.

Pour prouver que la fragmentation principale m/z 535 est indépendante de la chaîne latérale (si celle-ci est suffisamment longue, C>5), nous avons analysé le mélange de chlorine stéryl esters, isolées et caractérisées précédemment dans la partie A. La Figure IV.1. 2(a) présente le spectre ES/MS du mélange de chlorine stéryl esters lorsque la tension des lentilles électrostatiques de l'interface est réglée pour promouvoir la fragmentation. Un seul fragment est observé, m/z 535 caractéristique d'un macrocycle du type du pyrophéophorbide-a. Le spectre MS/MS de m/z 535, présenté sur la Figure IV.1. 2(b), montre comme attendu les fragments caractéristiques du dit macrocycle. En outre, ces expériences supplémentaires permettent de prouver par un autre biais que les stérols de la fraction isolée ne sont liés qu'à une seule sorte de macrocycle, à savoir le pyrophéophorbide-a.



Figure IV.1.1: Spectres ES/MS de la pyrophéophytine-a



Figure IV.1.2 : Spectres ES/MS du mélange de pyrophéophorbide-a stéryl esters

(a) région totale, tension des lentilles basse

(b) région du macrocycle acide, tension des lentilles grande.

121



Figure IV.1 3: Structure et fragmentation de la pyrophéophytine-a





- 28 CO





н





Figure IV.1 4: Schéma des mécanismes de fragmentation postulés pour les pertes de 28 u et 72 u.

IV.2) Fragmentation des chlorines du type phéophorbide-a

Les chlorines dont le macrocycle est du type phéophorbide-a sont étudiées à l'aide d'un standard de phéophytine-a, servant de modèle pour la fragmentation des chlorines

possédant ce type de macrocycle. La phéophytine-a utilisée pour cette étude a été isolée du sédiment de surface du Voua de la Motte et caractérisée également dans la partie A, de manière analogue à la pyrophéophytine-a. La Figure IV.2. 1(a) montre le spectre de masse de la phéophytine-a, lorsque la tension des lentilles électrostatiques est réglée pour promouvoir la fragmentation. L'ion moléculaire est observé à m/z 871, le pic de base est l'ion m/z 593 correspondant à la perte de phytadiène (-278 u) suite au réarrangement de McLafferty à l'instar du modèle précédemment étudié. L'ion m/z 533 résulte de la perte de formate de méthyle (60 u) à partir de m/z 593. Cette fragmentation est facile et dénote la labilité du groupe en C-132. La perte de 60 u à partir du fragment "macrocycle acide" pourra donc ultérieurement être utilisée comme indication de la présence d'un groupe méthyl carboxylique en C-13². Un spectre MS³ (593 \rightarrow 533 \rightarrow ?) [Figure IV 2. I(b)] est utilisé pour tracer la généalogie du fragment m/z 593, permettant ainsi d'établir le chemin de fragmentation proposé dans le schéma de la Figure IV.2. 2. A l'instar de la pyrophéophytine-a, des pertes de 72 u et de 28 u sont observées dénotant respectivement la présence de la chaîne propionique et du méthyle en C-8 ou encore celle du groupe CO rattaché au carbone C-13. Néanmoins, la fragmentation est un peu moins nette que celle de la pyrophéophytine-a, certains fragments n'entrent pas dans la séquence décrite sur la Figure IV.2. 2. Nous considérons ces fragments "anarchiques" comme une conséquence directe de l'élimination du formate de méthyle à partir de m/z593. Cette élimination implique la migration d'un atome d'hydrogène du macrocycle vers le groupe partant, abandonnant le macrocycle probablement sous la forme d'un cation diradicalaire. Ce dernier se fragmente via une fragmentation induite par le radical pour donner les quelques pics non-assignés, ou alors, il est susceptible de se réarranger en un cation sans électron célibataire (closed shell species), pour se fragmenter suivant une séquence similaire à celle de la pyrophéophytine-a, comme décrit sur la Figure IV.2. 2.



Figure IV.2.1 : spectres ES/MS de la phéophytine-a

125



Figure IV.2. 2: Structure et fragmentation de la phéophytine-a

IV.3) Fragmentation de la chlorophyllone-a

La chlorophyllone utilisée comme modèle provient également du Voua de la Motte. Je ne reviendrai pas sur sa caractérisation, étant donné qu'elle a fait l'objet d'une étude dans la première partie de ce travail (partie A). La Figure IV. 3. *I*(a) présente le spectre ES/MS de la chlorophyllone lorsque la tension des lentilles électrostatiques de l'interface est réglée afin de promouvoir la fragmentation. L'ion moléculaire m/z 533 est le pic de base et m/z 515 son seul fragment, généré par la perte d'une molécule d'eau. Comme c'était le cas pour la perte du formiate de méthyle à partir de la phéophorbide-a, cette perte nécessite la migration d'un atome d'hydrogène du macrocycle. Le spectre MS/MS de m/z 533 présenté sur la Figure IV.3. I(b) contient des fragments très similaires à ceux obtenus lors d'analyses d'alkyl-porphyrines métallées (Van Berkel et al., 1991). Or, nous savons de ces études que ce genre de porphyrines est bien connu pour supporter un radical-cation même si l'ionisation est aussi douce que l'électrospray. C'est pourquoi nous pensons que la perte de H₂O transforme la molécule protonée en un cation di-radicalaire sur lequel un électron célibataire serait délocalisé sur l'ensemble du système π électronique du macrocycle alors que le second serait localisé dans une orbitale sp³ du carbone en C-13². Ce radical tertiaire est stabilisé par sa position allylique et rigidifié par les deux exocycles qu'il relie, si bien qu'il n'a pas de moyen de se réarranger, comme le fait la phéophytine-a, avant de se fragmenter. Cette situation permettrait d'expliquer la raison pour laquelle cette chlorine protonée se fragmente via des ruptures homolytiques typiques des radicaux cations. Les deux exocycles restent intacts même lorsqu'on excite fortement m/z 533, ce qui atteste de la stabilité du système. Aucune perte de 72 u n'est observée, dénotant l'absence de chaîne propionique. Une dernière observation tend à montrer que la perte d'eau, et par conséquent l'arrachage d'un proton quelque part sur le macrocycle, est certainement impliquée dans le mode de fragmentation de la molécule. En effet, le fragment (de faible intensité) m/z 505 ne peut être expliqué que par une perte de 28 u à partir de m/z 533. Ce qui montre que la fragmentation homolytique de la molécule est ultérieure à la perte de la molécule d'eau. La Figure IV.3. 2 montre la séquence de fragmentation de la chlorophyllone.

13





Figure IV.3.1 : Spectres ES/MS de la chlorophyllone



Figure IV.3 2: Structure et fragmentation de la chlorophyllone-a

IV.4) Application de la technique et des règles de fragmentation des composés modèles à analyse du mélange de chlorines de structures inconnues.

La fraction coloriée en noir sur le chromatogramme HPLC de la Figure IV a été isolée dans son ensemble. Un spectre UV/visible ainsi qu'un spectre de masse (D/EI)

129

permettaient de penser que cette fraction contenait une quantité non négligeable de chlorines, sans qu'aucune proposition de structure ne puisse être avancée. Les composés sont dissous dans un mélange 50/50 dichlorométhane/méthanol (sans acide afin d'éviter une détérioration éventuelle des substances). Sur la Figure IV.4. *1*, le spectre ES/MS du mélange de substances inconnues est présenté lorsque la tension des lentilles électrostatiques est ajustée afin de promouvoir la fragmentation.



Figure IV.4. 1: Spectre ES/MS de la fraction coloriée en noir sur le chromatogramme de la Figure IV, lorsque la tension des lentilles électrostatiques sont réglées pour promouvoir la fragmentation.

Dans la région des ions moléculaires, trois ions majeurs sont observés, c'est-à-dire m/z791, 845 et 889. Sachant que le mécanisme d'ionisation est la mono-protonation du macrocycle, nous en déduisons que le poids moléculaire est respectivement pour chacun des composés 790, 844 et 888. Dans la région dit "du macrocycle acide" entre m/z 350 et 610, beaucoup de fragments sont observés sans qu'il soit possible de déduire une quelconque relation entre eux, ni avec les ions de la région moléculaire. Pour obtenir une information spécifique sur chacun des ions moléculaires, la tension des lentilles électrostatiques est ajustée afin de minimiser la fragmentation. Les paramètres du spectromètre Ion trap sont réglés afin d'éjecter tous les ions jusqu'à m/z 750 et les propriétés MSⁿ du spectromètre sont utilisées afin d'exciter spécifiquement chacun des trois ions moléculaires pour enregistrer leur généalogie.

Le spectre MS/MS de l'ion m/z 889 présenté sur la Figure IV 4. 2(a) contient seulement quelques fragments ions-fils, m/z 609, 549 et 477. Suivant les règles de fragmentation définies à l'aide des composés modèles, m/z 609 doit correspondre au fragment "macrocycle acide" tandis que m/z 549 et 477 peuvent soit être des fragments de m/z609, soit des fragments d'autres "macrocycles acides" liés à des chaînes latérales plus lourdes. Afin de lever le doute un spectre MS³ (889 →609→?), présenté sur la Figure IV.4. 2(b), a été enregistré. Il présente plusieurs fragments relativement intenses qui démontrent que m/z 889 est un composé de poids moléculaire 888 u, de macrocycle acide 608 u et lié à une chaîne latérale dont le poids moléculaire du fragment résultant du réarrangement de McLafferty est 280 u. En tirant un parallèle avec la fragmentation de la phéophytine-a, on constate, sur la Figure IV.4. 3 et sur le spectre MS³ [Figure IV.4. 2(b), que la chaîne latérale est plus lourde de deux unités de masse atomique, et que tous les fragments caractéristiques de la phéophytine-a s'y retrouvent mais sont déplacés de 16 u, indiquant la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire sur le macrocycle. En se basant sur des considérations biologiques et sur le spectre UV/visible de l'échantillon, on peut raisonnablement proposer la structure de la bactériophéophorbide-a comme celle du macrocycle et celle du dihydrophytol pour la chaîne latérale. A notre connaissance, c'est la première fois que cette bactériochlorine est liée à une autre chaîne latérale que le phytol.





Figure IV.4.2 : Spectres ES/MS du bactériophéophorbide-a dihydrophytyl ester



Figure IV.4 3: Structure et fragmentation du composé isolé de la fraction coloriée en noir sur le chromatogramme HPLC (Figure IV) et, dont l'ion moléculaire protoné est à m/z 889 (Figure IV.4 1).

Des expériences similaires de MS/MS et MS³ ont été effectuées sur les ions m/z 845 et m/z 791. Les résultats sont présentés sur les Figures IV.4. 4(a), IV.4. 4(b) ainsi que IV.4. 5(a) et IV.4. 5(b). Ces spectres de masse nous permettent d'affirmer que les macrocycles de ces deux composés de structures inconnues sont les mêmes. La différence de masse entre ces deux composés réside donc dans leur chaîne latérale; m/z 845 possède une chaîne latérale de poids moléculaire 296 u (278+18), correspondant certainement au phytol, tandis que m/z 791 possède une chaîne latérale de poids moléculaire 242 u (224+18) qui peut correspondre à un alcool C₁₆ saturé, de structure indéterminée. La séquence de fragmentation du macrocycle de ces deux composés est présentée sur la

Figure IV.4. 6(a). En comparant la séquence de fragmentation de ce macrocycle avec celle du pyrophéophorbide-a, les principales différences observées sont d'une part une perte de 44 u dans les deux branches du chemin de fragmentation, et d'autre part, un déplacement des ions m/z 535, 463 et 435, de 32 u. Enfin, comme nous l'avons déjà signalé au début, la chaîne latérale de m/z 791 est moins lourde que le phytol. A l'exception du problème inhérant aux chaînes latérales, auquel une attention particulière sera portée dans un des paragraphes suivants, les autres différences peuvent être expliquées par l'introduction d'une molécule d'eau et d'un groupe -CH2 quelque part à la périphérie du macrocycle. Biologiquement les seuls précurseurs pouvant accepter ces fonctions supplémentaires et posséder une séquence de fragmentation montrant des analogies avec le pyrophéophorbide-a sont les bactériochlorophylles-d ou -c. Ces deux molécules possèdent un groupe éthyle en C-3 à la place du groupe vinyl des composés dérivés de la chlorophylle-a, une fonction hydroxyle sur le carbone C-31 et un groupe -CH2 supplémentaire rattaché à l'atome de carbone C-12 dans le cas de la bactériochlorine du type -d ou en C-20 pour la bactériochlorine du type -c. Pour différencier les deux molécules, il suffirait d'effectuer un MSⁿ mettant en évidence la perte successive de deux éthylène, mais comme nous l'avons déjà vu pour la pyrophéophytine-a (Figure IV.1. 3), le groupe carbonyl en C-13¹ semble également pouvoir être éliminé sous forme d'une perte de -28 u, ce qui complique l'interprétation des résultats. Enfin, comme nous n'avions pas assez de résolution pour différencier les groupes partants (CH2CH2 ou CO), nous sommes penchés sur d'autres techniques spectroscopiques pour différencier les deux isomères. Les spectres UV/visible des composants de la fraction coloriée en noir (Annexes III) montrent une bande d'absorption à 657 nm ne correspondant pas à une absorption de la bactériophéophorbide-a mais plutôt au bactériopyrophéophorbide-d, (cette bande étant déplacée vers 664 nm dans le cas du bactériophéophorbide-c). Bien que faible, cela pouvait être une première indication. En effet, des travaux passés en revue par Hoff et Amesz (1991) on sait qu'un groupe méthyle en position C-20 provoque un déplacement

de quelques 10 nanomètres vers le rouge. Néanmoins, afin de lever toute ambiguïté, nous avons isolé par HPLC puis par chromatographie sur couche mince préparative < 0.1 mg de cette bactériochlorine dans le but d'enregistrer un spectre de résonance magnétique nucléaire (NMR) entre 8 et 12 ppm. Cette plage est la région dans laquelle résonent les protons en position "méso"¹. Le résultat obtenu est sans ambiguïté, trois signaux sont observés à 9.9 ppm (HC-5); 9.7 ppm (HC-10); et 8.8 ppm (HC-20), prouvant que la position C-20 n'est pas occupée par un méthyle. Par conséquent, la molécule ne peut être une bactériochlorine du type -c. Nous proposons la structure de la 8,12-diéthylbactériopyrophéophorbide-d [Structure Figure IV.4, $\delta(a)$] comme étant le macrocycle commun aux ions m/z 845 et m/z 791. Sur la Figure IV 4 6(b), un mécanisme rationalisant la perte de 44 u est proposée, On notera le parallélisme de cette fragmentation avec les autres mécanismes postulés pour la fragmentation des chlorines protonées. De nouveau, suite à une confirmation de ces résultats après hydrolyse et analyse par GC/MS, une interprétation géochimique devra être donnée pour tenter d'expliquer l'estérification de chaînes latérales relativement peu typique pour ce type de macrocycle.

¹ c'est-à-dire les protons attachés aux atomes de carbone C(5), C(10), C(15)




Figure IV.4. 4: Spectres ES/MS² du bactériopyrophéophorbide-*d* dont l'ion moléculaire est *n*/z 845.





Figure IV. 4. 5: Spectres ES/MSⁿ du : bactériopyrophéophorbide-*d* dont l'ion moléculaire est m/z 791.



 Figure IV.4. 6: (a) Structures et fragmentation des composés isolés de la fraction coloriée en noir sur le chromatogramme HPLC (Figure IV) et dont les ions moléculaires sont m/z 845 et 791 (Figure IV.4 1). (b) Rationalisation de la perte de 44 u.

V) Expériences complémentaires et aspects géochimiques

Afin d'identifier la structure des chaînes latérales des bactériochlorines inconnues (fraction coloriée en noir, Figure IV) dont la structure du macrocycle a été caractérisée au point IV, nous avons hydrolysé les chaînes latérales. L'hydrolyse s'effectue de manière similaire à celle décrite pour les chlorine stéryl esters dans la partie A II.2.1. Brièvement, les bactériochlorines sont dissous dans 100 μ L de THF et ajoutées à un mélange 1/1 KOH_{sat} /MeOH (v/v). La solution est portée à reflux 6h. Après extraction et séchage, l'échantillon est dérivatisé avec BSTFA (20 min., 80°C). Les chaînes latérales peuvent alors être analysées par GC/MS. Le programme de température est : 50°C pendant une minute; 8°/min.→200°C; puis 4°/min.→280°C; et enfin 10 min. à 280°C. La colonne capillaire (SE-54) et les autres conditions GC/MS restent similaires aux expériences précédentes. Le chromatogramme du courant ionique total (non-reproduit) montre entre 14 et 28 min, deux pics dominants. Le spectre de masse du composé possédant un temps de rétention de 20.8 min. est celui d'un alcool C_{16} saturé, certainement linéaire. L'autre pic d'intensité importante apparaît vers 24 min. Son spectre de masse nous permet d'identifier le phytol co-éluant avec le dihydrophytol. Les autres composés sont soit des acides gras co-éluants avec les bactériochlorines lors de l'isolement par HPLC, soit des contaminants classiques des solvants organiques. Afin d'être sûr qu'il s'agisse d'un alcool linéaire C16 saturé, nous effectuons une injection d'un standard, puis une co-injection du standard et de l'échantillon. Ces deux expériences confirment la présence d'un alcool linéaire C16 saturé. D'une part, les fragmentations du standard et de l'échantillon sont très semblables et d'autre part la co-injection montre un pic bien gaussien. De ces expériences et des précédentes, nous concluons que nous sommes en présence d'un 8,12 diéthyl 8.12 bactériopyrophéophorbide-d n-hexadécanyl ester. d'une diéthyl bactériopyrophéophytine-d, et d'un bactériophéophorbide-a dihydrophytyl ester.

Géochimiquement, ces trois bactériochlorines possèdent une chaîne latérale qui n'est pas connue pour être liée au macrocycle auquel elles le sont. On revient donc, par un autre biais, au problème de la trans-estérification des macrocycles tétrapyrroliques par les alcools. En détaillant, on s'aperçoit premièrement qu'aucune chlorine biologique isolée ne possède à notre connaissance le dihydrophytol comme chaîne latérale (Scheer, 1991). Deuxièmement, que le phytol n'est pas une chaîne latérale typique des bactériochlorines du type -c, d ou e, bien que Caple et al. (1978) aient montré qu'on en trouvait des traces dans les bactéries photosynthétiques vertes. On leur connaît plutôt des isoprénoïdes du type farnésol ou géraniol. Troisièmement, qu'aucune bactérie ne synthétise des alcools linéaires, et par conséquent, le n-hexadécanol n'est certainement pas la chaîne latérale originale du macrocycle auquel elle est liée.

Si ces chaînes latérales ne sont pas les chaînes originales des macrocycles tétrapyrroliques mais qu'elles sont estérifiées après coup comme nous l'avons montré pour les chlorine stéryl esters, nous devons nous demander quel organisme produit les alcools utilisés comme chaîne latérale ? Le phytol est très présent puisque c'est la chaîne latérale de toutes les plantes supérieures. Les deux sources de dihydrophytol connues à ce jour sont: (i) une réduction du phytol au travers de transformations diagénétiques médiatées ou non par des bactéries et (ii) les archébactéries dont les parois cellulaires en contiennent certaines quantités pour rigidifier leur structure (Killops et Killops, 1993). La source principale des alcools linéaires gras sont les waxes-esters (esters cireux) des plantes supérieures. Dans la partie A II, grâce aux chlorine stéryl esters, nous avons montré que la transestérification des chaînes latérales des chlorines ne pouvait se passer dans le sédiment, mais devait se produire plutôt dans la colonne d'eau. Cependant, nous avions soulevé le problème de la sélectivité. Pourquoi n'estérifier que les stérols ? Pourquoi seule la pyrophéophorbide-a est-elle estérifiable ? Le problème de la sélectivité relance toujours le problème de la "volonté biologique" de créer une nouvelle molécule que dans une finalité précise. Il est donc important de montrer qu'il n'y a pas de volonté biologique dans la création des chlorine stéryl esters mais que leur formation est plutôt la conséquence d'une activité biologique. Nous avons déjà vu dans le chapitre II.3 que le pyrophéophorbide-a n'est pas la seule chlorine susceptible d'être estérifiée à un stérol,

Dans cette partie, nous démontrons que les bactériochlorines peuvent non seulement être transestérifiées mais l'être aussi par des chaînes alcools autres que les stérols. En reprenant le modèle de la transestérification des chlorines se passant dans le tube digestif d'un organisme pélagique hétérotrophe se nourrissant d'organismes ou de détritus présents dans la colonne d'eau, on peut très bien admettre que cet organisme prédateur se nourit de bactéries photosynthétiques, de débris de plantes supérieures et archébactéries et qu'il rejette par défécation des crottes contenant les divers alcools identifiés sous forme de chlorines estérifiées. Ce modèle n'est pas entièrement satisfaisant, car il ne peut expliquer certaines sélectivités. Pourquoi l'alcool C_{16} linéaire est-il estérifié spécifiquement et pas ses homologues ? Ce genre de constatations nous mène à nous demander si ces sélectivités ne sont pas le fait de conditions hydrobiologiques particulières ? Bien que la transestérification des chlorines ne commence qu'à être dégrossie, aucun doute ne subsiste sur une corrélation entre le milieu hydrobiologique et les chlorines transestérifiées. Lorsqu'un certain nombre de paramètres régissant cette corrélation seront mieux compris, on devrait pouvoir, en analysant les chlorines transestérifiées, obtenir des informations hydrobiologiques précieuses pour sonder l'état d'un lac.

VI) Références

- Busch K. L., Glish G. L., McLuckey S. A. (1988) Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry, VHC Publishers: New York
- Caple M. B., Chow H., Strouse C. E. (1978) Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria, the esterifying alcohols of bacteriochlorophyll-c from Chlorobium Limicola, J. Biol. Chem., 253, 6730-6737.
- Cooks R. G., Glish G. L., McLuckey S. A., Kaiser R. E. (1991) Ion Trap Mass Spectrometry, C&EN, 69, 26-41.
- Dawson P. H. and Douglas D. J. (1983) Collisionally activated dissociation of low kinetic energy ions, in "Tandem Mass Spectrometry" edited by McLafferty, Wiley-Interscience, New York, 126-148.
- Fischer E. (1959) Die dreidimensionale Stabilisierung von Ladungsträgern in einem Vierpolfeld, Z. Phys., 156, 1-26.
- Goeringer D. E., Whitten W. B., Ramsey J. M., McLuckey S. A., Glish G. L., (1992) Theory of High Resolution Mass Spectrometry Achieved via Resonance Ejection in the Quadrupole ion Trap, Anal. Chem., 64, 1434-1439.
- Hoff A. J. and Amesz J. (1991) Visible spectroscopy of chlorophylls in "Chlorophylls" edited by H. Scheer, CRC press, 723-738.
- Kebarle P. and Tang L. (1993) From ions in solution to ions in the gas phase: The mechanism of electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 65, 972A-986A.

Killops S. D. and Killops V. (1993) An Introduction to Organic Geochemistry, Longman, Harlow.

Louris J. N., Brodbelt-Lustig J. S., Cooks R. G., Glish G. L., Van Berkel G. J., McLuckey S. A. (1990) Ion isolation and sequential stages of mass spectrometry in a quadrupole ion trap mass spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 96, 117-137.

- Louris J. N., Cooks R. G., Syka J. E. P., Kelley P. E., Stafford Jr G. C. (1987) Instrumentation, Applications and Energy Deposition in Quadrupole Ion-trap Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem., 59, 1677-1685.
- Major F. G. and Dehmelt H. G. (1968) Exchange-Collision Technique for rf Spectroscopy of Stored Ions, Phys. Rev., 170, 91-107.
- March R. E. and Hughes R. J. (1989) Quadrupole Storage Mass Spectrometry, vol. 102 in "Chemical Analysis", 31-125.
- McLuckey S. A. (1992) Principles of Collisional Activation in Analytical Mass Spectrometry, J. Am. Mass Spectrom., 3, 599-614.
- McLuckey S. A., Goeringer D. E., Glish G. L. (1992) Collisional Activation with Random Noise in Ion Trap Mass Spectrometry, Anal. Chem., 64, 1455-1460.
- Scheer H. (1991) Structure and occurrence of chlorophylls, in "Chlorophylls" edited by H. Scheer, CRC press, 3-30.
- Shirts R.B. (1986) Collision Theory and Reaction Dynamics in "Gaseous Ion Chemistry and Mass Spectrometry" edited by Furtrell, Wiley, New York, 25-57.
- Thomson B. A. and Iribarne J. V. (1979) Field induced ion evaporation from surfaces at atmospheric pressure, J. Chem. Phys., 71, 4451-4462.
- Todd J. F. J. (1991) Ion trap mass spectrometer -past, present and future (?), Mass Spectrom. Reviews, 10, 3-52,
- Todd J. F. J., Lawson G., Bonner R. F. (1976) Quadrupole Ions Traps in "Quadrupole Mass Spectrometry" edited by Dawson, Elsevier, 181-224.
- Van Berkel G. J., Quinones M. A., Quirke J. M. E. (1993) Geoporphyrin Analysis Using Electrospray-Mass Spectrometry, *Energy Fuels*, 7, 411-419.
- Van Berkel G. J., McLuckey S. A., Glish G. L. (1992) Electrochemical Origin of Cations Observed in Electrospray Ionization Mass Spectra, Anal. Chem., 64, 1586-1593.

- Van Berkel G. J., McLuckey S. A., Glish G. L. (1991) Electrospray Ionization of porphyrins using a Quadrupole Ion Trap for Mass Analysis, *Anal. Chem.*, 63, 1098-1109.
- Van Berkel G. J, Glish G. L., McLuckey S. A. (1990) Electrospray Ionization Combined with Ion Trap Mass Spectrometry, Anal. Chem., 62, 1284-1295.
- Wuerker R. F., Shelton H., Langmuir R. V. (1959) Electrodynamic Containment of Charged Particles, J Appl. Phys., 30, 342-349.

CONCLUSION:

Ce travail soulève un certain nombre d'interrogations et de questions sur la géochimie des chlorines/porphyrines. Les observations effectuées dans ce travail nous amènent à conclure que les "chemins de travers" de la dégradation de la chlorophylle ou autrement formulé "sa géochimie non-classique", marginalisée jusqu'alors, pourrait jouer un rôle plus important que prévu aussi bien dans la phase d'incorporation des macrocycles tétrapyrroliques au kérogène -et par ce biais dans la formation des pétroles, qu'en chimie de l'environnement. Parmi les observations conduisant à ces déductions, on rappellera que nous avons:

- caractérisé une nouvelle chlorine sédimentaire, la chlorophyllone-a, possédant un exocycle à 7 membres et précurseur potentiel des di-DPEP. Ce composé a été isolé en quantité importante par rapport à la phéophytine-a et à la pyrophéophytine-a. Cette concentration atteste qu'il s'agit certainement d'un produit de dégradation de la chlorophylle et non d'un biomarqueur spécifique d'un organisme.
- démontré que les chlorine stéryl esters se forment dans la colonne d'eau. Cette réaction d'estérification est probablement catalysée dans le tube digestif d'un organisme hétérotrophe. La variation de concentration des chlorine stéryl esters, de la colonne d'eau au sédiment, par rapport à celle de la phéophytine-a et de la pyrophéophytine-a semble montrer que l'hydrolyse des chlorine stéryl esters est plus lente que celle des produits de dégradation classique de la chlorophylle et par ce biais pourrait moduler les quantités de macrocycles tétrapyrroliques incorporées au kérogène. Contribuant ainsi plutôt à la formation de kérogène du type I dont les molécules sont peu aromatiques.
- utilisé la théorie du trappage des ions par des champs radio-fréquence pour l'obtention de spectres de masse du type MSⁿ, nous permettant de caractériser des bactériochlorines à chaînes latérales peu habituelles dans un mélange naturel difficilement purifiable.
- étudié enfin en détail la fragmentation des chlorines protonées lorsque leur énergie interne est augmentée par collisions avec des atomes d'hélium jusqu'à dissociation. Les chemins de fragmentation proposés permettent en quelque sorte de systématiser la caractérisation du macrocycle.

Annexes:

Annexe I: Dictionnaire des abbréviations

- D/CI(-MS): spectrométrie de masse avec l'échantillon désorbé thermiquement de la surface d'un filament d'une sonde étendue, ionisation chimique.
- D/EI(-MS): spectrométrie de masse avec l'échantillon désorbé thermiquement de la surface d'un filament d'une sonde étendue, ionisation en impact électronique.
- ES-MS: spectrométrie de masse couplée à une source électrospray.
- FAB: méthode d'ionisation par bombardement avec des atomes rapides.
- GC/MS: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- HPLC: chromatographie liquide haute performance.
- ITMS: spectrométrie de masse ion trap
- NMR: résonance magnétique nucléaire.
- MS: spectrométrie de masse ou spectre de masse (suivant le contexte).
- MS/MS: spectrométrie de masse en tandem ou spectre de masse d'un spectre de masse.
- MSⁿ: spectrométrie de masse permise, entre autres, par les spectromètres du type ion trap et permettant d'obtenir n fois un spectre de masse d'un spectre de masse.

TLC: chromatographie sur couche mince.

Annexe II:

Structures des stérols discutés dans le texte



1. cholestérol (cholesta-5en, 3β-ol)



2. brassicastérol (24-méthyl cholesta-5, 22-dien- 3β -ol)

Her CS Brit

3. campestérol (24-méthyl cholesta-5en, 3B-ol)



4. stigmastérol (24-éthyl cholestan-5, 22-dien, 3 β -ol)



5. β-sitostérol (24-éthyl cholesta-5en, 3β-ol)



6. dinostérol (4 α ,23,24-triméthyl cholesta-5, 22dien, 3 β -ol)





7. citrostanol (4α-méthyl, 24-éthyl cholesta-3β-ol)

Xa. squelette stéroïdal du stanol associé au stérol X





(a) chlorophylle-a; (b) pyrophéophorbide-a méthyl ester



(b) chlorophyllone.



(b) bactériopyrophéophorbide-d n-hexadécanyl ester.



mélange de bactériochlorines analysé dans la partie B.

Annexe IV: Abstract

This work can be divided into two parts. Part one reports the isolation and characterization of sedimentary chlorins in relation with their geochemistry. The second part shows the utility of the electrospray ion source coupled with ion trap mass spectrometry, for characterizing a complex mixture of chlorins.

The first part is a study of the geochemistry of chlorins and porphyrins and presents the classical pathway of the chlorophyll-*a* degradation, but geochemists have discovered some chlorin components in sediment, which they cannot related to classical geochemistry. One can propose for these compounds the name, "products coming from a non-classical geochemistry of chlorins". We have studied more specifically two classes of these products, the chlorin steryl esters and the chlorins/porphyrins with a seven membered exocycle.

The chlorin steryl esters are a class of biomarkers which link various degradation products of chlorophyll (pyropheophorbide-*a*) to sterols. We have extracted them from a surface sediment (Motte lake in France) by ultra-sonic extraction (liquid-liquid), then isolated by TLC and reverse-phase HPLC chromatographic methods. A fraction containing the chlorin steryl esters was analyzed by UV/visible spectroscopy and mass spectrometry in D/EI. Desorption from an extended probe is a technique allowing to record spectra in EI or CI mode and to desorb rather polar compounds with large molecular weights without producing too much thermal degradation. The sample is deposited on a platinum wire which penetrates into the ion source and is heated by Joule effet. After having rationalized the fragmentation of commercial pyropheophorbide-*a* methyl ester and two well-known degradation products of chlorophyll-*a*, i.e. pheophytine-*a* and pyropheophytine-*a*, we have analyzed the fraction containing the unresolved mixture of chlorin steryl esters. By

comparing the fragmentation with that obtained with synthetic pyropheopheophorbide-a stigmasteryl ester, we could identify without any doubt the presence of different sterols attached to a unique type of macrocycle (pyropheophorbide-a). Although the method allowed the complete identification of the chlorin steryl esters, we nevertheless decided to hydrolyze the sterols from the tetrapyrrolic macrocycle so as to get results comparable with the ones reported in the litterature and to compare the sterol distribution with that of the free sterols in the surface sediment and water column. These analysis were performed by GC/MS after TMS-derivatization of sterols. Our results seem to prove that the formation of the chlorin steryl esters takes place in the water column and that the reaction should be biologically mediated. Some geochemical aspects are also presented.

The second class of chlorins we have studied is that of the chlorins/porphyrins with a seven membered exocycle. We have found an abundant unknown chlorin in Motte lake surface sediment. We have isolated this compound using TLC and HPLC chromatographies and characterized it by UV/Visible spectroscopy and mass spectrometry in D/EI. After TMS derivatization, a high resolution mass spectrum was recorded to yield the exact elemental composition. Some ¹H-NMR and COSY (homonuclear) experiments confirm the proposed structure i.e. that of chlorophyllone-*a*, a new sedimentary chlorin. We assume that it is formed in water column and connect it with more mature chlorins and porphyrins having also a seven membered exocycle. Some geochemical interpretations in relationship with sulfur bonded chlorins and paleontologic environment are proposed,

In part two, we describe the use of an electrospray ion source system coupled with an ion trap mass spectrometer in order to analyze a complex mixture of chlorins which are difficult to isolate by classical chromatographic methods.

First, we have been interested in the motions of the ions in the trap and in MSⁿ techniques. We describe the form of the electrical potential generated by the geometry of the electrodes and by the radiofrequency voltage. A non-trivial differential equation (named Mathieu's equation) describes this motion. We give the mathematical expression of the solution and two physical approximations to resolve it. One of them (first proposed by Wuerker et al.) is based on the picture of a fluorescent charged particle moving in the trap. This picture allows to decompose the trajectory of the ion in two distinguable motions: a secular motion and a micro-motion superposed on the first one. This approximation permits to rewrite the Mathieu equation as a simple differential equation. The solution becomes trivial and shows clearly that each ion with a defined m/z has a single secular frequency. The consequence is the discrimination of the ions as a function of their m/z value inside the trap. Now, if we add on the end-cap electrodes an additional radiofrequency voltage in resonance with the secular frequency of the selected ion, we have the possibility to excite it (or to eject it) without disturbing the other ions present in the trap. The excited ion can convert its kinetic energy in internal energy via energy conversion processes described as hard sphere collisions or long life complex formation types. When the internal energy is higher than the dissociation potential, the ions fragment and their fragmentation is characteristic of this structure. We thus obtain MSⁿ spectra with an ion trap mass spectrometer.

We have then analyzed by the ES/ITMS technique some degradation products of chlorophyll, which had already been isolated and characterized in part one of this work (i.e. pyropheophytin-*a*, pheophytin-*a*, chlorophyllone-*a*). We have rationalized the fragmentation pathways and explained the similitudes and the differences of the fragmentation between the different compounds and between the different ionization technique (ES and D/EI mode). The last part of this work deals with the characterization of the individual compounds in an unknown natural chlorin mixture using the MSⁿ technique with the ion trap mass spectrometer to isolate and to fragment each component of this mixture inside the trap. With the help of the fragmentation pathways etablished just before, we have identified the macrocycle of these chlorins as being bacteriopheophorbide-*a* linked to a 280 u molecular weight side chain and bacteriopyropheophorbide-*d* linked with two side chains of molecular weights 278 u and 224 u respectively. Some complementary GC/MS experiments allowed us to identify the side chains as dihydrophytol, phytol and *n*-hexadecanol. As these side chains are unusual for these kind of macrocycle, it is possible that these compounds are transesterification products of chlorins as was the case for pyropheophorbide-*a* steryl esters.



