HAL open science

Recherche de chimie prébiotique et d'indices de vie sur les mondes océans par analyse in situ de matière organique

Valentin Moulay

To cite this version:

Valentin Moulay. Recherche de chimie prébiotique et d'indices de vie sur les mondes océans par analyse in situ de matière organique. Planétologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASP092 . tel-04315128

HAL Id: tel-04315128

https://theses.hal.science/tel-04315128

Submitted on 30 Nov 2023

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

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

Recherche de chimie prébiotique et d'indices de vie sur les mondes océans par analyse *in situ* de matière organique

Search for prebiotic chemistry and clues of life on the ocean worlds through in situ chemical analyses of organic matter

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 127, astronomie et astrophysique d'Ile-de-France
Spécialité de doctorat : Astronomie et Astrophysique
Graduate School : Physique. Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **LATMOS** (Université Paris-Saclay, UVSQ, CNRS), sous la direction de **Cyril SZOPA**, Professeur des Universités, et sous le co-encadrement de **Caroline FREISSINET**, Chargée de recherche

Thèse soutenue à Guyancourt, le 23 octobre 2023, par

Valentin MOULAY

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Ronan MODOLO Professeur des Universités, UVSQ/LATMOS	Président
Pauline POINOT Maître de Conférences, Université de Poitiers	Rapportrice et Examinatrice
Gabriel TOBIE Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur et Examinateur
Christelle BRIOIS Maître de Conférences, Université d'Orléans/LPC2E	Examinatrice
Vincent GROSSI Directeur de Recherche, CNRS	Examinateur

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASP092

ÉCOLE DOCTORALE
Astronomie
et Astrophysique
d'Île-de-France (AAIF)

Titre : Recherche de chimie prébiotique et d'indices de vie sur les mondes océans par analyse *in situ* de matière organique.

Mots clés : Mondes océans, Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), analyses chimique *in situ*, analogues naturels.

Résumé : La présence d'océans sous la surface de certains des satellites glacés de Jupiter (*e.g.* Europe) et de Saturne (*e.g.* Titan, Encelade) couplée à l'existence de geysers permettant l'échantillonnage de leurs profondeurs a fait émerger le fort potentiel exobiologique de ces corps planétaires du système solaire. De telles découvertes ont suscité le développement de futures missions spatiales (*Dragonfly* pour Titan et concepts de missions pour Europe et Encelade) pour comprendre la chimie de surface de ces mondes océans, et par extension de rechercher des traces de chimie prébiotique ou de vie passée ou actuelle. La quête de telles signatures nécessite un analyseur chimique à bord des sondes qui seront envoyées dans le système solaire externe. De nombreuses techniques analytiques peuvent être mises en œuvre mais la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) apparaît comme une technique de premier choix pour tenter de répondre à ces questions, de par son héritage dans l'exploration spatiale, sa capacité à analyser une large gamme de composés organiques et son potentiel pour détecter des biosignatures notamment par l'étude de l'énantiomérie des espèces chirales.

L'objectif de ce travail de thèse est de préparer la future analyse chimique *in situ* de ces lunes glacées, d'une part par l'amélioration des connaissances scientifiques et d'autre part par l'optimisation technique des instruments. Il s'agit d'évaluer et d'optimiser les capacités analytiques de la CPG-SM et des méthodes de préparation d'échantillon associées, afin de détecter des molécules organiques et biosignatures avec les contraintes analytiques connues et/ou attendues sur ces corps planétaires (richesse en matière organique des échantillons prélevés pour Titan et présence d'eau de sels pour les échantillons à la surface d'Europe et d'Encelade). Dans le cas d'Europe et Encelade, l'étude d'échantillons hypersalins terrestres a permis de mettre en avant les capacités de la CPG-SM et des méthodes de prétraitements associées pour la recherche de molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie malgré la présence de sels. Pour évaluer l'impact du sel sur ces méthodes, le développement d'un protocole de dessalement a été entrepris et mis en place. Outre l'aspect analytique, mon travail a permis la sélection et la caractérisation des performances des colonnes chromatographiques (générale et chirale) qui seront intégrées à l'instrument DraMS à bord de la sonde Dragonfly (*e.g. Dragonfly Mass Spectrometer*, DraMS). Pour ces différents aspects, ce travail s'est appuyé sur l'étude d'échantillon analogues synthétiques (tholins pour Titan) mais aussi naturels (lac hypersalin pour Europe et Encelade).

ÉCOLE DOCTORALE
Astronomie
et Astrophysique
d'Île-de-France (AAIF)

Title: Search for prebotic chemistry and clues of life on ocean worlds through *in situ* chemical analyses of organic matter.

Keywords : Ocean worlds, Gaz chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), *in situ* chemical analyses, analog samples.

Abstract: The presence of oceans beneath the surface of some of Jupiter's (*e.g.* Europa) and Saturn's (*e.g.* Titan, Enceladus) icy satellites, coupled with the existence of geysers that allow their depths to be sampled, has highlighted the strong exobiological potential of these planetary bodies in the solar system. Such discoveries have motivated the development of future space missions (*Dragonfly* for Titan and mission concepts for Europa and Enceladus) to understand the surface chemistry of these ocean worlds, and by extension to search for traces of prebiotic chemistry or past or present life. The search for such signatures requires a chemical analyzer on board the probes that will be sent into the outer solar system. Many analytical techniques can be used, but gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) appears to be one of the best techniques for answering these questions, thanks to its heritage in space exploration, its ability to analyze a wide range of organic compounds, and its potential for detecting biosignatures, especially by studying the enantiomery of chiral species.

The aim of this thesis is to prepare for future in situ chemical analysis of these icy moons, both by improving our scientific knowledge and by technically optimizing our instruments. The main purpose is to evaluate and optimize the analytical capabilities of GC-MS and associated sample preparation methods, in order to detect organic molecules and biosignatures within the analytical constraints known and/or expected on these planetary bodies (richness in organic matter in samples from Titan, and presence of water and salts in samples from the surface of Europa and Enceladus, etc.). In the case of Europa and Enceladus, the study of hypersaline terrestrial samples has highlighted the ability of GC-MS and associated pretreatment methods to find organic molecules of interest for exobiology, despite the presence of salts. In order to assess the impact of salt on these methods, a desalination protocol was developed and implemented. In addition to the analytical aspect, my work has enabled the selection and characterization of the performance of the chromatographic columns (general and chiral) that will be integrated into the DraMS instrument on board the Dragonfly probe (*e.g.* Dragonfly Mass Spectrometer, DraMS). For these different aspects, this work was based on the study of synthetic analogous samples (tholins for Titan) as well as natural ones (hypersaline lake for Europa and Enceladus).

Remerciements

De par la curiosité des gens
Il semblerait que les remerciements
Dans une thèse de doctorat
Soient la seule partie que chacun voit.
En guise de changement et d'amusement,
Plutôt que l'option d'une prose classique
Au LATMOS, pour un aperçu de ces trois ans,
En vers et rimes, voici mon genre poétique.

Caroline et Cyril

Caro et Cyril un grand merci,
Pour le choix du doctorat,
C'est un récit dans ma petite vie,
À jamais inscrit en moi.

La méthodologie scientifique,
Ancrée en moi comme une logique.
Pour les projets DraMS et EMILI,
Merci à vous de m'avoir investi.
Pour m'envoyer en conférences,
Merci à vous pour cette chance.
Pour la plus grande des autonomies,
Je dois encore vous dire merci.

Voici le temps d'un peu de raillerie,
Ce ne serait pas moi, sans conneries.

Bien que jamais sans l'HDR,
Promesse tenue ? Promesse en l'air ?
C'est à toi Caro que je m'adresse
Pour ton encadrement en finesse.
Oh tu le sais dans ma vie,
La science en fait partie,
Il y a aussi les sports extrêmes,
Un point commun que l'on aime.

Esprit critique, franc et honnête
Toujours sans aucune prise de tête
Café, croissants, 1h de réunion,
Tes paupières qui tombent au fond.
Oui, Cyril tu te seras reconnu
Ne t'en fais pas, personne ne l'a vu.

Avec humour ces derniers vers,
Sont un trait de mon caractère,
Et c'est sans interlude
Que vous avez ma gratitude.

Ophélie

Après trois ans de colocation,
Dans un bureau, euh… une exposition
Avec un début de thèse ex-aequo
Arrivés au bout, franchement chapeau !
Partager les mêmes directeurs de thèse
Rien à redire, on est balèzes.

Soutien, coups de pouce, toujours le moral,
Comme cobureau c'est l'idéal !
Des personnalités plutôt opposées,
On peut dire que ça a bien marché.

L'avenir t'attend pour la recherche,
Attrape donc toutes les perches.
Bon courage pour les États-Unis
D'avance, un post-doc réussi.

La dernière épreuve c'est le grand oral,
Une étape importante, rien de crucial,
Et cette fois-ci, j'y crois sans le stress
Le 27 septembre, une date sans détresse.

Arnaud

Ta bonne humeur à Centrale,
Lors de manips cruciales (hmm…)
Jamais un instrument ne fonctionne,
Tout ce qu'il nous reste c'est la déconne.

Qu'importe l'endroit, t'es en chaussettes,
De la connerie, tu es en tête,
Bien que quand il s'agit de chimie,
Soudain la connaissance resurgit.

Roi des boîtes à Toulouse,
Toujours un plan, jamais la loose
Opérations SAM ou bien cuites ?
Autour des yeux, l'info fuite.

Un seul regret restera,
Aucune soirée avec toi,
À l'avenir, je nous fais confiance
À coups sûrs une terrible alliance.

David

Toujours le sourire et plein d'idées
Fin de deuxième année et 4 papiers
Un doctorant plein d'ambition
Pour moi aucun doute pour ta passion.

Cœur central du LGPM,
Ça se voit que tout le monde t'aime
Toujours à l'écoute, toujours présent,
Avis et conseils en un rien de temps.

Pas d'inquiétude pour la suite,
Les bons plans tu les intuites,
Un sacré docteur tu feras,
Quelle pagaille dans tes résultats !

Bon courage pour la fin de thèse,
Te connaissant ce sera à l'aise,
Au grand plaisir de se recroiser,
Probablement dans un bar à l'étranger

Vincent et Jamila

Comme des piliers de chaque instru
Sans vous, au LGPM tout est perdu,
Pour votre sourire, votre aide et votre accueil
Votre place, sans doute, est dans ce recueil.

Le jury

Vous avez accepté avec plaisir et courage
De vous lancer dans la relecture de 270 pages
Pour un mois d'août tout en souffrance,
Pour cela vous avez toute ma reconnaissance.

Nathalie et Aymeric

Des collègues… Que dis-je ? Des amis,
Pour avoir assuré mon comité de suivi
C'est bien-sûr Aymeric et Nathalie,
À eux deux, un très grand merci.

Avec le sourire, un œil avisé,
Dans la recherche, toujours beaucoup d'idées,
Avec plaisir et émotions,
Leurs conseils, synonymes de bénédiction.

Bureau 1310

Des remerciements pour un bureau ?
Peu commun, rien d'anormal
Son intérieur et sa déco,
Sans aucun doute, rien ne l'égale.

Stickers, fusée, photos, mobile
Tous les objets possèdent un sens,
Toujours orné d'un certain style,
À chaque passage, tout le monde l'encense.

Je te quitterai avec nostalgie,
Un grand merci pour m'avoir accueilli,
Si pas de recherche comme boulot,
En plan D, je ferai des galeries d'expo.

Labo Chromato

Remercier un labo de manips ?
Voilà quelque chose de peu logique,
Passé des heures là-dedans,
Au bruit devront s'habituer tes tympans

Tous les jours ne sont pas faciles,
Des fuites, des pannes, troubleshooting,
Ne rien lâcher, tenir sur un fil,
Du chromato tu seras king.

Il faut avouer qu'on y est bien,
Hier, aujourd'hui et même demain,
Quelques journées monotones,
Des résultats ! Enfin tu frissonnes.

Team Ping Pong

Après déjeuné tous les midis,
Ça commence, c'est reparti,
Une habitude, même un rituel,
Au Ping-pong, c'est l'heure du duel.

Des matches en simple ou bien en double
La balle va vite mais rien n'est trouble,
Des parties dures, souvent faciles,
Merci à Yann, Jade et Émile.

Le grand classique après une heure,
Bien digéré et tous en sueur,
Comme synonyme de sonnerie,
À 14h, le travail est repris.

Team Latmos

Bistrot du Théâtre

Un petit verre à partager,
Après le travail c'est mérité,
Désolé, vous me connaissez,
Un seul ?? Ce n'est pas assez !

Toutefois à SQY, où se retrouver
Dans cette ville toute grisâtre ?
Je vous propose le bistrot du théâtre,
Aussi simplement appelé le BdT.

Le ralliement dans ce troquet,
La tradition de se rassembler,
C'est bon tout le monde est là,
Il est saoulé, Greg souffle déjà.

Trois, quatre verres, quelques petits Val,
Un shot à son nom, la carte a mal.
La fermeture ?? N'ayez pas peur,
À la coloc, évidemment, il y a after.

Jade

Par où commencer pour ce petit être,
Que je souhaite à chacun de connaître,
Embellir vos journées, les emplir de joie,
Passer du temps avec, c'est OUI pour moi.

Le poème le plus long de ce recueil
Sans aucun doute et sans orgueil,
Celui-ci Jade il est pour toi,
Toutes nos conneries tu trouveras

Après quelques verres au BdT,
D'un coup d'un seul me vient une idée,
Plutôt que SQY sans aucune âme,
Et c'est parti pour Amsterdam.

Sacré week-end mémorable,
House of Ping sur toutes les tables,
Bulbes d'oignons, sauce hollandaise, gouda
Pornstar Martini ça va de soi.

Retour en France et au labo,
Chaque jour un délire nouveau,
OH OUAIS TROP BIEN, Ok SUPER.
Désolé je n'arrive pas à me taire

Au tournoi de ping-pong on se redoutait,
Gagner sans soucis je le pensais
Bien trop pressé d'être en finale,
Finalement toi qui a mis toutes les balles

Comme un hymne je n'ai pas le choix
De ces prochains vers tu as les droits
Tous ces gâteaux, tous gobés,
Voici une strophe pour résumer :
Un Doowap pour Valou,
Un Doowap pour Jadou,
Des pépites de chocolat
J'en ai plein les doigts.

En quête de réponse un soir venu
Problème conjugal, d'argent et de chance
Voici le numéro d'un hurluberlu
MOUSSA dans sa vie quelle délivrance.

Un jour un seul c'est venu comme ça,
La belle histoire des grodougras,
Blablabla bloubiba bloublouba
Cette strophe vous ne la comprenez pas

Comme une certaine impression
Qu'avec ce méli-mélo d'histoire
Le lecteur est en pleine perdition
Il est perdu, là c'est trop tard.

Demoiselle, vile gueuse ou mécréante
En médiéval, loin d'être ignorante,
Qu'ouïs-je, oh ! mais qu'entends-je ?
L'incompréhension, ça rien ne change

POURQUOI IL Y A TANT DE DOS-D'ÂNE ?
UN, DEUX, PEUT-ÊTRE TROIS OU TRENTE DEUX
C'EST TROP POUR MOI, JE DIS ADIEU
WOW MAIS ON DIRAIT LA SAVANE,
LE JEUNE VA VITE, SEUL,
L'ANCIEN CONNAIT LE CHEMIN, L'AVEUGLE

Jade t'as encore bouffé tout le buffet
Sur Apollite t'as pris exemple
Dis donc maintenant tu vas te calmer
Pantalon petit, pourtant il était ample.

Vince arrive, rouge comme une tomate tu es,
Les carottes sont cuites ça te déplaît,
Tu vas pas me prendre le chou avec tes navets
La fin des haricots, y a pas de secret.

Chez Hensoldt toi tu travailles ?

Quel beau rêve, quel beau mirage,
Pour réussir ma thèse quel attirail,
Oh ma fusée, une joie ce coloriage !

Projet JAVA, le seul, le vrai,
Réunion en pause, c'est méga chill,
Conneries, fous rires, ça dérapait,
C'est bon laisse-moi tranquille.

Continuer longtemps je pourrais
Il faut pourtant laisser la place au suivant
Des anecdotes, voici un beau livret
Ce n'est que le début, que le commencement

Cette dernière année je reconnais,
Sans toi n'aurait pas été la même,
La rédaction sans toi j'admets,
Aurait été bien plus extrême.

Maëva

Maëva, jeune chercheuse ou juste stagiaire,
Au CNRS, moi je m'y perds
Cette qualité de réflexion,
Nul besoin d'une confirmation

Au labo, pas avant 11h on te croisera,
Quoi que je dise tu le nieras,
Dark Maeva, du déjà vu
Après une pinte tu t'arrêtes plus

Reine des analogues, des extractions,
Des protocoles toujours à foison,
Pour ces échanges et tes connaissances,
Voilà toute ma reconnaissance.

Thomas

Bien plus que des échanges amicaux,
Avec toi Thomas, aux bas mots,
Labo, bar, resto ou conférences,
L'ouverture d'esprit en pleine aisance.

Malak

Dans les rencontres, une des premières,
La bonne humeur, du caractère,
Pour toi la chimie analytique,
Une évidence, comme un classique.

En espérant que dans l'avenir,
Que le bonheur puisse te sourire,
C'est avec plaisir et envie,
Que pour travailler avec toi je dirai oui.

Robin

Avec QGIS t'es un expert,
Toi le sultan du Taillefer
En rando, sur Terre ou sur Titan,
Que de pauses pour un post-doctorant.
Énième échec pour l'ONERA
Ça va aller Robi Sultana.

Bastien

Pour *DraMS*, le meilleur intégrateur,
Au BdT à n'importe quelle heure
Embuscade, Traquenard et Piège,
Oh bien plus qu'un sortilège

Hugues pour sûr ton vrai prénom,
À 30 ans l'âge de raison,
Rien à redire, toi tu bosses,
WOW ! ESPÈCE DE BEAU GOSSE !

Émile

En escalade, la balade dans le 7a,
Qu'en est-il de ton doctorat ?
Bien meilleur sur un rocher
Que pour écrire des papiers.

Un système digestif dur comme un roc
Bordel !! c'est quoi ces pas de bloc ?
WISDOM désormais dans tes mains
Un jour sur Mars, ce n'est pas certain.

Louis

Master de chimie soi-disant,
Laisse-moi douter en te voyant
Rien ne va plus dans un labo de chimie
Attention vla Louis, rangez la verrerie.

Un grand freestyle dans cette thèse,
Avec les tholins toujours à l'aise,
Le pHmètre tu ne l'aimais pas,
Plutôt que de le briser t'avais d'autres choix.

L'esprit de l'échec et de la patience,
Des résultats sur un coup de chance,
Pas de panique, le moral au plus haut,

Tu feras toujours Paris-LATMOS à vélo.

Un très grand courage pour l'avenir,
Dans cette thèse tu vas t'en sortir,
D'ici décembre, à ta guise,
Je peux te faire des analyses.

Yann

Sûrement l'un des plus durs à décrire
Un personnage, ce n'est pas peu dire.

Quelques théories bancales et farfelues,
Un chapeau, un bonnet, ou un barbu.
Quoiqu'il en soit, ne vous battez pas,
Le convaincre reste un sacré combat.

Cinéphile et prétendument à droite,
Du moins c'est ce que tu miroites,
Pas d'inquiétude et pas de soucis,
Mais oui Yann, je te paierai ton demi.

En attendant l'investissement,
Les valeurs du ping pong tu défends,
Soi-disant l'arme altruiste
Qui nous défera tous des racistes.

Aubin

Bien qu'une rencontre sur la fin,
Je pense que je te le devais bien,
Quelques petits mots et quelques lignes,
Notre amitié que je souligne.

Novice grimpeur bien motivé,
Dans la nature toi tu t'évades,
Randonneur bien confirmé,
Sur les parois tu escalades.

Après 2 ans d'électronique,
Bientôt 13 mois en Antarctique,
Profite bien du continent blanc,
Tel un marin, je te souhaite bon vent !

Alexis

Seulement quelques jours de présence
Amplement suffisants pour comprendre
Que malgré ta régulière absence,
On était clairement fait pour s'entendre

Cycliste et pongiste aguerri,
Autour d'un café et c'est parti,
Des discussions pendant des heures,
Aucun sujet ne nous fait peur.

Jean-Luc

Prince du dev, roi du support,
De ton bureau toujours dehors,
Mises à jour et imprimantes,
Les erreurs qu'est-ce qu'elles sont chiantes.

Métalleux punk c'est convivial,
Le PC d'un GC ce n'est pas trivial,
Geek avéré et bien fêtard,
Tous les deux des couche-tard

Pinte, petit canon ou bien rhum,
Les bouteilles nous on les dégomme
« Petites » pauses à l'ATC
C'est toujours un oui pour trinquer.

Le lundi matin, tête dans le coltard,
Au moment de la croisée des regards
L'un comme l'autre oui on le sait
Ce que chacun de son week-end a fait

À l'occasion avec grand plaisir,
À Niort je suis là pour t'accueillir.

Sadok

C'est toujours au détour d'un couloir
Bienveillance et conneries dans ton regard
Sadok il est temps de sortir du coin
Dans la team AIT, des problèmes ? Aucun.

Tu m'offres des fruits illimités
Tout ce que je donne ce n'est pas chouette
Mes gâteaux tu ne veux pas goûter
Perso je mange des croquettes.

Zoé

De l'autre bout du labo on t'entend,
Ces éclats de rires qu'ils sont stridents,
On ne peut que les reconnaître,
Sans nul doute c'est Zoé qui va apparaître

Les atmosphères tu les maîtrises,
Pour les pompes une sacrée expertise,
Monter une manip en un rien de temps

Deux trois coups de clé, un jeu d'enfant

Quoiqu'on t'ait dit, ne les écoute pas,
À toi de faire tes propres choix,
La recherche ce n'est pas tout,
Faire pousser des betteraves, un bel atout.

En conclusion, à ton honneur,
La déformation d'expressions à toute heure,
Sorties de nulle part quelle invention,
Sans limite doit être ton imagination.

Ludo

Pilier de l'équipe Atmosim,
Sans toi pas d'équipe, même pas de rime,
L'expert des expé et des manips
T'as toujours la bonne clé à pipe

Même sur un GC tu t'y connais,
Aucun instrument ne t'arrête,
Les mains dedans tu les mets,
À chaque composant tu fais sa fête.

Sache qu'importe ce qu'il advient,
Surtout ne change rien,
Guy lui-même l'avouera,
Ludo, le Latmos a besoin de toi.

Latmossiens proches et moins proches

Pour ces visages du quotidien,
Tous les midis autour d'une table,
Quelques rimes dont je suis capable
Pour vous montrer que j'y tiens.

En commençant par Pedro,
Clin d'œil, bb, toujours les mots,

Ou bien Thomas sans hésitation,
Je te crie un « Félicitations »,

Je ne t'oublie pas toi Léa,
Toujours du frais, des bons petits plats.

Et pour Kevin le suivant,
De l'histoire, toi le sachant et passionnant.

Je vous présente maintenant Mallau,
La féministe au mojito

Et voici Nonam ou Manon,
Du degré, sa maîtrise dans le second.

Bien sûr sans omettre Valérian,
La tête dans tous les sens, le café excitant,

Au bout du couloir c'est Dédé,
Sourire en coin, conneries à déballer,

Toute discrète, voilà Lulu,
Un petit sourire, oui je l'ai vu.

Et Yassin prend la conclusion,
Au babyfoot, l'homme de la situation.

Pardonnez-moi si quelques noms
J'ai oublié de mentionner,
Dans ce labo, dans ce cocon,
Croiser les gens ce n'est pas aisé.

Team RED

Je ne savais pas qu'en une semaine,
Quelle chance, quelle aubaine,
Que l'on pouvait devenir si proches
Ensemble toutes les cases on coche

Des séminaires et des projets
Vins à volonté, jamais de rejets,
Une belle chanson ; où ça ? où ça ?
Moi je réponds : « Arrrrrrrgggggg »

En conférences à l'étranger,
Pas le souvenir d'y avoir assisté,
Plus facile de se retrouver dans les rues,
Jusqu'au bout de la nuit on se perd plus.

Sacrée équipe de doctorants,
Quand vous voulez les mêmes je reprends,
Ne vous en faites pas c'est vu d'avance,
En intervenants futurs on recommence

Vass

En voilà une sacrée découverte,
Passer à côté de toi aurait été une perte
Marseille, Atlanta ou bien Grenade
Aucun moment n'est jamais fade.

Je suis pas passé loin de ton post-doc,
Dans mon jury, t'aurais pu être,

Petit duo plutôt loufoque
De la science ensemble un jour peut-être

Recherche ou pas, ça ne change rien,
Chinon ou Côte du Rhône, sacrés vins,
Dans les catacombes, ou n'importe où
En spéléo, je te suis partout.

Théo

Pour une coloc, on fait la paire
Tomber sur mieux, c'est impossible,
Une découverte, un ami et même un frère,
Sache que pour toi toujours disponible.

Quelques soirées bien arrosées,
Au BdT puis à l'appart,
Qu'importe l'heure y a à manger,
Un petit verre faut que ça reparte.

En nocturne, un tour aux urgences,
Oh un trottoir, vraiment pas de chance
Changement de roue, vite on se rattrape
Jamais je ne verrai les urgences de Trappes.

Au fourneau ou en commis,
Quoiqu'on prépare c'est un délice,
Surtout mets y du tien et tes envies
C'est toi le chef sur les épices.

L'accent du Sud en Ile de France,
Un petit Ricard pour la confiance.
Improvisation d'une dégustation
Les papilles en pleine palpitation.

De l'agriculture sacré salon,
Ton grand amour pour les régions,
Les lèvres pleines de couleurs,
Un aperçu des dernières heures.

Chez Syngenta ou apiculteur,
Je crois bien que rien ne te fait peur
Je ne suis pas inquiet pour le futur
On se retrouvera, sois en sûr !

Candice

Remercier les gens sans que tu y sois,
C'est impossible, ce n'est pas moi,
Pour ta présence au fil des mois,
Dans le bonheur et dans la joie.

La pleine nature au centre de nos vies
Rando, bivouac, escalade, kite et ski,
Il semblerait que pour tout ça
Les mêmes envies on aura

Vivre dans les montagnes un jour
Moi je suis carrément pour,
Avec toi repartir en Afrique,
C'est devenu notre classique.

Les Forsitains

Même pas sûr qu'une thèse suffise,
Pour vous remercier, vous rendre grâce
Même pas sûr qu'un de vous la lise
J'avoue, même moi ça me dépasse

De vos prénoms, de vos surnoms,
Je pourrai faire une énumération,
Je ne suis pas sûr que cela soit nécessaire
En vous, j'y crois dur comme fer.

La famille

Les frangins

Commençons par les deux frères,
Un petit, un grand, je suis bien centré
Tous les deux sacrément littéraires,
Que des rimes pauvres j'en suis désolé…

Pas de commentaire sur la métrique,
Sans aucune règle c'est moins classique,
Tout de même quelques figures de style,
Le poème simple, c'est mon idylle.

Petit soutien du quotidien,
Quelques petits mots, ça va ça vient,
Jebi, Pierre-Ca vous le savez,
Sur vous deux on peut compter.

Papa

Bien plus les pieds sur Terre que moi,
Tu sais j'ai aussi besoin de ça,
Toujours des petites touches de curiosité
Et pour mon sujet un certain attrait.

Nathalie

Un grand merci pour ta présence,
À chaque instant, à n'importe quel moment
Discuter avec toi en toute aisance,
C'est toujours un plaisir d'y passer du temps.

Pascal

C'est toujours avec une certaine philosophie
Que tu abordes chaque situation de la vie
Des questionnements perspicaces ?
Toujours dès que ça concerne l'espace.

Dolcita mamma

Il me semblait inné et logique
De finir par toi maman,
Après trois ans seulement
En sciences exactes c'est bien pratique.

Pour tes mots doux et ton soutien
Nous ne sommes jamais bien loin,
La traversée d'un doctorat,
Pas mieux que toi pour connaître ça.

Clôture

Après ce grand nombre de strophes,
Je ne partirai pas en catastrophe,
Ces derniers vers annoncent la fin,
D'une aventure ça c'est certain.
Reste donc à nous de décider
De continuer de la prolonger.

Comme le vent, ces trois ans,
Qui ont filé à toute allure,
Sans vous tous, ça j'en suis sûr,
Auraient été moins gouleyants

Que diriez-vous de dernières rimes ?
Oh que vous en êtes légitimes.
C'est avec sourire et passion,

Que les mots sont remplis d'émotion.
Que me pardonnent ceux que j'ai omis,
Voici le plus sincère des mercis.

Sommaire

Liste des abréviations 18

Avant-propos 20

Chapitre 1 : La place des mondes océans pour la recherche de vie dans le système solaire. 22

1. Où chercher la vie dans le système solaire ? 22

1.1. Les mondes océans : des satellites glacés chaleureux ? 23

1.1.1. Les satellites galiléens 23

1.1.2. Les satellites de Saturne 29

1.1.3. Hypothèses sur l'existence d'autres mondes océans dans le système solaire. 37

2. La matière organique : une clé pour la recherche de vie sur les mondes océans. 40

2.1. La quête de biosignatures et de bioindices 40

2.1.1. Molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie 40

2.1.2. La chiralité et l'excès énantiomérique 45

2.1.3. D'autres potentiels bioindices 46

2.2. L'analyse *in situ*, un indispensable dans la quête de matière organique. 46

3. L'instrumentation chimique pour l'analyse in situ de la matière organique sur des mondes océans. 47

3.1 Le choix de l'analyse chimique selon les composés cibles 48

3.1.1. La désorption-ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse 48

3.1.2. Les techniques séparatives et d'analyse chirale 49

4. *Les projets de futures missions d'analyse in situ à destination de Titan, d'Europe et d'Encelade.* 59

4.1. La mission Dragonfly et l'instrument DraMS 59

4.2. La mission Europa Lander et l'instrument EMILI 62

4.3. Les missions à destination d'Encelade 64

5. Objectifs de thèse 65

6. Références 68

Chapitre II : Étude du processus de dérivatisation au diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA) de composés azotés pour leur détection à la surface de Titan avec la mission *Dragonfly*. 77

1. Objectifs 77

2. Matériels et méthodes 78

2.1. Instrumentation 78

2.2. Les standards chimiques 80
2.3 Procédure de dérivatisation avec le DMF-DMA 84
2.4 Les analogues synthétiques des aérosols de Titan (=tholins). 85
3. Résultats et discussion 86
3.1 Réactivité chimique du DMF-DMA avec les fonctions amines. 86
3.1.1. Identification des produits provenant du DMF-DMA. 86
3.1.2 Identification des formes dérivatisées pour les amines primaires 88
3.1.3 Identification des formes dérivatisées pour les amines secondaires 90
3.1.4. Dérivatisation des amines tertiaires. 92
3.1.5. Identification des formes dérivatisées pour les amides 93
3.2 Etude quantitative de la dérivatisation au DMF-DMA sur les composés azotés. 96
3.3 Chiralité et séparation énantiomérique des composés azotés dérivatisés. 102
3.4 Dérivatisation de biomolécules : application aux dipeptides et aux nucléotides. 105
3.5 Dérivatisation d'analogues synthétiques des aérosols de l'atmosphère de Titan en préparation à l'analyse in situ. 109
4. Conclusions et Perspectives 113
5. Références 116

Chapitre III : Sélection et caractérisation des performances des colonnes chromatographiques de *Dragonfly Mass Spectrometer* (DraMS) en préparation à la recherche de molécules organiques d'intérêt exobiologique sur Titan 119
1. Objectifs de l'étude 120
2. Matériels et méthodes 120
2.1 Le choix des phases stationnaires 120
2.2 Instrumentation 123
2.3 Standards, échantillons et conditions analytiques pour les différentes études. 124
3. Résultats & Discussion 132
3.1. Étude d'efficacité 132
3.2. Étude de rétention et de séparation avec des mélanges de standards. 136
3.3. Sélection de la colonne générale de DraMS-GC. 140
3.3. Analyse de mélanges complexes et d'analogues des aérosols de Titan avec les colonnes chromatographiques de DraMS-GC. 143
3.3.1 Séparation générale avec les colonnes chromatographiques de DraMS-GC. 144
3.4. Séparation énantiomérique de standards chimiques chiraux 147
3.5 Analyse de tholins avec les colonnes de DraMS-GC. 149
4. Conclusion 153
5. Références 154

Chapitre IV : Caractérisation d'échantillons hypersalins du lac Tirez, analogues de matériaux de la surface d'Europe et d'Encelade, et préparation de méthodologies d'analyse *in situ*. 157

1. Le système lacustre de Tírez 159

2. Objectifs de l'étude 162

I. Caractérisation chimique des échantillons prélevés des lacs Tirez 163

1. Objectifs de l'étude 163

2. Matériels et méthodes 163

2.1 Les échantillons étudiés 163

2.2 Contenu en carbone et en azote total – TC, TN 164

2.3 Caractérisation et quantification de la salinité des échantillons Tírez 165

2.3.1 La microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie à dispersion d'énergie (MEB-SDE) 165

2.3.2 Analyse des cations 166

2.3.3 Analyse des anions 167

2.4. Evaluation de l'intégrité des cellules par microscopie confocale 168

3. Évaluation des caractéristiques physico-chimiques des échantillons Tírez. 170

3.1. Contenu en carbone et en azote. 170

3.2. Mesure de la salinité 171

3.2.1. Identification des sels présents dans les échantillons 171

3.2.2. Dosage des sels majoritaires 174

3.3 Intégrité des cellules 178

II. Détection de molécules organiques relatives au vivant dans les échantillons Tírez hypersalins : application de la CPG-SM et des techniques de préparation d'échantillon envisagées pour l'analyse *in situ* sur Encelade/Europe. 180

1. Objectifs de l'étude 180

2. Matériels et Méthodes 181

2.1 Échantillon étudié 181

2.2 Instruments et protocoles analytiques 181

2.2.1. La pyrolyse-CPG-SM 182

2.2.2 La dérivatisation en amont de la CPG-SM 182

2.2.3 La thermochimiolyse CPG-SM 183

2.3 Cultures de cyanobactéries et d'archées halophiles. 183

3. Résultats et discussion 185

3.1. Pyrolyse CPG-SM 185

3.1.1. Pyrolyse flash 185

3.1.2. Pyrolyse par rampe de température 187

3.1.3. Discussion sur le lien entre les molécules détectées en pyrolyse et une origine biologique potentielle 188
3.2. Dérivatisation-CPG-SM 190
3.2.1 Dérivatisation au DMF-DMA 190
3.2.2. Dérivatisation au MTBSTFA 194
2.3. Thermochimiolyse-CPG-SM 197
2.3.1 Thermochimiolyse au TMAH 197
2.3.2 Thermochimiolyse au TMSH 201
4. Discussion sur le prétraitement d'échantillon et l'impact des sels. 203
4.1. Comparaison des méthodes de préparation d'échantillon 203
4.2. Hypothèses de l'impact des sels sur les méthodes de préparation d'échantillon. 205
5. Conclusion 206
III. Développement d'un protocole de dessalement : évaluation de l'impact du sel sur la détection de molécules organiques. 207
1. Objectifs de l'étude 207
2. Matériels et méthodes 208
2.1. Système de dessalement 208
2.2 Optimisation du protocole de dessalement 211
2.2.1 Dessalement cationique 212
2.2.3. Dessalement anionique 213
2.3. Paramètres instrumentaux d'analyse et protocoles de préparation d'échantillon. 213
2.3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 213
2.3.2. Préparation des échantillons 214
3. Résultats 215
3.1. Optimisation du protocole de dessalement 215
3.1.2. Optimisation du dessalement anionique 219
3.1.3. Mesure du pH avec le protocole optimisé. 220
3.1.4. Conclusion sur l'optimisation du protocole de dessalement 221
3.2. Analyse des échantillons naturels dessalés. 221
3.2.1. Dérivatisation au MTBSTFA d'un échantillon dessalé 223
3.2.2. Thermochimiolyse au TMAH d'un échantillon Tírez dessalé 224
4. Conclusion sur le dessalement des échantillons Tirez et perspectives 225
IV. Conclusion sur l'étude des échantillons Tírez. 226
V. Références 229
Conclusions générales et perspectives 234
Annexes 242

Chapitre Annexe : Détection de molécules organiques provenant de la souche *Halobacterium salinarum* dans des cristaux d'halite (NaCl) en préparation à l'analyse *in situ* sur Encelade et Europe. 243

Annexes relatives au Chapitre II – Étude de la dérivatisation au DMF-DMA de composés azotés 257

Annexes relatives au Chapitre III – Colonne DraMS 260

Annexes relatives au Chapitre IV - Étude des échantillons Tírez. 267

Liste des abréviations

ACP = Aerosol Collector and Pyrolyzer
ADN = Acide désoxyribonucléique
ADN = Acide désoxyribonucléique
ARN = Acide ribonucléique
ARN = Acide ribonucléique
ATP = adénosine triphosphate.
BSW = bisilylated water
CDA = Cosmic Dust Analyzer
CIRS = Cassini Infrared Spectrometer
CPG = Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM = Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CPL = Chromatographie en phase liquide
DMF = Diméthylformamide
DMF-DMA = Diméthylformamide Diméthyl acétal
DraCO = Drill for Acquisition of Complex Organics
DraMS = The Dragonfly Mass Spectrometer
EC = Electrophorèse Capillaire
ELF = Enceladus Life Finder
ESA : European Space Agency
FAMEs = fatty acid methyl esters
FID = Flame Ionisation Detector
FID = Détecteur à Ionisation de Flamme
GC-DIF = Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme
HAP = Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HEPT = Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique
HPLC-Orbitrap = Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à un Orbitrap
HRMS = Spectrométrie de masse haute résolution
HST = Hubble Space Telescope
ICP-MS = Spectrométrie de Masse à Plasma à Couplage Inductif
ID = Internal diameter
INMS = Ion and Neutral Mass Spectrometer
ISQ = Spectromètre de masse à simple quadrupôle
JUICE = Jupiter and Icy Moons Explorer
JWST = James Webb Space telescope
LATMOS = Laboratoire Atmopshère et Observations Spatiales
LD-MS = Désorption Laser couplée à la spectrométrie de masse
LOD = Limite de détection
LOQ = Limite de quantification
MASPEX = The Mass Spectrometer for Planetary Exploration
MEB-SDE = Microscopie électronique à balayage couplé à un Spectromètre à Dispersion d'Energie
MOMA = Mars Organic Molecule Analyser.
MTBSTFA = N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide
NASA = National Aeronautics and Space Administration
PAMPRE = Production d'Aérosols en Microgravité par Plasmas REactifs
PVDF = Polyfluorure de vinylidène
Pyr-CPG-SM = pyrolyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

SAM = Sample Analysis at Mars
SM-SM = tandem de spectromètre de masse
SOLID = Signs Of LIfe Detector
SPE = Extraction en Phase Solide
SSL = Split/Splitless
SSL = Split/Splitless
TIC = Total Ion Current
TMAH = Tetramethylammonium hydroxide
TMSH = Trimethylsulfonium hydroxide
TSQ = Spectromètre de masse à triple quadrupôles
VIMS = Visible and Infrared Mapping Spectrometer.

Avant-propos

L'origine de la vie sur Terre ainsi que sa distribution dans l'Univers font partis des questionnements qui occupent l'esprit de l'Homme depuis des décennies. Tentant d'apporter des éléments de réponse à ces grandes interrogations, l'exobiologie est un domaine de recherche pluridisciplinaire allant de la philosophie à l'astrophysique, de la biologie à la géologie en passant par la chimie. Le terme d'exobiologie est apparu la première fois en 1960, prononcé par un généticien et microbiologiste américain Joshua Lederberg. Ce terme a été conservé depuis et prend tout son sens lorsqu'il s'agit de comprendre les processus, notamment géologiques et biochimiques, qui aboutissent à l'apparition de la vie et qui provoquent à son évolution, sur Terre, comme ailleurs.

Les connaissances dont nous disposons à propos de l'émergence de vie sur Terre aujourd'hui sont très limitées. D'une part, de nombreuses recherches en biologie s'intéressent à tenter de définir l'ancêtre commun aux trois règnes phylogénétiques (archées, procaryotes et eucaryotes) nommé LUCA pour Last Universal Common Ancestor, qui serait un organisme unicellulaire très primitif, ancêtre de tous les systèmes biologiques que nous connaissons aujourd'hui. D'autre part, les chimistes s'intéressent à comprendre comment les molécules organiques, à la base de la structure de toute cellule vivante sur Terre, réagissent entre elles pour donner naissance au vivant. Ces études s'intéressent à la chimie prébiotique. C'est justement la frontière entre la chimie et la biologie qui représente aujourd'hui le chaînon manquant de notre compréhension sur les origines de la vie.

L'aspect pluridisciplinaire dans lequel l'exobiologie prend ses sources, permet d'avoir une approche sur la compréhension de la vie, de sa distribution et de son émergence en replaçant cette dernière dans le contexte planétaire, en considérant l'évolution de celle-ci au sein d'un environnement et sur une période donnée. Une telle approche permet donc de couvrir tous les aspects à prendre en compte, qu'une seule discipline ne pourrait achever, pour tenter de comprendre un phénomène aussi complexe que la vie, qui dépasse le questionnement scientifique seul.

Un tel domaine de recherche soulève de nombreuses questions philosophiques, sur ce que l'Homme considère comme étant la vie, sur la façon de considérer l'humanité et la vie terrestre dans la nature et l'Univers. Pour tenter de percer les mystères de certaines de ces questions, la quête de traces de vie primitives sur Terre est une possibilité mais ces dernières ont souvent disparu avec le temps et les processus géologiques naturels. Par conséquent, une autre alternative est d'aller chercher des traces de vies telles que nous la connaissons dans l'Univers, et même plus près, dans le système solaire. La découverte d'une chimie prébiotique ou mieux encore de traces de vie permettrait d'apporter des clés pour comprendre l'émergence du vivant sur Terre. Aujourd'hui, deux théories principales s'opposent quant à l'origine de la vie sur Terre : 1) la vie serait apparue de manière endogène sur Terre, potentiellement au cœur des océans ou 2) les corps planétaires sont ensemencés par des molécules organiques plus ou moins complexes, voire par la vie elle-même, c'est la théorie de la panspermie. Ainsi, découvrir la vie sur d'autres corps planétaires pourraient apporter des éléments de réponses affirmant ou réfutant l'une de ces deux théories.

Chapitre 1 : La place des mondes océans pour la recherche de vie dans le système solaire.

1. *Où chercher la vie dans le système solaire ?*

La découverte de formes de vie extrêmophiles (*e.g.* découverte des archées en 1977 (Woese and Fox 1977)), jusqu'à alors non imaginées, dans des milieux pensés comme inhabitables et inhabités, a permis à la communauté scientifique de dépasser les frontières du possible qui avaient été posées. Des psychrophiles aux hyperthermophiles retrouvés dans les fonds marins, des acidophiles aux alcalinophiles dans les lacs acides volcaniques, des barophiles aux halophiles en passant par les organismes radiorésistants, voilà un bref aperçu des milieux dans lesquelles la vie microbienne pourrait se développer. Outre l'adaptation à une des conditions extrêmes citées précédemment, il existe également des espèces, bien qu'encore rares, qualifiées de polyextrêmophiles (Aliyu *et al.* 2016; Seckbach *et al.* 2013), qui peuvent s'adapter à plusieurs conditions, repoussant encore plus les limites du possible en termes d'environnements où la vie peut se développer. De telles adaptations appellent donc à reconsidérer les candidats planétaires sur lesquels la vie, telle que nous la connaissons sur Terre, aurait pu apparaître ou être encore présente.

Depuis les années 1990, de nombreuses exoplanètes ont été découvertes, ce qui a amené la communauté scientifique à reconsidérer considérablement le nombre de candidates ayant pu voir émerger la vie. Toutefois, l'exploration de ces mondes se limite, pour l'instant du fait de contraintes technologiques, à des observations à distance avec des télescopes spatiaux (le Hubble Space Telescope (HST) ou plus récemment le James Webb Space Telescope (JWST)). Ainsi, les seules informations dont nous disposons pour le moment, se résument à des paramètres physiques de ces planètes (taille, rayon, masse et densité) et chimiques concernant leurs compositions atmosphériques pour un petit nombre d'entre elles. En conséquence, le système solaire reste aujourd'hui encore l'endroit dans l'Univers où il est le plus simple de rechercher d'éventuelles traces de vie.

Après un rapide tour d'horizon des différents environnements de notre système solaire, il est aisé de se rendre compte que très peu d'endroits rassemblent les conditions qui sont jugées nécessaires (et peut-être suffisantes ?) pour l'émergence du vivant. Ces conditions sont au nombre de trois (Cockell *et al*., 2016) : la présence d'un solvant liquide catalysant la chimie pouvant s'y produire, la présence d'énergie exogène au système vivant permettant l'activation de réactions chimiques et enfin la présence de composés chimiques indispensables pour produire la matière nécessaire aux organismes vivant, dont les plus emblématiques sont les molécules organiques à base de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote, de phosphore et de soufre. Parmi les objets qui composent notre système solaire, ces trois conditions, favorables à l'émergence du vivant tel que nous le connaissons, sont retrouvées sur Terre, sur Mars et sur les mondés océans, ces derniers se plaçant au cœur de ce travail de thèse.

Après Mars et les nombreuses missions que la planète rouge a vu se poser à sa surface, les mondes océans, depuis les dernières missions qui leur ont été dédiées (Galileo pour le système de Jupiter et Cassini-Huygens pour le système de Saturne), présentent un fort intérêt pour la recherche exobiologique. En effet, bien que Mars ait pu connaître une période passée propice à l'émergence du vivant quelques temps après sa formation, son environnement radiatif actuel à la surface est tel qu'aujourd'hui la matière organique, relique de cette vie passée, est extrêmement compliquée à détecter. En revanche, sur les mondes océans, c'est aussi bien la recherche d'une chimie prébiotique que celle d'une vie passée, voire actuelle, qui est visée.

1.1. Les mondes océans : des satellites glacés chaleureux ?

Les mondes océans tels qu'ils sont qualifiés aujourd'hui, sont des corps planétaires, du système solaire externe, sur lesquels de l'eau à l'état liquide est retrouvée en subsurface, sous une enveloppe glacée du fait de la distance au soleil. Ces mondes océans sont, pour ceux connus et confirmés aujourd'hui grâce aux missions spatiales passées, des satellites se trouvant dans les systèmes de Saturne et de Jupiter (dans ce chapitre introductif seront également décrits les corps planétaires pour lesquels l'hypothèse d'un océan en subsurface est émise). De par la présence de ces géantes gazeuses, très denses, des déformations périodiques des satellites sont provoquées du fait des forces gravitationnelles. Ces déformations périodiques, appelées forces de marées, provoquent un frottement interne qui libère de la chaleur et permet donc la présence d'eau liquide (Cassen *et al.* 1979; Porco *et al.* 2006; Ross and Schubert 1989) aussi loin dans le système solaire (distance supérieure à 4 unités astronomiques soit plus de 600 millions de kilomètres). La quantité d'eau estimée sur ces satellites pourrait être bien plus importante que l'eau retrouvée sur Terre, alors que cette dernière est beaucoup plus grande que ces lunes.

La première partie de ce chapitre introductif vise donc à établir un état des connaissances actuelles à propos de ces différents mondes océans, en débutant par les satellites galiléens puis par les satellites du système de Saturne et en finissant sur de potentiels mondes océans dont les preuves *in situ* n'ont pas pu encore être apportées. Ainsi, il sera possible de mettre en avant les mondes océans qui sont estimés aujourd'hui comme étant les plus propices au développement d'une chimie prébiotique, voire à la présence de vie passée ou actuelle et donc d'intérêt majeur pour l'exobiologie.

1.1.1. Les satellites galiléens

La planète Jupiter, de par sa forte gravité, possède un nombre très important de satellites dont les 4 principaux, appelés satellites galiléens, sont Ganymède, Callisto, Europe et Io. Ces 4 satellites ont été découverts par Galilée en 1610 par des observations à la lunette astronomique. Les résultat *in situ* obtenus sur ces satellites sont le fruit de succès de l'exploration spatiale, à savoir les missions Voyager 1 et 2 ainsi que la mission Galileo qui a exploré le système jovien de 1995 à 2003. La mission JUICE (pour JUpiter and Icy Moons Explorer, qui a déjà entamé son voyage vers Jupiter) et la mission Europa Clipper apporteront d'ici la décennie 2030 de nombreux nouveaux résultats, notamment sur Europe et Ganymède. Le système jovien, en plus des forces gravitationnelles qui y est règnent, est le lieu

d'interactions électromagnétiques intenses du fait d'une immense magnétosphère, aboutissant notamment à une chimie énergétique.

Le satellite Io, le plus proche de Jupiter, possède des caractéristiques particulières du fait de cette proximité avec la géante gazeuse et des forces de marées ainsi engendrées. Des volcans à sa surface, dégageant du SO_2 dans l'environnement Jovien ont été observés par la sonde Galileo (McEwen *et al.* 1998; Sparks *et al.* 2016; Spencer *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2004). Toutefois, des preuves quant à la présence d'un océan en subsurface n'ont pas pu être formellement obtenues. Voilà pourquoi dans les prochains paragraphe, l'intérêt est porté uniquement sur Callisto, Ganymède et Europe.

Callisto : un guide sur l'origine du système Jovien ?

Callisto est parmi les 4 lunes précédemment citées, celle qui se trouve la plus éloignée de Jupiter, subissant donc beaucoup moins les forces de marées. Les premières images de ce satellite glacé par les sondes Voyager et les suivantes prises par Galileo ont montré un satellite intensément cratérisé avec une surface dite proche de la saturation en termes de nombre de cratères (Figure I-1). Cela signifie que l'intégralité de cette surface est quasiment recouverte par des cratères. Une telle observation témoigne de l'ancienneté des terrains présents en surface de Callisto, et donc d'une dynamique et d'une activité tectonique quasi-éteinte (quelques zones plus lisses pourrait être des indices d'un cryovolcanisme plus récent)(Greeley *et al.* 2000). Ainsi, ce satellite représente un vestige du système solaire, car ne semblant pas avoir été modifié depuis sa création il y a 4,5 milliards d'années.

La sonde Galileo, par des mesures de champs magnétiques, a pu apporter des indices quant à la possible présence d'un océan sous la surface de Callisto. En effet, le champ magnétique de Jupiter, en passant au travers de ce satellite engendre la formation d'un champ magnétique dit induit, qui pourrait être expliqué par la présence d'un océan liquide sous la couche de glace de Callisto (K. K. Khurana *et al.* 1998; Zimmer *et al.* 2000). Hormis ce constat qui suggère la présence d'un océan, la structure interne du satellite, contrairement à celle de Ganymède et d'Europe, demeure aujourd'hui encore très peu connue. De fait, l'intérêt de Callisto pour l'exobiologie n'a pas encore été avancé, mais l'étude d'un tel corps planétaire, du fait de son âge, peut apporter nombre d'informations sur la formation des satellites galiléens mais aussi sur leur évolution au cours du temps.

Figure I-1 : Photo du satellite Callisto prise par la sonde Galileo en Mai 2021. La surface de Callisto est proche de la saturation en cratère d'impact. Source : JPL, NASA.

Ganymède : un géant glacé.

Ganymède est un satellite possédant la taille d'une planète et le plus gros des satellites du système solaire avec un diamètre avoisinant les 5300 km, soit compris entre celui de Mercure et celui de Mars. Sa surface présente à la fois des terrains sombres et des terrains brillants sur les images obtenues par les différentes sondes spatiales qui l'ont survolé. Sur ces deux types de terrains, une très grande variété de structures géomorphologiques sont observées témoignant d'une dynamique de surface importante. À titre d'exemples, de nombreux cratères pouvant être dus à des impacts, la présence de coulées qui pourraient être expliquées par du cryovolcanisme mais aussi des mouvements de terrains expliqués par de la tectonique avec notamment des remontées de matériaux depuis la subsurface (Pappalardo *et al.* 2004). La composition de surface, a été étudiée à la fois par des analyses lors de son survol par la sonde Galileo par le passé, mais aussi par des observations depuis le sol terrestre avec l'utilisation du Very Large Telescope (VLT) au Chili. Ces différentes observations ont montré la prédominance de glace d'eau sous forme crystalline mais aussi amorphe ainsi que la présence d'hydrates d'acide sulfurique et de sels de chlorures et de sulfates (King and Fletcher 2022; Ligier *et al.* 2019; Pappalardo *et al.* 2004).

Les données gravimétriques obtenus par la sonde Galileo ont indiqué que Ganymède est un corps fortement différencié entre un noyau et un manteau (Anderson *et al.* 2016). Ce noyau métallique, pourrait être responsable d'une des autres particularités de Ganymède, la présence d'un champ magnétique intrinsèque au sein de la magnétosphère de Jupiter, pouvant s'expliquer par différents processus non détaillés ici (Kivelson *et al.* 1996; Kivelson *et al.* 1997; Schubert *et al.* 1996).

Sa structure interne, qui a été contrainte grâce à des modèles couplés avec les observations obtenues par Galileo, est composée de différentes enveloppes comme suit (Figure I-2), de la plus éloignée jusqu'au noyau (Hussmann *et al.* 2016; Journaux *et al.* 2020; Vance *et al.* 2014). Une enveloppe glacée est en contact direct avec le vide interplanétaire et baigne dans la magnétosphère de Jupiter, puis un océan global en subsurface, compris entre la croûte de glace externe et plusieurs couches de glace à haute pression avant d'atteindre le manteau rocheux. La différence qui existe entre les modèles aujourd'hui est liée à la présence ou à l'absence de liquides stables entre les différents feuillets de glace à différentes pressions. Enfin, au plus profond, un noyau, responsable de la dynamo qui alimente le champ magnétique intrinsèque de Ganymède. Avec une telle structure, l'océan de subsurface n'est donc pas en interaction direct avec le plancher rocheux, interactions qui pourraient résulter en la formation de processus hydrothermaux comme au fond des océans terrestres. Ces monts hydrothermaux, sur Terre, sont le lieu d'écosystèmes riches, où la vie est capable de se développer en se basant sur des métabolismes différents de la photosynthèse. L'absence de tels processus sur Ganymède explique principalement pourquoi cette lune glacée a un intérêt exobiologique qui est moins marqué qu'Europe et Encelade par exemple.

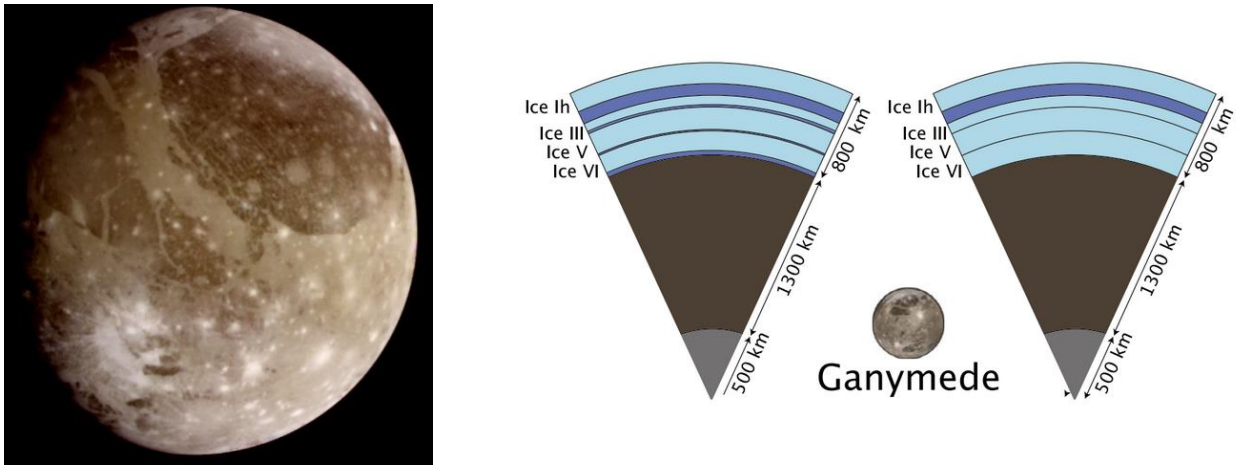


Figure I-2 : (Gauche) Image de Ganymède prise par la sonde Galileo lors de son premier survol de la lune. Crédit : NASA/JPL. (Droite) Structure interne supposée de Ganymède. Source : (Journaux et al. 2020).

Europe : un lieu propice au développement de la vie.

Europe est la plus petite des quatre lunes galiléennes avec un diamètre de 3121,6 km et le sixième satellite le plus proche de Jupiter. Les données de la sonde Galileo, en observant la surface d'Europe, ont montré une surface brillante, très peu cratérisée témoignant d'un renouvellement récent de cette dernière.

La présence d'un océan de subsurface sur Europe a été étayée par plusieurs indices. Premièrement, des indications géomorphologiques ont été relevées pouvant témoigner de l'existence d'une telle couche. En effet, l'observation d'une surface brillante avec des réseaux de fractures (Figure I-3), probablement produite par les tensions induites par la forte gravité de Jupiter, est totalement compatible avec la présence d'une couche liquide sous la surface (Carr *et al.* 1998; Papparlardo *et al.* 1999).

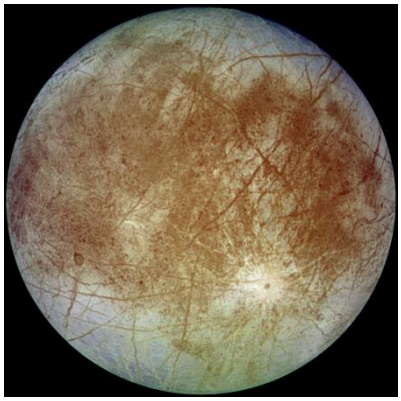


Figure I-3 : Photo de la lune glacée Europe, avec tous les réseaux de fractures caractéristiques de sa surface. Crédit : NASA/JPL-Caltech.

Une autre preuve, plus frappante, pour appuyer la présence d'un océan en subsurface, est la mesure du champ magnétique au voisinage d'Europe, obtenue à partir du magnétomètre à bord de la sonde Galileo. Cette donnée montre, à l'instar de Callisto, qu'Europe produit un champ magnétique induit en interagissant avec le champ magnétique de Jupiter. La génération d'un tel champ magnétique peut s'expliquer par le fait qu'Europe possède une couche conductive sous sa surface. Étant donné que la glace est un très mauvais conducteur, l'existence d'un océan de subsurface salé, dont l'épaisseur a été estimée aux alentours des 100 km apparaît comme une bien meilleure hypothèse pour expliquer la génération de ce champ magnétique. (Kivelson *et al.* 2000; Zimmer *et al.* 2000). Cette épaisseur d'océan serait donc 10 fois plus profond que la fosse océanique la plus profonde connue sur Terre aujourd'hui, à savoir la fosse des Mariannes (approchant les 11 km).

Enfin, des observations effectuées par le télescope HST ainsi que des mesures magnétiques, viennent également appuyer ces données de la sonde Galileo quant à la présence d'un océan global sous la surface. En effet, des potentiels geysers ont été observés à deux années d'intervalle témoignant de possible panaches à la surface d'Europe (Figure I-4) (Jia *et al.* 2018; Roth *et al.* 2014; Sparks *et al.* 2016; Sparks 2017). De tels résultats, en plus d'appuyer un peu plus l'existence d'un océan de subsurface, témoignent de la possibilité d'aller échantillonner et analyser du matériel provenant d'en dessous de l'enveloppe glacée et donc potentiellement de l'océan, directement en surface. En effet, l'épaisseur de l'enveloppe glacée d'Europe pourrait être comprise entre 3 et plusieurs dizaines de kilomètres (Howell 2021; Leonard *et al.* 2020), le débat étant toujours en cours. Par conséquent, sans la présence de ces geysers, aller échantillonner directement l'océan sous une telle couche de glace dépasse complètement les technologies actuelles. Sur Europe, il est également possible que des réservoirs d'eau liquide existent au sein de l'enveloppe de glace, et que du matériel remonte de ces réservoirs par les fractures présentes dans l'enveloppe de glace (Fagents 2003).

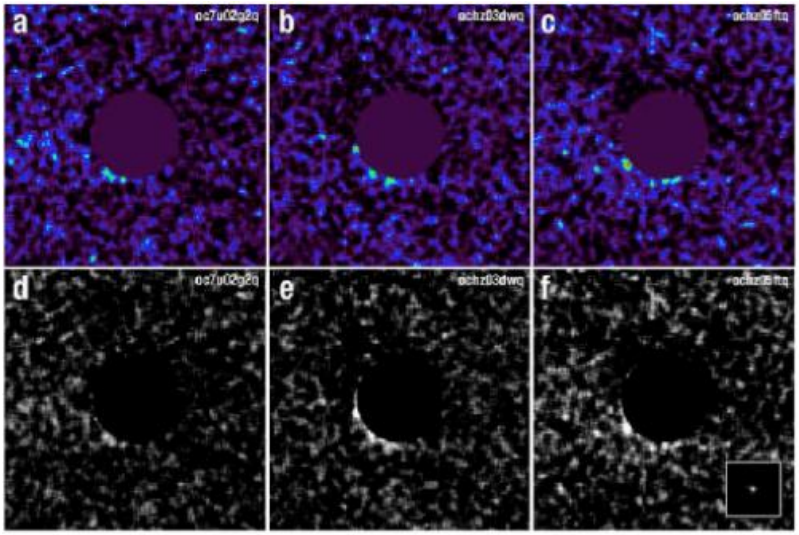


Figure I-4 : Image prise pas le Hubble Space Telescope à différentes périodes. Source : (Sparks et al. 2016). Les tâches vertes et blanches observées au pôle sud d'Europe correspondent aux panaches qui sont supposés.

La structure interne d'Europe a également été déduite à partir des données Galileo. Cela a permis de montrer que l'océan sous la surface, dont de nombreuses hypothèses soutiennent son

existence, serait en interaction directe un manteau silicaté (Kargel 1991), sous lequel se trouverait un noyau métallique (Anderson 1998). Cette hypothèse est supportée par l'identification de sels à la surface d'Europe, par la mission Galileo (McCord *et al.* 1999) mais aussi par des observations avec le télescope spatial HST (Trumbo *et al.* 2022; Trumbo *et al.* 2019). Ainsi, du chlorure de sodium a été détecté, mais également des sels de sulfates et potentiellement des carbonates. L'origine purement endogène de certains sels est encore débattue, notamment les sels de sulfates qui pourraient être créés à la surface d'Europe par des réactions de radiolyse (Zolotov and Shock 2004) ou par implantation de SO_2 provenant du volcanisme d'Io (Brown and Hand 2013). Toutefois, ces sels, notamment ceux de chlorure, pourraient également avoir une origine endogène, provenant directement de l'océan et remontés en surface par les geysers ou par des remontées au travers de fractures. D'un point de vue exobiologique, une telle interaction entre l'océan et le manteau rocheux, couplée aux forces de marées intenses, pourrait amener à des processus d'hydrothermalisme au niveau du plancher rocheux ainsi qu'à une chimie organique (Figure I-5). Or, sur Terre, comme explicité précédemment, ces monts hydrothermaux sont un lieu propice au développement d'une chimie organique intense avec l'énergie apportée par le volcanisme sous-marin et d'écosystèmes diversifiés, ne se basant pas sur un métabolisme photosynthétique mais chimiolithotrophique. Contrairement à Encelade, aucun indice, même indirecte, n'a été apporté à ce jour pour appuyer l'hypothèse de processus hydrothermaux récents ou actuels. Toutefois, Europe et Encelade, bien que différentes par leurs tailles et l'environnement dans lequel elles évoluent, semblent être jumelles de par leur structure interne. Ainsi, Europe pourrait être une des lunes glacées les plus prometteuses pour la recherche de trace de vies passées ou présentes.

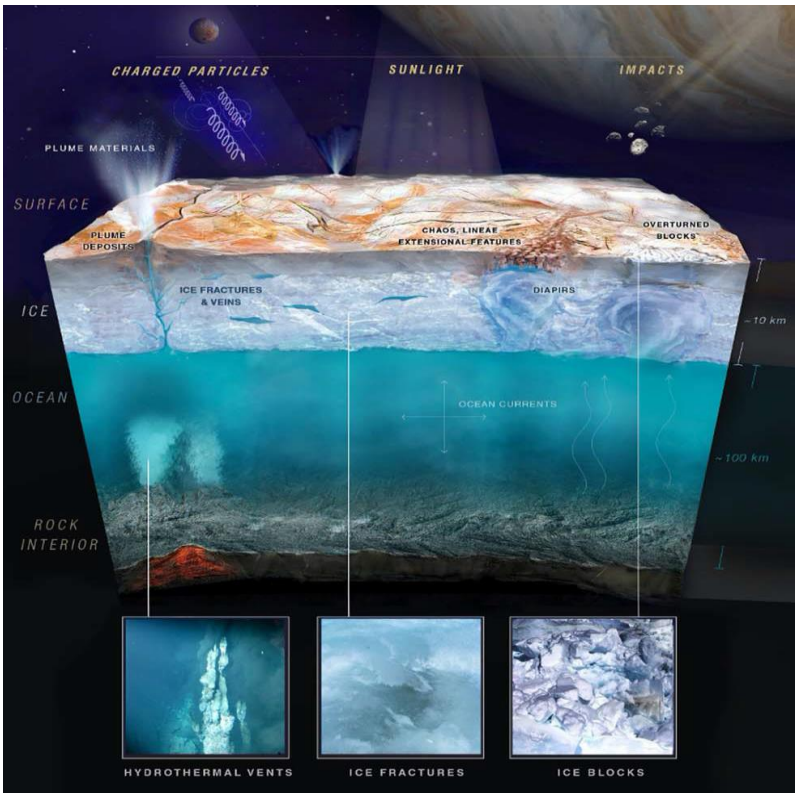


Figure I-5 : Coupe transversale de la structure interne d'Europe telle que supposée avec les connaissances actuelles. Source : (Hand et al. 2022)

1.1.2. Les satellites de Saturne

Les satellites de Saturne, connus actuellement au nombre de 83 dont les 7 principaux, de formes planétaires sont, du plus proche au plus éloigné de la géante gazeuse, Mimas, Encelade, Téthys, Dioné, Rhéa, Titan et Japet. L'un des aspects frappant de ces lunes lors de leur étude par la mission Cassini-Huygens est qu'elles présentent toutes une surface et des caractéristiques différentes les rendant chacune plus unique les unes que les autres. C'est seulement sur trois d'entre elles, qu'il a été possible de détecter la présence d'un océan en subsurface grâce à la mission Cassini-Huygens qui a exploré le système de Saturne et ses lunes pendant 13 ans, de 2004 à 2017. Cette mission est probablement l'un des succès de collaboration internationale entre la NASA et l'ESA des plus marquants, que ce soit en termes d'avancées technologiques et de retombées scientifiques. Cette sonde, a notamment permis d'obtenir de très nombreuses informations sur Titan et sur Encelade, grâce à de nombreux survols mais aussi en larguant la sonde atmosphérique Huygens au sein de l'atmosphère de Titan. Une telle mission a permis un grand bond dans nos connaissances actuelles et a révélé ainsi leurs hauts potentiels exobiologiques. Ce sont donc pour ces deux lunes glacées, l'une pour son implication dans la compréhension de la chimie prébiotique et l'autre pour les probabilités que la vie y soit apparue voire présente, que sera détaillé l'éventail des connaissances dont la communauté scientifique dispose aujourd'hui.

Titan : un proxy de la Terre primitive ?

Titan, plus grosse lune de Saturne, a été découvert par le mathématicien Christian Huygens en 1655. C'est très probablement l'un des corps planétaires des plus surprenants du système solaire, tant par la présence d'une atmosphère épaisse que par la diversité des processus qu'il existe en surface. Titan a un diamètre de 5150 km, une gravité de 1,35 m/s², une atmosphère dense qui impose une pression de surface de 1,5 bar et une température de surface de 94 K (Fulchignoni *et al.* 2005; Jennings *et al.* 2019). L'existence d'une telle atmosphère de diazote a été prouvée lors du survol de Titan par les sondes Pioneer 11, Voyager 1 et 2 qui ont notamment montré la présence d'aérosols dans l'atmosphère (Tomasko 1980) donnant sa couleur orangée à ce satellite (Figure I-6). De par la composition de son atmosphère, à savoir ~95 % de diazote (N_2) et quelques pourcents de méthane (CH_4), l'atmosphère de Titan rappelle celle de la Terre primitive, et pourrait donc être un analogue présent de la Terre primitive (avec des conditions environnementales différentes), permettant potentiellement de comprendre l'évolution chimique de la planète bleue vers la biologie.

Figure I-6 : Image de Titan dans le visible prise par la sonde Voyager 2 en 1981. La couleur jaune orangé témoigne de la présence du brouillard photochimique Crédit : Nasa/JPL.

La surface de Titan est majoritairement composée de glace d'eau, avec la présence d'aérosols organiques provenant de l'atmosphère. Ces aérosols organiques, produits de la chimie photochimique détaillée ci-après, peuvent former dans certaines régions de Titan des plaines de dunes organiques au niveau de l'équateur (Figure I-7), très similaires aux dunes retrouvées dans le désert du Namib sur Terre (Lorenz 2006; Radebaugh *et al.* 2008; Soderblom 2007).

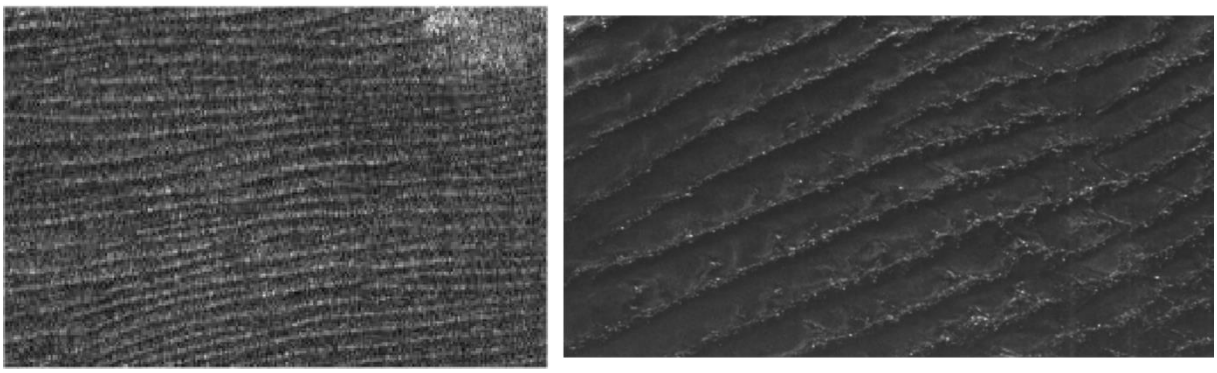


Figure I-7 : (Gauche) Observation des dunes de sable organique par le radar de Cassini en 2005 de la région équatoriale de Titan. (Droite) Observation en radar des dunes de sable du désert du Namib en Namibie. Crédit : (Lorenz et al. 2006).

Une des autres fascinantes particularités de Titan est la présence d'hydrocarbures (méthane et éthane) à l'état liquide et stable en surface formant des lacs et des mers dans les zones polaires découverts par les instruments de la sonde Cassini (Hayes 2016; Stofan et al. 2007)(Figure I-8). Titan est donc le seul autre corps planétaire avec la Terre à posséder des étendues liquides stables dans le temps en surface. Sur Titan, comme sur Terre avec l'eau, du fait des différences de température entre l'équateur et les pôles, il existe un cycle du méthane, avec des phénomènes d'évaporation et de précipitation. Ainsi, des observations obtenues par le radar de la sonde Cassini ont permis de mettre en évidence la présence de réseaux de rivières à la surface de Titan (Lorenz *et al.* 2008). L'existence d'un tel cycle et de liquide en surface a notamment mené à des études biologiques quant au potentiel développement de systèmes vivants exotiques dans des hydrocarbures (McKay 2016).

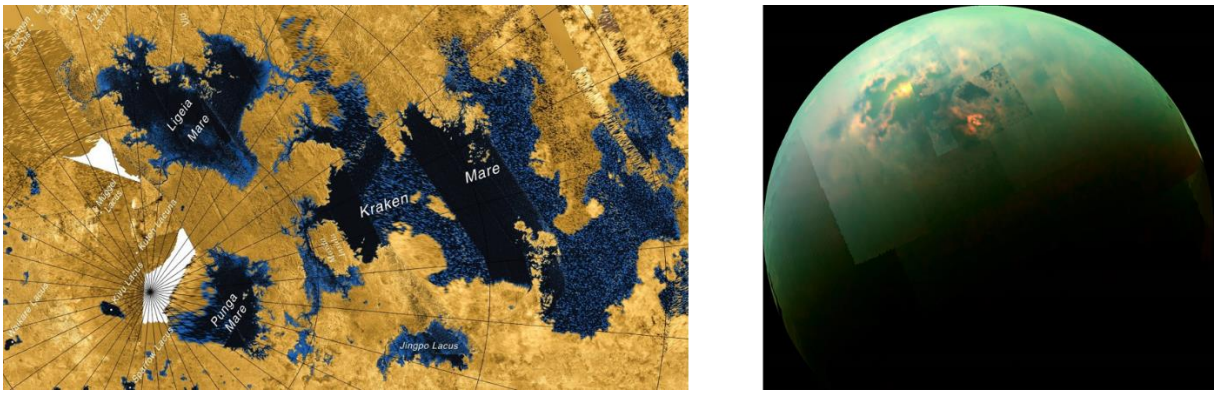


Figure I-8 : Observations des mers d'hydrocarbures de Titan au pôle Nord. (Gauche) Compilations d'observations avec le radar de Cassini, les couleurs représentent les valeurs de l'émissivité de chaque région. (Droite) Réflexion spéculaire des mers de Titan observées dans l'infrarouge avec l'instrument VIMS de Cassini. Crédit : NASA/JPL-Caltech

Toutes ces particularités font de Titan un monde intriguant et exotique et sont complétées par la présence possible d'un océan sous la surface. En effet, un ensemble de mesures gravimétriques effectuées par la sonde Cassini, topographiques, de dynamique rotationnelle et de détection de résonances de Schumann par la sonde Huygens sont concordantes pour supporter la présence d'un océan sous la surface composé d'un mélange d'eau et d'ammoniaque (Béghin *et al.* 2012; Bills and Nimmo 2011; Iess *et al.* 2010; Mitri *et al.* 2014). Toutes ces mesures ont donc permis de montrer que Titan possède un intérieur différencié, avec de la couche la plus superficielle à la plus profonde, l'enveloppe glacée externe, l'océan de subsurface, une couche de glace haute pression puis un intérieur supposé soit rocheux soit composé d'un mélange roche/glace (Figure I-9)(Grasset *et al.* 2000; Hemingway *et al.* 2013; Mitri *et al.* 2014; Sohl 2003). À l'instar de Ganymède, l'océan de subsurface ne serait donc pas directement en interaction avec l'intérieur profond rocheux, inhibant tout processus hydrothermal envisageable.

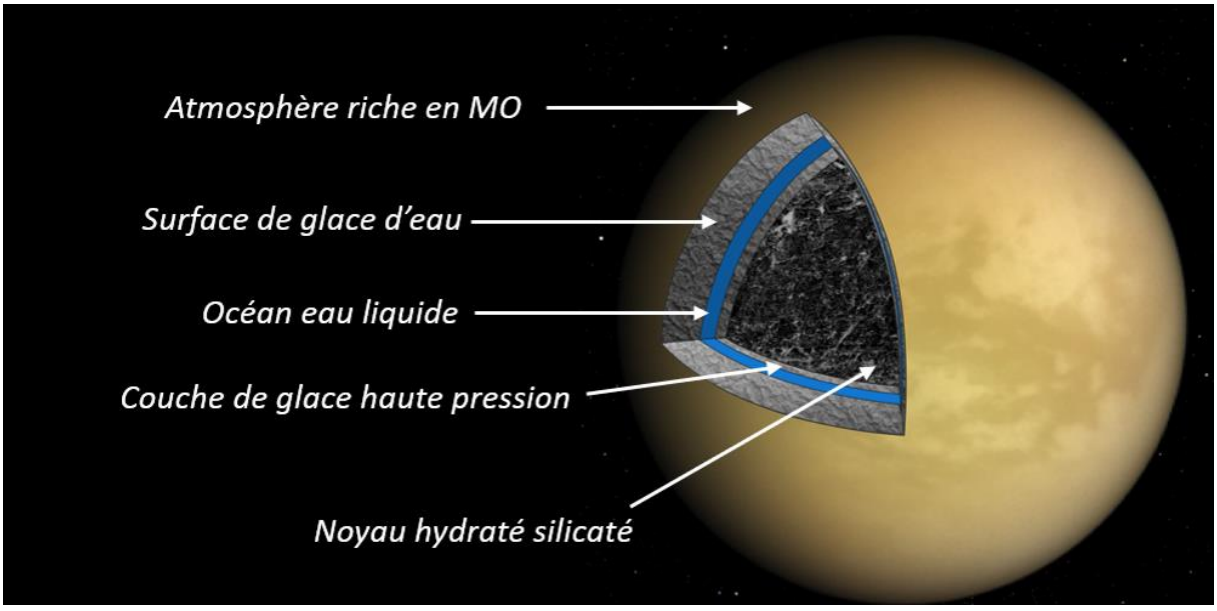


Figure I-9 : Structure interne de Titan telle que supposée à partir des différentes données obtenues avec la sonde Cassini-Huygens. Crédit : NASA/JPL

En s'appuyant sur ces constats, l'intérêt pour l'exobiologie de Titan est donc directement lié à sa chimie atmosphérique et aux interactions entre les aérosols organiques et la surface pouvant mener au développement d'une chimie prébiotique. L'atmosphère de Titan, moyennement réductrice, est le lieu d'une chimie organique atmosphérique riche et intense qui est initiée par la photodissociation du CH_4 et la dissociation et l'ionisation par impact électronique du N_2 (Carrasco *et al.* 2018; Hörst 2017). Ces impacts électroniques sont provoqués par la présence de particules chargées dans la magnétosphère de Saturne qui viennent bombarder en permanence l'atmosphère de Titan. La nature des molécules produites par cette chimie qui se produit dans l'ionosphère de Titan a été révélée en partie grâce à la sonde Voyager 1 mais surtout avec la mission Cassini-Huygens équipée notamment d'un spectromètre de masse à ions et molécules neutres (INMS). Les données obtenues ont montré la présence d'hydrocarbures aliphatiques légers tels que l'acétylène (C_2H_2), l'éthylène (C_2H_4), l'éthane (C_2H_6), le propane (C_3H_8) et le propyne (C_3H_4) (Maguire 1981; Waite et al. 2005). Ces résultats ont également permis d'identifier des nitriles et des imines comme le cyanogène et la méthanimine (Kunde *et al.* 1981). Au cours de leur descente dans l'atmosphère, ces composés vont eux-mêmes réagir pour former des molécules de plus en plus lourdes (Carrasco *et al.* 2018), et notamment des molécules aromatiques, comme le benzène (C_6H_6) détecté par l'instrument INMS de la sonde Cassini (Waite *et al.* 2007)(Figure I-10). Le Spectromètre Imageur dans l'infrarouge et dans le visible de la sonde Cassini (VIMS) a réalisé une analyse *in situ* qui a également révélé la présence de cyclohexane (Dinelli *et al.* 2013; Kim *et al.* 2011). Ces espèces chimiques, en descendant en altitude, finiront par former des aérosols par addition de cycle aromatique notamment, qui constitueront l'épais brouillard organique et photochimique retrouvé dans l'atmosphère de Titan. Une analyse *in situ* par les instruments UVIS (Ultraviolet Imaging Spectrograph) et CAPS (Cassini Plasma Spectrometer) a permis de montrer que les particules constituant ces aérosols ont des masses pouvant atteindre les 8000 Da avec une taille de particule de 260 nm (Waite *et al.* 2007).

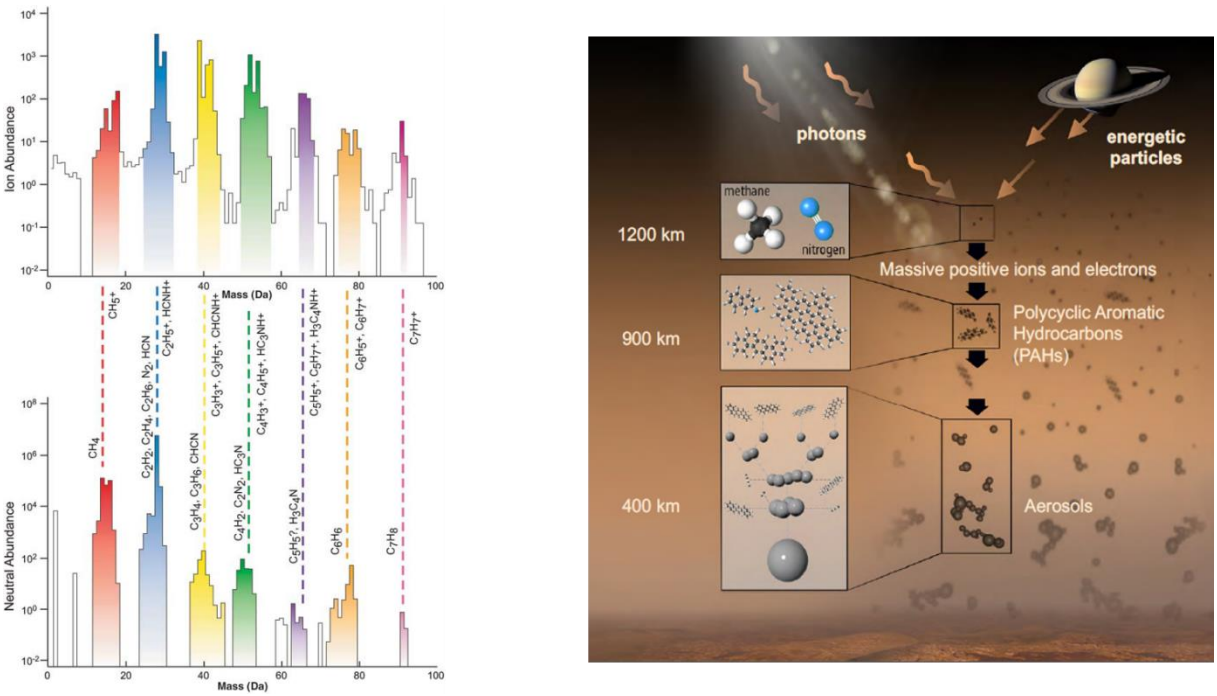


Figure I-10 : (Gauche) Spectres de masse obtenus par l'instrument INMS de la sonde Cassini avec en haut les ions mesurés et en bas les espèces neutres correspondantes. (Droite) Schéma de la chimie atmosphérique menant à la formation des tholins dans l'atmosphère de Titan à partir de la dissociation du N_2 et du CH_4. Source : Waite et al., 2007 et ESA/ATG medialab.

La composition chimique de ces aérosols organiques photochimiques n'est pas connue à ce jour, malgré deux analyses réalisées par la sonde Huygens au cours de sa descente dans l'atmosphère de Titan. Ces deux analyses en pyrolyse à 600 °C ont permis d'identifier du cyanure d'hydrogène et de l'ammoniaque (Israël et al. 2005), mais aucun composé plus complexe n'a pu être identifié. De nombreuses expériences de laboratoire, simulant la chimie atmosphérique de Titan permettent de reproduire des analogues synthétiques de ces poudres organiques. Ces échantillons de laboratoire sont appelés « tholins ». Leur étude permet d'aider à la compréhension à la fois de la chimie qui se produit au sein de l'atmosphère de Titan mais également d'estimer leur structure et certaines de leurs propriétés physiques (*e.g.* indices optiques). D'après des études chimiques sur ces analogues synthétiques, les aérosols de Titan possèdent probablement une fraction aromatique, avec une part d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Gautier *et al.* 2017; Trainer *et al.* 2013). De plus, la présence importante d'une diversité de composés azotés a été reportée, notamment des composés aromatiques incluant des atomes d'azotes dans leurs cycles mais aussi des amines (Gautier *et al.* 2014; Schulz *et al.* 2021).

Au sein de l'atmosphère de Titan, après leur formation, les aérosols organiques subissant le transport vertical et horizontal vont précipiter et sédimenter sur la surface (Raulin et al. 1995). En sédimentant, ces aérosols vont pouvoir subir différentes interactions du fait des différentes unités géologiques présentes en surface. Ils pourront interagir et se dissoudre dans les lacs et mers d'hydrocarbures, former des dunes de matériaux organiques comme décrit précédemment, ou interagir avec la glace de surface. C'est cette dernière interaction qui est particulièrement intéressante pour l'exobiologie et la recherche de molécules complexes. En effet, la surface étant faite de glace

d'eau, cette dernière peut fondre dans certaines conditions et laisser place à de l'eau liquide. Des cratères d'impact ont été identifiés à la surface de Titan grâce à la mission Cassini (Wood *et al.* 2010). L'énergie et la chaleur dégagées au moment de l'impact peuvent permettre d'obtenir de l'eau liquide (Artemieva and Lunine 2003; Artemieva and Lunine 2005). La durée de vie de l'eau liquide, avant de recongeler, émanant de ce processus a été calculée et estimée entre 100 ans et 10000 ans selon la taille de l'impacteur (O'Brien *et al.* 2005). De plus, des indices géomorphologiques comme des structures ressemblant à des écoulements ont été identifiées laissant supposer l'existence de cryovolcanisme à la surface de Titan (Lopes *et al.* 2007). Qu'il soit effusif ou éruptif, ce volcanisme pourrait dégazer de l'eau et du matériel provenant de la subsurface. La zone géographique autour des éruptions serait donc réchauffée ce qui aurait pour effet de faire fondre la glace. L'interaction entre eau liquide et les aérosols organiques ayant sédimenté depuis l'atmosphère pourrait conduire à des réactions en milieu aqueux favorisant la formation de molécules encore plus complexes, qui pourraient être d'intérêt pour la chimie prébiotique.

En s'appuyant sur cette dernière hypothèse, des expériences de laboratoire se sont intéressées à mettre en contact des tholins dans des solutions contenant de l'eau et de l'ammoniaque (dans différentes proportions) pour tenter de mimer la chimie qui pourrait se produire à la surface de Titan. Les analyses de ces tholins après contact avec ces mélanges aqueux ont montré la présence de molécules d'intérêt pour la chimie prébiotique et retrouvées dans les systèmes biologiques terrestres. En effet, 14 acides aminés qui sont utilisés par la vie sur Terre ont été identifiés, ainsi que 5 bases nucléiques (ou azotés) et de l'urée (Brasse *et al.* 2017; Cleaves *et al.* 2014; Neish *et al.* 2009; Neish et al. 2010; Poch et al. 2012). Identifier de telles molécules à partir de l'hydrolyse des tholins de Titan témoigne du potentiel exobiologique quant à la mise en place d'une chimie prébiotique à la surface de Titan à partir des aérosols organiques. La sonde atmosphérique Huygens qui a atterri à la surface de Titan a pu réaliser une analyse en surface, mais n'a pas pu révéler une telle complexité moléculaire. En effet, n'ayant pas été prévu à cet effet, la sonde a seulement permis la détection de cyanure d'hydrogène et d'éthane en surface (Niemann et al. 2005). Par conséquent, la quête de molécules complexes est donc toujours une question prioritaire pour la recherche en exobiologie sur Titan.

Un schéma récapitulatif de la chimie atmosphérique de Titan ainsi que des différents processus de surface est présenté en Figure I-11, reprenant tous les aspects précédemment détaillés et soulignant encore un peu plus la complexité d'un tel objet planétaire, suscitant un tel intérêt exobiologique et scientifique.

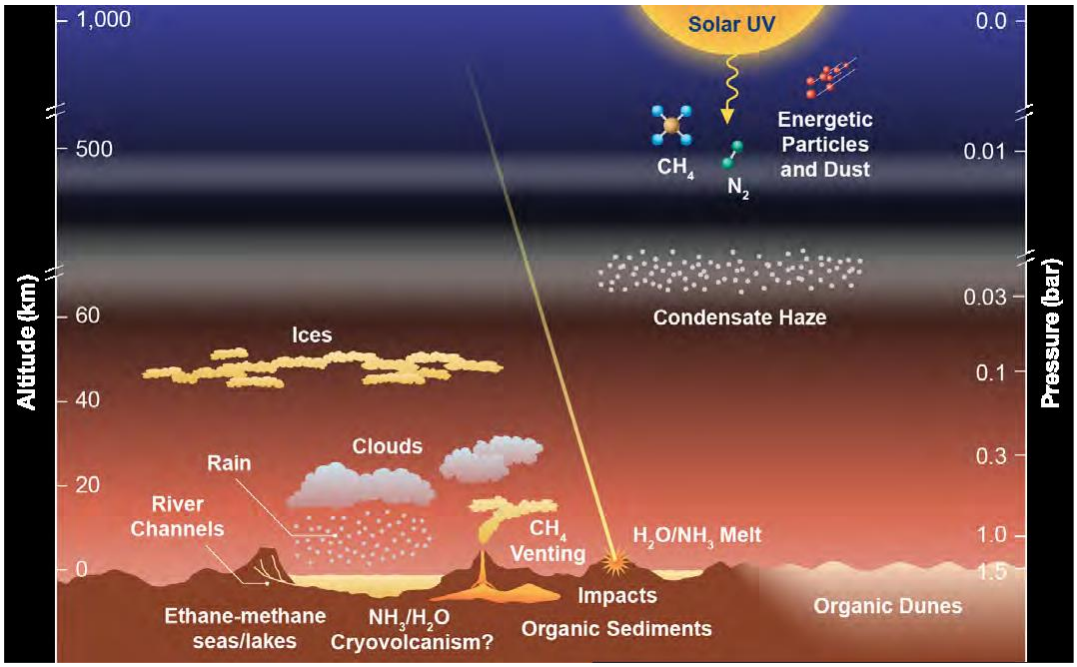


Figure I-11 : Schéma récapitulatif des différents processus dans l'atmosphère et en surface Titan. Crédit : Zibi Turtle, Titan Through Time VI, 2023.

Encelade : la petite sœur d'Europe.

Encelade est un petit satellite (diamètre de 504 km) de Saturne et se situe dans l'anneau E de la géante gazeuse. Les premières images obtenues par les missions Voyager 1 et 2 dans les années 1980, bien que de faible résolution ont montré une surface brillante et lisse. L'absence de cratère témoigne, tout comme pour Europe, d'une surface jeune avec un renouvellement récent.

La mission Cassini-Huygens, qui a étudié de manière bien plus approfondie Encelade que ses prédécesseurs, a permis de détecter la présence d'un point chaud au pôle sud d'Encelade, associé à des structures géomorphologiques appelées « griffures de tigre » (Porco 2006; Spencer *et al.* 2006)(Figure I-12). C'est sur cette zone précise que la sonde Cassini a photographié des geysers éjectant directement du matériel de subsurface dans le vide interplanétaire (Figure I-12) (Waite *et al.* 2006). Une étude très récente a également permis de détecter un geyser immense (proche de 10 000 km) en rayonnement infrarouge grâce au JWST, montrant à quel point cette lune est active (Villanueva *et al.* 2023). Des panaches de cette nature créent autour de Saturne un tore tout le long de l'anneau, véritable réservoir de molécules d'eau glacées. Des observations aussi fortes ont donc permis de mettre en évidence la présence d'un océan sous l'enveloppe glacée d'Encelade bien que son étendue au niveau du satellite global soit encore débattue. En effet, il se pourrait que ce réservoir liquide soit uniquement localisé au pôle sud d''après des mesures de champ gravitationnel (L. Iess *et al.* 2014) ou bien qu'il s'étende sur la globalité de la lune (Patthoff and Kattenhorn 2011; Thomas *et al.* 2016).

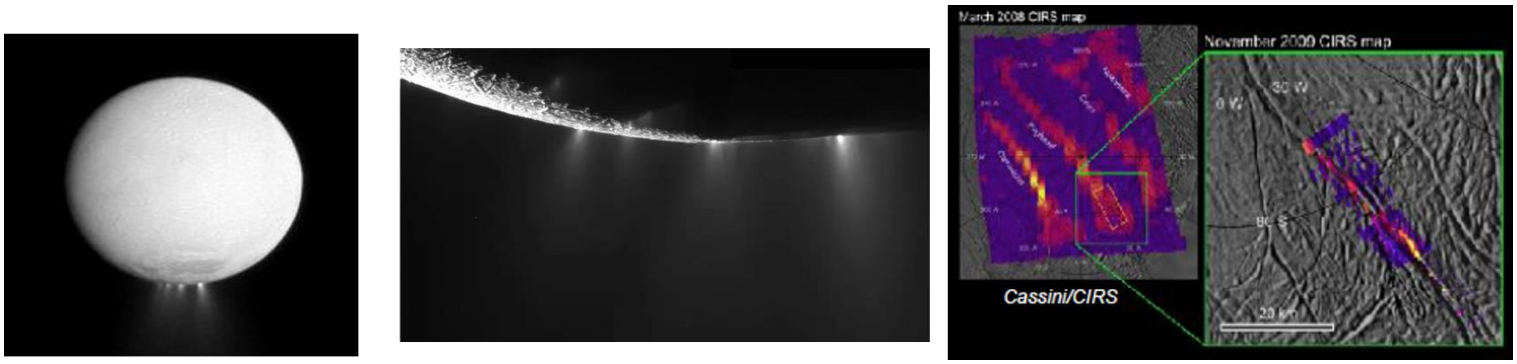


Figure I-12 : Images d'Encelade (gauche) et de son pôle sud (milieu) prises par la sonde Cassini. (Droite) Griffures de tigre telles qu'observées par l'instrument CIRS (Cassini Infrared Spectrometer) au pôle sud d'Encelade.

Mieux que de simplement photographier ces geysers, la sonde Cassini s'est approchée au plus près d'Encelade (à environ 170 km de la surface) pour aller échantillonner directement ces panaches grâce à deux de ses spectromètres de de masse (INMS et CDA). Une telle manœuvre a permis de déterminer la composition de ces geysers, à savoir majoritairement de l'eau, du dioxyde de carbone, et du méthane. Des sels contenant du sodium ont également été identifiés et retrouvés dans l'anneau E de Saturne, comme le chlorure de sodium (NaCl) mais également le phosphate de sodium (Na_3PO_4) (Postberg *et al.* 2009; Postberg *et al.* 2011; Postberg *et al.* 2023). Finalement, grâce à cet échantillonnage, des molécules organiques aliphatiques à faible poids moléculaire comme l'acétylène et le propane ont également été détectées (Waite *et al.* 2006), laissant présager d'une chimie organique au sein de l'océan même (Figure I-13).

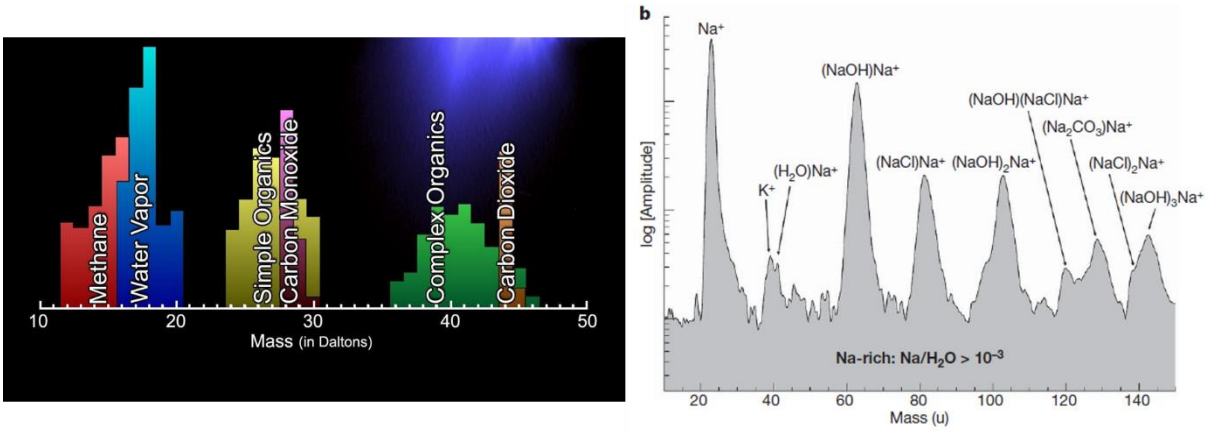


Figure I-13 : (Gauche) Spectre de masse obtenu par l'INMS (Ion and Neutral Mass Spectrometer) avec l'identification possible des composés détectés. (Droite) Spectre de masse obtenu par le CDA (Cosmic Dust analyzer) après analyse des geysers. Crédit : NASA/JPL et Postberg et al., 2009.

La mission Cassini a également permis d'acquérir de très nombreuses connaissances sur la structure interne d'Encelade, notamment par des mesures du champ gravitationnel (L. Iess *et al.* 2014). Tout comme Europe, l'océan d'Encelade qu'il soit global ou non, serait en interaction avec un manteau rocheux, pouvant engendrer des phénomènes d'hydrothermalisme du fait de l'interaction entre ces deux couches (Figure I-14). Des indices indirects pourraient même soutenir cette hypothèse, comme la détection d'hydrogène et de méthane dans les panaches d'Encelade (Waite *et al.* 2017) ainsi que

des particules silicatées dans les grains de l'anneau E d'Encelade (Hsu *et al.* 2015). Détecter et identifier de tels composés laisse présumer d'une activité hydrothermale récente sur Encelade, et notamment des systèmes produisant du CO_2 et de l'H_2. Ces systèmes hydrothermaux sont retrouvés au fond des océans terrestres au niveau du plancher océanique, autour desquels des systèmes biologiques se développent et survivent, même à des pressions très élevées (entre 100 et 500 bars) en se basant sur un métabolisme chimioautotrophique (Reveillaud *et al.* 2016).

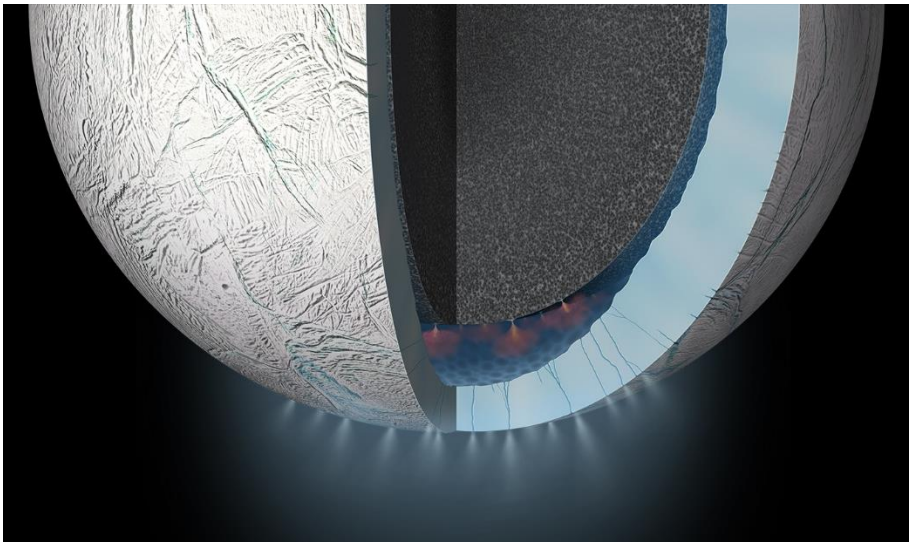


Figure I-14 : Illustration du pôle sud d'Encelade avec ses geysers émis ainsi que le potentiel hydrothermalisme supposé à l'interface entre océan et manteau silicaté. Source : NASA JPL/Caltech.

Encelade apparaît donc comme très similaire à Europe (hormis de par son diamètre), et de nombreuses analogies entre les deux satellites glacés, bien qu'évoluant dans des environnements radiatifs différents, peuvent être posées. Obtenir de nouvelles connaissances sur l'une des deux lunes peut donc permettre de répondre à des questions concernant l'autre. D'après toutes les informations acquises par les missions passées, il reste néanmoins certain qu'Encelade et Europe sont devenues des lieux de haut intérêt pour la recherche de vie dans le système solaire et pour la compréhension de son émergence.

Les autres satellites de Saturne

Parmi les autres satellites principaux de Saturne, Mimas possèderait un océan sous sa surface d'après des mesures indirectes de libration par la sonde Cassini (Noyelles 2017; Rhoden and Walker 2022), bien que cette dernière semble inactive, avec l'absence d'indice géomorphologique de cryovolcanisme passé ou actuel. Mimas reste un satellite pour lequel de nombreuses questions restent en suspens, questions pour lesquelles seule l'analyse *in situ* peut apporter des réponses.

1.1.3. Hypothèses sur l'existence d'autres mondes océans dans le système solaire.

La découverte des différents mondes océans décrits précédemment, a conduit la communauté scientifique à émettre des hypothèses quant à l'existence de mondes océans ailleurs dans le système

solaire. Ces suppositions sont basées sur des modèles théoriques, avec pour certaines, l'appui de données *in situ*, quand des sondes d'exploration spatiale ont pu survoler ces objets, mais les indices quant à la présence d'océan liquide sur ces corps planétaires sont parfois très maigres et insuffisants pour le moment. Parmi tous ces objets, quelques images de ces différents objets planétaires, toutes prises par des sondes d'exploration spatiale sont présentées sur la Figure I-15.

Au plus proche de la Terre, la planète naine Cérès, située dans la ceinture d'astéroïde principale, est candidate au titre de monde océan (Castillo-Rogez *et al.* 2020). Cérès a été étudiée par la sonde américaine Dawn, et a révélé notamment une altération aqueuse des matériaux de surface ainsi qu'une activité cryovolcanique récente (Ammannito *et al.* 2016; Ruesch *et al.* 2016). De plus, la détection de sels à la surface de Cérès laisse également supposer la présence d'eau (Bramble and Hand 2022; Nathues *et al.* 2022). C'est notamment la distribution homogène à la surface de Cérès de ces différentes observations qui suggère l'existence d'un océan. Des signatures spectrales de surface en infrarouge témoignent également de la présence de matière organique (Kaplan *et al.* 2018; Vinogradoff *et al.* 2021), mais rien ne prouve aujourd'hui que celle-ci est d'intérêt pour l'exobiologie. Par conséquent, pour Cérès également, des projets de mission d'analyse *in situ* sont en cours de préparation pour les prochains appels d'offre New Frontier.

En s'éloignant du Soleil et en dépassant le système Jovien et de Saturne, plusieurs lunes, orbitant autour d'Uranus, pourraient également être des mondes océans. Le système d'Uranus a seulement été étudié par des observations au télescope soit depuis le sol soit depuis l'espace mais également par la sonde Voyager 2. Les quelques données dont dispose la communauté scientifique a permis de supposer la présence d'océan sur Miranda, Titania, Ariel, Umbriel et Oberon (Cartwright *et al.* 2021a; Cartwright *et al.* 2021b; Castillo‐Rogez *et al.* 2023). Le manque de sondes ayant exploré ce système empêche d'avoir plus d'informations sur ces satellites et de confirmer ou réfuter la présence d'océan sous leurs surfaces. De futures missions d'exploration spatiale d'Uranus et de ses lunes sont donc nécessaires pour apporter des clés quant au potentiel exobiologique de ces lunes.

En se rapprochant désormais de Neptune, Triton a été proposée comme un monde océan. Seule la sonde Voyager 2 l'a survolé en 1989, laissant penser que Triton aurait des similitudes avec Titan d'un point de vue atmosphérique et pourrait abriter un océan du fait de l'observation de geysers sur les images obtenues avec Voyager 2 (Gaeman *et al.* 2012; Hansen *et al.* 2021), mais aussi sur des modèles d'étude des forces de marée et de dissipation de chaleur interne (Gaeman *et al.* 2012) . Seulement basé sur ces observations, la NASA a fait de Triton une priorité pour le programme New Frontier 6 avec déjà une proposition de projet de mission du nom de Trident (Howett *et al.* 2020).

Enfin, aux confins du système solaire dans la ceinture de Kuiper, Pluton, ayant été principalement étudiée par le survol de la sonde New Horizons en 2016, s'est révélée être une planète naine complexe. La présence d'une atmosphère de diazote, bien que très ténue (9 µbar) avec une photochimie organique en son sein, des cycles saisonniers du fait de l'excentricité de son orbite, des montagnes de glace et du cryovolcanisme en surface ont fait de Pluton un objet planétaire d'intérêt. Des indices géomorphologiques, notamment de resurfaçage par du cryovolcanisme pourraient laisser supposer l'existence d'un océan en subsurface (Goldman *et al.* 2018; Hendrix *et al.* 2019). Pour Pluton

aussi des projets de mission sont en cours de développement pour répondre à l'appel d'offre d'un des programmes New Frontier de la NASA.

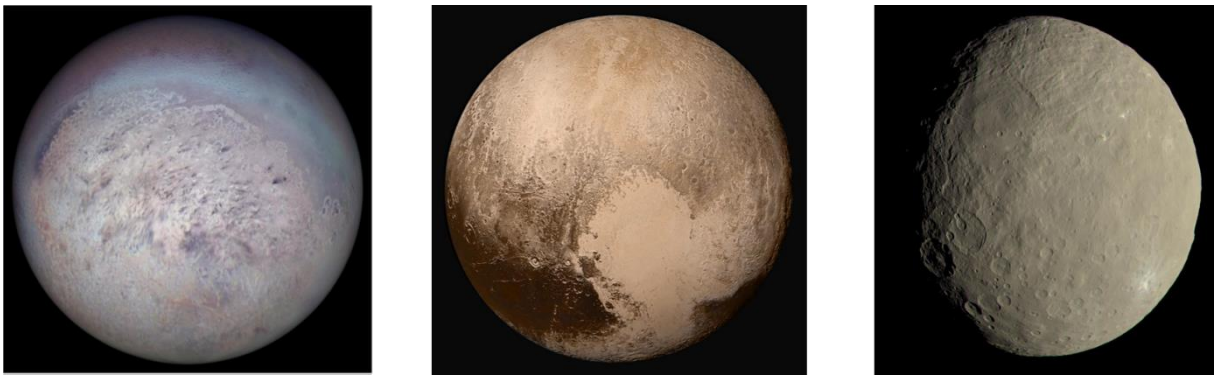


Figure I-15 : (Gauche) Reconstruction d'image du satellite Triton à partir de photos prises par la sonde Voyager 2. (Milieu) Compilation de 4 photos de Pluton prises par la sonde New Horizons, (Droite) Image de la planète naine Cérès prise par la sonde Dawn. Les couleurs ont été estimées à partir des spectres de réflectance. Sources : NASA/JPL-Caltech.

Comparaison des différents mondes océans et conclusion sur les cibles prioritaires.

Comme décrit précédemment, tous les mondes océans qui ont été découverts sont différents et ne sont pas équivalents pour la recherche de chimie prébiotique et d'indices de vie dans l'état de nos connaissances actuelles. De ce fait, certains de ces corps planétaires seront privilégiés pour l'envoi de sondes d'analyse *in situ*. Le NASA Decadal survey (ou rapport décennal) permet de mettre en avant les questions scientifiques clés de la décennie en identifiant les cibles planétaires ainsi que les missions pour l'exploration spatiale. La mission *Dragonfly* (détaillée plus loin) a été sélectionnée en 2019 dans le programme New Frontier 4, bien que Titan ne fasse pas parti des destinations retenues initialement. Le rapport décennal 2023-2032 a mis en avant Encelade comme cible prioritaire pour l'exobiologie (Board and Council 2012). Une mission flagship de la NASA, Enceladus Orbilander (détaillée en section I.4) a été toute indiquée pour aller échantillonner les geysers au pôle sud d'Encelade et également y déposer un atterrisseur. De plus, la mission Europa Lander (détaillée également ci-après) a été financée pour démontrer les capacités technologiques d'un atterrisseur à la surface d'Europe avant de sélectionner potentiellement de manière définitive la mission. Europe devrait donc voir un atterrisseur à sa surface dans les prochaines décennies, la mission n'étant pas été retenue pour le programme New Frontier 5 de la NASA. L'analyse *in situ* étant primordial pour la recherche exobiologique, ce travail de doctorat s'intéressera donc principalement à Titan, Encelade et Europe.

Les cibles planétaires prioritaires dans le système solaire pour l'exobiologie ayant été présentées, il s'agit désormais d'expliciter quels sont les marqueurs de la chimie prébiotique ou bien les traces de vies tant convoitées, qu'elles soient passées ou actuelles, qui sont recherchées. Qu'appelle-t-on traces de vie ou comme cela est entendu fréquemment « biosignatures » ? S'agit-il d'aller directement chercher à identifier la vie telle qu'on la connait ou bien d'aller chercher des indices

relatifs aux systèmes biologiques dont nous sommes familiers ? Quelles sont les molécules d'intérêt à rechercher ? C'est à toutes ces interrogations que le prochain volet de cette introduction se propose d'apporter des éléments de réponse, en se plaçant dans le contexte des mondes océans.

2. La matière organique : une clé pour la recherche de vie sur les mondes océans.

La matière organique est basée sur les 6 atomes qui constituent majoritairement les êtres vivants, appelés CHNOPS : le carbone, l'hydrogène, l'azote, l'oxygène, la phosphore et le soufre. La stratégie de la NASA pour la recherche de vie ailleurs dans le système solaire a été longtemps « Follow the water » (littéralement suivre l'eau) et a depuis été complétée par « Follow the carbon » (littéralement suivre le carbone). En effet, la matière organique à la base de la plus petite entité biologique des systèmes vivants, la cellule, peut être directement reliée à celle-ci ou du moins porteuse de message pouvant indiquer la mise en place d'une chimie prébiotique voire la potentielle présence de vie.

2.1. La quête de biosignatures et de bioindices

Que ce soit pour les molécules organiques elles-mêmes ou bien pour les messages qu'elles portent, il n'est pas aisé de considérer cela comme la présence potentielle ou non de vie. En effet, définir la vie demeure aujourd'hui très complexe même si nous savons la caractériser par certaines de ses propriétés. Il s'agit donc de définir ce qui pourrait être aujourd'hui de manière non ambigüe des marqueurs qui témoigneraient de la présence de vie passée ou actuelle. On parle alors de biosignatures ou de biomarqueurs. Autrement dit, un biomarqueur constitue une ou un ensemble de preuves irréfutables quant à la présence de vie. C'est de cette définition que de nombreuses discordes au sein de la communauté scientifique sont nées quant à la définition de biosignatures. Que doit-on considérer comme biosignature et qu'est ce qui ne l'est pas ? Pour affirmer la présence de vie telle que nous la connaissons, il faudrait passer en revue tous les processus abiotiques connus et montrer que ces derniers ne peuvent pas produire de telles signatures, ainsi une biosignature serait découverte. De cette ambigüité découle donc un second terme, moins sujet à débat, appelé bioindice. Dans ce cas il s'agit plutôt d'une trace de vie potentielle mais dont l'existence pourrait être expliquée à la fois de manière biotique et abiotique.

Les molécules organiques carbonées, constitutives des êtres vivants terrestres, représentent des bioindices voire des biosignatures de par leur nature et structure mais également de par le message dont elles peuvent être porteuses.

2.1.1. Molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie

Les cellules des êtres vivants, quel que soit le règne phylogénétique considéré, sont composées par les mêmes molécules, essentielles à toute forme de vie. Ainsi les acides nucléiques, que ce soit l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'acide ribonucléique (ARN) sont porteurs de l'information génétique. Les lipides ont de nombreuses fonctions biologiques à la fois énergétiques et structurantes et sont les précurseurs de toute structure membranaire. Les protéines ont également de nombreuses fonctions au sein des organismes vivants, que ce soit dans la signalisation cellulaire, la division cellulaire ou encore dans les fonctions métaboliques et énergétiques. Peuvent être ajoutés à cette liste les

polymères de sucres, appelés polysaccharides, qui sont également impliquées dans plusieurs voies métaboliques. Tous ces biopolymères avec la complexité moléculaire et structurelle qui leur est associée, peuvent être considérés comme de réelles biosignatures, étant donné qu'une synthèse abiotique de telles macromolécules n'a pas été découverte à ce jour.

Toutefois, ces polymères, aussi nombreux soient-ils, se conservent très mal dans un environnement suite à la mort des organismes. La détection de telles macromolécules dans des environnements extraterrestres peut s'avérer être un défi expérimental et analytique considérable. En effet, ces biopolymères se dégradent en macromolécules et monomères beaucoup plus stables, appelés kérogènes. Contrairement au biopolymères décrits précédemment, ces composés pourraient être détectés sur d'autres corps planétaires. Or, ces produits de dégradation étant moléculairement moins complexes, constituent seulement des bioindices et non des biosignatures. En effet, la plupart de ces composés peuvent être synthétisés de manière abiotique. Néanmoins, même si la détection de telles molécules dans des environnements extraterrestres ne peut pas indiquer irréfutablement la présence de vie, elle peut toutefois permettre d'apprécier la mise en place d'une chimie prébiotique. Il faut donc bien comprendre que les biopolymères constituent des biosignatures quant à la présence de vie alors que les monomères qui les composent représentent des précurseurs prébiotiques ou des produits de dégradation. Les différentes sous parties ci-après s'intéressent donc à la description de ces monomères, sous-unités des biopolymères cellulaires.

Les acides nucléiques

Les deux acides nucléiques des systèmes vivants sont l'ADN et l'ARN. La différence entre ces deux acides nucléiques est le sucre qui les compose. Pour l'ADN, le sucre utilisé est le β-désoxyribose alors que pour l'ARN c'est le β-ribose. Hormis le sucre qui diffère entre ces deux molécules, la structure est la même, à savoir un polymère de plusieurs nucléotides. Un nucléotide est composé d'une base azotée ou nucléobase (existante au nombre de 5), du β-désoxyribose pour l'ADN, et de trois phosphates (Figure I-16). Les nucléotides sont donc au nombre de 5 selon la nucléobase qui est impliquée dans la structure.

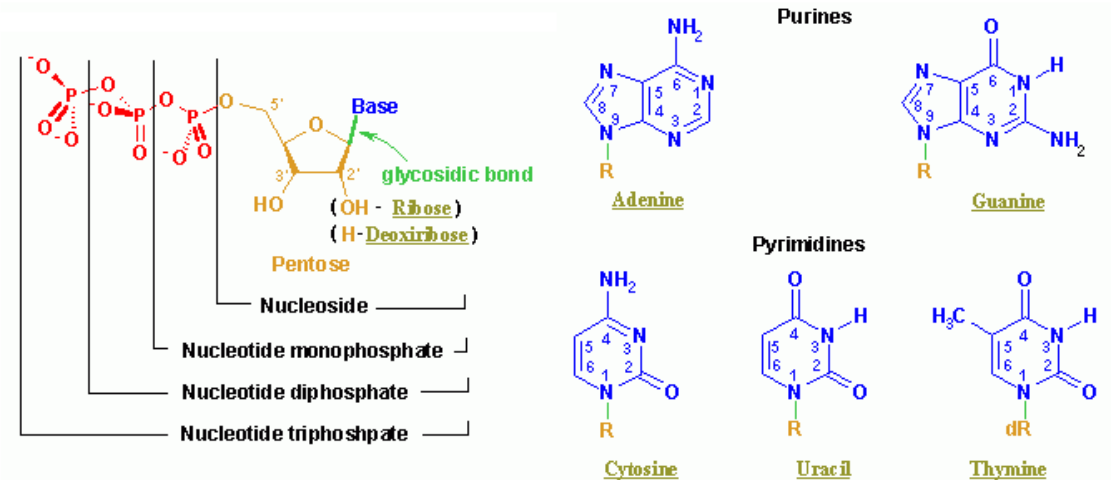


Figure I-16 : Nucléobases composant l'ADN et l'ARN dans les systèmes biologiques terrestres et dénomination des nucléotides selon le nombre de phosphate. Schéma libre de droits.

La dégradation de l'ADN ou de l'ARN donne des monomères plus stables appelés nucléotides. Ainsi, parmi les molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie, les nucléotides font partis des composés prébiotiques qui sont recherchés sur les autres corps planétaires. Les nucléotides eux-mêmes peuvent se dégrader et donner un nucléoside (nucléobase et sucre) et trois phosphates ou alors une nucléobase, un sucre et les trois phosphates. Par conséquent, la détection de chacun de ces composés pourrait apporter des indices sur le développement d'une chimie prébiotique ou sur la potentielle présence d'une vie passée ou présente qui utilise comme support de l'information génétique, l'ADN ou l'ARN.

L'adénosine triphosphate (ATP) qui est un nucléotide, représente également la molécule énergétique considérée comme universelle car retrouvée dans tous les règnes phylogénétiques. C'est le clivage de la liaison entre les phosphates qui libère de l'énergie dans les systèmes vivants. Par conséquent, identifier l'ATP dans un environnement extraterrestre, en plus de son implication prébiotique dans la structure de l'ADN, pourrait apporter des informations sur la mise en place d'un métabolisme énergétique, potentiel témoin de la présence de vie telle qu'on la connaît.

Les lipides et les acides gras.

Les lipides sont une classe de molécules de fort intérêt exobiologique ayant des fonctions structurales et énergétiques au sein des organismes vivants. Ils existent sous différentes formes, selon leur fonction biologique.

Parmi les lipides aliphatiques, il existe les phospholipides et les sphingolipides qui ont un rôle crucial dans les structures membranaires des êtres vivants et les mono-, di- ou triglycérides, molécules clés pour le stockage de l'énergie. Toutes ces molécules sont constituées par de longues chaînes aliphatiques, les acides gras qui sont des acides carboxyliques à longue chaîne (Figure I-17). Ces acides gras peuvent se dégrader en acides carboxyliques plus courts qui sont des molécules très stables dans le temps et qui peuvent survivre à des conditions très dégradantes, telles que retrouvées à la surface des mondes océans ou de Mars par exemple. Ces monomères provenant de biopolymères peuvent donc constituer de très bons bioindices témoignant d'une vie passée. Pour toutes ces raisons, ce type d'espèces chimiques est particulièrement recherché dans des environnements extraterrestres, du fait de leur stabilité et de leur implication prébiotique.

Les lipides aromatiques sont aussi des molécules, plus stables que les aliphatiques du fait de leur aromaticité, qui sont fortement recherchés en exobiologie. Parmi les lipides aromatiques sont retrouvés les stéroïdes (chez les eucaryotes) comme le cholestérol qui apporte des contraintes stériques dans les membranes cellulaires, ou encore les hopanoïdes (chez les bactéries). Ces deux dernières classes de molécules pourraient être des bioindices forts quant à la présence de structures membranaires et étant des marqueurs spécifiques de règnes phylogénétiques.

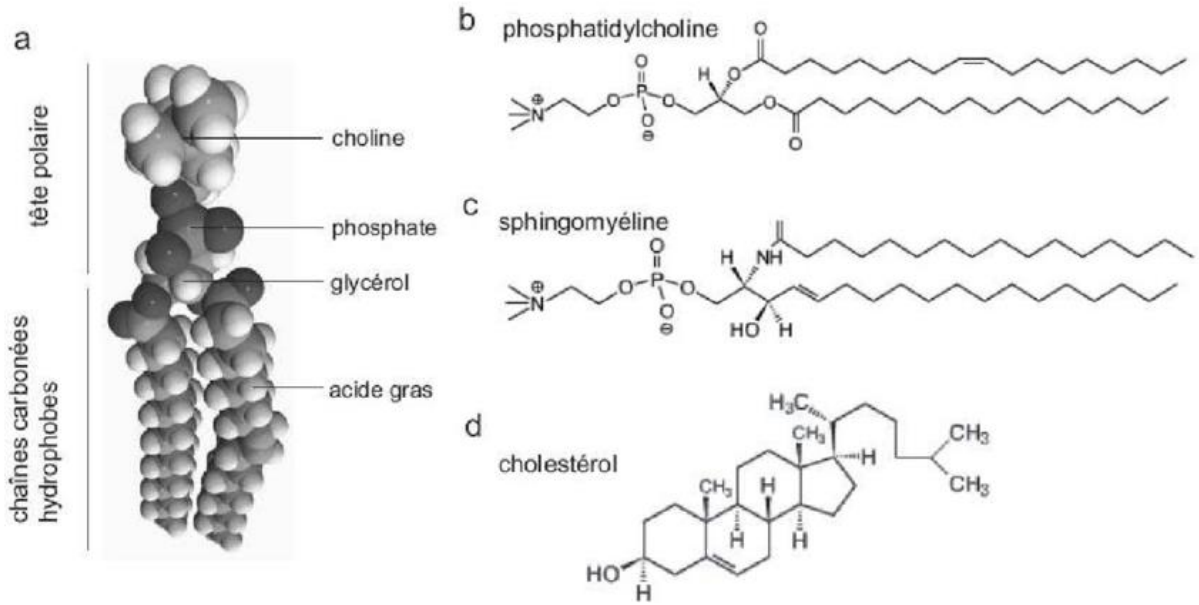


Figure I-17 : (a) Structure générale des phospholipides, (b) exemple d'un phospholipide avec une tête polaire constituée de la choline, (c) exemple de sphingolipide avec une tête de myéline, le glycérol étant remplacé par une molécule de sphingosine, (d) structure du cholestérol, un stéroïde. Source : (Delatour 2007).

Les protéines, peptides et acides aminés

Les dernières molécules d'intérêt prébiotique et pour la recherche de traces de vie sont les protéines et les sous-unités qui les composent. Les protéines possèdent un éventail de fonction chimique qui en font des composés très complexes. Quelle que soit la fonction biologique des protéines, celles-ci sont toutes composés de la même unité élémentaire, l'acide aminé. Il existe de nombreux acides aminés, mais la vie telle que nous la connaissons n'en utilise que 22 pour former des protéines (dits protéinogènes) (Figure I-18). Ce premier constat permet de réduire grandement le nombre de molécules à rechercher quand l'intérêt est porté sur les acides aminés. La découverte des acides aminés sur d'autres corps planétaires est depuis longtemps une des quêtes principales des exobiologistes. Toutefois, l'identification de la glycine sur la comète 67 Churyumov-Gerasimenko (Altwegg *et al.* 2016), a montré que cet acide aminé pouvait être synthétisé de manière abiotique. C'est pourquoi, en plus de la détection d'acides aminés, les peptides qui sont des assemblages de plusieurs acides aminés sont aussi des molécules de fort intérêt pour l'exobiologie. En effet, l'assemblage de plusieurs acides aminés entre eux nécessitent chez les systèmes biologiques terrestres l'intervention d'enzymes (protéine avec une activité catalytique). Par conséquent, la détection de peptides, de plus ou moins longues chaînes, pourrait indiquer la présence potentielle de systèmes biologiques dans un environnement planétaire.

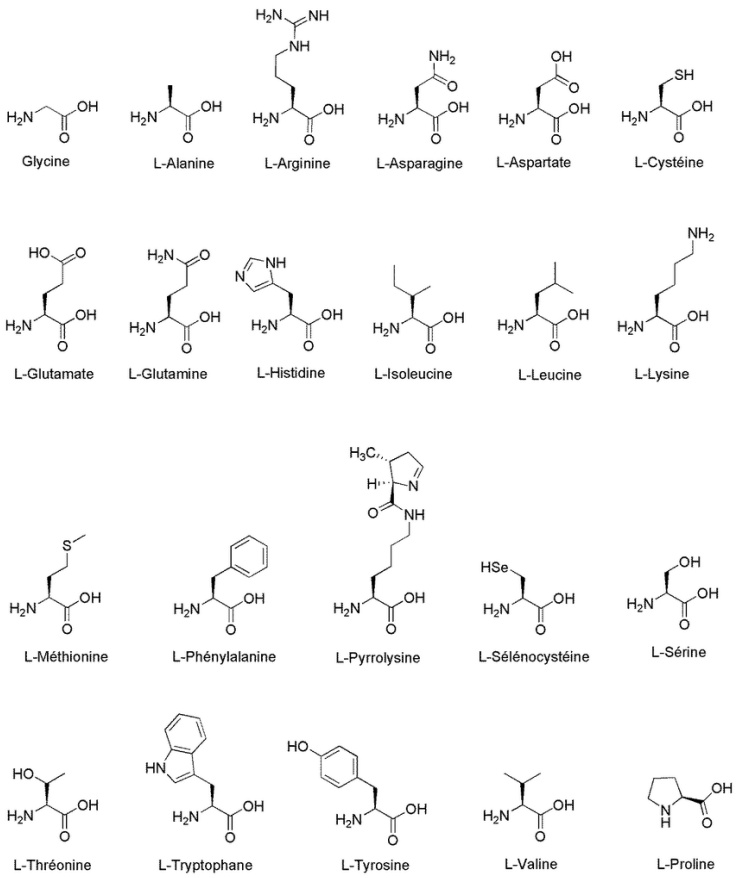


Figure I-18 : Formule développée des formes L des 22 acides aminés protéinogènes identifiées aujourd'hui.

Toutes ces molécules précédemment décrites sont à la base de tout système vivant terrestre, peuvent être les produits d'une chimie prébiotique et sont indispensables à l'apparition d'une vie primitive, potentiellement sous forme de protocellule (Figure I-19).

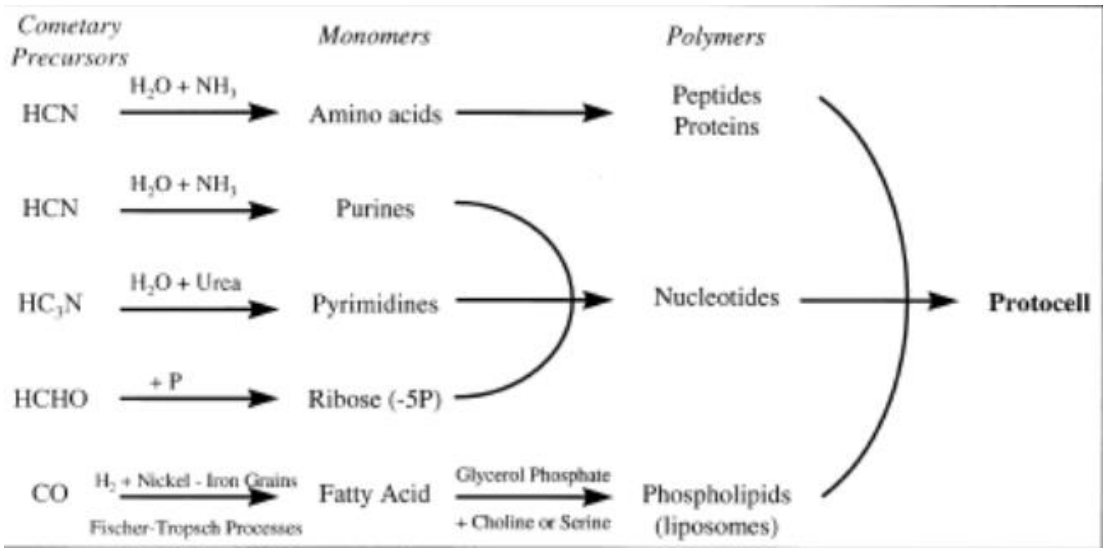


Figure I-19 : Constituants principaux d'une cellule telle que connue sur Terre, avec leurs précurseurs potentiels. Adapté de Oro and Berry, 1987.

Parmi toutes les molécules décrites précédemment, additionnellement au fait d'être probablement relatives à la présence de vie ou à la mise en place d'une chimie prébiotique, certaines présentent une propriété moléculaire intrinsèque de haute importance pour la recherche de vie dans le système solaire : la chiralité.

2.1.2. La chiralité et l'excès énantiomérique

La chiralité est une propriété intrinsèque des molécules en lien direct avec leur activité optique. Les molécules chirales ont la capacité de dévier le plan de polarisation d'une lumière polarisée incidente dans un sens ou dans l'autre selon la forme de la molécule. Les différentes formes des molécules chirales sont appelées énantiomères. Ces formes sont non superposables mais image l'une de l'autre dans un miroir (Figure I-20). Plusieurs nomenclatures sont utilisées pour différencier les énantiomères, celle retenue ici est la plus utilisée en biologie : l'énantiomère L ou D. Une molécule est considérée comme chirale lorsqu'elle possède un atome de carbone dit asymétrique. Concrètement cela signifie que cet atome est porteur de quatre substituants différents. Outre la liaison d'un carbone avec quatre groupements différents, la chiralité peut aussi provenir des molécules possédant une hélicité ou un axe/plan de chiralité.

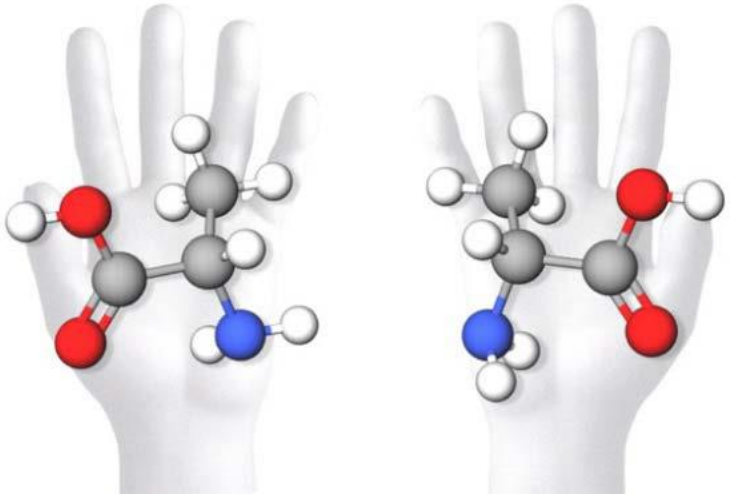


Figure I-20 : Exemple d'une molécule chirale, non superposable mais image l'une de l'autre dans un miroir, comme les deux mains d'un humain. Source (Hand et al. 2017). Les sphères rouges représentent l'oxygène, les grises le carbone, les blanches l'hydrogène et les bleues l'azote.

Cette propriété moléculaire prend tout son sens en exobiologie. En effet, sur Terre, pour des systèmes abiotiques, les deux formes énantiomériques (L et D) sont retrouvées en proportion identique, on parle de mélange racémique. En revanche, les systèmes biologiques terrestres ont privilégié un énantiomère de certaines molécules par rapport à l'autre. Typiquement, c'est le cas pour les acides aminés qui constituent les protéines, pour lesquels seul la forme L est retrouvée alors que pour les sucres, c'est la forme D qui a été privilégiée. Dans ce cas, on parle d'homochiralité. Ainsi, la détection d'un déséquilibre énantiomérique, avec une forme moléculaire privilégiée par rapport à l'autre, sur un autre corps planétaire pourrait être considérée comme une biosignature.

2.1.3. D'autres potentiels bioindices

Hormis des marqueurs moléculaires et la chiralité, d'autres bioindices peuvent également exister. Un exemple d'un tel bioindice est le ratio isotopique, qui permet l'estimation de la proportion d'un isotope par rapport à un autre. Sur Terre, ces ratios sont influencés notamment par les métabolismes des systèmes biologiques qui vont préférentiellement choisir un isotope plutôt qu'un autre. Typiquement, c'est le cas du ratio entre le ^{12}C et le ^{13}C, où le premier des deux est privilégié dans la fixation du CO_2 par les plantes lors de la photosynthèse. Le système photosynthétique crée donc une différence de proportion entre les deux isotopes au sein des plantes, qui n'est aujourd'hui pas explicable par un processus abiotique. De telles différences sont aussi observées pour les ratios $^{15}N/^{14}N$, $^{1}H/^{2}H$ ou encore $^{32}S/^{34}S$, dues respectivement à la dénitrification bactérienne dans les sols, à l'activité des méthanogènes (métabolisme basé sur le méthane) et au métabolisme réducteur du soufre chez certaines bactéries. Ces ratios peuvent donc être considérés comme des bioindices, n'ayant pas d'origine abiotique connue. Cependant, parmi les ratios cités précédemment, certains comme celui du carbone ne sont pas pertinents pour la recherche de vie sur les mondes océans. En effet, le développement de la vie (s'il existe) sur ces lunes glacées, est attendu pour être au cœur de l'océan, sous la couche de glace, à l'abri de toute lumière, n'autorisant pas la mise en place d'un métabolisme photosynthétique.

D'autres observations peuvent également être considérées comme des bioindices, notamment les structures minéralogiques résultant de l'interaction entre des micro-organismes et la matrice minérale, mais de nombreux travaux actuels parviennent à former des structures identiques avec des processus abiotiques.

Parmi l'éventail de bioindices décrits précédemment, il apparaît donc que les molécules organiques et la chiralité sont les marqueurs d'une potentielle activité biologique les plus pertinents pour la quête de vie sur les mondes océans. Ayant mis en avant les éléments moléculaires à chercher voire trouver pour émettre des hypothèses sur le développement d'une potentielle chimie prébiotique ou vie passée et/ou actuelle dans des environnements extraterrestres, il reste à définir les moyens pour atteindre un tel objectif.

2.2. L'analyse *in situ*, un indispensable dans la quête de matière organique.

Les observations au télescope, que ce soit depuis le sol ou depuis l'espace peuvent apporter de très nombreuses informations sur les mondes océans, mais ne permettent pas l'identification des marqueurs moléculaires précédemment décrits ni la quantification d'un excès énantiomérique. Une des possibilités pour l'identification de tels biomarqueurs voire biosignatures est le retour d'échantillon depuis les corps planétaires du système solaire directement sur Terre. En effet, ramener des échantillons extraterrestres sur Terre, permet une analyse bien plus fine et approfondie que ce qu'il est possible de faire dans l'espace. Cela a déjà été réalisé sur des petits corps comme la comète 81P/Wild avec la mission Stardust (Brownlee *et al.* 2006), l'astéroïde Itokawa avec la mission Hayabusa (Yoshikawa *et al.* 2021) et l'astéroïde Ryugu avec la mission Hayabusa 2 (Watanabe *et al.* 2017). De plus, le programme Mars Sample Return a pour objectif de ramener des échantillons de Mars dans les années 2030 (Mattingly and May 2011). Une mission similaire est également envisagée pour Encelade

pour ramener des échantillons provenant directement des geysers au pôle sud (Neveu *et al.* 2020; Tsou *et al.* 2012). Toutefois de tels programmes requièrent des budgets conséquents ainsi que des années de mise en place, pour un succès qui n'est pour l'instant pas assuré. Typiquement, dans le cas de Mars, décoller d'un autre corps planétaire d'une telle taille n'a jamais été réalisé par le passé.

Après tous ces constats, bien que les missions de retour d'échantillon restent très prometteuses pour l'avenir en termes de retombées scientifiques, il apparaît que le meilleur moyen pour aller chercher des bioindices voire des biosignatures sur des corps planétaires du système solaire, que ce soit interne ou externe, nécessite l'envoi de sondes d'exploration spatiale. Ces sondes pourront alors effectuer des analyses dites « *in situ* » et rechercher des molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie.

3. L'instrumentation chimique pour l'analyse in situ de la matière organique sur des mondes océans.

Après avoir défini les lieux de fort intérêt pour l'exobiologie dans le système solaire et avoir décrit ce qui était recherché comme indices voire comme témoin de la présence de vie passée ou actuelle, il s'agit désormais de définir les moyens utilisés pour détecter de tels marqueurs.

Il existe de nombreuses méthodes d'analyse moléculaire, développées notamment à des fins d'analyses pharmaceutiques ou biologiques, avec des applications terrestres mais grand nombre d'entre elles ne répondent pas aux critères qu'imposent les contraintes spatiales pour l'analyse *in situ*. Cependant, depuis quelques années, de nombreux développements instrumentaux visant à spatialiser des méthodes d'analyses chimiques ont vu le jour. Par exemple, toujours dans une optique de détection de matière organique, il y a une très forte motivation à vouloir adapter la spectrométrie de masse à haute résolution avec la technologie Orbitrap™ pour augmenter grandement la résolution spectrale (valeur de résolution de 100 000 voire plus) en comparaison des spectromètres de masse utilisés actuellement dans l'instrumentation spatiale. Un des prototypes les plus avancés à ce jour et ayant fait ses preuves sur des échantillons analogues aux mondes océans est le LAb-CosmOrbitrap (pour Laser Ablation Cosmorbitrap) développé par un consortium de 6 laboratoires (Selliez *et al.* 2023; Selliez *et al.* 2020). Un autre détecteur, qui a été développé, et qui est à bord de la sonde Europa Clipper (Waite *et al.* 2019), est le spectromètre de masse à temps de vol MASPEX qui permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers (Brockwell *et al.* 2016). Ce détecteur pourrait également être embarqué à bord d'un des projets de missions spatiales à destination d'Encelade, la mission Enceladus Life Finder (ELF)(Reh *et al.* 2016)

De plus, des prototypes instrumentaux visant à détecter des molécules complexes voire directement des cellules ou des spores sont aussi en développement. C'est par exemple le cas d'un instrument développé au Centre d'Astrobiologie en Espagne, nommé SOLID (pour Signs Of Life Detector) basé sur la détection de biomolécules grâce à des anticorps qui sont révélés par fluorescence (Parro *et al.* 2011; Parro *et al.* 2005).

Toutefois, il apparaît que la spectrométrie de masse, en tant que détecteur, est la technique universelle et déjà spatialisable, avec un héritage dans l'exploration spatiale important pour la recherche de matière organique. De plus, les spectromètres de masse peuvent se coupler facilement à des méthodes d'ionisation et séparatives en amont de la détection. Ainsi, les différentes parties qui suivent détaillent les méthodes qui sont couplées à la spectrométrie de masse et qui ont été développées pour l'exploration spatiale ou ont connu des développements répondant aux contraintes d'une analyse spatiale et seront envoyées à bord des futures sondes pour l'analyse de matière organique sur les mondes océans.

3.1 Le choix de l'analyse chimique selon les composés cibles

Le choix des méthodes d'analyse chimique à utiliser est directement dépendant des molécules qui sont ciblées. C'est donc le spectre d'analyse chimique des techniques (nature, masse et polarité des molécules) qu'il faut prendre en considération. La chimie sur les mondes océans, d'après nos connaissances actuelles semblent être très riche et diversifiée, notamment pour Titan, et avec de nombreuses hypothèses pour Europe et Encelade concernant une chimie prébiotique voire une biochimie. Ici, quatre méthodes seront présentées, dont trois sont embarquées à bord de missions à destination des mondes océans ou candidates à l'intégration dans de futures missions. Ces quatre méthodes sont la chromatographie en phase liquide (CPL), la désorption-ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse (LD-MS), l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour les applications spatiales, les trois dernières ont en commun d'utiliser le même détecteur à savoir un spectromètre de masse. Ces quatre techniques sont complémentaires entre elles, car elles permettent d'analyser une large gamme de molécule allant de masse très faibles (quelques daltons) à des masses élevées (environ 2500 Da). De plus, l'électrophorèse capillaire, la chromatographie en phase liquide et la chromatographie gazeuse permettent la séparation des énantiomères provenant des molécules chirales, qui fait partie des exigences pour les missions exobiologiques d'analyse *in situ.*

3.1.1. La désorption-ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse

La désorption laser couplée à la spectrométrie de masse est une méthode qui repose sur l'analyse d'un échantillon dense (liquide ou solide) par désorption/ionisation de ses molécules avec un laser. Les molécules ainsi ionisées sont ensuite détectées par un spectromètre de masse. L'utilisation d'une telle source d'ionisation permet de cibler des molécules ayant une masse élevée, comme des acides gras lourds, des peptides voire des polypeptides, molécules de haute importance pour l'exobiologie. Toutefois c'est une méthode qui n'est pas séparative et l'analyse des spectres de masse peut ainsi s'avérer compliquée quand plusieurs molécules sont détectées au même instant. C'est une technique d'analyse chimique qui est intégrée à l'instrument MOMA de la mission Exomars (Goesmann *et al.* 2017) et qui sera également embarquée au sein de l'instrument DraMS à bord de la mission *Dragonfly* (Grubisic *et al.* 2021).

3.1.2. Les techniques séparatives et d'analyse chirale

La séparation des molécules dans un échantillon peut s'avérer être une étape cruciale avant la détection de ces dernières par le spectromètre de masse, améliorant nettement les possibilités d'identification stricte de chaque composé et permettant également la séparation des isomères et surtout les énantiomères. Parmi ces méthodes séparatives, certaines sont en cours d'étude pour la spatialisation (chromatographie en phase liquide (CPL)), d'autres dont le prototype spatialisable est en cours de développement voire prêt (électrophorèse capillaire) et enfin les dernières qui ont déjà été embarquées à bord de sondes spatiales (chromatographie en phase gazeuse (CPG)).

La chromatographie en phase liquide (CPL)

Parmi les méthodes séparatives utilisées couramment pour des applications terrestres, la chromatographie en phase liquide permet la séparation de composés présents dans un échantillon selon des interactions chimiques ou physiques entre la phase mobile (liquide qui contient les échantillons) et la phase stationnaire. La différence avec la chromatographie en phase gazeuse est que l'échantillon est sous forme liquide. Cette méthode permet de cibler des composés à plus haut poids moléculaires que la CPG et est donc complémentaire de celle-ci. Par exemple, cette technique peut permettre de détecter des peptides composés de plusieurs acides aminés. En plus de cela, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode particulièrement efficace pour la séparation des énantiomères.

La CPL est notamment une méthode intéressante pour l'analyse d'échantillons astrophysiques, qu'ils soient des analogues synthétiques (tholins, glaces cométaires) ou provenant directement de l'espace (météorites, missions de retours d'échantillons). Le développement de protocoles de CPL couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) pour l'analyse d'échantillons astrophysiques (planétaires, cométaires, etc.) (Eddhif *et al.* 2018) a montré que la CPL-HRMS était en mesure, sans préparation d'échantillon, de détecter des composés d'intérêt pour l'exobiologie (acides aminés et sucres par exemple) en ciblant des poids moléculaires plus élevés que ceux atteignables par la CPG-SM.

De plus, dans une optique de spatialisation, une étude a également été effectuée pour évaluer l'impact des radiations sur les capacités analytiques des phases stationnaires liquides contenues dans les colonnes chromatographiques (Timoumi *et al.* 2022). Toutefois, l'utilisation d'une phase mobile liquide pour l'exploration spatiale reste un problème du fait des conditions drastiques imposées pour l'analyse *in situ*. Des études plus approfondies devront donc être réalisées pour estimer la potentielle spatialisation d'une telle méthode.

L'électrophorèse capillaire

Depuis deux décennies, l'électrophorèse capillaire est devenue une technique très prometteuse pour la séparation et l'analyse chirale des molécules, à la fois pour des applications terrestres mais aussi dans une optique d'exploration d'environnements extraterrestres, d'autant que cette méthode répond presque intégralement aux contraintes que l'exploration spatiale impose (Willis *et al.* 2015).

La séparation des molécules repose sur la vitesse de migration de ces dernières selon leur rapport charge/taille entre deux électrodes au sein d'un champ électrique dans un tube capillaire. Ce tube capillaire contient une phase appelée pseudophase.

Pour l'électrophorèse capillaire, l'analyse chirale se fait grâce à un sélectant chiral se trouvant au sein de la pseudophase. La révélation pour la séparation chirale des énantiomères se fait par fluorescence en marquant les composés d'intérêt avec un fluorophore. La séparation chirale d'acides aminés a ainsi pu être réalisée en utilisant un prototype qui avait été miniaturisé dans l'optique d'analyse spatiale *in situ* (Skelley and Mathies 2003). Depuis ces résultats avec ce fluorophore, un prototype complet a été développé dans l'optique d'une spatialisation, initialement pour la mission Exomars 2016 au sein de l'expérience Urey. Les premiers résultats ont montré que l'électrophorèse capillaire avec une micropuce était en capacité de détecter des composés azotés pouvant être d'intérêt exobiologique tel que l'adénine ou bien l'alanine et la sérine (Skelley *et al.* 2006).

Depuis ces premiers résultats prometteurs, l'utilisation de la micro-électrophorèse capillaire miniaturisée a été totalement automatisée avec succès, sans aucune action d'un utilisateur (Mora *et al.* 2011). L'utilisation du prototype spatialisable a ensuite été étendue à l'étude d'échantillons analogues aux mondes océans qu'ils soient synthétiques ou naturelles. L'analyse de tholins des aérosols de Titan a montré la capacité d'une telle méthode à détecter des amines primaires au sein de ces échantillons (Cable *et al.* 2014), ce qui n'a pas pu être effectué pour le moment avec la chromatographie en phase gazeuse. Il est important de noter que pour tous les résultats obtenus, l'électrophorèse capillaire était couplée à une détection par fluorescence induite par laser. Cette méthode de détection autorise des limites de détections de l'ordre du ppt.

Le prototype spatialisable a par la suite été couplé à un spectromètre de masse pour étudier des standards chimiques d'acides aminés, de peptides, de nucléobases et de nucléosides en présence de sels. Les résultats ont montré des limites de détection selon les composés allant du ppb (partie par milliards) à la centaine de ppb sans sels. En présence de sels, et sans aucun procédé de préparation d'échantillon, ces mêmes molécules sont détectées avec des limites de détection plus hautes de l'ordre du ppm (Mora *et al.* 2022). Cette méthode apparaît donc comme toute indiquée pour l'exploration *in situ* et la recherche de biosignatures à la surface des mondes océans tels qu'Encelade et Europe, où la présence de sels a été confirmée, ou encore Titan ou des sels d'ammonium sont notamment attendus. Toutefois, contrairement à la chromatographie en phase gazeuse, c'est une méthode qui ne possède pas d'héritage pour l'exploration spatiale, et l'utilisation de phase mobile liquide dans des environnements extraterrestres peut être sujette à quelques problèmes.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Contrairement à l'électrophorèse capillaire, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode séparative qui permet de s'affranchir, comme indiqué par son nom de la phase mobile liquide, et donc des problèmes de spatialisation qui peuvent être associés.

L'invention de la chromatographie en phase gazeuse, telle qu'utilisée aujourd'hui, est généralement attribué à Martin et James en 1952 (James and Martin 1952). C'est probablement devenue l'une des méthodes les plus répandues aujourd'hui dans le domaine de la chimie analytique, allant de l'industrie pharmaceutique à l'analyse de produits pétroliers, en passant par l'analyse de pesticides ou d'insecticides, mais aussi, sujet principal ici, pour l'analyse *in situ* d'environnements extraterrestres (Sternberg *et al.* 2007). L'éventail d'applications pour lesquelles la CPG est utilisée témoigne de ses nombreux avantages pour les analyses en laboratoire. Ces derniers vont de la sensibilité de l'instrument, de sa facilité d'utilisation, des temps d'analyse relativement courts, de la non-nécessité de devoir optimiser la phase mobile (contrairement à la chromatographie liquide) et de la simplicité pour coupler la CPG à des détecteurs comme la spectrométrie de masse (SM) (Figure I-21). Un tel couplage permet d'abaisser les limites de détection pour atteindre la picomole, ce qui en fait une méthode très sensible.

Figure I-21 : Chromatographe en phase gazeuse (CPG) couple à un spectromètre de masse (SM) au laboratoire

Le chromatographe en phase gazeuse se compose d'un injecteur et d'un four dont la température peut être programmée. Une colonne chromatographique capillaire, cœur analytique de cette technique, siège au sein de ce four et est tapissée d'une phase stationnaire pouvant varier selon les composés d'intérêt à analyser. L'échantillon est injecté et les molécules contenues sont vaporisées selon leur température d'ébullition avant d'être transférées au sein de la colonne chromatographique, en étant entrainées par un gaz vecteur, inerte chimiquement. Les différences d'affinité entre les molécules et la phase stationnaire, ainsi que leurs propriétés physiques (masse) vont permettre la séparation de ces dernières au sein de la colonne. Ainsi, chaque espèce chimique sortira de la colonne avec un temps qui lui est propre et identique d'une analyse à l'autre dans des conditions similaires. Ce

temps est appelé temps de rétention et permet donc la caractérisation de chaque composé. Après leur élution de la colonne chromatographique les molécules séparées sont transférées au spectromètre de masse où elles sont ionisées et fragmentées par impact électronique (dans la majeure partie des cas) ou par collision chimique. Pour l'impact électronique, l'énergie d'ionisation couramment utilisée (et tout au long de ce manuscrit) est de 70 eV. Le schéma de fragmentation est propre à chaque molécule et, tout comme le temps de rétention, est répétable pour un composé donné pour les mêmes conditions analytiques utilisées. Les composés ionisés sont ensuite séparés par un analyseur dont les principaux sont l'analyseur quadrupolaire, l'analyseur à temps de vol ou le piège à ions. Tout au long de ce manuscrit c'est un analyseur quadrupolaire qui sera utilisé pour mener à bien mes différentes études. Le signal résultant sera amplifié par un multiplicateur d'électron, ce qui permettra d'obtenir le spectre de masse de la molécule ionisée. L'intensité est exprimée en coups par seconde et est donc directement proportionnelle à la concentration de l'ion provenant d'un échantillon. Ce spectre de masse représente la carte d'identité des molécules ionisées et fragmentées aboutissant à leur identification par comparaison avec les spectres connus dans des bases de données. En résumé, la détection de chaque molécule contenue dans un échantillon se traduira par l'obtention d'un pic chromatographique pour lequel correspondra un spectre de masse pour l'identification (Figure I-22).

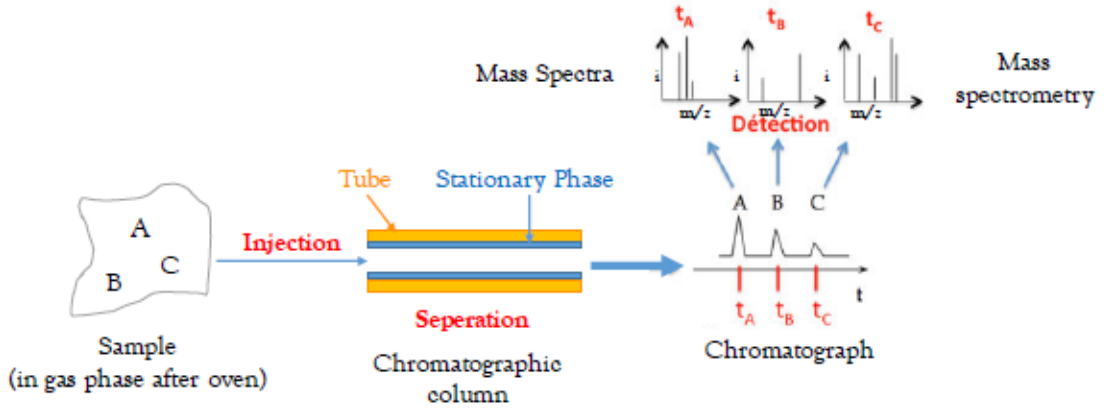


Figure I-22 : Principe de la CPG-SM pour un échantillon contenant trois molécules, nommées A, B et C. Crédit : Cyril Szopa.

Le cœur de l'analyse chromatographique est situé au niveau de la colonne. La phase stationnaire qui tapisse l'intérieur des colonnes chromatographiques est généralement composée d'un squelette de polysiloxane avec une proportion variable de groupements diphényles (ou d'autres) qui augmentent la polarité à la phase. Ainsi, selon le ratio entre ces deux constituants, les phases stationnaires seront plus ou moins polaires et permettront donc une plus ou moins bonne séparation des composés selon leur polarité. Il existe également d'autres phases stationnaires où le diphényle est substitué par un autre groupement, permettant de cibler plus spécifiquement certains composés. Une explication plus détaillée des phases stationnaires est donnée dans le Chapitre III de ce manuscrit.

La séparation chirale en CPG (et pour l'analyse *in* situ) se fait justement en substituant le groupement diphényle par de la cyclodextrine qui permet la séparation des énantiomères par

stéréochimie basée sur un principe dit « clé-serrure ». Il devient alors envisageable de séparer les énantiomères d'un composé chiral (selon la polarité et la taille de la molécule en question) et de quantifier l'abondance de chacun des énantiomères. Ainsi, détecter un déséquilibre énantiomérique pour les conséquences en exobiologie qu'il peut impliquer est tout à fait possible avec la chromatographie en phase gazeuse.

Toutefois, comme décrit précédemment, la CPG-SM se limite uniquement à l'analyse de molécules volatiles. Pour dépasser cette limitation analytique qui réduit considérablement la gamme de composés analysables, plusieurs méthodes de prétraitement des échantillons en amont de l'analyse chromatographique peuvent être utilisées, chacune ayant leurs avantages et leurs limitations. Pour l'analyse *in situ*, la pyrolyse, la dérivatisation et la thermochimiolyse sont usuellement utilisées. Les trois prochaines parties s'intéressent donc à la description du principe de ces différentes méthodes.

• *La pyrolyse*

La pyrolyse est une méthode de préparation d'échantillon qui consiste en une extraction thermique des composés contenus dans un échantillon. Concrètement, l'augmentation de la température permet la fragmentation des composés les plus réfractaires, résultant en la formation de molécules volatiles. La température apporte l'énergie suffisante pour rompre certaines liaisons chimiques, aboutissant en la formation de fragments moléculaires stables (Moldoveanu 1998). De plus, l'utilisation de températures avoisinant les 1000 °C peut permettre la destruction de structures minérales, relarguant ainsi des espèces chimiques pouvant être piégées dans ces dernières.

La fragmentation dépend directement de la vitesse à laquelle l'échantillon est chauffé et est caractéristique du composé pyrolysé. Par conséquent, en analysant les fragments résultant de la pyrolyse, appelés pyrolysats, il est envisageable de remonter à la structure chimique de la molécule mère (Moldoveanu 2009; Wampler 2006). Toutefois, la fragmentation est parfois telle que des produits de dégradation de pyrolyse peuvent être générés par différentes molécules mères, rendant l'identification de ces dernières beaucoup moins aisée.

La pyrolyse s'effectue en laboratoire à l'aide d'un pyrolyseur, couplé directement au système d'injection du CPG. La pyrolyse peut s'effectuer selon deux méthodes : (i) une pyrolyse dite « flash » qui chauffera l'échantillon très rapidement (quelques secondes) à une température donnée, ce qui permet de vaporiser les composés très peu volatils au détriment des plus volatils présents dans l'échantillon. (ii) Une pyrolyse en rampe de température, consistant au chauffage de l'échantillon avec un gradient de température choisi par l'utilisateur. Ainsi il est possible de vaporiser les composés les plus volatils sans les dégrader thermiquement (à basse température) tout en vaporisant les espèces les plus réfractaires (à haute température).

Cette méthode de préparation d'échantillon a été embarquée depuis le début de l'exploration spatiale dans les missions d'analyse *in situ*, par exemple sur l'atterrisseur Viking (Biemann et al. 1976), le rover Curiosity (Mahaffy *et al.* 2012), la sonde atmosphérique Huygens (Israel *et al.* 2003) mais aussi

le rover Rosalind Franklin de la mission Exomars (Goesmann *et al.* 2017) . En effet, c'est une méthode qui permet d'obtenir des informations sur la composition chimique d'un échantillon brut de manière simple et de savoir si présence de matière organique il y a, même si celle-ci est dégradée thermiquement.

• *La dérivatisation*

En CPG-SM, parmi les molécules qui sont difficilement analysables de manière directe sont retrouvées les molécules portant des fonctions polaires telles que des fonctions amines (-NH, -NH_2), alcools (-OH), carboxyles (-COOH) ou thiols (-SH). En effet, ces groupements contiennent des atomes d'hydrogène labiles pouvant interagir avec la matrice de l'échantillon, avec la phase stationnaire mais aussi former des liaisons hydrogènes intermoléculaires notamment. Toutes ces interactions ont pour conséquence de réduire fortement la volatilité de ces espèces, les rendant parfois indétectables, comme les acides aminés par exemple. Pour outrepasser cette contrainte, la dérivatisation (ou fonctionnalisation) de ces fonctions chimiques est une réaction désactivant ces dernières par substitution des hydrogènes labiles avec un groupement appartenant à l'agent de dérivatisation (Figure I-23). La réaction de dérivatisation permet d'améliorer la symétrie des pics, de diminuer les limites de détection et donc d'analyser des composés ayant une volatilité trop faible pour la CPG.

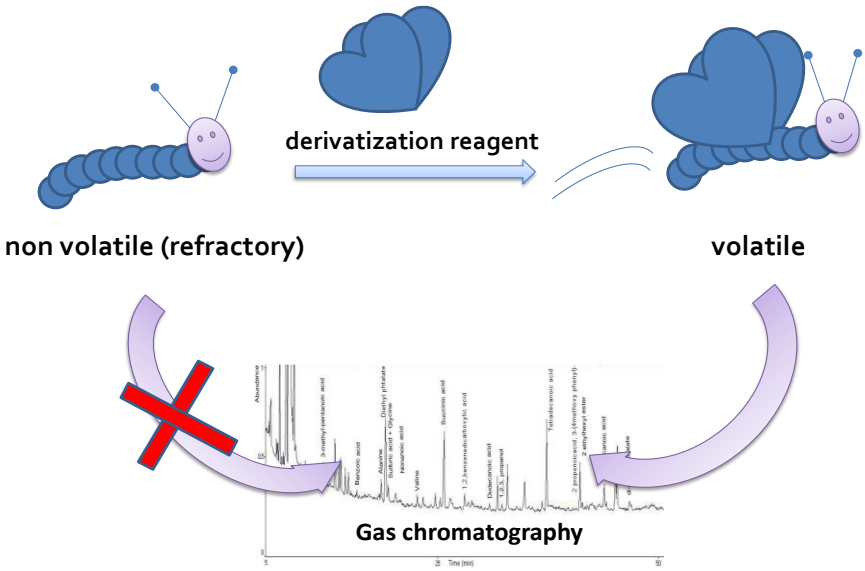


Figure I-23 : Illustration générale de la réaction de dérivatisation sur une molécule réfractaire. Crédit : D. Boulesteix

Une telle méthode a été développée pour l'analyse *in situ* des environnements extraterrestres, en utilisant deux agents de dérivatisation qui ont déjà été utilisés et embarqués à bord de sondes spatiales. Ces deux agents sont le diméthyl-formamide diméthyl-acétal (DMF-DMA) à bord de la sonde Rosetta et du rover Rosalind Franklin, bien que celui-ci soit encore sur Terre (Goesmann *et al.* 2017; Goesmann *et al.* 2006), et le N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA), embarqué sur le rover Curiosity (Mahaffy *et al.* 2012). Un exemple de réaction de dérivatisation avec chacun de ces réactifs est présenté sur la Figure I-24. Ces réactifs ont été choisis car ils permettent une réaction de dérivatisation rapide et en une seule étape, ce qui répond parfaitement aux contraintes

spatiales. LE MTBSTFA a été choisi car il possède un rendement de réaction élevé pour de nombreuses familles chimiques. LE DMF-DMA, bien que dérivatisant beaucoup moins biens certaines fonctions (*e.g.* les alcools), a été sélectionné car il permet la conservation des centres chiraux des molécules fonctionnalisées ce qui permet de séparer les énantiomères correspondants et quantifier un potentiel excès énantiomérique.

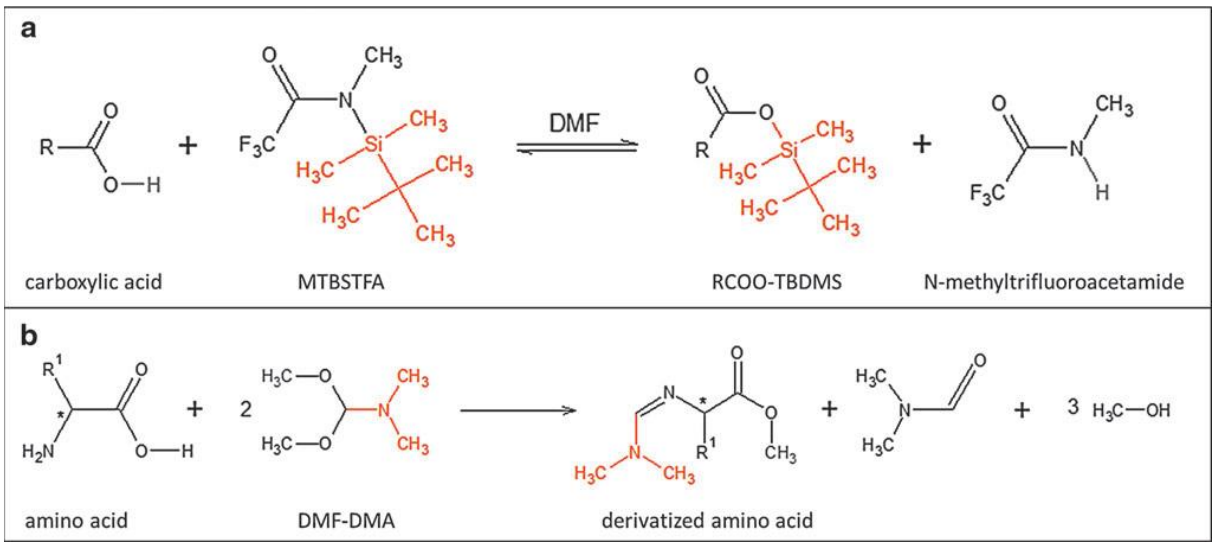


Figure I-24 : Exemples de réactions de dérivatisation entre (a) le MTBSTFA dans du DMF avec un acide carboxylique et (b) avec le DMF-DMA et un acide aminé. Source : (Goesmann et al. 2017)

• *La thermochimiolyse*

La thermochimiolyse est une technique de prétraitement d'échantillon qui combine l'extraction thermique (température avoisinant les 600 °C) de la pyrolyse avec une réaction chimique. Autrement dit, elle peut être considérée comme une dérivatisation à haute température. Cette méthode permet l'hydrolyse des liaisons polaires qui est suivie par une méthylation des groupements carboxyles, amines et alcools catalysée par le chauffage (Geoffroy Rodier et al. 2009). Autrement dit, il s'agit d'une pyrolyse douce associée à une réaction chimique qui stabilise la structure des espèces thermiquement extraites. La thermochimiolyse augmente la volatilité des espèces chimiques tout en stabilisant les pyrolysats formés lors du traitement thermique, ce qui simplifie leur analyse par CPG-SM. Ainsi, il devient possible de récupérer des chaînes moléculaires plus longues que par pyrolyse pure. En outre, cette méthode permet d'analyser des molécules polaires se trouvant dans des structures organiques plus complexes ou même dans des structures minérales. Il devient envisageable d'analyser des acides aminés présents dans des protéines, des acides gras dans des membranes cellulaires ou encore des acides carboxyliques dans des macromolécules abiotiques.

Plusieurs agents de thermochimiolyse existent mais le seul d'entre eux à avoir été envoyé dans une sonde d'analyse *in situ* est l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) à bord du rover Curiosity sur Mars. Toutefois, d'autres agents sont également en lice pour être intégrés à de futures missions d'exploration *in situ*, le TMAH présentant notamment des désavantages par rapport au nombre de co-produits qui sont détectés lors de son utilisation (Boulesteix *et al.* 2023).

Récapitulatif sur les différentes méthodes de prétraitement d'échantillon.

La Figure I-25 reprend les différentes méthodes de prétraitement d'échantillons précédemment détaillées, en précisant les gammes de températures employées pour chacune d'entre elles et la nature de la matière organique extraite correspondante. Toutes ces méthodes sont prévues pour être embarquées à bord de la sonde Dragonfly et potentiellement à bord des futures missions à destination d'Encelade et d'Europe (voir section I. 4.)

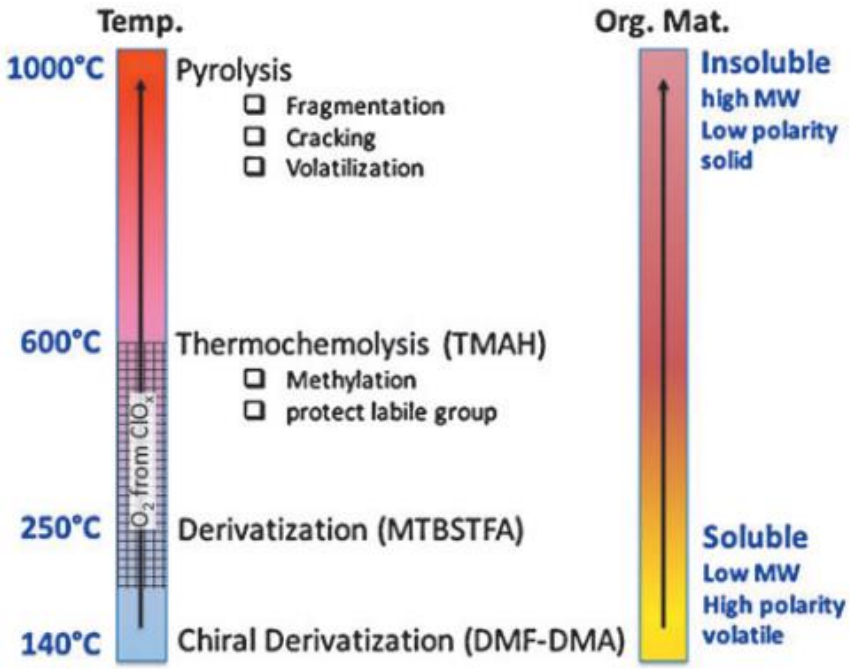


Figure I-25 : Températures des différentes méthodes de prétraitement d'échantillon associées à la CPG-SM et la nature de la matière organique extraite selon la méthode employée. MW : Molecular Weight. Source : (Goesmann et al. 2017)

Bien qu'associée à ces différentes méthodes de traitement d'échantillon, élargissant le spectre d'analyse chimique de la CPG-SM, cette dernière connaît également des limitations analytiques. Tout d'abord, les limites supérieures en masse peuvent être contraignantes pour la détection de molécules d'intérêt pour l'exobiologie tels que les peptides légers. De plus, bien que la dérivatisation permette la détection de molécules polaires, de nombreux composés recherchés en astrobiologie portant plusieurs fonctions polaires demeurent difficilement, voire non détectables, ce qui est le cas des sucres ou bien des acides nucléiques. Enfin, bien que les méthodes de prétraitement d'échantillons permettent d'extraire un plus grand nombre de molécules qu'avec la CPG-SM seule, ces dernières peuvent constituer des interférences analytiques, par exemple la pyrolyse dégradant les molécules mères et la dérivatisation et la thermochimiolyse produisant des co-produits de réactions pouvant co-éluer avec des molécules d'intérêt.

Ces quelques limitations justifient le fait qu'en plus de la CPG-SM d'autres techniques analytiques soient embarquées à bord des sondes d'analyse *in situ* pour palier à ces limites tout en assurant une certaine complémentarité de détection entre ces méthodes. En plus de la complémentarité, des chevauchements dans les gammes de masses détectables entre techniques

existent, assurant ici une certaine redondance entre les méthodes pour la détection de composés d'intérêt. Une telle charge scientifique à bord des sondes d'exploration spatiale, composé des trois méthodes analytiques décrites précédemment permet l'apport des avantages analytiques des unes tout en palliant aux limitations des autres.

La spatialisation des techniques d'analyse in situ

La spatialisation des méthodes précédemment citées a déjà été réalisée et seule l'électrophorèse capillaire n'a pas encore voyagé dans l'espace. Les instruments spatiaux d'analyse chimique *in situ* doivent répondre à des contraintes spécifiques aux environnements dans lesquels ils seront envoyés et aux conditions d'analyse auxquelles ils seront soumis.

Tout d'abord, les contraintes techniques sont nombreuses : résistance aux variations de température (typiquement -180 °C à la surface de Titan), aux chocs et aux vibrations lors du décollage, du voyage et de l'atterrissage, être simple de construction, totalement automatisé, et en mesure d'être miniaturisé, à la fois pour la taille mais aussi pour la masse. La résistance aux radiations est aussi un aspect à prendre en compte selon l'environnement où se trouvera la sonde : présence ou non d'une atmosphère, présence d'une magnétosphère, intensité du vent solaire et du rayonnements cosmique. Typiquement cet aspect est capital pour l'exploration de la surface d'Europe du fait de la magnétosphère de Jupiter. De plus, l'aspect énergétique est également à prendre en considération, la disponibilité de cette dernière pouvant être limitée selon l'environnement planétaire où se trouvera la sonde. En effet, la distance au soleil va jouer sur le rendement énergétique des panneaux solaires des sondes, et l'utilisation de pile nucléaire au plutonium peut être envisagée. Enfin, l'espace de stockage des données étant limité, les instruments devront être compatibles avec un volume de donnée à stocker et à transmettre relativement faible.

Hormis ces contraintes techniques il existe aussi de nombreuses contraintes analytiques. En guise d'exemples, comme explicité pour la dérivatisation, un nombre limité d'étapes pour la préparation d'échantillon est nécessaire, la stérilisation de la sonde et des autres instruments à bord pour éviter toute détection de faux positif doit également être considérée, ainsi que la présence d'une faible quantité de consommables, qui se conservent dans le temps.

Tout cet ensemble de contraintes doit être pris en considération lors du développement d'instruments pour l'analyse *in situ*. Les trois analyseurs chimiques détaillés précédemment répondent à ces critères. La CPG-SM dispose d'un héritage spatial très fort, ayant été embarquée à bord de nombreuses missions spatiales par le passé, la première fois pour l'exploration lunaire en 1962 (Oyama *et al.* 1962). Depuis cette première spatialisation, la CPG-SM, ainsi que les méthodes de préparation d'échantillons détaillées précédemment ont connu de nombreuses améliorations, notamment grâce aux retours d'expériences des missions passées mais aussi à l'innovation liée aux instruments commerciaux sur Terre. Par conséquent, la CPG-SM a été embarquée à bord de nombreuses sondes pour explorer différents environnements dans le système solaire.

À titre d'exemple, la CPG-SM a été envoyée la première fois sur Mars à bord des deux atterrisseurs Viking dans les années 1970, à la fois pour la détection de molécules organiques mais aussi pour la recherche d'une potentielle vie microbienne. Sur Mars encore, la CPG-SM est intégrée au rover Curiosity au sein de l'expérience SAM (toujours en activité) et a permis la détection des premières molécules organiques (Freissinet *et al.* 2015).

Avec pour cible un objet d'étude différent, à savoir la comète 67P/Churyumov-Gerasimenko, l'atterrisseur Philae de la mission Rosetta a également embarqué à son bord un CPG-SM au sein de l'expérience scientifique COSAC (COmetary Sampling and Composition) pour étudier la composition de la comète. Il est important ici de souligner que c'est sur cette mission qu'à pour la première fois été intégrée la dérivatisation au DMF-DMA à bord d'une mission d'analyse *in situ*. Le spectromètre de masse de l'instrument COSAC a notamment permis la détection de molécules organiques encore jamais identifiées sur des comètes (Goesmann *et al.* 2015).

L'autre exemple qui est d'intérêt central pour ce manuscrit est la sonde atmosphérique Huygens qui avait à son bord un CPG-SM auquel était associée la pyrolyse, au sein de l'expérience ACP (Aerosol Collector Pyrolyser), avec une température de chauffe de 600 °C pour l'analyse des aérosols de l'atmosphère de Titan au cours de la descente (Niemann *et al.* 2003). Le chromatographe était composé de trois colonnes chromatographiques, chacune reliée à une source ionique indépendante, pouvant fonctionner en parallèle (Akapo *et al.* 1999). Avec la sonde Huygens il était possible d'analyser la composition chimique de l'atmosphère ou bien les produits de pyrolyse directement en spectrométrie de masse. Du fait de l'architecture du système, il était également possible d'analyser les gaz de l'atmosphère par CPG-SM mais aussi de séparer les pyrolysats formés par CPG avant l'identification avec la spectrométrie de masse (Israël et al. 2005). La gamme scannée par le spectromètre de masse composé d'un analyseur quadrupolaire scannait les masses de 2 à 141 u, ce qui ne permettait pas la détection de molécules organiques lourdes. Toutefois, le dysfonctionnement d'une des sources ioniques ainsi que la contamination externe des colonnes capillaires ont rendu l'exploitation des chromatogrammes très compliquées voire impossible du fait d'un bruit de fond élevé même si le bon fonctionnement du chromatographe a été prouvé par la détection de méthane et d'argon (Niemann et al. 2005).

De plus, comme explicité auparavant, la spectrométrie de masse était embarquée à bord de la sonde Cassini (instrument INMS) et a permis de révéler des molécules organiques dans la haute atmosphère de Titan (Waite *et al.* 2007) mais aussi au sein des geysers d'Encelade comme l'acétylène et le propane (Waite *et al.* 2006). Toutefois, que ce soit la sonde atmosphérique Huygens ou la sonde Cassini, bien qu'étant un réel succès dans l'exploration spatiale, de nombreuses molécules voire biomolécules pouvant constituer des biosignatures n'ont pas été identifiées et sont pourtant espérées et attendues sur ces deux satellites mais également sur Europe, en faisant le parallèle avec Encelade. Par conséquent, les attentes d'un point de vue exobiologique pour ces mondes océans étant telles, que cela a motivé la réflexion autour du développement de nombreuses futures missions spatiales à destination de ces trois satellites du système solaire externe, déjà sélectionnées ou encore en lice dans les futures programme de la NASA. La description de ces différentes missions à destination de Titan, d'Europe et d'Encelade font l'objet de la prochaine partie de cette introduction.

4. *Les projets de futures missions d'analyse in situ à destination de Titan, d'Europe et d'Encelade*.

Comme explicité précédemment, le comité du NASA Decadal survey indique les cibles planétaires prioritaires avec les missions qui leur seront adressées. Avec la mise en évidence des mondes océans, de la présence de geysers permettant d'échantillonner directement du matériel de subsurface ou encore l'environnement potentiellement habitable pour Encelade et Europe, mais aussi les résultats obtenus par la mission Cassini-Huygens pour Titan, le nombre de projets de missions à destination du système solaire externe, et précisément du système Jovien et de Saturne, a explosé. Parmi les missions à destination des mondes océans, la mission Dragonfly est déjà sélectionnée pour explorer Titan, alors que la mission Europa Lander et les projets de missions pour Encelade sont encore en lice pour la sélection dans les prochains appels d'offres de la NASA.

4.1. La mission Dragonfly et l'instrument DraMS

La mission Dragonfly a été sélectionnée en juin 2019 pour aller explorer la surface de Titan à partir de 2034 (le lancement étant prévu en 2027) pendant une durée nominale de 3 ans et 4 mois. Dragonfly est un drone de 800 kg possédant 8 hélices qui se déplacera entre différents environnements en volant dans l'atmosphère de Titan (Figure I-26). En effet, le vol est le meilleur moyen de déplacement sur le plus gros satellite de Saturne étant donné sa gravité qui représente 14 % de la gravité terrestre mais aussi sa densité atmosphérique, 4 fois plus importante que celle terrestre, résultant en une flottabilité accrue. À titre de comparaison, un tel moyen de déplacement permettra de parcourir jusqu'à 200 km en 3 ans alors que le rover Curiosity s'est déplacé d'environ 25 km en 12 ans sur la planète Mars. Ainsi, une plus grande diversité d'environnements pourra être explorée avec Dragonfly. Le site d'atterrissage de la sonde se situe au niveau de l'équateur dans la région de Shangri-La qui est constituée par une mer de dunes organiques (Figure I-26) (Lorenz 2021). La destination finale de la mission est le cratère Selk, un cratère d'impact au sein duquel l'interaction entre eau liquide et aérosols organiques a pu se produire par le passé, menant potentiellement à la formation de molécules hautement complexes. Ainsi, le drone pourra analyser différents matériaux à savoir, les dunes d'organiques, les interdunes, les éjectats associés au cratère et le matériel fondu par l'impact.

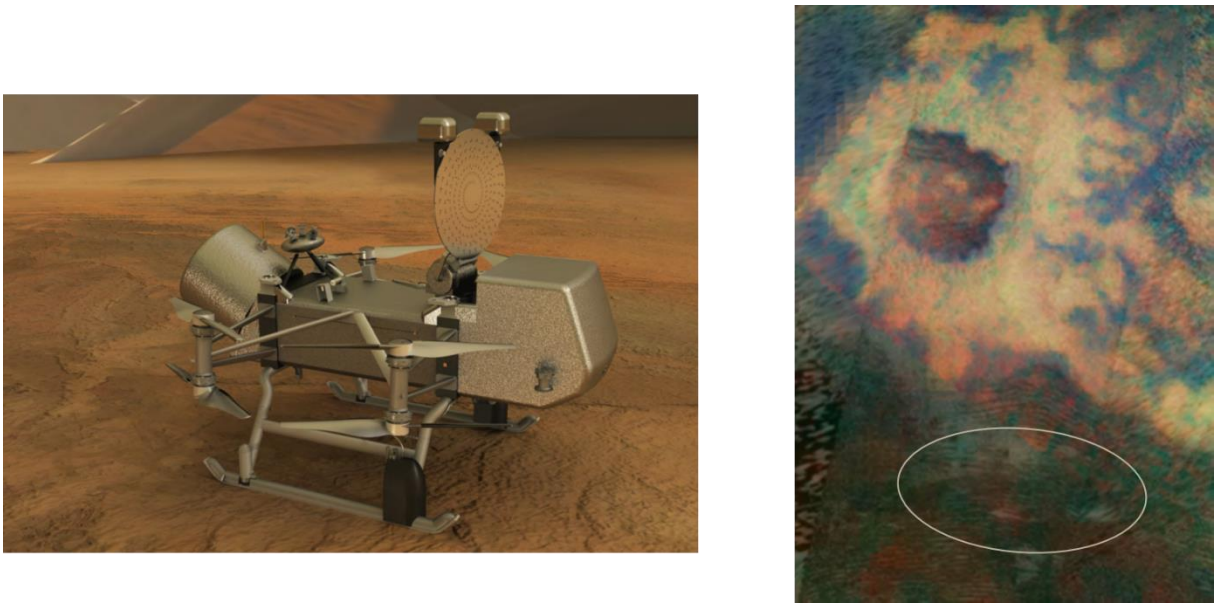


Figure I-26 : (Gauche) Vue d'artiste du drone Dragonfly à la surface de Titan. (Droite) Ellipse d'atterrissage de Dragonfly et visualisation du cratère Selk.

Les objectifs scientifiques de la mission *Dragonfly* pendant son exploration de Titan sont d'étudier l'établissement d'une potentielle chimie prébiotique initiée avec la chimie atmosphérique, d'évaluer l'habitabilité de Titan, et de rechercher la présence de biosignatures qui pourraient donner des indices sur la présence de vie sur Titan. Ce dernier aspect n'est pas le prioritaire étant donné que Titan intéresse plus pour sa chimie à l'échelle planétaire que pour sa potentielle biologie (Barnes et al. 2021).

Pour répondre à ces objectifs, la sonde Dragonfly embarquera à son bord 4 instruments (Figure I-27), qui seront alimentés par une pile nucléaire (MMRTG) :

- L'instrument Dragonfly Camera suite (DragonCam) : la sonde *Dragonfly* embarquera 8 caméras pour à la fois prendre des images grand angle, des images des sites d'échantillonnages et pouvoir observer les échantillons à l'échelle microscopique.

- L'instrument Dragonfly Geophysics and Meteorology package (DraGMet) : cet instrument est composé par plusieurs sous-systèmes, principalement des sondes atmosphériques et géophysiques qui permettront de récolter des informations sur l'atmosphère (profils de température, pression, vitesse du vent, etc.) mais également sur la surface et la subsurface (propriétés diélectriques, champ électrique, sismicité de la croûte, etc) (Lorenz *et al.* 2019).

- L'instrument Dragonfly Gamma-Ray and Neutron Spectrometer (DraGNS) : c'est un spectromètre capable de mesurer les neutrons émis par les éléments présents sous l'effet des rayons gamma, jusqu'à deux mètres sous la surface. Ainsi cet instrument servira à qualifier et quantifier la composition élémentaire de surface notamment des éléments comme le carbone, l'hydrogène, l'azote et l'oxygène mais aussi le sodium et le magnésium par exemple.

- L'instrument Dragonfly Mass Spectrometer (DraMS) : il est composé par deux sous-systèmes, un laser à désorption couplé au spectromètre de masse (LD-MS) et un chromatographe en phase gazeuse dont l'analyse se fait aussi par spectrométrie de masse (CPG-SM). Le détecteur est commun aux deux sous-systèmes et l'analyseur du spectromètre de masse est un piège à ion linéaire (Grubisic *et al.* 2021; Trainer 2018). En plus d'analyser la composition des échantillons de surface, le CPG-SM de DraMS permettra également de mesurer la composition atmosphérique. DraMS est directement dérivé des instruments SAM (Sample Analysis at Mars) à bord du rover Curiosity et MOMA (Mars Organic Molecule Analyzer) de la mission Exomars. DraMS permettra donc l'identification de molécules avec une masse allant jusqu'à 2000 Da. Couplé à DraMS, un système de prélèvement d'échantillons, le Drill for Acquisition of Complex Organics (DrACO), qui permettra de collecter les échantillons à la surface et de les délivrer à l'instrument DraMS (Barnes et al. 2021).

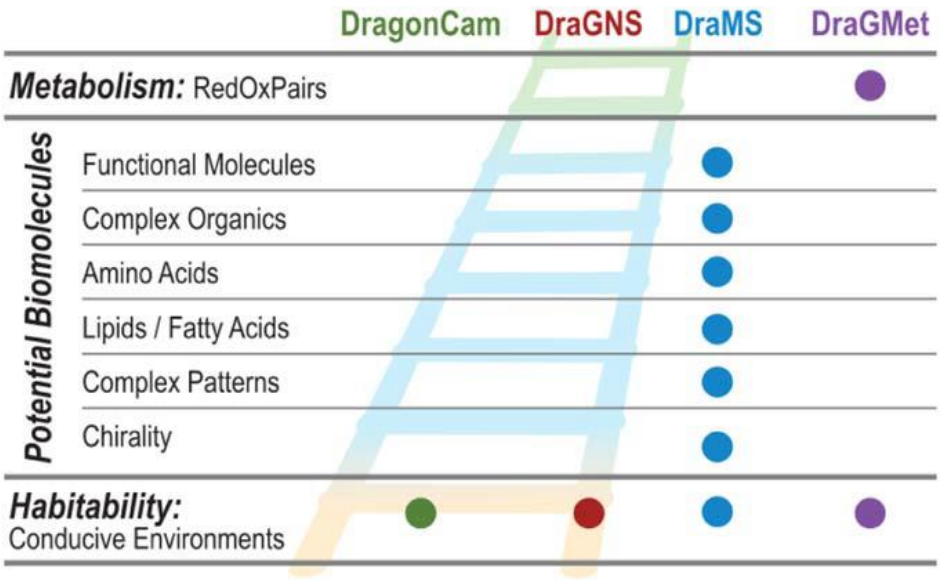


Figure I-27 : Objectifs de la mission Dragonfly et les instruments y répondant. Crédit : (Barnes et al. 2021)

Le chromatographe en phase gazeuse de l'instrument DraMS (DraMS-GC) est composé de deux pièges à injections pour préconcentrer les molécules de l'échantillon et de réaliser une injection la plus rapide possible dans les deux colonnes chromatographiques, améliorant grandement la séparation chromatographique (Figure I-28)(Moulay *et al.* 2023). Trois méthodes de préparation d'échantillon sont associées à DraMS-GC pour tenter d'extraire un maximum d'information sur la composition moléculaire des échantillons qui seront prélevés, à savoir la pyrolyse (extraction thermique), la dérivatisation (extraction chimique) et la thermochimiolyse (extraction thermique et chimique). L'instrument DraMS est constitué d'un carrousel lui permettant d'analyser 14 échantillons au total, ce nombre étant réparti entre les différentes techniques de prétraitement des échantillons précédemment citées.

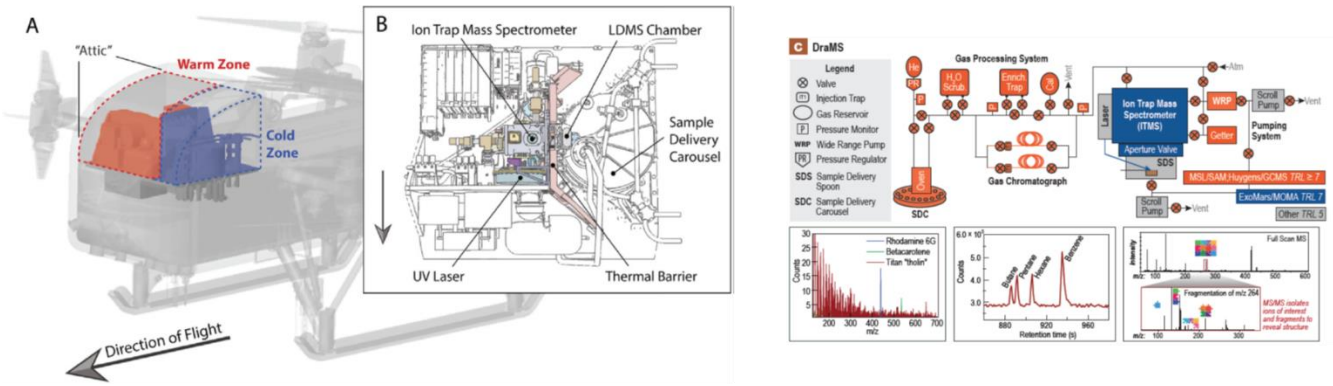


Figure I-28 : Emplacement de l'instrument DraMS à bord du drone Dragonfly (Grubisic et al. 2021) et son schéma détaillé.

4.2. La mission Europa Lander et l'instrument EMILI

La mission Europa Lander est un concept de mission qui a été développé en 2011 et qui vise à envoyer un atterrisseur à la surface d'Europe pour aller échantillonner les dépôts provenant des geysers potentiellement détectés (Figure I-29). Ces échantillons seront donc issus de la sous surface, potentiellement de l'océan ou de réservoirs d'eau liquide présents dans l'enveloppe glacée d'Europe. L'objectif principal d'une telle mission est d'aller chercher des traces de vie à la surface d'Europe, indices de vie à la fois chimiques mais aussi biologiques (Hand *et al.* 2022).

Figure I-29 : Vue d'artiste de l'atterrisseur de la mission Europa Lander à la surface d'Europe

Pour aller rechercher des potentielles traces de vie à la surface d'Europe, l'atterrisseur actuellement défini embarque 42,5 kg d'instruments scientifiques. Les instruments définitifs, si le projet voit le jour, n'ont cependant pas encore été définitivement choisis. Toutefois, 14 instruments ont été présélectionnés par la NASA pour potentiellement faire partie de la charge utile de l'atterrisseur, tous aptes à répondre aux objectifs scientifiques de la mission. Cette liste exhaustive d'instruments peut être retrouvée dans le Europa Lander Science Definition Team Report (Hand *et al*. 2017). Ici, nous nous intéresserons particulièrement à un des instruments sélectionnés, l'instrument

EMILI pour Europan Molecular Indicators of Life Investigation. Cet instrument a pour but d'analyser la composition chimique de dépôts de subsurface relativement frais, pour aller y chercher des potentielles biosignatures de vie présente ou passée. Cette analyse doit se faire par deux sous-systèmes complémentaires d'analyse chimique, une électrophorèse capillaire (technique n'ayant jamais volé dans l'espace)(Willis *et al.* 2015) nommée OCEANS, et la chromatographie en phase gazeuse nommée GAPS (Figure I-30)(Brinckerhoff *et al.* 2022). Ces deux méthodes permettent d'étudier la distribution de la matière organique à la surface d'Europe en recherchant des molécules pouvant provenir d'une origine biologique (lipides, acides aminés, etc.) en ayant des limites de détection basses, de l'ordre de la picomole. La détection, que ce soit pour l'électrophorèse ou la chromatographie se fait avec un spectromètre de masse constitué par un piège à ions. Comme explicité précédemment, l'intérêt sera porté ici sur le chromatographe en phase gazeuse, celui-ci étant développé au sein du LATMOS.

Le sous-système GAPS est composé de deux colonnes chromatographiques, comme l'instrument DraMS, à savoir une colonne générale et une colonne chirale, permettant la séparation d'un large éventail de familles chimiques mais également des énantiomères de composés d'intérêt pour l'exobiologie. Ainsi, un potentiel excès énantiomérique, s'il existe, pourra être quantifié. L'utilisation de deux colonnes permet d'élargir la sélectivité des composés ciblés ainsi que d'obtenir une certaine redondance dans les résultats. De façon similaire à l'instrument DraMS, plusieurs méthodes de préparation d'échantillon en amont de l'analyse chromatographique sont prévues, à savoir la pyrolyse (600 °C), la dérivatisation et la thermochimiolyse, pour tenter d'extraire un maximum de molécules.

Par conséquent, les deux techniques d'analyses chimiques, sélectionnées pour intégrer l'atterrisseur de la mission Europa Lander sont parfaitement adaptées à la détection de potentielles biosignatures sur Europe.

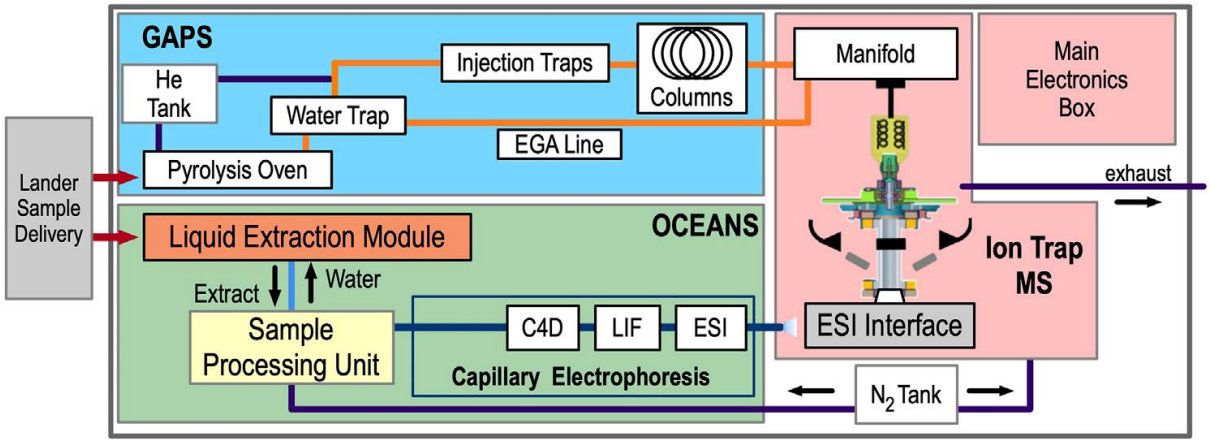


Figure I-30 : Schéma des différents sous-systèmes de l'instrument EMILI. Le sous-système GAPS correspond au CPG et le sous-système OCEANS à l'électrophorèse capillaire.

Initialement, l'atterrisseur devait être envoyé avec la sonde Europa Clipper, mais la faisabilité d'une telle mission ainsi que la pertinence d'un atterrisseur à la surface d'Europe restaient à démontrer. En effet, l'environnement radiatif à la surface d'Europe, engendré par la magnétosphère

de Jupiter, implique une durée de mission qui n'excède pas 1 mois. Le programme Instrument Concepts for Europa Exploration (ICEE) a donc été mis en place pour démontrer la faisabilité technologique d'un tel atterrisseur (avec un niveau de préparation des technologies TRL-6 *a minima* pour les instruments à bord). Un tel programme vise à mettre en place des protocoles de stérilisation suffisants et indispensables pour la protection planétaire ainsi que d'améliorer notamment le système d'échantillonnage pour la potentielle future mission Europa Lander.

Le dernier rapport du NASA Decadal Survey pour 2023-2032 n'a pas prioritisé Europe comme cible prioritaire pour l'exobiologie et *a fortiori* la mission *Europa Lander* pour l'appel d'offre New Frontier 5 de cette fin d'année 2023. Cela est justifié par des raisons techniques liées à l'environnement radiatif de Jupier et que des informations supplémentaires sur la surface d'Europe sont nécessaires en vue de l'atterrissage prévu. Les missions Europa Clipper (NASA, lancement en 2024), ainsi que JUICE (ESA, déjà en voyage vers Jupiter), vont permettre la récolte de nombreuses données sur la surface d'Europe apportant de précieuses informations sur les sites d'atterrissage d'intérêt (fractures de la surface avec remontées de matériels subsurface, zones de retombées de panaches, etc.). Ainsi, le projet de mission sera reproposé pour l'appel d'offre New Frontier 6, les TRL (Technologies Readiness Level) demandés pour Europa Lander étant atteints.

4.3. Les missions à destination d'Encelade

Les découvertes associées à la mission Cassini (échantillonnage de geysers, présence d'eau liquide sous la surface, détection de matière organique dans les panaches) ont fait d'Encelade un objet de fort intérêt pour l'exobiologie. Par conséquent, de nombreux concepts de mission ont été proposés pour la lune de Saturne. En effet, l'environnement radiatif de cette dernière est beaucoup moins contraignant que celui de Jupiter, permettant d'assurer une bien plus grande longévité aux sondes qui pourront y être envoyées. Les projets de missions pour Encelade sont donc multiples et vont de l'orbiteur qui réaliserait plusieurs survols en analysant notamment les geysers, à des missions visant à atterrir à la surface d'Encelade.

Ainsi, des concepts de missions de la classe Discovery (<450 millions de dollars) et New Frontier (<1 milliard de dollars) ont été proposées comme les missions Enceladus Life Finder (ELF)(Cable *et al.* 2017) ou encore Enceladus Life Signatures and Habitability (ELSAH)(Eigenbrode *et al.* 2018). Concrètement, ces deux projets consistent en l'envoi d'une sonde qui réalisera plusieurs survols d'Encelade pour échantillonner les geysers du pôle sud, à l'instar des analyses réalisées par Cassini.

Un autre concept de mission de la classe Flagship (>1 milliards de $) a également été proposé, se nommant Enceladus Orbilander (Figure I-31) (Shannon M. MacKenzie *et al.* 2021). Ce projet a notamment été recommandé par le NASA Decadal Survey 2023-2032. Cette mission a pour but d'envoyer une sonde qui serait dans un premier temps un orbiteur puis par la suite un atterrisseur pour aller échantillonner des dépôts frais de geysers en surface.

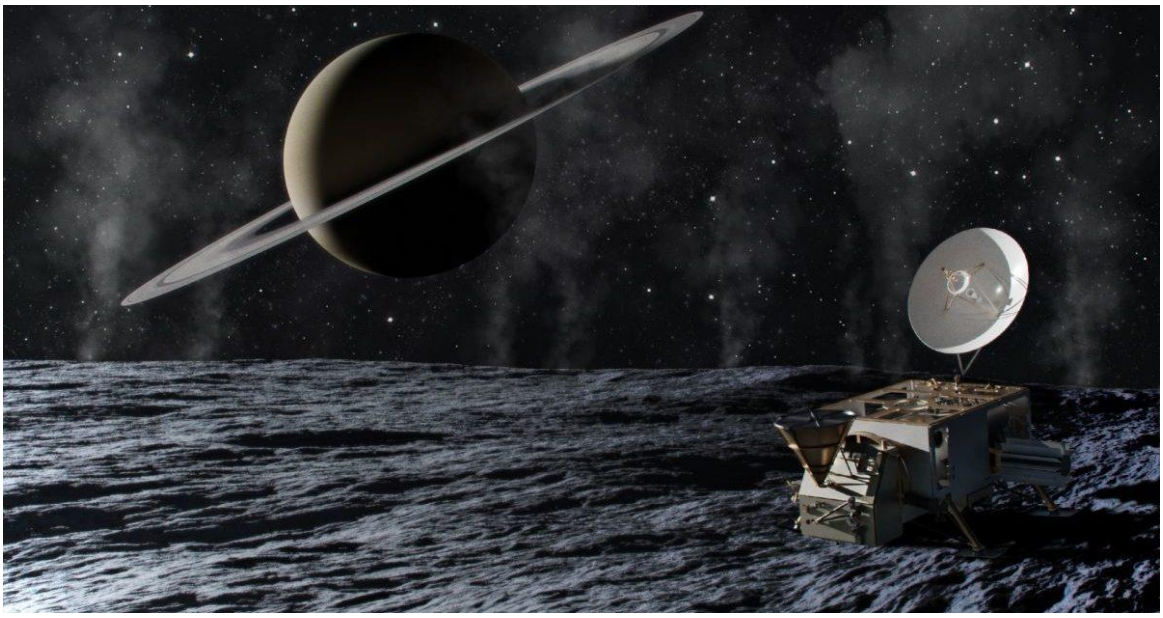


Figure I-31 : Vue d'artiste de l'atterrisseur de la mission Enceladus Orbilander à la surface d'Encelade.Crédits : Johns Hopkins APL.

Tous ces projets missions, et d'autres qui sont également en cours de développement, mais dont la confidentialité doit être tenue, ont pour objectif premier d'aller échantillonner les geysers d'Encelade ou même des échantillons de surface. Un tel échantillonnage est indispensable pour la quête de molécules organiques complexes, potentielles bioindices, pouvant être reliées à la mise en place d'une chimie prébiotique ou mieux, à la présence de vie. Répondre à une telle question nécessite la présence d'un laboratoire d'analyse chimique à bord de ces différentes sondes, comme pour les missions à destination de Titan ou d'Europe. Une transposition de l'instrument EMILI (Brinckerhoff *et al.* 2022), et notamment du sous-système GAPS, développé pour la mission Europa Lander et déjà finalisé, est donc tout à fait envisageable pour être intégré à une mission ayant pour cible Encelade. D'autant que les problématiques analytiques pour la chromatographie en phase gazeuse, directement liées à la présence de sels et d'eau notamment, se recouvrent entre ces deux lunes glacées.

5. Objectifs de thèse

Titan, Europe et Encelade présentent un potentiel pour la recherche en exobiologie élevé, que ce soit pour le développement d'une chimie prébiotique ou pour la recherche de traces de vie. La quête de molécules organiques pouvant être associées à ces deux processus est donc une priorité pour les futures missions d'analyse *in situ* qui seront envoyées sur place.

Le développement de ces missions et des instruments qui seront embarqués à bord des sondes, ainsi que la future interprétation des données nécessitent des travaux de préparation pour répondre aux problématiques à la fois techniques et analytiques qui sont propres à chaque environnement. Ici, le cœur de mon travail sera tourné vers la CPG-SM et les méthodes de préparation d'échantillon associées. Pour Titan, la diversité et la richesse en espèces organiques qui sont attendues sont telles

que des méthodes doivent être développées pour mener au mieux la caractérisation organique *in situ*. Pour Europe et Encelade, la présence d'eau et de sels peuvent également être au cœur des problématiques analytiques en interférant avec la détection de matière organique ou bien avec les méthodes de prétraitements d'échantillons, limitant les capacités de la CPG-SM et son spectre d'analyse moléculaire. Associé aux problématiques analytiques, le développement instrumental lui-même est une étape clé dans la préparation des futures missions, avec le choix, la caractérisation et l'optimisation des composants analytiques pour répondre au mieux à la recherche de bioindices voire de biosignatures. Ainsi, de nombreuses études doivent être menées, pour tenter de répondre à la question suivante :

Quelles sont les capacités de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse associée aux méthodes de préparation d'échantillon pour détecter des molécules organiques liées au développement d'une chimie prébiotique ou de la vie elle-même sur Titan, Europe et Encelade, en connaissant les problématiques analytiques propres à chacun de ces mondes ?

Pour répondre à cette question, j'ai utilisé différents moyens de laboratoire (protocoles et instruments), en m'appuyant sur différents niveaux de complexité d'échantillons. Il s'agit d'utiliser donc des méthodes et instruments commerciaux dont le fonctionnement est connu et certifié sur Terre en étudiant des standards chimiques (pour des études de routine), des échantillons analogues (selon une propriété en général) synthétiques ou bien naturels (les plus complexes). Avec un jeu d'échantillons comme ceux-là, la complexité ainsi que la représentativité vis-à-vis de ce qui est attendu sur les mondes océans est croissante. De plus, une fois les prototypes instrumentaux développés, des études similaires peuvent être réalisées pour comparer les performances analytiques avec les instruments commerciaux.

Dans cette ligne de conduite, les deux premiers chapitres de mon travail de thèse s'inscrivent à la fois dans la préparation de l'analyse chimique qui sera effectuée par l'instrument DraMS à la surface de Titan mais aussi dans le développement instrumental de ce dernier. Le premier volet cherche à montrer comment le processus de dérivatisation avec le DMF-DMA est en mesure de détecter les molécules portant des fonctions azotés (amines et amides), familles chimiques attendues sur Titan et potentiels précurseurs de composés prébiotiques. Le second volet s'intéresse à la sélection de la colonne chromatographique générale de DraMS ainsi qu'à la caractérisation des performances analytiques des deux colonnes qui seront embarquées sur Dragonfly (générale et chirale) pour des espèces chimiques attendues sur Titan.

Le troisième chapitre de ce manuscrit, s'inscrit quant à lui dans la préparation de la future exploration d'Europe et d'Encelade avec les différents projets de mission associés. Il s'intéresse à l'étude d'échantillons analogues (en termes de salinité) naturels, aux océans d'Europe et potentiellement d'Encelade qui proviennent d'un lac hypersalin en Espagne, le lac Tírez. L'objectif de ce chapitre est de caractériser chimiquement ces échantillons, puis d'évaluer l'impact des sels, aussi divers qu'ils soient, sur la détection de matière organique relative à la présence de vie dans ces échantillons avec la CPG-SM et les méthodes de traitement d'échantillon. Les résultats obtenus dans cette étude que j'ai menée seront aux fondements du troisième objectif qui vise à développer un

protocole de dessalement pour analyser les mêmes échantillons dénués de sels et poser un comparatif quant à la détection de molécules organiques. Une telle étude devrait permettre de mettre en avant les capacités de la CPG-SM et des méthodes de traitement d'échantillons pour détecter des molécules organiques malgré la présence de sels mais aussi la nécessité de développer un système de dessalement spatialisable pour l'analyse *in situ* future d'Europe et d'Encelade (et très certainement d'autres corps du système solaire où des sels ont été identifiés).

En complément de ce troisième chapitre, une collaboration que j'ai pilotée a été entreprise avec le Museum National d'Histoire Naturel de Paris, pour la synthèse et l'analyse d'échantillons synthétiques de cristaux d'halite (NaCl) contenant une souche d'archée halophiles : *Halobacterium salinarum*. Cette étude a été menée pour élargir les échantillons à disposition avec une complexité croissante, particulièrement dans la nature des sels et des espèces présentes. Comparés aux échantillons du lac Tírez, les échantillons synthétiques du Museum sont composés d'un seul sel avec une seule couche. Les résultats obtenus n'étant pas concluant du fait de contaminations externes lors de la synthèse mais également du milieu de culture utilisé pour les archées, ce chapitre est présenté en Annexe 1.

6. Références

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

Aliyu H., De Maayer P., and Cowan D. (2016) The genome of the Antarctic polyextremophile Nesterenkonia sp. AN1 reveals adaptive strategies for survival under multiple stress conditions. *FEMS microbiology ecology*, 92: fiw032.

Altwegg K., Balsiger H., Bar-Nun A., Berthelier J.-J., Bieler A., Bochsler P., Briois C., Calmonte U., Combi M. R., and Cottin H. (2016) Prebiotic chemicals—amino acid and phosphorus—in the coma of comet 67P/Churyumov-Gerasimenko. *Science advances*, 2: e1600285.

Ammannito E., DeSanctis M., Ciarniello M., Frigeri A., Carrozzo F., Combe J.-P., Ehlmann B., Marchi S., McSween H., and Raponi A. (2016) Distribution of phyllosilicates on the surface of Ceres. *Science*, 353: aaf4279.

Anderson C. M., Samuelson R. E., Yung Y. L., and McLain J. L. (2016) Solid ‐ state photochemistry as a formation mechanism for Titan's stratospheric C ₄ N ₂ ice clouds. *Geophysical Research Letters*, 43: 3088-3094.

Anderson J. D. (1998) Europa’s Differentiated Internal Structure : Inference from four Galileo Encounters.

Artemieva N., and Lunine J. (2003) Cratering on Titan: impact melt, ejecta, and the fate of surface organics. *Icarus*, 164: 471-480.

Artemieva N., and Lunine J. I. (2005) Impact cratering on Titan II. Global melt, escaping ejecta, and aqueous alteration of surface organics. *Icarus*, 175: 522-533.

Barnes et al. (2021) Science Goals and Objectives for the Dragonfly Titan Rotorcraft Relocatable Lander. *PSJ*.

Béghin C., Randriamboarison O., Hamelin M., Karkoschka E., Sotin C., Whitten R. C., Berthelier J.-J., Grard R., and Simões F. (2012) Analytic theory of Titan’s Schumann resonance: Constraints on ionospheric conductivity and buried water ocean. *Icarus*, 218: 1028-1042.

Biemann et al. (1976) Search for Organic and Volatile Inorganic Compounds in Two

Surface Samples from the Chryse Planitia Region of Mars. *Science*, 194.

Bills B. G., and Nimmo F. (2011) Rotational dynamics and internal structure of Titan. *Icarus*, 214: 351-355.

Board S. S., and Council N. R. (2012) Vision and voyages for planetary science in the decade 2013-2022. National Academies Press.

Boulesteix D., Buch A., Williams A., He Y., Freissinet C., Trainer M., Stern J., and Szopa C. (2023) Comparison of tetramethylammonium hydroxide (TMAH), trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), and trimethylphenylammonium hydroxide (TMPAH) thermochemolysis for in situ space analysis of organic molecules in planetary environments. *Talanta*, 257: 124283.

Bramble M. S., and Hand K. P. (2022) Spectral Evidence for Irradiated Sodium Chloride on the Surface of 1 Ceres. *Geophysical Research Letters*, 49.

Brasse C., Buch A., Coll P., and Raulin F. (2017) Low-Temperature Alkaline pH Hydrolysis of Oxygen-Free Titan Tholins: Carbonates' Impact. *Astrobiology*, 17: 8-26.

Brinckerhoff W. B., Willis P. A., Ricco A. J., Kaplan D. A., Danell R. M., Grubisic A., Mora M. F., Creamer J. S., Noell A., Stern J. and others. (2022) Europan Molecular Indicators of Life Investigation (EMILI) for a Future Europa Lander Mission. *Frontiers in Space Technologies*, 2.

Brockwell T. G., Meech K. J., Pickens K., Waite J. H., Miller G., Roberts J., Lunine J. I., and Wilson P. (2016) The mass spectrometer for planetary exploration (MASPEX).2016 IEEE Aerospace Conference. IEEE.

Brown M., and Hand K. (2013) Salts and radiation products on the surface of Europa. *The Astronomical Journal*, 145: 110.

Brownlee D., Tsou P., Aléon J., Alexander C. M. O. D., Araki T., Bajt S., Baratta G. A., Bastien R., Bland P., and Bleuet P. (2006) Comet 81P/Wild 2 under a microscope. *science*, 314: 1711-1716.

Cable M., Hörst S., He C., Stockton A., Mora M., Tolbert M., Smith M., and Willis P. (2014) Identification of primary amines in Titan tholins using microchip nonaqueous capillary electrophoresis. *Earth and Planetary Science Letters*, 403: 99-107.

Cable M. L., Lunine J. I., and Spilker L. J. (2017) Enceladus life finder.

Carr *et al.* (1998) Evidence for a subsurface ocean on Europa.

Carrasco N., Tigrine S., Gavilan L., Nahon L., and Gudipati M. S. (2018) The evolution of Titan's high-altitude aerosols under ultraviolet irradiation. *Nature Astronomy*, 2: 489-494.

Cartwright R., Cruikshank D. P., DeColibus D., Emery J. P., Grundy W. M., Holler B. J., Mueller M. M., Neveu M., Nordheim T., and Pinilla-Alonso N. (2021a) The moons of Uranus: A NIRSpec investigation of their origins, organic constituents, and possible ocean world activity. *JWST Proposal. Cycle 1*: 1786.

Cartwright R. J., Beddingfield C. B., Nordheim T. A., Elder C. M., Castillo-Rogez J. C., Neveu M., Bramson A. M., Sori M. M., Buratti B. J., and Pappalardo R. T. (2021b) The science case for spacecraft exploration of the Uranian satellites: Candidate ocean worlds in an ice giant system. *The Planetary Science Journal*, 2: 120.

Cassen P., Reynolds R. T., and Peale S. (1979) Is there liquid water on Europa? *Geophysical Research Letters*, 6: 731-734.

Castillo-Rogez J. C., Neveu M., Scully J. E., House C. H., Quick L. C., Bouquet A., Miller K., Bland M., De Sanctis M. C., and Ermakov A. (2020) Ceres: Astrobiological target and possible ocean world. *Astrobiology*, 20: 269-291.

Castillo‐Rogez J., Weiss B., Beddingfield C., Biersteker J., Cartwright R., Goode A., Melwani Daswani M., and Neveu M. (2023) Compositions and interior structures of the large moons of Uranus and implications for future spacecraft observations. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 128: e2022JE007432.

Cleaves H. J., Neish C., Callahan M. P., Parker E., Fernández F. M., and Dworkin J. P. (2014) Amino acids generated from hydrated Titan tholins: Comparison with Miller–Urey electric discharge products. *Icarus*, 237: 182-189.

Cockell, C. S., Bush, T., Bryce, C., Direito, S., Fox-Powell, M., Harrison, J. P., ... & Zorzano, M. P. (2016). Habitability: a review. *Astrobiology*, *16*(1), 89-117.

Delatour V. (2007) Propulsion de liposomes géants par polymérisation d'actine: un modèle pour l'interaction dynamique cytosquelette-membrane dans la motilité: Université Paris Sud-Paris XI.

Dinelli B. M., López-Puertas M., Adriani A., Moriconi M. L., Funke B., García-Comas M., and D'Aversa E. (2013) An unidentified emission in Titan's upper atmosphere. *Geophysical Research Letters*, 40: 1489-1493.

Eddhif B., Allavena A., Liu S., Ribette T., Abou Mrad N., Chiavassa T., d'Hendecourt L. L. S., Sternberg R., Danger G., and Geffroy-Rodier C. (2018) Development of liquid chromatography high resolution mass spectrometry strategies for the screening of complex organic matter: Application to astrophysical simulated materials. *Talanta*, 179: 238-245.

Eigenbrode J., Gold R. E., McKay C. P., Hurford T., and Davila A. (2018) Searching for life in an ocean world: the Enceladus Life Signatures and Habitability (ELSAH) mission concept. *42nd COSPAR Scientific Assembly*, 42: F3. 6-3-18.

Fagents S. A. (2003) Considerations for effusive cryovolcanism on Europa: The post‐Galileo perspective. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 108.

Freissinet C., Glavin D. P., Mahaffy P. R., Miller K. E., Eigenbrode J. L., Summons R. E., Brunner A. E., Buch A., Szopa C., Archer P. D. and others. (2015) Organic molecules in the Sheepbed Mudstone, Gale Crater, Mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 120: 495-514.

Fulchignoni M., Ferri F., Angrilli F., Ball A., Bar-Nun A., Barucci M., Bettanini C., Bianchini G., Borucki W., and Colombatti G. (2005) In situ measurements of the physical characteristics of Titan's environment. *Nature*, 438: 785-791.

Gaeman J., Hier-Majumder S., and Roberts J. H. (2012) Sustainability of a subsurface ocean within Triton's interior. *Icarus*, 220: 339-347.

Gautier T., Carrasco N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Szopa C., Buch A., and Pernot P. (2014) Nitrogen incorporation in Titan's tholins inferred by high resolution orbitrap mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Earth and Planetary Science Letters*, 404: 33-42.

Gautier T., Sebree J. A., Li X., Pinnick V. T., Grubisic A., Loeffler M. J., Getty S. A., Trainer M. G., and Brinckerhoff W. B. (2017) Influence of trace aromatics on the chemical growth mechanisms of Titan aerosol analogues. *Planetary and Space Science*, 140: 27-34.

Geoffroy Rodier et al. (2009) Thermochemolysis in search for organics in extraterrestrial environements. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85.

Goesmann F., Brinckerhoff W. B., Raulin F., Goetz W., Danell R. M., Getty S. A., Siljeström S., Mißbach H., Steininger H., Arevalo R. D. and others. (2017) The Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA) Instrument: Characterization of Organic Material in Martian Sediments. *Astrobiology*, 17: 655-685.

Goesmann F., Rosenbauer H., Bredehöft J. H., Cabane M., Ehrenfreund P., Gautier T., Giri C., Krüger H., Le Roy L., and MacDermott A. J. (2015) Organic compounds on comet 67P/Churyumov-Gerasimenko revealed by COSAC mass spectrometry. *Science*, 349: aab0689.

Goesmann F., Rosenbauer H., Roll R., Szopa C., Raulin F., Sternberg R., Israel G., Meierhenrich U., Thiemann W., and Munoz-Caro G. (2006) Cosac, The Cometary Sampling and Composition Experiment on Philae. *Space Science Reviews*, 128: 257-280.

Goldman B., Nock K., Sandy C., and Lo D. (2018) Exploration of Pluto with a New-Frontiers-Class Lander or Orbiter Mission. *42nd COSPAR Scientific Assembly*, 42: B5. 3-47-18.

Grasset O., Sotin C., and Deschamps F. (2000) On the internal structure and dynamics of Titan. *Planetary and Space Science*, 48: 617-636.

Greeley R., Klemaszewski J., Wagner R., and Team G. I. (2000) Galileo views of the geology of Callisto. *Planetary and Space Science*, 48: 829-853.

Grubisic A., Trainer M. G., Li X., Brinckerhoff W. B., Van Amerom F. H., Danell R. M., Costa J. T., Castillo M., Kaplan D., and Zacny K. (2021) Laser Desorption Mass Spectrometry at Saturn's moon Titan. *International Journal of Mass Spectrometry*, 470: 116707.

Hand *et al*. (2017) Report of the Ruopa Lander Science Definitions Team.

Hand K. P., Phillips C. B., Murray A., Garvin J., Maize E., Gibbs R., Reeves G., San Martin A., Tan-Wang G., and Krajewski J. (2022) Science goals and mission architecture of the Europa lander mission concept. *The Planetary Science Journal*, 3: 22.

Hansen C. J., Castillo-Rogez J., Grundy W., Hofgartner J., Martin E., Mitchell K., Nimmo F., Nordheim T., Paty C., and Quick L. C. (2021) Triton: fascinating moon, likely ocean world, compelling destination! *The Planetary Science Journal*, 2: 137.

Hayes A. G. (2016) The lakes and seas of Titan. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 44: 57-83.

Hemingway D., Nimmo F., Zebker H., and Iess L. (2013) A rigid and weathered ice shell on Titan. *Nature*, 500: 550-552.

Hendrix A. R., Hurford T. A., Barge L. M., Bland M. T., Bowman J. S., Brinckerhoff W., Buratti B. J., Cable M. L., Castillo-Rogez J., and Collins G. C. (2019) The NASA roadmap to ocean worlds. *Astrobiology*, 19: 1-27.

Hörst S. M. (2017) Titan's atmosphere and climate *Journal of Geophysical Research: Planets*.

Howell S. M. (2021) The Likely Thickness of Europa's Icy Shell. *The Planetary Science Journal*, 2: 129.

Howett C., Procktor L., Mitchell K., Bearden D., and Smythe W. (2020) Trident: A Mission to Explore Triton, a Candidate Ocean World. Copernicus Meetings.

Hsu H. W., Postberg F., Sekine Y., Shibuya T., Kempf S., Horanyi M., Juhasz A., Altobelli N., Suzuki K., Masaki Y. and others. (2015) Ongoing hydrothermal activities within Enceladus. *Nature*, 519: 207-10.

Hussmann H., Shoji D., Steinbrügge G., Stark A., and Sohl F. (2016) Constraints on dissipation in the deep interiors of Ganymede and Europa from tidal phase-lags. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy*, 126: 131-144.

Iess L., Rappaport N. J., Jacobson R. A., Racioppa P., Stevenson D. J., Tortora P., Armstrong J. W., and Asmar S. W. (2010) Gravity field, shape, and moment of inertia of Titan. *science*, 327: 1367-1369.

Israël et al. (2005) Complex organic matter in Titan's atmospheric aerosols from in situ pyrolysis and analysis. *Nature*, 438.

Israel G., Cabane M., Brun J.-F., Niemann H., Way S., Riedler W., Steller M., Raulin F., and Coscia D. (2003) Huygens probe aerosol collector pyrolyser experiment. *The Cassini-Huygens Mission: Overview, Objectives and Huygens Instrumentarium Volume 1*: 433-468.

James A. T., and Martin A. J. (1952) Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*, 50: 679.

Jennings D., Tokano T., Cottini V., Nixon C., Achterberg R., Flasar F., Kunde V., Romani P., Samuelson R., and Segura M. (2019) Titan surface temperatures during the Cassini mission. *The Astrophysical Journal Letters*, 877: L8.

Jia X., Kivelson M. G., Khurana K. K., and Kurth W. S. (2018) Evidence of a plume on Europa from Galileo magnetic and plasma wave signatures. *Nature Astronomy*, 2: 459-464.

Journaux B., Kalousová K., Sotin C., Tobie G., Vance S., Saur J., Bollengier O., Noack L., Rückriemen-Bez T., and Van Hoolst T. (2020) Large ocean worlds with high-pressure ices. *Space Science Reviews*, 216: 1-36.

K. K. Khurana *et al.* (1998) Induced magnetic fields as evidence for subsurface oceans in Europa and Callisto. *Nature*.

Kaplan H. H., Milliken R. E., and Alexander C. M. O. D. (2018) New constraints on the abundance and composition of organic matter on Ceres. *Geophysical Research Letters*, 45: 5274-5282.

Kargel J. S. (1991) Brine volcanism and the interior structures of asteroids and icy satellites. *Icarus*, 94: 368-390.

Kim S. J., Jung A., Sim C. K., Courtin R., Bellucci A., Sicardy B., Song I. O., and Minh Y. C. (2011) Retrieval and tentative indentification of the 3µm spectral feature in Titan's haze. *Planetary and Space Science*, 59: 699-704.

King O., and Fletcher L. N. (2022) Global Modeling of Ganymede's Surface Composition: Near‐IR Mapping From VLT/SPHERE. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 127: e2022JE007323.

Kivelson *et al.* (2000) Galileo Magnetometer Measurements : a stronger case for a Subsurface Ocean at Europa. *Science*, 289.

Kivelson M., Khurana K., Russell C., Walker R., Warnecke J., Coroniti F., Polanskey C., Southwood D., and Schubert G. (1996) Discovery of Ganymede's magnetic field by the Galileo spacecraft. *Nature*, 384: 537-541.

Kivelson M. G., Khurana K., Coroniti F., Joy S., Russell C., Walker R., Warnecke J., Bennett L., and Polanskey C. (1997) The magnetic field and magnetosphere of Ganymede. *Geophysical Research Letters*, 24: 2155-2158.

Kunde V. G., Aikin A. C., Hanel R. A., Jennings D. E., Maguire W. C., and Samuelson R. E. (1981) C4H2, HC3N and C2N2 in Titan's atmosphere. *Nature*, 292: 686-688.

L. Iess *et al.* (2014) The Gravity Field and Interior Structure of Enceladus. *Science*, 344.

Leonard E., Yin A., and Pappalardo R. (2020) Ridged plains on Europa reveal a compressive past. *Icarus*, 343: 113709.

Ligier N., Paranicas C., Carter J., Poulet F., Calvin W., Nordheim T., Snodgrass C., and Ferellec L. (2019) Surface composition and properties of Ganymede: Updates from ground-based observations with the near-infrared imaging spectrometer SINFONI/VLT/ESO. *Icarus*, 333: 496-515.

Lopes R. M., Mitchell K. L., Stofan E. R., Lunine J. I., Lorenz R., Paganelli F., Kirk R. L., Wood C., Wall S. D., and Robshaw L. (2007) Cryovolcanic features on Titan's surface as revealed by the Cassini Titan Radar Mapper. *Icarus*, 186: 395-412.

Lorenz R. D. (2006) The Sand Seas of Titan Cassini RADAR Observations. *Science*

Lorenz R. D., et al.,. (2021) Selection and Characteristics of the Dragonfly Landing Site near Selk Crater, Titan. *The Planetary Science Journal*.

Lorenz R. D., Imanaka H., McKay C. P., Makel D. B., Hunter G. W., Trainer M. G., Osiander R., Mastandrea A., Barnes J. W., and Turtle E. P. (2019) Hydrogen sensing in Titan's atmosphere: Motivations and techniques. *Planetary and Space Science*, 174: 1-7.

Lorenz R. D., Lopes R. M., Paganelli F., Lunine J. I., Kirk R. L., Mitchell K. L., Soderblom L. A., Stofan E. R., Ori G., and Myers M. (2008) Fluvial channels on Titan: initial Cassini RADAR observations. *Planetary and Space Science*, 56: 1132-1144.

Lorenz R. D., Wall S. D., Reffet E., Boubin G., Radebaugh J., Elachi C., Allison M., Anderson Y., Boehmer R., and Callahan P. (2006) Radar imaging of giant longitudinal dunes: Namib desert (earth) and the belet sand sea (titan).37th Annual Lunar and Planetary Science Conference.

Maguire W. C. e. a. (1981) C3H8 and C3H4 in Titan's atmosphere. *Nature*, 292.

Mahaffy *et al.* (2012) The Sample Analysis at Mars Investigation and Instrument suite. *Space Sci Rev*.

Mattingly R., and May L. (2011) Mars sample return as a campaign.2011 Aerospace Conference. IEEE.

McCord *et al.* (1999) Hydrated salt minerals on Europa's surface from the Galileo near-infrared mapping spectrometer investigation. *Journal of Geophysical Research*, 104.

McEwen A. S., Keszthelyi L., Geissler P., Simonelli D. P., Carr M. H., Johnson T. V., Klaasen K. P., Breneman H. H., Jones T. J., and Kaufman J. M. (1998) Active volcanism on Io as seen by Galileo SSI. *Icarus*, 135: 181-219.

McKay C. P. (2016) Titan as the abode of life. *Life*, 6: 8.

Mitri G., Meriggiola R., Hayes A., Lefevre A., Tobie G., Genova A., Lunine J. I., and Zebker H. (2014) Shape, topography, gravity anomalies and tidal deformation of Titan. *Icarus*, 236: 169-177.

Moldoveanu. (2009) Pyrolysis of organic molecules applications to health and envrionmental issues.

Moldoveanu S. C. (1998) Analytical pyrolysis of natural organic polymers. Elsevier.

Mora M. F., Greer F., Stockton A. M., Bryant S., and Willis P. A. (2011) Toward total automation of microfluidics for extraterrestial in situ analysis. *Analytical chemistry*, 83: 8636-8641.

Mora M. F., Kok M. G., Noell A., and Willis P. A. (2022) Detection of biosignatures by capillary electrophoresis mass spectrometry in the presence of salts relevant to ocean worlds missions. *Astrobiology*, 22: 914-925.

Moulay V., Freissinet C., Rizk-Bigourd M., Buch A., Ancelin M., Couturier E., Breton C., Trainer M. G., and Szopa C. (2023) Selection and Analytical Performances of the Dragonfly Mass Spectrometer Gas Chromatographic Columns to Support the Search for Organic Molecules of Astrobiological Interest on Titan. *Astrobiology*, 23: 213-229.

Nathues A., Hoffmann M., Schmedemann N., Sarkar R., Thangjam G., Mengel K., Hernandez J., Hiesinger H., and Pasckert J. H. (2022) Brine residues and organics in the Urvara basin on Ceres. *Nature Communications*, 13.

Neish C. D., Somogyi Á., Lunine J. I., and Smith M. A. (2009) Low temperature hydrolysis of laboratory tholins in ammonia-water solutions: Implications for prebiotic chemistry on Titan. *Icarus*, 201: 412-421.

Neish et al. (2010) Titan's Primordial Soup Formation of Amino Acids via Low Temperature Hydrolysis Tholins. *Astrobiology*, 10.

Neveu M., Anbar A. D., Davila A. F., Glavin D. P., MacKenzie S. M., Phillips-Lander C. M., Sherwood B., Takano Y., Williams P., and Yano H. (2020) Returning samples from Enceladus for life detection. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 7: 26.

Niemann et al. (2005) The abundances of constituents of Titan's atmosphere from GCMS instrument on the Huygens probe *Nature*, 438.

Niemann H., Atreya S., Bauer S., Biemann K., Block B., Carignan G., Donahue T., Frost R., Gautier D., and Haberman J. (2003) The gas chromatograph mass spectrometer for the Huygens probe. *The Cassini-Huygens Mission*: 553-591.

Noyelles B. (2017) Interpreting the librations of a synchronous satellite–How their phase assesses Mimas' global ocean. *Icarus*, 282: 276-289.

O'Brien D. P., Lorenz R. D., and Lunine J. I. (2005) Numerical calculations of the longevity of impact oases on Titan. *Icarus*, 173: 243-253.

Oro J., and Berry J. (1987) Comets and life. *Advances in space research*, 7: 23-32.

Oyama V., Vango S. P., and Wilson E. M. (1962) Application of Gas Chromatography to the Analyses of Organics, Water, and Adsorbed Gases in the Lunar Crust. *ARS Journal*, 32: 354-360.

Pappalardo R. T., Collins G. C., Head J., Helfenstein P., McCord T. B., Moore J. M., Prockter L. M., Schenk P. M., and Spencer J. R. (2004) Geology of ganymede. *Jupiter: The Planet, Satellites and Magnetosphere*, 2: 363.

Papparlardo *et al.* (1999) Does Europa have a subsurface ocean Evaluation of the geological evidence. *Journal of Geophysical Research*, 104.

Parro V., de Diego-Castilla G., Rodríguez-Manfredi J. A., Rivas L. A., Blanco-López Y., Sebastián E., Romeral J., Compostizo C., Herrero P. L., and García-Marín A. (2011) SOLID3: a multiplex antibody microarray-based optical sensor instrument for in situ life detection in planetary exploration. *Astrobiology*, 11: 15-28.

Parro V., Rodríguez-Manfredi J., Briones C., Compostizo C., Herrero P., Vez E., Sebastián E., Moreno-Paz M., García-Villadangos M., and Fernández-Calvo P. (2005) Instrument development to search for biomarkers on Mars: terrestrial acidophile, iron-powered chemolithoautotrophic communities as model systems. *Planetary and Space Science*, 53: 729-737.

Patthoff and Kattenhorn. (2011) A fracture history on Enceladus provides evidence for a global ocean. *Journal of Geophysical Research Letters*, 38.

Poch et al. (2012) Production yields of organics of astrobiological interest from H2O–NH3 hydrolysis of Titan's tholins. *Planetary and Space Science*.

Porco. (2006) Cassini Observes the Active South Pole of Enceladus *Science*, 311.

Porco C. C., Helfenstein P., Thomas P., Ingersoll A., Wisdom J., West R., Neukum G., Denk T., Wagner R., and Roatsch T. (2006) Cassini observes the active south pole of Enceladus. *science*, 311: 1393-1401.

Postberg F., Kempf S., Schmidt J., Brilliantov N., Beinsen A., Abel B., Buck U., and Srama R. (2009) Sodium salts in E-ring ice grains from an ocean below the surface of Enceladus. *Nature*, 459: 1098-1101.

Postberg F., Schmidt J., Hillier J., Kempf S., and Srama R. (2011) A salt-water reservoir as the source of a compositionally stratified plume on Enceladus. *Nature*, 474: 620-622.

Postberg F., Sekine Y., Klenner F., Glein C. R., Zou Z., Abel B., Furuya K., Hillier J. K., Khawaja N., and Kempf S. (2023) Detection of phosphates originating from Enceladus's ocean. *Nature*, 618: 489-493.

Radebaugh J., Lorenz R., Lunine J., Wall S., Boubin G., Reffet E., Kirk R. L., Lopes R., Stofan E., and Soderblom L. (2008) Dunes on Titan observed by Cassini RADAR. *Icarus*, 194: 690-703.

Raulin et al. (1995) Exobiology on Titan.

Reh K., Spilker L., Lunine J. I., Waite J. H., Cable M. L., Postberg F., and Clark K. (2016) Enceladus Life Finder: The search for life in a habitable Moon.2016 IEEE Aerospace Conference. IEEE.

Reveillaud J., Reddington E., Mcdermott J., Algar C., Meyer J. L., Sylva S., Seewald J., German C. R., and Huber J. A. (2016) Subseafloor microbial communities in hydrogen‐rich vent fluids from hydrothermal systems along the Mid‐Cayman Rise. *Environmental Microbiology*, 18: 1970-1987.

Rhoden A. R., and Walker M. E. (2022) The case for an ocean-bearing Mimas from tidal heating analysis. *Icarus*, 376: 114872.

Ross M., and Schubert G. (1989) Viscoelastic models of tidal heating in Enceladus. *Icarus*, 78: 90-101.
Roth *et al.* (2014) Transient Water Vapor at Europa's South Pole. *Science*, 343: 171-174.
Ruesch O., Platz T., Schenk P., McFadden L., Castillo-Rogez J., Quick L., Byrne S., Preusker F., O'Brien D., and Schmedemann N. (2016) Cryovolcanism on ceres. *Science*, 353: aaf4286.
Schubert G., Zhang K., Kivelson M. G., and Anderson J. D. (1996) The magnetic field and internal structure of Ganymede. *Nature*, 384: 544-545.
Schulz *et al.* (2021) Imaging Titan's Organic Haze at Atomic Scale. *The Astrophysical Journal Letters*.
Seckbach J., Oren A., and Stan-Lotter H. (2013) Polyextremophiles: life under multiple forms of stress. Springer Science & Business Media.
Selliez L., Briois C., Carrasco N., Thirkell L., Gaubicher B., Lebreton J.-P., and Colin F. (2023) Analytical performances of the LAb-CosmOrbitrap mass spectrometer for astrobiology. *Planetary and Space Science*, 225: 105607.
Selliez L., Maillard J., Cherville B., Gautier T., Thirkell L., Gaubicher B., Schmitz-Afonso I., Afonso C., Briois C., and Carrasco N. (2020) High-resolution mass spectrometry for future space missions: Comparative analysis of complex organic matter with LAb-CosmOrbitrap and laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 34: e8645.
Shannon M. MacKenzie *et al.* (2021) The Enceladus Orbilander Mission Concept: Balancing Return and Resources in the Search for Life. *The Planetary Science Journal*.
Skelley A. M., Cleaves H. J., Jayarajah C. N., Bada J. L., and Mathies R. A. (2006) Application of the Mars Organic Analyzer to nucleobase and amine biomarker detection. *Astrobiology*, 6: 824-837.
Skelley A. M., and Mathies R. A. (2003) Chiral separation of fluorescamine-labeled amino acids using microfabricated capillary electrophoresis devices for extraterrestrial exploration. *Journal of Chromatography A*, 1021: 191-199.
Soderblom. (2007) Correlations between Cassini VIMS spectra and RADAR SAR images : Implication for Titan's surface composition and the character of the Huygens Probe landing site.
Sohl F. (2003) Interior structure models and tidal Love numbers of Titan. *Journal of Geophysical Research*, 108.
Sparks *et al.* (2016) Probing for evidence of plumes on Europa with HST/STIS.pdf>. *The Astrophysical Journal*
Sparks W. B. (2017) Active Cryovolcanism on Europa. *The Astrophysical Journal Letters*.
Spencer *et al.* (2006) Cassini Encounters Enceladus Background and the Discovery of a South Polar Hot Spot. *Science*, 311.
Spencer J., Stern S., Cheng A., Weaver H., Reuter D., Retherford K., Lunsford A., Moore J., Abramov O., and Lopes R. (2007) Io volcanism seen by New Horizons: A major eruption of the Tvashtar volcano. *Science*, 318: 240-243.
Sternberg R., Raulin F., Szopa C., Buch A., and Vidal-Madjar C. (2007) Gas chromatography in space exploration. Elsevier.
Stofan et al. (2007) The lakes of Titan. *Nature*.
Thomas N., Bagenal F., Hill T., and Wilson J. (2004) The Io neutral clouds and plasma torus. *Jupiter. The planet, satellites and magnetosphere*, 1: 561-591.
Thomas P. C., Tajeddine R., Tiscareno M. S., Burns J. A., Joseph J., Loredo T. J., Helfenstein P., and Porco C. (2016) Enceladus's measured physical libration requires a global subsurface ocean. *Icarus*, 264: 37-47.
Timoumi R., Geffroy C., Le Postollec A., Dobrijevic M., and Rioland G. (2022) Liquid chromatography in space-like conditions: radiation effects on stationary phases. *44th COSPAR Scientific Assembly. Held 16-24 July*, 44: 2771.
Tomasko M. (1980) Preliminary results of polarimetry and photometry of Titan at large phase angles from Pioneer 11. *Journal of Geophysical Research: Space Physics*, 85: 5937-5942.
Trainer *et al.* (2013) The Influence of Benzene as a trace reactant in Titan aerosol analogs. *The Astrophysical Journal Letters*.

Trainer M. G. (2018) Dragonfly : investigating the surface composition of Titan.

Trumbo *et al.* (2022) A New UV Spectral Feature on Europa: Confirmation of NaCl in Leading-hemisphere Chaos Terrain.

Trumbo S. K., Brown M. E., and Hand K. P. (2019) Sodium chloride on the surface of Europa. *Science Advances*, 5: eaaw7123.

Tsou P., Brownlee D. E., McKay C. P., Anbar A. D., Yano H., Altwegg K., Beegle L. W., Dissly R., Strange N. J., and Kanik I. (2012) LIFE: Life investigation for Enceladus a sample return mission concept in search for evidence of life. *Astrobiology*, 12: 730-742.

Vance S., Bouffard M., Choukroun M., and Sotin C. (2014) Ganymede' s internal structure including thermodynamics of magnesium sulfate oceans in contact with ice. *Planetary and Space Science*, 96: 62-70.

Villanueva G., Hammel H., Milam S., Kofman V., Faggi S., Glein C., Cartwright R., Roth L., Hand K., and Paganini L. (2023) JWST molecular mapping and characterization of Enceladus' water plume feeding its torus. *arXiv preprint arXiv:2305.18678*.

Vinogradoff V., Poggiali G., Raponi A., Ciarniello M., De Angelis S., Ferrari M., Castillo-Rogez J. C., Brucato J., and De Sanctis M.-C. (2021) Laboratory investigations coupled to vir/dawn observations to quantify the large concentrations of organic matter on ceres. *Minerals*, 11: 719.

Waite et al. (2005) Ion Neutral Mass Spectrometer Results from the First Flyby of Titan. *Science*.

Waite *et al.* (2006) Cassini Ion and Neutral Mass Spectrometer Enceladus Plume composition and Structure. *Science*, 311.

Waite *et al.* (2017) Cassini finds molecular hydrogen in the Enceladus plus : evidence for hydrothermal processes *Planetary Geology*.

Waite J. H., Brockwell T., Glein C., Perry R., Bolton S., McGrath M., Miller K., Mousis O., Ray C., and Sephton M. (2019) MASPEX-Europa aboard Clipper: A mass spectrometer for investigating the habitability of Europa.Epsc-dps joint meeting.

Waite J. H., Jr., Young D. T., Cravens T. E., Coates A. J., Crary F. J., Magee B., and Westlake J. (2007) The process of tholin formation in Titan's upper atmosphere. *Science*, 316: 870-5.

Wampler. (2006) Applied Pyrolysis Handbook.

Watanabe S.-i., Tsuda Y., Yoshikawa M., Tanaka S., Saiki T., and Nakazawa S. (2017) Hayabusa2 mission overview. *Space Science Reviews*, 208: 3-16.

Willis P. A., Creamer J. S., and Mora M. F. (2015) Implementation of microchip electrophoresis instrumentation for future spaceflight missions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407: 6939-6963.

Woese C. R., and Fox G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5088-5090.

Wood C. A., Lorenz R., Kirk R., Lopes R., Mitchell K., Stofan E., and Team C. R. (2010) Impact craters on Titan. *Icarus*, 206: 334-344.

Yoshikawa M., Kawaguchi J., Fujiwara A., and Tsuchiyama A. (2021) The Hayabusa mission. In: *Sample return missions*, Elsevier, pp 123-146.

Zimmer *et al.* (2000) Subsurface Oceans on Europa and Callisto : Constraints from Galileo Magnetometer observations *Icarus*, 147.

Zolotov M. Y., and Shock E. L. (2004) A model for low‐temperature biogeochemistry of sulfur, carbon, and iron on Europa. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 109.

Chapitre II : Étude du processus de dérivatisation au diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA) de composés azotés pour leur détection à la surface de Titan avec la mission *Dragonfly*.

---

1. Objectifs

La mission *Dragonfly* atterrira sur Titan en 2034 pour une mission nominale d'une durée de 3,3 ans terrestres (Barnes et al. 2021). Pendant ces années d'exploration titanienne, l'analyseur chimique à bord du drone, *Dragonfly Mass Spectrometer* (DraMS) (détaillé en introduction de ce manuscrit, section I.4.1) analysera plusieurs échantillons prélevés à la surface par DrACO (Drill for Acquisition of Complex Organics). L'analyse de la composition moléculaire des échantillons se fera notamment à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM) (Moulay *et al.* 2023; Trainer *et al.* 2018). En amont de cette analyse, des méthodes de préparation d'échantillon associées à la CPG-SM seront appliquées sur l'échantillon pour tenter d'extraire le plus grand nombre de molécules possibles, ou de mettre en évidence des propriétés moléculaires spécifiques. Ces techniques de préparation d'échantillon sont la pyrolyse (chauffage de l'échantillon à haute température) jusqu'à 600 °C, la dérivatisation au DMF-DMA (réaction chimique) et la thermochimiolyse au TMAH (dérivatisation à haute température). Le principe de toutes ces méthodes a été détaillé dans la partie introductive de ce manuscrit (section I.3.1)

Du fait de la photochimie organique intense qui se produit dans l'atmosphère de Titan, initiée par la photolyse du méthane (CH_4) et la dissociation et ionisation du diazote (N_2) par les particules chargées provenant de la magnétosphère de Saturne (Carrasco et al. 2018; Hörst 2017), une diversité de familles chimiques est attendue dans les échantillons prélevés en surface (voir section I.1.2). Parmi ces familles, certaines ont déjà été détectées par la mission Cassini-Huygens ou par des observations à distance. En revanche, d'autres familles sont supposées être présentes en s'appuyant sur des modèles photochimiques ou des expériences de laboratoire qui simulent l'atmosphère de Titan et la chimie qu'il s'y produit, mais n'ont jamais été détectées jusqu'à présent. Parmi ces dernières, les molécules portant des fonctions amines (*e.g.* $-NH_2$ pour les amines primaires) ont été identifiées dans des analogues synthétiques des aérosols de Titan (=tholins)(Cable et al. 2014; Gautier et al. 2012). Ce sont des composés qui sont fortement recherchés à la surface de Titan, porteurs de plusieurs informations d'intérêt pour l'exobiologie. En effet, les molécules azotées peuvent être à la fois des précurseurs et des produits de dégradation de biomolécules tels que les acides aminés (Körner 2021). Leur détection et identification pourrait donc apporter des indices sur la mise en place d'une chimie prébiotique par exemple sur Titan, objectif clé de la mission *Dragonfly*. La chiralité des molécules azotées peut également apporter des informations sur un éventuel excès énantiomérique pouvant exister. Enfin, les groupements amines étant des fonctions réduites, des informations sur les conditions redox de surface peuvent également être obtenues. Les amines ont été détectées dans plusieurs types de tholins de Titan par plusieurs techniques analytiques : absorption infrarouge (Gautier *et al.* 2012),

photo-ionisation couplée à la SM à pression atmosphérique (Carrasco *et al.* 2009), résonance magnétique nucléaire (Derenne *et al.* 2012), micro-électrophorèse capillaire avec fluorescence laser induite(Cable *et al.* 2014). Cependant, ils n'ont été que peu reportés par analyse pyr-CPG-SM. Khare et al (1984) a reporté la détection de quatre amines aromatiques primaires sur des analogues de Titan. Morisson et al (2016) a utilisé la pyr-CPG-SM pour analyser des échantillons générés par un mélange CH_4/N_2 à 10 % et a reporté la détection d'amino-pyridine, ainsi qu'une détection potentielle d'ammoniaque, d'amino-cyclobutane, de 2-propyn-1-amine et de benzyl-amine. Ces résultats suggèrent un biais pour les structures aromatiques. Dans Morisson et al. (2016), la difficulté de mesurer les amines linéaires en CPG-SM est discutée, à cause de leur nature polaire et leur adsorption sur les lignes de transfert en inox. La dérivatisation réduisant la polarité des molécules, ces biais instrumentaux peuvent être limités par cette technique qui est donc bien complémentaire à la pyrolyse. Cependant, la dérivatisation des amines au DMF-DMA est mal connue, autant au niveau qualitatif que quantitatif.

À travers cette étude, il s'agit donc de comprendre comment le DMF-DMA réagit avec les fonctions amines, notamment selon leur nature (amines primaires, secondaires ou tertiaires, aliphatiques ou aromatiques, linéaires ou ramifiées). Il sera ainsi possible d'établir des signatures spectrales propres à la réaction de dérivatisation avec les groupements amines, qui seront référencées dans une base de données dédiée. Au-delà des fonctions amines, l'étude sera élargie à d'autres familles chimiques azotées tels que les amides, les nucléosides, les bases nucléiques et les acides aminés. Ainsi, ce travail s'inscrit directement dans la préparation de l'interprétation des données qui seront collectées et renvoyées sur Terre par la sonde *Dragonfly*. De plus, toujours dans l'optique de la caractérisation de la réaction de dérivatisation des fonction amines, les limites de détection et de quantification des molécules azotées dérivatisées par rapport aux molécules azotées non dérivatisées seront déterminées. Cela permettra d'évaluer l'impact de la dérivatisation sur la sensibilité de détection. Enfin, certaines amines pouvant être chirales, l'impact de la dérivatisation au DMF-DMA sur la séparation énantiomérique dans la recherche d'un potentiel excès sera aussi évalué.

Ce travail de dérivatisation des amines a été initié par un stagiaire de M1, Antoine Palanca, et achevé par moi-même dans le cadre de mon projet de thèse. De nombreux résultats découlent donc d'un travail commun.

2. Matériels et méthodes

2.1. Instrumentation

Toutes les expériences présentées dans ce chapitre ont été conduites avec un chromatographe Thermo Fisher Scientific Trace 1300 couplé à un spectromètre de masse quadrupolaire ISQ de la même marque. L'analyse s'étend de *m/z* = 20 à *m/z* = 600 u avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Le chromatographe est équipé d'un injecteur split/splitless (SSL) dont la température est fixée à 250 °C. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium (AirLiquide, pureté > 99,999 %) et la valeur du débit est de 1 $mL.min^{-1}$ au travers de la colonne. Cette dernière est une RTX-20 commercialisée par Restek™ d'une longueur de 30 m, de diamètre interne de 0,25 mm et avec une épaisseur de phase de 0,25 µm. La phase stationnaire est constituée à 20 % de diphényle et 80 % de diméthylpolysiloxane. Pour la majorité des expériences, la température initiale du four du chromatographe est de 40 °C puis

augmente jusqu'à 300 °C avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}. La température finale est maintenue au minimum 15 minutes. Le programme de température est considéré comme standard, dans les limites des conditions expérimentales de DraMS. Pour certaines analyses particulières, le programme diffère et la méthode est mentionnée sous les chromatogrammes. Par exemple, pour l'analyse des dipeptides (réalisée sur une colonne chromatographique RTX-5), une valeur de rampe de température CPG de 20 °C.min^{-1} a été choisie (contre 10 °C.min^{-1} pour les autres analyses) pour permettre une élution plus rapide des molécules, celles-ci étant plus lourdes que les amines analysées avec l'autre méthode analytique.

Pour l'étude de la chiralité et de la séparation énantiomérique avec et sans dérivatisation, une colonne CP-Chirasil-Dex CB, commercialisée par Agilent a été utilisée. Cette même phase stationnaire sera également embarquée à bord de DraMS (Moulay *et al.* 2023). Cette colonne permet d'obtenir une séparation énantiomérique optimale, particulièrement des acides aminés (Freissinet *et al.* 2013). La longueur de la colonne est de 25 mètres, avec un diamètre interne de 0,25 µm et une épaisseur de phase de 0,25 µm. La phase stationnaire est une phase chirale de β-cyclodextrine modifiée directement liée au squelette de polysiloxane, ce qui assure une stabilité spatiale de cette dernière, permettant une énantiosélectivité homogène et donc une résolution maximale entre les énantiomères. Une telle architecture permet d'augmenter la stabilité thermique de la phase stationnaire, la rendant plus résistante que ce soit en analyse isotherme (200 °C maximum) ou en programmation de température (225 °C maximum). Dans cette étude, le programme de température débute à 40 °C pour atteindre 190 °C maintenu pendant 10 minutes avec une rampe de 5 °C.min^{-1}. Cette rampe a été choisie pour permettre une élution plus lente des composés avec une augmentation de la température plus douce, ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution chromatographique des pics correspondants aux énantiomères étudiés. La température finale est maintenue pendant 15 minutes. Le split utilisé est de 50 mL.min^{-1} pour toutes les analyses qualitatives étant proches de la concentration saturante pour cette analyse qualitative. Pour l'analyse quantitative et celle des tholins, le split utilisé est de 20 mL.min^{-1}.

Enfin, pour la dérivatisation des analogues synthétiques (tholins), un pyrolyseur Pyroprobe 6200 de la marque CDS analytical a été utilisé permettant une dérivatisation on-line, aboutissant à une injection totale du contenu de l'échantillon (pas de prélèvement d'un volume donné avec une seringue). Cela a été effectué car le ratio DMF-DMA:tholins utilisé n'est pas compatible avec un prélèvement de DMF-DMA liquide résiduel après la réaction de fonctionnalisation. Une alternative est d'ajouter un solvant (typiquement du DMF) après la dérivatisation, mais cela a pour impact de diluer la solution contenant les molécules dérivatisées, ce qui limite les capacités de détection. Pour assurer une meilleure détection des molécules présentes dans les tholins, dont la concentration est inconnue, la dérivatisation « on-line » a donc été privilégiée. Pour cette étude, le pyrolyseur a été utilisé en passant par un piège chimique à thermodésorption. Le protocole employé pour celle-ci est détaillé dans la section II.2.4.

2.2. Les standards chimiques

Pour chaque étude menée dans ce chapitre, une comparaison a été faite entre les standards chimiques non dérivatisés et leurs formes dérivatisés, aboutissant à l'évaluation de l'impact du DMF-DMA à la fois sur les limites de détection et de quantification mais aussi sur la séparation chirale. Tous les standards chimiques utilisés dans cette étude ont été fournis par Merck. La pureté des composés (quand celle-ci est disponible) ainsi que la structure de ces derniers sont référencées dans le Tableau II-1.

Les composés azotés étudiés avec la dérivatisation

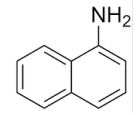
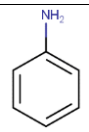
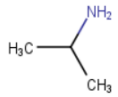
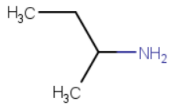
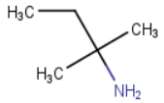
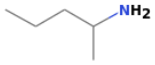
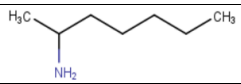
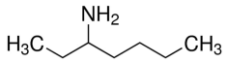
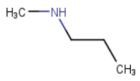
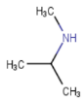
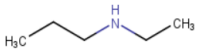
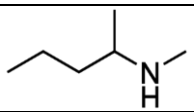
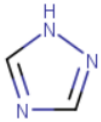
La dérivatisation avec le DMF-DMA des fonctions amines étant très peu référencée dans la littérature, une grande variété de standards chimiques a été utilisée comprenant différentes natures de molécules (aliphatique linéaire, aliphatique ramifiée, aromatique), de fonction amine (primaire, secondaire, tertiaire), mais aussi des amides, des bases azotées, des nucléosides, des nucléotides ainsi que d'autres espèces azotées (Tableau II-1).

Des molécules plus complexes et d'intérêt pour l'exobiologie ont également été étudiées comme certains dipeptides. Avant la dérivatisation, ces dipeptides ont été inclus dans un mélange équimolaire à 10^{-2} mol.L^{-1} dilués dans de l'eau MilliQ®.

Dans un premier temps, l'intérêt est porté sur la réactivité du DMF-DMA et l'identification des formes dérivatisées obtenues après dérivatisation au DMF-DMA selon la nature des molécules ciblées. De fait, l'aspect quantitatif ne nous intéresse pas pour la première partie de cette étude. Ainsi, la concentration pour toutes les molécules étudiées n'a pas été déterminée, hormis pour le mélange de dipeptide et des composés chiraux comme précédemment explicité. Pour toutes ces expériences 0,2 µL de solution ont été injectés avec un ratio de split de 50.

Tableau II-1 : Liste des composés azotés étudiés dans ce chapitre. Les molécules en orange correspondent à des molécules possédant un carbone asymétrique (molécules chirales).

Nom	Mase molaire (g.mol^{-1})	Pureté	Structure
	Molécules aliphatiques linéaires avec une amine primaire		
Ethanamine	45,08	-	H_2N———R^1 R^1 correspond à la longueur de la chaîne carbonée selon la molécule
Butanamine	73,14	>99.5 %	
Pentanamine	87,16	99 %	
Hexanamine	101,19	99 %	
Heptanamine	115,22	99 %	
Octanamine	129,25	99 %	
Nonanamine	143,27	99 %	
Decanamine	157,30	95 %	
Dodecanamine	185,30	>99 %	
Tetradecanamine	213,40	95 %	
Hexadecanamine	241,46	98 %	
Octadecanamine	269,51	97 %	

	Molécules aromatiques avec une amine primaire		
1-Naphtylamine	143,19	99 %	
Aniline	93,13	>99.5 %	
	Molécules aliphatiques ramifiées avec une amine primaire		
Isopropylamine	59,11	>99,5 %	
2-aminobutane	73,14	99 %	
Tert-amylamine	87,17	98 %	
2-aminopentane	87,16	97 %	
2-aminoheptane	115,22	99 %	
1-ethyl-N-pentanamine	115,22	-	
	Molécules aliphatiques avec une amine secondaire		
N-methylpropylamine	73,14	96 %	
N-isopropylmethylamine	73,14	98 %	
N-ethyl-N-propylamine	87,16	-	
N-methyl-2-pentanamine	101,19	-	
	Molécule aromatique avec une amine secondaire		
1,2,4-Triazole	69,01	98 %	

	Molécule aromatique avec une amine tertiaire		
4-Picoline	93,13	-	
1-Propyl-1H-1,2,4-triazol-3-amine	126,16	-	
N-méthylpyrrole	81,12	99 %	
2,3,5,6-tetramethylpyrazine	136,198	98 %	
	Amides		
Nicotinamide	122,12	-	
Acétamide	59,07	99 %	
Butanamide	87,12	98 %	
N-méthylacétamide	73,09	99 %	
N-éthylacétamide	87,09	99 %	
2-ethyl-3-methylpentamide	143,23	>96 %	
	Autres		
Urée	60,06	-	
Glycyl-glycine	132,12	>99 %	

Glycyl-alanine	146,07	-	
Alanyl-leucine	202,251	-	
Alanyl-alanine	160,17	-	
Adénine	135,13	99 %	
Uracile	112,09	-	
Adénosine	267,24	>99 %	
Uridine	244,20	-	
Adénosine triphosphate	507,18	-	

<u>L'étalon interne pour la quantification</u>

Un étalon interne a été utilisé pour la quantification. L'étalonnage interne repose sur l'addition dans la solution à analyser d'une quantité parfaitement connue d'une molécule de référence, nommée étalon interne. Quelle que soit la solution, la quantité injectée de cet étalon est donc toujours la même. En effet, l'aire des pics chromatographiques obtenues après détection des molécules est proportionnelle à la quantité de matière des composés étudiés. Toutefois, certains biais expérimentaux et instrumentaux existent. En ajoutant l'étalon interne, il est possible de s'affranchir de ce biais instrumental mais également de s'affranchir des erreurs relatives à la préparation d'échantillon, à l'injection et à l'instrumentation. Pour ce faire, pour chaque molécule étudiée, la quantification se fera en rapportant l'aire du pic chromatographique du soluté étudié à l'aire du pic correspondant à l'étalon interne. L'étalon interne choisi pour cette étude est le méthyl laurate (ou

ester méthylique de l'acide dodécanoïque (Figure II-1). En effet, celui-ci ne fait pas parti des solutés d'intérêt, ne peut pas réagir avec le DMF-DMA (étant déjà méthylé sur sa fonction carboxyle) et est élué à des temps différents des composés d'intérêt avec la méthode analytique employée. Le méthyl laurate (Merck, pureté > 98 %) est dilué à 10^{-2} mol.L^{-1} pour les expériences réalisées dans de l'acétate d'éthyle (Merck, pureté de 99,8 %) qui est miscible avec le DMF-DMA. Après la réaction de dérivatisation au DMF-DMA des molécules azotées étudiées, 1 µL d'étalon interne est ajoutée à la solution avant injection, permettant ainsi d'éviter toute dégradation de ce dernier avec la température de dérivatisation utilisée ici (145 °C).

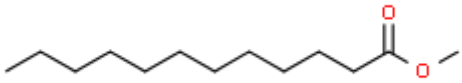


Figure II-1 : Structure moléculaire du méthyl laurate, étalon interne choisi pour cette étude.

2.3 Procédure de dérivatisation avec le DMF-DMA

La dérivatisation a été effectuée avec du DMF-DMA fourni par Merck avec une pureté supérieure à 99 %. Le DMF-DMA est un agent de dérivatisation qui va substituer un des hydrogènes labiles des composés polaires par un groupement lui appartenant (Figure II-2). Cette fonctionnalisation permet notamment de supprimer les liaisons intermoléculaires (de type hydrogène par exemple), rendant les molécules contenues dans un échantillon plus volatiles. L'augmentation de la volatilité passe donc par un abaissement de la polarité des molécules. L'autre intérêt du DMF-DMA est la conservation de la symétrie des centres chiraux des molécules possédant un carbone asymétrique, dans les conditions protocolaires utilisées (Freissinet *et al.* 2010).

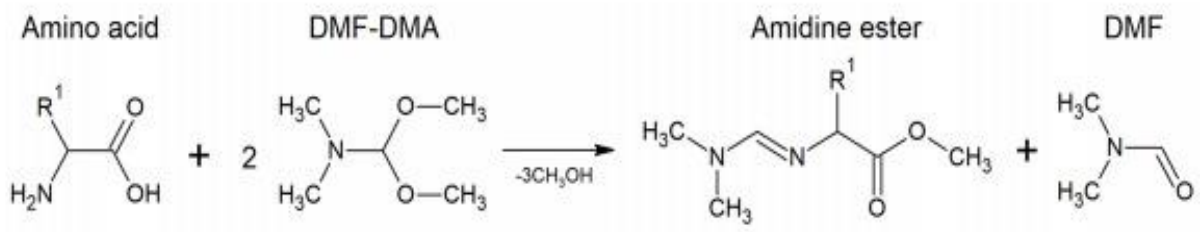


Figure II-2 : Exemple de dérivatisation d'un acide aminé avec du DMF-DMA.

Une dérivatisation en une seule étape a été utilisée sur les différentes molécules azotées listées dans le Tableau II-1. Pour chaque expérience effectuée, 20 µL de DMF-DMA sont ajoutés directement dans un flacon de 2 mL qui contient les composés azotés à dérivatiser soit sous forme liquide ou soit sous forme solide. Ensuite, le flacon est placé dans un bloc chauffant à 145 °C pendant 3 minutes (Freissinet *et al.* 2010), la réaction de dérivatisation au DMF-DMA étant peu efficace à température ambiante. 1 µL de solution d'étalon interne est ajoutée à la solution dérivatisée. Après

mélange, 0,2 µL de la solution résultante dérivatisée sont injectés. Ce protocole a été appliqué pour toutes les expériences réalisées hormis pour la dérivatisation des dipeptides et des tholins. En effet, le mélange de dipeptide étudié est dilué dans de l'eau MilliQ. Or, les atomes d'hydrogène labiles des molécules d'eau peuvent réagir avec le DMF-DMA, ce qui aboutit à une réaction non souhaitée pouvant consommer l'intégralité de l'agent de fonctionnalisation. Par conséquent, en amont de la réaction de dérivatisation, une évaporation complète de l'eau est nécessaire, ce qui s'effectue sous flux de diazote. L'évaporation est effectuée à température ambiante pour deux raisons : (i) préserver les dipeptides de la dégradation thermique et (ii) le volume à évaporer étant de 10 µL, l'évaporation sous flux de diazote uniquement est rapide.

Enfin, certaines molécules chirales ont également été étudiées en mélange racémique pour évaluer la séparation énantiomérique avec la dérivatisation sur une colonne chirale selon la nature de l'amine. Pour ce faire, un mélange équimolaire de deux amines chirales aliphatiques à 10^{-2} mol.L^{-1} dans du diméthylformamide (DMF, fourni par Merck, pureté > 99%) a été réalisé, pour éviter toute saturation du détecteur, ce qui pourrait impacter la séparation énantiomérique (deux isomères optiques étant élués proches l'un de l'autre). Le solvant étant du DMF, la dérivatisation au DMF-DMA s'effectue avec 10µL du mélange d'amines chirales et 20 µL d'agent de dérivatisation.

2.4 Les analogues synthétiques des aérosols de Titan (=tholins).

Des échantillons de synthèse, analogues aux aérosols de l'atmosphère de Titan ont également été dérivatisés au DMF-DMA pour travailler sur des échantillons plus représentatifs de ce qui est attendu sur Titan par rapport aux standards chimiques. Ceci permet donc de réaliser des expériences plus réalistes en préparation à l'analyse *in situ,* bien que cela ne tienne pas compte de toutes les espèces pouvant être présentes à la surface de Titan. En effet, les tholins sont des analogues des aérosols de l'atmosphère de Titan et ne prennent pas en compte tous les processus que ces derniers peuvent subir une fois à la surface.

Dans ces analogues, la présence de fonctions amines a notamment été rapportée par une analyse infrarouge et par électrophorèse capillaire (Gautier *et al.* 2012). Dans Morisson et al. (2016), les tholins produits au LATMOS ont été analysés par pyr-CPG-SM et ont montré la détection de nombreux composés nitriles, mais seulement de quelques composés amines. Ces poudres organiques ont été produites au sein du réacteur PAMPRE et préparées selon la procédure détaillée dans la littérature (Gautier *et al.* 2014; Szopa *et al.* 2006). Le mélange gazeux injecté dans le réacteur est composé de 95% de diazote et 5% de méthane. Un tel ratio a été sélectionné car il est connu pour produire une forte quantité de tholins (Sciamma-O'Brien *et al.* 2010). La pression totale au sein du réacteur PAMPRE était de 0,9 mbar et le débit en gaz de 55 mL.min^{-1}. Les tholins ainsi produits ont été accumulés pendant 20 heures dans un cristallisoir (Figure II-3) englobant le plasma, et ont ensuite été collectés dans des flacons.

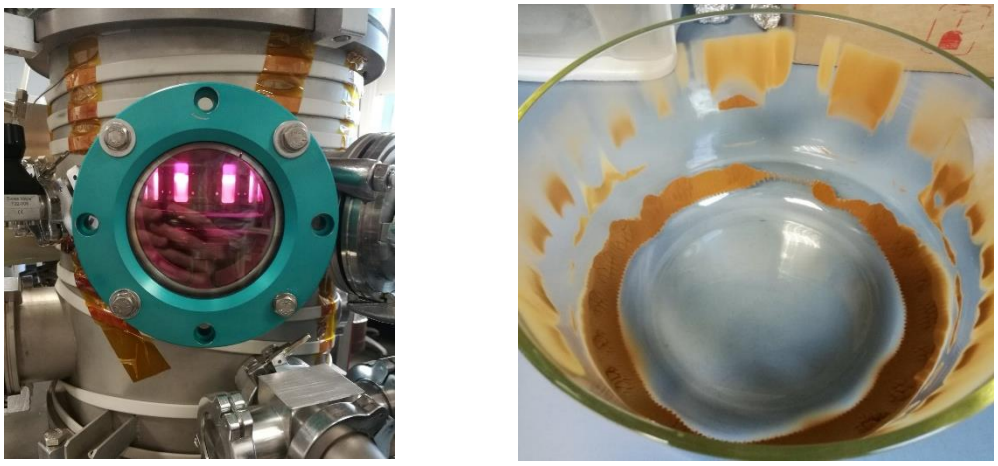


Figure II-3 : (Gauche) Réacteur PAMPRE pendant la phase de production des tholins avec le plasma allumé. (Droite)Tholins de Titan après leur production au sein du réacteur PAMPRE et avant leur récolte.

La dérivatisation des tholins s'est fait en mode « on-line », à savoir au sein du pyrolyseur CDS décrit précédemment. 1 mg de tholins a été dérivatisé avec 2 µL de DMF-DMA. Ce volume a été choisi selon une étude (non publiée actuellement) réalisée au sein de l'équipe, qui a déterminé un ratio optimal de 2 entre la masse de tholins et le volume d'agent de dérivatisation. La chambre de pyrolyse a été chauffée dans un premier temps à 145 °C pendant 3 minutes en coupant le flux d'hélium au sein du pyrolyseur pour simuler un réacteur fermé, comme cela se produira sur DraMS. Dans un second temps, la température de la chambre a été augmentée à 300 °C et le flux d'hélium à l'intérieur du pyrolyseur a été fixé à 25 $mL.min^{-1}$. Ainsi, toutes les molécules dérivatisées formées ont pu être volatilisées et envoyées vers un piège rempli par du Tenax™ et maintenu à 30 °C. Pour l'injection, le sens du flux d'hélium dans le piège est inversé en même temps que le piège est chauffé à 280 °C pendant 2 minutes pour désorber les molécules adsorbées et les envoyer directement vers le chromatographe.

3. Résultats et discussion

3.1 Réactivité chimique du DMF-DMA avec les fonctions amines.

Ici sont présentés les résultats pour chaque nature de molécule avec en général un exemple sur un composé parmi tous les composés qui ont été étudiés.

3.1.1. Identification des produits provenant du DMF-DMA.

En premier lieu, il est nécessaire d'appliquer le même protocole de dérivatisation que celui qui sera utilisé sur les amines, avec le DMF-DMA seul, pour obtenir un blanc de dérivatisation de référence. Cela permet d'identifier les produits secondaires de réaction qui sont formés à la température employée pour la réaction de fonctionnalisation. Un tel blanc permet de connaître tous les co-produits formés et leur temps de rétention dans des conditions expérimentales données, information primordiale pour déconvoluer les potentielles coélution avec les amines d'intérêt. De plus le DMF-DMA possédant un atome d'azote dans sa structure, il est tout à fait possible que des co-produits de réaction correspondent à des molécules d'intérêt portant des fonctions chimiques azotées. La Figure II-4 correspond au chromatogramme obtenu avec le DMF-DMA seul.

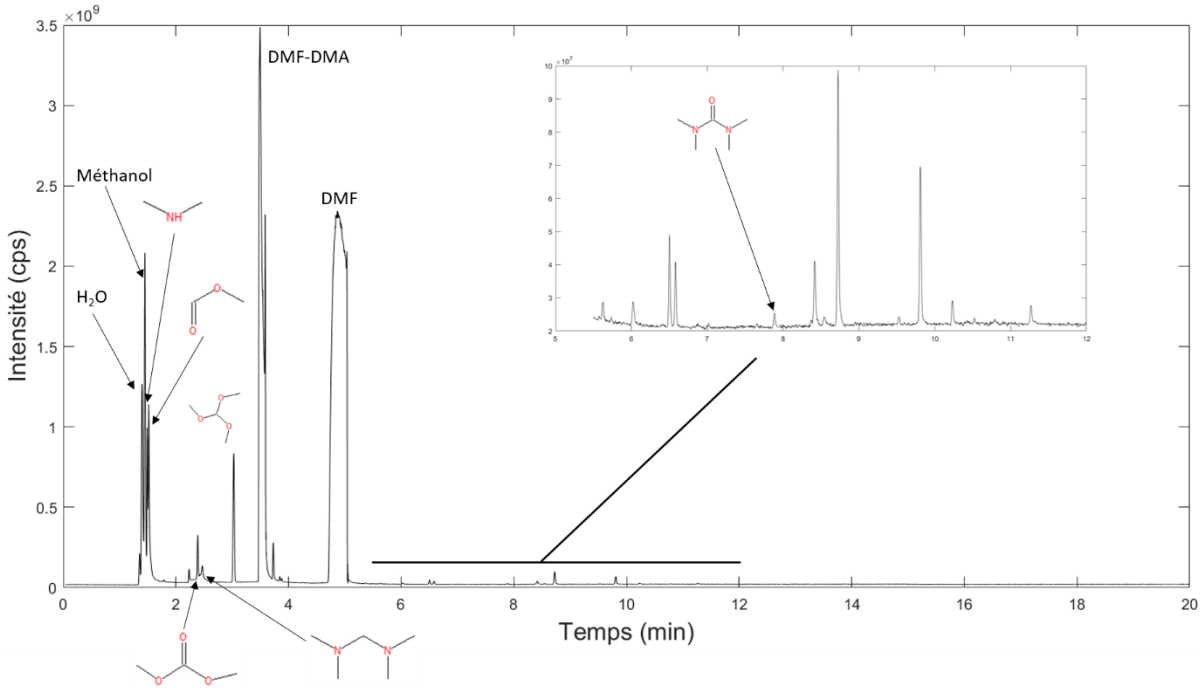


Figure II-4 : Chromatogramme (obtenu en TIC) du DMF-DMA dérivatisé seul à 145 °C pendant 3 minutes. Les pics qui ne sont pas annotés correspondent à des molécules qui n'ont pas pu être identifiées.

La dérivatisation du DMF-DMA seul montre de nombreux co-produits, dont certains comportent des fonctions amines dérivatisées comme l'urée détectée aux alentours de 8 minutes. Le fait que ce composé soit présent dans le DMF-DMA seul peut poser problème car cette molécule est une cible potentielle à la surface de Titan (voir section II.3.5). Malgré les potentielles coélutions entre les produits de dégradation du DMF-DMA et des composés azotés d'intérêt pour l'exobiologie, les molécules organiques attendues sur Titan sont généralement de plus haut poids moléculaire du fait de la photochimie atmosphérique. Elles seront donc éluées avec des temps de rétention estimés supérieurs à 10 minutes. Certains pics n'ont pas encore été identifiés et leurs structures moléculaires devront être obtenues pour pouvoir interpréter les futures données *in situ*. Une future analyse avec un tandem de spectromètre de masse pourra être envisagée afin d'obtenir l'identification de ces co-produits inconnus. Ces composés peuvent provenir d'une réaction interne au DMF-DMA, ou d'impuretés présentes dans la solution. De tels travaux pourraient également servir à l'analyse des données de futures missions qui embarqueront du DMF-DFMA comme agent de dérivatisation, notamment celles qui seront obtenues avec le rover Rosalind Franklin et l'instrument MOMA.

3.1.2 Identification des formes dérivatisées pour les amines primaires

La dérivatisation au DMF-DMA des amines primaires donnent une forme majoritaire, mais laisse apparaître également des formes minoritaires, qui peuvent soit provenir de la réaction de dérivatisation, soit uniquement de la température élevée employée lors de la fonctionnalisation.

Forme majoritaire

La fonctionnalisation des amines primaires a été premièrement étudiée sur des amines primaires aliphatiques et linéaires (de formule $C_nH_{2n-1}NH_2$), puis ramifiées (voir Tableau II-1). La forme majoritaire qui est observée sur les chromatogrammes, que les amines soient linéaires ou ramifiées est la forme diméthylformamidinée (Figure II-5).

Les amines primaires aromatiques (aniline et naphthylamine) ont également été analysées. Les amines aromatiques ont une réactivité nucléophile beaucoup moins importante que les amines aliphatiques. En effet, le noyau aromatique modifie la répartition électronique au sein de la molécule par attraction vers le noyau par effet inductif, ce qui aurait pu conduire à une forme dérivatisée différente. Malgré cet effet, la forme diméthylformamidinée est observée comme largement majoritaire.

Pour toutes les amines primaires étudiées ici, la méthylation et la diméthylation auraient pu également être des formes attendues, mais aucun pic ne correspond à de telles molécules. De plus, que ce soit pour les amines primaires linéaires, ramifiées ou aromatiques, l'excès de DMF-DMA conduit à une réaction totale, avec l'absence d'amine non dérivatisée.

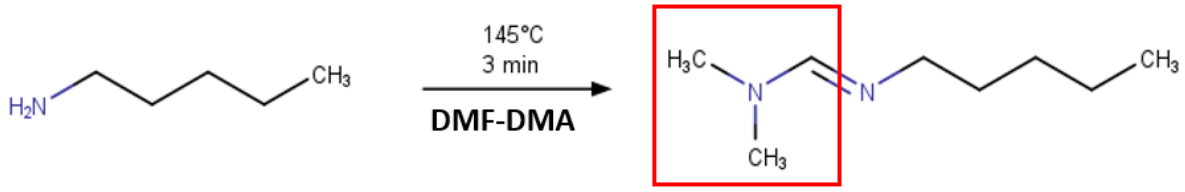


Figure II-5 : Exemple de réaction du DMF-DMA avec une amine primaire aliphatique, ici la pentanamine. L'encadré en rouge représente le groupement diméthylformamidine.

Les spectres de masse correspondants au pic chromatographique majoritaire avec les amines primaires linéaires (pentanamine) et ramifiées (2-aminoheptane) dérivatisées sont présentés sur la Figure II-6 avec les ions correspondants. Le fragment *m/z* = 44 est retrouvé pour les amines aliphatiques linéaires et ramifiées et correspond à l'ion $(CH_3)_2\ N^+$, le fragment *m/z* = M + 55 correspond au pic moléculaire et le fragment *m/z* = M + 11 correspond au pic moléculaire auquel le fragment 44 a été retiré, c'est le fragment complémentaire. Le fragment *m/z* = 85 est spécifique aux amines primaires aliphatiques linéaires et correspond à l'ion ($C_4H_9N_2^+$) alors que le fragment *m/z* = 99 est lui spécifique des amines ramifiées et correspond à l'ion $(CH_3)_3(CH)_2N_2^+$. Ces fragments spécifiques ont été observés pour toutes les amines primaires aliphatiques linéaires et seulement pour trois des amines aliphatiques ramifiées étudiées (celles ayant uniquement le groupement $-NH_2$ en ramification). Ces spectres de masse, n'existant pas dans les bases données spectrales NIST et Wiley, ont été ajoutés dans une libraire

spécifique à la dérivatisation des amines qui sera enrichie au fur et à mesure de la progression de l'étude. Ainsi, cette librairie pourra être utilisée pour l'interprétation des données *in situ* obtenues par l'instrument DraMS à la surface de Titan.

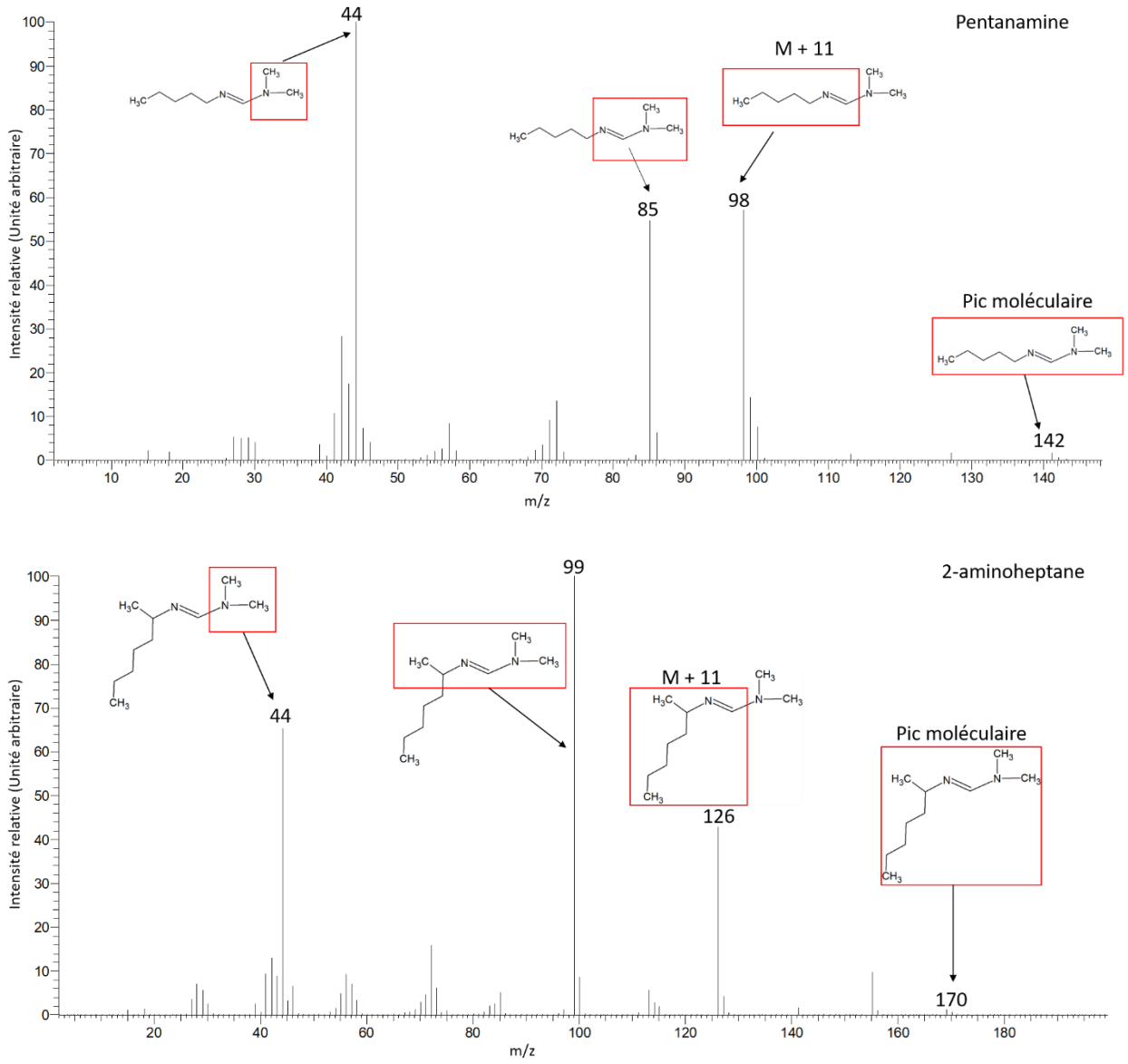


Figure II-6 : Spectres de masse de la pentanamine et du 2-aminoheptane obtenus sur un quadrupôle avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Les fragments détectés sont encadrés en rouge par rapport à la molécule de départ. La notation M correspond à la masse moléculaire du composé non dérivatisé.

Autres formes associées

Hormis la forme diméthylformamidinée, d'autres formes beaucoup plus minoritaires sont également retrouvées, exceptées pour les amines primaires aromatiques. Pour les amines primaires aliphatiques et linéaires, l'aldéhyde correspondant à la chaîne carbonée est retrouvé, alors que pour les amines ramifiées, c'est la cétone équivalente qui est identifiée. Cela signifie que le groupement amine est substitué par un atome d'oxygène. Ces mêmes amines chauffées à 145 °C en absence de

DMF-DMA ne permet pas de détecter l'aldéhyde et la cétone correspondants. Cela signifie que ces molécules proviennent de la dérivatisation au DMF-DMA, avec un apport d'atome d'oxygène.

Pour les amines primaires aliphatiques et linéaires, deux autres formes sont également détectées. Premièrement, le nitrile correspondant à l'amine est détecté. Les nitriles peuvent provenir de la transformation de la fonction amine en nitrile avec la température ; les 145 °C utilisés pour la réaction de fonctionnalisation sont suffisants pour observer un tel processus. Des analyses ont été réalisées avec l'amine seule chauffée à 145 °C pendant 3 minutes (même protocole que pour la dérivatisation), et le nitrile est observé. Ainsi, cette molécule est associée à la pyrolyse de l'amine plutôt qu'à la dérivatisation. Enfin, les dernières formes qui sont observées, sont l'amine primaire indentée d'un ou plusieurs carbones. Par exemple, pour des analyses sur la décanamine, l'octanamine et la nonanamine diméthylformamidinées sont aussi identifiées. L'analyse de la solution de décanamine pure en injection directe n'a pas montré la présence de ces deux composés. En effet, ils auraient pu être présents dans la solution mère, en tant que contaminant. Cela signifie que ces composés sont produits par la réaction de dérivatisation à 145 °C. Cela apporte notamment une information sur la cinétique de réaction : il y a tout d'abord une délétion des carbones avec la température puis une dérivatisation des fonctions amines. La pyrolyse est donc plus rapide que la fonctionnalisation d'un point de vue cinétique.

Il reste important de souligner que l'intensité des pics correspondants à ces formes en comparaison à la forme dérivatisée principale demeure très faible. À titre d'exemple, les pics de l'octanamine et la nonanamine diméthylformamidinées apparaissent avec 2 ordres de grandeur de différence en termes d'abondance. De plus, la solution injectée ici est de 10^{-2} mol.L^{-1}. Au vu des différences d'ordre de grandeur de l'air des pics chromatographiques, il est tout à fait envisageable qu'à des concentrations plus faibles, ces molécules soient en dessous de la limite de détection.

Pour les amines primaires aromatiques, aucune autre forme que la molécule diméthylformamidinée n'a été observée et aucun autre pic chromatographique ne semble être relatif à la dérivatisation au DMF-DMA.

3.1.3 Identification des formes dérivatisées pour les amines secondaires

Contrairement aux amines primaires étudiées précédemment, les amines secondaires possèdent un seul atome d'hydrogène labile et sont intégrées au sein d'une chaîne carbonée, ce qui augmente l'encombrement stérique d'un point de vue réactionnel. De fait, les amines secondaires présentent plusieurs formes dérivatisées abondantes différentes des amines primaires. Puisque la dimethylformamidination observée pour la dérivatisation des amines primaires nécessite une double liaison, cette réaction est impossible dans le cas des amines secondaires dont la fonction amine ne porte qu'un seul atome d'hydrogène. Dans cette étude qualitative, que ce soit pour les amines secondaires aliphatiques ou aromatiques, trois formes dérivatisées sont identifiées : la forme méthylée, la forme diméthoxyméthylée et la forme formylée (Figure II-7). D'après Grubb et al., 1989, une rétro-acétylisation convertit l'amine diméthoxyméthylée en amine formylée. Ces deux dernières formes dérivatisées sont spécifiques de la fonctionnalisation au DMF-DMA. Contrairement aux amines

primaires, la réaction de dérivatisation sur les amines secondaires n'est pas totale malgré l'excès de DMF-DMA et l'amine secondaire non dérivatisée est également détectée.

Le chromatogramme obtenu pour la dérivatisation d'une amine secondaire aliphatique (N-isopropyléthylamine) est présenté Figure II-7 pour montrer notamment les différences d'intensités des pics chromatographiques selon les formes dérivatisées. Que ce soit pour l'amine secondaire aliphatique ou aromatique, il apparaît d'un point de vue semi-quantitatif que la forme méthylée est la moins abondante. Une étude quantitative devra être menée sur une amine secondaire dans le futur pour déterminer les limites de détection de chaque forme dérivatisée.

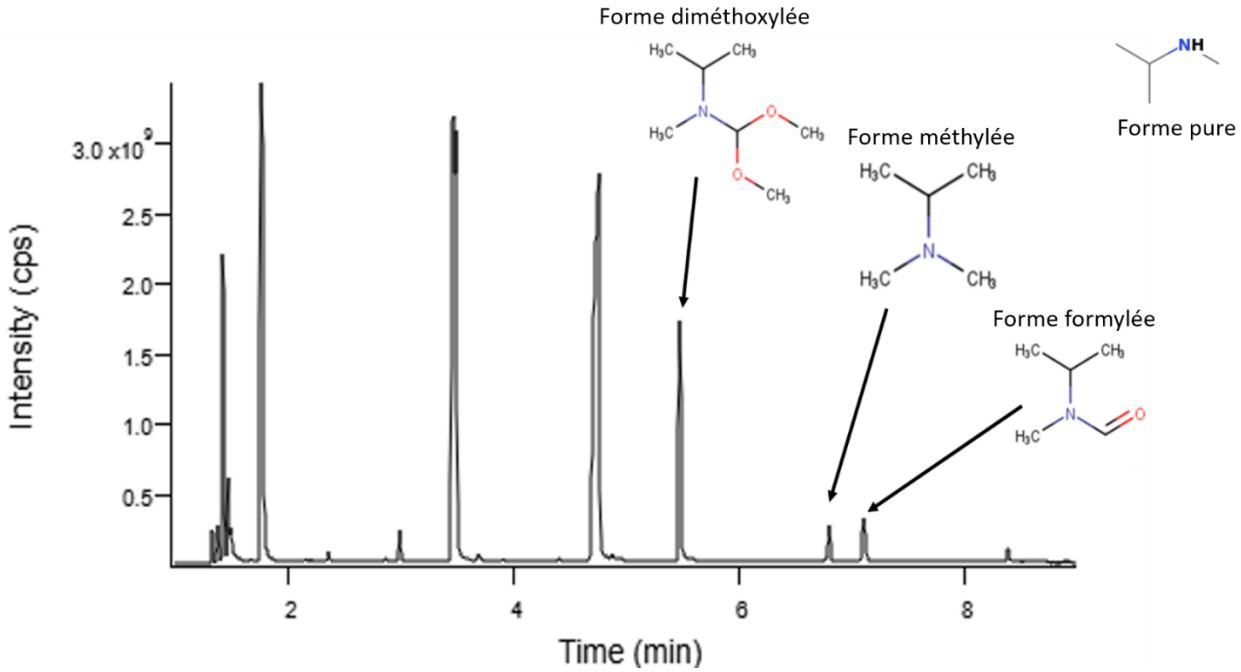


Figure II-7 : Chromatogramme de la N-isopropylméthylamine dérivatisée au DMF-DMA et de ses trois formes dérivatisées. Les pics non annotés correspondent à des co-produits du DMF-DMA. Le programme de température débute à 30 °C pour atteindre 300 °C avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}.

Les spectres de masse correspondants aux différentes formes dérivatisées des amines secondaires aliphatiques et aromatiques sont présentés sur la Figure II-8 avec les fragments correspondants. Les trois formes dérivatisées étant très différentes l'une de l'autre, la fragmentation obtenue est également propre à chaque forme. Ici, seulement sont détaillés les fragments se rapportant aux groupements apportés par la dérivatisation. Pour la forme diméthoxyméthylée, le fragment m/z = 75 correspond à l'ion $(CH_3)_2CHO_2^+$, le fragment M-31 correspond à l'ion $(CH_3)_3(CH_2)_2CHO^+$ et le fragment *m/z* = M + 74 au pic moléculaire. Pour la forme formylée, le fragment *m/z* = 29 u correspond à l'ion CHO^+, le fragment *m/z* = M – 1 correspond à l'ion $(CH_3)_2(CH_2)_2N^+$ et le fragment *m/z* = M + 28 au pic moléculaire. Le fragment *m/z* = 58 pour la forme formylée est propre à la molécule et non dû à la dérivatisation. Enfin, le spectre de la forme méthylée n'est pas présenté car pour les amines analysées, celui-ci était déjà présent dans la base de données. Les formes dimethoxyméthylées et formylées ne l'étaient pas, et l'identification a pu être faite par recherche

ciblée des spectres de masse. Ces spectres de masse comme ceux des amines primaires ont été ajoutés à la librairie de dérivatisation des amines au DMF-DMA.

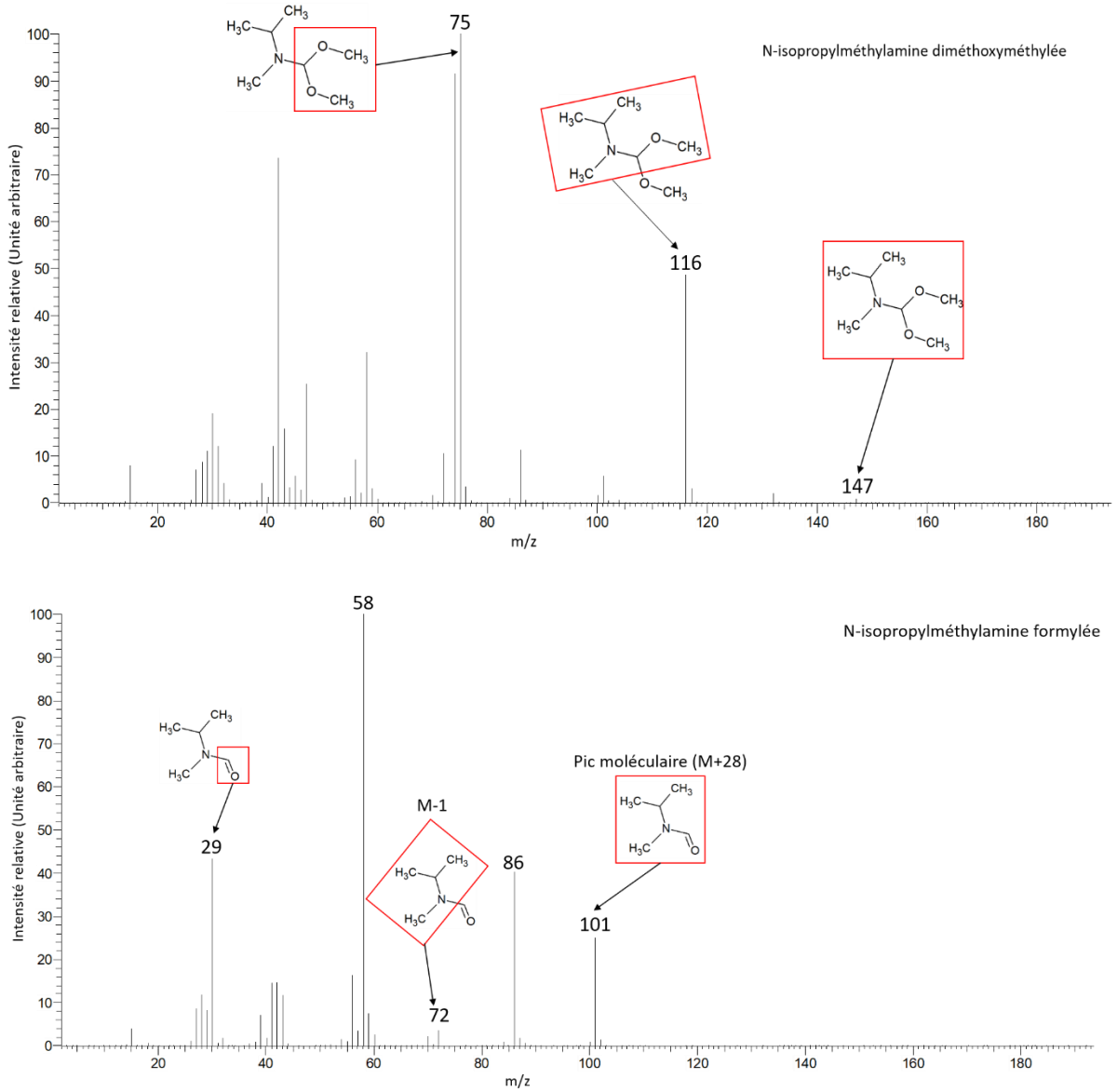


Figure II-8 : Spectres de masse des formes diméthoxyméthylée et formylée de la N-isopropylethylamine obtenus sur un quadrupôle avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Les fragments détectés sont indiqués en rouge sur les molécules.

3.1.4. Dérivatisation des amines tertiaires.

La dérivatisation au DMF-DMA a également été testée sur les amines tertiaires. Les amines tertiaires étudiées ici étaient toutes aromatiques avec un ou des atomes d'azote inclus dans le cycle. Les amines tertiaires correspondent à un atome d'azote qui est relié à trois autres groupements moléculaires autre que des atomes d'hydrogènes. Ainsi, ces groupements chimiques ne présentent pas d'hydrogène labile contrairement aux amines primaires et secondaires.

Comme cela était attendu, la dérivatisation des amines tertiaires n'a donné aucune forme dérivatisée ou moléculaire qui aurait pu être relative à la réaction avec le DMF-DMA.

3.1.5. Identification des formes dérivatisées pour les amides

Les amides primaires

Les amides primaires réagissent avec le DMF-DMA comme les amines primaires, à savoir une diméthylformamidination du groupement NH_2, qui est la forme dérivatisée majoritaire. Du fait de la répartition électronique avec la présence de l'atome d'oxygène, les amides primaires donnent également une autre forme dérivatisée, beaucoup plus minoritaire, qui est le méthyl alcanoate associé à l'amide dérivatisé (Figure II-9). Cela signifie que le groupement NH_2 est substitué par un groupement $O\text{-}CH_3$. L'amide primaire sous sa forme brute (non dérivatisée), n'est pas retrouvée sur les chromatogrammes, ce qui signifie que la réaction avec le DMF-DMA est totale. Enfin, selon les amides étudiés, il est également possible d'obtenir l'amide diméthylé mais une telle forme n'est pas observée pour tous les amides primaires. La réaction de dérivatisation des amides primaires demande donc encore d'être totalement comprise bien que la forme majoritaire ait été identifiée.

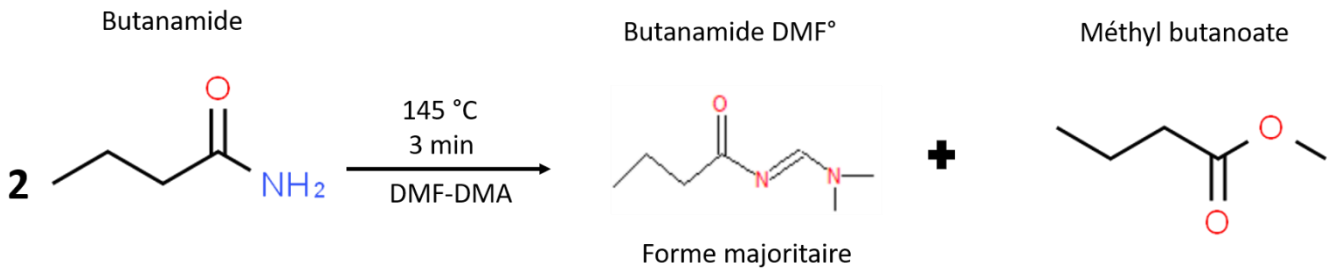


Figure II-9 : Réaction de dérivatisation de la butanamide (amide primaire) avec le DMF-DMA et ses formes dérivatisées résultantes.

Les fragments obtenus sur les spectres de masse sont donc les mêmes que pour les amines primaires en ajoutant la masse correspondant à l'atome d'oxygène de l'amide. Pour tous les amides référencés dans le Tableau II-1, les spectres de masse ont également été ajoutés à la librairie dédiée à cette étude.

Les amides secondaires

Les amides secondaires semblent réagir avec le DMF-DMA de manière différente des amines secondaires. La première observation est que la forme majoritaire observée est l'amide secondaire non dérivatisée témoignant de la faible réactivité entre les amides secondaires et le DMF-DMA (Figure II-10). De plus, contrairement aux amines secondaires, les amides secondaires présentent une forme diméthylformamidinée, ce qui signifie que le groupement N-alkyl est intégralement remplacé par un groupement dimethylformamidine. Ainsi, l'information sur la longueur de la chaîne carbonée de départ de l'amide semble être totalement perdue avec cette forme. Des analyses sur d'autres standards devront être effectuées pour voir si le même phénomène se produit. Enfin, une dernière

forme a été observée qui est la minoritaire correspondant à l'amide avec un carbone additionnel (pour la N-méthylacétamide étudiée ici, la N-méthylpropanamide est observée).

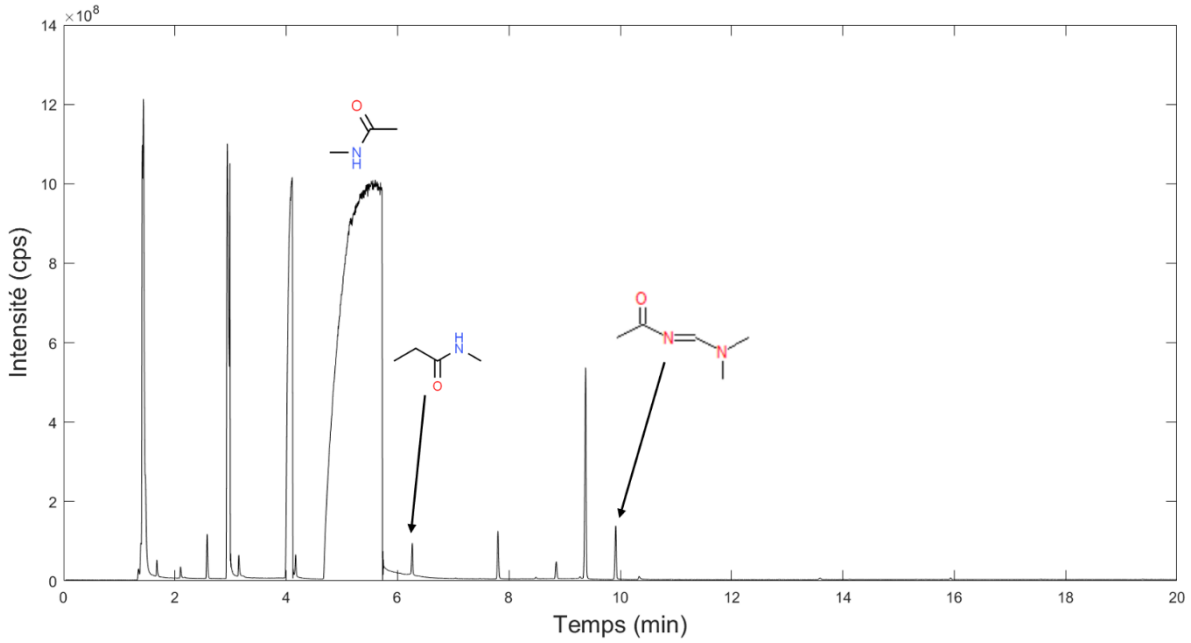


Figure II-10 : Chromatogramme du N-méthylacétamide dérivatisée au DMF-DMA (obtenu en TIC) avec les différentes formes fonctionnalisées observées. Les pics non annotés correspondent à des co-produits du DMF-DMA. Le programme de température débute à 30 °C pour atteindre 300 °C avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}.

Une autre analyse a été réalisée sur la même molécule et des résultats différents ont été obtenus (deux analyses indépendantes avec deux opérateurs différents), à savoir l'absence de la forme avec un carbone supplémentaire de la forme diméthylformamidinée. Le fait que ce résultat ne soit pas répétable pourrait être expliqué par une raison quantitative. La quantité d'amide dérivatisée n'étant pas connu du fait de l'étude qualitative réalisée, il se peut que ces formes dérivatisées dépendent de la concentration initiale. Pour la première analyse (Figure II-10), la forme non dérivatisée sature le détecteur alors que ce n'est pas le cas dans la seconde analyse (Annexe-I), ce qui témoigne d'une quantité d'amide injectée bien différente. Une étude quantitative (non réalisée lors de ce doctorat) pourrait être réalisée dans le futur. De plus, différentes températures et durées de dérivatisation (allant de 80 à 300 °C pour des durées de 30 secondes à 60 minutes) ont été expérimentées pour essayer d'obtenir un meilleur rendement de dérivatisation mais les résultats obtenus sont identiques à ceux correspondant au protocole standard de fonctionnalisation au DMF-DMA.

Cas de l'urée

L'urée est une molécule symétrique de masse moléculaire de 60 g.mol^{-1} possédant deux fonctions amides, toutes les deux primaires (Figure II-11). Ainsi, ces deux fonctions vont pouvoir être dérivatisées au DMF-DMA avec les formes attendues détaillées en section II.3.1. L'urée a été étudiée ici car elle peut être considérée comme un bioindice étant universelle de tous les règnes phylogénétiques en tant que composé produit lors du métabolisme des protéines. De plus, l'urée

pourrait être impliquée dans des processus de chimie prébiotique à la basse de certaines molécules du vivant. Par exemple, des expériences de laboratoire ont montré la synthèse des nucléobases composants l'ARN à partir d'urée contenu dans de la glace d'eau avec des cycles de congélation/décongélation (Menor - Salván *et al.* 2009). C'est une molécule qui peut être formée de manière abiotique et a déjà été identifiée dans la météorite de Murchison (Hayatsu *et al.* 1975) et potentiellement dans le milieu interstellaire (Belloche *et al.* 2019). De plus, l'urée est une molécule qui a déjà été identifiée dans les tholins, comme le produit majoritaire de l'hydrolyse des tholins dans des solutions d'eau et d'ammoniaque ou par acidification avec de l'acide chlorhydrique (Khare *et al.* 1986; Poch et al. 2012; Ramírez *et al.* 2010). Une telle hydrolyse pourrait se produire à la surface de Titan entre les aérosols organiques précipitant et de l'eau liquide pouvant être présente en surface, soit lorsque la couche de glace de surface était plus fine ou soit suite à des impacts (Artemieva and Lunine 2003; O'Brien *et al.* 2005). Ainsi, identifier les formes dérivatisées de l'urée semble être une étape cruciale pour l'interprétation des futures données *in situ* sur Titan.

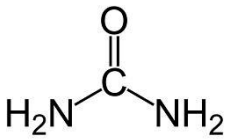


Figure II-11 : Structure moléculaire de l'urée.

La fonctionnalisation au DMF-DMA de l'urée aboutit à une grande variété de formes, allant de la molécule non dérivatisée à la molécule doublement fonctionnalisée en passant par un éventail de dérivatisations partielles. Les molécules dérivatisées décrites sont numérotées sur la Figure II-12. Ainsi, il est possible d'observer la forme doublement diméthylformamidinée (molécule n°6), la forme diméthylée d'une part et diméthylformamidinée de l'autre (n°5), la forme diméthylée sur un groupement NH_2 et l'autre n'ayant pas été modifiée (n°1), la forme diméthylformamidinée sur l'un des groupements -NH2 et l'autre n'ayant pas été dérivatisé (n°4) et également la forme diméthylformamidinée sur un groupement et estérifiée sur l'autre (n°3) (comme cela a été observée pour les amides primaires). Il est également tout à fait envisageable que certaines formes de l'urée n'aient pas été identifiées, tant la dérivatisation de l'urée semble être une somme de plusieurs équilibres avec des sens de réactions favorisés en fonction de la température et de la durée de dérivatisation. De plus, pour certaines formes identifiées, il est difficile d'affirmer avec certitude que leur origine est liée à l'urée et ne peut pas également être due au DMF-DMA qui, suite à sa dérivatisation, donne de l'urée sur les chromatogrammes (Figure II-4).

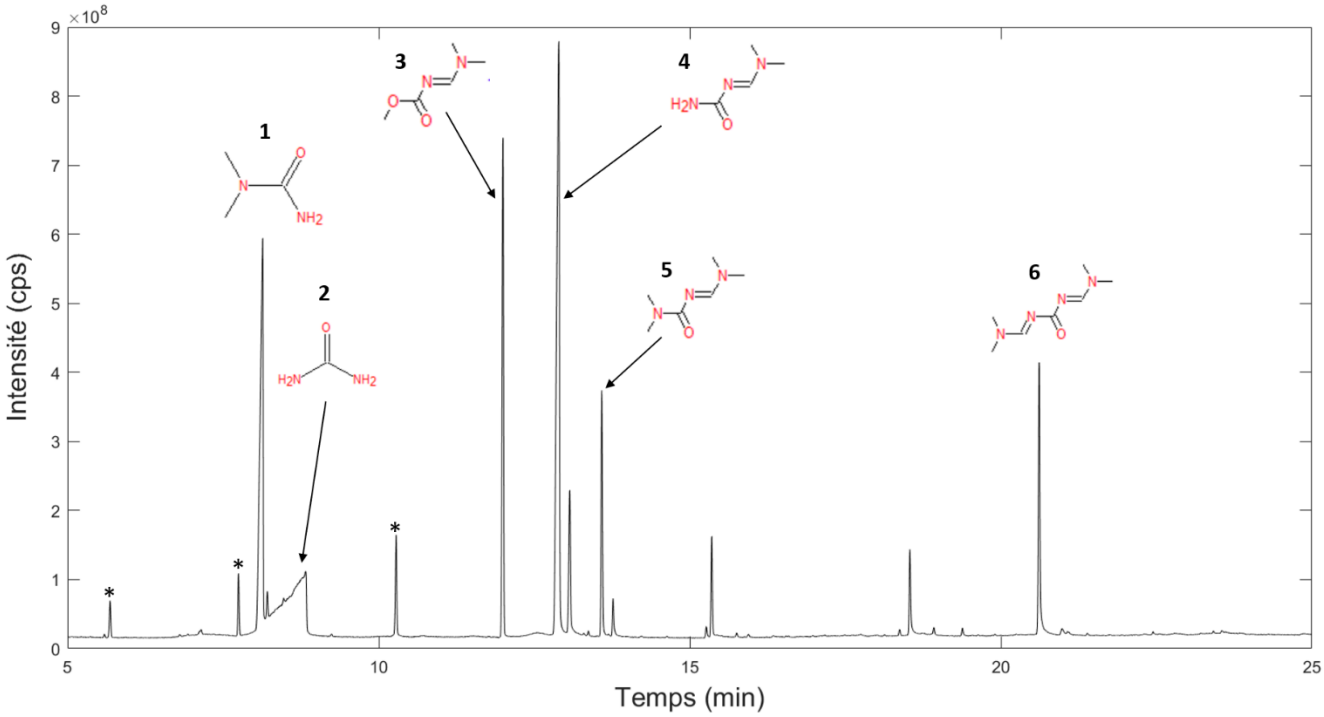


Figure II-12 : Chromatogramme de la dérivatisation au DMF-DMA de l'urée (obtenu en TIC), avec la diversité de formes résultantes observées et identifiées. (*) correspond aux coproduits du DMF-DMA déjà identifiés.

Pour cette molécule, étant donné son importance exobiologique ainsi que sa potentielle présence à la surface de Titan, des futures études approfondies pourront être réalisées, notamment une étude quantitative pour déterminer les limites de détection et de quantification des différentes formes identifiées.

3.2 Etude quantitative de la dérivatisation au DMF-DMA sur les composés azotés.

Sur DraMS, certains échantillons seront traités avec la dérivatisation et d'autres par pyrolyse ou thermochimiolyse. Certaines analyses, effectuées avec ces deux derniers ne permettront pas de détecter les formes dérivatisées, ni les amines pures (ces dernières étant thermolabiles). L'identification ou la confirmation de telles composés pourra donc être effectuée par dérivatisation, en obtenant notamment des temps de rétention différents par rapport à la forme non dérivatisée en cas de coélutions. Une étude quantitative a donc été menée sur des molécules azotées de différentes natures portant des fonctions amines primaires et secondaires dans l'optique de déterminer les limites de détection et de quantification des formes non dérivatisées par rapport aux composés dérivatisés. Ainsi, l'impact de la dérivatisation avec le DMF-DMA sur la détection mais aussi sur la quantification pourra être évalué.

Mode opératoire

Pour réaliser cette étude quantitative, cinq molécules azotées ont été sélectionnées : la pentanamine (amine linéaire primaire), la décylamine (amine linéaire primaire), la N-ethyl-N-propylamine (amine secondaire), l'aniline (molécule aromatique avec une amine primaire) ainsi que la butanamide (amide linéaire primaire). Une analyse quantitative aurait dû également être menée sur

le 1,2,4 triazole mais des problèmes instrumentaux liés à la répétabilité des analyses à empêcher sa réalisation. Les temps de rétention de chacun de ces composés sous leur forme non dérivatisée et dérivatisée sont reportées dans le Tableau II-2. La forme méthylée, lorsque l'amine aliphatique secondaire (N-Ethyl-N-propylamine) est à une concentration de 10^{-2} mol.L^{-1} correspondant à 333 picomoles injectées, n'est pas détectée, son abondance étant en dessous des limites de détection. Par conséquent, la quantification sera seulement faite sur les formes formylée et diméthoxyméthylée.

Tableau II-2 : Temps de rétention (RT) des différentes molécules aminées étudiées dans cette analyse quantitative. Pour les amines secondaires, certaines formes ne sont pas détectées comme explicité dans la section II.3.1.

Composés	RT pure (en min)	RT dérivatisée (en min)
Pentanamine	2,84	7,96
Decanamine	9,95	14,54
N-Ethyl-N-propylamine	2,18	Méthylée : - Diméthoxyméthylée : 6,00 Formylée : 7,52
Aniline	7,01	12,92
1,2,4 Triazole	6,59	Méthylée : 5,06 min Dimethoxyméthylée : 8,46 Formylée : -
Butanamide	6,40	12,20

Pour chacune de ces molécules, l'échelle de concentration s'étend de 1,6.10^{-5} mol.L^{-1} à 10^{-2} mol.L^{-1}, chaque standard étant dilué dans du diméthylformamide. Une telle gamme permet d'obtenir des pics chromatographiques qui s'étalent de la limite de détection à une réponse proche de la saturation du détecteur. Pour chaque concentration étudiée, les solutions ont été injectées à la fois non dérivatisées et dérivatisées. Le protocole de préparation d'échantillon diffère simplement sur la quantité de solution prélevée pour la dérivatisation. D'une part, pour les solutions non dérivatisées, 10 µL des solutions standards (amines et amide dans le DMF) ont été prélevés, auxquels a été ajouté 1 µL d'étalon interne après dérivatisation. Ensuite 0,5 µL sont injectés dans le chromatographe avec un ratio de split de 15. D'autre part, pour les solutions dérivatisées, 5 µL des solutions standards ont été mélangés avec 5 µL de DMF-DMA. La réaction se produit à 145 °C pendant 3 minutes. Après fonctionnalisation, 1 µL d'étalon interne est ajouté. Le volume d'injection et le split utilisés sont les mêmes que pour les solutions non dérivatisées. Les quantités de matière ainsi analysées sont reportées dans le Tableau II-3. Le DMF-DMA étant présent en excès molaire par rapport aux fonctions amines à dérivatiser, on suppose ici un rendement de réaction de 100 %, soit que chaque groupement NH ait été dérivatisé. Cette supposition est appuyée par le fait qu'il n'y a plus de détection de molécules avec des amines ou amide non dérivatisées sur les chromatogrammes.

Tableau II-3 : Concentrations et quantités de matière injectée correspondante étudiées pour l'étude quantitative.

Concentration (mol/L)	Quantité injectée (en mol) solution non dérivatisée	Quantité injectée (en mol) solution dérivatisée
1,00E-02	3,33E-10	1,52E-10
2,00E-03	6,67E-11	3,03E-11
1,00E-03	3,33E-11	1,52E-11
4,00E-04	1,33E-11	6,06E-12
8,00E-05	2,67E-12	1,21E-12
1,60E-05	5,33E-13	2,42E-13

Droites de calibration

Une gamme de six concentrations a été analysée par CPG-SM, dans deux conditions pour chaque solution ; non dérivatisée et dérivatisée. Pour obtenir une courbe de calibration pour chacune des molécules analysées dans les deux conditions étudiées et pour chaque concentration, l'aire des pics chromatographiques de chaque soluté, obtenu en mode TIC, a été intégrée et rapportée à la valeur de l'aire du pic de l'étalon interne (l'intérêt de l'étalon interne est détaillé en section II.2.2). Chaque valeur permettant de tracer la droite de calibration (Figure II-13) ainsi obtenue est représentative de la moyenne de trois réplicats, les barres d'erreurs correspondant à l'écart type de ces réplicats. La linéarité de la réponse chromatographique a été évaluée par l'application d'une régression linéaire pour les différents points reportés sur la Figure II-13 et par le calcul d'un coefficient de corrélation R^2 (Tableau II-4). Tous ces coefficients sont supérieurs à 0,98 hormis pour la forme diméthoxyméthylée de l'amine secondaire, témoignant de la répétabilité et la réponse linéaire du CPG-SM. Une telle corrélation permet donc d'inférer les limites de détection et de quantification pour chacune des molécules à la fois non dérivatisées et dérivatisées.

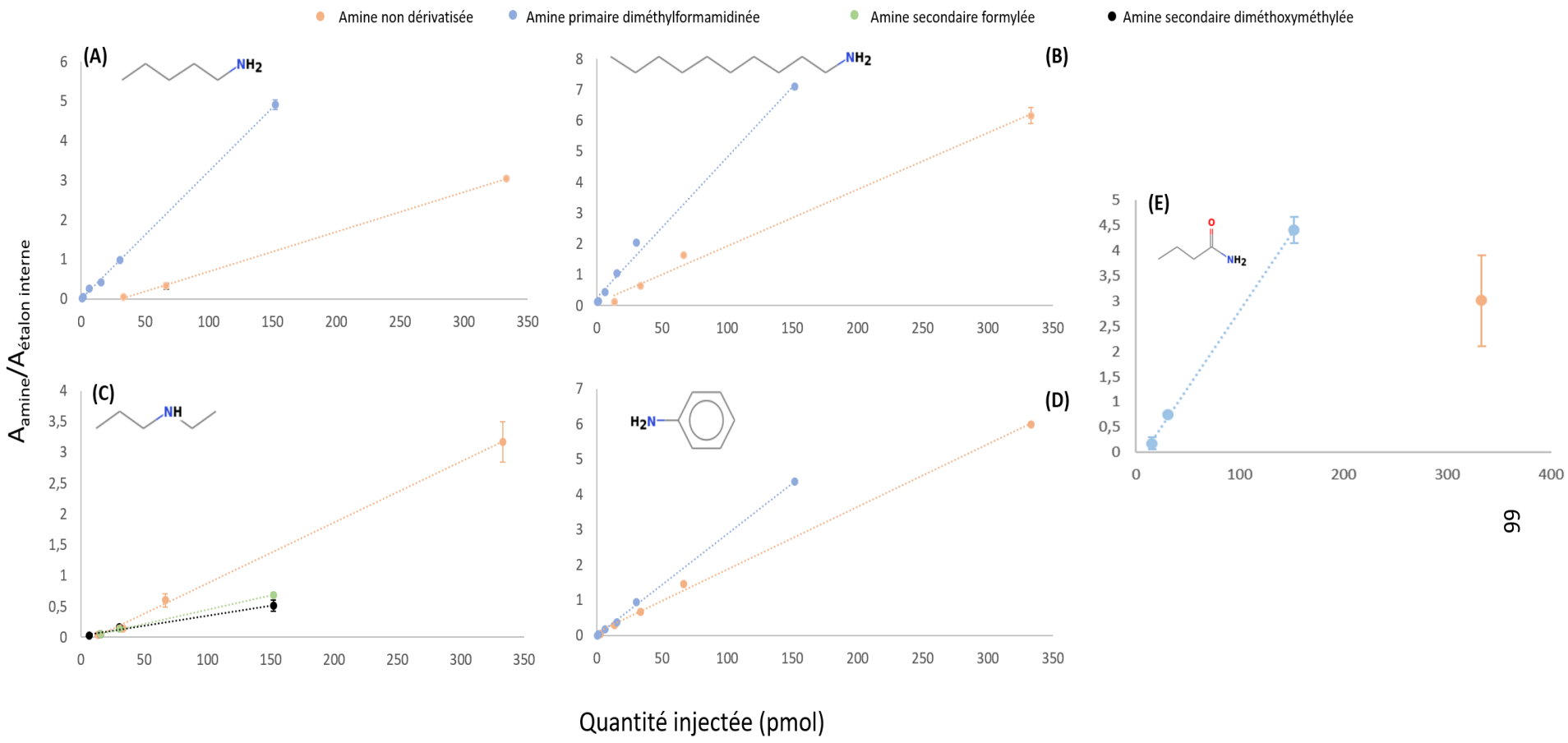


Figure II-13 : Droites de calibration pour les différentes molécules azotées étudiées : (A) Pentanamine, (B) Décanamine, (C) N-éthyl-N-propylamine, (D) Aniline. En ordonnée, l'aire des pics chromatographiques de chaque soluté a été ramenée à l'aire du pic de l'étalon interne, permettant de s'affranchir des incertitudes instrumentales et utilisateur.

Il apparait pour toutes les amines primaires que la réponse chromatographique est plus importante pour les amines dérivatisées que pour celles pures. Par exemple, pour la pentanamine et la décylamine, en injectant 100 pmol, la réponse chromatographique est quatre fois plus importante pour la molécule dérivatisée. Ainsi, la dérivatisation au DMF-DMA permet d'augmenter la réponse chromatographique, résultant en des aires de pics beaucoup plus élevées. Cette observation est également valide pour la molécule aromatique même si l'augmentation de la détection est moindre que pour les amines aliphatiques linéaires. Ensuite, la dérivatisation des amines secondaires, résultant en trois formes dérivatisées (méthylation, formylation et diméthoxylation), ne permet pas d'améliorer la quantité détectée de molécule, étant donné que la quantité de matière initialement injectée est divisée en trois produits de réaction. Enfin, sans dérivatisation, l'amide primaire étudiée ici n'est observée qu'à sa plus haute concentration soit 10^{-2} mol.L^{-1}, le processus de fonctionnalisation semble donc obligatoire pour pouvoir détecter des concentrations plus faibles, ce qui est observé quand la butanamide est dérivatisée en considérant ici la forme diméthylformamidinée. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre pourquoi l'amide primaire non dérivatisée n'est détectée qu'à 10^{-2} mol.L^{-1}, ce qui apparaît être une limite de détection élevée.

Tableau II-4 : Paramètres de la régression linéaire ainsi que le coefficient de corrélation R^2 pour chaque molécule étudiée. [1] Forme diméthoxyméthylée de l'amine secondaire, [2] Forme formylée de l'amine secondaire.

Composés	Régression linéaire non dérivatisée	Coefficient de corrélation R^2
Non dérivatisé		
Pentanamine	y = 0,0101x - 0,312	0,999
Décanamine	y = 0,0184x + 0,0868	0,993
N-éthyl-N-propylamine	y = 0,0099x - 0,1115	0,999
Aniline	y = 0,0178x + 0,0885	0,998
Butanamide	/	/
Dérivatisé		
Pentanamine	y = 0,0322x + 0,0081	0,999
Décanamine	y = 0,0455x + 0,2612	0,994
N-éthyl-N-propylamine	[1] y = 0,0033x + 0,0204	0,985
	[2] y = 0,0046x - 0,008	0,999
Aniline	y = 0,0289x - 0,0097	0,999
Butanamide	y = 0,0306x - 0,2340	0,999

<u>Détermination des limites de détection en TIC.</u>

Les limites de détection et de quantification sont propres à chaque instrument et peuvent également varier dans le temps en fonction de la sensibilité du détecteur. Ces limites sont ici calculées, avec le signal obtenu en TIC, pour pouvoir établir une comparaison entre les valeurs obtenues avec et sans la dérivatisation au DMF-DMA. La limite de détection nommée X_{LOD}, et la limite de quantification, X_{LOQ} sont déterminées en fonction de la concentration du soluté d'intérêt résultant en un signal respectivement égal à :

$$Y_{LOD} = y_B + 6\sigma_B \text{ et } Y_{LOQ} = y_B + 20\ \sigma_B$$

Avec y_B correspondant au signal moyen de dix blancs analytiques et σ_B sa déviation standard. Pour chaque composé, le blanc est considéré comme le signal avoisinant le pic, de même largeur à sa base et où aucune autre molécule n'est détectée. À partir de cela, les limites de détection et de quantification sont calculées à partir des équations suivantes :

$$X_{LOD} = 6\ \sigma_B/\alpha \text{ et } X_{LOQ} = 20\ \sigma_B/\alpha$$

Avec α la pente des droites de calibration, pour chaque composé, déterminée dans la régression linéaire. Hormis ces valeurs que l'on peut considérer comme théoriques, il est également possible d'obtenir des valeurs de limites de détection expérimentales qui correspondent à la quantité de matière injectée pour laquelle il n'y a plus de détection. Les valeurs de limites de détection et de quantification obtenues sont reportées dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 Limites de détection et de quantification théoriques ainsi que la limite de détection expérimentale, obtenues à partir des données TIC, pour chacune des amines étudiées dans les deux conditions d'analyse (avec et sans dérivatisation).

	Pure			**Dérivatisée**					
Amines	LOD (pmol)	LOQ (pmol)	LOD exp (pmol)	LOD (pmol)		LOQ(pmol)		LOD exp (pmol)	
Pentylamine	0,06	0,20	33,3	0,02		0,06		< 0,24	
Decylamine	0,19	0,65	13,3	0,04		0,14		< 0,24	
N-ethyl-N-propylamine	0,14	0,47	13,3	Dimethoxy 0,27	Formyl 0,19	Dimethoxy 0,89	Formyl 0,64	Dimethoxy 6,06	Formyl 6,06
Aniline	0,11	0,38	2,67	0,01		0,04		< 0,24	
Butanamide			333	0,22		0,74		15,2	

Les limites de détection et de quantification pour les molécules non dérivatisées sont de l'ordre du dixième de picomoles alors que lorsque ces dernières sont dérivatisées avec le DMF-DMA, les limites atteignent le centième de picomoles, ce qui augmente la sensibilité d'un ordre de grandeur. Ces différences de détection sont dues à plusieurs paramètres chromatographiques qui sont améliorés par la dérivatisation. Tout d'abord, la dérivatisation abaisse la polarité des molécules, ce qui aboutit à l'amélioration de la forme des pics en limitant le phénomène de tailing habituellement observé pour des composés polaires. De plus, la section efficace d'ionisation (probabilité d'ionisation d'une molécule

avec le cortège électronique provenant de la source du SM) est plus élevée car la molécule dérivatisée est plus lourde que la molécule pure. L'ionisation sera donc plus efficace, menant à une meilleure détection. Pour l'amine secondaire et l'amide étudiés, les valeurs des limites de détection et de quantification avec la dérivatisation sont de l'ordre du dixième de picomoles voire du picomole. Comme explicité précédemment, la dérivatisation aboutissant à trois formes fonctionnalisées pour les amines secondaires, les limites de détection et de quantification ne sont pas améliorées lorsque ce processus est appliqué. Ces limites de détection et de quantification pourront être comparées au prototype de l'instrument DraMS, permettant d'évaluer les différences de performances entre un instrument commercial et le modèle de vol.

3.3 Chiralité et séparation énantiomérique des composés azotés dérivatisés.

La chiralité est une propriété des molécules recherchée en exobiologie qui peut donner des indications sur l'origine (biologique ou abiotique) des composés détectés sur les corps planétaires du système solaire. En effet, dans les systèmes biologiques terrestres, un seul des deux énantiomères (L ou D) d'une molécule chirale est préférentiellement sélectionné. C'est ce qui est appelé le déséquilibre énantiomérique. Par exemple, les acides aminés retrouvés au sein des protéines sont tous de la forme L alors que les sucres présents dans les cellules sont tous sous la forme D. C'est l'homochiralité du vivant. Ainsi, la présence d'un excès énantiomérique, ou d'une homochiralité, de ces molécules peut être considéré comme une potentielle biosignature. Cette recherche de déséquilibre énantiomérique sur d'autres corps planétaires justifie le fait qu'une colonne chromatographique pour la séparation chirale (β-Chirasil-Dex) soit intégrée à bord de l'instrument DraMS. Dans cette étude, la séparation énantiomérique de molécules chirales portant des fonctions amines, potentiellement à la fois précurseurs mais aussi produits de dégradation d'acides aminés, a été étudiée pour deux amines primaires aliphatiques linéaires (2-aminopentane 2-aminoheptane) et pour un amide primaire (2-ethyl-3-methylpentamide) avec et sans dérivatisation (Figure II-14 et II-15). Le mode opératoire est présenté dans la section II.2.2.

La résolution chromatographique peut être calculée entre deux pics sur un chromatogramme et permet donc d'évaluer l'efficacité de la séparation énantiomérique pour une molécule donnée. Cette résolution dépend de deux paramètres que sont la distance entre le sommet des deux pics (facteur thermodynamique) et la largeur de chacun des pics (facteur cinétique). La résolution, dépendante des temps de rétention et de l'efficacité de la colonne (détaillée en section III.2.3), est calculée grâce à l'équation suivante :

$$R_S = \frac{t_r^b - t_r^a}{w_A + w_b}$$

Avec t_r^b et t_r^a les temps de rétention respectifs des deux énantiomères élués et w_A et w_B les largeurs à mi-hauteur des pics correspondants. Les valeurs de résolution ont donc été calculées pour les deux paires d'énantiomères étudiées et sont reportées dans le Tableau II-6. Des valeurs de résolution supérieures à 1 voire 1,5 sont nécessaires pour permettre une intégration des pics fiable et donc une quantification précise. De telles valeurs de résolution sont donc nécessaires pour l'évaluation d'un excès énantiomérique.

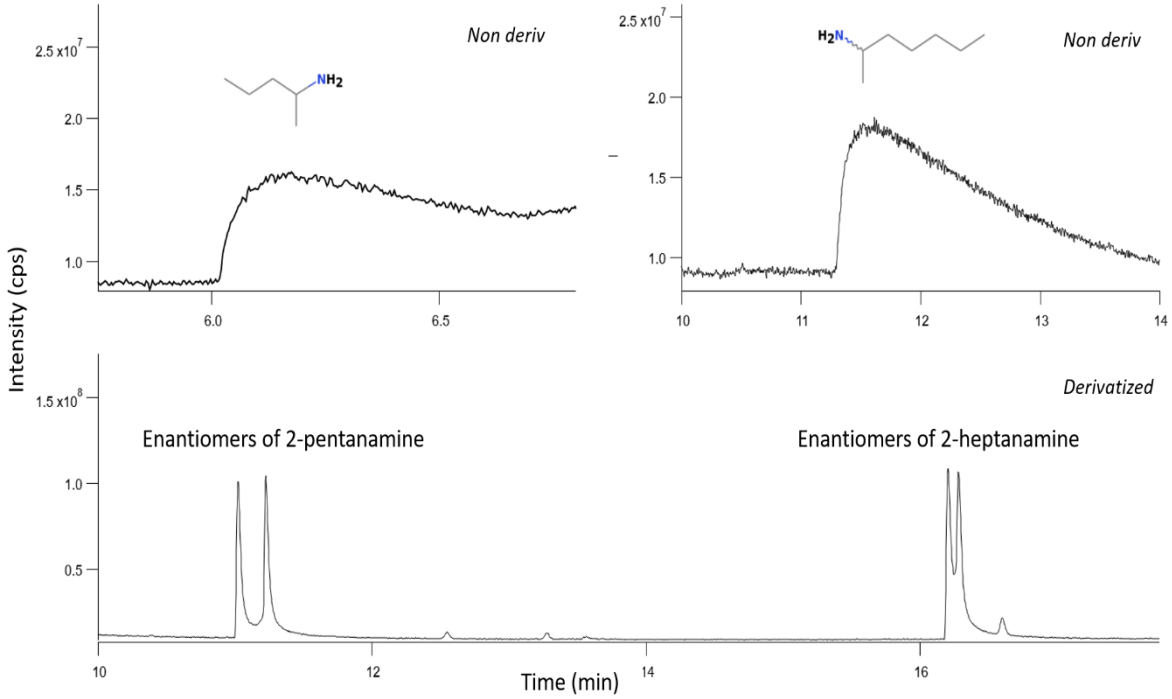


Figure II-14 : Chromatogrammes (Total Ion current) des amines primaires chirales non dérivatisées (haut) et dérivatisées (bas) avec le DMF-DMA, puis séparées sur une colonne Chirasil-Dex. Le débit en gaz vecteur est de 1 mL.min^{-1} et le split utilisé est de 50 mL.min^{-1}. Le programme de température du four du chromatographe est détaillé en section II.2.1.

Les résultats obtenus avec et sans dérivatisation sur les amines chirales montrent des différences flagrantes. Lorsque les composés ne sont pas dérivatisés, aux concentrations injectées, sur la Chirasil-Dex, les pics chromatographiques sont très étalés (pas de forme gaussienne, étalement sur plusieurs minutes). En effet, la Chirasil-Dex possède une phase stationnaire apolaire, contrairement à la RTX-20 qui possède une phase dite de polarité intermédiaire. La polarité des composés non dérivatisés entraîne donc un fort phénomène de tailing, résultant en des pics non gaussien avec une forte trainée. Ces molécules ont été analysées avec la RTX-20 et donne des pics beaucoup plus satisfaisants en termes de symétrie et de tailing. Ainsi, il n'est pas possible de résoudre les deux énantiomères présents pour ces deux composés non dérivatisés avec la colonne chirale. En revanche, en appliquant la dérivatisation au DMF-DMA et donc en abaissant la polarité des deux composés, les isomères optiques de chaque molécule sont séparés et le signal est proche d'un retour à la ligne de base pour le 2-aminopentane. En effet, les valeurs de résolution (Tableau II-6) montrent pour le 2-aminopentane que les deux pics sont parfaitement séparés alors que pour le 2-aminoheptane, le retour à la ligne de base du signal n'est pas atteint, avec une valeur de résolution proche de 1. Pour améliorer cette valeur de résolution, il est possible de faire varier à la fois la rampe de température du four du chromatographe mais également la valeur de débit du gaz vecteur.

La propriété du DMF-DMA en lien avec la conservation des centres chiraux des molécules est donc confirmée. De plus, ce résultat témoigne du fait que la fonctionnalisation au DMF-DMA est

indispensable pour séparer les énantiomères d'amines chirales pour l'analyse *in situ* qui sera réalisée par *Dragonfly*.

Tableau II-6 : Résolutions chromatographiques calculées entre les paires d'énantiomères des deux amines chirales analysées lorsque celles-ci sont dérivatisées. Les valeurs de résolution doivent être supérieures à 1 pour permettre une bonne intégration des pics chromatographiques et pouvoir quantifier un potentiel excès énantiomérique, particulièrement intéressant en exobiologie.

Amines	Résolution chromatographique
2-aminopentane	2,76
2-aminoheptane	0,96

La séparation des énantiomères d'une amide primaire chirale a également été étudiée (Figure II-15). Contrairement aux amines primaires analysées précédemment, l'amide primaire présente des pics qui ne sont pas des traînées sur plusieurs minutes. De plus, les énantiomères sont partiellement séparés lorsque l'amide n'est pas dérivatisée et presque coélués avec la dérivatisation au DMF-DMA. Une autre rampe de température a été testée (*i.e.* 5°C.min^{-1}) pour évaluer l'impact sur la séparation énantiomérique. La séparation des énantiomères quand l'amide n'est pas dérivatisée n'est que partielle et n'est pas améliorée avec la dérivatisation au DMF-DMA. Cette séparation énantiomérique ne permet donc pas une quantification correcte de chaque isomère optique. La dérivatisation associée à une analyse sur une colonne chirale ne permet donc pas l'amélioration de la séparation énantiomérique pour cet amide primaire.

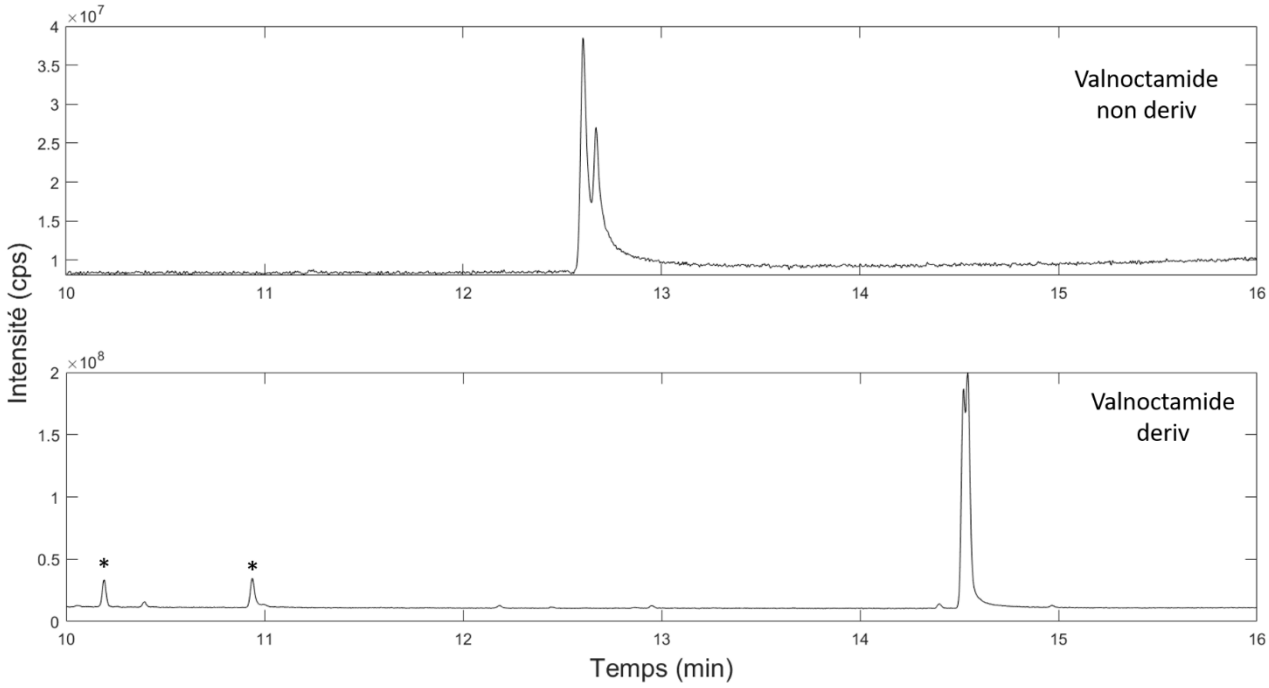


Figure II-15 : Chromatogrammes (Total Ion current) du 2-ethyl-3-methylpentamide (amide primaire) non dérivatisé (haut) et dérivatisé (bas) avec le DMF-DMA, puis séparées sur une colonne Chirasil-Dex. (*) Co-produits du DMF-DMA. Le débit en gaz vecteur est de 1 mL.min^{-1} et le split utilisé est de 50 mL.min^{-1}. Le programme de température du four du chromatographe est détaillé en section II.2.1 et la rampe utilisée ici est de 10 °C.min^{-1}.

Après avoir obtenu de tels résultats, des études futures devront être menées sur d'autres standards chimiques portant des atomes d'azote (*e.g.* amide secondaire) pour évaluer les capacités de la CPG-SM associée avec la dérivatisation au DMF-DMA à séparer les énantiomères de ces différentes familles chimiques. De telles études apparaissent comme indispensables pour préparer la future analyse *in situ* de la composition des échantillons qui seront prélevés à la surface de Titan.

3.4 Dérivatisation de biomolécules : application aux dipeptides et aux nucléotides.

Au-delà des molécules azotées relativement simples étudiées plus tôt dans ce chapitre, la dérivatisation au DMF-DMA peut également permettre la détection de composés plus complexes telles que des biomolécules comme les peptides ou les nucléotides qui ne sont pas détectables sans dérivatisation en CPG-SM. Les peptides, en tant que polymères d'acides aminés, représentent un degré de complexité supplémentaire par rapport à ces derniers qui sont usuellement recherchés en exobiologie et un pas vers les protéines. Les polynucléotides, ou nucléotides simples sont à la base de la structure de l'ADN, molécule universelle, support de l'information génétique, et biosignature par excellence représente également une augmentation de la complexité moléculaire par rapport aux nucléobases qui les composent. L'analyse et la détection de tels composés pourraient donc apporter des indices sur la mise en place d'une potentielle chimie prébiotique ou de la présence de vie passée ou présente.

L'objectif analytique de cette partie est d'identifier les formes dérivatisées avec le DMF-DMA des biomolécules étudiées, d'évaluer si à partir d'un polymère il est possible d'obtenir les monomères correspondants (*e.g.* les acides aminés constituants les peptides, ou les nucléobases constituant les acides nucléiques) dérivatisés ou non, détectables en dérivatisation-CPG-SM. Par exemple, pour les peptides, il s'agit de comprendre si la dérivatisation permet le clivage de la liaison peptidique et si tel est le cas de connaître la cinétique entre clivage de la liaison et dérivatisation des acides aminés. Étant une étude préliminaire, les molécules sélectionnées sont des polymères simples par rapport à des polymères complexes comme les protéines ou les polynucléotides. Les résultats obtenus pourront être transposés aux polymères complexes, leur structure résultant en l'assemblage des molécules étudiées ici.

Les dipeptides.

La CPG-SM étant limitée pour détecter des composés réfractaires (de haute masses molaires et/ou forte polarité), l'étude préliminaire menée ici s'est limitée à l'analyse qualitative de dipeptides simples après leur fonctionnalisation au DMF-DMA. Le choix a donc été orienté sur des dipeptides composés de glycine, d'alanine et de leucine (Tableau II-1).

Le mode opératoire utilisé pour ces expériences est détaillé en section II.2.2. La dérivatisation au DMF-DMA du mélange des quatre dipeptides a permis d'obtenir le chromatogramme présenté en Figure II-16.

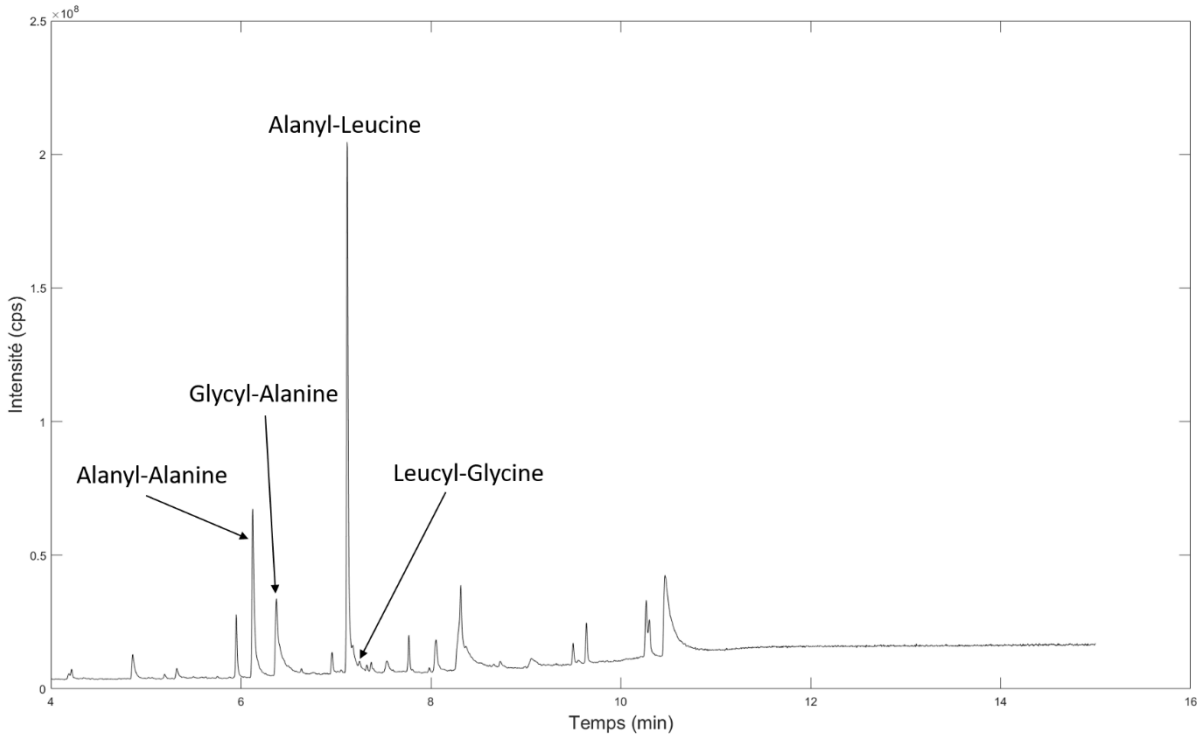


Figure II-16 : Chromatogramme (TIC) du mélange des 4 dipeptides (alanyl-alanine,glycyl-glycine, alanyl-leucine e tleucyl-glycine) étudiés après leur fonctionnalisation au DMF-DMA. Les 4 dipeptides identifiés sont observés sous leur formes dérivatisées attendues, à savoir une diméthylformamidination sur l'amine terminale et une méthylation sur le carboxyle terminal. L'amine secondaire impliquée dans la liaison peptidique n'est pas dérivatisée pour ces formes-là. Les pics n'ayant pas d'annotation n'ont pas pu être identifiés. Programme de température : 50 °C à 300 °C avec une rampe de température de 15 °C.min^{-1}. L'analyse a été effectuée sur une RTX-5. Le volume d'injection était de 0,5 µL et le ratio de split était de 20 mL.min^{-1}.

La fonctionnalisation au DMF-DMA des dipeptides donne un chromatogramme avec de nombreux pics. Tout d'abord, les formes dérivatisées attendues à savoir la diméthylformamidination sur l'extrémité -NH_2 du premier acide aminé et la méthylation sur l'extrémité -COOH du second acide aminé sont observées avec des intensités différentes selon les dipeptides alors que ces derniers sont dans un mélange équimolaire. Cela signifie que le rendement de dérivatisation n'est pas identique d'un dipeptide à l'autre, potentiellement explicable par l'absence ou la présence de chaîne latérale sur chacun des acides aminés, modifiant la répartition électronique au sein de la molécule et donc la nucléophilie des peptides. Par exemple, la présence de chaîne latérale sur l'alanine et la leucine joue sur la répartition des électrons au sein du dipeptide contrairement à la glycine qui ne possède pas de chaîne latérale. Il faudrait élargie la gamme de dipeptides étudiés pour observer des différences selon les chaînes latérales des acides aminés (chaîne carbonée apolaire, chaîne portant des fonctions carboxyles ou amines, etc). Les formes fonctionnalisées identifiées ont pu être ajoutées dans une librairie qui servira pour les futures identifications mais aussi pour l'interprétation des futures données *in situ*, si de tels composés sont présents.

Les dipeptides contiennent également une amine secondaire qui est engagée dans la liaison peptidique. Comme vu précédemment, les amines secondaires peuvent être fonctionnalisées résultant en trois formes différentes, possédant chacune une signature spectrale caractéristique. Ces formes fonctionnalisées ont été recherchées en extrayant les masses correspondantes aux fragments

caractéristiques. Les molécules complètement fonctionnalisées (amine primaire, acide carboxylique et amine secondaire) ainsi que les formes intermédiaires (avec des fonctions brutes et d'autres dérivatisées) ont donc été recherchées. Cependant, aucune de ces molécules n'ont pu être identifiées sur le chromatogramme. En effet, la répartition électronique au sein des peptides étant différente que dans les molécules étudiées dans la section 3.1 du fait de la présence d'autres fonctions chimiques, la fonctionnalisation de l'amine secondaire peut donner des formes différentes que celles identifiées précédemment.

En outre, il apparaît que de nombreuses autres formes qui n'ont pas pu être identifiées sont également détectées. Les hypothèses quant à leur formation sont multiples : (i) la réaction de dérivatisation avec le DMF-DMA ayant un rendement très faible pour les amides secondaires, d'après les résultats obtenus dans cette étude (section II.3.1.5), aucune forme dérivatisée n'est observée. (ii) La température utilisée pour la dérivatisation provoque une cyclisation du dipeptide dont la molécule résultante est encore à identifier. Il apparaît néanmoins, que pour plusieurs dipeptides étudiés, nombre des molécules détectées, mais non identifiées, ont des signatures spectrales identiques d'un dipeptide à l'autre mais les fragments n'ont pas encore pu être encore identifiés. Ainsi, le schéma de fragmentation attendu avec la dérivatisation au DMF-DMA n'est pas celui attendu, le spectre de masse n'est donc pas évident à prédire. Une étude plus approfondie sur l'analyse des masses est donc nécessaire, avec un tandem de spectromètre de masse par exemple (SM-SM).

Ce résultat préliminaire ouvre donc sur de nombreuses perspectives. La première d'entre elles est de parvenir à trouver la structure moléculaire des formes dérivatisées qui n'ont pas pu être identifiées, permettant ainsi l'enrichissement des bases de données déjà créées. En parallèle de cela, d'autres dipeptides, voire des peptides plus complexes (avec un nombre d'acides aminés plus important) devront aussi être dérivatisés pour connaître les formes fonctionnalisées et essayer de faire ressortir des signatures spectrales caractéristiques comme cela a été le cas pour les fonctions amines primaires et secondaires.

Dans un second temps, une étude quantitative pourra être menée pour déterminer les limites de détection et de quantification de plusieurs dipeptides. Ces limites pourront être comparées avec celles d'autres méthodes séparatives, et il sera ainsi possible d'évaluer les capacités de la dérivatisation-CPG-SM pour la détection de telles biomolécules sur d'autres corps planétaires.

Ensuite, une optimisation de la température et de la durée de dérivatisation pourra aussi être envisager pour évaluer les capacités de la dérivatisation à cliver la liaison peptidique, notamment au sein de peptides complexes avec plusieurs acides aminés, aboutissant à l'obtention de fragments plus volatiles, potentiellement analysables par CPG-SM. En effet, sur la Figure-14, les acides aminés pouvant résulter du clivage de la liaison peptidique ne sont pas identifiés. Il se peut que les acides aminés soient présents, mais non dérivatisés donc non détectables avec la CPG-SM. Il serait alors intéressant d'étudier la cinétique entre clivage de la liaison peptidique et dérivatisation des acides aminés résultants. Ainsi, si le clivage intervient avant la dérivatisation, les acides aminés pourraient être détecter.

Enfin, une étude sur la séparation chirale devra être menée pour déterminer s'il est envisageable de séparer les quatre énantiomères d'un dipeptide donné et de pouvoir quantifier un potentiel déséquilibre énantiomérique sur d'autres corps planétaires, s'il existe.

Les nucléotides et leurs monomères : exemple de l'adénosine triphosphate, l'adénosine et l'adénine

La dérivatisation au DMF-DMA des nucléobases (adénine et uracile), des nucléosides correspondants (adénosine et désoxy-uridine) et des désoxy-nucléotides (ATP) a été étudiée. En guise d'exemple sont présentés les résultats obtenus sur l'adénine, l'adénosine et l'ATP (Figure II-17 et Annexe II-3). Les résultats pour l'uracile et l'uridine sont présentés en Annexe II-2.

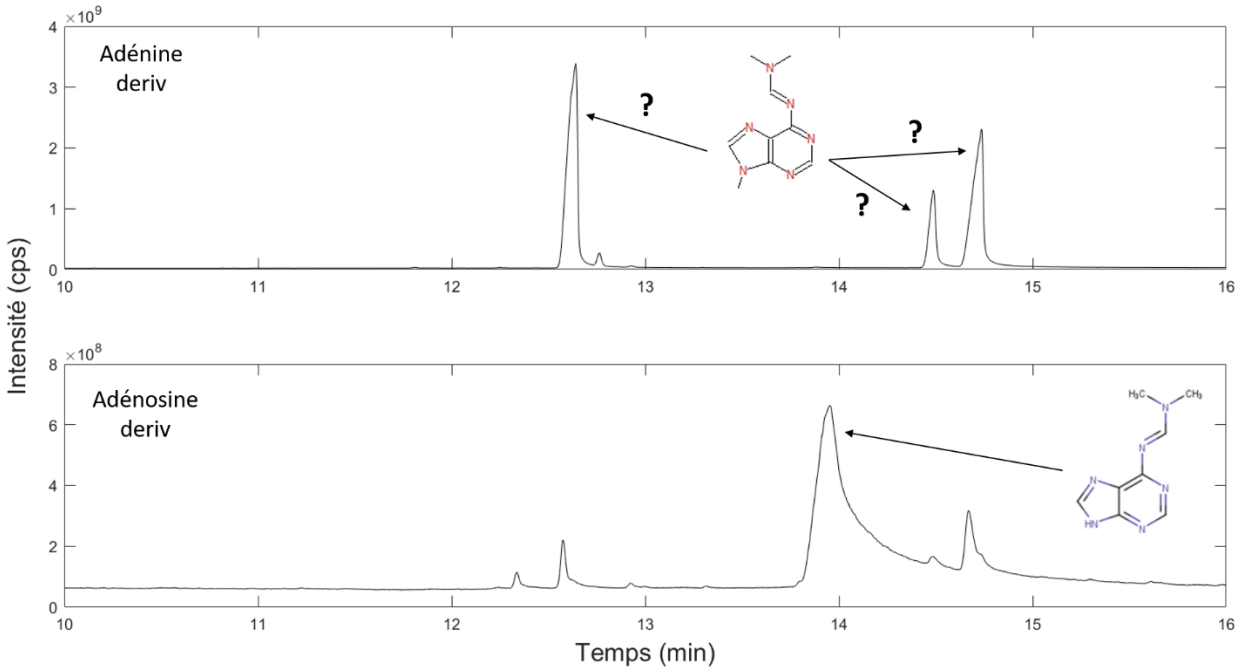


Figure II-17 : Chromatogrammes (TIC) de l'adénine (haut) et de l'adénosine (bas) dérivatisée au DMF-DMA. Les 3 pics désignés par une flèche pour l'adénine ont un pic moléculaire à 204 u avec des schémas de fragmentation différents. L'un de ces 3 pics correspond à l'adénine méthylée et diméthylformamidinée et les autres sont directement liés à cette structure moléculaire potentiellement avec des cyclisations au sein de la molécule. L'observation de l'adénosine diméhtylformamidinée et de l'amine secondaire libre témoigne que le clivage de liaison osidique entre le sucre du nucléoside et la nucléobase a lieu avant la dérivatisation.

La dérivatisation de l'adénine donne un chromatogramme avec trois pics résultant de la réaction avec le DMF-DMA (Figure II-17). L'adénine méthylée sur son amine secondaire et diméthylformamidinée sur son amine primaire est retrouvée. La même observation a été faite sur la l'uracile. De plus, pour l'adénine, deux autres pics sont également détectés qui présentent le même pic moléculaire que l'adénine dérivatisée avec une masse M = 204 u mais des schémas de fragmentation différents. Ces composés n'ont pas encore pu être identifiés mais une cyclisation au sein même de l'adénine dérivatisée pourrait intervenir, expliquant de telles détections.

Pour l'adénosine (Figure II-17), la dérivatisation au DMF-DMA ne montre pas le désoxynucléoside intégral dérivatisé. Toutefois, il est possible d'identifier l'adénine avec son amine primaire qui est diméthylformamidinée et son amine secondaire qui n'a pas été modifiée. Cette amine secondaire est engagée dans la liaison osidique avec le sucre de l'adénosine. Le fait que celle-ci ne soit

pas modifiée avec la dérivatisation signifie, d'un point de vue cinétique, que le clivage de liaison osidique, probablement dû à la température de dérivatisation, intervient avant la réaction de dérivatisation. Par ailleurs, le désoxyribose qui est le sucre au sein de l'adénosine n'est pas détectée lorsque cette dernière est dérivatisée. Concernant l'uridine (Annexe II-2), les résultats sont identiques sauf qu'il est possible d'identifier l'uridine complète dérivatisée (sur les fonctions amines de l'uracile, les groupements hydroxyles du sucre n'ont pas été modifiés).

Enfin, la dérivatisation de l'ATP (Annexe II-3) donne de nombreux pics parmi lesquels seuls deux peuvent être identifiés : l'adénine non dérivatisée et la kinétine (qui provient probablement de la pyrolyse du nucléotide avec la température de dérivatisation). Aucune molécule dérivatisée n'a pu être identifiée, ne pouvant confirmer l'efficience de la réaction de dérivatisation avec un tel composé.

La dérivatisation au DMF-DMA semble fonctionner sur les nucléobases et sur les nucléosides mais aucune preuve n'a pu être apportée quant à la dérivatisation des nucléotides. Comme pour les peptides, de futurs travaux sont nécessaires pour approfondir ces résultats, en élargissant le nombre de molécules à dérivatiser notamment avec la thymine et la guanine ainsi que leurs nucléosides et nucléotides correspondants. De plus, l'optimisation du protocole de dérivatisation (durée et température de réaction) semble être une étape cruciale pour parvenir à dérivatiser de tels composés. Enfin, la séparation énantiomérique des nucléosides pourra également être étudiée étant donné que le ribose est chiral et qu'une seule des deux formes est sélectionnée par le vivant (énantiomère D). Ainsi, comme pour les acides aminés, si la séparation des deux énantiomères des nucléosides est achevée il sera possible de quantifier un excès énantiomérique, s'il existe, sur d'autres corps planétaires.

3.5 Dérivatisation d'analogues synthétiques des aérosols de l'atmosphère de Titan en préparation à l'analyse in situ.

Les tholins produits au sein du réacteur PAMPRE au LATMOS ont été dérivatisés au DMF-DMA. Le protocole pour cette dérivatisation est détaillé en section II.2.4. L'analyse des tholins dérivatisés s'est effectuée 10 jours après leur récolte. Ce laps de temps suffit pour que ces analogues synthétiques soient oxydés du fait de la présence d'oxygène et d'eau de manière ubiquitaire dans l'atmosphère terrestre (Cable *et al.* 2012). Ainsi, parmi les molécules composant les tholins, il est tout à fait envisageable que des molécules oxygénées soient retrouvées mais que celles-ci n'entrent pas dans la composition initiale des tholins étant donné l'absence d'oxygène au sein du réacteur PAMPRE (modulo les microfuites indissociables de ce type de réacteur). De plus, il faudrait connaître les effets potentiels de la température lors de la production des tholins sur la formation de certaines fonctions chimiques. En effet, Cable *et al.,* (2014) a détecté le plus grand nombre d'amines parmi toutes les études effectuées sur ces analogues, en analysant des tholins produits à 170 K. Dans notre cas, les tholins ont été produits à température ambiante. Les amines les plus volatiles, ainsi que d'autres composés des tholins, ont donc pu être perdu avec ces conditions thermiques.

La dérivatisation au DMF-DMA des tholins est présentée sur la Figure II-18 et les molécules qui ont pu être identifiées strictement sont recensées dans le Tableau II-7.

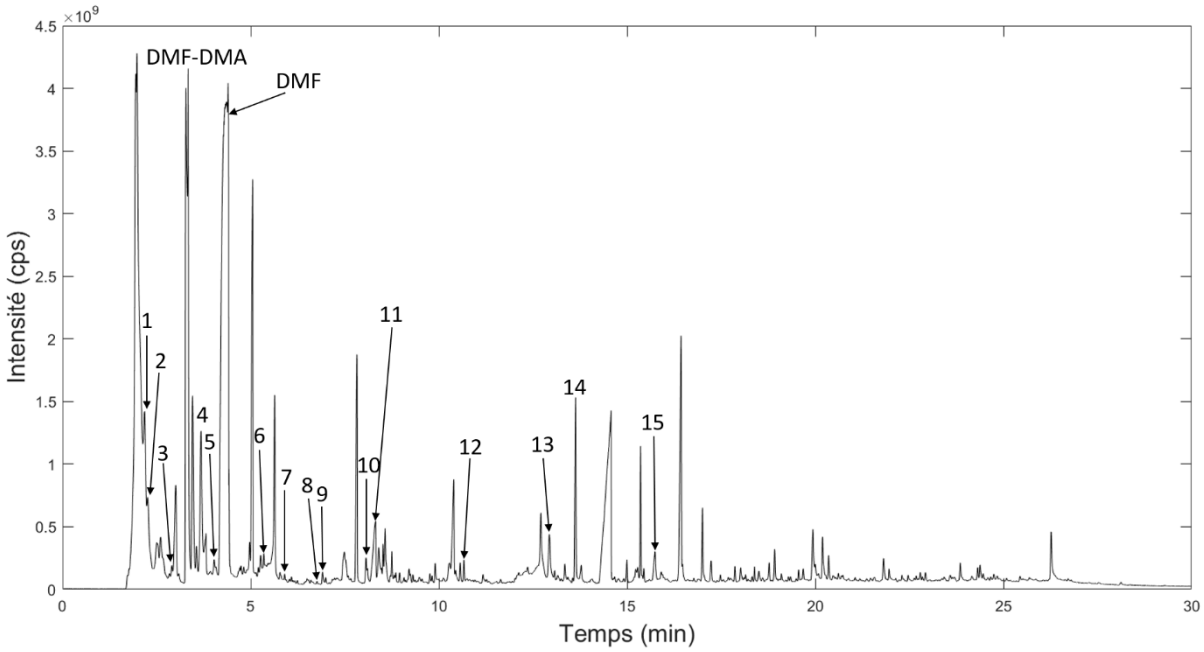


Figure II-18 : Chromatogramme de la dérivatisation d'un milligramme de tholins (signal obtenu en TIC). La dérivatisation s'est déroulée à 145 °C pendant 3 minutes et la chambre de pyrolyse a ensuite été chauffée à 300 °C au moment où les molécules sont envoyées vers le piège. Tous les pics n'ayant pas d'annotation sont des molécules qui n'ont pas pu être identifiées. La légende correspondant au numéro sur le chromatogramme est reportée dans le Tableau II-7. Les co-produits provenant du DMF-DMA n'ont pas été renseignés sur le chromatogramme par souci de lisibilité.

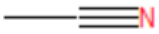
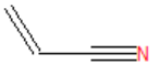
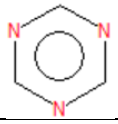
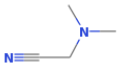
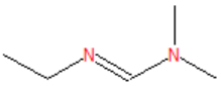
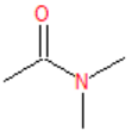
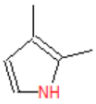
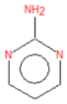
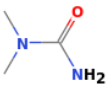
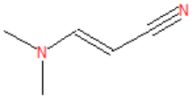
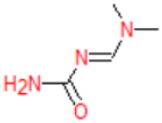
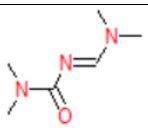
Il existe très peu d'études sur la dérivatisation au DMF-DMA des tholins bruts sans traitement des analogues avant leur analyse. Gautier *et al.,* (2014), après dissolution des tholins (produits dans le réacteur PAMPRE) dans du méthanol et leur dérivatisation au DMF-DMA, a pu identifier 10 composés en CPG-SM, dont des molécules contenant des atomes d'azotes parmi lesquelles deux amines sont retrouvées. Toutefois, les tholins produits pour cette étude ont été piégés dans un piège à froid, permettant la rétention des molécules volatiles, ce qui n'a pas été la configuration de production pour les tholins utilisés ici. Cette différence de protocole de production des aérosols pourrait potentiellement expliquer les différences de détection entre les deux études. D'autres études ont également employé la dérivatisation au MTBSTFA, mais ici aussi les tholins avaient soit été trempés dans des solutions d'eau/ammoniaque en différentes proportions (Ramírez *et al.* 2010),soit avait été produits avec une certaine proportion de monoxyde de carbone dans le mélange gazeux initial (Hörst *et al.* 2012). La comparaison des compositions moléculaires avec de telles études n'est donc pas possible. Enfin, la pyrolyse des tholins couplée à la CPG-SM a été étudiée et a permis d'identifier de nombreuses molécules comme des cycles azotés, des alcanes aliphatiques et aromatiques, des nitriles aliphatiques (Coll *et al.* 2013; McGuigan *et al.* 2006; Morisson *et al.* 2016; Moulay *et al.* 2023). Même si les températures de pyrolyse entre les résultats présentés ici et les études citées, il est possible d'inférer les molécules qui ont été produites par la pyrolyse liée à la température de dérivatisation.

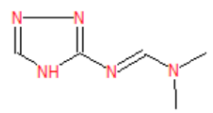
La dérivatisation des tholins avec le DMF-DMA révèle un chromatogramme chargé (Figure II-17) avec de nombreux pics distribués sur une large gamme de temps de rétention (de 1 minutes à 28 minutes). La dérivatisation permet donc d'extraire de très nombreuses molécules organiques à partir des analogues synthétiques des aérosols de l'atmosphère de Titan. Toutefois, les base de données NIST et Wiley, qui sont utilisées pour l'identification des composés à partir des spectres de masse obtenus, sont très pauvres en spectre de masse de molécules dérivatisées au DMF-DMA. Les quelques molécules et leurs formes dérivatisées correspondantes qui ont pu constituer un début de librairie d'identification ne sont pas suffisantes pour identifier la majorité des structures moléculaires présentes dans les tholins dérivatisés. De plus, après analyse de tous les pics, il n'est retrouvé que pour certains d'entre eux des signatures spectrales caractéristiques de la dérivatisation au DMF-DMA telles que celles propres à la diméthylformamidination pour les amines primaires (voir section II.3.1). Les formes dérivatisées obtenues (Tableau-7) ici correspondent aux formes identifiées précédemment, c'est-à-dire ayant potentiellement subi une réaction de diméthylformamidination ou de diméthylation. Les tholins contenant à la fois des cycles aromatiques et des longues chaînes carbonées, il est tout à fait envisageable que d'autres formes dérivatisées encore non découvertes à ce jour puissent exister avec le DMF-DMA. Dépendante notamment de la répartition électronique au sein d'une molécule, la dérivatisation au DMF-DMA peut fonctionnaliser des groupements méthyles en leur substituant un atome d'hydrogène (Gümüş and Koca 2020). Ainsi, les tholins contenant des molécules aromatiques pourraient subir de telles réactions, bien que celles-ci semblent apparaître avec des protocoles de dérivatisation différents de celui utilisé ici (les durées de réaction sont beaucoup plus élevées, de l'ordre de la dizaine d'heure).

Dans un deuxième temps, des molécules ne portant ni groupements caractéristiques de la dérivatisation ni des fonctions dérivatisables ont été observées. Ces composés ont pu être extraits soit thermiquement avec la température employée pour la dérivatisation soit en se solubilisant dans le DMF-DMA. Par exemple, les triazines et les nitriles sont des composés qui ont déjà été identifiés auparavant (Gautier *et al.* 2016; Quirico *et al.* 2008). Les nitriles sont également connus pour être des produits de pyrolyse des amines (Moldoveanu 2009) et ont déjà identifiés dans des résultats de pyrolyse-CPG-SM (Morisson *et al.* 2016). La température utilisée pour la dérivatisation, d'après les résultats de la section II.3.1 sur les amines primaires, semble être suffisante pour permettre une telle réaction.

Finalement, certaines molécules qui ont été identifiées (Tableau II-7) portent des fonctions amines qui n'ont pas subi la réaction de dérivatisation et possèdent encore leurs hydrogènes labiles. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Il est possible de supposer qu'avec de tels analogues, la réaction de dérivatisation ne se produisent pas avec un même rendement que sur des standards d'amines. L'observation de ces amines non modifiées peut également être expliquée par la cinétique de réaction entre pyrolyse et dérivatisation. Les fonctions amines non dérivatisées qui sont observées pouvaient être liées à d'autres groupements moléculaires, donc non accessibles pour la dérivatisation. La réaction de dérivatisation s'est produite puis la pyrolyse a libéré ces fonctions amines n'ayant pas pu être dérivatisées du fait de la cinétique réactionnelle. Cette hypothèse reprend le schéma réactionnel qui a été observé pour la dérivatisation de l'adénosine.

Tableau II-7 : Molécules ayant pu être identifiées après application du protocole de fonctionnalisation des tholins produits au sein du réacteur PAMPRE. DMF° = Diméthylformamidinée.

N° de légende de la Figure II.18	Temps de rétention	Nom chimique	Structure moléculaire
1	2,18	Acétonitrile	
2	2,26	2-Propenenitrile	
3	2,90	1,3,5 Triazine	
4	3,68	Dimethylaminoacetonitrile	
5	4,03	Ethylamine DMF°	
6	5,35	N,N dimethylacetamide	
7	5,90	2,3-Dimethylpyrrole	
8	6,76	Pyrimidine, 4,6-dimethyl	
9	6,91	2-Pyrimidinamine	
10	8.06	Butanedinitrile	
11	8,32	Urée diméthylée	
12	10,66	3-Dimethylaminoacrylonitrile	
13	12.93	Urée DMF°	
14	13,63	Urée diméthylée et DMF°	

15	15,74	1,3,4-Triazol-3-amine, N-dimethylaminoethylene	

Cable et al., (2014) a détecté de nombreuses molécules avec des fonctions amines. Toutefois, les tholins analysés dans ces travaux n'ont pas été produits dans les mêmes conditions et la méthode de préparation d'échantillon et la technique analytique n'étaient pas les mêmes (électrophorèse capillaire *versus* dérivatisation au DMF-DMA couplée à la spectrométrie de masse). En outre, la détection d'amines dans les tholins produits par le réacteur PAMPRE, dans les mêmes conditions, a été possible par d'autres méthodes analytiques (explicitées en introduction de ce chapitre). Cela montre donc que ces fonctions chimiques sont belles et bien présentes au sein de ces échantillons de synthèse et que le protocole utilisé ici est remis en question. Il est donc nécessaire de réaliser des analyses plus approfondies pour tenter de comprendre ce qui empêche de détecter un plus grand nombre de molécules avec des fonctions amines ou amides. Si la température de dérivatisation semble être un paramètre central dans cette non détection provoquant la pyrolyse et la conversion d'amines en nitriles, une optimisation du protocole utilisée (température et durée de dérivatisation) sera nécessaire.

4. Conclusions et Perspectives

L'étude de la dérivatisation des amines et plus largement de composés portant des fonctions chimiques azotées a permis d'obtenir de nombreux nouveaux résultats par rapport à la littérature existante, en augmentant la complexité des molécules étudiées. Ces résultats témoignent de l'importance de telles études en préparation aux futures missions d'analyse *in situ* lorsque des composés particuliers (ici azotés) sont anticipés.

Au travers de cette étude, en combinant les résultats d'un stage de Master 1 et le début de cette thèse de doctorat, il a été possible d'identifier pour la première fois les formes dérivatisées au DMF-DMA de différentes amines variant selon la nature de la molécule ou de la fonction amine elle-même. Les spectres de masses ainsi obtenus ont permis de constituer un début de librairie pour les molécules dérivatisées au DMF-DMA, qui sera complétée au fur et à mesure des analyses futures.

Cette étude a également permis de déterminer les limites de détection et de quantification des amines primaires et secondaires avec et sans dérivatisation. Cela a permis de montrer que la fonctionnalisation au DMF-DMA peut améliorer jusqu'à un ordre de grandeur ces limites (centième de picomoles), sur une amine primaire. En ce qui concerne les amines secondaires, possédant trois formes dérivatisées distinctes, les limites de détection et de quantification ne sont pas augmentées avec la dérivatisation, mais celles-ci ne sont pas non plus abaissées. Cette étude quantitative doit se poursuivre dans le futur en élargissant l'éventail de composés azotés analysés, ce qui permettrait notamment d'évaluer l'abondance relative des formes dérivatisées détectées (quand il y en a plusieurs), et la limite de détection de chacune en fonction de la quantité initiale injectée.

De plus, comme propriété phare dans la recherche exobiologique, la chiralité et la séparation énantiomérique des isomères optiques des amines a également été étudiée avec la dérivatisation-CPG-SM. Les amines pouvant être à la fois des précurseurs mais aussi des produits de dégradation des acides aminés, un excès énantiomérique pourrait être observé en les analysant, même si des études demeurent nécessaires pour évaluer la préservation des propriétés optiques lors de la dégradation des acides aminés en amines. Les résultats obtenus sur des amines primaires chirales montrent que la dérivatisation au DMF-DMA couplée à l'analyse sur une colonne chirale est indispensable pour aboutir à la séparation des énantiomères et pour pouvoir quantifier un déséquilibre énantiomérique si un tel phénomène est présent à la surface de Titan. Un autre aspect qu'il faudra approfondir à l'avenir est l'étude de la racémisation de composés homochiraux avec la dérivatisation au DMF-DMA dans les conditions d'analyses de DraMS. En effet, le processus de fonctionnalisation au DMF-DMA à haute température pourrait supprimer l'excès énantiomérique s'il existe sur Titan, par racémisation des composés chiraux.

En conservant le souhait d'augmenter la complexité des composés étudiés, des dipeptides simples ont été dérivatisés pour réaliser une étude préliminaire sur les formes fonctionnalisées. Les formes attendues, à savoir la diméthylformamidination sur l'amine primaire et la méthylation sur le carboxyle terminal ont pu être identifiées. Toutefois, de nombreux autres pics ont également été détectés sans pouvoir trouver la structure moléculaire correspondante. Une étude plus approfondie demeure donc nécessaire, qui pourra être complétée par une analyse quantitative pour déterminer les limites de détection et de quantification de tels composés. Suite à cela, une optimisation du protocole pourra être réaliser pour tenter de cliver les liaisons peptidiques, résultant dans la détection d'acides aminés si ces derniers subissent la réaction de dérivatisation. Enfin, une étude sur la séparation énantiomérique de dipeptides dans un premier temps puis de peptides plus complexes par la suite pourra être envisagée, pour tenter de résoudre tous les isomères optiques dans la quête d'un excès énantiomérique de molécules prébiotiques.

Finalement, comme ultime échantillon complexe, des analogues synthétiques (tholins) des aérosols organiques présents dans l'atmosphère de Titan ont été dérivatisés. Les résultats ont montré que de nombreuses molécules sont détectées mais que leur identification demeure très complexe avec la dérivatisation au DMF-DMA. Ici aussi, une étude plus approfondie demeure nécessaire, autant sur le protocole utilisé que sur les potentielles interférences que peut constituer une matrice comme celles des tholins.

Les résultats obtenus au travers de cette étude sont encourageants par rapport aux objectifs de DraMS et plus généralement de la mission *Dragonfly*. La dérivatisation au DMF-DMA associée à la CPG-SM permet la détection des différentes natures de molécules portant des atomes d'azote. Ce type de composés organiques pourra donc être recherchés, détectés et identifiés à la surface de Titan. Comme souligné tout au long de cette étude, ces travaux ont ouvert sur de nombreuses perspectives et il est important de souligner les différences de résultats de la dérivatisation entre amines libres des standards chimiques et amines présentes dans les tholins. Il apparaît que la réactivité du DMF-DMA ne semble pas être la même entre les standards chimiques et des échantillons plus complexes comme les tholins. Ces analogues sont les échantillons les plus représentatifs des aérosols organiques de

l'atmosphère de Titan à notre disposition aujourd'hui. Leur étude, en préparation à l'interprétation des futures données *in situ* envoyées par *Dragonfly*, est donc indispensable dans la décennie à venir pour que la communauté scientifique parvienne à identifier des structures moléculaires dans les échantillons de surface sur Titan. Molécules qui pourraient être des indices quant à la mise en place d'une chimie prébiotique sur le plus grand des satellites de Saturne.

5. Références

Artemieva N., and Lunine J. (2003) Cratering on Titan: impact melt, ejecta, and the fate of surface organics. *Icarus*, 164: 471-480.

Barnes et al. (2021) Science Goals and Objectives for the Dragonfly Titan Rotorcraft Relocatable Lander. *PSJ*.

Belloche A., Garrod R., Müller H., Menten K., Medvedev I., Thomas J., and Kisiel Z. (2019) Re-exploring Molecular Complexity with ALMA (ReMoCA): Interstellar detection of urea. *Astronomy & Astrophysics*, 628: A10.

Cable M., Hörst S., He C., Stockton A., Mora M., Tolbert M., Smith M., and Willis P. (2014) Identification of primary amines in Titan tholins using microchip nonaqueous capillary electrophoresis. *Earth and Planetary Science Letters*, 403: 99-107.

Cable M. L., Hörst S. M., Hodyss R., Beauchamp P. M., Smith M. A., and Willis P. A. (2012) Titan tholins: simulating Titan organic chemistry in the Cassini-Huygens era. *Chemical Reviews*, 112: 1882-1909.

Carrasco N., Schmitz-Afonso I., Bonnet J. Y., Quirico E., Thissen R., Dutuit O., Bagag A., Laprevote O., Buch A., Giulani A. and others. (2009) Chemical characterization of Titan's tholins: solubility, morphology and molecular structure revisited. *J Phys Chem A*, 113: 11195-203.

Carrasco N., Tigrine S., Gavilan L., Nahon L., and Gudipati M. S. (2018) The evolution of Titan's high-altitude aerosols under ultraviolet irradiation. *Nature Astronomy*, 2: 489-494.

Coll P., Navarro-González R., Szopa C., Poch O., Ramírez S. I., Coscia D., Raulin F., Cabane M., Buch A., and Israël G. (2013) Can laboratory tholins mimic the chemistry producing Titan's aerosols? A review in light of ACP experimental results. *Planetary and Space Science*, 77: 91-103.

Derenne S., Coelho C., Anquetil C., Szopa C., Rahman A. S., McMillan P. F., Corà F., Pickard C. J., Quirico E., and Bonhomme C. (2012) New insights into the structure and chemistry of Titan's tholins via 13C and 15N solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Icarus*, 221: 844-853.

Freissinet C., Buch A., Sternberg R., Szopa C., Geffroy-Rodier C., Jelinek C., and Stambouli M. (2010) Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 731-740.

Freissinet C., Buch A., Szopa C., and Sternberg R. (2013) Enantiomeric separation of volatile organics by gas chromatography for the in situ analysis of extraterrestrial materials: kinetics and thermodynamics investigation of various chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, 1306: 59-71.

Gautier T., Carrasco N., Mahjoub A., Vinatier S., Giuliani A., Szopa C., Anderson C. M., Correia J.-J., Dumas P., and Cernogora G. (2012) Mid- and far-infrared absorption spectroscopy of Titan's aerosols analogues. *Icarus*, 221: 320-327.

Gautier T., Carrasco N., Stefanovic I., Sikimic B., Cernogora G., and Winter J. (2014) Methane Conversion in a N2CH4Radiofrequency Discharge. *Plasma Processes and Polymers*, 11: 472-481.

Gautier T., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Szopa C., Buch A., and Carrasco N. (2016) Development of HPLC-Orbitrap method for identification of N-bearing molecules in complex organic material relevant to planetary environments. 275: 259-266.

Grubb M. F., and Callery P. S. (1989) Derivatization of N-methyl and cyclic amino acids with dimethylformamide dimethyl acetal. *Journal of Chromatography A*, 469: 191-196.

Gümüş M., and Koca İ. (2020) Enamines and Dimethylamino Imines as Building Blocks in Heterocyclic Synthesis: Reactions of DMF‐DMA Reagent with Different Functional Groups. *ChemistrySelect*, 5: 12377-12397.

Hayatsu R., Studier M. H., Moore L. P., and Anders E. (1975) Purines and triazines in the Murchison meteorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39: 471-488.

Hörst S. M. (2017) Titan's atmosphere and climate *Journal of Geophysical Research: Planets*.

Hörst S. M., Yelle R. V., Buch A., Carrasco N., Cernogora G., Dutuit O., Quirico E., Sciamma-O'Brien E., Smith M. A., Somogyi A. and others. (2012) Formation of amino acids and nucleotide bases in a Titan atmosphere simulation experiment. *Astrobiology*, 12: 809-17.

Khare B. N., Sagan C., Ogino H., Nagy B., Er C., Schram K. H., and Arakawa E. T. (1986) Amino acids derived from Titan tholins. *Icarus*, 68: 176-184.

Körner P. (2021) Hydrothermal degradation of amino acids. *ChemSusChem*, 14: 4947-4957.

McGuigan M., Waite J. H., Imanaka H., and Sacks R. D. (2006) Analysis of Titan tholin pyrolysis products by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1132: 280-288.

Menor‐Salván C., Ruiz‐Bermejo D. M., Guzmán M. I., Osuna‐Esteban S., and Veintemillas‐Verdaguer S. (2009) Synthesis of pyrimidines and triazines in ice: Implications for the prebiotic chemistry of nucleobases. *Chemistry‐A European Journal*, 15: 4411-4418.

Moldoveanu. (2009) Pyrolysis of organic molecules applications to health and envrionmental issues.

Morisson M., Szopa C., Carrasco N., Buch A., and Gautier T. (2016) Titan's organic aerosols: Molecular composition and structure of laboratory analogues inferred from pyrolysis gas chromatography mass spectrometry analysis. *Icarus*, 277: 442-454.

Moulay V., Freissinet C., Rizk-Bigourd M., Buch A., Ancelin M., Couturier E., Breton C., Trainer M. G., and Szopa C. (2023) Selection and Analytical Performances of the Dragonfly Mass Spectrometer Gas Chromatographic Columns to Support the Search for Organic Molecules of Astrobiological Interest on Titan. *Astrobiology*, 23: 213-229.

O'Brien D. P., Lorenz R. D., and Lunine J. I. (2005) Numerical calculations of the longevity of impact oases on Titan. *Icarus*, 173: 243-253.

Poch et al. (2012) Production yields of organics of astrobiological interest from H2O–NH3 hydrolysis of Titan's tholins. *Planetary and Space Science*.

Quirico E., Montagnac G., Lees V., Mcmillan P. F., Szopa C., Cernogora G., Rouzaud J.-N., Simon P., Bernard J.-M., Coll P. and others. (2008) New experimental constraints on the composition and structure of tholins. *Icarus*, 198: 218-231.

Ramírez S. I., Coll P., Buch A., Brassé C., Poch O., and Raulin F. (2010) The fate of aerosols on the surface of Titan. *Faraday Discussions*, 147: 419.

Sciamma-O'Brien E., Carrasco N., Szopa C., Buch A., and Cernogora G. (2010) Titan's atmosphere: An optimal gas mixture for aerosol production? *Icarus*, 209: 704-714.

Szopa C., Cernogora G., Boufendi L., Correia J. J., and Coll P. (2006) PAMPRE: A dusty plasma experiment for Titan's tholins production and study. *Planetary and Space Science*, 54: 394-404.

Trainer M., Brinckerhoff W., Freissinet C., Lawrence D., Peplowski P., Parsons A., Zacny K., Turtle E., Barnes J., and Lorenz R. (2018) Dragonfly: investigating the surface composition of Titan.Lunar andPlanetary Science Conference.

Chapitre III : Sélection et caractérisation des performances des colonnes chromatographiques de *Dragonfly Mass Spectrometer* (DraMS) en préparation à la recherche de molécules organiques d'intérêt exobiologique sur Titan

---

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue Astrobiology, Mary Ann Liebert. L'article peut être retrouvé avec la référence suivante et est également présenté en annexe :

Valentin Moulay, Caroline Freissinet, Malak Rizk-Bigourd, Arnaud Buch, Mayline Ancelin, Elise Couturier, Caroline Breton, Melissa G. Trainer, and Cyril Szopa.Selection and Analytical Performances of the Dragonfly Mass Spectrometer Gas Chromatographic Columns to Support the Search for Organic Molecules of Astrobiological Interest on Titan.Astrobiology.Feb 2023.213-229.http://doi.org/10.1089/ast.2022.0038.

Ce chapitre reprend donc la structure et les résultats de cet article, avec quelques ajouts et précisions, notamment théoriques, qui n'avaient pas pertinemment leur place dans une publication.

Nos connaissances actuelles de la chimie de Titan, construites à la fois sur des observations *in situ* grâce à la mission Cassini-Huygens, sur des modèles photochimiques et sur des expériences de laboratoire simulant la chimie atmosphérique, montrent une diversité et une richesse organiques attendues très importantes (voir section I. 1.2). La seule analyse des aérosols de Titan a été effectuée par la sonde Huygens lors de sa descente dans l'atmosphère et n'a pas permis de révéler une telle complexité moléculaire, qui pourrait être impliquée dans la mise en place d'une potentielle chimie prébiotique. Puisque l'analyse *in situ* est le seul moyen d'obtenir de telles informations aujourd'hui, la mission *Dragonfly* a été sélectionnée en 2019 pour être envoyée à la surface de Titan. L'instrument DraMS (pour *Dragonfly Mass Spectrometer*), à bord de la sonde Dragonfly aura pour objectif d'explorer la composition chimique des échantillons collectés notamment grâce à la CPG-SM. Le chromatographe en phase gazeuse de l'instrument DraMS (nommé DraMS-GC dans la suite du texte) est composé de deux modules d'injection reliés à deux colonnes chromatographiques, fonctionnant indépendamment l'un de l'autre. Les colonnes chromatographiques, au cœur d'un tel instrument, permettent la séparation des molécules étant contenues dans des mélanges complexes, pour leur identification ensuite par spectrométrie de masse.

Pour répondre aux objectifs scientifiques de la mission Dragonfly et tenter d'identifier la diversité de composés présents sur Titan, tout en considérant les ressources disponibles pour DraMS et les contraintes techniques, l'utilisation de deux colonnes chromatographiques pour DraMS-GC apparaît être le choix le plus judicieux. La première colonne est une colonne dite générale, consacrée à séparer une large gamme de molécules organiques provenant de différentes familles chimiques. La seconde colonne est une colonne chirale avec une phase stationnaire énantiosélective (Freissinet *et al.* 2013) ayant la capacité de séparer des énantiomères de composés organiques, objectif primordial pour la recherche d'un potentiel excès énantiomérique, pouvant être synonyme d'activité biochimique (Kvenvolden 1973; Neveu *et al.* 2018). Toutefois, la colonne chirale, ne se suffit pas à elle-même car

ses performances de séparation générale de nombreux composés sont beaucoup plus faibles que celles des colonnes générales, ce qui justifie la nécessité d'avoir deux colonnes chromatographiques sur DraMS-GC.

1. Objectifs de l'étude

Dans cette étude, quatre phases stationnaires, nommées respectivement RTX-5, RTX-20, RTX-35 et RTX-1701 ont été étudiées dans l'optique de sélectionner la plus appropriée pour intégrer le sous-système DraMS-GC, vis-à-vis des composés attendus à analyser à la surface de Titan. La sélection de la phase stationnaire parmi les quatre présélectionnées et la caractérisation des performances analytiques de cette dernière a reposé sur quatre études : (a) une étude d'efficacité sur différentes familles chimiques et (b) une étude de rétention pour évaluer la séparation d'une large gamme de composés organiques. À l'issue de ces deux premières études, la colonne générale de DraMS-GC a pu être sélectionnée. Les performances analytiques ont ensuite été évaluées en analysant (c) des mélanges complexes de standards chimiques contenant différentes familles chimiques ainsi que (d) des tholins (analogues synthétiques des aérosols de Titan) pyrolysés et dérivatisés au DMF-DMA, pour obtenir des résultats sur un échantillon représentatif de ce qui pourrait être obtenu à la surface de Titan. Les performances analytiques de la colonne chirale (CP-Chirsail-Dex) ont également été évalués en utilisant les mêmes espèces chimiques et les mêmes méthodes que pour les phases stationnaires RTX. En plus de cela, la séparation énantiomérique sur des familles chimiques chirales attendues sur Titan a également été étudiée.

Une telle étude s'inscrit directement dans le développement instrumental de l'instrument DraMS-GC, mais possède également une plus grande portée. En effet, une caractérisation intrinsèque de chaque phase stationnaire a été menée pour une grande variété de familles chimiques ce qui pourra être utilisée à l'avenir, notamment pour la sélection de colonnes chromatographiques pour de futures missions spatiales.

2. Matériels et méthodes

2.1 Le choix des phases stationnaires

Aujourd'hui, il existe une grande diversité de colonnes chromatographiques selon les applications souhaitées avec la CPG-SM. Ces colonnes diffèrent principalement en fonction de leurs dimensions, la nature de la phase stationnaire ainsi que le matériel utilisé pour créer le tube capillaire lui-même. Parmi toutes les colonnes existantes, il a donc fallu prendre en compte chacun de ces paramètres pour présélectionner les colonnes candidates à l'intégration au sein de l'instrument DraMS-GC.

Tout d'abord, pour des raisons techniques, le tube capillaire fait de métal est privilégié pour les applications spatiales car celui-ci est beaucoup plus résistant mécaniquement par rapport aux tubes en polyimides utilisés habituellement en laboratoire sur des instruments commerciaux. Hormis la résistance mécanique, les raccords avec les autres parties de l'instrument se font plus facilement qu'avec les tubes en silice notamment avec le système de gestion du gaz vecteur. Ce simple premier

critère, indispensable pour le développement instrumental spatial, limite grandement le nombre de phases stationnaires et les géométries disponibles chez les fournisseurs. En effet, les colonnes métalliques sont très peu utilisées dans le commerce car possède un nombre limité d'applications terrestres et leur production et conditionnement sont plus compliqués à mettre en œuvre que les colonnes en silice fondue usuelles.

Les contraintes techniques étant posées, il faut désormais prendre en considération les molécules attendues à la surface de Titan, qui devront être séparées par le sous-système DraMS-GC. Un des objectifs de la mission *Dragonfly* et de l'instrument DraMS est de séparer un grand nombre de molécules présentes à la surface de Titan, en ciblant les composés organiques pouvant être impliqués dans des processus prébiotiques voire biologiques (Mckay 2004). Comme détaillé dans l'introduction de ce manuscrit (voir section I. 1.2.), notre connaissance actuelle de la chimie atmosphérique de Titan, basée sur des observations, des modèles photochimiques et des analyses chimiques d'analogues des aérosols, indique probablement la présence de différents hydrocarbures tels que le benzène et des aromatiques polycycliques (HAPs)(Gautier *et al.* 2017; Trainer *et al.* 2013; Trainer *et al.* 2004) ainsi que des composés azotés comme les nitriles et les amines (Gautier *et al.* 2014a; Morisson *et al.* 2016; Schulz *et al.* 2021; Szopa *et al.* 2006). La chimie de surface, résultat de l'interaction entre les aérosols qui sédimentent et la présence d'eau liquide de manière transitoire peut également aboutir à des composés complexes tels que des acides carboxyliques et des acides aminés (Neish *et al.* 2009; Neish et al. 2010; Poch et al. 2012; Ramírez *et al.* 2010).

Enfin, la robustesse aux contraintes connues à la surface de Titan est également à prendre en compte. Ici, les contraintes prioritaires à considérer sont les gammes de température de survie et de fonctionnement ainsi que la durée des analyses envisagée mais aussi la résistance mécanique et chimique des colonnes vis-à-vis de la durée du voyage jusqu'au système de Saturne (7 ans) et de la durée de la mission nominale (environ 3 ans et 4 mois). Ces contraintes impactent principalement le choix fait quant à la géométrie de la colonne et de manière moindre, le choix de la phase stationnaire, excepté pour les gammes de température attendues.

En prenant en compte tous ces critères, quatre phases stationnaires ont été présélectionnées (toutes fournies par Restek®), susceptibles de remplir les objectifs analytiques de DraMS-GC. Les noms commerciaux de chacune de ces colonnes sont la RTX-5, la RTX-20, la RTX-1701 et la RTX-35 et elles contiennent chacune des compositions chimiques différentes de phases stationnaires. Toutes les colonnes qui seront testées dans cette étude sont faites d'un tube de polyimide pour des raisons de coûts et de praticité quant à l'installation sur des instruments commerciaux. Les équivalents avec un tube capillaire métallique sont disponibles chez Restek®. De plus, le choix s'est orienté vers ces colonnes car, hormis la RTX-35, toutes les autres ont déjà été embarquées à bord de sondes spatiales d'analyse *in situ.* Les équivalents métalliques aux colonnes RTX-5, RTX-20 et RTX-1701 ont déjà été utilisées pour des instruments dédiés à l'analyse du contenu moléculaire de la surface de Mars (Goesmann *et al.* 2017; Mahaffy *et al.* 2012), de la comète 67P/Chrymov-Gerasimenko (Goesmann *et al.* 2006) et pour l'atmosphère de Titan (Niemann *et al.* 2003). Ainsi, ces trois colonnes et les trois phases stationnaires qu'elles contiennent, ont déjà prouvé leur robustesse face aux conditions spatiales ainsi que leurs performances analytiques avec de nombreux résultats lors d'analyses *in situ*.

Pour les quatre colonnes chromatographiques présélectionnées, les dimensions, les compositions des phases stationnaires ainsi que les températures limites de fonctionnement sont reportées dans le Tableau III-1. Les colonnes RTX-5, RTX-20 et RTX-35 ont des natures de phases stationnaires identiques, avec une différence de proportion du contenu en phényle. Ces différences de proportion indiquent le degré de polarité des différentes phases. La RTX-5 est considérée comme une colonne non polaire, ce qui signifie que sa phase stationnaire a une meilleure affinité pour les composés apolaires tels que les alcanes, alors que la RTX-20 et la RTX-35 sont des colonnes qualifiées de moyennement polaires. La colonne RTX-1701, quant à elle, possède un groupement polaire différent des trois premières phases, à savoir le cyanopropylphényle. Cette différence de substituant polaire donne à la RTX-1701 une phase moyennement polaire et potentiellement plus apte à séparer des composés azotés comme les amines et les nitriles qui sont probablement attendus en abondance sur Titan. Les quatre colonnes chromatographiques ont les mêmes dimensions géométriques, ce qui signifie que les différences observées lors des analyses pourront être uniquement imputées à la phase stationnaire et à sa composition. En plus des quatre colonnes sélectionnées, une cinquième avec une autre épaisseur de phase a été étudiée (0,5 µm contre 0,25 µm initialement) pour la RTX-5, dans l'optique d'évaluer les différences en termes de séparation et de temps de rétention. Les analyses sur cette dernière ont été réalisées après les deux premières études qui ont mené à la sélection de la RTX-5, colonne la plus appropriée vis-à-vis des objectifs de l'instrument DraMS.

En outre de la séparation dite générale, parmi les objectifs de l'instrument DraMS, la capacité de séparer des énantiomères organiques, pour évaluer le ratio énantiomérique pour comparer ce dernier à ceux connus dans les systèmes biotiques et abiotiques, est également une priorité. Ainsi, seule une phase stationnaire capable de séparer les isomères optiques peut être sélectionnée. Une étude par le passé a montré que la colonne chirale CP-Chirasil-Dex fournie par Agilent possède la phase stationnaire la plus performante pour répondre à un tel objectif (Freissinet *et al.* 2013). De plus, cette colonne a également un héritage dans l'exploration spatiale car elle a déjà été utilisée à bord de la sonde Rosetta et du rover Curiosity sur Mars. La phase stationnaire de la CP Chirasil-Dex est composée de molécules de β-cyclodextrine modifiée liées au squelette de polydiméthylsiloxane ce qui permet la séparation des énantiomères des molécules chirales par l'intermédiaire d'une interaction qualifiée de «clé-serrure», avec une sélection des énantiomères qui se fait par stéréochimie.

*Tableau III-1 : Caractéristiques principales des colonnes utilisées pour cette étude, fournies par Restek® et Agilent. *ID : diamètre interne. ** (a) : étude d'efficacité, (b) étude des temps de rétention, (c) étude de mélanges complexes, (d) études d'échantillons analogues synthétiques.*

Colonne	Phase stationnaire	Minimum T° (°C)	Maximum T° (°C)	Dimensions L/ID*/épaisseur de phase (m/µm/µm)	Molécules cibles	Études menées**
RTX-5	5% Diphenyl and 95% dimethyl polysiloxane	-60	360	30/0.25/0.25	C_4-C_{25} organic molecules	(a), (b), (c), (d)
RTX-20	20% Diphenyl and 80% dimethyl polysiloxane	-20	320		C_4-C_{25} organic molecules	(a), (b)
RTX-35	35% Diphenyl and 65% dimethyl polysiloxane	+40	320		C_4-C_{25} organic molecules	(a), (b)
RTX-1701	14% cyanopropyl phenyl and 86% dimethyl polysiloxane	-20	280		C_4-C_{25} organic molecules + N-bearing compounds	(a), (b)
RTX-5	5% Diphenyl and 95% dimethyl polysiloxane	-60	330	30/0.25/0.50	C_4-C_{25} organic molecules	(c), (d)
CP Chirasil-Dex	Cyclodextrin bonded to dimethylpolysiloxane	Not available from supplier	200	25/0.25/0.25	Organic enantiomers	(a), (b), (c), (d)

2.2 Instrumentation

Les différentes études ont été menées sur deux instruments différents.

D'une part, un chromatographe en phase gazeuse Trace GC 1300 (ThermoFisher Scientific), équipé avec un injecteur automatique AI 1310 (également de chez ThermoFisher Scientific) avec une seringue de 0,5 µL et avec un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID) (appelé GC-FID par la suite), a été utilisé pour les études de routine sur les différentes colonnes, à savoir l'étude d'efficacité et l'étude de séparation et des temps de rétention. En effet, l'injection automatique permet d'obtenir une répétabilité dans les analyses contrairement à l'injection manuelle, ce qui est primordiale pour l'étude d'efficacité notamment (principe détaillé plus bas). Cet instrument est équipé d'un injecteur split/splitless pour vaporiser et transférer les échantillons liquides à la colonne chromatographique. La

température de l'injecteur pour toutes les études sur cet instrument est de 250 °C. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium fourni par AirLiquide (pureté ≥ 99,999 %).

D'autre part, le second instrument est un chromatographe Trace GC 1300 couplé à un spectromètre de masse à détecteur quadrupôlaire (ISQ) (CPG-SM) (les deux étant fournis par ThermoFisher Scientific). Ce CPG-SM a été utilisé pour l'analyse de mélanges complexes de standards chimiques et également pour les tholins pyrolysés et dérivatisés. L'utilisation du spectromètre de masse comme détecteur est ici nécessaire pour l'identification, car il est difficile de connaître le temps de rétention de chaque standard utilisé et donc l'ordre d'élution. Pour les tholins, ne connaissant par leur composition moléculaire, l'identification par spectrométrie de masse est également indispensable. Cet instrument est équipé d'un injecteur split/splitless dont la température est programmée à 250 °C pour les différentes analyses réalisées. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium fourni par AirLiquide (pureté ≥ 99,999 %). La température de la ligne de transfert entre le chromatographe et le spectromètre de masse ainsi que celle de la source d'ionisation est de 250 °C. L'énergie d'ionisation (impact électronique) est de 70 eV. La gamme de ratio masse/charge (m/z) scannée s'étend de 2 à 600 u, ce qui est représentatif de la gamme qui sera potentiellement utilisée sur DraMS-MS.

Enfin, un pyrolyseur Pyroprobe 6200 de chez CDS Analytical a été utilisé pour la pyrolyse et la dérivatisation des tholins. Ce pyrolyseur est connecté au CPG-SM par l'intermédiaire une ligne de transfert d'un mètre dont la température est de 280 °C, ce qui permet d'éviter la condensation de composés produits par pyrolyse au sein du pyrolyseur même.

2.3 Standards, échantillons et conditions analytiques pour les différentes études.

Tous les standards chimiques utilisées pour les différentes analyses sont de qualité analytique (pureté > 95 % ; Merck).

• ***L'étude d'efficacité***

Pour comparer différentes phases stationnaires entre elles, l'efficacité est un paramètre clé en chromatographie, relatif à l'élargissement des pics induit par toutes les étapes de la chromatographie en phase gazeuse, à savoir l'injection qui est ici automatique dont on peut de fait s'affranchir et l'interaction entre les solutés de l'échantillon et la phase stationnaire. Pour caractériser l'efficacité d'une colonne, celle-ci est considérée comme découpée en plusieurs cylindres successifs nommés plateaux théoriques. Cette méthode a été employée la première fois en 1941 par Matin et Synge (Martin and Synge 1941). Le nombre de plateaux théoriques est calculé ave l'équation suivante :

$$N = 5{,}54 \,.\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \qquad \textit{Équation III.2.1}$$

Avec t_R le temps de rétention du soluté et w la largeur à mi-hauteur du pic chromatographique considéré. Plus le nombre de plateau théoriques est élevé plus la colonne est considérée comme efficace. Le paramètre clé qui est ensuite calculé est la Hauteur Équivalente à un Plateau Théorique (HEPT). Celle-ci se calcule grâce à l'équation suivante :

$$HEPT = \frac{L}{N}$$ *Équation III.2.3*

Avec L la longueur de la colonne, donc de 30 mètres dans notre cas. L'efficacité étant proportionnelle aux nombres de plateaux théoriques, plus la HETP est faible, plus l'efficacité est élevée. Ainsi, une valeur de HEPT est obtenue pour différentes vitesses de gaz vecteur. La courbe des valeurs de HEPT en fonction de la vitesse en gaz vecteur est appelée courbe de Van Deemter-Golay et est décrite dans Golay (1958). Sur cette courbe, il apparaît donc un minimum qui correspond à l'efficacité maximum.

Cette efficacité chromatographique dépend de plusieurs paramètres dont les dimensions de la colonne, la nature de la phase stationnaire, les espèces chimiques analysées, la nature du gaz vecteur et conditions analytiques employées (température du four et vitesse du gaz vecteur). Par conséquent, les objectifs de cette étude d'efficacité sont doubles :

(1) Évaluer les différences d'efficacité qui sont seulement dues à la phase stationnaire dédiée à la séparation chromatographique pour DraMS. En effet, les quatre colonnes chromatographiques présélectionnées ont la même dimension et vont être étudiées dans les mêmes conditions opératoires, ainsi l'influence de la phase stationnaire sur l'efficacité sera directement évaluée, ce qui peut constituer un critère de sélection.

(2) Estimer le débit en gaz vecteur optimal pour DraMS-GC correspondant à la plus grande efficacité d'après les courbes de Van Deemter-Golay obtenues. Cette étude permet donc également d'aider à définir certains paramètres de DraMS-GC et de vérifier si ces valeurs de débit sont compatibles avec les contraintes liées à l'instrument DraMS.

Conditions analytiques pour l'étude d'efficacité

Pour les quatre colonnes qui ont été étudiées dans cette étude d'efficacité, toutes les expériences ont été menées en isotherme à deux températures : 100 °C et 150 °C pour chaque composé. Ces deux températures ont été choisies car elles correspondent à la gamme de température à utiliser sur DraMS-GC ce qui permet d'évaluer l'influence de ce paramètre sur l'efficacité. De plus, ces températures permettent une élution relativement rapide de tous les composés ce qui maintient les temps d'analyses à des valeurs raisonnables même pour les pressions en gaz vecteur les plus basses.

L'influence du débit en gaz vecteur sur l'efficacité chromatographique a été étudiée en utilisant une gamme qui s'étend de pression de 40 kPa à 250 kPa (relatif à la pression atmosphérique). Ce type de gamme correspond typiquement aux valeurs utilisées usuellement avec ce genre de colonnes et qui est compatible avec les conditions de fonctionnement de DraMS. Pour chaque condition explorée, trois réplicats ont été réalisés pour assurer la répétabilité des mesures entre les runs et la déviation standard a été calculée.

Les standards chimiques et la préparation des échantillons

Pour les colonnes consacrées à la séparation générale (les colonnes RTX), le pentanenitrile, le naphtalène, l'acide octanoïque et la décanamine ont été utilisés comme composés représentatifs de plusieurs familles chimiques qui seront ciblées par DraMS et qui peuvent être analysés dans des durées d'analyse raisonnables. Pour la colonne chirale, les conditions opératoires ont été les mêmes que pour les RTX. Toutefois, les phases stationnaires étant différentes entre la colonne chirale et les colonnes générales, certains standards chimiques utilisés sont différents : l'acide octanoïque a été dérivatisé avec du DMF-DMA pour qu'il soit détecté et l'hexanamine a été préférée à la décanamine et également dérivatisée.

Chaque composé précédemment décrit a été injecté individuellement pour éviter des interférences possibles avec d'autres composés chimiques, étant donné que l'étude d'efficacité a été réalisée avec le GC-FID. Ces composés ont été injectés soit pur soit dilué dans du méthanol à des concentrations variant de 0,01 à 1 mol.L^{-1}. Les volumes d'injections (de 0,01 à 0,1 µL) ainsi que les ratios de split utilisés (de 40 à 100) ont également été adaptés selon les composés analysés. Ces deux derniers paramètres ont été ajustés pour éviter la saturation du détecteur et de la phase stationnaire dans l'optique d'obtenir les pics chromatographiques les plus symétriques possibles. Toutes les concentrations, les volumes injectés et les ratios de split qui ont été utilisés et adaptés pour chaque composé sont reportés dans le Tableau III-2.

*Tableau III-2 : Liste des standards chimiques utilisés ainsi que leurs concentrations (lorsqu'ils ont été dilués) et le volume d'injection et le split ratio utilisés pour étudier l'efficacité chromatographique des colonnes de DraMS-GC. *L'acide octanoïque non dérivatisé pour les colonnes RTX a donné des pics non gaussiens, la dérivatisation au DMF-Dma fut donc requise pour la colonne chirale. Ici, nous considérons pour le calcul des concentrations un rendement de dérivatisation de 100 %. **Pour la CP Chirasil-Dex, la décanamine n'a pas pu être détectée sur le GC-FID, même en la dérivatisant. Par conséquent, l'hexanamine lui a été préférée.*

Standard chimique Formule brute	Colonne	Concentration (mol·L^{-1})	Volume d'injection/ Split ratio
Pentanenitrile C_5H_9N	All RTX columns	Pur	0.01 µL/100
	CP Chirasil-Dex	100 °C: 5.10^{-2} mol·L^{-1} in methanol 150 °C: 10^{-1} mol·L^{-1}	0.1 µL/40
Naphtalène $C_{10}H_8$	All RTX columns	0.34 mol·L^{-1}	0.01 µL/100
	CP Chirasil-Dex	100 °C: 5.10^{-2} mol·L^{-1} in methanol 150 °C: 10^{-1} mol·L^{-1}	0.1 µL/40

	RTX-5	Pur	0.01 µL/100
Acide octanoïque* $C_8H_{16}O_2$	RTX-20/RTX-35/RTX-1701	10^{-1} mol·L^{-1} in methanol	0.01 µL/50
	CP ChirasilDex	10^{-1} mol·L^{-1} derivatized with 30 µL DMFDMA*	0.1 µL/20
	RTX-5	Pure	0.01 µL/100
Décanamine $C_{10}H_{23}N$	RTX-20/RTX-35/RTX-1701	1 mol·L^{-1} in methanol	0.01 µL/100
Hexanamine** $C_6H_{15}N$	CP Chirasil-Dex	10^{-1} mol·L^{-1} derivatized with 30µL DMFDMA	0.1 µL/20

Finalement, pour obtenir les temps morts sur chaque colonne étudiée, 10 µL de pure méthane (pureté > 99,995 % ; AirLiquide) ont été injectés indépendamment des autres composés avec une seringue à gaz de 100 µL (fournie par Hamilton).

L'évolution de la HEPT en fonction de la vitesse en gaz vecteur a donc été tracée pour chaque colonne étudiée et pour chaque composé analysé comme résultat final de cette étude d'efficacité chromatographique.

• ***<u>Étude de la séparation et de la rétention de différents mélanges de standards chimiques.</u>***

L'étude des temps de rétention et de séparation pour les quatre colonnes a été menée sur le GC-FID. Le but d'une telle étude est de caractériser la séparation d'une large gamme de standards chimiques provenant de différentes familles chimiques et d'intérêt pour DraMS. Cela permettra donc d'évaluer quelle phase stationnaire est la plus adéquate pour achever la séparation souhaitée. Tout comme pour l'étude d'efficacité, les capacités de séparation constituent un critère de sélection de la phase stationnaire qui sera intégrée à DraMS-GC. En outre, cette étude permet également d'établir un premier panel de temps de rétention et d'évaluer les capacités de séparation avec des conditions opératoires qui est sont cohérentes avec celles anticipées sur DraMS-GC. Ainsi, cela permet d'obtenir des paramètres clés pour l'instrument de vol à bord de la sonde *Dragonfly*, comme par exemple la durée totale d'une analyse.

Conditions analytiques.

Dans cette optique, toutes les colonnes ont été étudiées avec le même débit en gaz vecteur pour comparer ici uniquement l'influence de la phase stationnaire sur la séparation. Cette valeur de débit a été choisie grâce à l'étude d'efficacité préalablement réalisée (1 $mL.min^{-1}$), considérée comme étant la valeur donnant l'efficacité chromatographique optimale. De plus, le même programme de température a été utilisé pour toutes les colonnes étudiées, avec une température de départ de 40 °C, maintenue pendant 2 minutes, une rampe de température de 10 $°C.min^{-1}$ pour atteindre la température finale de 250 °C (pour les colonnes RTX) ou 200 °C (pour la colonne chirale) maintenue pendant 15 minutes.

Les standards chimiques utilisés.

Des mélanges individuels de composés non dérivatisés (alcanes, nitriles, HAPs, amines, et des acides gras estérifiés (FAMEs)) ont été injectés pour évaluer la séparation et la rétention des différentes phases pour ces différentes familles chimiques. Le mélange d'amines ainsi qu'un mélange d'acide aminé a également été dérivatisé avec du DMF-DMA. Le mélange de FAMEs permet de simuler des acides carboxyliques qui auraient subit la réaction de dérivatisation au DMF-DMA, à savoir une méthylation sur la fonction carboxyle. Les solutions ont été préparées de manière équivolumique et les standards solides ont été ajoutés de manière non quantitative. Chaque mélange a été injecté indépendamment pour obtenir une meilleure identification avec le GC-FID. Pour la colonne chirale, deux molécules chirales supplémentaires ont été ajoutées au mélange d'amine, et un mélange équivolumique de standards d'alcools a également été injecté. Les volumes d'injection ainsi que les ratios de split ont été ajustés en fonction des solutions pour éviter la saturation des différentes phases stationnaires étudiées. La composition de chaque mélange ainsi que les temps de rétention de chaque composé sont reportés dans l'Annexe III-1.

Comme explicité, certains composés doivent être dérivatisés (ici au DMF-DMA) car trop polaires pour être analysés directement en GC-FID, tels que les acides aminés. Le DMF-DMA est un agent de dérivatisation qui sera utilisé sur DraMS qui permet, pour rappel, la substitution des hydrogènes labiles des fonctions polaires dans les molécules par un groupement méthyle pour les fonctions carboxyles et un groupement diméthylformamidine pour les fonctions amines. La dérivatisation au DMF-DMA permet également la conservation de la chiralité ce qui pourrait permettre de détecter un excès énantiomérique s'il existe sur Titan. Pour réaliser la réaction de fonctionnalisation, 10 µL de DMF-DMA ont été ajoutés à 5µL des mélanges d'amines et d'acides aminés et la solution a été chauffé à 145 °C pendant 3 minutes pour catalyser la réaction (Freissinet *et al.* 2010).

• ***Analyse de mélanges complexes de standards avec les deux colonnes de DraMS-GC.***

Deux mélanges complexes composés de plusieurs familles chimiques ont été préparés de façon équivolumique pour les standards liquides et de façon non quantitative pour les standards solides. Ces deux mélanges ont été injectés sur la RTX-5 (les deux épaisseurs de phases stationnaires étudiées) et sur la CP-ChirasilDex avec un CPG-SM, car la RTX-20, la RTX-1701 et la RTX-35 étaient déjà exclues de la sélection pour cette étude. Le premier mélange est composé d'alcanes, d'HAPs, de nitriles et

d'amines (non dérivatisées) et le second d'amines, d'acides carboxyliques et d'acides aminés, tous dérivatisés au DMF-DMA. Pour la colonne CP ChirasilDex, un composé chiral a été ajouté au second mélange et dérivatisé avec le DMF-DMA.

Enfin un mélange équimolaire à 10^{-1} mol.L^{-1} constitué de composés chiraux (analysés à la fois non dérivatisés et dérivatisés au DMF-DMA) dilués dans du DMF a été étudié pour évaluer la capacité de la phase stationnaire chirale a résoudre les pics des énantiomères. La composition des différents mélanges complexes ainsi que les temps de rétention de chaque composé sont reportés dans le Tableau III-4 et III-5.

Tableau III-4 : Temps de rétention et composition des mélanges n°1 et n°2. Pour rappel, tous les composés du second mélange ont été dérivatisés au DMF-DMA et les temps de rétention donnés correspondent à ceux des molécules dérivatisés.

Composés	RTX-5 temps de rétention (min)	ChDex temps de rétention (min)
Mélange n°1 (alkanes, nitriles, PAHs, non-derivatized amines)		
Butylamine	2.1	4.0
Benzene	2.3	3.1
Octane	3.5	4.0
Butanenitrile	2.3	3.0
Pyridine	2.9	4.2
Hexylamine	4.8	6.4
Nonane	4.0	5.5
Pentanenitrile	3.3	4.9
Hexanenitrile	4.6	6.7
Octylamine	7.0	8.8
Undecane	7.8	8.4
Dodecane	9.3	9.7
Octanenitrile	7.6	9.4
Naphthalene	9.3	10.4
Décanamine	10.0	11.3
Nonanenitrile	9.1	10.6
Hexadecane	14.5	14.4
Dodecanenitrile	13.2	13.9

Tetradecanamine	15.1	/
Hexadecanamine	17.3	/
Octadecanamine	19.3	/
Didecanamine	20.1	/
Stearonitrile (C_{18})	19.7	23.0
Mélange N°2 (amines, carboxylic acids and amino acids)		
N-ethyl-N-propylamine	Diméthoxyméthylé: 6,0 Formylé : 6,7	Formylé : 9.0
Butylamine	6.2	6.9
Octanoic acid	8.2	9.2
Hexylamine	9.1	9.7
Alanine	9.4	10.4
Nonanoic acid	9.7	10.5
Butyramide	11.1	11.9
Leucine	11.7	11.6 and 11.7 (énantiomères)
Octanamine	11.9	12.2
Acide undécanoïque	12.3	12.8
Acide dodécanoïque	13.6	13.9
Décanamine	14.3	14.4
Acide glutamique	14.8	15.0
Phenylalanine	16.2	16.3
Dodecanamine	16.6	16.5
Tetradecanamine	18.6	19.3
Lysine	18.7	20.0
Hexadecanamine	20.4	24.6
Octadecanamine	22.1	35.0

Tableau III-5 : Temps de rétention et composition du mélange de molécules chirales analysé avec la Chirasil-Dex. Deux temps de rétention sont donnés quand les énantiomères sont séparés, seulement un quand ils sont coélués.

Composés	Mélange non dérivatisé	Mélange dérivatisé
2-pentanol	7.3 et 7.4	6.8 et 7.1
2-hexanol	10.0 et 10.1	10.0 et 10.1
2-aminobutane	2.83	7.8 et 8.0
2-aminopentane	4.71	9.8 et 10.0
N-methyl-2-pentanamine	5.4 et 5.5	16.7 et 17.0
Acide 2-methylbutanoïque	16.0 et 16.2	5.6 et 5.7
Acide 4-methyloctanoïque	23.7 et 23.4	15.9
2-methylpentanenitrile	8.0 et 8.1	8.0 et 8.1

Les conditions analytiques pour ces analyses étaient les suivantes : la température de départ était de 40 °C, puis augmentait à 10 °C.min^{-1} pour atteindre 300 °C pour la RTX-5 et 200 °C pour la CP ChirasilDex. Cette température finale a été maintenue pendant un minimum de 5 minutes.

Analyse d'analogues synthétiques : applications aux tholins de Titan

Dans l'optique d'obtenir un jeu de données plus représentatif de ce qui pourrait être obtenu sur Titan, des échantillons analogues synthétiques des aérosols organiques de Titan (appelés tholins) ont été synthétisé et analysés avec les colonnes de DraMS-GC, à savoir la RTX-5 et la CP ChirasilDex. Le protocole de production de ces tholins est détaillé dans la section II.2.4 et également dans la littérature (Gautier *et al.* 2014b; Szopa *et al.* 2006).

Pour la pyrolyse des tholins, 2 mg ont été pyrolysés à 600 °C pendant 30 secondes dans le pyrolyseur CDS. Cette température de pyrolyse est une des températures envisagées sur DraMS. Pour la dérivatisation au DMF-DMA, 2 µL d'agent de dérivatisation ont été ajoutés à 1 mg de tholins, et la réaction de fonctionnalisation s'est passée directement au sein de la chambre de pyrolyse à 145 °c pendant 3 minutes et toutes les molécules extraites ont été piégées au sein d'un piège rempli de Tenax® maintenu à 30 °C. Après piégeage des composés, la désorption s'est produite à 280 °C pendant 30 secondes pour transférer les molécules piégées vers le chromatographe.

3. *Résultats & Discussion*

3.1. Étude d'efficacité

Colonne générale

Pour différentes vitesses en gaz vecteur, les valeurs de HEPT ont été calculées pour les différents composés étudiés et dans les deux conditions de température (100 °C et 150 °C). Ainsi, la Figure III-1 présente l'évolution de ces valeurs en fonction de la vitesse en gaz vecteur et le Tableau III-6 liste les valeurs de l'efficacité maximum (=HEPT minimale) et le débit en gaz vecteur correspondant. En Annexe III-2 sont également présentées toutes les valeurs expérimentales relatives à cette étude d'efficacité.

Pour la colonne RTX-20 à 100 °C, l'évolution de la HEPT pour la décanamine n'a pas pu être tracée à cause de la forme du pic chromatographique correspondant qui n'était pas gaussien et de la très forte rétention de ce composé sur la phase stationnaire au pression testées les plus basse (40 et 50 kPa ce qui correspond à 10,4 et 13,1 $cm.s^{-1}$). Pour la colonne RTX-1701, l'acide octanoïque n'est pas élué dans la durée de l'analyse avec les conditions utilisées pour les pressions en gaz vecteur les plus basses (40 et 50 kPa), ce qui explique pourquoi les points des HEPT correspondants à ces valeurs ne sont pas tracés.

Pour les colonnes RTX-5, la RTX-20 et la RTX-35, l'évolution expérimentale de la HEPT est cohérente avec l'évolution théorique décrite par l'équation de Van Deemter-Golay sauf pour l'acide octanoïque à 100 °C (Figure III-1). L'augmentation continue des valeurs de HEPT tout au long de la gamme de vitesse en gaz vecteur étudiée est très probablement due à sa forte polarité couplée à une faible volatilité, résultant dans une interaction non-nominale entre le composé et la phase stationnaire. Toutefois, lorsque la température utilisée est de 150 °C, les résultats obtenus pour l'acide octanoïque deviennent beaucoup plus cohérents avec ce qui est attendu.

D'un point de vue global, l'évolution de la HEPT est très similaire pour un composé donné entre les colonnes RTX-5, RTX-20 et RTX-35 pour les deux températures testées, même si quelques légères différences sont observées sur le minimum de la HEPT obtenue et donc sur la vitesse en gaz vecteur optimale. Cette observation est tout à fait cohérente étant donné que ces trois colonnes ont une composition très similaire pour leurs phases stationnaires qui diffère simplement par le pourcentage de phényle. Ces différences de proportions pour les composés étudiés et dans les conditions analytiques utilisées ne semblent pas avoir d'impact significatif sur l'efficacité de la colonne. Pour ces trois colonnes, à 100 °C, les vitesses optimales en gaz vecteur selon les composés varient entre 25,0 et 37,89 $cm.s^{-1}$ ce qui correspond à une gamme de débit optimaux qui s'étend de 0,7 à 1,1 $mL.min^{-1}$. À 150 °C, les vitesses optimales sont comprises entre 23,0 et 35,0 $cm.s^{-1}$ donnant des débits entre 0,7 et 1,3 $mL.min^{-1}$. Aux deux températures étudiées, la gamme de débit donnant la meilleure efficacité pour les colonnes RTX-5, RTX-20 et RTX-35 peut être utilisée pour établir la pression optimale qu'il faudra utiliser sur DraMS-GC.

Pour la colonne RTX-1701, tous les composés étudiés montrent une évolution des valeurs de HEPT en fonction de la vitesse en gaz vecteur qui est tout à fait cohérente avec l'évolution théorique

décrite par l'équation de Van Deemter-Golay à 100 comme à 150 °C. Les échanges entre la phase stationnaire et la phase mobile semblent donc être en équilibre pour tous les composés contrairement aux autres phases étudiées. À 100 °C, la gamme de vitesse optimale en gaz vecteur est comprise entre 25,8 et 38,8 cm.s^{-1} ce qui correspond à des débits optimaux entre 0,8 et 1,1 mL.min^{-1}. À 150 °C, les valeurs minimales d'HEPT sont obtenus pour des débits compris entre 0,9 et 1,0 ml.min^{-1}.

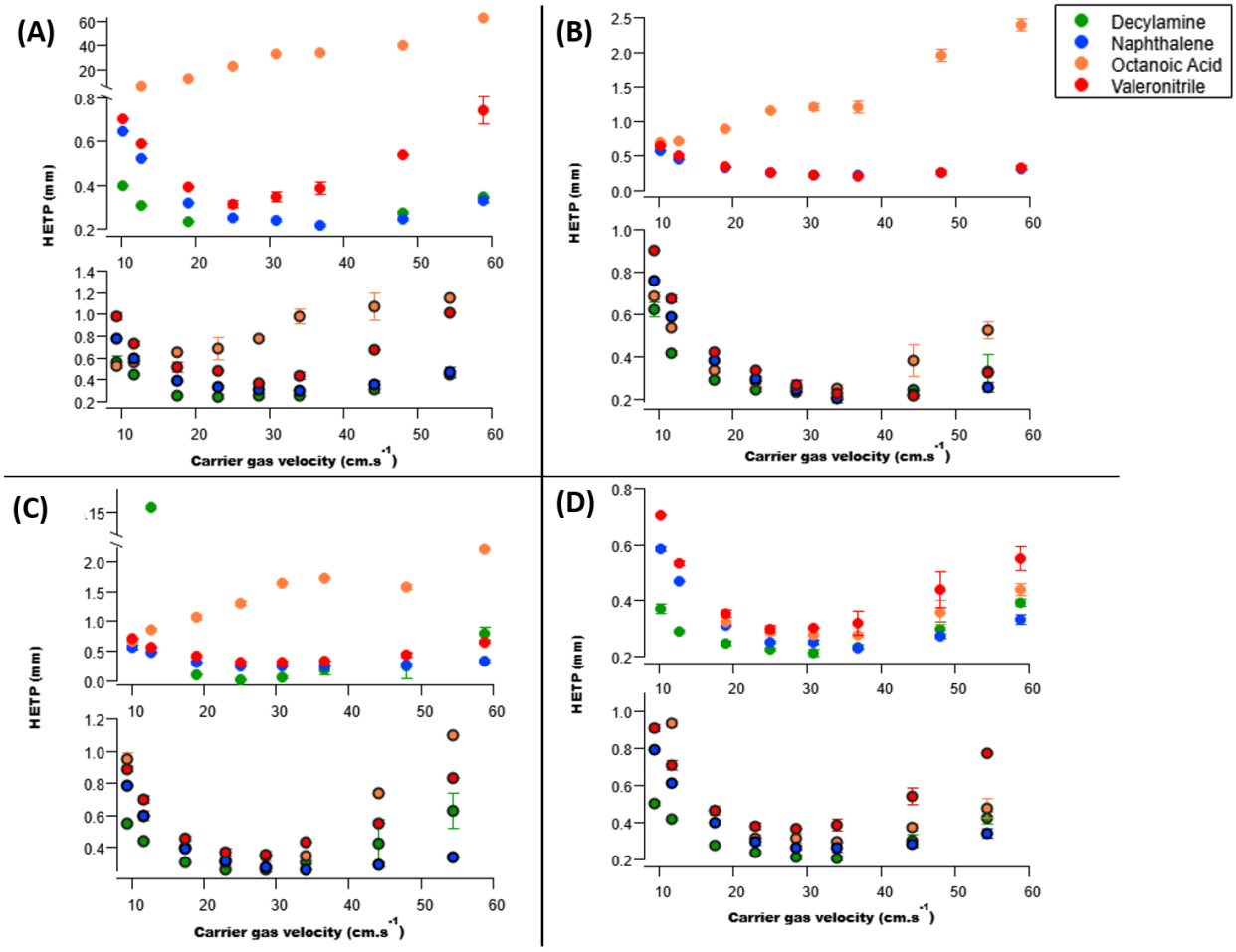


Figure III-1 : Courbes de Golay pour les différents composes testés et pour les quatre colonnes étudiées. Les valeurs de HEPT sont exprimées pour les différentes vitesses de gaz vecteur étudiées. (A) RTX-5, (B) RTX-20, (C) RTX-35 and (D) RTX-1701. Pour chaque sous-graphique, la courbe du haut correspond aux mesures faites à 100 °C et celle du bas à 150 °C. Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard des valeurs de HEPT des trois réplicats effectués pour chaque vitesse en gaz vecteur.

Au vu des différents débits optimaux obtenus, quelle que soit la colonne sélectionnée, des débits compris entre 1,0 et 1,5 mL.min^{-1} pourront être appliqués pour DraMS-GC. Un débit inférieur à 1,0 mL.min^{-1} conduirait à des durées d'analyse allongée avec des temps de rétention plus élevés. Par conséquent, avec de tels débits, les molécules les plus lourdes ne seraient pas détectées. En plus de cette considération, la forme des courbes de Golay doit également être prise en compte : l'augmentation des valeurs de HEPT et donc la diminution de l'efficacité est moins importante pour les fortes vitesses en gaz vecteur (côté droit des courbes) que pour les faibles vitesses. Ainsi, même si une

colonne possède un débit optimal inférieur à 1,0 mL.min^{-1} sur DraMS, l'augmentation de cette valeur mènerait simplement à une légère diminution de l'efficacité de la colonne.

De plus, la gamme de débit obtenue pour les colonnes RTX-1701 et RTX-20 est cohérente avec les performances et les contraintes prévues pour DraMS-GC alors que de légères différences sont observées pour les colonnes RTX-5 et RTX-35 pour les acides carboxyliques et les amines. En comparant les valeurs de HEPT des différentes phases stationnaires (Annexe III-2), celle de la RTX-20 est la plus efficace (=valeurs de HEPT les plus faibles) suivie par la RTX-1701 alors que les phases de la RTX-5 et de la RTX-35 montrent des efficacités similaires. Toutefois, ces différences, bien que soulignées ici, demeurent très faibles, et n'apparaissent pas comme significative en termes d'efficacité (différences < 20 %).

Pour conclure cette étude d'efficacité sur les colonnes générales en lice pour intégrer DraMS-GC, toutes les phases stationnaires étudiées apparaissent comme adéquate en termes d'efficacité pour l'analyse des composés attendus à la surface de Titan. En effet, l'étude menée ici n'apporte pas d'arguments forts en faveur d'une colonne ou d'une autre.

Colonne chirale

Comme pour les colonnes RTX, l'efficacité de la colonne chirale a également été caractérisée en représentant l'évolution expérimentale de la HEPT pour différentes valeurs de gaz vecteur à 100 et 150 °C (Figure III-2). Aux deux températures étudiées, l'efficacité de la colonne ChirasilDex correspond à la tendance théorique décrite par l'équation de Van Deemter-Golay pour tous les composés analysés. Il a même fallu abaisser la limite basse de la gamme de pression utilisée pour obtenir la forme théorique de la courbe de Van Deemter-Golay. À 100 °C, la valeur minimale de la HEPT obtenue est très similaire pour tous les composés, et correspond à des vitesses optimales en gaz vecteur comprises entre 21,9 et 29,1 cm.s^{-1}. Ces vitesses donnent une gamme de débit qui s'étend de 0,65 à 0,86 mL.min^{-1}. À 150 °C, la valeur minimale de HEPT est la même pour les quatre composés étudiés, donnant une valeur de vitesse optimale de 20,1 cm.s^{-1}, ce qui correspond à un débit de 0,6 mL.min^{-1}. Toutes ces valeurs sont présentées dans le Tableau III-6.

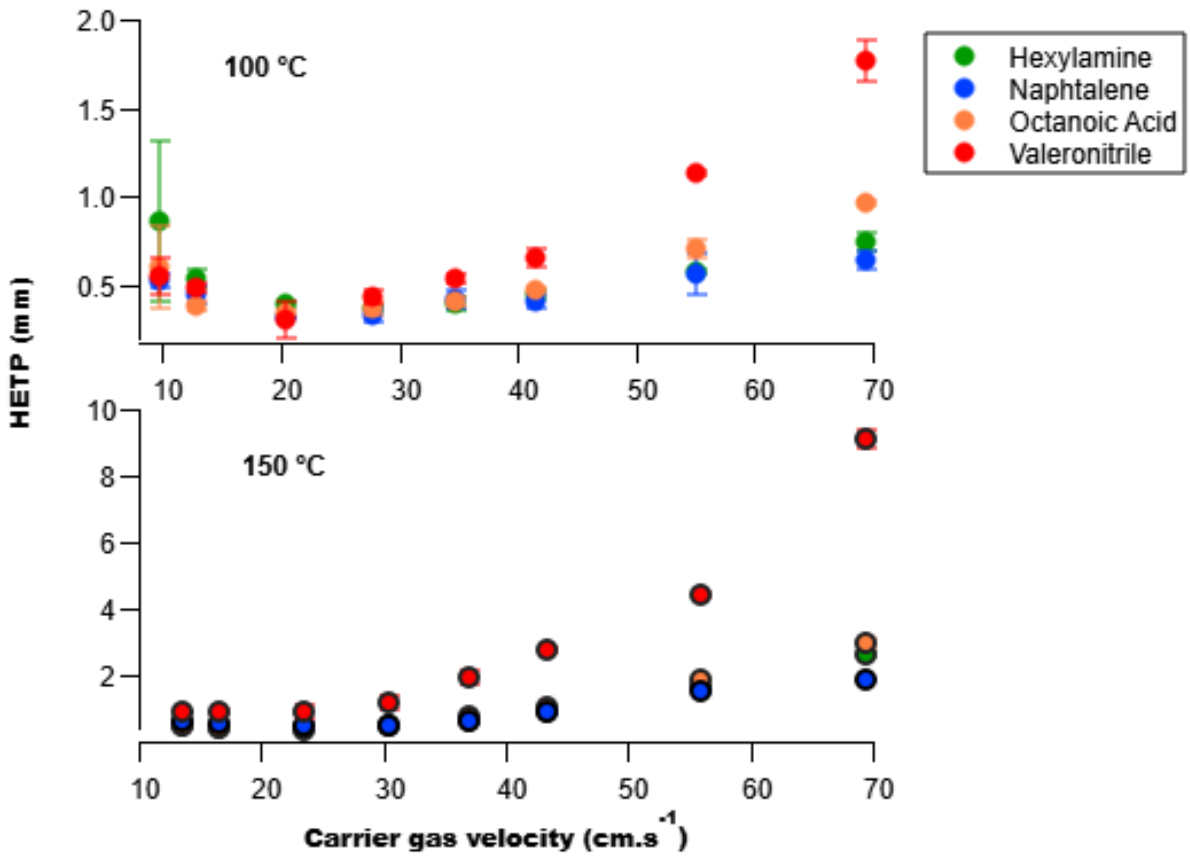


Figure III-2 : Variation de la HEPT en fonction de la vitesse en gaz vecteur ($cm.s^{-1}$) déterminée expérimentalement pour la colonne ChirasilDex, pour quatre composes différents à 100 °C (haut) and 150 °C (bas). Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard des valeurs de HEPT pour les trois réplicats effectués pour chaque vitesse en gaz vecteur.

La colonne chirale montre des valeurs de HEPT plus élevées que les colonnes RTX précédemment étudiées, signifiant que la phase chirale est moins efficace que les phases des colonnes générales. Ces différences d'efficacité sont probablement dues à la présence de cyclodextrine au sein du squelette de polysiloxane, ce qui diminue la quantité absolue de ce dernier dans la phase stationnaire. En outre, les débits optimaux sont plus faibles que ceux obtenus avec les colonnes RTX. Toutefois, en considérant la forme des courbes de Golay, la faible diminution de l'efficacité aux fortes vitesses en gaz vecteur signifie qu'un débit supérieur à 1 $mL.min^{-1}$ engendrerait simplement une faible baisse de l'efficacité toute en réduisant les temps de rétention des composés et la durée totale d'une analyse.

Tableau III-6 : Valeurs relatives à l'efficacité maximale pour les cinq composés confondus sur les cinq colonnes qui ont été étudiées: la pression d'entrée optimale (kPa), la vitesse en hélium correspondante (cm·s^{-1}) et le débit correspond (mL·min^{-1}).

Valeurs relatives à l'efficacité	RTX-5		RTX-20		RTX-35		RTX-1701		Chirasil-Dex	
	100 °C	150 °C	100 °C	150 °C	100 °C	150 °C	100 °C	150 °C	100 °C	150 °C
Pression (kPa)	100-150	125-150	150	150-200	125	100-150	100-150	125-150	75-100	75
Vitesse hélium (cm·s^{-1})	25.0-36.8	23.0-34.0	37.9	34.9-45.5	31.3	23.4-34.2	25.8-38.3	29.3-34.9	21.9-29.1	20.1
Débit hélium (mL·min^{-1})	0.7-1.1	0.7-1.0	1.1	1.0-1.3	0.9	0.7-1.0	0.8-1.1	0.9-1.0	0.6-0.9	0.6

3.2. Étude de rétention et de séparation avec des mélanges de standards.

La séparation et la rétention de nombreux standards appartenant à différentes familles chimiques a été étudiée pour les quatre colonnes RTX (Figure III-3). Une telle étude a également été menée sur la colonne CP ChirasilDex et les résultats sont présentés en Annexe III-3.

D'un point de vue général, pour chaque famille chimique, les temps de rétention sont très proches pour toutes les colonnes RTX sans différences flagrantes. La diversité des familles chimiques analysées et la masse moléculaire des différents standards a un impact direct sur la distribution des temps de rétention, qui sont ici répartis sur l'intégralité de la durée de l'analyse, à savoir 35 minutes. Une telle distribution pourrait être représentative des chromatogrammes complexes qui seront obtenus à la surface de Titan, étant donné la richesse attendue en molécules organiques dans les échantillons collectés. De plus, il est important de souligner pour le modèle de vol, qu'avec les conditions utilisées ici, il est possible de détecter des composés avec une chaîne carbonée allant jusqu'à 25 atomes de carbone quelle que soit la colonne RTX. Ceci n'est que la limite basse car aucun standard avec un plus grand squelette carbonée n'a été injecté.

Désormais, en regardant plus en détails l'élution des différents composés (Figure III-3 et Annexe III-1), la colonne RTX-5 donne les temps de rétention les plus élevés pour les alcanes. Ce constat était attendu étant donné que cette phase stationnaire est apolaire et a donc une meilleure affinité avec les composés apolaires en comparaison avec les autres phases. Cela explique donc pourquoi la rétention des alcanes diminiue avec l'augmentation de la polarité des phases. Le raisonnement inverse peut également s'appliquer aux composés polaires comme les amines ; plus un composé est polaire, plus son temps de rétention sera faible sur une phase stationnaire apolaire. Hormis les alcanes et les amines, la RTX-5 est la colonne qui affiche les temps de rétention les plus courts pour toutes les familles chimiques.

Pour la majortié des familles chimiques, les temps de rétention de la RTX-1701 sont compris entre ceux de la RTX-20 et de la RTX-35. Par conséquent, la polarité de la colonne RTX-1701 a été estimée pour être comprise entre celles de la RTX-20 et de la RTX-35. Toutefois, cette dernière possède des atomes d'azote dans la composition de sa phase stationnaire (du fait des groupements cyanopropylphényle), qui va donc avoir des interactions spécifiques avec les molécules azotées. Cette différence de composition par rapport aux autres colonnes pourrait expliquer les résultats observés pour les nitriles qui sont élués plus tardivement sur la RTX-1701 que sur les autres colonnes. Cette famille chimique est attendue pour être présente en abondance à la surface de Titan (voir pyrolyse des tholins, section III.3.5), et des temps de rétention élevés avec la RTX-1701 pourrait être un argument contre cette phase pour la sélection.

Pour le mélange de FAMEs analysé (contenant 37 molécules), le temps de rétention le plus élevé (correspondant au C_{25}) est aux alentours de 34 minutes, pour la colonne avec la plus haute rétention (RTX-20). Ce temps de rétention est parfaitement cohérent avec les futures analyses *in situ* qui sont habituellement d'une durée d'une heure. Toutefois, selon la phase stationnaire, il n'a pas été possible de détecter ou d'identifier les 37 composés contenus dans le mélange. En effet, dans cette solution de nombreuses espèces ont le même nombres d'atomes de carbone mais possèdent un nombre et une position différents des insaturations, se traduisant par des élutions très proches pouvant provoquer des coélutions. L'absence de spectromètre de masse ainsi que ce phénomène de coélution potentielle rendent l'identification stricte difficile. Voilà pourquoi, par exemple pour la RTX-35, il n'a pas été possible d'identifier le temsp de rétention du composé $C_{25:1}$. Une observation générale qui a pu être émise est que pour un même nombre d'atomes de carbone, la molécule insaturée sera éluée avant la moléculé saturée. La colonne RTX-5 a permis la détection du plus grand nombre de FAMEs avec la meilleure séparation et les temps de rétention les plus courts.

Il est important de souligner que la température maximale utilisée dans cette étude est de 250 °C qui est atteinte après 23 minutes. Toutefois, avec DraMS-GC, la température maximale sera de 300 °C ce qui engendrera une élution plus rapide de composés qui ont été élués après 23 minutes dans cette étude.

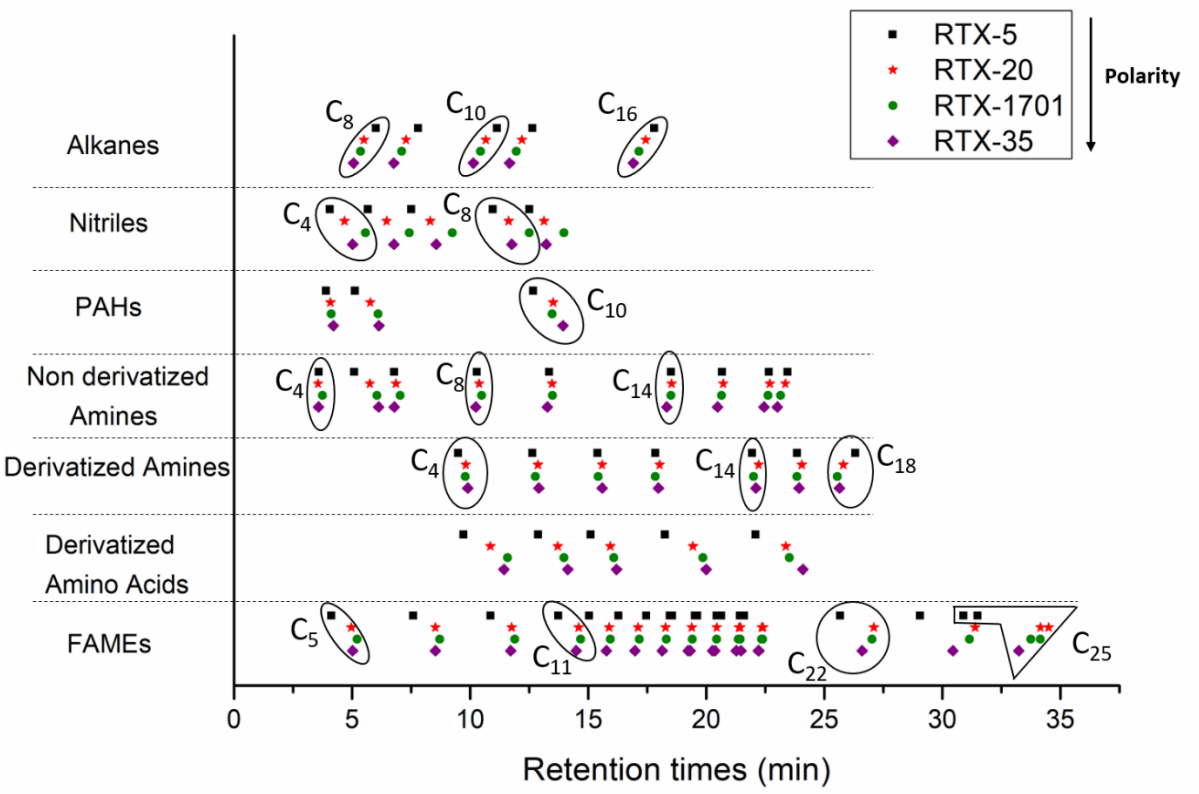


Figure III-3 : Temps de rétention (en minutes) des différents standards appartenant à plusieurs familles chimiques pour chaque colonne RTX. Les cercles sur le graphique entourent un même composé pour les quatre phases stationnaires avec l'indication du nombre d'atomes de carbone. Pour les FAMEs, le C_{25} encercle deux points : le premier est la forme insaturée alors que le second est la forme saturée. À noter que certains composés dans le mélange de FAMEs (notamment les formes insaturées) n'ont pas été représentés sur cette figure pour des soucis de lisibilité.

En comparant les temps de rétention des composés provenant de différentes familles chimiques, il apparaît que ces derniers sont très proches les uns des autres ce qui pourrait provoquer de nombreuses coélutions. Pour évaluer ces potentielles coélutions, tous les temps de rétention de chaque famille chimique ont été rassemblés pour chacune des colonnes, en supposant un échantillon qui contiendrait une telle diversité de molécules organiques Figure III-4. De nombreuses coélutions sont observées entre les différentes familles chimiques pour les colonnes RTX-1701 et RTX-35 alors que la RTX-5 et la RTX-20 ne présente seulement qu'une coélution, témoignant d'une meilleure séparation pour ces deux dernières. Cette observation, bien que pertinente, reste tout de même à tempérer, étant donné qu'un échantillon avec une telle complexité et diversité chimique n'est pas forcément représentatif de ce qui sera analysé sur Titan. De plus, les analyses ont été faites ici en GC-FID, mais l'utilisation d'un spectromètre de masse en tant que détecteur peut permettre de s'affranchir de certaines coélutions.

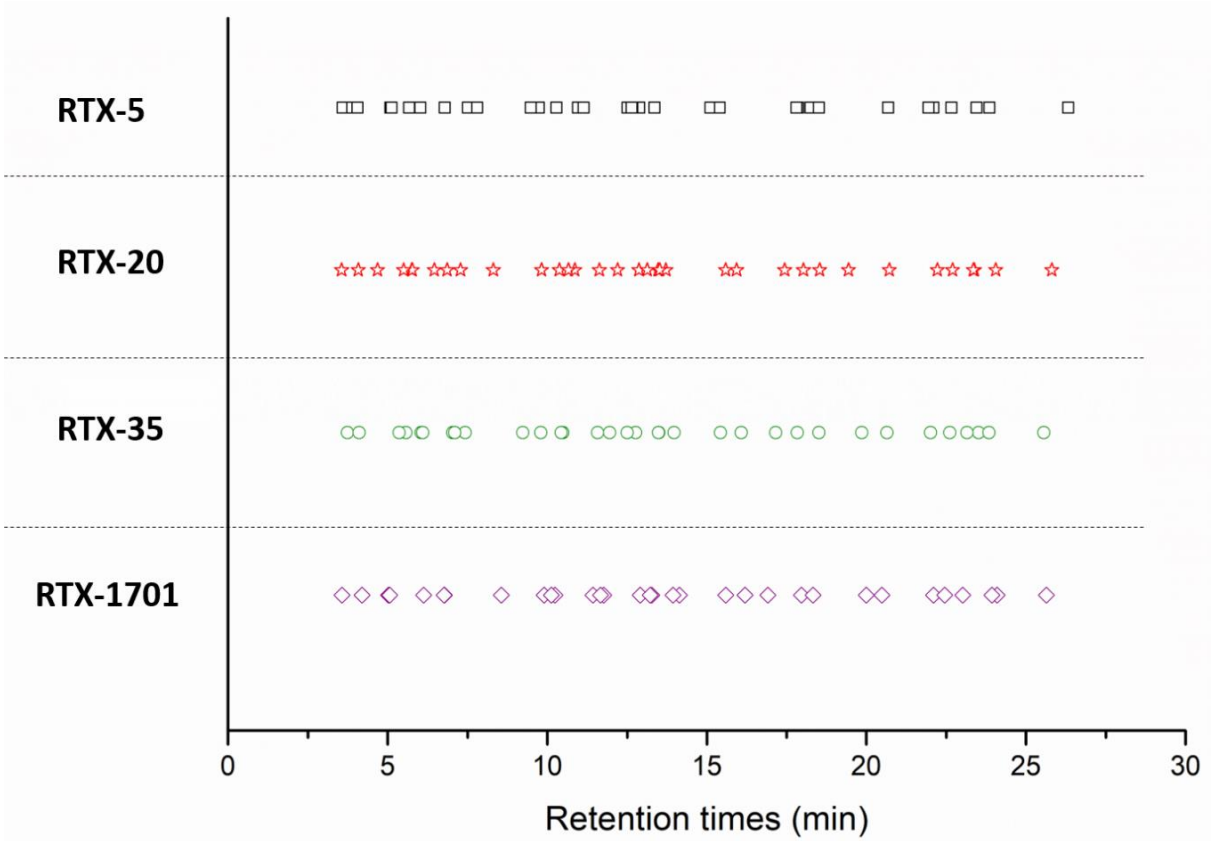


Figure III-4 : Temps de rétention de tous les standards chimiques étudiés (hormis les FAMEs) pour chaque phase stationnaire. Les FAMEs n'ont pas été présentés pour des soucis de lisibilité. Cette figure ne provient pas de résultats obtenus avec une seule analyse mais de la fusion des temps de rétention obtenus pour chaque familles chimique (Annexe III-1). Une telle représentation permet d'estimer les potentiels de séparation de chaque colonne.

Un dernier aspect à prendre en compte pour la sélection de la colonne générale de DraMS-GC est la forme du pic chromatographique. En effet, la forme des pics est influencée directement par la polarité des composés et par celle de la phase stationnaire. Un pic chromatographique symétrique et fin est privilégié car cela résulte en une meilleure capacité de résolution. Ainsi, pour les amines qui sont des composés polaires, la colonne RTX-5 du fait de sa phase faiblement polaire, montre des pics avec une traînée (également appelée tailing) comparée aux autres colonnes (Figure III-5). Un tel phénomène peut compliquer la détection et donc l'identification de composés, notamment si la concentration du composé d'intérêt est proche de la limite de détection. Les différences de polarité entre les colonnes RTX-20, RTX-35 et RTX-1701 ne semblent pas avoir d'influence sur le tailing pour les composés polaires.

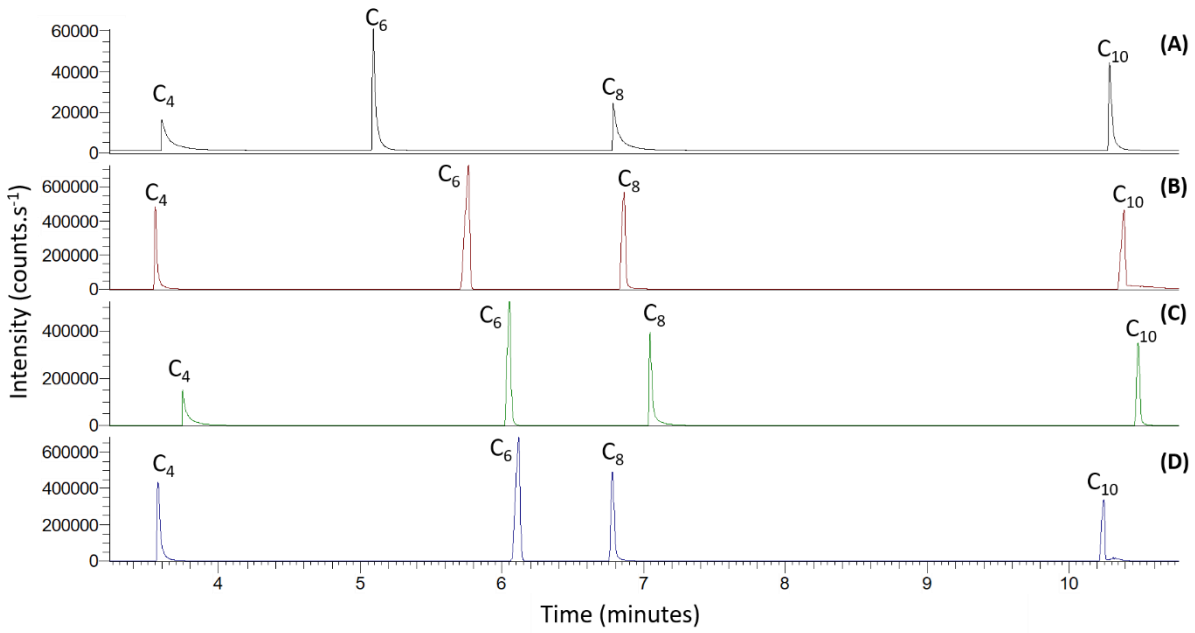


Figure III-5 : Chromatogrammes du mélange d'amine pour les quatre phases stationnaires : (A) RTX-5, (B) RTX-20, (C) RTX-1701 and (D) RTX-35. Pour chaque pic, le nombre d'atomes de carbone est indiqué.

3.3. Sélection de la colonne générale de DraMS-GC.

Après ces deux premières études, la sélection de la colonne générale qui sera intégrée à DraMS-GC a été basée sur différents critères : les capacités de séparation, la forme des pics chromatographiques (aussi gaussien que possible), les temps d'élution, la durée des analyses qui doit être la plus courte possible sur DraMS-GC et la robustesse des phases stationnaires.

Les deux premières études comparatives de l'efficacité et de la rétention pour les quatre colonnes RTX présélectionnées pour DraMS-GC n'ont pas permis de montrer qu'une colonne possédait toutes les meilleures capacités analytiques et devrait donc être préférentiellement intégrée au modèle de vol. Par conséquent, d'autres paramètres doivent également être considérés tels que la température minimale de fonctionnement, les propriétés physiques des colonnes et le bleeding (=dégradation de la phase stationnaire avec la température).

Sur *Dragonfly*, la zone dite « chaude » où le CPG sera placé aura une température maximum de 40 °C ce qui est la température minimale de fonctionnement de la phase stationnaire de la RTX-35. En dessous de cette température, la phase peut perdre ses capacités de rétention. Une température ambiante en dessous de 40 °C nécessiterait donc un préchauffage de la colonne avant l'analyse ce qui serait donc à la fois chronophage et énergivore. Les autres colonnes RTX ont une température minimale de –60 °C (RTX-5) et de -20 °C (RTX-20 et RTX-1701) ce qui n'impactera pas les analyses pour DraMS. Pour cette première raison technique et non négligeable, la colonne RTX-35 a été exclue de la sélection.

Un autre paramètre important à prendre en compte est le phénomène de bleeding de la phase stationnaire. Avec l'augmentation de la température au sein de la colonne chromatographique, la phase stationnaire se dégrade et les produits de ces dégradations thermiques (=espèces composées de siloxanes) sont donc détectés par le spectromètre de masse. L'interférence analytique due au bleeding est donc double : (i) la détection de pics chromatographiques supplémentaires provenant de la dégradation d'une forte quantité de phase stationnaire pendant l'analyse. Ce phénomène peut poser des problèmes si ces composés sont coélués avec des molécules d'intérêt provenant de l'échantillon. (ii) L'augmentation continue du bleeding avec la température se traduit par une augmentation de la contribution du siloxane dans le signal de fond, ce qui a pour conséquence d'altérer les limites de détection pour les composés d'intérêt dans l'échantillon analysé. Par conséquent, le bleeding de chaque colonne a été étudié en utilisant le même programme de température et plafonnant aux températures maximales de chaque colonne (Tableau III-1). La Figure III-6 présente l'évolution du bleeding, en scannant uniquement le ratio m/z = 207 u, caractéristique des siloxanes en spectrométrie de masse, en fonction de l'augmentation de la température du four du CPG. La RTX-1701 montre un bleeding plus intense et qui débute plus tôt dans l'analyse en comparaison avec les connes RTX-5 et RTX-20. En effet, sa phase stationnaire, étant plus fragile que celles de la RTX-5 et de la RTX-20 a une température maximale de fonctionnement de 280 °C contre plus de 300 °C pour les deux autres colonnes.

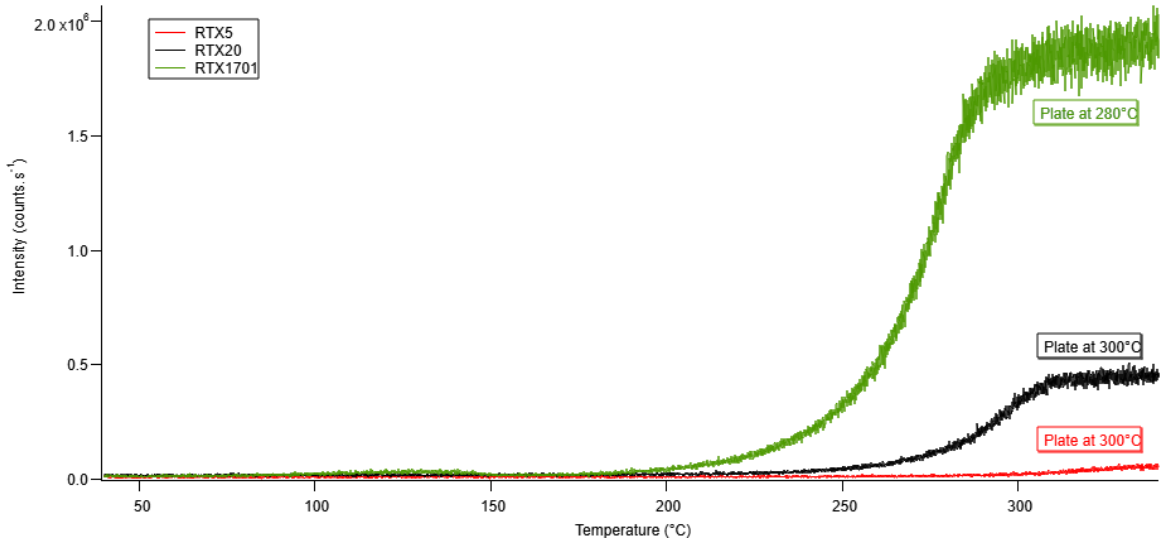


Figure III-6 : Comparaison du bleeding des colonnes RTX-5, RTX-20 et RTX-1701 en fonction de la température. Seul le ratio m/z = 207 u est représenté car caractéristique du bleeding des phases stationnaires. Le même programme de température a été utilisé pour les trois colonnes : la colonne chromatographique a été chauffée de 40 °C à 280 °C (RTX-1701) ou 300 °C (RTX-5 et RTX-20) maintenu pendant un minimum de 5 minutes avec une rampe de 10 °C.min^{-1}.

De plus, la température maximale prévue pour DraMS est de 300 °C. Pour des colonnes de la même géométrie, pouvoir atteindre des teépratures plus élevées permet d'obtenir des temps de rétention plus courts. Comme la colonne RTX-1701 a une température de fonctionnement maximale plus faible que la RTX-5 et la RTX-20, le temps d'analyse pour un mélange de composés donné devrait

être plus long sur la RTX-1701, limitant le nombre total de composés qui pourront être détectés. Par conséquent, la colonne RTX-1701 n'a pas été sélectionnée pour intégrer DraMS-GC.

Finalement, la colonne RTX-5 est connue pour être robuste d'un point de vue thermique (Figure III-6) et a déjà été envoyée plusieurs fois dans l'espace. De plus, la colonne RTX-20 est actuellement à bord du rover Curiosity au sein de l'instrument SAM, et présente un très fort bleeding dans les analyses *in situ* (température maximale de 250 °C) alors que la colonne RTX-5 présent un bleeding plus faible avec la température maximale prévue pour DraMS (300 °C)/ En s'appuyant sur tous ces éléments, la colonne RTX-5 a été choisie pour être la colonne chromatographique générale qui sera intégrée à DraMS-GC. Son potentiel de détection et de séparation pour une large gamme de composés attendus sur Titan, notamment ceux d'intérêt pour la chimie prébiotique font de cet colonne la plus pertinente pour la future exploration de Titan.

La colonne RTX-5 étant sélectionnée, se pose désormais la question de l'épaisseur de la phase stationnaire. En effet, les temps de rétention mesurés avec la RTX-5 pour tous les composés analysés sont inférieurs à la durée d'une analyse prévue pour DraMS-GC, à savoir environ 40 minutes. Par conséquent, une colonne RTX-5 avec une phase stationnaire plus épaisse (0,5 µm) a été testée pour évaluer si une potentielle amélioration des capacités de séparation étaient possibles. La comparaison entre les deux phases stationnaires est présentée sur la Figure III-7, par analyse d'un des mélanges complexes de standards utilisé par la suite. Les résultats obtenus entre les deux épaisseurs de phase ne montrent pas de résultats significatifs en terme de séparation et de formes de pic chromatographique. La seule différence notable est l'augmentation des temps de rétention lorsque la phase stationnaire est plus épaisse, à savoir un décalage d'une minute et demi voire plus pour les composés plus lourds. En se basant sur ce chromatogramme, la colonne RTX-5 avec une épaisseur de phase de 0,25 µm a donc été sélectionnée pour être la colonne chromatographique générale de DraMS-GC. Par conséquent, tous les résultats présentés par la suite ont été menés sur les deux colonnes qui partiront sur Titan, à savoir la RTX-5 (0,25 µm d'épaisseur de phase) et la CP Chirasil-Dex.

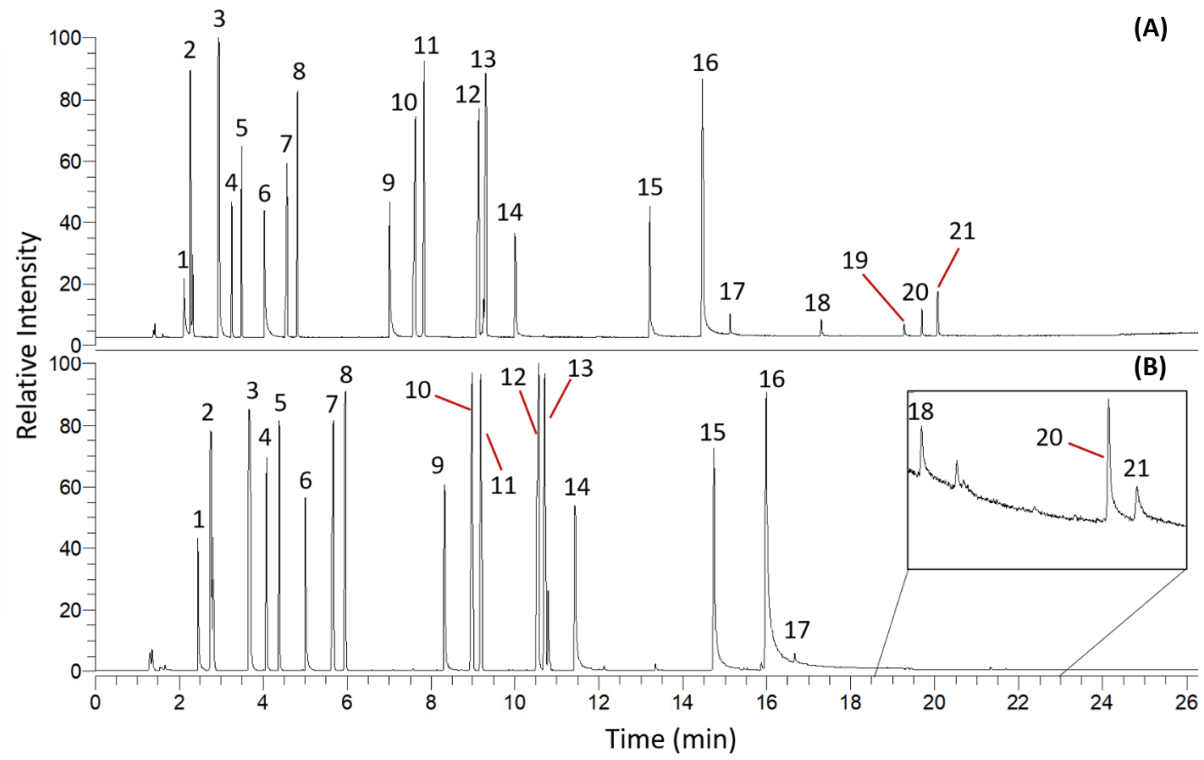


Figure III-7 : Chromatogrammes (obtenu en TIC) du mélange n°1 (alcanes, nitriles, HAPs et amines sur la colonne RTX-5 avec deux épaisseurs de phase : (A) 0.25µm and (B) 0.5µm. la colonne chromatographique a été chauffée de 40 °C à 300 °C avec une rampe de 10 °C.min^{-1}. La temperature finale a été maitnenue pendant 15 minutes. 0.3 µL were injected with a split ratio of 40. Attribution des pics : (1) Butanamine, (2) Benzène, (3) Pyridine, (4) Pentanenitrile, (5) Octane, (6) Hexanamine, (7) Hexanenitrile, (8) Nonane, (9) Octanamine, (10) Octanenitrile, (11) Undecane, (12) Nonanenitrile, (13) Dodecane, (14) Decanamine, (15) Dodecanenitrile, (16) Hexadecane, (17) Tetradecanamine, (18) Hexadecanamine, (19) Octadecanamine, (20) Didecanamine, (21) Steraonitrile.

3.3. Analyse de mélanges complexes et d'analogues des aérosols de Titan avec les colonnes chromatographiques de DraMS-GC.

Un des objectifs de ces deux dernières études est d'évaluer la séparation et la détection avec les deux colonnes chromatographiques (générale et chirale) qui seront intégrées à DraMS-GC en utilisant des mélanges complexes de standards. Les chromatogrammes qui seront ainsi obtenus constitueront un premier panel de temps de rétention dans les conditions prévues pour DraMS pour des composés qui seront recherchés à la surface de de Titan. Ces premiers temps de rétention pourront contribuer au traitement et à l'interprétation des futures données *in situ*.

Le second objectif est d'analyser des échantillons analogues aux aérosols organiques de Titan (= tholins de Titan) pour obtenir des données sur l'échantillon le plus représentatif à notre disposition. Ainsi, il sera possible d'estimer et d'anticiper le matériel qui sera collecté par DrACO pour les analyses effectuées par DraMS. De plus, sur DraMS, trois méthodes de préparation d'échantillon seront utilisées pour vaporiser les espèces chimiques, dans l'optique d'extraire un maximum de molécules organiques : la pyrolyse, la dérivatisation avec le DMF-DMA et la thermochimiolyse. Ici seules les deux premières méthodes ont été employées. La pyrolyse a été effectuée car c'est une méthode qui est

communément utilisée pour les analyses *in* situ sur des échantillons brutes. La dérivatisation au DMF-DMA a également été étudiée étant donné que cette méthode préserve les propriétés chirales des molécules. Pour ces raisons, ces deux méthodes ont été employées pour analyser la fraction des tholins de Titan qui peut être extraite.

Toutefois, cette approche possède ses limitations qualitatives et quantitatives. En effet, les standards chimiques ont tous des puretés très élevées, par conséquent, les concentrations de chaque composé sont probablement bien plus élevées que celles attendues sur Titan. De plus, les tholins sont qualifiés d'analogues, mais des différences avec ce qui est attendu sur Titan existent tout de même. À titre d'exemple, la présence de composés oxygénés dans les tholins due la contamination par de l'oxygène moléculaire provenant de l'atmosphère ambiante lors de la récolte des poudres (Gautier *et al.* 2014b).

3.3.1 Séparation générale avec les colonnes chromatographiques de DraMS-GC.

Deux mélanges de standards chimiques ont été préparés pour évaluer la séparation générale des deux colonnes de DraMS-GC. Le premier, qualifié d'apolaire, est composé d'alcanes, de nitriles, d'HAPs et d'amines et est injecté directement sans aucune préparation. Le second, composé uniquement de molécules polaires (amines, acides carboxyliques et acides aminés) subit la réaction de dérivatisation au DMF-DMA avant son injection. La composition de ces deux mélanges est détaillée dans le Tableau III-4.

Pour le premier mélange (Figure III-8), tous les standards chimiques ont été détectés et élués en 20 minutes sur la colonne RTX-5. Sur la colonne chirale, tous les composés étudiés exceptées les amines les plus lourdes (C_{10}, C_{14}, C_{16} et C_{18}) sont élués en 23 minutes. Ces temps d'élutions correspondent aux temps de rétention des composés les plus gros, la didécanamine et le stéaronitrile. Ce premier résultat suggère que DraMS-GC devrait pouvoir éluer des composés de plus de 25 atomes de carbone (selon leur polarité) avec une durée d'analyse inférieure à 40 minutes, ce qui est actuellement la limite supérieure supposée pour les durées d'analyses en CPG-SM.

De plus, tous les composés sont distribués tout au long du chromatogramme et séparés pour les deux colonnes, ce qui limite les coélutions et par conséquent facilite l'identification des molécules dans le mélange. Ces deux colonnes présentent une redondance dans leur capacité à réaliser une séparation générale. Cela signifie que si un des deux modules contenant les colonnes présentent un défaut lors des analyses *in situ*, les informations ne seront pas entièrement perdues.

Un autre aspect à prendre en compte est l'ordre d'élution des différents composés sur les deux colonnes, directement relatif à la sélectivité des phases stationnaires. D'un point de vue général, le schéma de rétention est le même pour les deux colonnes mais quelques inversions sont observées. Par exemple, les temps de rétention des pairs de composés 8-9, 11-12 et 13-14 sont inversés entre les deux colonnes (Figure III-8). Ces inversions, causées par la sélectivité des phases, peuvent représenter un réel atout. En effet, elles peuvent aider dans l'identification de molécules, par exemple sur une colonne certains composés peuvent être coélués alors qu'ils seront bien séparés sur l'autre. Ainsi,

l'analyse d'un échantillon avec les deux colonnes peut être parfaitement avantageuse pour l'identification des molécules en croisant les données obtenues.

Enfin, la forme des pics de chaque composé est également à prendre en considération. La plupart des molécules détectés montrent des pics symétriques pour les deux colonnes, ce qui minimise les possibilités de chevauchement entre deux pics, pouvant rendre l'identification compliquée dans certains cas. Toutefois, comme déjà observé précédemment, avec la colonne RTX-5 les pics correspondant aux amines présentent un tailing dû à leur polarité élevée mais la forme du pic reste toutefois satisfaisante. Concernant la colonne chirale, les intensités des pics correspondant aux amines apparaissent vraiment faibles même pour les amines les plus légères (C_4, C_6 et C_8) avec un très fort tailing. Cela explique pourquoi les amines aliphatiques ne sont pas mentionnées sur la Figure III-8 pour la colonne chirale. En effet, le squelette siloxane de la phase stationnaire est apolaire et le pourcentage de β-cyclodextrine est relativement bas (aujourd'hui le pourcentage de cyclodextrine dans la phase du CP Chirasil-Dex est de l'ordre de 30 à 40 % en masse), ce qui fait de la colonne Chirasil-Dex, une colonne apolaire, expliquant la forme de tels pics pour des composés polaires. Dans l'optique d'améliorer la forme de ces pics, le dérivatisation au DMF-DMA peut être employée, rendant les composés moins polaires, plus volatiles et améliorant donc la forme des pics chromatographiques correspondants.

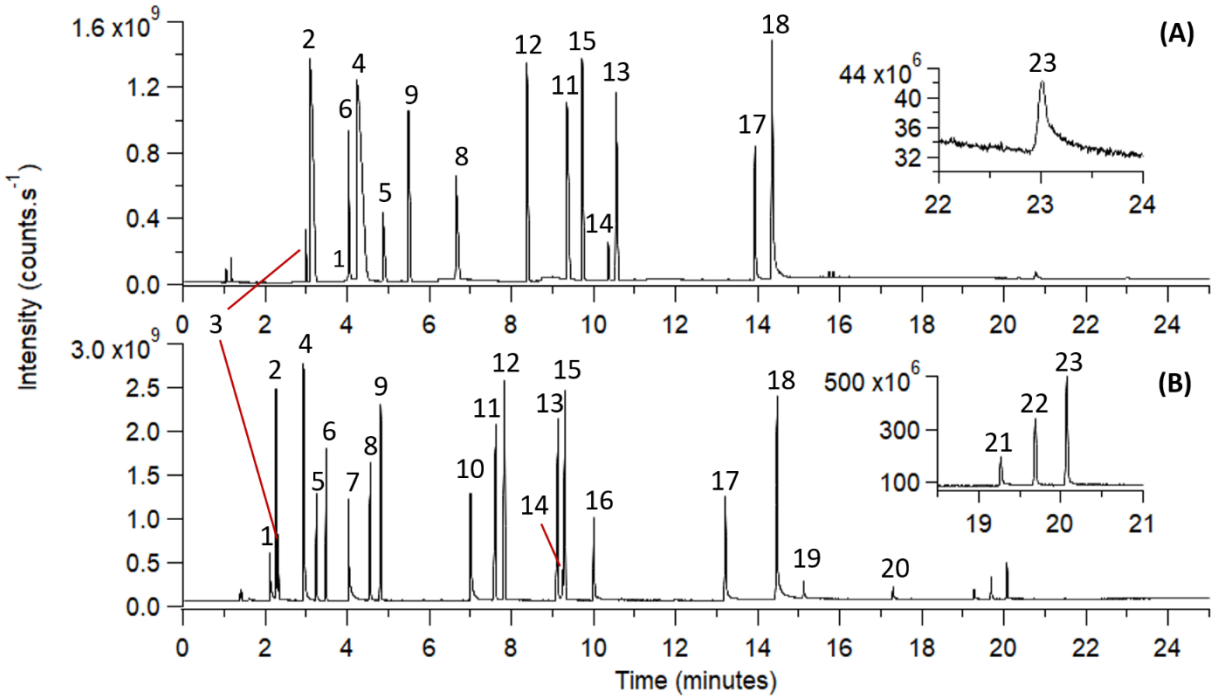


Figure III-8 : Chromatogrammes (obtenus en TIC) du premier mélange de standards, qualifié d'apolaire (alcanes, HAPs, nitriles, amines) analysé avec les colonnes (A) CP-ChirasilDex et (B) RTX-5. La colonne a été chauffé de 40 °C à 200 °C (Chirasil-Dex) ou 300 °C (RTX-5) maintenue 15 minutes avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}. Le débit en hélium était de 1mL·min^{-1}. 0.3 µL ont été injectés avec un ratio de split de 40. Attribution des pics: (1) Butanamine, (2) Benzene, (3) Butanenitrile, (4) Pyridine, (5) Pentanenitrile, (6) Octane, (7) Hexanamine, (8) Hexanenitrile, (9) Nonane, (10) Octanamine, (11) Octanenitrile, (12) Undecane, (13) Nonanenitrile, (14) Naphtalene, (15) Dodecane, (16) Decanamine, (17) Dodecanenitrile, (18) Hexadecane, (19) Tetradecanamine, (20) Hexadecanamine, (21) Octadecanamine, (22) Didecanamine, (23) Stearonitrile.

Pour le second mélange, tous les composés sont élués en 23 minutes pour la RTX-5 et en 35 minutes pour la colonne chirale (Figure III-9). Pour cette dernière, il pourrait être compliqué de détecter des molécules avec un squelette carboné avec plus de 20 atomes de carbones (selon leur polarité) sur Titan, car ceux-ci pourraient être élués en dehors tu temps dédié aux analyses CPG-SM avec DraMS. Comme pour le premier mélange, les temps de rétention des molécules dérivatisées au DMF-DMA sont distribués sur l'intégralité du chromatogramme et sont bien séparés les uns des autres. Ici aussi, les deux colonnes présentent une redondance dans les capacités de séparation, ce qui augmente les probabilités d'identification de composés dans les futures analyses *in situ* même si des problèmes analytiques apparaissent avec une colonne pendant la mission.

L'ordre d'élution des composés dérivatisés est le même pour les deux colonnes, excepté pour l'amide qui est présente (=butanamide, composé n°7). Avec la colonne CP Chirasil-Dex, pour les composés les plus lourds (comme les composés n°18 et n°19, Figure III-9), l'écart entre deux pics est plus important qu'avec la colonne RTX-5, ce qui améliore la séparation mais engendre une diminution de l'intensité des pics. Cette différence d'écart dans les temps de rétention est très probablement due aux températures maximales de fonctionnement qui diffèrent entre les deux colonnes (200 °C contre 300 °C).

De plus, la dérivatisation au DMF-DMA permet d'améliorer la forme des pics chromatographiques, comme cela était attendu en abaissant la polarité des molécules. Ainsi le tailing pour les composés polaires est fortement diminué ce qui rend les pics quasiment symétriques, que ce soit sur la colonne RTX-5 ou sur la CP Chirasil-Dex.

Enfin, pour les amines, les temps de rétention des molécules dérivatisées sont plus importants que pour les molécules non dérivatisés (en comparant avec la Figure III-8), car la dérivatisation au DMF-DMA substitue un hydrogène par un groupement plus lourd (Gümüş and Koca 2020)(un groupement diméthylformamidine pour les amines primaires par exemple, voir chapitre II). Avec la colonne chirale, les amines aliphatiques les plus légères (C_4, C_6 et C_8) ainsi que les plus lourdes (C_{10}, C_{14}, C_{16} et C_{18}) peuvent être identifiées quand elles sont dérivatisées avec le DMF-DMA, ce qui n'est pas le cas sous leurs formes brutes. Cela signifie que les amines peuvent être détectées de différentes manières dans un même échantillon, à la fois non dérivatisées et dérivatisées avec la colonne générale RTX-5 et seulement dérivatisées avec la colonne chirale CP Chirasil-Dex. Par conséquent, la détection et l'identification de tels composés sur Titan, s'ils sont présents (comme cela est attendu), semblent être assurées avec les colonnes sélectionnées et la dérivatisation au DM-DMA.

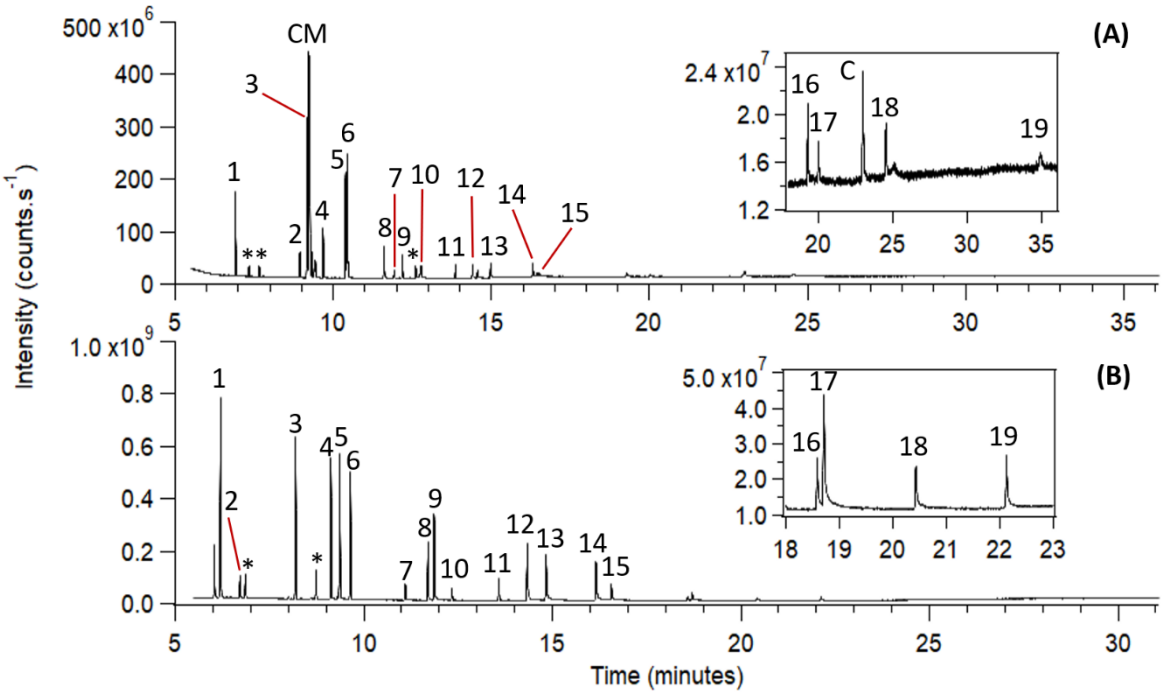


Figure III-9 : Chromatogrammes (obtenus en TIC) de second mélange (amines, acides carboxyliques et acides aminés) après sa dérivatisation au DMF-DMA et analysé avec les colonnes (A) CP-ChirasilDex et (B) RTX-5. La colonne a été chauffée de 40 °C à 200 °C (Chirasil-Dex) ou 300 °C (RTX-5) maintenue 15 minutes avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}. Le débit en hélium était de 1mL·min^{-1}. 0.3 µL ont été injectés avec un ratio de split de 40. Les chromatogrammes débutent à 5 minutes pour éviter la saturation du détecteur par le DMF-DMA, d'autant qu'aucun composé n'est élué avant. Attribution des pics : (1) Butanamine, (2) N-ethyl-N-propanamine, (3) Acide octanoïque, (CM) Molécule chirale : 2-aminoheptane, (4) Hexanamine, (5) Alanine, (6) Acide nonaïque, (7) Butanamide, (8) Leucine, (9) Octanamine, (10) Acide undécanoïque, (11) Acide doécanoïque, (12) Decanamine, (13) Acide glutamique, (14) Phenylalanine, (15) Dodecanamine, (16) Tetradecanamine, (17) Lysine, (18) Hexadecanamine, (19) Octadecanamine, (C) Contamination : stearonitrile d'une analyse précédente. (*) Co-produits du DMF-DMA.

3.4. Séparation énantiomérique de standards chimiques chiraux

La séparation énantiomérique a été étudiée en analysant un mélange ne contenant que des composés chiraux, provenant de quatre familles chimiques différentes (Figure III-10). Ce mélange a tout d'abord été injecté sans aucune préparation, et a également été dérivatisé au DMF-DMA avant son analyse, résultant donc en deux séries d'analyse des mêmes standards chimiques. La composition de ce mélange ainsi que les temps de rétention associés sont présentés dans le Tableau III-4.

Premièrement, les résultats obtenus sans la dérivatisation au DMF-DMA montrent une séparation chirale pour les alcools, l'amine secondaire, les acides carboxyliques et les nitriles (Figure III-10). Les isomères optiques des amines primaires ne sont en revanche pas séparés ou la résolution est trop faible pour quantifier une potentielle séparation. Pour l'amine secondaire, il est également important de souligner qu'une autre paire d'énantiomère est détectée mais non identifiée. Celle-ci semble être relative à l'amine secondaire car est également retrouvée lorsque cette même amine est injectée seule. La colonne CP Chirasil-Dex, sans la dérivatisation au DMF-DMA, permet donc de résoudre 7 pairs d'énantiomères sur les 9 étudiées.

En regardant les résultats obtenus avec la dérivatisation au DMF-DMA (Figure III-10), il apparaît que celle-ci a plusieurs effets sur l'analyse du mélange chiral. Tout d'abord, la fonctionnalisation permet la séparation des deux amines primaires (2-aminobutane et 2-aminopentane) ce qui n'était pas le cas quand le mélange n'était pas dérivatisé. De plus, pour l'amine secondaire étudiée (N-methyl-2-pentanamine), les énantiomères sont séparés avec ou sans dérivatisation. La dérivatisation au DMF-DMA ne modifie pas la séparation énantiomérique des alcools étant donné que ceux-ci sont difficilement dérivatisables avec le DMF-DMA du fait de leur faible nucléophilie.

Enfin, concernant les deux acides carboxyliques, les temps de rétention des formes dérivatisés sont beaucoup plus faibles que les formes pures. Par exemple, pour l'acide 4-methyloctanoïque, son temps de rétention passe de 23,40 minutes à 16,00 minutes avec la dérivatisation. De plus, la dérivatisation ne semble pas améliorer la séparation énantiomérique pour les deux acides carboxyliques. En effet, pour l'acide 2-méthybutanoïque, les énantiomères sont résolus avec et sans dérivatisation mais la valeur de résolution (ratio entre les temps de rétention des deux énantiomères et la somme des deux largeurs à mi-hauteur des deux pics) est plus élevée lorsque la dérivatisation n'est pas appliquée (6,9 sans dérivatisation contre 1,62 avec). Pour l'acide 4-méthyloctanoïque, les énantiomères sont complètement coélués lorsque la dérivatisation au DMF-DMA est appliquée alors qu'ils sont résolus sans cette dernière. Ces résultats peuvent potentiellement être expliqués par le fait que la configuration stérique des deux acides carboxyliques est modifiée avec la dérivatisation. Cela signifie donc, qu'avec la colonne chirale, l'analyse de molécules chirales avec et sans dérivatisation au DMF-DMA est complémentaire.

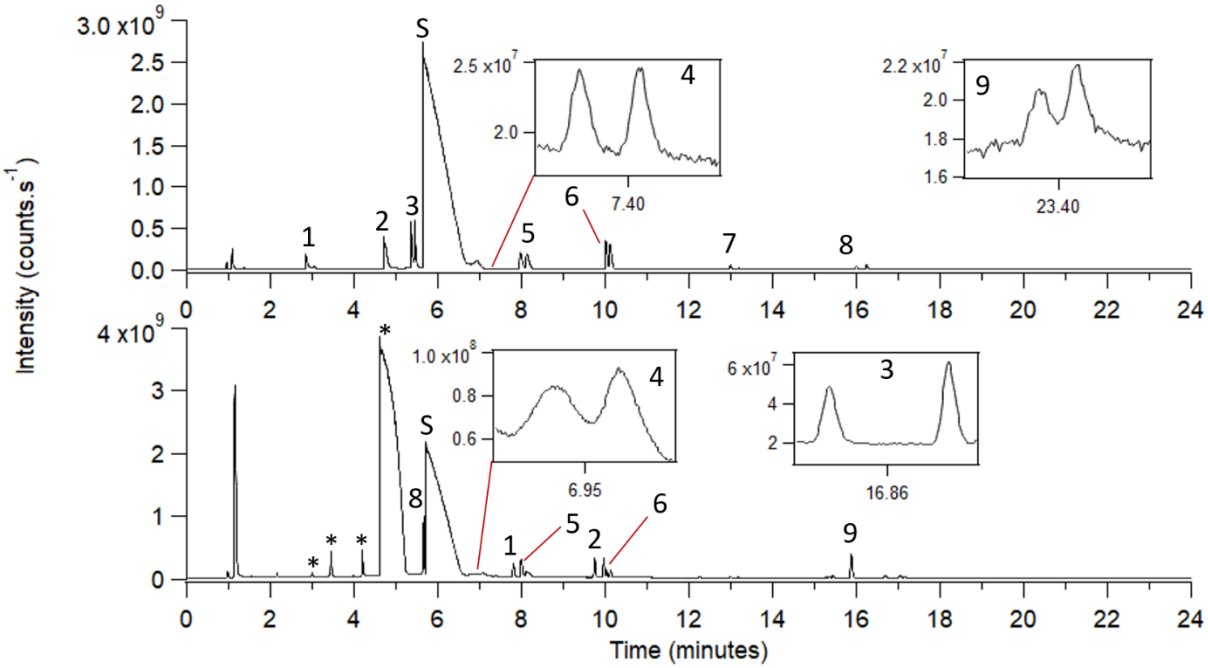


Figure III-10 : Chromatogrammes (obtenus en TIC) du mélange chiral non dérivatisé (haut) et dérivatisé au DMF-DMA (bas) avec la colonne CP-Chirasil-Dex. La colonne a été chauffée de 40 °C à 200 °C (maintenue 15 minutes) avec une rampe de 5 °C.min^{-1}. Une rampe de 5°C.min^{-1} a été déterminée pour donner la meilleure séparation énantiomérique sans engendrer une durée d'analyse trop élevée pour les composés étudiés. Le débit en hélium était de 1mL·min^{-1}. 0.3 µL ont été injectés avec un ratio de split de 40. Attribution des pics : (1) 2-aminobutane, (2) 2-aminopentane, (3) N-méthyle-2-pentanamine, (4) 2-Pentanol, (5) 2-méthylpentanenitrile, (6) 2-Hexanol, (7) Enantiomères non identifiés relatif au N-methyl-2-pentanamine, (8) Acide 2-méthylbutanoïque (9) Acide 4-méthyloctanoïque, (S) Solvant : DMF, (*) Co-produits du DMF-DMA.

3.5 Analyse de tholins avec les colonnes de DraMS-GC.

Les tholins de Titan ont été analysés par pyrolyse à 600 °C (température de pyrolyse qui a été utilisée par l'Aerosol Collector Pyrolyzer (ACP) à bord de la sonde atmosphérique Huygens (Israël et al. 2005)) et par dérivatisation au DMF-DMA, et ont été dans les deux cas analysés par les deux colonnes de DraMS-GC. Il est important de souligner que ces analyses ne cherchent pas à optimiser les conditions de pyrolyse ou de dérivatisation des tholins, ni à identifier précisément la gamme de composés détectée. Ici, les tholins sont utilisés comme analogues pour démontrer la séparation des composés du proxy le plus représentatif à disposition avec les colonnes qui seront embarqués à bord de l'instrument DraMS.

• ***Pyrolyse des tholins à 600 °C.***

La majorité des molécules de la pyrolyse des tholins ont été éluées en 20 minutes avec la RTX-5 et en 22 minutes avec la Chirasil-Dex (Figure III-11). Certaines molécules non identifiées sont éluées plus tardivement mais l'intensité des pics est trop proche du bruit de fond pour une stricte d'identification. Le chromatogramme obtenu apparaît très riche en pics chromatographique ce qui demeure très compliqué à interpréter, l'identification étant rendue très compliquée par la présence de très nombreuses coélutions (potentiellement dues à des isomères au vu des spectres de masse). La

pyrolyse des tholins a déjà été étudiée dans des études passées et plusieurs familles chimiques ont été identifiées : des nitriles aliphatiques, des cycles azotés et des alcanes à la fois aliphatiques et aromatiques (Coll *et al.* 2013; McGuigan *et al.* 2006; Morisson *et al.* 2016). Au travers de cette étude, des composés similaires ont été identifiés, à savoir des molécules aromatiques, des nitriles mais aussi des composés oxygénés.

Les molécules aromatiques azotés et les nitriles aliphatiques ont également été déjà identifiés dans des études passées par différentes méthodes complémentaires autres que la pyrolyse-CPG-SM, telles que la chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un détecteur Orbitrap® (HPLC-Orbitrap) (Gautier *et al.* 2016) et par résonance magnétique nucléaire (Derenne *et al.* 2012). Parmi ces molécules aromatiques azotés, les dérivés de triazine, constamment identifiés sont connus pour être d'une importance majeure dans la composition des tholins (Quirico *et al.* 2008).

Les amines linéaire sont des molécules qui ne sont pas retrouvées dans l'analyse de la pyrolyse des tholins, que ce soit dans cette étude ou dans celles passées, alors qu'elles sont attendues pour être présentes dans les aérosols de l'atmosphère de Titan (Raulin *et al.* 2012). Cela justifie notamment le fait de devoir utiliser d'autres méthodes de préparation d'échantillon comme la dérivatisation ou la thermochimiolyse à bord de Dragonfly.

En comparant les résultats obtenus avec les deux colonnes, il apparaît que la colonne chirale permet la détection d'un plus grand nombre de nitriles que la colonne générale. Ces nitriles peuvent provenir de la composition des tholins directement, car ils ont déjà été identifiés par spectroscopie infrarouge (Gautier *et al.* 2012; Imanaka *et al.* 2004) ou des amines primaires présentes dans les tholins qui se transforme en nitriles pendant la pyrolyse (Moldoveanu 2009). Cette seconde hypothèse pourrait justifier le fait qu'aucune amine primaire n'est identifiée lorsque les tholins sont pyrolysés.

Enfin, de très nombreux pics restent non identifiés, mais l'analyse des tholins pyrolysés permet la détection de très nombreuses molécules. La détection de certains composés sur une ou l'autre colonne souligne encore le fait que ces eux colonnes sont complémentaires dans l'analyse. Les deux colonnes DraMS-GC sont donc adaptées pour l'analyse de la pyrolyse de matériel similaire aux tholins. Toutefois, un travail profond d'optimisation de température de pyrolyse et d'identification sera nécessaire pour tenter d'extraire un maximum d'information de ces tholins.

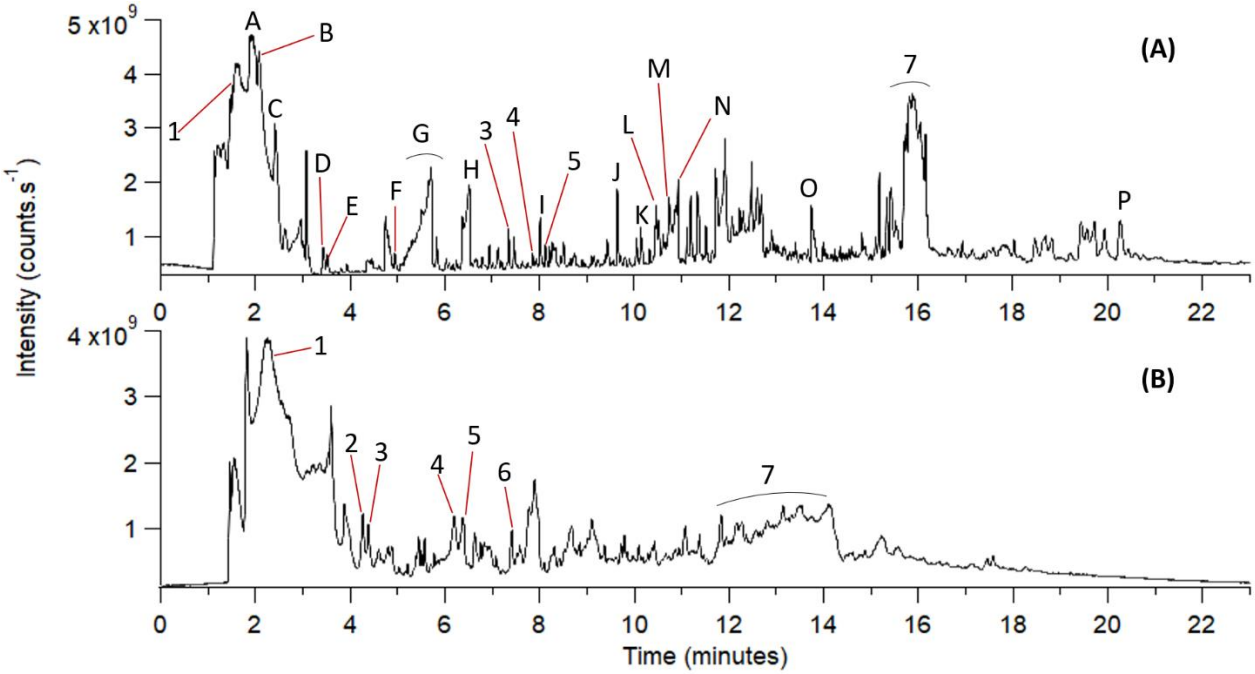


Figure III-11 : Chromatogramme (obtenu en TIC) des tholins pyrolysés à 600 °C avec les colonnes (A) ChirasilDex et (B) RTX-5. La colonne a été chauffée de 40 °C à 200 °C (Chirasil-Dex) ou 300 °C (RTX-5) maintenue 15 minutes avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}. Le débit en hélium était de 1mL·min^{-1}. Attribution des pics : (1) HCN, (2) Pyrrole-2-methyl, (3) Pyrrole-3-methyl, (4) Pyrrole 2,5 dimethyl, (5) Pyrrole 2,3 dimethyl, (6) 2-amino 4-methylpyrimidine, (7) 2,4 Diamino-6-methyl-1,3,5-triazine with coelutions, (A) Acetonitrile, (B) 2-Propenenitrile, (C) Methylacrylonitrile, (D) 2-Butenenitrile, (E) Butanenitrile, (F) Methallyl cyanide, (G) Formamide, (H) Acetamide, (I) Propanamide, (J)Butanedinitrile, (K) 2-Pyrimidinamine, (L) Imidazole, (M) 2-Amino-4-methylpyrimidine, (N) Imidazole 4-methyl, (O) Succinimide, (P) 5-Pyrimidinecarbonitrile-2,4 diamino.

• ***<u>Dérivatisation des tholins avec le DMF-DMA</u>***

La majorité des molécules extraites avec la dérivatisation au DMF-DMA à partir des tholins sont éluées en 24 minutes pour la RTX-5 et en 21 minutes pour la CP Chirasil-Dex (Figure III-12). Il est fortement probable que des molécules soient éluées plus tardivement mais leurs détections s'avèrent peu aisées du fait de leur concentration en dessous des limites de détection du spectromètre de masse.

Comme cela a été décrit avec les tholins pyrolysés, les amines sont des molécules qui sont attendues pour être présentes dans la composition des tholins et devrait donc être dérivatisées avec le DMF-DMA, améliorant leur détectabilité. Cependant, aucune amine dérivatisée n'a été identifiée sur le chromatogramme des tholins dérivatisés. Quelques molécules dérivatisées ont tout de même été identifiées telles que l'urée, mais ce composé est également connu pour faire parti des co-produits du DMF-DMA (voir Chapitre II). De fait, il demeure compliqué d'identifier l'origine d'un tel composé.

De plus, les tholins ont subi une oxydation du fait du contact avec l'atmosphère ambiante lors de la récolte et avant leur analyse en CPG-SM. Cette oxydation pourrait expliquer la présence notamment de composés oxygénés qui ont été identifiés (*e.g.* la butanamide).

Enfin, sur la colonne chirale, aucune séparation énantiomérique n'est observée. Une telle observation pourrait être expliquée par l'absence de molécules chirales dans la composition des

tholins, ou par le fait que la réaction de dérivatisation avec le DMF-DMA ne s'est pas produite correctement avec ce protocole de dérivatisation qui n'est potentiellement pas optimal pour des échantillons aussi complexes. Cette deuxième hypothèse est en cohérence avec les résultats obtenus sur la RTX-5 pour laquelle aucune molécule dérivatisée avec les signatures spectrales attendues (diméthylformamidination pour les amines par exemple) n'est identifiée.

La dérivatisation des tholins avec le DMF-DMA devra être optimisée dans de futures études pour tenter d'extraire et d'identifier un plus grand nombre de molécules organiques à partir des tholins. Une optimisation pourra être faite sur la température ainsi que sur la durée de dérivatisation mais aussi sur le ratio entre la masse de tholins et le volume d'agent de dérivatisation. En plus de cela, la base de données de dérivatisation au DMF-DMA devra être enrichie, comme cela a déjà été explicité dans la conclusion du chapitre II.

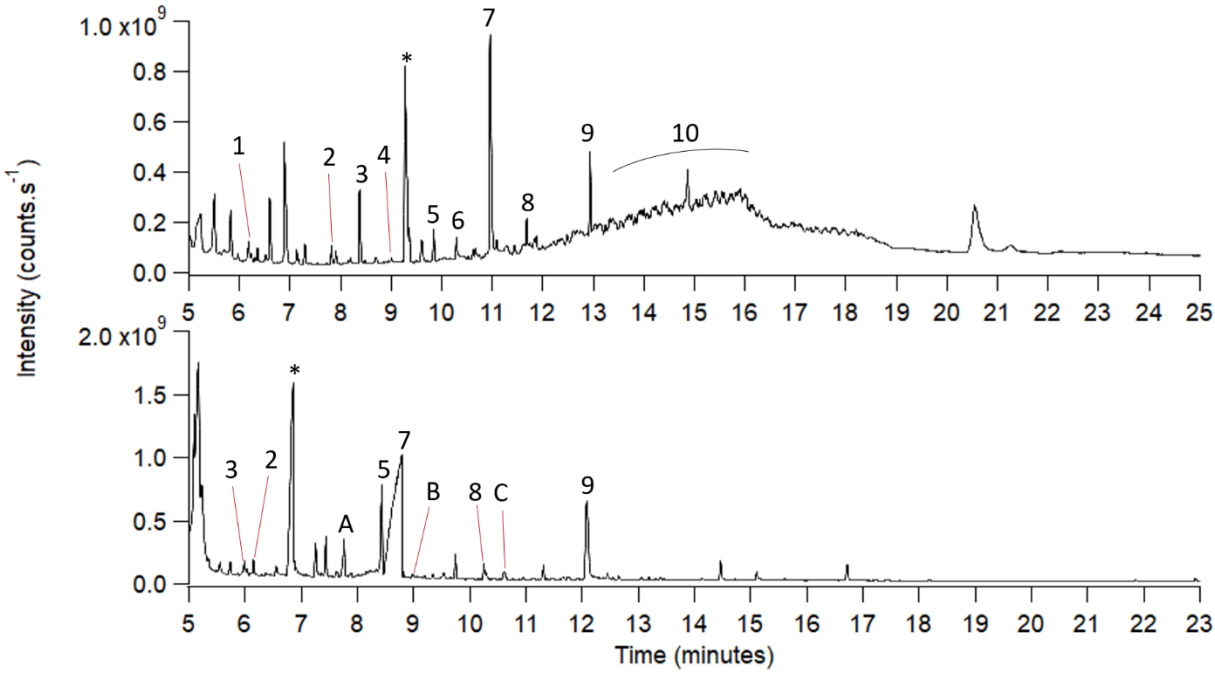


Figure III-12 : Chromatogramme de tholins dérivatisés au DMF-DMA sur les colonnes (haut) Chirasil-Dex et (bas) RTX-5. La colonne a été chauffée de 40 °C à 200 °C (Chirasil-Dex) ou 300 °C (RTX-5) maintenue 15 minutes avec une rampe de température de 10 °C.min^{-1}. Le débit en hélium était de 1mL·min^{-1}. Le chromatogramme ne débute qu'à 5 minutes pour éviter de saturer le détecteur avec le solvent (DMF). Attribution des pics : (1) Acetamide, (2) Tetramethylurea, (3) 1,3,5-Triazine hexahydro-1,3,5-trimethyl, (4) Glycinamide tetramethyl, (5) Acetamide N-dimethylaminomethylidene, (6) N,N-Dimethylurea, (7) Dérivé de l'urée, (8) Methylcarbamate dimethylformamidinaté, (9) Urée diméthylé et dimethylformamidiné, (10) 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine, (A) Oxalic acid mono-N-dimethyl-amide, methyl ester, (B) 3-Dimethylaminoacrylonitrile, (C) Butyramide probablement expliqué par l'oxydation des tholins.

4. Conclusion

La préparation pour la mission Dragonfly nécessite la sélection des meilleurs composants analytiques pour que l'exploration de la surface de Titan soit un succès. Le travail présenté ici avait pour but de sélectionner la colonne générale la plus performante pour être intégrer à l'instrument DraMS. L'étude qui a été menée a permis de caractériser plusieurs phases stationnaires, qui pourront être utilisées pour des analyses *in situ* futures. Les différences obtenues entre les quatre phases présélectionnées étaient minimes et plus d'une colonne aurait pu être appropriée pour être intégrée.

Après une étude d'efficacité, une analyse de la rétention et la séparation, et une considération de paramètres plus globaux des différentes colonnes, la colonne RTX-5 est apparue comme étant la plus adaptée pour être intégrée à l'instrument DraMS. L'efficacité, les capacités de séparation, la robustesse (notamment thermique), et l'héritage spatiale de la RTX-5 ont permis de justifier ce choix. Cette colonne permet la détection de tous les composés qui ont été sélectionnés pour cette étude, tous provenant de plusieurs familles chimiques. De plus, la durée d'analyse pour détecter les espèces attendues sur Titan, est compatible avec l'énergie disponible et les autres contraintes qui sont imposées par l'analyse *in situ*.

Des études plus approfondies ont donc été menées sur la phase stationnaire de la colonne RTX-5, pour évaluer ses performances en analysant des mélanges complexes de standards chimiques ainsi que des tholins de Titan. La pyrolyse des tholins avec la colonne RTX-5 a permis la détection de plusieurs molécules, comme des nitriles, des composés aromatiques et des cycles azotés ce qui est prometteur pour les futures analyses *in situ*.

Les deux colonnes chromatographiques sélectionnées pour DraMS-GC, la RTX-5 et la CP Chirasil-Dex, montre une redondance dans les analyses pour de nombreuses familles chimiques. De plus, les deux colonnes montrent également une complémentarité dans les analyses en présentant différents ordres d'élution. Ces propriétés peuvent être intéressantes notamment pour l'identification de molécules à partir d'un même échantillon injecté dans les deux colonnes.

La séparation énantiomérique, comme prérequis de l'instrument DraMS, a été étudiée avec la colonne chirale. Cette colonne associée à la dérivatisation au DMF-DMA permet la séparation de tous les énantiomères d'acides aminés, résultats prouvés par le passé (Freissinet *et al.* 2010). De plus, ce travail a démontré que la colonne CP Chirsail-Dex est capable de résoudre les énantiomères d'amines, d'acides carboxyliques et de nitriles, les deux premières familles étant recherchées en priorité du fait de leur implication dans la chimie prébiotique.

Les deux colonnes chromatographiques sélectionnées pour être intégrées à DraMS-GC (RTX-5 et CP Chirasil-Dex) et caractérisées dans cette étude remplissent les spécifications imposées par la mission et sont par conséquent, capable de détecter les composés attendus à la surface de Titan, d'intérêt pour la recherche exobiologique.

5. Références

Coll P., Navarro-González R., Szopa C., Poch O., Ramírez S. I., Coscia D., Raulin F., Cabane M., Buch A., and Israël G. (2013) Can laboratory tholins mimic the chemistry producing Titan's aerosols? A review in light of ACP experimental results. *Planetary and Space Science*, 77: 91-103.

Derenne S., Coelho C., Anquetil C., Szopa C., Rahman A. S., McMillan P. F., Corà F., Pickard C. J., Quirico E., and Bonhomme C. (2012) New insights into the structure and chemistry of Titan's tholins via 13C and 15N solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Icarus*, 221: 844-853.

Freissinet C., Buch A., Sternberg R., Szopa C., Geffroy-Rodier C., Jelinek C., and Stambouli M. (2010) Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 731-740.

Freissinet C., Buch A., Szopa C., and Sternberg R. (2013) Enantiomeric separation of volatile organics by gas chromatography for the in situ analysis of extraterrestrial materials: kinetics and thermodynamics investigation of various chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, 1306: 59-71.

Gautier T., Carrasco N., Mahjoub A., Vinatier S., Giuliani A., Szopa C., Anderson C. M., Correia J.-J., Dumas P., and Cernogora G. (2012) Mid- and far-infrared absorption spectroscopy of Titan's aerosols analogues. *Icarus*, 221: 320-327.

Gautier T., Carrasco N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Szopa C., Buch A., and Pernot P. (2014a) Nitrogen incorporation in Titan's tholins inferred by high resolution orbitrap mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Earth and Planetary Science Letters*, 404: 33-42.

Gautier T., Carrasco N., Stefanovic I., Sikimic B., Cernogora G., and Winter J. (2014b) Methane Conversion in a N2CH4Radiofrequency Discharge. *Plasma Processes and Polymers*, 11: 472-481.

Gautier T., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Szopa C., Buch A., and Carrasco N. (2016) Development of HPLC-Orbitrap method for identification of N-bearing molecules in complex organic material relevant to planetary environments. 275: 259-266.

Gautier T., Sebree J. A., Li X., Pinnick V. T., Grubisic A., Loeffler M. J., Getty S. A., Trainer M. G., and Brinckerhoff W. B. (2017) Influence of trace aromatics on the chemical growth mechanisms of Titan aerosol analogues. *Planetary and Space Science*, 140: 27-34.

Goesmann F., Brinckerhoff W. B., Raulin F., Goetz W., Danell R. M., Getty S. A., Siljeström S., Mißbach H., Steininger H., Arevalo R. D. and others. (2017) The Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA) Instrument: Characterization of Organic Material in Martian Sediments. *Astrobiology*, 17: 655-685.

Goesmann F., Rosenbauer H., Roll R., Szopa C., Raulin F., Sternberg R., Israel G., Meierhenrich U., Thiemann W., and Munoz-Caro G. (2006) Cosac, The Cometary Sampling and Composition Experiment on Philae. *Space Science Reviews*, 128: 257-280.

Golay M. (1958) Gas Chromatography 1957. *by VJ Coates, HJ Noebels, and IS Fagerson, Academic Press, New York*: 1.

Gümüş M., and Koca İ. (2020) Enamines and Dimethylamino Imines as Building Blocks in Heterocyclic Synthesis: Reactions of DMF-DMA Reagent with Different Functional Groups. *ChemistrySelect*, 5: 12377-12397.

Imanaka H., Khare B. N., Elsila J. E., Bakes E. L. O., Mckay C. P., Cruikshank D. P., Sugita S., Matsui T., and Zare R. N. (2004) Laboratory experiments of Titan tholin formed in cold plasma at various pressures: implications for nitrogen-containing polycyclic aromatic compounds in Titan haze. *Icarus*, 168: 344-366.

Israël et al. (2005) Complex organic matter in Titan's atmospheric aerosols from in situ pyrolysis and analysis. *Nature*, 438.

Kvenvolden. (1973) Criteria for distinguish biogenic and abiogenic amino acids. *Space Life Science*.

Mahaffy *et al.* (2012) The Sample Analysis at Mars Investigation and Instrument suite. *Space Sci Rev*.

Martin A. J., and Synge R. L. (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*, 35: 1358.

McGuigan M., Waite J. H., Imanaka H., and Sacks R. D. (2006) Analysis of Titan tholin pyrolysis products by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1132: 280-288.

Mckay C. P. (2004) What Is Life—and How Do We Search for It in Other Worlds? *PLoS Biology*, 2: e302.

Moldoveanu. (2009) Pyrolysis of organic molecules applications to health and envrionmental issues.

Morisson M., Szopa C., Carrasco N., Buch A., and Gautier T. (2016) Titan's organic aerosols: Molecular composition and structure of laboratory analogues inferred from pyrolysis gas chromatography mass spectrometry analysis. *Icarus*, 277: 442-454.

Neish C. D., Somogyi Á., Lunine J. I., and Smith M. A. (2009) Low temperature hydrolysis of laboratory tholins in ammonia-water solutions: Implications for prebiotic chemistry on Titan. *Icarus*, 201: 412-421.

Neish et al. (2010) Titan's Primordial Soup Formation of Amino Acids via Low Temperature Hydrolysis Tholins. *Astrobiology*, 10.

Neveu M., Hays L. E., Voytek M. A., New M. H., and Schulte M. D. (2018) The Ladder of Life Detection. *Astrobiology*, 18: 1375-1402.

Niemann H., Atreya S., Bauer S., Biemann K., Block B., Carignan G., Donahue T., Frost R., Gautier D., and Haberman J. (2003) The gas chromatograph mass spectrometer for the Huygens probe. *The Cassini-Huygens Mission*: 553-591.

Poch et al. (2012) Production yields of organics of astrobiological interest from H2O–NH3 hydrolysis of Titan's tholins. *Planetary and Space Science*.

Quirico E., Montagnac G., Lees V., Mcmillan P. F., Szopa C., Cernogora G., Rouzaud J.-N., Simon P., Bernard J.-M., Coll P. and others. (2008) New experimental constraints on the composition and structure of tholins. *Icarus*, 198: 218-231.

Ramírez S. I., Coll P., Buch A., Brassé C., Poch O., and Raulin F. (2010) The fate of aerosols on the surface of Titan. *Faraday Discussions*, 147: 419.

Raulin F., Brassé C., Poch O., and Coll P. (2012) Prebiotic-like chemistry on Titan. *Chemical Society Reviews*, 41: 5380.

Schulz *et al.* (2021) Imaging Titan's Organic Haze at Atomic Scale. *The Astrophysical Journal Letters*.

Szopa C., Cernogora G., Boufendi L., Correia J. J., and Coll P. (2006) PAMPRE: A dusty plasma experiment for Titan's tholins production and study. *Planetary and Space Science*, 54: 394-404.

Trainer *et al.* (2013) The Influence of Benzene as a trace reactant in Titan aerosol analogs. *The Astrophysical Journal Letters*.

Trainer M. G., Pavlov A. A., Jimenez J. L., Mckay C. P., Worsnop D. R., Toon O. B., and Tolbert M. A. (2004) Chemical composition of Titan's haze: Are PAHs present? *Geophysical Research Letters*, 31: n/a-n/a.

Chapitre IV : Caractérisation d'échantillons hypersalins du lac Tirez, analogues de matériaux de la surface d'Europe et d'Encelade, et préparation de méthodologies d'analyse *in situ*.

L'exploration future d'Europe et d'Encelade, avec les concepts de missions associés (détaillés en introduction de ce manuscrit), nécessite de relever de nombreux défis, notamment analytiques. La recherche de molécules organiques pouvant être associées à la présence de vie passée ou actuelle sur ces satellites est un des objectifs principaux pour ces futures missions d'analyse *in situ*. Pour ces deux lunes glacées, les observations à distance, les résultats obtenus avec l'échantillonnage des geysers d'Encelade par Cassini et les modèles prédisant le contenu en sel de l'enveloppe glacée et de l'océan ont montré une possible grande diversité de ces sels. Parmi ceux-là, les principaux qui ont été détectés ou sont attendus sont le chlorure de sodium (NaCl) et le sulfate de magnésium ($MgSO_4$)(Carlson *et al.* 2009; McCord *et al.* 1999; Postberg *et al.* 2009; Trumbo *et al.* 2022; Trumbo *et al.* 2019) avec des concentrations estimées à l'aide de modèles de l'ordre de 0,01 ppb pour Europe et de l'ordre de 0,1 % pour Encelade (Buffo *et al.* 2020; Hand and Chyba 2007). Hormis l'océan, il y a également de fortes probabilités qu'il y ait des réservoirs d'eau liquide salée à l'intérieur de la couche de glace (Chivers *et al.* 2021) et pour lesquels la concentration et le contenu en sel pourrait fortement varier en fonction de l'évolution et de l'âge du liquide remplissant ces réservoirs. Le Tableau IV-1 récapitule la nature des sels identifiés sur Europe et Encelade ainsi que leurs concentrations attendues (estimées à partir de données *in situ* ou de modèles théoriques). Par exemple pour Europe, l'estimation de la concentration en magnésium de sulfate est contrainte par l'intensité du champ magnétique induit qui a été mesurée par la sonde Galileo.

Tableau IV-1 : Nature et concentrations des sels identifiés et attendus sur Europe et Encelade. Les concentrations sont exprimées en moles par kilogramme de glace d'eau.

	Europe	Encelade
Nature des sels	Sulfates, NaCl, Na_2CO_3 *(McCord et al., 1999, Trumbo et al., 2019, 2022)*	NaCl, KCl Na_2CO_3, Phosphates (Postberg, 2009, 2023)
Exemple concentrations attendues	$MgSO_4 < 0{,}85$ mol.kg$^{-1}{}_{H2O}$	NaCl : 0,05-0,2 mol.kg$^{-1}{}_{H2O}$ Na_2CO_3 : 0,02-0,1 mol.kg$^{-1}{}_{H2O}$ *(Postberg et al., 2009)*

La recherche de matière organique sur les mondes océans peut être fortement entravée par plusieurs processus, que ce soit dans l'évolution ou la dégradation des molécules organiques dans leur contexte planétaire, ou encore du fait de l'impact négatif des sels sur la technique analytique.

Dans le premier cas, la matière organique présente à la surface d'Europe et d'Encelade est constamment soumise à des radiations (photons et particules chargées) provenant du vent solaire, des magnétosphères de Jupiter et de Saturne, ou encore du rayonnement cosmique. Toutes ces radiations vont faire évoluer la matière organique en surface soit en la dégradant soit en la modifiant

structurellement menant à la formation de résidus photorésistants. Sur Mars, les effets de ces radiations ont été étudiées avec des expériences en laboratoire, montrant des dégradations selon le temps d'exposition et la matrice dans laquelle les molécules se trouvent (Pavlov *et al.* 2012; Poch *et al.* 2014). De telles modifications pourraient également être observées à la surface d'Europe et d'Encelade.

Dans le second cas, c'est l'analyse même qui peut être entravée et dégradée par la présence de sels dans les échantillons qui seront récoltés à la surface ou en subsurface. En effet, premièrement les sels peuvent endommager l'instrument et/ou altérer son fonctionnement (e.g. *détection*). Les sels peuvent également provoquer la dégradation des performances analytiques. Ces effets sur la méthode analytique sont particulièrement observables sur les méthodes de préparation des échantillons. Par exemple, des analyses effectuées par l'instrument Sample Analysis at Mars (SAM) dans l'optique de trouver de la matière organique à la surface de Mars avec le rover Curiosity, ont montré la présence d'oxychlorines dans les échantillons prélevés par Curiosity au fond du cratère Gale (Archer Jr *et al.* 2014; Glavin *et al.* 2013). Or, ces sels de chlore peuvent réagir avec la matière organique de l'échantillon dans le système de préparation d'échantillon de l'instrument et ainsi affectent la détection et l'identification des molécules organiques à la fois d'un point de vue qualitatif (chloration) et quantitatif (oxydation) (Freissinet *et al.* 2015; Millan *et al.* 2020).

La préparation des analyses *in situ* à la surface d'Europe et d'Encelade nécessite donc d'étudier l'impact de la diversité des sels attendus sur l'instrumentation et sur les méthodes analytiques, incluant la préparation d'échantillon. Dans un premier temps, le travail consiste en des études de routine sur des standards chimiques puis par l'étude d'échantillons analogues synthétiques de laboratoire. Ces derniers présentent l'avantage de disposer d'une parfaite maîtrise de l'échantillon et de contrôler les concentrations en sels et en molécules organiques d'intérêt. Ils ne sont cependant pas représentatifs de la complexité des échantillons attendus sur les mondes océans. C'est pourquoi la préparation des futures analyses *in situ* passe ensuite par l'étude d'échantillons naturels terrestres considérés comme analogues vis-à-vis d'une propriété qu'elle soit en lien avec la minéralogie, avec la structure des échantillons, avec la composition physico-chimique ou encore un mélange entre ces différents aspects. Par exemple, des carottes de glaces provenant d'Arctique ont été utilisées pour mettre au point des protocoles de stérilisation pour limiter la contamination des échantillons en préparation aux futurs prélèvements qui pourraient être effectués sur la surface d'Europe ou d'Encelade (Coelho *et al.* 2022). Un autre exemple est l'étude du lac Vostok et l'utilisation de radars employés pour l'exploration spatiale, pour l'étude de propriétés de surface ou de subsurface (Lorenz *et al.* 2011). Enfin, des échantillons provenant de monts hydrothermaux au fond des océans terrestres peuvent être récoltés pour étudier la microbiologie qui s'y développe, similaire à celle qui pourrait exister dans les océans d'Europe et d'Encelade (Preston and Dartnell 2014). Ces échantillons analogues ont pour avantage d'être plus représentatifs des échantillons qui seront analysés sur les lunes glacées que les échantillons synthétiques. En effet, que ce soit la diversité minérale, saline, chimique ou biologique, toutes sont difficilement reproductibles sur des analogues de laboratoire.

À l'instar de ces études, l'équipe de chromatographie spatiale du LATMOS a également choisi cette approche en complément de l'étude d'échantillons synthétiques. C'est dans ce cadre que j'ai pris

la responsabilité de l'étude d'échantillons naturels terrestres considérés comme analogues en termes de salinité à l'océan d'Europe (Prieto-Ballesteros 2003) et potentiellement d'Encelade.

1. Le système lacustre de Tírez

Ces échantillons proviennent d'un système lacustre en Espagne, dans la région de la Mancha au sud de Madrid (Figure IV-1). Le système lacustre endoréique de Tirez est composé de sept lagunes éphémères hypersalines et de trois lagunes d'eau douce. Le niveau de l'eau dans cette région est donc seulement influencé par les cycles de précipitation, d'évaporation et d'infiltration dans le sol. Ici l'intérêt sera uniquement porté sur les lacs hypersalins. L'intérêt exobiologique d'un tel environnement a vu le jour grâce aux retombées scientifiques des missions Galileo et Cassini-Huygens pour l'étude d'Europe et Encelade respectivement, qui ont permis d'établir une analogie en termes de composition saline avec ces mondes océans.

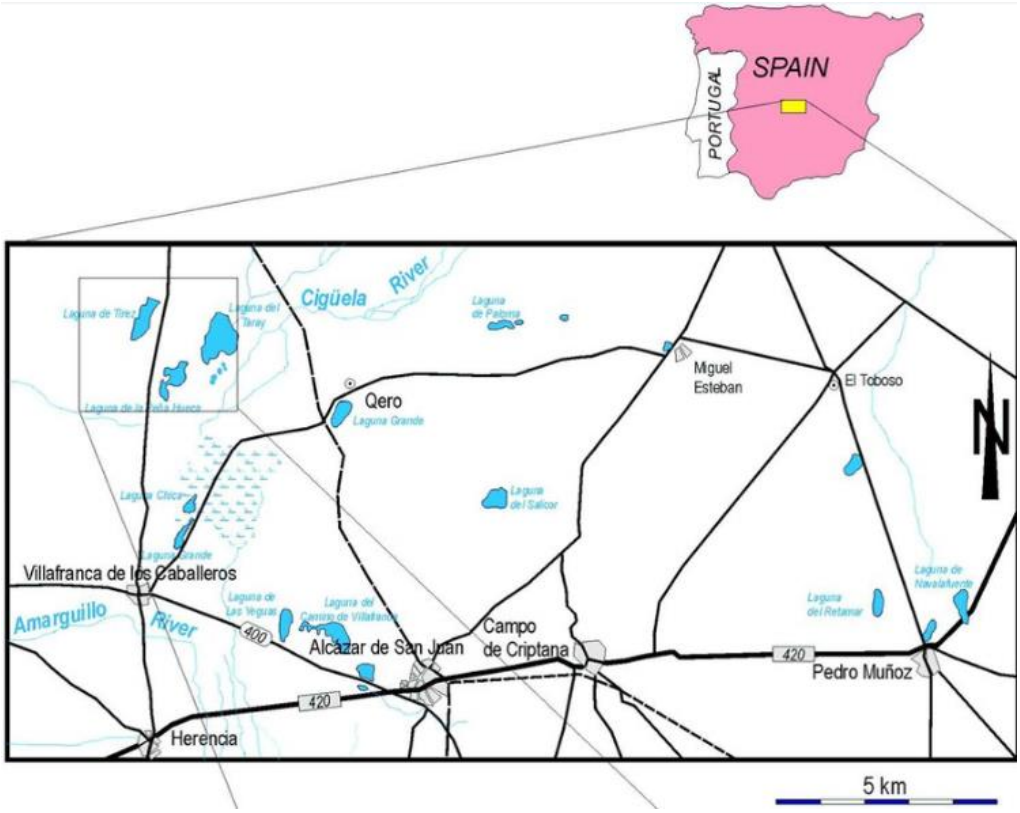


Figure IV-1 : Localisation des différentes lagunes constituant le système lacustre de Tirez dans la région de la Mancha en Espagne. Source : Prieto-Ballesteros et al., (2003).

Prieto-Ballesteros et al., (2003) a caractérisé la minéralogie et la géochimie d'échantillons provenant de la lagune Tírez, pour confirmer la pertinence de l'analogie de cet environnement hypersalin avec les océans subsurfaces d'Europe et d'Encelade. La comparaison des spectres infrarouges des échantillons du lac Tírez avec ceux obtenus par la sonde Galileo lors des différents survols d'Europe, montre que les saumures provenant du lac Tírez ont des signatures spectrales dans l'infrarouge proches de celles de la surface d'Europe, témoignant notamment de la présence de gypse, d'halite hexahydrite et d'epsomite. Les saumures provenant du lac Tírez correspondent donc à un

mélange de sels de sodium (Na), de magnésium (Mg), de chlore (Cl), de sulfate (SO_4) et de calcium (Ca). Du fait de l'identification de sels de sodium provenant d'Encelade dans l'anneau E de Saturne par la sonde Cassini (Postberg *et al.* 2009), ces échantillons peuvent également être considérés comme analogues à l'océan de ce satellite, bien qu'il n'y ait pas encore eu d'identification de sels de sulfates à la surface d'Encelade.

De plus, plusieurs études exhaustives de la microbiologie retrouvée à la fois dans des échantillons solides (*e.g.* sédiments anoxiques notamment) et dans des échantillons liquides (colonne d'eau) provenant de différentes lagunes (lagune Tírez, lagune de Peña Hueca) du système lacustre de Tírez ont été menées (Fairén *et al.* 2023; Martin-Cuadrado *et al.* 2019; Montoya *et al.* 2011; Montoya *et al.* 2013). Ces différentes études ont permis d'identifier de nombreuses souches de micro-organismes, constituant un écosystème complexe d'extrêmophiles adaptés pour vivre dans les conditions de salinité des lacs du système de Tírez. Dans ces échantillons, des espèces provenant de différents phyla du règne bactérien, du règne des archées mais également des eucaryotes ont été identifiées. À titre d'exemple, la Figure IV-2 permet d'avoir un aperçu de la diversité de phylum ainsi que de genre qu'il peut y avoir dans les échantillons de la lagune de Peña Hueca, à la fois dans le domaine bactérien et archéen. Enfin, en ce qui concerne le règne eucaryotes (non présenté sur la Figure IV-2), des microalgues sont principalement retrouvées et notamment le genre *Dunaliella* (Montoya *et al.* 2013) qui est retrouvé dans de très nombreux environnements hypersalins autour du globe (Lee *et al.* 2018; Oren 1999; Oren 2010; Rodriguez-Valera *et al.* 1985).

Dans le cadre de l'exploration *in* situ d'Europe et d'Encelade, cela signifie que leur caractère salin à hypersalin ne serait pas incompatible avec le développement d'êtres vivants, extrêmophiles, , bien qu'il faille garder à l'esprit que les échantillons analogues ne le sont que sur le paramètre de salinité et diffèrent grandement des autres conditions physico-chimiques des satellites glacés. Aussi, il faut également écarter les organismes basés sur la photosynthèse. En effet, les océans de ces deux satellites glacés sont situés sous la surface, ce qui empêche la lumière de passer.

Dans le cadre de mon étude, cela aura donc directement un impact sur la diversité de composés organiques qu'il sera possible de détecter en CPG-SM dans des échantillons hypersalins, allant des composés membranaires à des métabolites produits selon les métabolismes employés (autotrophique et hétérotrophique) et donc selon les souches présentes.

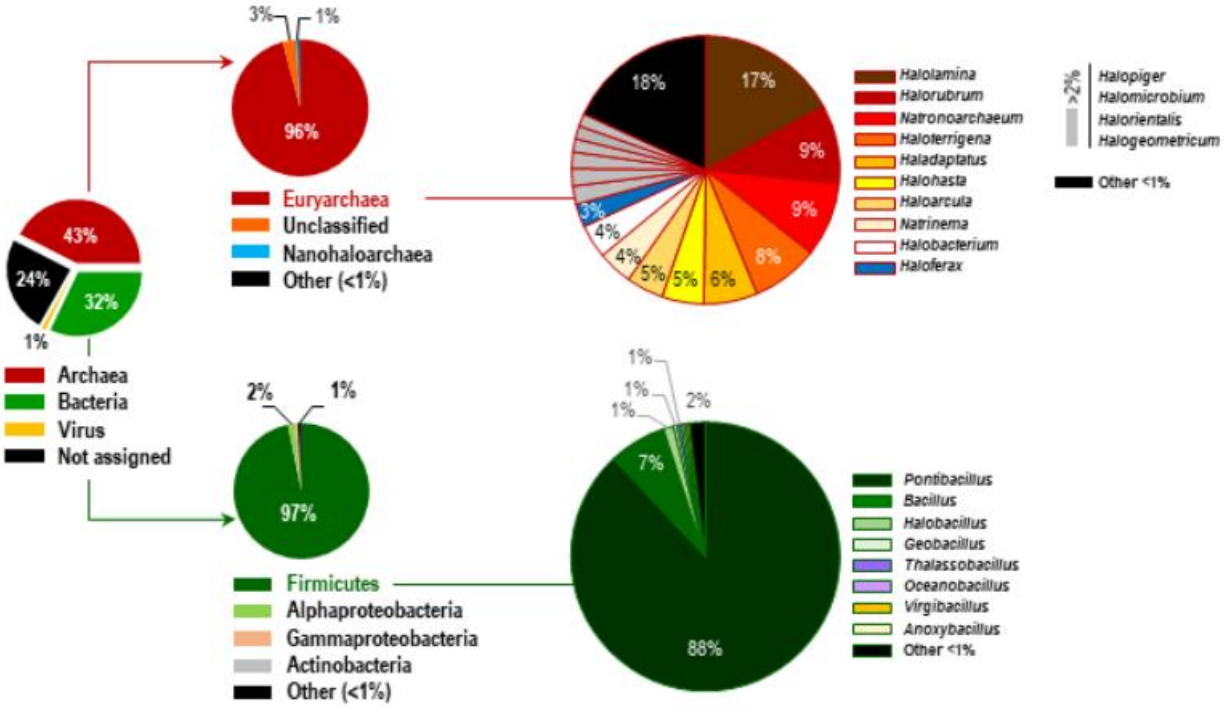


Figure IV-2 : Distribution des règnes, phyla et genres dans des échantillons de la lagune Peña Hueca. Source : (Martin-Cuadrado et al. 2019).

Les échantillons étudiés ici ont été récoltés en Juillet 2019 (contrat Europlanet TA Fourth Call, TA1: Planetary Field Analogue Sites), après un printemps très sec, par conséquent, il ne restait plus que quelques points d'eau résiduels à certains endroits, très concentrés en sels. Des échantillons liquides et solides ont été prélevés dans quatre lagunes éphémères (Laguna del Longar, Laguna Larga, Laguna de Tírez, Laguna Peña Hueca) (Figure IV-3), à la fois en surface et en subsurface (jusqu'à une profondeur d'une vingtaine de centimètres). Selon la disponibilité en volume aqueux sur chaque site d'échantillonnage, selon les différences observables sur le terrain entre les différents sites, entre 25 et 500 mL d'échantillon ont été collectés. Certains de ces échantillons correspondent à de l'eau limpide, d'autres à des échantillons aqueux avec une viscosité variable selon la charge en sédiments. Tous les échantillons ont ensuite été stockés à 4 °C, avant le début des analyses 2 ans plus tard, soit en 2021.

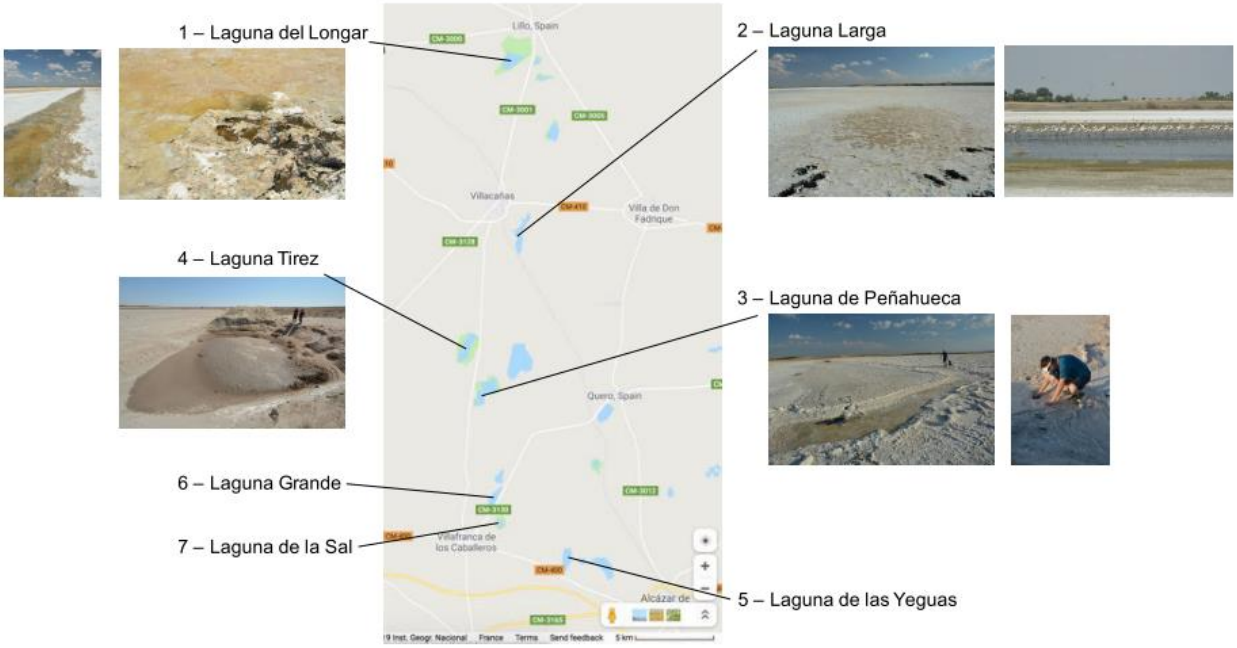


Figure IV-3 : Photos prises pendant la campagne d'échantillonnage en Juillet 2019 dans les différentes lagunes du système de Tirez, avec leurs localisations géographiques respectives. Pour rappel, seules les lagunes 1, 2, 3 et 4 ont été échantillonnées.

2. Objectifs de l'étude

La composition chimique du système lacustre de Tírez n'a été que très peu caractérisée par le passé. En effet, une étude sur la physico-chimie a été publiée (Prieto-Ballesteros *et al.* 2003), plusieurs sur la microbiologie de cet environnement (Martin‐Cuadrado *et al.* 2019; Montoya *et al.* 2011; Montoya *et al.* 2013), et seule une étude très récente traite de la composition lipidique pour évaluer la conservation de tels biomarqueurs dans ce type d'environnement (Fairén *et al.* 2023). Toutefois, aucune étude ne couvre la problématique liée à l'analyse ni la caractérisation de la matière organique des matériaux présents dans ces lacs. C'est pour cette raison que j'ai décidé d'orienter l'étude de ces échantillons vers 3 objectifs à savoir :

1. Caractériser chimiquement les échantillons en préparation aux analyses organiques effectuées *a posteriori.* Cela passe par la mesure de la salinité de ces échantillons, de leur contenu en carbone et en azote ainsi que l'évaluation de l'intégrité des micro-organismes après 2 ans de stockage. Les résultats de cette première étude auront aussi un rôle important pour le troisième et dernier objectif de cette étude, étant aux prémices du développement d'un protocole de dessalement.

2. évaluer les capacités analytiques de la CPG-SM et des méthodes de préparation d'échantillon associées en présence de sels, qui sont utilisées actuellement dans l'exploration spatiale, dans l'optique de détecter des molécules organiques relatives aux micro-organismes dans ces échantillons. L'objectif secondaire qui découle du premier objectif est la caractérisation du contenu en matière organique ces échantillons.

3. mettre en place un protocole de dessalement des échantillons afin d'en évaluer l'effet sur les performances analytiques du CPG-SM et la détection des molécules organiques. En cas de résultats probants, cette étude pourrait amener à développer un système de dessalement spatialisable.

Chacun de ces objectifs fait l'objet d'un sous chapitre dans cette étude sur les échantillons du système lacustre de Tírez.

I. Caractérisation chimique des échantillons prélevés des lacs Tirez

1. Objectifs de l'étude

Les échantillons ayant été très peu caractérisés chimiquement, la première étape consiste à la mesure de leur salinité, d'évaluer leur contenu en carbone et en azote total, ainsi que d'observer si les cellules de micro-organismes présentes sont encore intègres ou ont été dégradées avec les 2 ans de conservation à 4°C.

2. Matériels et méthodes

2.1 Les échantillons étudiés

Parmi tous les échantillons collectés (35 échantillons liquides et 7 échantillons solides), et pour des questions de temps d'analyse, il a fallu choisir une gamme limitée d'échantillons, provenant des différentes lagunes. Les critères de sélection que j'ai retenus sont :

(i) L'aspect visuel des échantillons. En effet, cet aspect était différent pour des échantillons collectés dans une même lagune mais également d'une lagune à l'autre.

(ii) le lieu de prélèvement. Par exemple, certains échantillons liquides ont été collectés en surface quand il restait de l'eau résiduelle, alors que d'autres l'ont été en sous-surface en creusant dans la croûte de sel.

En se focalisant sur ces deux critères de sélection, l'objectif était d'avoir un panel d'échantillons le plus varié possible. L'ensemble des échantillons retenus pour cette étude sont présentés dans le Tableau IV-2 avec leur description visuelle, la valeur de pH qui a été mesurée avant de débuter les analyses.

Tableau IV-2 : Présentation des différents échantillons étudiés dans ce chapitre avec leur description visuelle et leur pH. Les photos correspondantes aux différents échantillons sont présentées en Annexe IV-1. Une eau boueuse est considérée comme n'étant pas translucide et contenant une charge sédimentaire visuellement alors qu'une eau trouble ne contient pas cette dernière. CI : Chromatographie ionique, AAS : Spectroscopie par adsorption atomique, TC : Contenu en carbone total, TN : contenu en azote total, ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif.

Échantillon (lagune et numéro)	Description visuelle et provenance	pH	Analyses effectuées
Échantillons liquides			

Lagune del Longar n°5	Eau noire et chaude (surface)	6,55	Microscopie confocale, MEB-SDE, CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Lagune del Longar n°9	Eau limpide (surface)	6,96	Chromatographie ionique, CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Lagune del Longar n°12	Eau trouble (subsurface)	6,54	CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Lagune del Longar n°44	Eau limpide (surface)	6,54	CI, AAS, ICP-MS, TC, TN, Optimisation protocole dessalement
Lagune Larga n°13	Eau boueuse (surface)	6,36	CI, TC, TN, CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Lagune Larga n°15	Eau noire et chaude (subsurface)	/	CI
Peña Hueca n°21	Eau limpide (subsurface)	5,55	CI, CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Peña Hueca n°35	Eau limpide (surface)	6,87	CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Peña Hueca n°50	Eau noire et chaude (surface)	6,55	CPG-SM, (pyrolyse & dériv)
Peña Hueca n°56	Eau jaunâtre limpide (subsurface)	5,60	CI
Peña Hueca n°57	Eau limpide et froide (prélevée dans un étang artificiel)	6,67	TC, TN, Analyse CPG-SM après dessalement
Tirez n°40	Eau boueuse (subsurface)	6,26	CI, AAS, CPG-SM (pyrolyse & dériv)
Échantillons solides (croûte de sel)			
Larga n°17	/	/	MEB-SDE
Peña Hueca n°25	/	/	MEB-SDE
Tirez n°42	/	/	MEB-SDE

2.2 Contenu en carbone et en azote total – TC, TN

La caractérisation du contenu en carbone et en azote total d'un échantillon par lagune a été effectuée avec un analyseur élémentaire Flash EA 1112 de chez Thermo Fisher Scientific. Les mesures ont été effectuées à l'Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, par Yoan Marcangeli et David Carmignac.

Le principe de cet instrument repose sur une combustion flash à 930 °C de l'échantillon placé sous flux d'oxygène. Les gaz d'intérêt produits, c'est-à-dire N_2 pour l'azote et CO_2 pour le carbone, sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse. La quantification de ces éléments se fait par intégration des pics chromatographiques et comparaison avec une courbe de calibration. Cette dernière a, ici, été réalisée avec un standard d'acide aspartique.

Pour cette caractérisation, les échantillons doivent être solides. Etant donné que les échantillons que j'étudie sont liquides, des étapes de préparation d'échantillons doivent être réalisés pour récupérer la fraction solide. Tout d'abord, les échantillons ont été homogénéisés puis centrifugés à 4000 rpm jusqu'à 2 minutes selon leurs viscosités. Le surnageant résultant pour chaque échantillon a été aspiré puis conservé pour une analyse élémentaire liquide ultérieure, non réalisée à ce jour, mais qui permettra d'évaluer la quantité de carbone dissout. Seul le surnageant provenant de la lagune Larga a été séché, car même après des centrifugations répétées, celui-ci présentait une coloration encore importante, laissant supposer la présence de carbone dissout. Chaque culot obtenu a ensuite été séché à l'étuve à 50°C pendant 15 jours. En effet, les échantillons étant très riches en sels, ces derniers forment une croûte qui ralentit grandement l'évaporation du contenu en eau. Enfin, les culots secs résultant ont été broyés et 1 mg a été prélevé pour l'analyse élémentaire. Ici, la mesure du contenu en carbone total (TC) prend en compte le carbone organique (TOC) et inorganique (TIC) (*e.g.* carbonates). Du fait de problèmes instrumentaux et d'un temps limité par les ingénieurs qui s'occupaient de ces expériences, aucun réplicat n'a été réalisé. De futures mesures devront toutefois être réalisées à la fois pour avoir les incertitudes de mesure mais également pour obtenir le contenu en carbone organique et pas seulement le total.

2.3 Caractérisation et quantification de la salinité des échantillons Tírez

La caractérisation de la salinité d'échantillons salins s'effectue par l'identification et la quantification des cations et des anions constitutifs des sels attendus. Dans le cas des échantillons de Tírez, il s'agit donc de quantifier le sodium, le magnésium, le calcium ainsi que le potassium pour les cations et le chlore et le sulfate pour les anions.

2.3.1 La microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie à dispersion d'énergie (MEB-SDE)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique d'imagerie basée sur l'interaction d'un faisceau électron incident focalisé à haute énergie avec l'échantillon d'intérêt. Cette interaction résulte en l'émission de particules secondaires qui peuvent être analysées selon l'objectif souhaité (Figure IV-4). Pour chaque pixel, les électrons réfléchis sont détectés donnant une image en contraste de gris. L'imagerie peut être réalisée de deux manières : (1) par l'analyse des électrons secondaires pour obtenir des contrastes sur la topographie, et (2) par l'analyse des électrons rétrodiffusés pour obtenir des contrastes sur les différents matériaux de l'échantillon d'intérêt. Enfin, le faisceau d'électron en interagissant avec l'échantillon va engendrer l'émission de rayons X. Chaque

rayon X a une signature énergétique unique propre à un élément présent dans l'échantillon. Ces rayons X sont analysés par un spectromètre à dispersion d'énergie (SDE), permettant donc la caractérisation de la composition élémentaire de chaque région de l'échantillon. Ce couplage entre microscopie électronique à balayage et analyse élémentaire se nomme le MEB-SDE, et a été utilisé ici pour déterminer la composition saline des échantillons Tírez (un échantillon par lagune, quatre au total).

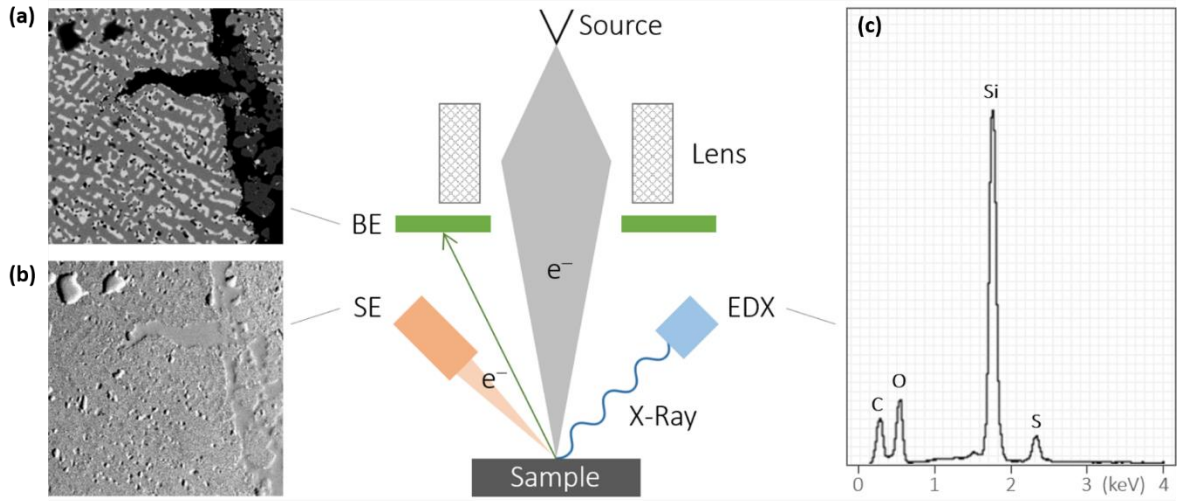


Figure IV-4 : Schéma du principe de fonctionnement de la microscopie électronique à balayage (SEM) avec les différentes détections possibles. (a) Analyse des électrons rétrodiffusés, (b) analyse des électrons secondaires, (c) spectre en énergie après analyse des rayons X émis par l'échantillon. Source : RJl-Micro & analytic.

Le MEB qui a été utilisé pour cette étude est un Quanta 200, produit par la compagnie FEI et se trouve au LGPM. Les observations ont été réalisées en collaboration avec Nathalie Ruscassier. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons solides correspondant à des croûtes de sels, avec un échantillon par lagune. Choisir des échantillons solides plutôt que liquides permet de s'affranchir de l'étape d'évaporation qui s'avère laborieuse avec de telles concentrations en sels. Pour chaque échantillon étudié, plusieurs clichés avec différents zooms (x100, x800, x3000) ont été pris, à une pression de travail de 0,68 Torr, pour avoir à la fois une vue d'ensemble des échantillons ainsi qu'une précision suffisante sur les cristaux de sels (avec un zoom important) pour l'analyse SDE. Cette dernière a été effectué avec une tension d'accélération de 15 kV.

2.3.2 Analyse des cations

Le dosage des cations a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) au LGPM. L'instrument utilisé est un spectromètre contrAA 800 D fourni par Analytik Jena. La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur l'absorption de photons par les éléments présents dans l'échantillon, qui sont atomisés par un brûleur (Figure IV-5). Une source lumineuse (cathode creuse) va éclairer l'échantillon atomisé avec des longueurs d'onde (rayonnement polychromatique) permettant l'excitation des atomes à doser. Cette lumière va alors être absorbée par l'atome d'intérêt, la quantité de lumière absorbée est mesurée (par la loi de Beer-Lambert) et est directement proportionnelle à sa concentration. Dans le cadre de mon étude, les atomes d'intérêt sont ceux constitutifs des sels, à savoir le sodium, le magnésium, le potassium et le calcium.

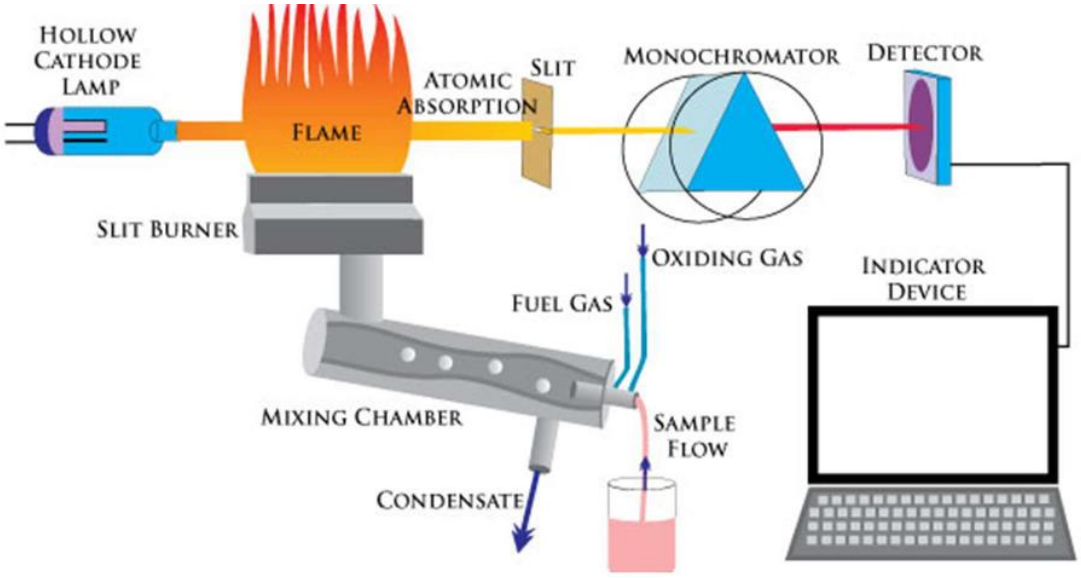


Figure IV-5 : Principe de fonctionnement de la spectrométrie d'absorption atomique. Source : Université Ferhat Abbas.

La préparation d'échantillon ainsi que les analyses ont été réalisées par mes soins en collaboration avec Vincent Butin. Pour les analyses que j'ai réalisées, un échantillon par lagune a été étudié (LilloS44, TirezS40, Larga 13 et Peña Hueca S57) pour réaliser une comparaison entre les quatre lacs. Les éléments analysés sont le sodium, le magnésium, le calcium et le potassium. Une gamme étalon a été préparée en fonction de l'absorbance de chacun de ces cations. Les échantillons ont été dilués avec un facteur de 10^5 pour la mesure du calcium magnésium et potassium et de 10^6 pour le sodium, dans de l'eau Milli-Q® acidifiée à 2% avec l'acide nitrique (70%, purifié par redistillation, >99.999%, Merck) qui permet de dissoudre les cations pouvant être liés à des particules ou bien aux parois de la verrerie utilisée. Pour la quantification du calcium une flamme de protoxyde d'azote et d'acétylène a été utilisée alors que pour les trois autres éléments la flamme était à base d'acétylène et d'air. Les longueurs d'onde employées pour la mesure d'absorbance étaient les suivantes : 589,59 nm pour le sodium, 285,21 nm pour le magnésium, 422,67 nm pour le calcium et 766,49 nm pour le potassium. Les valeurs d'absorbance sont ensuite reportées sur les différentes courbes de calibration pour obtenir la valeur des concentrations de chaque cation étudié. Les incertitudes ne sont pas renseignées car aucun réplicat n'a été effectué car c'est l'ordre de grandeur qui m'intéressait plus qu'une valeur précise. Toutefois, maintenant que l'ordre de grandeur des concentrations en ions chlorures et sulfates a été obtenu, de futures analyses avec réplicat pourront être effectuées pour avoir les incertitudes de mesures.

2.3.3 Analyse des anions

La quantification des anions présents dans les échantillons est effectuée par chromatographie ionique au Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux à Nancy. L'instrument utilisé est un chromatographe Dionex™ ICS-1500 avec un passeur AS-DV (Thermo Fisher Scientific). La chromatographie ionique permet l'identification et la quantification des ions d'une solution. Pour ce faire, l'échantillon circule à travers une colonne comportant une résiné échangeuse d'ion (une résine

échangeuse d'anion dans ce cas). Chaque ion est fixé sélectivement sur la résine, en échangeant un contre ion (ici des alkyles d'ammonium quaternaire). Les processus physico-chimiques mis en jeu dans l'échange d'ions sont fortement dépendants de la vitesse de passage de l'échantillon et de la température de la colonne. Les ions d'intérêt fixés sont donc séparés et détectés par conductimétrie après leur élution. La conductivité mesurée en sortie de colonne est directement proportionnelle à la concentration.

La préparation des échantillons a été effectuée par mes soins et les analyses ont été effectués en collaboration avec David Billet. Les échantillons du système de lacs Tírez étudiés ont été filtrés avec des filtres en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de porosité de 0,22 µm avant d'être dilués avec de l'eau Milli-Q® 2500 fois pour éviter toute potentielle saturation et fausser la quantification. Chaque échantillon est ensuite injecté pour analyse avec un débit de 1,3 $mL.min^{-1}$ et la température du four dans lequel se trouve la colonne séparative est à 25 °C. Cette colonne contient une résine échangeuse d'ion, à l'instar de celles utilisées pour le dessalement (section IV.III) constituée par un squelette de styrène avec une proportion de divinyle benzene sur lequel est fixé les contre ions, à savoir des alkyles ammonium quaternaire. L'acquisition des données s'est faite avec le logiciel Chromeleon. Tout comme pour le dosage des cations, les incertitudes ne sont pas renseignées car aucun réplicat n'a été effectué lors de la journée d'analyse à Nancy pour des questions de temps. Maintenant que l'ordre de grandeur des concentrations en ions chlorures et sulfates a été obtenu, de futures analyses avec réplicat pourront être effectuées pour avoir les incertitudes de mesures. Un blanc analytique avec de l'eau ultra pure a été réalisé et comparé avec un standard de calibration (Annexe IV-4), pour s'assurer qu'il n'y avait pas de contribution du solvant utilisé (eau Milli-Q®) pour les dilutions dans les échantillons analysés.

2.4. Evaluation de l'intégrité des cellules par microscopie confocale

La microscopie confocale est une méthode d'imagerie optique apparentée à la microscopie à fluorescence. Ce type de microscopie utilise un laser avec une longueur d'onde d'excitation pour éclairer l'échantillon en un point précis et exciter les fluorochromes qui ont été utilisées pour marquer l'échantillon. L'utilisation de filtres en sortie du laser permet la sélection de longueur d'excitation selon le fluorophore utilisé et d'autres en amont du détecteur permettent la sélection d'une gamme de longueurs d'ondes d'émission spécifiques à chaque marqueur fluorescent. Ces dernières sont captées par un détecteur de type CCD pour la reconstitution de l'image. En scannant l'intégralité de l'échantillon il est donc possible d'obtenir une image complète 2D de l'échantillon. Le principe de la microscopie confocale est illustré sur la Figure IV-6. En plus de cela, la microscopie confocale permet d'explorer différentes profondeurs dans un échantillon, appelées section optique, résultant en l'obtention d'images 3D. Par exemple, c'est une méthode qui est couramment utilisée pour obtenir des images de cellules avec leurs structures internes (*e.g.* marquage de la membrane cytoplasmique et du noyau).

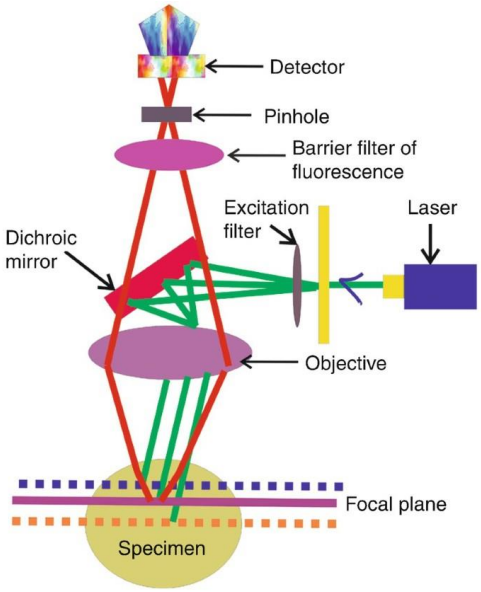


Figure IV-6 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope confocale. Source : (Dey 2018)

Le fluorochrome utilisé pour cette étude est l'acridine orange qui se lie aux acides nucléiques présents dans l'échantillon. Sa fluorescence varie selon la nature monocaténaire (rouge) ou bicaténaire (verte) des acides nucléiques marqués. L'inconvénient de l'acridine orange, bien qu'étant une méthode fiable, est sa faible spécificité résultant dans un marquage de nombreux éléments autres que des acides nucléiques. La discrimination, parfois complexe, entre la fluorescence provenant des cellules intègres et celle provenant d'autres éléments de la matrice se fait donc par reconnaissance visuelle.

L'observation des échantillons Tírez a été réalisée au sein du Laboratoire Génie des Procédés et Matériaux (LGPM). La préparation d'échantillon a été réalisée par mes soins et les observations par Cyril Breton. L'échantillon n°5 de la lagune del Longar a été évaporé et 10 mg du résidu solide a été déposé sur une lame de microscopie, marqués par l'acridine orange pendant 15 minutes, puis rincés abondamment à l'eau pour éliminer le maximum de fluorochrome non lié. Les lames avec les échantillons marqués ont ensuite été séchées sous flux d'azote avant l'observation par microscopie confocale pour éviter toute interférence de l'eau. Le microscope confocale utilisé est un Confocal LSM 700 (inversed microscope – AxioObserver Z1 – Ziss) avec une résolution latérale de 0,12 µm et une résolution verticale comprise entre 0.35 et 1.4 µm. Sur cet instrument, quatre longueurs d'ondes sont disponibles, à savoir 405, 488, 555 et 639 nm. L'observation au microscope confocale s'est faite en utilisant deux longueurs d'ondes parmi celles précédemment citées. Une première à 488 nm qui est la longueur d'onde d'excitation de l'acridine orange. Ce fluorochrome a une gamme de longueur d'onde d'émission comprise entre 530 et 640 nm selon la nature polymérique des acides nucléiques marqués. La seconde longueur d'onde utilisée correspond à l'excitation de la chlorophylle a, supposée présente dans ces échantillons de par la présence de cyanobactéries et de microalgues. La chlorophylle A, suite à son excitation, émet des photons de longueurs de l'ordre de 664 nm. L'objectif de cette analyse est d'observer des cellules des différents règnes phylogéniques présents dans les échantillons (eucaryotes, bactéries, archées) et de voir si des cellules intègres sont encore présentes dans le milieu après les deux ans de conservation. Les images obtenues ont été traitées grâce au logiciel ImageJ.

3. *Évaluation des caractéristiques physico-chimiques des échantillons Tírez.*

3.1. Contenu en carbone et en azote.

Les concentrations en carbone et en azote ont été déterminées par une analyse élémentaire. Les résultats obtenus (Tableau IV-3) correspondent aux concentrations en carbone et en azote particulaires pour les échantillons de la lagune del Longar et de Peña Hueca, c'est-à-dire contenus dans le culot des échantillons (ceux-ci ayant été centrifugés). Pour ces deux échantillons, il n'y a donc pas la contribution du carbone et de l'azote dissout dans la partie liquide de l'échantillon (=surnageant), ce qui n'est pas le cas pour la lagune Larga, qui combine l'analyse du surnageant et du culot. De plus, il est important de souligner que les échantillons n'ont pas été acidifiés avant l'analyse, les valeurs obtenues prennent donc en compte à la fois la partie organique et la partie inorganique. Pour le carbone, cela correspond principalement à la présence de carbonates, qui sont normalement à leur concentration leur plus basse (*i.e.* ~ 200 $mg.L^{-1}$) à la saison à laquelle l'échantillonnage a été fait, dépendante directement de leur précipitation saisonnière dans le sol (Prieto-Ballesteros 2003). Pour l'azote, la contribution inorganique correspond principalement à la présence de nitrates, pouvant notamment provenir de l'agriculture avec l'utilisation d'engrais dans les cultures alentours, mais aussi de l'industrie. De fait, les valeurs présentées sont donc le reflet de la contribution du carbone et à l'azote pouvant provenir des micro-organismes (qui sédimentent avec la centrifugation) et de la partie minérale (donc inorganique) dans ces échantillons.

D'après les résultats obtenus, il apparaît très nettement que l'échantillon provenant de la lagune Larga a une concentration beaucoup plus élevée que ce soit en carbone ou en azote (facteur 100 par rapport aux deux autres échantillons). Cet échantillon ayant été analysé intégralement (culot et surnageant), il est possible de supposer qu'une proportion importante de carbone et d'azote provient du surnageant et donc des ions bicarbonates et nitrates dissouts. Cela pourrait expliquer de telles différences entre échantillons, pour lesquels il y a seulement le carbone particulaire qui apparaît. De plus, lors de l'échantillonnage dans cette zone, de nombreux flamands roses ont été observés et peuvent être responsables d'une contamination extérieure qui expliquerait une telle valeur.

Pour obtenir les concentrations en carbone organique, une étape d'acidification en amont de l'analyse est nécessaire, permettant ainsi de savoir quels échantillons et quelle lagune est la plus riche en carbone organique. L'acidification ne permet toutefois pas d'éliminer les ions nitrates pouvant être présents.

Tableau IV-3 : Concentration en carbone et azote particulaires (organique et inorganique) dans trois des échantillons collectés. Un échantillon de la lagune de Tírez n'a pas été analysé pour des questions de temps mais de futures analyses sont prévues pour élargir le nombre d'échantillons analysé. Aucun réplicat n'a été effectué (voir section IV.2.3) ce qui explique pourquoi il n'y a pas de valeurs d'incertitude.

	Concentration en carbone ($mg.L^{-1}$)	Concentration en azote ($mg.L^{-1}$)
Longar S44	77	6
Larga S13	9299	878

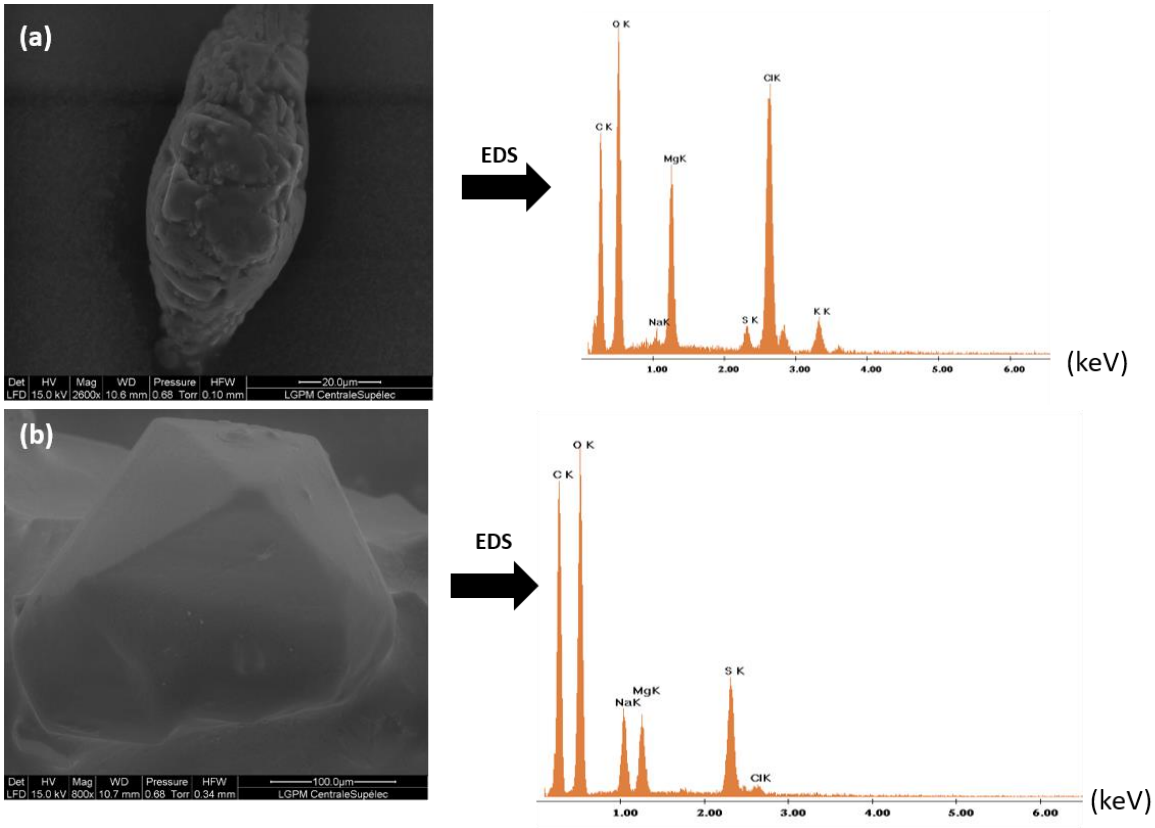
Peña Hueca S57	116	12

3.2. Mesure de la salinité

3.2.1. Identification des sels présents dans les échantillons

Prieto-Ballesteros et al., (2003) n'ayant étudié que la lagune de Tírez, un des premiers objectifs de ce travail est de caractériser qualitativement la composition en sels des différentes lagunes, notamment celles qui n'ont jamais été étudiées. Cela permet de comparer les lagunes entre elles ainsi que de potentiellement pouvoir établir un lien entre la forme des cristaux de sel et leur composition. Cette première caractérisation a été réalisée par une analyse MEB-SDE sur un échantillon de chaque lagune.

Avec cette méthode, il est également possible de réaliser une étude semi-quantitative de la composition élémentaire mais les incertitudes liées à la quantification peuvent être élevées du fait de la diffusion des rayons X. En effet, dans une telle étude quantitative, la morphologie des échantillons analysés peut directement impacter la quantification, la zone ciblée pouvant être plus ou moins rugueuse et la diffusion des rayons X se faisant donc dans plusieurs directions. De fait, tous les rayons X ne seront pas collectés, faussant alors la quantification. Voilà pourquoi seule une étude qualitative a été menée dans cette partie. L'analyse quantitative des sels présents dans les échantillons sera assurée par d'autres méthodes plus performantes.



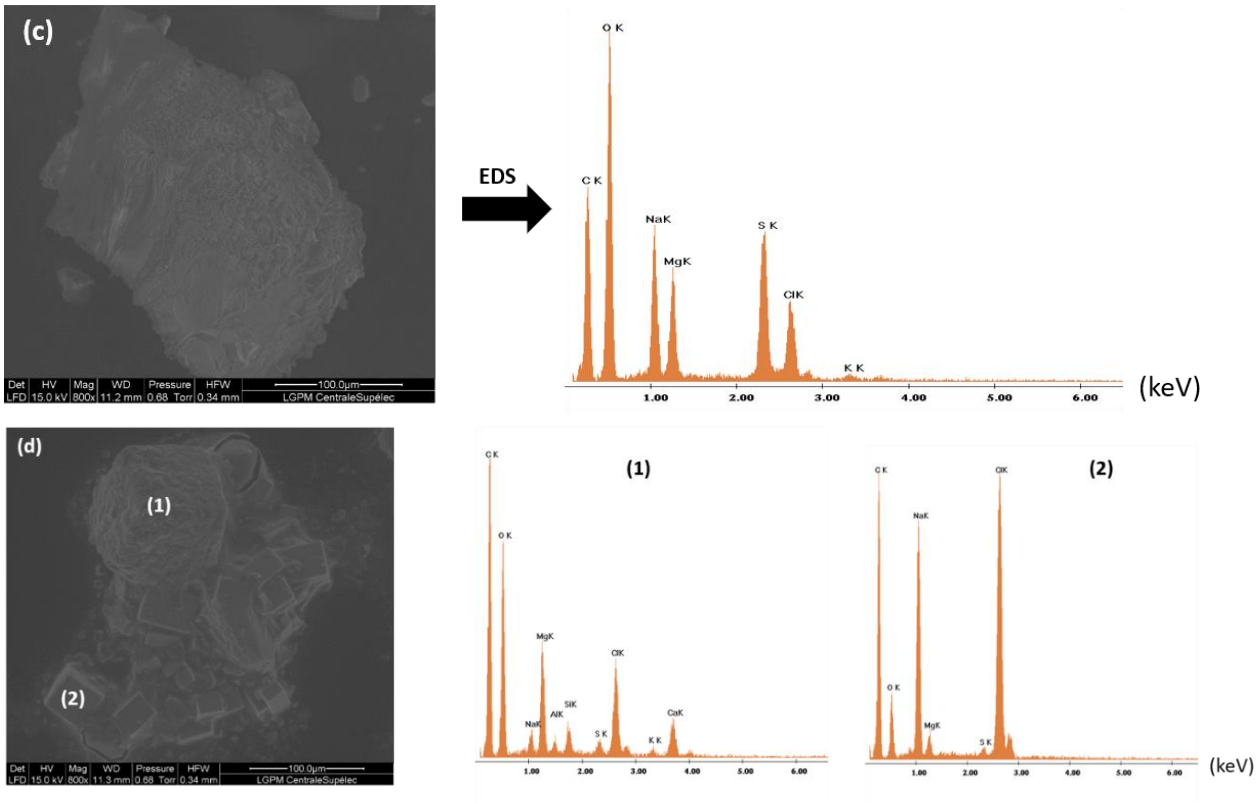


Figure IV-7 : Analyses MEB-SDE des échantillons (a) Lagune del Longar n°5 (b) Lagune de Peña Hueca n°25, (c) Lagune Larga n°17, (d) Lagune de Tírez n°42. La distance de travail du faisceau d'électron avec l'échantillon est indiquée sur chaque image sous l'acronyme WD. L'axe des ordonnées pour les spectres obtenus pour chaque image correspond à l'abondance relative de chaque élément, normalisée au pic le plus intense.

L'analyse MEB-SDE des quatre échantillons provenant des quatre lagunes de Tírez permet d'obtenir la Figure IV-7, avec d'une part les images collectées par détection des électrons rétrodiffusés et d'autre part le spectre en énergie avec la composition élémentaire obtenue pour la zone de l'échantillon analysée en détectant les rayons X. Ici les échantillons analysés correspondent à des échantillons solides provenant de la croûte de sels des lagunes Peña Hueca, Larga et Tírez et d'un échantillon liquide (n°5) de la lagune del Longar (Tableau IV-2).

Pour ce qui est de la morphologie, les images en SEM montrent des cristaux différents selon la lagune étudiée. En effet, pour la Lagune del Longar et Larga, les clichés obtenus montrent des structures salines amorphes, alors que les cristaux de sel des lagunes Tírez et Peña Hueca apparaissent polygonaux avec des formes bien précises. Par exemple, pour la lagune Tírez (Figure IV-7(d)), certains cristaux sont rectangulaires ou carrés et pour Peña Hueca, une forme pyramidale est observée pour certains des cristaux. Il semblerait qu'il soit possible pour certains cristaux d'établir un lien entre morphologie et composition élémentaire, comme cela est détaillé ci-après.

En ce qui concerne la composition élémentaire des cristaux de sels obtenue par EDS, tous les spectres obtenus montrent un pic de carbone et d'oxygène. Pour le carbone, cela est dû principalement à la préparation d'échantillon. En effet, les cristaux de sels sont déposés sur un scotch composé majoritairement de carbone qui est lui aussi frappé par le faisceau d'électrons du fait de la

précision de ce dernier. L'oxygène observé provient très probablement des molécules d'eau potentiellement piégées dans les cristaux de sels, qui se subliment sous vide, produisant un pic intense d'oxygène sur le spectre. Pour ce qui est des autres éléments, des différences sont observées entre les différentes lagunes, attestant de leur origine dans l'échantillon étudié. Les échantillons provenant de la lagune de Peña Hueca et Larga présentent une composition élémentaire très similaire (Figure 7(b) et (c)), avec majoritairement du sodium, du magnésium et du soufre. Contrairement à la lagune Peña Hueca, du chlore est également observé pour la Lagune Larga. Ainsi, il est possible de supposer que la lagune Peña Hueca contient majoritairement des sels de sulfate alors que la Lagune Larga semble contenir en plus des sels de chlore.

Les cristaux de sels provenant de la lagune de Tírez présentent des cristaux de composition différente, directement lié à leur morphologie. La première zone analysée (annotée avec un (1) sur la Figure IV-7(d)) est semblable à un agglomérat de cristaux de sels et de sédiments. En effet, la composition élémentaire est beaucoup plus diversifiée que les lagunes précédentes avec la présence majoritairement de magnésium, de chlore et de calcium. Du soufre est également identifié en proportion plus minoritaire. Les sels dans cette lagune pourraient donc être à la fois chlorés et sulfatés. En plus de ces éléments, de l'aluminium et de la silice sont également retrouvés, laissant présumer la présence de sédiments dans cet agglomérat. La seconde zone analysée correspond à des cristaux rectangulaires qui montrent une composition élémentaire typique de cette morphologie, à savoir des cristaux d'halite (chlorure de sodium). En analysant les autres cristaux de même morphologie sur ce même cliché, il apparaît, comme cela était attendu, que les cristaux de chlorure de sodium présentent une forme rectangulaire voire cubique.

Enfin, l'échantillon provenant de la lagune del Longar (Figure 7(a)) présente des cristaux dont la composition élémentaire apparaît riche en magnésium et en chlore avec la présence également de sodium, de potassium et de soufre. Pour cette lagune également, les sels sont présents sous forme chlorée et sulfatée. Un récapitulatif des résultats par lagune est présenté dans le Tableau IV-4.

Au travers de cette analyse en MEB-SDE, il apparaît que les différentes lagunes présentent des cristaux et des compositions élémentaires qui peuvent varier selon l'échantillon mais également au sein d'un même échantillon. Il est important de rappeler que seul un échantillon par lagune a été analysé et que plusieurs endroits ont été analysés au sein d'un même échantillon, montrant des hétérogénéités selon les lagunes. Par conséquent, il n'est pas possible d'extrapoler ces observations sur l'intégralité d'une lagune, des variations étant observées au sein d'un même échantillon, comme c'est le cas pour la lagune de Tírez par exemple. Cette analyse permet néanmoins d'avoir une connaissance qualitative sur la composition élémentaire des sels présents dans les échantillons collectés. Cette information demeure toutefois importante, tant la nature des sels présents peut impacter à la fois les méthodes de prétraitement d'échantillons qui seront utilisées dans le second volet de ce chapitre (*e.g.* la dérivatisation) mais également le fonctionnement des instruments (*e.g.* dégazage de chlorure d'hydrogène avec le chauffage qui peut dégrader la phase stationnaire d'une colonne chromatographique). Enfin, connaître la nature et donc la valence des ions présents est également une donnée importante pour le protocole de dessalement des échantillons liquides qui sera mis en place dans la troisième partie de cette étude.

Tableau IV-4 : Récapitulatif de la composition élémentaire qualitative de chaque lagune d'après les résultats obtenus en MEB-SDE. La morphologie des cristaux est donnée pour les échantillons observés, en aucun cas une extrapolation à la lagune entière n'est faite. Mg : magnésium, Cl : chlore, S : soufre, Na : sodium, K : potassium, Ca : calcium, Al : aluminium, Si : silicium.

Lagune	Morphologie cristaux	Composition
Del Longar	Amorphe	Mg et Cl majoritaires S et K minoritaires
Larga	Amorphe, en agglomérat	Na, Mg, Cl, S
Peña Hueca	Pyramidale, mais très variés au sein d'un échantillon	Mg et Cl majoritaires, S et K minoritaires
Tírez	Agglomérat (Matrice saline et minérale)	Na, Mg, Al, Si, S, Cl, Ca
	Rectangulaire	Na et Cl majoritaires

3.2.2. Dosage des sels majoritaires

La mesure de la salinité de certains des échantillons prélevés a été réalisée pour répondre à deux objectifs principaux : le premier étant la caractérisation de la salinité de ces lacs hypersalins (ayant été peu étudiée auparavant), le second s'inscrivant dans l'optique de mise en place d'un protocole de dessalement. En effet, pour ce deuxième objectif, connaître la salinité de chaque échantillon et la concentration en anions et en cations composant ces sels va permettre d'optimiser au mieux la méthode de dessalement mise en place et de voir son efficacité en faisant des mesures de salinité avant/après dessalement (voir section Chapitre IV.III).

3.2.2.1. Dosage des cations

La quantification des cations présents dans les échantillons de Tírez a été réalisée par spectroscopie d'absorption atomique. La quantification a été effectuée en mesurant l'absorbance pour les quatre échantillons (un par lagune) et la valeur a été reportée sur les courbes de calibration préalablement obtenues. Les résultats ainsi obtenus (Tableau IV-5) permettent de comparer les concentrations en calcium, potassium, magnésium et sodium des 4 échantillons provenant de lagunes différentes. Contrairement au dosage des anions, seul un échantillon de chaque lagune a été analysé. En effet, cette analyse quantitative est intervenue tard dans ce doctorat, du fait de la mise en service de l'instrument.

Table IV-5 : Concentrations des cations sodium, magnésium, calcium et potassium des différents échantillons analysés par spectroscopie d'absorption atomique. Aucun réplicat n'a été effectué d'où l'absence d'incertitude.

Lagunes & N° échantillon	*Na (g.L^{-1})*	*Mg (g.L^{-1})*	*Ca (g.L^{-1})*	*K (g.L^{-1})*
Peña Hueca S57	59,7	53,8	18,2	11,0
Larga S13	28,6	62,4	0	19,6
Longar S44	14,8	69,8	13,3	25,7
Tirez S40	25	82,5	8,9	13,0

Les résultats obtenus pour les différents échantillons montrent des différences à la fois entre les lagunes et entre les différents cations. Il apparaît que le magnésium est le cation le plus abondant pour tous les échantillons exceptés pour Peña Hueca S57, avec de 3 jusqu'à 10 fois plus de magnésium (en termes de concentration) par rapport aux autres cations pour un échantillon donné. L'échantillon Peña Hueca S57 apparaît comme le plus riche en sodium et en calcium, alors que l'échantillon Tirez S40 possède la plus forte concentration de magnésium et l'échantillon de la lagune del LongarS44 la plus forte pour le potassium. Hormis pour le sodium, les valeurs trouvées pour la concentration des cations (magnésium, le calcium et potassium) sont du même ordre de grandeur pour toutes les lagunes. Il est également important de souligner l'absence totale de calcium dans l'échantillon provenant de la lagune Larga.

3.2.2.2. Dosage des anions

Le dosage des anions a été réalisé par une analyse en chromatographie ionique. La quantification a été effectuée en intégrant les pics chromatographiques correspondants aux ions chlorure et sulfates et les valeurs obtenues ont été reportées sur des courbes de calibration de ces deux ions, préalablement tracées. Ces courbes de calibration sont présentées en Annexe IV-3.

Les résultats obtenus ont permis de comparer les échantillons provenant de différentes lagunes mais également de comparer des échantillons d'une même lagune mais prélevés à différentes localisations ou à différentes profondeurs pour le même site d'échantillonnage (Figure IV-8 et AnnexeIV-5).

Dans un premier temps, la quantification et la comparaison des anions présents dans les quatre échantillons analysés montre des différences d'une lagune à l'autre. En comparant les échantillons provenant des différentes lagunes (Tableau IV-6 et Figure IV-8), il apparait que la lagune de Tírez contient la plus grande concentration de chlore suivie par la lagune del Longar, puis par la lagune Peña Hueca et enfin la lagune Larga. Concernant les ions sulfate, la même observation peut être faite en inversant l'ordre des lagunes. En effet, il apparaît que plus un échantillon est riche en chlore plus celui-ci est pauvre en sulfate et inversement. Toutefois, bien que des différences soient observées entre les échantillons des différentes lagunes, la concentration en ions chlore et en ion

sulfates restent du même ordre de grandeur pour les quatre échantillons. À titre de comparaison, pour une eau de mer de salinité de 35 $g.L^{-1}$ (valeur moyenne des océans terrestres), l'ion chlorure a une concentration de 19,35 $g.L^{-1}$ et l'ion sulfate de 2,71 $g.L^{-1}$. Les valeurs obtenues à Tírez sont donc d'au moins un ordre de grandeur plus élevées pour les deux anions. À titre de comparaison la valeur de saturation de l'eau pour le sulfate de sodium (Na_2SO_4) d'environ 150 gL^{-1} à 20 °C.

Table IV-6 : Concentrations en ions chlorure et sulfate des différents échantillons analysés par chromatographie ionique.

Lagunes & N° échantillon	*Cl^- ($g.L^{-1}$)*	*SO_4^{2-} ($g.L^{-1}$)*
Peña Hueca S21	301,8	23,6
Peña Hueca S56	285,1	21,7
Peña Hueca S57	176,6	70,4
Larga S13	149,1	55,2
Larga S15	201,4	80,0
Longar S9	188,5	48,7
Longar S44	209,3	35,3
Tirez S40	239,2	40,9

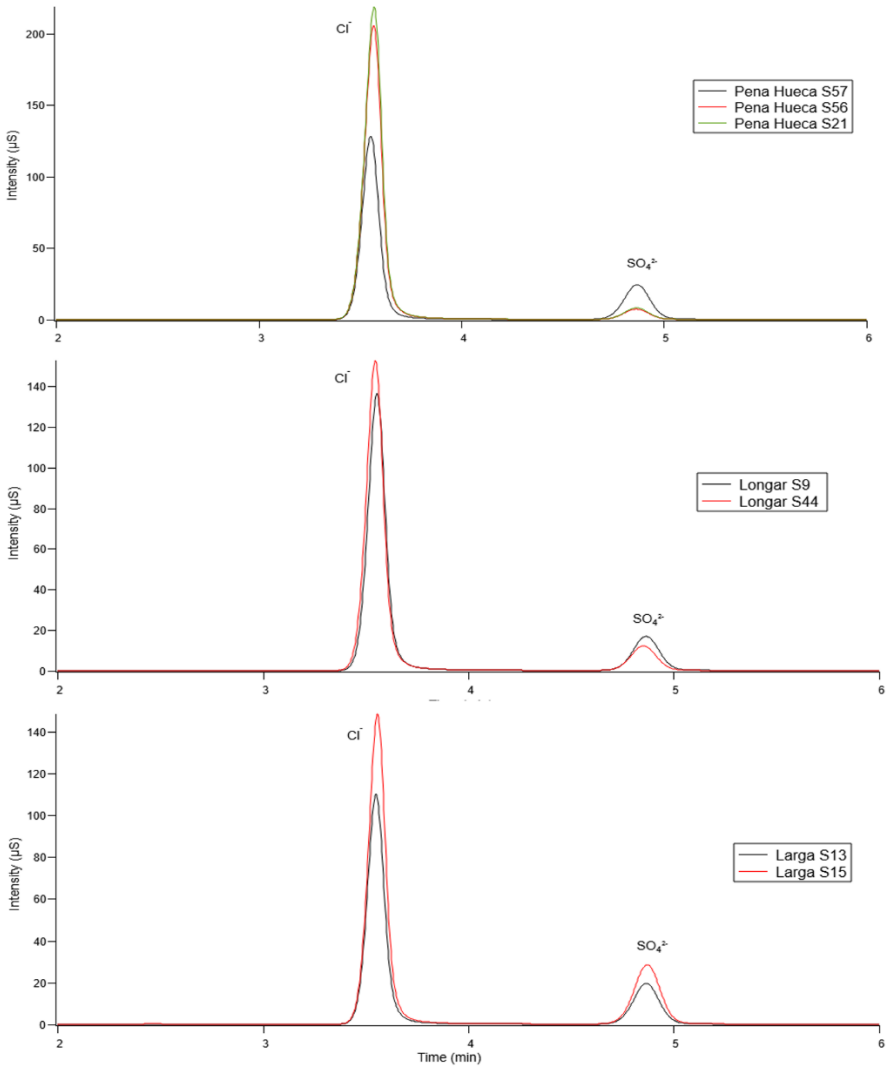


Figure IV-8 : Superposition de chromatogrammes des ions chlores et sulfates pour des échantillons prélevés au sein du même lagune (différents échantillons) de la quantité en anions pour (a) lagune de Peña Hueca, (b) lagune del Longar et (c) lagune Larga. L'intensité mesurée est directement proportionnelle à la quantité en ions présents dans l'échantillon.

Dans un second temps, les concentrations en chlore et en sulfate des échantillons provenant d'une même lagune ont été comparées (Figure IV-8 et Tableau IV-6). Pour les lagunes Peña Hueca et Larga, une comparaison entre échantillon de surface et subsurface a été réalisée (Larga S13 versus S15 et Peña Hueca S56 versus S57) (Tableau IV-6). La concentration en ions chlore est plus importante pour les échantillons prélevés en subsurface que pour ceux récupérés en surface. Il en est de même pour les ions sulfate sur les échantillons de la lagune Larga. Ces observations s'expliquent par le fait que l'eau échantillonnée en subsurface était beaucoup plus chaude que celle en surface (température non mesurée lors de l'échantillonnage). De fait, la solubilité augmentant avec la température, beaucoup plus d'ions chlore ont pu se dissoudre dans un même volume, expliquant ces différences de concentrations. Enfin, en comparant des échantillons de surface provenant de différentes localisations pour une même lagune (Figure IV-8 (a) et (b), échantillons Peña Hueca S21 et S57 ainsi que Longar S9 et S44) il apparaît que pour la lagune del Longar les concentrations en chlore et en sulfate sont très

similaires, alors que des différences sont observées pour la lagune Peña Hueca entre les échantillons S21 et S57.

3.3 Intégrité des cellules

Les observations en MEB, avec le protocole utilisé (*i.e.* sans fixation des échantillons, (Murtey and Ramasamy 2016)), ne permettent pas d'observer les cellules de micro-organismes présents dans les échantillons. Il a donc fallu utiliser la microscopie optique et plus spécifiquement la microscopie confocale couplée à un marquage des échantillons avec un fluorochrome, l'acridine orange. Un des intérêts d'une telle observation est de montrer, si cellule intègre il y a, l'importance ou non d'une lyse cellulaire en amont des analyses *in situ* en CPG-SM. En effet, une telle lyse peut être nécessaire pour accéder au contenu organique intracellulaire. De plus, cela pourra permettre d'évaluer les capacités des méthodes de préparation d'échantillons à lyser ces parois membranaires dans une optique d'analyse *in situ*. Ces informations sont primordiales pour la recherche de biosignatures sur Europe et Encelade par exemple.

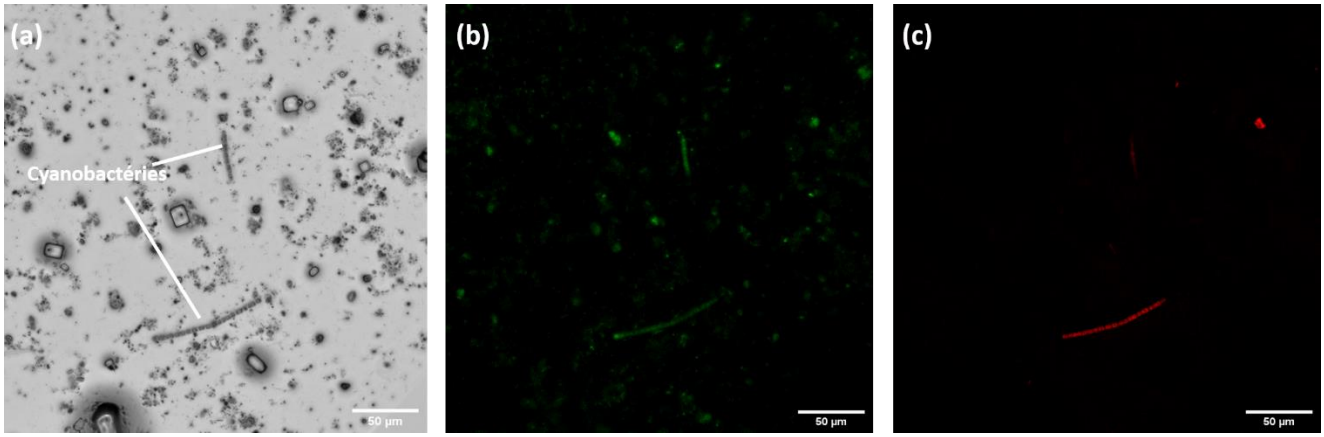


Figure IV-9 : Echantillon de la lagune del Longar (n°5) en microscopie confocale. (a) Observation en phase de l'échantillon, (b) observation de la fluorescence de l'acridine orange fixée aux acides nucléiques (tâches vertes), (c) observation de la fluorescence de la chlorophylle A présente dans les cyanobactéries (tâche rouge). L'échelle est indiquée en bas à droite de chaque cliché.

Les observations au microscope confocal ont été réalisées sur le résidu solide (matrice saline et sédimentaire) d'un échantillon évaporé de la lagune del Longar, le numéro 5 (Figure IV-9). Cet échantillon a été observé en contraste de phase (Figure IV-9 (a)), avec la fluorescence de l'acridine orange (Figure IV-9 (b)) mais aussi celle de la chlorophylle *a*, pouvant provenir de cyanobactéries ou de cellules de microalgues (Figure IV-9 (c)). L'observation en contraste de phase montre de nombreux éléments dans l'échantillon difficilement identifiables, de par la présence d'inclusions d'air et d'eau sur la lame de microscopie mais également par la présence d'une importante matrice sédimentaire dans cet échantillon. La topographie de l'échantillon (présentée en Annexe IV-6) impacte également la résolution obtenue et donc l'identification de cellules intègres. Toutefois, des cyanobactéries peuvent être identifiées (comme mentionné sur la Figure IV-9) formant des chaînettes pouvant aller, ici, jusqu'à une taille de 100 µm. Cette observation est confirmée dans un premier temps par la fluorescence de l'acridine orange, où les mêmes chaînettes sont observées par le marquage d'acides nucléiques bicaténaires. Dans un second temps, l'observation de la fluorescence de la chlorophylle A

représente un argument de poids quant à l'identification de ces cyanobactéries, avec l'apparition de chaînettes parfaitement discriminables, aux mêmes emplacements que sur les deux autres clichés. Ces observations montrent que, même après deux ans de conservation à 4 °C des échantillons, les cellules de cyanobactéries sont encore intègres. L'intégrité cellulaire n'étant pas synonyme d'activité métabolique, cette observation permet donc seulement de montrer que les membranes cellulaires des cyanobactéries n'ont pas été dégradées avec le temps, les cellules pouvant être mortes par ailleurs. Comme explicité auparavant, ce fluorochrome semble marquer de nombreux autres éléments qui ne sont pas des acides nucléiques (voir Figure IV-10 (b)), dû à sa faible spécificité de marquage. En effet, le fluorochrome semble par exemple être adsorbé sur les cristaux de la matrice saline. Hormis les chaînettes de cyanobactéries qui ont pu être identifiées indubitablement, il n'est pas possible de discriminer des cellules d'autres micro-organismes. En effet, sur les différentes images en microscopie confocale, aucune autre formation de cellules, pouvant être caractéristiques de certains micro-organismes n'apparaît. Conclure sur l'intégrité de cellules, autres que les cyanobactéries dans cet échantillon, demeure donc compliqué, bien qu'il semblerait que les membranes plasmiques soient conservées dans le temps. Or, les compositions de ces dernières variant d'un règne phylogénique à un autre, il est difficile de transposer les observations des cyanobactéries aux autres micro-organismes potentiellement présents (archées halophiles et microalgues par exemple). L'observation de cellules encore intègres est en lien direct avec les objectifs des expériences réalisées en section IV.2, qui viseront notamment à savoir si les méthodes de préparation d'échantillon associées à la CPG-SM permettent une lyse cellulaire en présence de sels et donc une détection de molécules organiques provenant du contenu intra-cellulaire.

4. Conclusion

Ce premier chapitre présente la caractérisation de certaines propriétés physico-chimiques des échantillons de Tírez qui ont été collectés en 2019, propriétés qui sont des clés pour l'analyse ultérieure et l'interprétation des résultats d'analyse organique, et pour le développement de stratégie analytique (*e.g.,* type de dérivatisant) de préparation d'échantillon (*e.g.,* dessalement). Dans un premier temps, la salinité des échantillons a été évaluée en quantifiant les cations (Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} et K^+) et les anions (Cl^- et SO_4^{2-}). L'étude de salinité montre des différences pour les cations entre les différentes lagunes notamment pour le sodium, le magnésium étant l'ion le plus abondant hormis pour la lagune Peña Hueca. Le dosage des anions montre une prépondérance des ions chlorures par rapport aux ions sulfates (d'un facteur 3 à 10 selon les échantillons), avec quelques différences entre la provenance des échantillons bien que les variations observées restent bien inférieures à l'ordre de grandeur.

Le contenu en carbone et en azote a également été évalué par analyse élémentaire. Le protocole utilisé ciblant à la fois la partie organique et inorganique du carbone et de l'azote particulaires il demeure difficile de conclure sur la richesse en matière organique de chaque échantillon, ces derniers pouvant contenir une grande quantité de carbonates. Ainsi, choisir un échantillon plutôt qu'un autre pour les analyses chimiques effectuées dans la prochaine partie relève plutôt des résultats des premières expériences effectuées en CPG-SM plutôt que la comparaison du contenu total en carbone et en azote.

Enfin, l'intégrité des cellules des micro-organismes présents dans les échantillons a été estimée par microscopie confocale. Cette observation a été réalisé sur un seul des échantillons et a permis de montrer des chaînettes de cyanobactéries encore intègres après les deux ans de conservation à 4 °C.

II. Détection de molécules organiques relatives au vivant dans les échantillons Tírez hypersalins : application de la CPG-SM et des techniques de préparation d'échantillon envisagées pour l'analyse *in situ* sur Encelade/Europe.

Le dosage de la salinité dans les échantillons provenant des lagunes de Tírez, Peña Hueca, Larga et del Longar a montré des taux de sels proches de la saturation. Les sels présents dans ces échantillons sont majoritairement composés de chlore ($MgCl_2$ et NaCl) et de soufre (sulfates). Les résultats ont également montré la présence de cellules encore intègres, source de matière organiques et de potentiels biosignatures. En plus de ces cellules, de très nombreuses molécules organiques peuvent très probablement être présentes dans les échantillons, soit provenant de la dégradation des cellules, soit directement liés au métabolisme et la communication cellulaire (*e.g.* métabolites secondaires), ou soit d'origine animale ou spécifiquement anthropique (*e.g.* hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques)

Les océans d'Europe et d'Encelade, de par leur salinité, pourraient également contenir de tels micro-organismes comme des halophiles. Les analyses *in situ* qui seront réalisées que ce soit sur Europe et Encelade incluront très probablement la CPG-SM (Hand *et al*. 2017) ainsi que les différentes méthodes de préparation d'échantillon qui ont déjà été utilisées par le passé sur d'autres corps planétaires. Cependant, la littérature est relativement pauvre en ce qui concerne l'impact des différents sels identifiés dans nos échantillons sur ces méthodes analytiques. Les quelques études qui ont été menées sur ces problématiques ont été réalisées sur des échantillons synthétiques, dont la concentration en molécules organiques et en sels étaient maîtrisées (*e.g.,* (Boulesteix *et al.* 2023a)). De plus, dans ces échantillons synthétiques, aucune expérience n'a été menée avec des mélanges de sels, tels qu'observés dans nos échantillons naturels. Typiquement, l'impact des sels de chlorure *ou* de sulfates à différentes concentrations sur la dérivatisation de composés organiques (acides aminés et acides carboxyliques) a été étudié, mais jamais un mélange de ces deux types de sels. Un tel mélange pourrait par exemple présenter des effets synergiques et entraver la réaction de dérivatisation, ou, *a contrario*, la favoriser (changement de pH).

1. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de ce chapitre est d'évaluer les capacités analytiques de la CPG-SM et des méthodes de préparation d'échantillon associées pour détecter des molécules organiques en présence de fortes concentrations en sels dans les échantillons Tírez. Ces molécules organiques peuvent potentiellement représenter des biosignatures pouvant être associées à la présence de micro-organismes provenant de différents phyla dans nos échantillons. Pour ce faire, les différentes méthodes de prétraitement d'échantillon utilisées dans l'analyse *in situ* (pyrolyse, dérivatisation et thermochimiolyse) seront associées à la CPG-SM sur les échantillons Tírez. En plus de cela, les mêmes méthodes seront appliquées sur des souches pures de micro-organismes pour des objectifs multiples

: (i) évaluer quelles molécules peuvent être détectées avec la CPG-SM sur des échantillons moins complexes que des échantillons naturels, (ii) identifier des composés qui peuvent être considérés comme des biosignatures de ces souches, (iii) estimer si les méthodes de préparation d'échantillon permettent la lyse cellulaire de cellules intègres et (iv) préparer une base de données aussi bien en termes de temps de rétention que de signatures spectrales pour l'interprétation des futures données acquises *in situ.*

2. Matériels et Méthodes

2.1 Échantillon étudié

Parmi tous les échantillons collectés, les résultats présentés dans ce second volet ont été obtenus sur un échantillon, le numéro 5 provenant de la lagune del Longar (voir Annexe IV-1). Avant le début des expériences, le contenu en carbone n'avait pas été évalué. Si tel avait été le cas, il est probable que, selon les résultats, un échantillon différent aurait pu être choisi. Cet échantillon a donc été sélectionné de par sa couleur très sombre qui suggérait la présence de bactérie anoxiques avec un métabolisme réducteur du soufre. De plus, c'est sur cet échantillon que des chainettes de cyanobactéries avaient été observées en microscopie confocale (section IV.I.3.3). Ainsi les capacités de détection de la CPG-SM de molécules directement liées à ce phylum pourraient être évaluées.

2.2 Instruments et protocoles analytiques

Chaque méthode de préparation d'échantillon nécessitant des configurations particulières, les analyses ont été effectuées sur des instruments différents, décrits ci-dessous. Chaque analyse, quel que soit l'instrument employé, a été réalisée sur une colonne RTX-5 (Restek), d'une longueur de 30 mètres, un diamètre interne de 0,25 mm et une phase stationnaire composée de 95 % de diméthylpolysiloxane et 5 % de diphényle et d'épaisseur 0,25 µm. Ce type de colonne a été choisie car connue pour être très robuste et ayant un héritage important dans la chromatographie spatiale passée (Goesmann *et al.* 2017; Goesmann *et al.* 2006; Mahaffy *et al.* 2012) et qui sera également envoyée sur Titan à bord de la sonde Dragonfly (Moulay *et al.* 2023). De plus, pour toutes les analyses, la température des injecteurs, des lignes de transfert et des sources de chaque instrument est fixée à 250 °C. L'énergie utilisée pour l'ionisation est de 70 eV. Le gaz vecteur est de l'hélium (AirLiquide, pureté > 99,999%) utilisé à un débit constant de 1mL.min^{-1}. Les analyses SM s'étendent des *m/z* = 40 à *m/z* = 700. Le programme de température des différents chromatographes en phase gazeuse utilisés est similaire pour toutes les expériences, hormis la température initiale qui est modifiée. Celui-ci débute à 40 °C (pyrolyse flash et rampe) ou à 50 °C (dérivatisation et thermochimiolyse), augmentant jusqu'à 300 °C avec une rampe de 10 °C.min^{-1}. La température finale est maintenue au minimum 15 minutes.

Pour chaque condition étudiée, deux analyses indépendantes ont été réalisées permettant de s'assurer de la répétabilité des expériences.

2.2.1. La pyrolyse-CPG-SM

La pyrolyse permet d'extraire des molécules organiques présentes dans un échantillon par un apport d'énergie thermique important (Wampler 2006). Les analyses en pyrolyse CPG-SM ont été effectuées avec un pyrolyseur CDS 6200 (CDS Analytical). Ce pyrolyseur est couplé au chromatographe en phase gazeuse Trace 1300 (Thermo Fisher Scientific) par l'intermédiaire d'une ligne de transfert dont la température a été fixée à 280 °C. La température de l'interface du pyrolyseur est de 250 °C. Les échantillons ont été pyrolysés avec deux méthodes différentes : (i) en pyrolyse flash pendant 30 secondes à 300, 500 et 800 °C ainsi qu'en (ii) pyrolyse lente par l'utilisation d'une rampe de chauffage, avec une température de départ de 100 °C dans la chambre de pyrolyse, augmentant avec une rampe de 100 °C.min^{-1} pour atteindre une température finale de 800 °C maintenue pendant 30 secondes. Une telle méthode s'apparente à ce qui est utilisé sur l'instrument MOMA à bord du rover Rosalind Franklin (Goesmann *et al.* 2017). Les molécules extraites avec l'augmentation de la température sont envoyées et adsorbées dans un piège contenant du Tenax®, refroidi à -40 °C par de l'azote liquide. Une fois la rampe de pyrolyse achevée, le flux d'hélium est inversé dans le piège et ce dernier est chauffé à 280 °C pour la désorption des molécules piégées, celles-ci étant ensuite transférées dans la colonne chromatographique par la ligne de transfert. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé pour la pyrolyse est un Trace 1300 couplé à un spectromètre de masse ISQ (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque analyse en pyrolyse, 10 mg de résidu après évaporation de l'eau de l'échantillons sont analysés.

2.2.2 La dérivatisation en amont de la CPG-SM

La dérivatisation a été employée pour cibler les molécules polaires ne pouvant être détectées directement par une analyse classique en CPG-SM en raison de leur polarité et leur masse moléculaire plus élevées (volatilité moindre). Deux agents de dérivatisation, employés pour l'analyse spatiale *in situ,* ont été utilisés : le diméthlyformamide diméthyl acétal (DMF-DMA) et le N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA). Le second a été dilué dans du DMF (ratio 4 : 1 respectivement), augmentant significativement le rendement de dérivatisation, comme cela est fait sur l'instrument SAM sur Mars (Mahaffy *et al.* 2012). Les deux agents de dérivatisation sont fournis par Sigma Aldrich et ont une pureté supérieure à 99,0 %. À noter que la dérivatisation au MTBSTFA possède un meilleur rendement de dérivatisation que celle au DMF-DMA (Goesmann *et al.* 2017). Toutefois, ce dernier est utilisé dans l'exploration spatiale pour sa capacité à conserver la chiralité d'une molécule, permettant la séparation énantiomérique par CPG-SM (non étudiée ici).

Le même protocole expérimental de dérivatisation off-line a été utilisé pour les deux agents de dérivatisation. La réaction chimique s'effectue dans un bloc chauffant extérieur au CPG-SM. Le protocole utilisé est le suivant : 20 µL d'agent de dérivatisation sont ajoutés à 10 mg du résidu sec provenant de l'évaporation de l'échantillon de la lagune del Longar. La dérivatisation au DMF-DMA s'effectue à 145 °C pendant 3 minutes (Freissinet *et al.* 2010) et celle au MTBSTFA à 75 °C pendant 15 minutes. Ensuite, 1 µL de la solution résultante est injecté pour l'analyse en CPG-SM en mode splitless. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Trace 1300 qui est couplé à un spectromètre de masse TSQ9000 constitué par un triple quadrupôle (les deux fournis par Thermo Fisher Scientific).

Pour chacune des dérivatisations, un blanc de dérivatisation (agent dérivatisant analysé seul avec le même protocole) a été réalisé permettant de connaître les produits secondaires issus uniquement du DMF-DMA et du MTBSTFA qui se forment durant la réaction de dérivatisation et l'analyse chromatographique.

2.2.3 La thermochimiolyse CPG-SM

La thermochimiolyse est une réaction de dérivatisation à haute température (*i.e.* 600 °C) qui permet de cibler notamment des macromolécules, qui sont stabilisées grâce à la réaction chimique (méthylation sur les fonctions alcools, carboxyles et amines), ce qui évite la dégradation thermique. À l'instar de la dérivatisation, la thermochimiolyse abaisse la polarité des molécules pour les rendre plus volatiles. Ici, la thermochimiolyse a été réalisée avec du Tetraméthylammonium hydroxide TMAH (dilué à 25 % w/w dans du méthanol, Merck) en mode on-line (réaction qui se fait directement dans le système d'injection). La réaction est effectuée à la température ayant le meilleur rendement de réaction, 600 °C (Buch *et al.* 2018), dans le four du pyrolyseur EGA/PY-3030D (FrontierLab). Le pyrolyseur est directement installé sur l'injecteur du chromatographe. 10 mg de résidu provenant de l'évaporation de l'échantillon de la lagune del Longar ont été pyrolysés avec 4 µL de TMAH pendant 10 secondes. Le contenu total de la capsule a été injecté avec un split de 20 $mL.min^{-1}$ (ratio 1:20) dans un chromatographe Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse ISQ simple quadrupôle.

En plus du protocole standard employé ici, différentes températures de thermochimiolyse ont été utilisées, pour cibler notamment des composés tels que des acides aminés ou des nucléobases. En effet, pour ces molécules organiques, la température de 600 °C peut être trop élevée et provoque leur dégradation.

Enfin, le TMAH est connu pour présenter de nombreux produits secondaires de réaction rendant le chromatogramme complexe à analyser, notamment au travers de coélutions possibles avec des molécules d'intérêt. Ainsi des études ont été menées sur d'autres agents de thermochimiolyse (Boulesteix *et al.* 2023b), dans une optique d'optimisation des méthodes d'analyse *in situ*, qui pourraient être embarquées à bord des futures sondes à destination des mondes océans. Voilà pourquoi j'ai également employé la thermochimiolyse au trimethylsulfonium hydroxyde (TMSH) à 600 °C, pour tenter d'obtenir un chromatogramme avec moins de co-produits de réaction comparé au TMAH.

2.3 Cultures de cyanobactéries et d'archées halophiles.

Dans l'optique de relier la composition et la détection de molécules organiques à des phyla pour les échantillons naturels, deux souches de microorganismes ont été cultivées pour être analysées avec les mêmes méthodes que celles employées sur l'échantillon de la lagune del Longar.

La première souche étudiée ici est *Halobacterium salinarum*, une archée halophile, identifiée dans de nombreux environnements hypersalins sur Terre (Baati *et al.* 2022; Mormile *et al.* 2003; Oren 2010). Cette archée est capable de survivre dans des eaux saturées en sels mais également de réactiver son métabolisme en présence d'eau après avoir été desséchée dans une croûte de sel. Cette famille

d'extrêmophile fait partie des potentielles candidates qui auraient pu s'être développée sur Mars (Litchfield 1998) et est une cible potentielle pour la recherche de vie sur les mondes océans tels qu'Europe et Encelade, bien qu'une extrapolation d'une vie terrestre dans un environnement extraterrestre ne peut être avancée. De par son omniprésence dans tous les milieux hypersalins terrestres, la souche *Halobacterium salinarum* NRC-1 est devenue la souche modèle pour les archées halophiles du fait de sa facilité de culture ainsi que de son génome entièrement séquencé. Ainsi, les voies métaboliques *d'Halobacterium salinarum* et donc les molécules qui y sont rattachées sont très bien connues (Gonzalez *et al.* 2008). Ici, *Halobacterium salinarum* DSM 671 a été fournie par DSMZ (Leibniz institute, DSMZ-German collection of Microorganisms and Cell Culturea GmbH). Les cellules ont été isolées à partir d'une eau minérale de source, Missa, Tottori Pref. Japan. Elles ont été cultivées dans un Erlenmeyer de 250 mL rempli avec 50 mL de milieu de culture nommé DSM 671 pour la famille Halobacteria à 37 °C et dans l'obscurité. La période de croissance des cultures était de 7 jours avant la récolte.

La seconde souche qui est étudiée dans ce sous-chapitre est *Chroococcidiopsis cubana.* Ce genre de cyanobactérie a été identifiée (*Chroococcidiopsis sp.)* notamment dans des dépôts de sels (cristaux d'halite) proches de la surface du Salar Grande dans le désert d'Atacama au Chili (Stivaletta *et al.* 2012). C'est probablement la cyanobactérie la plus résistante aux conditions extrêmes sur Terre, capable de résister à la dessication, aux radiations similaires aux taux rencontrés à la surface de Mars et à la salinité (Billi *et al.* 2000; Cockell *et al.* 2005; Cumbers and Rothschild 2014). La présence d'une telle cyanobactérie semble néanmoins peu probable sur les mondes océans, que ce soit en surface au vu de la température trop basse, ou dans les océans en subsurface du fait de l'absence de lumière dans de tels milieux, empêchant la photosynthèse. L'étude de *Chroococcidiopsis cubana* ici est utile pour estimer les capacités de la CPG-SM à détecter des molécules à partir de micro-organismes vivants et intègres ainsi qu'à l'interprétation des données obtenues à partir de l'échantillon n°5 de lagune del Longar. Pour cette étude, *Chroococcidiopsis cubana* DSM 107010 a été fournie par DSMZ (Leibniz institute, DSMZ-German collection of Microorganisms and Cell Culturea GmbH). Les cellules proviennent d'un sol sec de Pinar del Rio à Cuba. Ici, les souches ont été cultivées dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu 3N-Bristol sous un flux continu de photon d'une densité de 20 µmol photons $m^{-2}s^{-1}$. Comme pour les archées, la phase croissance a duré 7 jours avant la récolte.

La séparation des cellules du milieu de culture avant analyse est indispensable pour éviter toute détection pouvant provenir de ce dernier plutôt que des cellules elles-mêmes, ce qui aurait pour conséquence majeure de complexifier les chromatogrammes obtenus. Dans cette optique, pour chaque analyse effectuée (dérivatisation-CPG-SM et thermochimiolyse-CPG-SM), 1 mL de culture a été centrifugé à 6000 rpm pendant 5 minutes (Figure IV-10). Ensuite le surnageant a été retiré et conservé et le culot a été resuspendu dans 500 µL d'eau Milli-Q® (Merck Millipore). Ce procédé a été répété trois fois pour s'assurer de l'élimination maximale du milieu de culture. Enfin, le culot final obtenu a été séché sous flux de diazote avant de réagir avec les agents dérivatisant ou le TMAH (le même volume d'agents a été utilisé que pour l'échantillon naturel).

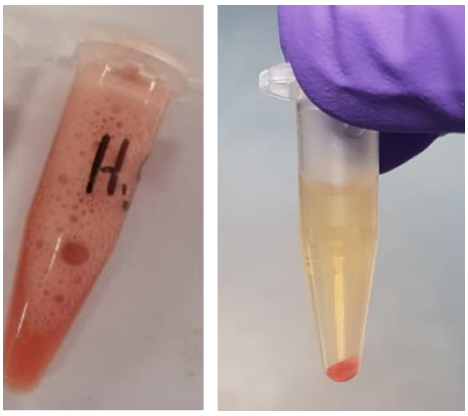


Figure IV-10 : Culture d'*Halobacterium salinarum* dans son milieu de culture (gauche) et après centrifugation (droite).

3. *Résultats et discussion*

3.1. Pyrolyse CPG-SM

3.1.1. Pyrolyse flash

La pyrolyse flash de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar a été réalisée à trois températures : 300, 600 et 800 °C (Figure IV-11). La comparaison avec les souches bactérienne et archée n'a pas été réalisée.

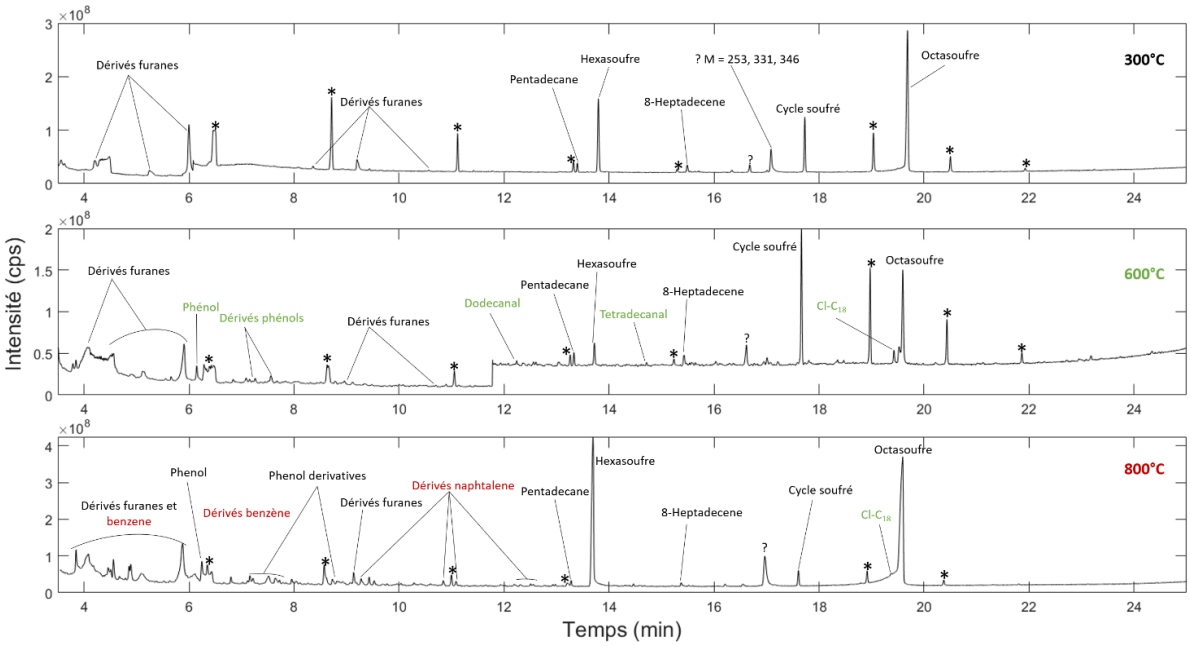


Figure IV-11 : Pyrolyse flash à 300 °C (haut), 600 °C (milieu) et 800 °C (bas) de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar. (*) Pics provenant de la dégradation de la phase stationnaire de la colonne chromatographique (=bleeding) ou de la dégradation thermique de minéraux provenant de l'échantillon.

La pyrolyse flash, quelle que soit la température utilisée, permet d'extraire et de détecter de nombreuses molécules organiques, avec une augmentation du nombre d'espèces chimiques détectées avec l'élévation de la température de pyrolyse. Des dérivés de furanes sont détectés à toutes les

températures, c'est-à-dire des cycles à cinq atomes de carbone contenant un atome d'oxygène avec des ramifications alkyls localisées à différentes positions du cycle mais également des ramifications portant des fonctions aldéhyde et cétone par exemple. Des composés aliphatiques sont également détectés pour les trois conditions de pyrolyse étudiées, tels que le pentadecane et le 8-heptadécène. Ces chaînes carbonées proviennent très probablement de la dégradation thermique des membranes cellulaires des micro-organismes présents dans l'échantillon. Enfin, des cycles soufrés (six et huit atomes de soufre) sont également détectés, dont l'origine est probablement liée à la dégradation des sulfates retrouvés dans les échantillons.

À 600 °C, le phénol et ses dérivés (ramifications à différentes positions) sont aussi identifiés. Le phénol ayant une température d'ébullition d'environ 180 °C, et n'étant pas détecté à 300 °C, sa détection traduit potentiellement le fait que ces molécules sont des produits de dégradation thermique de molécules mères présentes dans les échantillons. En plus des dérivés phénolés, trois molécules aliphatiques sont détectées, deux aldéhydes et le chlorooctadecane. Ce dernier n'est pas retrouvé à 300 °C. La formation de chlorooctadecane semble provenir d'une réaction entre le chlore des sels et l'octadecane présent dans les échantillons. Cet alcane pourrait provenir de la dégradation de l'acide stéarique (C_{18}) constituant des membranes lipidiques. La pyrolyse engendrerait donc la chloration de molécules organiques dans l'échantillon par réaction thermique (Mcintosh *et al.* 2022).

À 800 °C, des dérivés du benzène et du naphtalène sont détectés avec là-aussi des différences de positions de ramification. La cyclisation est un processus qui est bien connu avec l'augmentation de la température et a déjà été montrée par le passé (Morisson *et al.* 2016) L'origine de tels composés restent ici très difficile à établir, du fait de grand nombre de molécules mères pouvant se dégrader thermiquement pour donner ces produits, comme des alcanes ou des alcènes (Moldoveanu 2009).

Un autre aspect à souligner ici est que pour les trois températures utilisées, de nombreux pics détectées (astérisque sur la Figure IV-11) s'apparentent à des molécules provenant de la dégradation de la phase stationnaire (polymères de silice) de la colonne chromatographique (=bleeding). En effet, la pyrolyse de sels de chlorures et de sulfates engendre le dégazage de deux gaz principaux : le chlorure d'hydrogène et le dioxyde de soufre, détectés entre 2 et 4 minutes sur le chromatogramme (non montré sur la Figure IV-11 pour des soucis d'échelle). Ces deux espèces sont très agressives pour la phase stationnaire, ce qui pourrait expliquer la présence de nombreux pics et leurs intensités. Néanmoins, le bleeding se caractérise habituellement par l'élution aléatoire de composés provenant de la phase stationnaire, ce qui se traduit par la détection de pics à des temps de rétention différents d'une analyse à l'autre. Dans notre cas, il apparaît que les pics qui correspondraient à la dégradation de la phase stationnaire sont élués au même temps de rétention. Cette observation laisse tout de même supposer que ces molécules pourraient provenir de l'échantillon, et notamment de la partie sédimentaire. Toutefois, l'observation de tels pics à 300 °C semble réfuter cette hypothèse, car une température aussi faible ne devrait pas permettre la dégradation thermique de la partie minérale des échantillons.

La pyrolyse flash, notamment à haute température, entraîne une dégradation thermique des molécules, provoquant la cyclisation des composés aliphatiques. C'est notamment pour cela que de nombreux composés aromatiques sont détectés, leur nombre grandissant avec l'augmentation de la

température. Avec ce processus de dégradation, il devient compliqué de remonter aux molécules mères présentes dans les échantillons. En effet, un même produit de dégradation peut provenir de différentes molécules mères, rendant impossible leur identification. Pour pallier à ce biais analytique, tout en conservant l'extraction thermique apportée par la pyrolyse, il peut être intéressant d'utiliser la pyrolyse en rampe de température, qui en chauffant progressivement l'échantillon va permettre l'extraction de molécules aliphatiques ou peu stables thermiquement tout en conservant leurs structures.

3.1.2. Pyrolyse par rampe de température

La pyrolyse par rampe a été appliquée sur l'échantillon n°5 de lagune del Longar (Figure IV-12). Contrairement aux résultats obtenus avec la dérivatisation et la thermochimiolyse, la comparaison avec les souches bactériennes et archées n'a pas été faite, principalement en raison de problèmes instrumentaux liés au pyrolyseur. Les temps de rétention de chaque composé détecté sont reportés en Annexe IV-7.

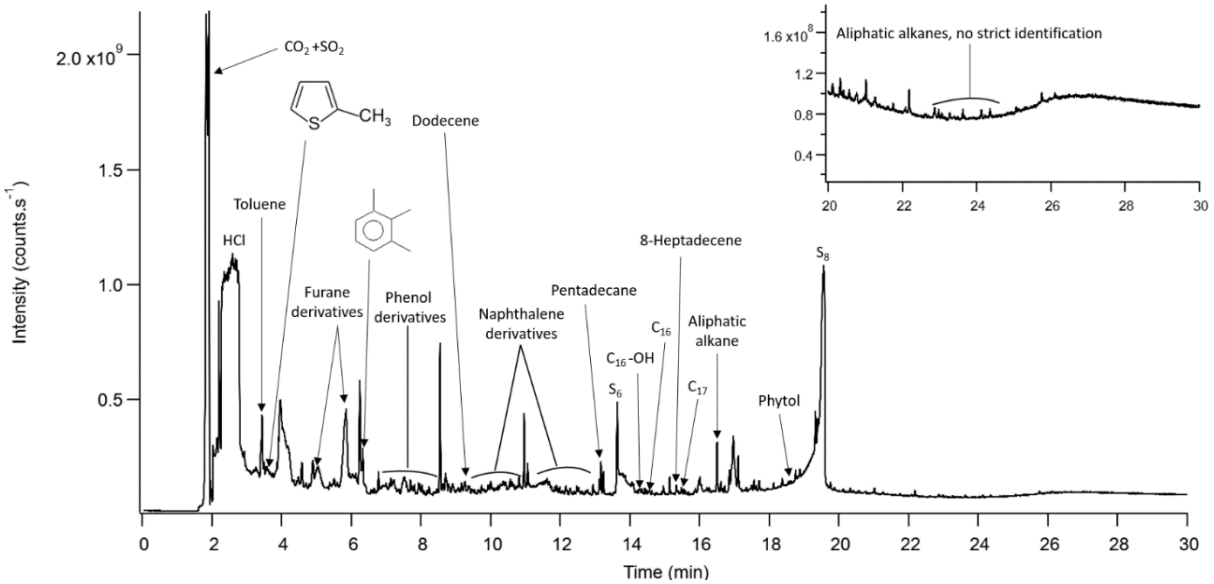


Figure IV-12 : Chromatogramme (Total Ion Current) obtenu lors de la pyrolyse par rampe de l'échantillon numéro 5 de la lagune del Longar. Pour rappel, 10 mg du résidu (sel et sédiments) ont été pyrolysés et injecté avec un split de 20 mL.min^{-1}. Tous les pics chromatographiques sans annotation correspondent à des molécules non identifiées. Les temps de rétention de chaque composé sont présentés en Annexe IV-7. L'échantillon a été pyrolysé de 100 °C à 800 °C avec une rampe de pyrolyse de 100 °C.min. La température finale de pyrolyse a été maintenant 30 seconces.

La pyrolyse rampe, contrairement à la pyrolyse flash, permet d'obtenir un chromatogramme complexe avec de nombreux pics et de nombreuses coélutions, ce qui rend plus difficile l'identification des composés détectés. Avec la pyrolyse par rampe, les mêmes composés que ceux obtenus avec la pyrolyse flash sont détectés : des composés aromatiques tels que des dérivés des furanes, des dérivés du phénol, des dérivés du benzène et du naphtalène, des cycles soufrés, ainsi que certains composés aliphatiques. L'intérêt de la pyrolyse rampe est d'essayer de conserver la structure moléculaire des molécules mères par une augmentation progressive de la température. C'est ce qui est observé sur les résultats obtenus. En effet, de nombreux composés organiques aliphatiques sont détectés

contrairement à la pyrolyse flash à la même température maximale. Par exemple, de nombreux alcanes contenant de 15 jusqu'à 18 atomes de carbone sont identifiés. En plus des alcanes, des alcènes et des alcools tels que le phytol (C_{20} avec des ramification) sont également détectés. À partir de l'analyse du spectre de masse, il est possible d'émettre des hypothèses sur la famille chimique de certains composés qui sont élués plus tardivement grâce à des signatures spectrales caractéristiques de ces familles. Toutefois, les pics moléculaires (molécule non fragmentée et ionisée) sur les spectres de masse ne sont pas toujours détectés et une identification stricte demeure donc compliquée. En effet, il n'est pas forcément possible de discriminer des molécules ayant le même schéma de fragmentation et qui diffèrent uniquement par leur nombre d'atomes de carbone.

3.1.3. Discussion sur le lien entre les molécules détectées en pyrolyse et une origine biologique potentielle

Malgré la dégradation thermique des molécules mères présentes dans les échantillons durant la pyrolyse, il est possible de faire des hypothèses sur les liens entre les molécules détectées et leur origine dans l'échantillon.

Tout d'abord, les cycles contenant des atomes d'oxygènes comme les différents furanes identifiés peuvent provenir de la dégradation des sucres présents dans les micro-organismes des échantillons, participant par exemple à différentes voies métaboliques (Schrödter and Baltes 1991; Tara L. Salter *et al.* 2022). Cette hypothèse est par ailleurs cohérente avec la température de dégradation de nombreux sucres (< 200 °C) ce qui justifie pourquoi ces cycles aromatiques sont détectés dès 300 °C. De plus, les dérivés benzéniques et phénolés détectés pourraient être des produits de dégradation de protéines ou bien d'acides aminés (Chiavari and Galletti 1992; Schrödter and Baltes 1991). La confirmation d'une telle hypothèse demeure difficile à poser, ces composés étant retrouvés dans de nombreux domaines tels que l'industrie de matières plastiques pour les phénols par exemple.

Les alcanes et alcools aliphatiques à longue chaîne détectés par pyrolyse par rampe peuvent provenir des lipides constituant les membranes des bactéries ou eucaryotes de l'échantillon (Jan Schwarzbauer and Branimir Jovančićević 2020) mais aussi des éthers lipidiques constituant la membrane des archées (Navale 1992). Par exemple, les acides gras composant ces lipides subissent la réaction de décarboxylation lors de la pyrolyse, aboutissant à la détection de ce type d'alcanes (Moldoveanu 2009). Cependant, il est difficile d'attribuer strictement ces molécules aliphatiques à une souche bactérienne ou eucaryote particulière car les produits de dégradation sont globalement communs, c'est-à-dire que plusieurs souches de différentes règnes phylogénétiques peuvent donner ces molécules en pyrolyse. Par exemple, les esters et les éthers de glycérol (respectivement composants des membranes des eucaryotes/procaryotes et des archées) peuvent donner les mêmes produits de dégradation thermiques, à savoir des longues chaînes aliphatiques. De plus, compte tenu de l'environnement du lac, il n'est pas possible d'exclure que ces molécules aliphatiques aient une origine liée aux activités anthropiques (élevage, cultures…) qui peuvent contaminer le lac. L'estimation de cette contamination pourrait être faite en calculant le CPI (pour Carbon Preference Index, ou en français Indice de Préférence Carbone) pour les alcanes de C_{14} à C_{34}, qui évalue la prédominance des

alcanes à atomes pairs ou impairs. Sa valeur indique si les alcanes sont d'origine biologique ou non. Typiquement, le pétrole présente un CPI proche de l'unité alors que les veux de CPI > 3 indiquent une prédominance des alcanes biogènes. Pour ce faire, une extraction par solvant basée sur la procédure de Bligh-Dyer (Bligh and Dyer 1959) est nécessaire pour récupérer tous les alcanes des échantillons. Ce type d'expérience est à envisager dans les futures analyses qui seront réalisées.

Enfin, parmi les alcools détectés, le phytol est un produit de dégradation pouvant provenir de la chlorophylle (Kebelmann *et al.* 2013). Ses sources pourraient être des cyanobactéries (identifiées en microscopie confocale) ou des microalgues, également identifiées dans des études précédentes dans le système lacustre de Tírez.

En conclusion, la pyrolyse, qu'elle soit utilisée en mode flash ou en rampe de température, apparaît comme une méthode pertinente pour la détection de matière organique dans des échantillons hypersalins, et ce en présence de fortes concentrations en sels. Avec cette méthode, les sels semblent tout d'abord avoir un impact instrumental en venant créer des bouchons dans les capillaires fluidiques lors de la pyrolyse (étant donné leur caractère réfractaire), limitant le passage du gaz vecteur et *a fortiori* des molécules vaporisées. Cette interférence mécanique est à prendre en compte pour ne pas limiter les performances analytiques de l'instrument qui sera envoyé et obtenir un fonctionnement nominal tout au long de la mission. L'autre impact des sels est directement lié à leur dégradation avec la pyrolyse qui se traduit par un dégazage de chlorure d'hydrogène (HCl) et de dioxyde de soufre (SO_2). Ces deux gaz sont agressifs pour la phase stationnaire ce qui provoque sa dégradation (ou bleeding) pouvant limiter les performances séparatives de la chromatographie et *in fine* compliquer l'identification. Enfin, avec la pyrolyse, un phénomène de chloration peut être observé entre les ions chlorures inorganiques et les molécules organiques de l'échantillon. Un processus chimique similaire peut également exister avec le soufre des ions sulfates. De telles réactions peuvent rendre l'interprétation des données ardue, particulièrement pour remonter aux molécules initialement présentes dans l'échantillon.

La pertinence de la détection de matière organique au sein des échantillons est à nuancer concernant la recherche de composés d'intérêt pour la chimie prébiotique ou témoins de traces de vie. En effet, la dégradation thermique des molécules biologiques induite par la pyrolyse constitue un biais analytique important pour tenter de détecter des potentiels biomarqueurs. Ainsi, l'utilisation d'un tel procédé pour l'analyse *in situ* sur les mondes océans dans notre cas, permet de savoir si l'échantillon prélevé contient des molécules organiques qui pourrait être d'intérêt pour l'exobiologie. D'autres méthodes complémentaires de préparation d'échantillon doivent être utilisées pour tenter d'extraire des molécules mères, directement liées à la biologie, sans modification de leur structure moléculaire. Sans cela, l'identification de bioindices pertinents, comme définis en introduction de ce manuscrit, semble compromis.

3.2. Dérivatisation-CPG-SM

En tant que méthode de préparation d'échantillon utilisée dans l'exploration spatiale, j'ai appliqué la dérivatisation couplée à la CPG-SM sur l'échantillon de la lagune del Longar. Deux agents de dérivatisation, utilisés dans l'analyse *in situ* (sur Mars notamment) ont été utilisés, à savoir le DMF-DMA et le MTBSTFA (principes détaillés en introduction de ce manuscrit). Ainsi, les molécules réfractaires et/ou polaires pourront être analysées par CPG-SM.

3.2.1 Dérivatisation au DMF-DMA

La dérivatisation au DMF-DMA a été utilisée sur l'échantillon n°5 de la lagune del Longar, ainsi que sur l'archée halophile *Halobacterium salinarum* et la cyanobactérie *Chroococcidiopsis cubana.*

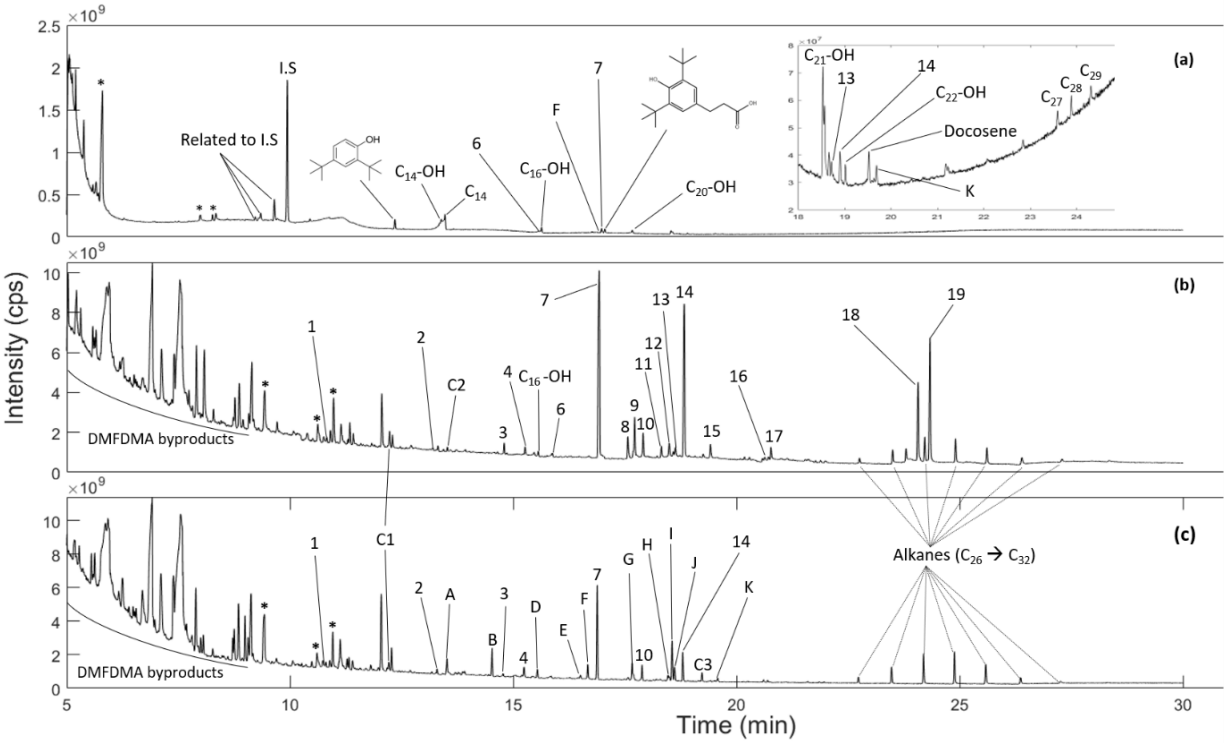


Figure IV-13 : Chromatogrammes obtenus (Total Ion Current) lors de l'analyse d'échantillons dérivatisés avec le DMF-DMA : (a) échantillon n°5 de la lagune del Longar, (b) la souche Halobacterium salinarum et (c) la souche Chroococcidiopsis cubana. Après la dérivatisation dite off-line, 3 µL de solution ont été injectés pour l'échantillon naturel et 1 µL pour les souches, les deux en mode splitless. Tous les pics qui ne sont pas annotés sont des molécules non identifiées. Attribution des pics: (*) Co-produits DMF-DMA, (I.S) Etalon interne, (C1), (C2) et (C3) Contaminations provenant d'analyses précédentes, (1) Tridecene, (2) Tetradecene, (3) Acide tetradecanoïque dérivatisé, (4) N-isopropylbenzosulfonamide, (5) Hexadecanol, (6) Acide pentadecanoïque dérivatisé, (7) Acide palmitique dérivatisé, (8) Acide palmitique ethyl ester, (9) Dihydrophytol, (10) Octadecanol, (11) Chlorooctadecane, (12) Acide phytanique dérivatisé, (13) Acide oléique dérivatisé, (14) Acide stéarique dérivatisé, (15) Acide stéarique ethyl ester, (16) Acide eicosanoïque dérivatisé, (17) Alcane aliphatique, (18) Dihydrosqualene, (19) Squalene, (A) Acide glutamique dérivatisé, (B) Heptadecane, (D) Acide 12-methyltetradecanoïque dérivatisé, (E) Acide carboxylique dérivatisé, (F) Acide palmitoléique dérivatisé, (G) Phytol, (H) Acide linoléique dérivatisé, (I) Acide linolénique dérivatisé, (J) Acide élaïdique dérivatisé et (K) Acide dihydrosterculique dérivatisé.

La Figure IV-13 montre que de nombreuses molécules sont détectées à partir de l'échantillon naturel mais aussi avec les deux souches de micro-organismes. Un plus grand nombre de molécules est détecté avec les cultures qu'avec l'échantillon naturel. Cette observation peut être attribuée en premier lieu à la quantité de matière organique présente dans les échantillons. En effet, les souches peuvent être considérées comme une référence « pure » (densité de cellules de 4.10^6 cell.mL^{-1} pour *Chroococcidiopsis cubana* et 1.10^8 cell.mL^{-1} pour *Halobacterium salinarum*) alors que l'échantillon naturel constitue un écosystème à part entière avec une constituante organique et une autre inorganique (fraction minérale), avec par conséquent des densités de cellules de chaque micro-organisme beaucoup plus faible.

Concernant l'échantillon de Tírez, 29 molécules ont été considérées dont 10 n'ont pas pu être identifiées. Les pics retenus sont ceux qui n'étaient pas trop proches du bruit de fond pour permettre l'obtention d'un spectre de masse propre. La considération d'un rapport signal/bruit = 3 n'a pas été retenue car des molécules d'intérêt n'aurait pas été analysées avec un tel critère. Parmi ces molécules, des acides gras saturés et insaturés (C_{15}, C_{16} et C_{18}), des alcanes et alcènes aliphatiques (jusqu'à C_{29}), des alcools (jusqu'à C_{22}) et deux cycles aromatiques portant des fonctions alcools et carboxyles sont détectés. Les acides carboxyliques sont détectés sous leur forme dérivatisée (méthyl ester) alors que les alcools le sont sous leur forme brute. En effet, les alcools étant des espèces chimiques très faiblement nucléophiles, le rendement de réaction avec le DMF-DMA (électrophile) est très faible voire nul. De fait, tout comme les alcanes et alcènes identifiées, les alcools qui ne sont pas dérivatisés ont pu être extraits par l'action du solvant, sans réaction de dérivatisation. Pour confirmer ce processus de solvatation, une expérience complémentaire, respectant le même protocole devra être réalisé en utilisant du DMF au lieu du DMF-DMA.

Comme avec la pyrolyse, les molécules organiques identifiées peuvent être associées à des souches de micro-organismes présents dans l'échantillon naturel. Les acides gras, constituant les lipides membranaires des cellules procaryotes et eucaryotes (DeLuca *et al.* 1990), proviennent très probablement des deux règnes phylogénétiques présents dans l'échantillon. L'origine des longues chaînes aliphatiques détectées telles que les alcanes et les alcènes est probablement directement liée à la dégradation des membranes cellulaires. Les alcènes provenant très probablement des acides gras insaturés et les alcanes de ceux saturés. La dégradation des acides gras en alcanes ou en alcènes peut s'expliquer par la conservation des échantillons avec le temps mais également par la température de dérivatisation utilisée qui peut provoquer une décarboxylation (*i.e.* 145 °C). Une telle distribution d'alcanes est très régulièrement observée dans l'étude d'échantillons naturels terrestres, et a déjà été répertoriée dans un environnement similaire en termes de salinité (Oyo-Ita *et al.* 2022). Tout comme pour la pyrolyse, les alcanes ne peuvent être directement attribués à une origine biologique. En effet, ce sont des composés qui sont également produits par des activités anthropiques et qui peuvent facilement constituer une contamination organique (Sojinu *et al.* 2012; Volkman *et al.* 1992).

Enfin, deux molécules aromatiques, l'une portant une fonction alcool (2,4 di-tert-bubtyl phenol) et l'autre un alcool et un carboxyle (3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionic acid) ont été détectées. Ces molécules peuvent être des métabolites secondaires avec des propriétés antioxydantes, et qui ont déjà été retrouvés dans des échantillons de lacs hypersalins (Nas *et al.* 2021).

Cela signifie, qu'additionnellement aux molécules provenant directement des micro-organismes, la détection de métabolites secondaires peut aussi constituer un indice de traces de vie dans le milieu en lui-même.

De fait, et malgré la présence de fortes concentrations en sels dans l'échantillon naturel, la dérivatisation au DMF-DMA permet de détecter de nombreuses molécules organiques, que ce soit par la solvatation ou bien avec la dérivatisation. Parmi ces molécules organiques, certaines sont spécifiques d'un règne phylogénétique et l'origine abiotique peut être écartée. Typiquement, c'est le cas pour des composés comme le dihydrophytol qui est spécifique de la membrane des archées. Toutefois, l'origine abiotique ne peut pas être écartée pour tous les composés détectés.

Dans un second temps, en observant les chromatogrammes obtenus par l'analyse des souches biologiques dérivatisées, un grand nombre de composés organiques sont détectés. Parmi les espèces chimiques détectées, 14 molécules organiques sont communes aux deux souches. Parmi ces molécules, il y a des longues chaînes aliphatiques (alcanes, alcènes et alcools jusqu'à C_{32}) ainsi que des acides gras saturés et insaturés. En plus de ces 14 composés, des molécules qui semblent être spécifiques de chaque famille sont détectées. Par exemple, le dihydrophytol, l'acide phytanique et le squalène et ses isomères sont des molécules spécifiques des archées alors que l'acide dihydrosterculic est spécifique des cyanobactéries. Déterminer l'origine cellulaire des molécules identifiées avec les souches permet de déterminer l'origine phylogénétique de certains composés identifiés dans l'échantillon naturel mais également de connaître les capacités analytiques de la dérivatisation-CPG-SM au DMF-DMA vis-à-vis de cultures de microorganismes, ce qui n'a jamais été étudié auparavant. Ainsi, il est possible d'évaluer si les protocoles utilisés pour la dérivatisation sont en mesure de lyser les cellules et d'accéder au contenu intracellulaire.

Tout d'abord, pour *Halobacterium salinarum*, la détection d'acide palmitique et phytanique relève directement de la membrane des cellules. En effet, l'acide palmitique est un acide gras libre associé à la bactériorhodopsine (pigment rose dans la membrane d'*Halobacterium salinarum*)(Colella *et al.* 1998; Corcelli et al. 1996) et l'acide phytanique entre dans la composition des phosphoglycérolipides éthers de la membrane des archées (Grivard *et al.* 2022). Les membranes des archées ne contiennent pas d'esters mais des éthers de glycérol, ce qui signifie que les autres acides gras détectés sur cette souche semblent potentiellement provenir de contaminations externes, par exemple lors de la mise en culture. De plus, le squalène et certains de ses isomères (supraene et dihydrosqualene) ont aussi été identifiés. Ces molécules sont des isoprénoïdes, constitutifs de la bactériorhodopsine (Gilmore *et al.* 2013). Enfin, le dihydrophytol peut être un produit de dégradation d'un lipide retrouvé dans la membrane des archées, nommé archaeol (Orphan *et al.* 2001). Toutes ces molécules pourraient être retrouvées dans l'échantillon naturel étudié mais leurs concentrations peuvent se situer en dessous des limites de détection.

Ensuite, en regardant dans le détail les résultats obtenus pour *Chroococcidiopsis cubana*, les acides gras identifiés proviennent vraisemblablement des membranes des cyanobactéries. Un autre composé identifié spécifiques des organismes photosynthétiques est le phytol. En effet, cette molécule est un produit de dégradation de la chlorophylle que l'on retrouve dans les thylakoïdes des cellules de cyanobactéries. Ces compartiments sont intracellulaires, ce qui signifie que le protocole de

dérivatisation au DMF-DMA (i.e. 145 °C 3 minutes), permet une lyse de la membrane donnant accès au contenu cytoplasmique ou bien, que les cellules de cyanobactéries sont déjà mortes et ont relargué leur contenu intracellulaire. De plus, l'acide dihydrosterculique a été détecté et peut provenir du métabolisme chez la cyanobactérie en tant qu'intermédiaire réactionnel. C'est également un composé qui est retrouvé dans l'échantillon Tírez, qui peut donc provenir des cyanobactéries identifiées en microscopie confocale. Cette molécule est aussi présente chez les plantes et les huiles végétales (Kleiman *et al* 1969), la présence de microalgues dans les lagunes Tirez ayant été confirmée, voici une autre origine biologique envisagée.

Un dernier aspect intéressant à souligner ici, est la différence de détection des co-produits du DMF-DMA entre l'échantillon naturel et les souches. En effet, entre 5 et 10 min de temps de rétention sur la colonne chromatographique, de nombreux co-produits de dérivatisation sont observés lors de l'analyse des souches alors que tous les pics correspondants sont absents sur l'analyse de l'échantillon du lac. Cela pourrait signifier que le DMF-DMA est consommé par ailleurs, limitant donc sa réactivité. Deux hypothèses principales pourraient expliquer cette observation : (i) le DMF-DMA est hydrolysé par l'eau résiduelle piégée par les sels ou bien ce sont les sels qui inhibent partiellement la réaction de dérivatisation (les acides carboxyliques et le carboxyle d'un métabolite secondaire étant dérivatisés). La première partie de cette hypothèse semble pouvoir être réfutée car si le DMF-DMA était consommé par l'eau, les co-produits de dérivatisation du DMF-DMA seraient tout de même observés. (ii) Le DMF-DMA s'adsorbe sur la matrice saline et ne réagit donc pas autant qu'attendu, résultant en l'absence de détection des co-produits. De futures investigations, notamment après dessalement des échantillons, sont cependant nécessaires pour confirmer ou réfuter ces hypothèses. (iii) Le pH ainsi que la nature des sels peuvent jouer sur le rendement de dérivatisation des molécules contenues dans l'échantillon. Par exemple, un pH acide permet d'obtenir un meilleur rendement de dérivatisation qu'un pH basique (Boulesteix *et al.* 2023a).

3.2.2. Dérivatisation au MTBSTFA

En tant qu'autre agent de dérivatisation utilisé dans l'analyse *in situ*, sur Mars notamment (Goesmann *et al.* 2017; Mahaffy *et al.* 2012), le MTBSTFA a été utilisé sur l'échantillon de la lagune del Longar et sur les souches d'archée et de cyanobactérie.

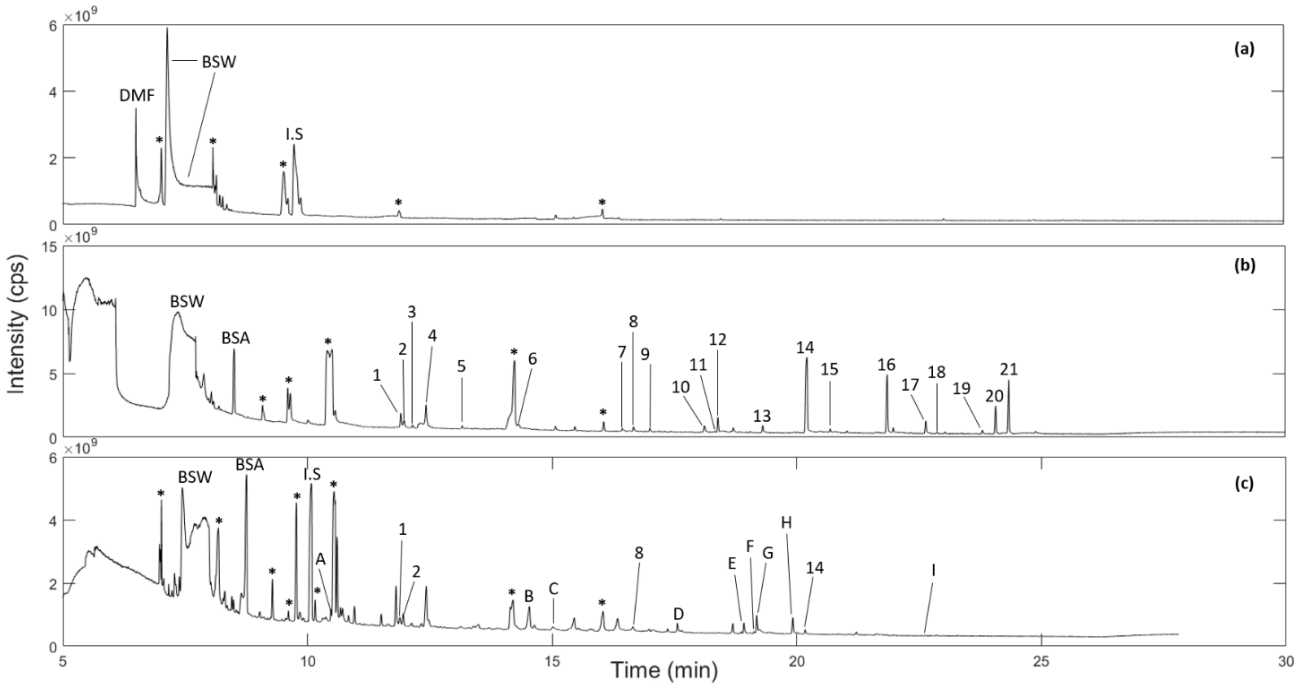


Figure IV-14 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse d'échantillons dérivatisés avec le MTBSTFA : (a) échantillon Tirez, (b) souche Halobacterium salinarum, (c) souche Chroococcidiopsis cubana. 3 µL de l'échantillon dérivatisé de Tírez ont été injectés avec un split de 10 mL.min^{-1}. Pour les souches, 1 µL a été injecté en mode splitless. Tous les pics non annotés sont des molécules qui n'ont pas pu être identifiées. Attributions des pics : (*) Co-produits MTBSTFA, (BSW) Eau bisylylée, (BSA) Ammonique bisylylé, (1) Acide lactique dérivatisé, (2) Acide benzoïque dérivatisé, (3) Acide glycolique dérivatisé, (4) Acide phénylacétique dérivatisé, (5) Acide nonaïque dérivatisé, (6) Leucine dérivatisée, (7) Acide dodécanoïque dérivatisé, (8) Acide phosphorique dérivatisé, (9) Proline dérivatisé, (10) Molécule avec signature spectrale de la dérivatisation mais non identifiée, (11) Phénylalanine dérivatiseé, (12) Acide tétradécanoïque dérivatisé, (13) Acide pentadécanoïque dérivatisé, (14) Acide palmitique dérivatisé, (15)Dihydrophytol, (16) Acide stéarique dérivatisé, (17) Acide citrique dérivatisé, (18) Tyrosine dérivatisé, (19) Supraene, (20) Dihydrosqualene, (21) Squalene, (A) Benzene-1,2-diethyl-3,4-dimethyl, (B) Heptadecane, (C) Heptadecane ramifié, (D) Acide palmitique éthyl ester, (E) Triehtylene dimethylacrylate, (F) Acide 9,12-Octadecadienoïque ethyl ester, (G) Acide oléique dérivatisé, (H) Acide glutamique dérivatisé et (I) Tyrosine dérivatisée.

La Figure IV-14(a) ne montre aucune détection de molécules organiques avec la dérivatisation au MTBSTFA-DMF sur l'échantillon Tirez. Seuls des co-produits de réaction sont observés tels que l'eau (BSW) et l'ammoniaque (BSA) dérivatisés. De fait, à l'inverse du DMF-DMA, le MTBSTFA n'extrait aucune molécule à partir de l'échantillon naturel (Figure IV-14(a)). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer un tel résultat. (i) Le MTBSTFA est très sensible à la présence d'eau dans un échantillon et peut être entièrement consommé par les molécules résiduelles. En effet, l'évaporation totale de l'eau avec le système utilisé (chauffage à 50 °C et flux de diazote) est très compliquée à atteindre, la concentration en sels est telle que ces derniers forment une croûte piégeant de l'eau. Ainsi, des molécules résiduelles d'eau sont toujours présentes ce qui justifie le fait qu'un tel pic d'eau bisylylée

(BSW) est observé. Pour autant il est difficile de dire si la quantité d'eau résiduelle est suffisante pour consommer tout le MTBSTFA, bien qu'il n'y ait plus de MTBSTFA détecté sur le chromatogramme. (ii) La seconde hypothèse concerne l'interférence analytique que peuvent représenter les sels et inhiber totalement la réaction de dérivatisation, comme supposé pour le DMF-DMA. (iii) Le pH peut également avoir un effet sur le rendement de réaction de dérivatisation d'après une étude récente effectuée dans l'équipe de chromatographie spatiale du LATMOS et qui sera publiée dans les prochains mois. (iv) Le protocole de dérivatisation (chauffage à 75 °C pendant 15 minutes) a été optimisé pour des standards chimiques. Il est tout à fait envisageable que ce protocole ne soit pas optimal pour des échantillons beaucoup plus complexes qui peuvent nécessiter une température plus importante pour une meilleure extraction thermique des molécules avant leur dérivatisation.

Un autre point à souligner est l'absence sur le chromatogramme de molécules ayant pu être solvatées dans le MTBSTFA-DMF, alors que cela avait été observé avec le DMF-DMA. Cette différence de résultat entre les deux méthodes de dérivatisation peut s'expliquer par des différences de solubilité des molécules organiques pour le DMF-DMA et le MTBSTFA-DMF. De plus, les deux températures employées pour la dérivatisation sont différentes entre le MTBSTFA et le DMF-DMA (*i.e.* 145 °C pour le DMF-DMA contre 75 °C pour le MTBSTFA), l'extraction thermique n'est donc pas la même entre les deux protocoles utilisés.

En revanche, la dérivatisation au MTBSTFA appliquée sur les cultures (Figure IV-14(b) et (c)) permet de détecter de nombreuses molécules (21 pour *Halobacterium salinarum*), certaines communes avec l'analyse effectuée avec le DMF-DMA. Toutefois, toutes les molécules détectées avec le DMF-DMA ne sont pas détectées avec le MTBSTFA et inversement. En effet, avec ce dernier, un plus grand nombre d'acides carboxyliques sont détectés, notamment l'acide phosphorique et lactique pour les deux souches et l'acide glycolique et citrique pour l'archée. L'acide lactique, glycolique et citrique peuvent provenir de différentes voies métaboliques telles que le métabolisme du pyruvate (Bhaumik and Sonawat 1994). Concernant l'acide phosphorique, plusieurs origines biologiques sont également envisageables comme le métabolisme énergétique impliquant la molécule d'adénosine triphosphate (ATP) qui contient trois acides phosphoriques liés entre eux ou bien directement de l'ADN. Toutefois, ce dernier est toujours observé avec la dérivatisation au MTBSTFA sur un échantillon naturel (Bishop *et al.* 2013), et des incertitudes existent sur son identification ainsi que sur sa provenance de l'échantillon. Par conséquent, associer cette molécule directement au métabolisme énergétique ou à la présence d'ADN n'est pas trivial. Outre ces molécules, et contrairement au DMF-DMA, la dérivatisation au MTBSTFA permet aussi la détection d'acides aminés tels que la proline, l'acide glutamique et la tyrosine qui sont des molécules d'intérêt premier dans la recherche en exobiologie notamment de par leur déséquilibre chiral dans les systèmes biologiques. Le MTBSTFA est connu pour avoir un meilleur rendement de réaction que le DMF-DMA (Goesmann *et al.* 2017), ce qui peut expliquer une telle différence de détection. Enfin comme pour le DMF-DMA, la dérivatisation au MTBSTFA permet la détection de molécules spécifiques à la famille *Halobacteriaceae* tels que les triterpènes (le squalène et ses isomères) et le dihydrophytol. Au vu des molécules détectées, il semblerait que le protocole utilisé ici permette la lyse cellulaire. En revanche, il est difficile de savoir si la lyse provient de la réaction de dérivatisation elle-même, ou du protocole avant dérivatisation. En

effet, l'ajout d'eau Milli-Q® pour rediluer le culot après élimination du milieu de culture crée un choc osmotique pour les cellules, ce qui a pour action de lyser complètement les cellules. Ceci est d'autant plus vrai pour les archées halophiles qui possède une forte concentration en sel dans le milieu intracellulaire. De futures protocoles devront être expérimentés pour déceler l'origine de la lyse supposée ici, et éventuellement l'adapter pour une utilisation dans le domaine du spatial et de l'analyse *in situ*.

La dérivatisation au MTBSTFA ne permet pas la détection de molécules organique sur l'échantillon naturel avec le protocole utilisé, et plusieurs tests d'optimisation ont été réalisés pour tenter de confirmer ou réfuter les hypothèses qui ont été émises précédemment. Ainsi, après évaporation du contenu aqueux, l'échantillon a été placé en étuve pendant 24 °C à 50 °C avant de subir la réaction de dérivatisation. Un tel protocole a été utilisé pour essayer d'éliminer les molécules d'eau résiduelles qui pourraient être piégées dans les sels. L'étuvage ne s'est pas fait à plus haute température pour ne pas risquer la dégradation thermique de certaines molécules organiques. Aussi, différentes températures et durées de dérivatisation ont été expérimentées pour évaluer l'impact du protocole de dérivatisation sur la détection de molécules.

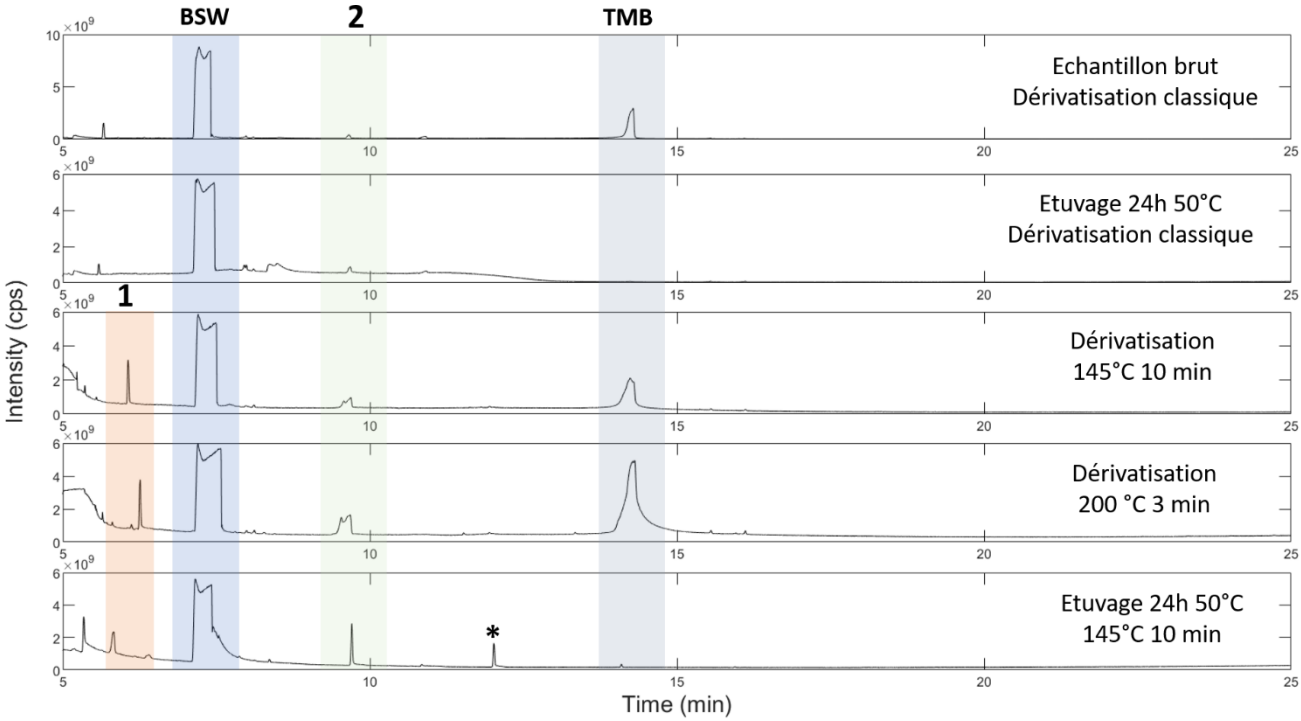


Figure IV-15 : Comparaison des chromatogrammes (Total Ion Current) de dérivatisation au MTBSTFA de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar pour différents protocoles expérimentés. BSW : Eau bisylylée, TMB : Acide borique dérivatisé, (1) et (2) Molécules non identifiés mais proviennent du MTBSTFA. (*) Bleeding de la colonne. Le programme de température pour le chromatographe en phase gazeuse est le même que pour les dérivatisations précédentes.

Les différents tests d'optimisation du protocole de dérivatisation réalisés sur l'échantillon de la lagune del Longar n'ont pas permis d'extraire de molécules organiques, les résultats sont les mêmes que ceux obtenus avec le protocole standard de dérivatisation et l'évaporation classique (Figure IV-15). Les seules différences observables entre les conditions testées sont la détection de produits de dégradation supplémentaires avec l'augmentation de la température de dérivatisation. Ces produits

de dégradation proviennent du MTBSTFA lui-même, au vu de leur composition et sont également retrouvés dans le MTBSTFA seul pour les différentes conditions éprouvées. Malgré l'utilisation de différents protocoles de dérivatisation et de préparation d'échantillon vis-à-vis de l'évaporation de l'eau, il n'est pas possible de détecter de molécules organiques provenant de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar. Il semblerait donc que l'absence de molécules dérivatisés est due à l'inhibition de la dérivatisation par la présence de sels de chlorure et de sulfates. Il demeure tout de même étrange qu'aucune molécule non dérivatisé ne soit détectée. En effet, avec le DMF-DMA, la majorité des molécules identifiées sont des molécules non dérivatisées qui ont pu être simplement extraites par le solvant. De futures expériences, visant à une optimisation plus approfondie du protocole, devront être réalisées pour essayer de détecter des composés organiques dans les échantillons Tírez.

2.3. Thermochimiolyse-CPG-SM

2.3.1 Thermochimiolyse au TMAH

En tant qu'autre méthode de traitement d'échantillon utilisée dans l'exploration spatiale, la thermochimiolyse au TMAH a été appliquée sur l'échantillon n°5 de la lagune del Longar ainsi que sur les deux souches étudiées.

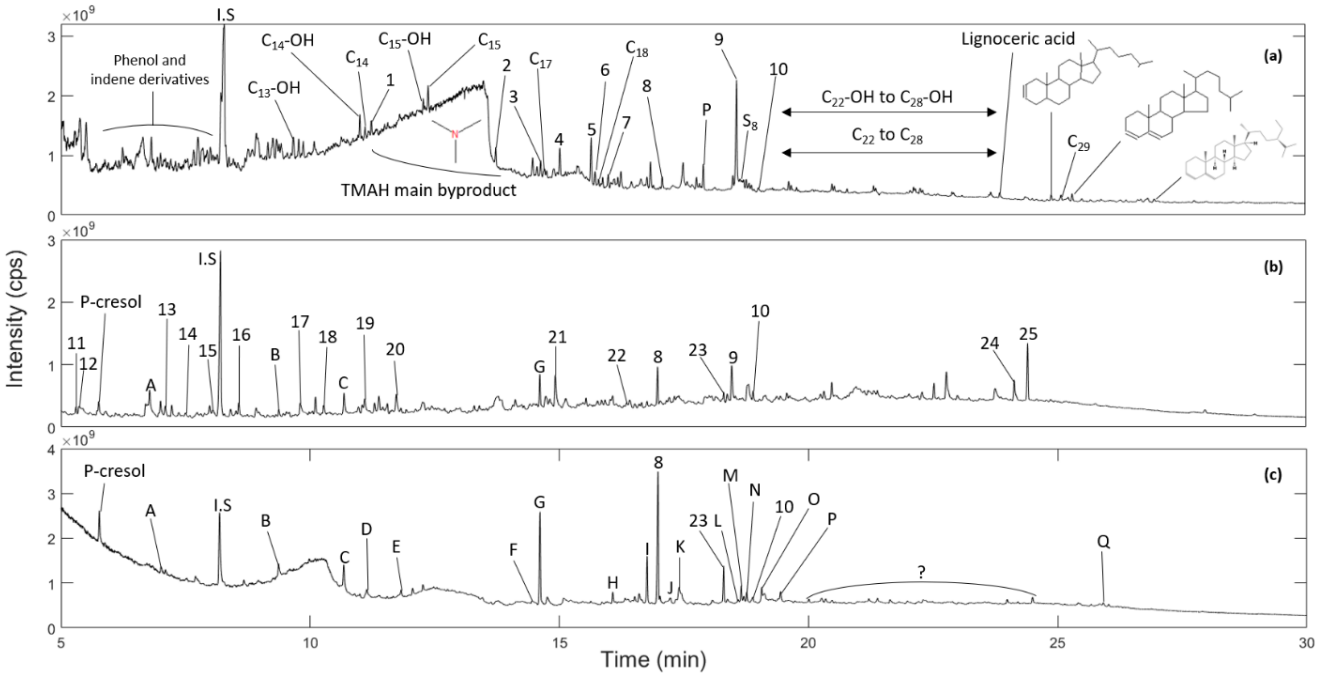


Figure IV-16 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse déchantillons soumis à la thermochimiolyse au TMAH de (a) l'échantillon de la lagune del Longar (n°5), (b) la souche Halobacterium salinarum et (c) la souche Chroococcidiopsis cubana à 600 °C. Pour rappel, tout le contenu de la capsule a été injecté avec un split de 20 mL.min^{-1}. Tous les pics sans annotation correspondent à des molecules non identifiées. Attributions moléculaires : (1) Tetradecanal, (2) Hexaecanal, (3) 8-Heptadecene, (4) 2-Hexadecene-3,7,11,15-tetramethyl, (5) Acide acétique, (6) Octadecene, (7) Octadecanal, (8) Acide palmitique, (9) Dihydrophytol, (10) Acide stéarique, (11) α-methoxytoluene, (12) Phenol, (13) Acide octanoïque, (14) Tolyl isocyanide, (15) Phenol-3-ethyl, (16) Hydantoine-3,5,5-trimethyl, (17) Indole, (18) Acide pyroglutamique, (19) Uracile, (20) Thymine, (21) Adenine, (22) Caffeine, (23) Unidentified molecule, (24) Dihydrosqualene, (25) Squalene, (A) Succinimide, (B) N-methylindole, (C) 1,3-

dimethylindole, (D) Aliphatic alkane/aldehyde, (E) Indolizine-2-methyl-6-ethyl (F) Acide P-methoxycinnamique, (G) Heptadecane, (H) Aliphatic alkane, (I)Acide palmitoléique, (J) Cyclo(leucylopropyl), (K) Palmitic acide non derivatisé, (L) Acide gras (signature spectrale) mais pas d'identification stricte, (M) Acide oléique, (N) Phytol, (O) Acide linolenique, (P) Hexadecanamide, (Q) α-Tocopherol.

Le TMAH est un sel d'ammonium, par conséquent cette méthode est supposée être moins sensible à la présence de fortes concentrations en sels dans l'échantillon naturel que les techniques de dérivatisation utilisées précédemment. Des études sur des analogues synthétiques sont en cours au sein de l'équipe pour vérifier cette supposition. De plus, en appliquant la thermochimiolyse des molécules polaires plus lourdes qu'avec la dérivatisation sont attendues du fait de la réaction de fonctionnalisation à haute température (~600 °C).

La thermochimiolyse au TMAH permet d'extraire et de détecter une plus grande diversité de molécules qu'avec les réactions de dérivatisation (72 pics contre 29 pour la dérivatisation au DMF-DMA) (Figure IV-16). Parmi ces composés, 32 d'entre eux ont pu être identifiés. Comme pour la pyrolyse, des molécules aromatiques à un ou deux cycles benzéniques apparaissent au début du chromatogramme : des dérivés phénolés et d'indène. L'origine de telles molécules est difficile à déterminer du fait des dégradations thermiques qu'ont pu subir les molécules mères donnant ces produits, comme explicité pour la pyrolyse. Toutefois, une des origines possibles associée aux micro-organismes des échantillons est la dégradation thermique de protéines, peptides ou acides aminés (Tara L. Salter *et al.* 2022).

Hormis les composés aromatiques, des longues chaînes de molécules aliphatiques sont également retrouvées comme pour la dérivatisation au DMF-DMA, comme des alcanes et des alcools (jusqu'à 29 atomes de carbone). Des aldéhydes et des alcènes comportant respectivement 14, 16 et 18 atomes de carbones sont également retrouvés. Toutes ces chaînes aliphatiques, comme pour les détections avec le DMF-DMA proviennent très probablement des membranes cellulaires des micro-organismes dans l'échantillon. Plus précisément, les alcanes correspondent aux acides gras saturés alors que les alcènes aux acides gras insaturés. Hormis ces composés aliphatiques, des acides gras sont également détectés avec pour la première fois dans cette étude la détection de l'acide lignocérique (C_{24}). Cet acide a déjà été identifié dans certaines souches de cyanobactéries, halophiles notamment (Sharathchandra and Rajashekhar 2011), mais n'est pas retrouvé dans la souche *Chroococcidiopsis cubana.* C'est un acide qui est produit en grande quantité à partir de l'acide arachidique en réponse à un stress oxydant (Kumar *et al.* 2012).

Contrairement aux méthodes précédemment employées, la thermochimiolyse au TMAH a permis pour la première fois dans cette étude d'extraire le dihydrophytol de l'échantillon de la lagune del Longar, témoignant directement de la présence d'archées dans cet échantillon. Enfin, pour la première fois également, la thermochimiolyse révèle la présence des dérivés de stéranes (les structures sont directement reportées sur la Figure IV-16(a)). Ces composés sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques comportant trois cycles benzéniques et un cycle à cinq atomes de carbone. Ils diffèrent les uns des autres selon les ramifications qu'ils portent. Ces molécules sont connues pour être des produits de dégradation de stérols dans le temps, qui sont retrouvés dans les membranes des eucaryotes. Ces structures agissent comme des régulateurs de la configuration et de la fluidité des

membranes phospholipidiques (Bloch 1983; Bui *et al.* 2016; Nes 1974). Ces stéranes et donc les stérols à fortiori peuvent constituer une classe de molécules considérées comme biomarqueurs de la présence de cellules eucaryotes dans un échantillon. En effet, ils sont connus pour avoir uniquement d'une origine biologique. Ce sont des molécules qui sont très bien conservées et qui peuvent également être des marqueurs de vie passés. En plus de cela, ce sont des molécules qui peuvent être spécifiques de règnes phylogénétiques donnés. Par exemple, le cholestérol provient des membranes des animaux alors que le stigmastérol et le campestérol sont uniquement retrouvés dans les membranes végétales. Parmi les composés retrouvés dans de nombreux échantillons naturels et très bien conservés dans le temps, les hopanes sont également des biomarqueurs, cette fois-ci des bactéries (Ourisson and Rohmer 1992). De telles molécules ne sont pourtant pas détectées dans l'échantillon étudié ici. Par conséquent, les données non traitées à ce jour doivent faire l'objet d'analyses approfondies pour la recherche de ces biomarqueurs.

Par ailleurs, du point de vue analytique, au vu de la densité de pics présents dans le chromatogramme (Figure IV-16(a)) entre 5 et 10 minutes, une optimisation du programme de température utilisé est nécessaire pour tenter de réduire au maximum le nombre de coélutions et donc d'augmenter le nombre d'identification stricte. Au-delà des coélutions observées au début de l'analyse, un pic large de triméthylamine (co-produit du TMAH) est observé entre 10 et 14 minutes, ce qui perturbe la détection de molécules ainsi que leur identification. En effet, la présence d'un pic avec une telle intensité engendre des coélutions avec les composés d'intérêt, pouvant compliquer leur identification. Ce pic de triméthylamine n'est observé que sur les chromatogrammes obtenus avec l'échantillon naturel et avec la souche de cyanobactérie. Or l'abondance entre les deux détections de triméthylamine est bien différente entre la Figure 16(a) et (c). Cela signifie que la nature de l'échantillon en lui-même a un impact direct sur le relargage de cette molécule. Le TMAH n'est pas sensible à l'eau, celui-ci étant parfois dilué dans l'eau plutôt que dans le méthanol. Une des hypothèses pour expliquer un tel pic de triméthylamine est qu'une partie du TMAH s'adsorbe sur la matrice saline et est relargué lorsque la température augmente sans avoir pu réagir. Enfin, il reste également une large gamme de molécules qui n'ont pas pu être identifiées à cause de l'absence de spectre de masse dans les bases de données ainsi que de trop nombreuses coélutions.

La thermochimiolyse des souches (Figure IV-16(b) et (c)) permet de détecter de très nombreuses molécules, dont la plupart ont déjà été identifiées avec la dérivatisation au DMF-DMA et au MTBSTFA. Parmi celles qui ne se recouvrent pas avec les méthodes de préparation d'échantillon utilisées précédemment, plusieurs bases nucléiques provenant de l'ADN et de l'ARN, à savoir l'uracile, la thymine et l'adénine, ont pu être identifiées avec la souche *Halobacterium salinarum*. En plus de ces nucléobases, la caféine a également été identifiée avec la souche d'archée. Ce composé correspond à la xanthine dérivatisée mais peut également être un produit de dégradation de thermochimiolyse de la guanine (He 2021). Comme pour l'échantillon naturel de Tírez, la molécule de dihydrophytol est détectée, ce qui confirme l'origine de cette molécule dans l'analogue naturel. Enfin, l'acide pyroglutamique est aussi identifié avec la souche d'archée qui est connu pour constituer le résidu de l'extrémité terminal $-NH_2$ de la bactériorhodopsine sur le côté extracellulaire des membranes des cellules (Li *et al.* 2016).

Concernant la souche de cyanobactérie, hormis les identifications identiques entre les méthodes de dérivatisation, un dérivé de la lignine est aussi détecté (acide p-methoxycinnamique). Des dérivés de la lignine peuvent être considérés comme des biomarqueurs des cyanobactéries ainsi que des cellules végétales, ceux-là n'étant produits que par ces organismes vivants. En plus de cela, un composé de la famille des diketopiperazines a été identifié (cyclo(leucylopropyl)). Ce type de molécule peut résulter de la cyclisation de protéines ou de peptides due à la pyrolyse (Fabbri *et al.* 2012; Smith *et al.* 1988). Enfin, uniquement avec la thermochimiolyse, il est possible de détecter l'α-tocophérol qui correspond à la vitamine E. Cette vitamine est retrouvée chez les organismes photosynthétiques et a pour rôle de protéger la chaîne photosynthétique (notamment le PSII) contre les risques oxydatifs (Nandagopal *et al.* 2021).

Ainsi avec la thermochimiolyse, il est tout à fait possible de détecter des molécules directement associées à la présence de vie. Ces composés proviennent de différentes localisations dans les cellules : la membrane avec les lipides, la partie protéiques avec les acides aminés et les DKPs ainsi que les composés liés aux acides nucléiques (noyau). Il est également possible de remonter à des composés provenant de compartiments intracellulaires spécifiques tels que les thylakoïdes.

Toutefois, que ce soit pour l'échantillon de la lagune del Longar ou pour les cultures étudiées, aucun acide aminé n'est détecté avec la thermochimiolyse, seulement des produits supposés de dégradation. Cette méthode a des limites de détections plus élevées que les techniques de dérivatisation. Étant donné qu'aucun acide aminé n'est détecté avec la dérivatisation au DMF-DMA, il semble cohérent qu'avec la thermochimiolyse le résultat soit identique. De plus, la détection d'acide aminé avec le TMAH nécessite une optimisation de la température, 600 °C provoquant leur dégradation plutôt que leur dérivatisation (He 2021). Différentes températures pourraient donc être expérimentées dans de futures analyses pour estimer les différences de détection selon l'intensité de la pyrolyse employée.

2.3.2 Thermochimiolyse au TMSH

Le TMAH permet d'extraire de nombreuses molécules mais présente également des inconvénients par rapport aux co-produits qui se forment, comme la triméthylamine. Dans l'optique de palier à ce problème pour les explorations spatiales futures, un autre agent de thermochimiolyse, le TMSH, peut être employé (Boulesteix *et al.* 2023b).

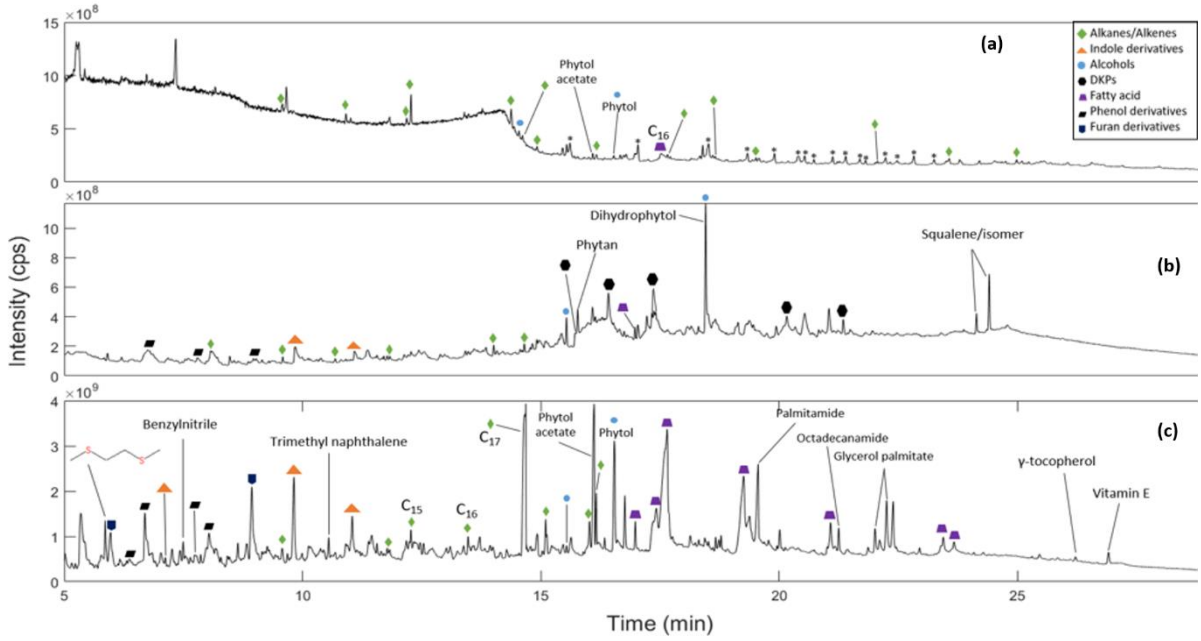


Figure IV-17 : Chromatogrammes (TIC) de la thermochimiolyse au TMSH à 600 °C de (a) l'échantillon n°5 de la lagune del Longar, et des souches (b) Halobacterium salinarum et (c) Chroococcidiopsis cubana. Les conditions analytiques employées sont les mêmes que pour le TMAH. Les pics n'ayant pas d'annotation correspondent à des molécules qu'il n'est pas possible d'identifier. Les temps de rétention avec l'identification des molécules sont reportés dans l'annexe IV-8.

Les résultats obtenus avec la thermochimiolyse au TMSH à 600 °C (Figure IV-17 et Annexe IV-8) montrent de nombreux recouvrements avec l'analyse faite avec le TMAH. Néanmoins, des différences notables sont observées, notamment l'absence de molécules qui pourraient être considérées comme des biomarqueurs tels que le dihydrophytol, indicateur de la présence d'archée, mais aussi les dérivés de stéranes, provenant des stérols, témoins de la présence de règne phylogénétique spécifiques. Ainsi, le TMSH, dans les conditions utilisées, ne permet pas la détection de telles molécules contrairement au TMAH.

De plus, seulement l'acide palmitique est détecté contre 3 acides gras avec le TMAH. En revanche, avec la thermochimiolyse au TMSH, le phytol, produit de dégradation de la chlorophylle, et donc témoin de la présence de cyanobactérie ou de plantes, est observé dans l'échantillon naturel contrairement à l'analyse faite avec le TMAH. Ces résultats restent toutefois à nuancer, du fait de la présence de nombreux pics de bleeding sur le chromatogramme. En effet, au vu du nombre de ces derniers, il apparaît que la phase stationnaire de la colonne se dégrade fortement, impactant directement les interactions avec les composés de l'échantillon et pouvant également provoquer des coélutions. Hormis ce constat, il est également probable que l'échantillon de la lagune del Longar, ne

soit pas homogène. Ainsi, certains micro-organismes présents dans le résidu analysé en TMAH ne sont potentiellement pas présents dans celui analysé avec le TMSH.

Sur la Figure IV-17, le bruit de fond élevé jusqu'à 14 minutes environ correspond à un mélange entre du chlorure d'hydrogène provenant de la dégradation des sels de chlorure et de SO_2 provenant de la dégradation des sulfates et pouvant également provenir du TMSH. Une telle augmentation de la ligne de base est observée après de nombreuses injections répétées de composés salins et d'agents de thermochimiolyse. Ici encore, une telle observation souligne l'impact physique des sels sur l'instrument en lui-même, pas seulement sur les méthodes de préparation d'échantillon. Hormis cette interférence, le TMSH ne présente pas de pics de co-produits aussi importants que la triméthylamine retrouvée dans l'analyse avec le TMAH. Ainsi, le TMSH permet d'éviter les biais analytiques, traduits par des co-élutions, liés au co-produits de la thermochimiolyse au TMAH.

La thermochimiolyse au TMSH des deux souches étudiées donne un chromatogramme différent de celui-observé pour le TMAH avec tout de même des recouvrements dans les molécules identifiées (Figure IV-17 (b) et (c)). En effet, des molécules aliphatiques tels que des alcanes, des alcènes et des alcools (dont le dihydrophytol pour la souche d'archée et le phytol et phytol acétate pour les cyanobactéries). Sont également retrouvés parmi les deux souches des dérivés de cycles indoles et phénols. Les hypothèses de leur origine sont identiques de celles émises avec les précédentes méthodes de préparation d'échantillon utilisées. Il s'agirait de produits de dégradation des membranes cellulaires pour les molécules aliphatiques et de protéines, peptides ou acides aminés pour les molécules aromatiques. De plus, plusieurs molécules appartenant à la famille des diketopiperazines sont détectées avec la souche d'archée, ce qui n'était pas le cas avec le TMAH, le protocole utilisé étant pourtant le même. Comme explicité auparavant, ces composés proviennent très probablement de la dégradation thermique de molécules d'origine protéique (Fabbri *et al.* 2012).

Hormis les molécules identiques entre thermochimiolyse au TMAH et au TMSH, certaines molécules sont identifiées pour la première fois avec la thermochimiolyse au TMSH sur les souches dans cette étude, tels que des amides et nitriles aliphatiques comportant respectivement 16 et 18 atomes de carbone. Le phytane est observé sur le chromatogramme de la souche d'archée halophile (Figure IV-17 (b)). Cet alcane fait partie des chaînes aliphatiques constituant les lipides neutres des membranes des archées halophiles, méthanogènes et thermoacidophiles (Tornabene *et al.* 1979). Enfin, deux monoglycérides sont identifiés avec la souche *Chroococcidiopsis cubana*, différant seulement par la position de l'acide gras (l'acide palmitique ici) sur les groupements hydroxyles de la molécule de glycérol. De telles molécules proviennent directement des triglycérides qui composent les lipides des membranes cellulaires des cyanobactéries et n'ont pas été identifiés avec les autres méthodes de préparation d'échantillon. Ces différences entre les chromatogrammes du TMAH et du TMSH pour les souches bactérienne et archée (Figure 16 (b)(c) et Figure 17 (b)(c)) montrent que ces deux agents de thermochimiolyse n'ont pas les mêmes réactivités pour le même protocole utilisé. Contrairement à l'échantillon naturel, il n'est pas possible dans le cas des souches de cyanobactérie et d'archée d'invoquer l'hétérogénéité de l'échantillon, car les cultures liquides sont considérées comme homogène étant mélangé avant de prélever les 1 mL nécessaires. Boulesteix et al., (2023) a montré que le TMSH avait un meilleur rendement de dérivatisation que le TMAH pour de nombreux acides

carboxyliques mais aussi pour certaines nucléobases. Cela pourrait justifier les différences d'identification entre le TMSH et le TMAH, notamment sur la détection de plus nombreux acides gras avec la souche de cyanobactérie.

4. Discussion sur le prétraitement d'échantillon et l'impact des sels.

4.1. Comparaison des méthodes de préparation d'échantillon

Les résultats présentés dans cette étude montrent tout d'abord la complémentarité et la redondance existant entre les méthodes de préparation des échantillons associées à la CPG-SM utilisée dans l'exploration spatiale, à savoir la pyrolyse, la dérivatisation au DMF-DMA et la thermochimiolyse au TMAH (Figure IV-18) et au TMSH. En effet, de nombreux recouvrement entre les différentes méthodes employées sont observés notamment sur les molécules aliphatiques et sur certains acides gras. Chaque méthode donne des résultats différents mais des recouvrements entre les différentes préparations d'échantillon sont également observés. Avec la pyrolyse, il demeure compliqué de remonter aux règnes phylogénétiques (que ce soit bactérien, eucaryote ou archée), du fait de la dégradation thermique des molécules organiques. Malgré des identifications compliquées des molécules détectées, la pyrolyse rampe permet la détection du plus grand nombre de molécules organiques. Contrairement à la pyrolyse, la dérivatisation au DMF-DMA permet la détection du plus petit nombre de molécules parmi lesquelles sont identifiés des métabolites secondaires bactériens mais également d'alcools comme le dihydrophytol spécifiques des archées. Cette méthode rend également possible la détection d'acide gras, qui sont les constituants majeurs des lipides membranaires des eucaryotes. Enfin, la thermochimiolyse est la méthode qui permet de détecter des dérivés des stéranes qui sont des molécules caractéristiques des eucaryotes retrouvées dans la membrane cellulaire. Ces composés ne sont retrouvés qu'avec la thermochimiolyse au TMAH. Cette dernière est également la méthode qui permet de détecter et d'identifier le plus grand nombre de molécules aliphatiques.

Une étude quantitative pour déterminer les limites de détection et de quantification de chaque méthode pourrait être intéressante, ce qui permettrait d'attribuer des molécules cibles préférentielles selon la technique utilisée.

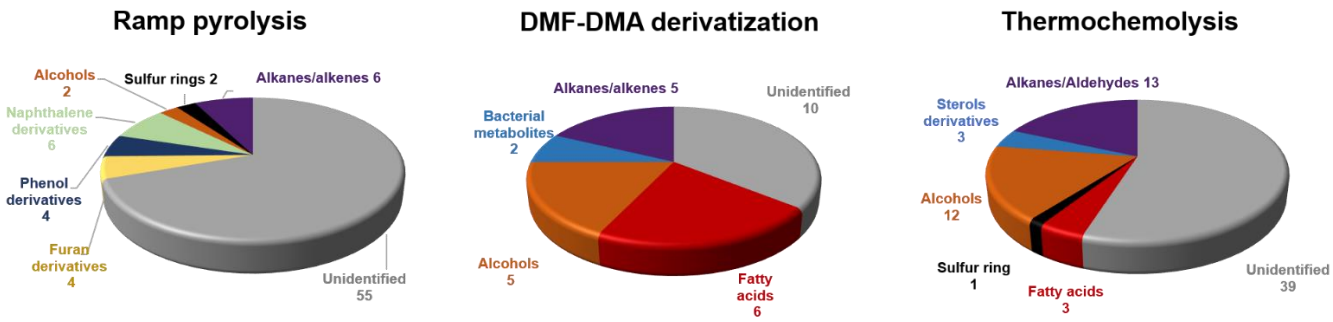


Figure IV-18 : Comparaison des trois méthodes de pré-traitement d'échantillons utilisées dans l'exploration spatiale associées à la CPG-SM. La dérivatisation au MTBSTFA ne permettant pas la détection de composés organiques, le diagramme correspondant n'a pas été réalisé. Pyrolyse rampe : 79 pics considérés, dérivatisation au DMF-DMA : 29 pics considérés, thermochimiolyse au TMAH : 71 pics considérés.

En outre, il est important de mettre en exergue le fait que pour chaque méthode employée, ce n'est pas la même quantité d'échantillon qui est injectée (pour la pyrolyse et la thermochimiolyse, 10 mg de résidu de l'échantillon évaporé sont analysés contre 3 µL de 10 mg de résidu évaporé dilués dans 20 µL de réactifs de dérivatisation). Ces différences, en plus de l'extraction thermique de la pyrolyse ou de la thermochimiolyse, peuvent également expliquer le nombre moins important de molécules détectées avec la dérivatisation qu'avec les autres techniques. Une dérivatisation dite « on-line » devra être effectuée dans une étude future afin d'analyser la même quantité d'échantillon qu'avec la pyrolyse et la thermochimiolyse : la totalité des molécules de l'échantillon étudié, sans dilution due à la méthode préparative.

La détection de dérivés de stéranes avec la thermochimiolyse et non avec la pyrolyse, alors qu'une même quantité d'échantillon est injectée pour ces deux méthodes est aussi un point à mettre en avant. Or, ces composés n'étant pas dérivatisables (absence d'hydrogène labile) et stables thermiquement, devraient être détectés par pyrolyse. Leur absence sur les pyrogrammes obtenus peut s'expliquer de plusieurs façons : (i) la première est en lien direct avec l'hétérogénéité de l'échantillon. En effet, l'échantillon peut ne pas avoir une répartition homogène de son contenu organique expliquant ces différences de détection. (ii) Ces composés sont solvatés grâce au TMAH, à l'instar de ce qui est observé avec le DMF-DMA, puis vaporisés au moment de l'augmentation de température au sein du pyrolyseur ce qui permet leur détection. (iii) Étant donné que deux instruments différents ont été utilisés pour la thermochimiolyse et la pyrolyse, les limites de détection, propres à chaque instrument et variant également dans le temps, ne sont pas les mêmes, ce qui pourrait expliquer ces différences. Les deux premières hypothèses sont toutefois appuyées par le fait que les stéranes ne sont pas détectés non plus avec la thermochimiolyse au TMSH, méthode qui a pourtant été employée sur le même instrument que la thermochimiolyse au TMAH.

Par ailleurs, alors que la dérivatisation au DMF-DMA de l'échantillon salin extrait des composés directement liés à la présence de vie en présence de sels (par exemple des métabolites bactériens), des études supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la dérivatisation au MTBSTFA avec ce type d'échantillon. La thermochimiolyse au TMAH permet de détecter et d'identifier un grand nombre de composés organiques et l'identification de l'origine des molécules détectées est possible. Il semble que la thermochimiolyse, étant une dérivatisation à haute température, stabilisant ainsi les molécules extraites, soit le meilleur moyen de détecter des molécules organiques directement liées à la présence de vie dans un échantillon salé avec de telles concentrations.

La thermochimiolyse au TMAH et au TMSH présente des recouvrements dans l'identification de molécules mais également des différences dans les détections, aussi bien sur l'échantillon naturel que sur les souches d'archée halophiles et des cyanobactéries. Ainsi, les deux méthodes sont partiellement redondantes mais aussi complémentaires. Pour l'analyse *in situ* future des mondes océans mais aussi d'autres corps du système solaire, il peut être intéressant de trouver un compromis selon les ressources disponibles pour embarquer ces deux agents de thermochimiolyse plutôt qu'un seul, comme sur l'expérience SAM à bord du rover Curiosity (Mahaffy *et al.* 2012).

Néanmoins, la comparaison entre les différentes méthodes demeure difficile à poser étant donné qu'il peut y avoir des biais propres à chaque méthode, les protocoles étant différents les uns des

autres. Par la suite, il est donc nécessaire, pour comparer les méthodes ente elles, de caractériser l'échantillon pour extraire le plus grand nombre de molécules organiques et caractériser ainsi le contenu en matière organique. Pour ce faire, il est tout à fait possible de réaliser des extractions de type Bligh-Dyer, en séparant les différentes fractions selon leur polarité. De plus, il est envisageable de coupler en amont à cette extraction, un protocole de lyse cellulaire permettant de libérer tout le contenu de cellules encore potentiellement intègres. Ainsi, chaque résultat obtenu par une méthode de prétraitement d'échantillon pourra être comparé avec cette référence.

4.2. Hypothèses de l'impact des sels sur les méthodes de préparation d'échantillon.

Pour les différentes analyses effectuées dans ce second sous-chapitre, l'hypothèse de l'impact des sels, notamment sur la non détection de certains composés avec la dérivatisation a été avancée à plusieurs reprises. Mais qu'est-il entendu par effet des sels ? Il semblerait que la diversité des sels ainsi que leurs concentrations puissent agir en entravant les réactions de dérivatisation. Cette entrave pourrait notamment être expliquée par trois effets principaux (Boulesteix *et al.* 2023a):

(1) L'effet de cage ionique et de cage cristalline : les sels favoriseraient la formation de complexe (avec la température et la durée de dérivatisation selon le réactif employé) notamment avec les ions divalents qui peuvent former deux liaisons covalentes et ioniques, ce qui stabilise les molécules organiques sous forme de sels organiques, bloquant ainsi la dérivatisation (Braden *et al.* 2001; Doktorov and Fedorenko 2011; Shankar *et al.* 2011).

(2) L'impact de la force ionique : selon la concentration pour un sel donné, l'ion correspondant serait plus ou moins acide selon la Hard and Soft Acids and Bases theory (HSAB), ce qui modifierait la répartition électronique autour de noyau atomique et limiterait la réaction des molécules organiques avec les agents de dérivatisation. La formation de complexe entre le sel et les organiques bloquerait donc physiquement la dérivatisation du fait du rayon ionique beaucoup plus important. Ce complexe peut également jouer un rôle dans le franchissement de la barrière réactionnelle énergétique qui rend la dérivatisation possible.

(3) Le pH de la solution, qui selon sa valeur, impactera la forme acide ou basique des molécules qui peuvent être ciblées par le DMF-DMA. Le pH va donc avoir un impact sur les constantes de formations de complexe entre les molécules organiques et les sels, ce qui aura donc un lien direct avec l'effet de cage ionique décrit précédemment. Cet effet a été étudié dans des travaux de l'équipe de chromatographie spatiale du LATMOS et a montré que la dérivatisation au DMF-DMA a un meilleur rendement de dérivatisation à pH acide plutôt qu'à pH basique (Boulesteix *et al.* 2023a). Cette étude a été réalisée sur des échantillons synthétiques, et des travaux complémentaires en mélangeant plusieurs sels (sels de chlorure et sels de sulfates) pour évaluer l'effet d'une telle diversité. À l'avenir, il pourra donc être intéressant d'acidifier ces échantillons naturels pour voir si des différences de détection avec les résultats présentés ici sont observés. De plus, selon le type de sels, les constantes de formation de ces complexes sel/composé organique vont également être modifiées. Les cations bivalents formeront des complexes beaucoup plus facilement que les monovalents (Bretti *et al.* 2020).

5. Conclusion

À travers ce second sous-chapitre, une étude qualitative a été menée sur un des échantillons prélevés dans le système lacustre de Tírez, afin d'évaluer la capacité et les performances analytiques de la CPG-SM associée aux techniques de préparation d'échantillons qualifiées pour l'utilisation en milieu spatial, afin de détecter des molécules organiques liées à des systèmes biologiques.

Les résultats obtenus ont montré que les méthodes de préparation d'échantillon associées à la CPG-SM permettaient la détection et l'identification de nombreuses molécules directement liées à la présence de micro-organismes dans l'échantillon malgré la présence de fortes concentrations en sels. Certaines des molécules détectées pourraient même être considérées comme des biomarqueurs tels que les stéranes pour les eucaryotes, les dérivés de la chlorophylle pour les cyanobactéries et les microalgues ou encore les dérivés des membranes des archées comme le dihydrophytol. De plus, malgré l'identification de potentiels biomarqueurs associés à des phyla, remonter directement à une souche ou à une famille à partir de signatures moléculaires organiques demeure complexe du fait de l'universalité et des origines multiples potentielles pour une molécule donnée.

Toutefois, parmi les molécules d'intérêt exobiologique habituellement recherchées sur d'autres corps planétaires, les acides aminés et les bases nucléiques n'ont pas pu être détectés dans l'échantillon naturel. Deux principales hypothèses peuvent être faites quant à l'origine de cette observation : (i) la diversité et la concentration en sels entravent la dérivatisation de ces molécules et/ou (ii) la conservation des échantillons à 4 °C pendant deux ans avant les premières analyses n'a pas permis la préservation de tels composés au sein de ce type d'échantillon. Il serait intéressant, dans une étude bien différentes de celle-ci, d'évaluer l'impact de sels sur le taux de préservation des acides aminés.

Cette étude révèle que les échantillons qui seront analysés à la surface d'Europe ou d'Encelade résulteront en des données complexes à interpréter si les échantillons sont analysés sous leur forme brute. La présence de glace d'eau, de sels et de matière organique (d'origine biotique ou abiotique) résulte en des échantillons complexes à analyser. Voilà pourquoi, il est nécessaire, en préparation des missions d'analyse *in situ* à destination des mondes océans, de développer des protocoles dans un premier temps en laboratoire puis dans un second temps spatialisables, pour éliminer les interférences analytiques possibles, à savoir dans notre cas principalement l'eau et les sels. C'est sur l'élimination des sels que le troisième et dernier volet de ce chapitre sera centré.

III. Développement d'un protocole de dessalement : évaluation de l'impact du sel sur la détection de molécules organiques.

Dans le chapitre précédent, les résultats ont montré, pour un échantillon provenant de la lagune del Longar (le numéro 5), que la détection de molécules organiques était possible avec la pyrolyse-CPG-SM, la dérivatisation CPG-SM et la thermochimiolyse CPG-SM malgré la diversité et les très fortes concentrations en sels. Mieux que cela, il a même été possible d'émettre des hypothèses quant à des liens directs entre certaines molécules organiques détectées et leurs origines biologiques. Cependant, ni les acides nucléiques, ni les acides aminés n'ont été détectés dans les expériences précédentes. Ces molécules de fort intérêt exobiologique, ne sont pas volatils et nécessite obligatoirement d'être dérivatisées pour les détecter par chromatographie en phase gazeuse. De fait, leur non-détection a soulevé plusieurs hypothèses dont l'une d'entre elle concernait directement l'impact du sel sur les réactions de dérivatisation. En effet, il est tout à fait envisageable qu'une telle diversité (sels de chlorure et de sulfates composés de magnésium, sodium, potassium et calcium) et une telle concentration en sels (de l'ordre de50 $g.L^{-1}$ pour le magnésium et le sodium, de 200 $g.L^{-1}$ pour le chlore et en moyenne de 45 $g.L^{-1}$ pour les sulfates) entravent la réaction par l'effet détaillé en section IV.II.3.

1. Objectifs de l'étude

Pour tenter d'évaluer l'impact des sels et de confirmer ou réfuter l'hypothèse de l'interférence de ces derniers sur la détection de molécules organiques, l'objectif de cette étude sur les échantillons analogues est d'établir un protocole de dessalement en amont de l'analyse moléculaire. Selon l'efficacité du dessalement, il sera possible d'analyser de nouveau le même échantillon que dans le chapitre précédent, cette fois-ci dénué ou limité en sels, avec les mêmes méthodes d'analyse. L'impact du sel sur les performances analytiques de la chromatographie en phase gazeuse pourrait donc être évalué. Outre l'influence sur les capacités d'analyses, un système de dessalement apparaît également comme nécessaire du fait de l'aspect néfaste des sels sur le fonctionnement et la mécanique des instruments comme cela a été illustré dans le chapitre précédent. Ainsi, ce dernier volet vise à montrer la pertinence et l'importance de développer un protocole de dessalement, dans un premier temps pour l'étude d'échantillons analogues terrestres hypersalins sur des instruments commerciaux et dans un second temps, spatialisable pour l'exploration future des mondes océans.

Dans l'optique de l'établissement de cette méthode dessalement, une revue bibliographique des différentes méthodes de dessalement a été réalisée pour sélectionner la plus appropriée aux échantillons ainsi qu'aux volumes disponibles de ces derniers, tout en gardant à l'esprit le terme de l'étude : sa spatialisation. Suite à cela, une optimisation du protocole sera nécessaire pour obtenir la meilleure efficacité de dessalement sur les échantillons du système lacustre de Tírez. Une fois le protocole affiné, la dernière étape consistera donc à dessaler les échantillons de Tírez pour, *in fine*, les analyser en chromatographie en phase gazeuse.

2. *Matériels et méthodes*

2.1. Système de dessalement

Le dessalement est un processus qui est étudié depuis longtemps, dans le but premier d'obtenir de l'eau douce à partir de l'eau de mer pour notamment parer à toute pénurie d'eau future. De fait, il existe de très nombreuses techniques permettent l'élimination des sels dans des solutions aqueuses (Kim 2011). La plus ancienne des méthodes consiste en une distillation qui permet de récupérer l'eau par des cycles d'évaporation et de refroidissement. La méthode la plus répandue aujourd'hui est basée sur l'osmose inverse, dans laquelle l'eau saline est filtrée au travers d'une membrane contenant des pores très fins ne laissant pas passer les sels. Ainsi, d'un côté de la membrane sont retrouvés les sels et de l'autre, l'eau dessalée. Cette méthode est très économique et permet de dessaler des grandes quantités d'eau. L'électrodialyse est également une technique très répandue, visant à séparer les molécules d'eau des sels par application d'un courant électrique entre des électrodes. Cependant, cette technique permet seulement le dessalement de faibles concentrations en sel. Un prototype de cette méthode a été récemment développé dans l'optique d'application spatiale (Bryson *et al.* 2022). Toutes les techniques précédemment évoquées demandent des installations spécifiques, qui dans un premier temps ne seraient pas justifiées pour un dessalement de faibles volumes de solutions comme cela est notre cas. Voilà pourquoi, dans la cadre de cette étude et pour le premier établissement d'un protocole de dessalement, nous avons choisi une autre méthode basée sur l'utilisation de résines échangeuses d'ions. Ce procédé repose uniquement sur l'utilisation de ces résines et est très simple à mettre en œuvre, ne nécessitant que très peu de matériel.

Ces résines sont des microbilles avec un squelette polymériques composé de styrène avec une proportion de divinylebenzene, qui permet la réticulation, pouvant varier selon les résines. Plus la réticulation est importante, plus la résistance aux contraintes mécaniques et osmotiques est élevée. Sur ce squelette, un ion est fixé de façon permanente (anions pour les résines cationiques et cation pour les résines anioniques). Pour assurer la neutralité électrique, chaque ion fixe est neutralisé par un contre ion, qui lui est mobile. Dans l'exemple de la Figure IV-19, les ions fixes sont des sulfonâtes pour la résine cationique et des ammoniums quaternaires pour la résine anionique. Les ions mobiles sont représentés par le sodium et par le chlore. À noter que ce schéma est simplement à titre indicatif et que pour l'appliquer à notre protocole il faut remplacer les contre ions Na^+ par un proton (H^+) et l'ion Cl^- par un ion OH^-.

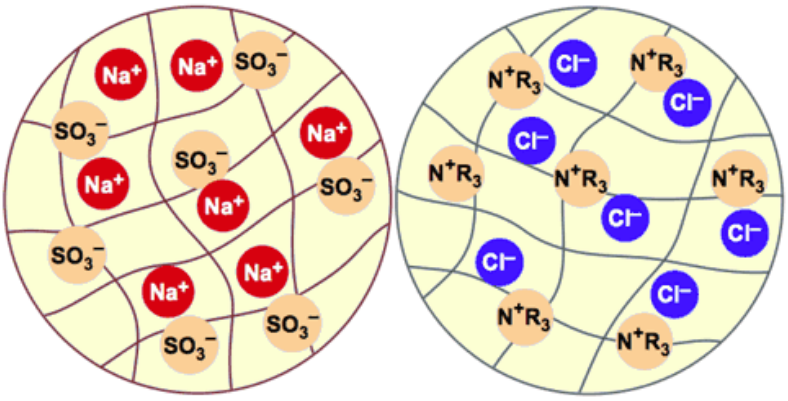


Figure IV-19 : Structure d'une résine échangeuse de cations (à gauche) et échangeuse d'anions (à droite). À tire d'exemple, ici les contre ions sont le sodium (Na^+) et le chlore (Cl^-). Dans notre cas, les contre ions sont un proton et l'ion hydroxyle. Pour appliquer notre protocole au schéma il faut remplacer l'ion Na^+ par un proton (H^+) et l'ion Cl^- par un ion hydroxyle OH^-.

Au passage de l'échantillon à travers la résine, les ions de la solution seront échangés contre les ions mobiles de même charge. Ainsi, les ions mobiles seront élués dans la solution résultante. Ce principe est illustré sur la Figure IV-20, pour une solution contenant du chlorure de sodium. Chaque résine est notamment caractérisée par sa capacité d'échange. Cette dernière correspond à la quantité d'ions susceptibles d'être fixés sur la résine par unité de volume ou de masse. Cette capacité d'échange est directement influencée par des paramètres externes à la résine elle-même tels que la concentration et la nature des ions à éliminer, la température et le débit de passage de l'échantillon à travers la résine. La simplicité d'un tel système a cependant un défaut important qui pourra impacter directement nos résultats ; la rétention de molécules organiques chargées provenant des échantillons étudiés, ne permettant pas leur détection dans l'analyse par CPG-SM après le dessalement.

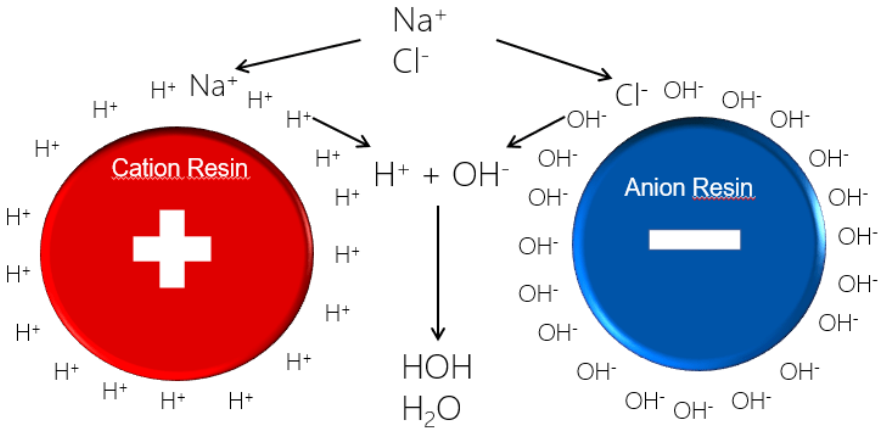


Figure IV-20 : Principe de fonctionnement des résines échangeuses d'ions avec du chlorure de sodium (NaCl) comme exemple. Ici on considère deux résines mélangées, dans notre cas les deux résines sont en série et séparées. Source : Eau Pure Pro.

L'objectif est de réaliser un dessalement en série qui permettra d'éliminer, dans un premier temps, les cations et dans un second temps les anions (ou inversement selon l'ordre d'utilisation des résines). Il existe sur le marché une grande variété de résine, différant selon la nature du contre ion qui sera échangé, selon la réticulation de la résine, selon leur pureté mais aussi selon leur capacité

d'échange. De par l'expertise de l'équipe, la disponibilité et la qualité des résines proposées, le choix des résines s'est orienté vers le fournisseur Bio-rad. En ce qui concerne la nature du contre ion, deux aspects majeurs ont été pris en compte : (i) le contre ion ne doit pas constituer un radical qui pourra être dérivatisé lorsque ce procédé sera appliqué sur l'échantillon dessalé, (ii) le pH des solutions après le dessalement peut varier fortement. En effet, selon le contre ion échangé, le pH de l'échantillon en amont du dessalement et en aval de celui-ci peut fortement varier. Or, une étude a été menée sur l'impact du pH sur les méthodes de dérivatisation utilisées (Boulesteix *et al.* 2023a). Que ce soit pour la dérivatisation au MTBSTFA ou au DMF-DMA, la tendance générale est que le rendement de dérivatisation est plus élevé à pH acide qu'à pH basique. La prise en compte de ces deux aspects va donc permettre d'orienter le choix des résines qui serviront pour le dessalement.

Parmi les résines cationiques proposées par Bio-rad, seules celles désignées par le nom AG® 50W permettent d'échanger des contre ions qui ne sont pas des éléments constitutifs des sels (sodium par exemple). Puisque ce sont justement des ions que nous souhaitons éliminer, le choix de la résine s'est orienté vers une résine AG® 50W-X8 qui possède comme contre ion des protons H^+. La dénomination X8 correspond à la réticulation du squelette polymérique. Une réticulation de 8 % permet le passage de molécules jusqu'à une masse moléculaire de 1000 Da. Cette limite supérieure correspond parfaitement aux molécules analysables par CPG-SM par la suite.

Parmi les résines anioniques commercialisées par Bio-rad, nombre d'entre elles proposent un échange contre un ion formate ou acétate. Ces derniers pourraient être méthylés par les agents de dérivatisation utilisés et donc les consommer intégralement (du fait de leur concentration dans l'échantillon dessalé), empêchant la dérivatisation des molécules d'intérêt. De fait, une résine échangeuse d'ion hydroxyle a donc été sélectionnée, nommé Ag® 1-X8 (la réticulation est aussi ici de 8 %). Avec cette résine, le dessalement va entraîner une augmentation du pH de la solution (du fait de l'échange avec des ions hydroxyles), ce qui peut avoir un impact sur le rendement de la réaction de dérivatisation. Cependant, la résine cationique choisie échange des protons contre les cations provenant des sels de l'échantillon, régulant ainsi le pH après le dessalement à travers les deux types de résine. Une mesure de pH en amont du dessalement, après passage dans une résine et après passage dans les deux résines a été effectuée (section IV.III.3.1) permettant de choisir l'ordre d'utilisation des résines et de connaître le pH final de la solution dessalée.

Pour réaliser le dessalement, des colonnes SPE vides de 6 mL seront utilisées, couplées à un système à vide Visiprep™ (Merck) pour un passage de l'échantillon à travers la résine plus rapide que par simple gravité (Figure IV-21). Les colonnes vides sont préalablement nettoyées par solvant (méthanol puis dichlorométhane, Merck, pureté > 99.0 %) et sonication. Par la suite, elles seront remplies avec une masse de résine donnée, résine qui sera encapsulée entre deux filtres Whatman®, avec une taille de pore de 6 µm. Ces deux filtres ont pour vocation d'une part de retenir les plus grosses particules présentes dans les échantillons et d'autre part de permettre une diffusion optimale de l'échantillon sur l'intégralité de la résine. La vitesse de passage de l'échantillon a été fixée à 5 mmHg, directement ajustable grâce au système Visiprep™. Chaque résine, une fois conditionnée dans la colonne, est nettoyée par passage d'eau Milli-Q® (le volume variant en fonction de la masse de résine).

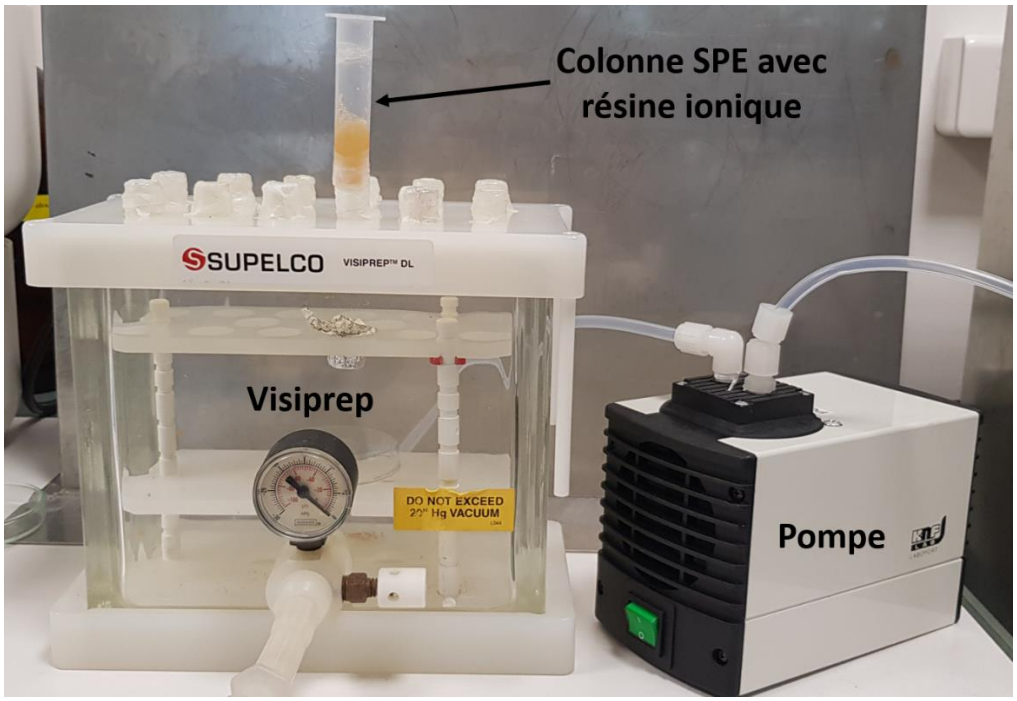


Figure IV-21 : Système Visiprep™ utilisé pour le dessalement des échantillons Tírez.

2.2 Optimisation du protocole de dessalement

La première optimisation du protocole de dessalement a porté sur le ratio entre la masse de résine utilisée par rapport au volume d'échantillon à dessaler. En effet, les résines peuvent être rapidement saturées (plus aucun site d'échange d'ions libre) en fonction de leur capacité d'échange, notamment en présence des échantillons hypersalins comme c'est le cas des échantillons Tirez. De fait, plus la masse de résine sera importante vis-à-vis du volume d'échantillon, plus le dessalement sera efficace, le nombre de sites d'échange d'ion augmentant avec la masse de résine. Différents ratios ont été étudiés (Tableau IV-7) et le pH, la concentration en anions (Cl^- et SO_4^{2-}) et en cations (Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} et K^+) ont été mesurés pour les solutions résultantes. Un échantillon a été choisi pour réaliser ce protocole d'optimisation, selon trois critères principalement : (i) la concentration en sels de cet échantillon ; en effet, optimiser le dessalement avec des échantillons ayant parmi les concentrations les plus fortes en sel permettra d'obtenir un ratio optimal pour tous les autres échantillons. (ii) La viscosité et la charge sédimentaire présente ; cela permet d'éviter la filtration en amont du dessalement et permet donc de gagner du temps pour l'optimisation, (iii) le volume d'échantillons disponible ; une optimisation de protocole requiert de nombreux tests et donc une consommation d'échantillon conséquente. En prenant ces différents aspects en compte, l'échantillon n°44 de la lagune del Longar (Annexe IV-1) a été choisi. De plus, c'est un échantillon qui appartient à la même lagune que l'échantillon n°5 qui a été étudié pour son contenu en molécules organiques, et prélevé en surface comme pour l'échantillon n°5, donc avec une salinité potentiellement proche.

Tableau IV-7 : Ratios de dessalement étudiés sur les échantillons provenant du système lacustre de Tírez. L'incertitude sur la pesée de la masse de résine est de +/- 5 mg. Le ratio correspond à la masse de résine divisée par le volume de l'échantillon.

Masse résine (en g)	Volume échantillon (en mL)	Ratio correspondant
0,2	4	1/20ème
0,2	3	1/15ème
0,4	2	1/5ème
1	2	1/2
1	1	1
3	1	3
4	1	4

2.2.1 Dessalement cationique

Le dosage des cations pour chaque ratio de dessalement dans chacune des solutions dessalées a été réalisé par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, Thermo Fisher Scientific) au LGPM, en comparaison avec l'échantillon brut. Cette méthode a été employée ici à la place de la spectroscopie absorption atomique pour la simple et unique raison que cette dernière n'était pas encore disponible lors de l'optimisation du dessalement. L'ICP-MS n'a pas été utilisée pour le dosage des cations dans les différents échantillons car l'instrument n'était plus en fonctionnement à ce moment. L'ICP-MS est une méthode qui permet l'analyse des métaux sous forme de traces de l'ordre de la partie par milliard (ppb) en masse. Cette technique repose sur la nébulisation de la solution d'intérêt puis l'aérosol produit est ensuite ionisé dans un plasma d'argon à couplage inductif. La température au cœur de ce plasma est de l'ordre de 6500 K, permettant ainsi l'ionisation du lithium jusqu'à l'uranium. Les ions produits, sont ensuite analysés par un spectromètre de masse constitué d'un triple quadripôle (Figure IV-22). L'ICP-MS permet à la fois la quantification de cations dont la courbe de calibration a pu être effectuée ainsi que de scanner l'intégralité des ions présents dans un échantillon. Ainsi de par la sensibilité de cette méthode, il est également possible de réaliser des études isotopiques. L'acquisition des données se fait ensuite par l'intermédiaire du logiciel Qtegra.

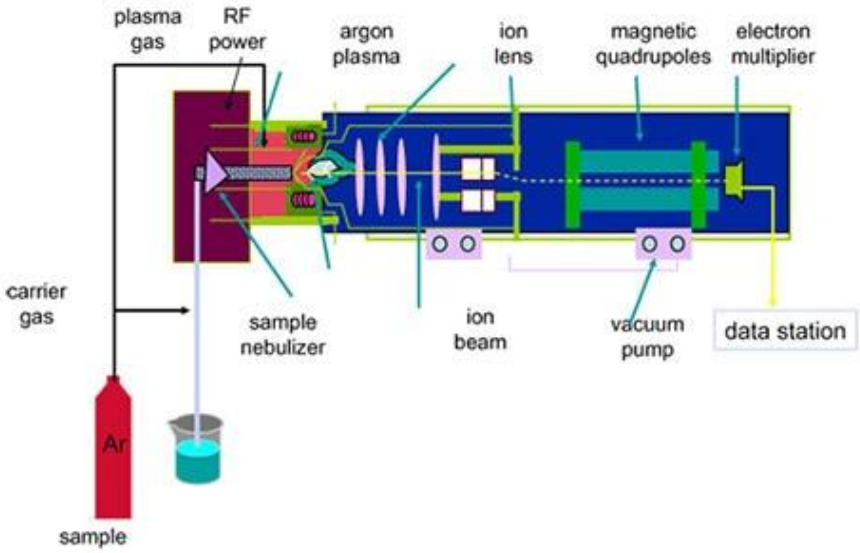


Figure IV-22 : Principe du fonctionnement de l'ICP-MS avec des échantillons liquides. Source : MerckMillipore.

L'ICP-MS est un instrument qui permet l'analyse d'échantillons liquides mais aussi solides lorsqu'il est couplé à une ablation laser. N'étant pas le cas ici, et disposant directement d'échantillons liquides, seuls ceux-là ont été analysés. La préparation des échantillons ainsi que les analyses ont été réalisées par mes soins, en collaboration avec Vincent Butin. Les échantillons ont été dilués à 10^{-6} mol.L^{-1} dans de l'eau Milli-Q® acidifiée à 2% avec de l'acide nitrique (70%, purifié par redistillation, >99.999%, Merck). Pour la quantification des cations d'intérêt, des courbes de calibrations ont été réalisées avec des solutions de standards de Na, Mg, K et Ca allant en concentration de 1 ppb à 10 ppm (partie par millions). Les concentrations qui sont données sur la Figure IV-23 ont été corrigées par la valeur de l'étalon interne (indène) ainsi que par les valeurs du blanc.

2.2.3. Dessalement anionique

Pour la quantification des ions chlore et sulfates dans les échantillons dessalés pour les différents ratios a été réalisée grâce à la chromatographie ionique. Le principe de cette méthode ainsi que les paramètres propres à l'instrument ont été détaillés en section IV.I.2.4.2. Les courbes de calibration utilisées pour la quantification sont celles présentées en Annexe IV-9. Les échantillons étudiés ont été dilués 1000 fois avant l'analyse pour éviter la saturation liée au détecteur et avoir une quantification fiable.

2.3. Paramètres instrumentaux d'analyse et protocoles de préparation d'échantillon.

2.3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Dès lors le protocole de dessalement optimisé et le meilleur ratio de dessalement déterminé, l'analyse par CPG-SM associée aux méthodes de préparation d'échantillon est effectuée sur les échantillons dessalés. Celle-ci a été réalisée sur un échantillon pour obtenir des résultats préliminaires : l'échantillon n°57 de la lagune de Peña Hueca. Cet échantillon a été choisi pour deux raisons principales : (i) comme l'échantillon de la lagune del Longar S44, c'est un échantillon liquide sans matrice sédimentaire et qui ne nécessite donc pas de filtration avant le dessalement, (ii) utilisé cet

échantillon avec le protocole de dessalement permettait également d'évaluer si ce dernier fonctionnait sur un autre échantillon avec une salinité différente de la lagune del Longar. Pour chaque analyse effectuée, 1 mL de chaque échantillon a été dessalé en utilisant les ratios de dessalement d'après les résultats de la section IV.III.3.1, 3 mg de résine cationique et 4 mg de résine anionique (qui ont été séparés dans deux colonnes SPE pour des soucis de faisabilité). Ce volume a été choisi car il permet de récupérer suffisamment d'échantillon en sortie des résines. En effet, des phénomènes d'adsorption sont observés, diminuant le volume de l'éluat, et pouvant donc le rendre nul. L'éluat est ensuite évaporé. Pour ces deux échantillons, la pyrolyse CPG-SM n'a pas pu être effectuée pour des raisons de problèmes instrumentaux. L'impact du sel sur la pyrolyse peut être multiple : une augmentation du bruit de fond sur les chromatogrammes due à la dégradation des sels, une dégradation de la phase stationnaire à cause du dégazage de chlorure d'hydrogène et de dioxyde de soufre et enfin, des réactions de chloration (réaction entre les sels de chlorures et les molécules organiques) peuvent également être détectées notamment en pyrolyse flash comme observé dans le second volet de chapitre. Des analyses de pyrolyse-CPG-SM devront être effectuées sur des échantillons dessalés pour pouvoir faire un comparatif à l'avenir.

Les analyses de dérivatisation au MTBSTFA ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Trace 1300 couplé à un spectromètre de masse TSQ 9000 (ThermoFisher Scientific). La thermochimiolyse CPG-SM a été effectuée sur un Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse ISQ (Thermofisher Scienitific). Ces instruments sont équipés d'injecteurs SSL split/splitless. Dans les deux types d'analyse, la température de l'injecteur, de la ligne de transfert et de la source est de 250 °C. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium (AirLiquide, alphagaz 2, pureté ≥ 99.999%) et le débit est de 1 $mL.min^{-1}$. L'impact électronique s'effectue avec une énergie de 70 eV. La gamme de masse scannée par le quadrupôle débute à *m/z* = 40 et se termine à *m/z* = 700. La colonne chromatographique utilisée est une RTX-5, composée de 5% de diphényle et 95% de diméthyle polysiloxane, d'une longueur de 30 m, un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur de phase stationnaire de 0,25 µm. Le programme de température du chromatographe en phase gazeuse débute à 50 °C, augmente jusqu'à 300 °C avec une rampe de 10 $°C.min^{-1}$, la température finale étant maintenue pendant 15 min. Les injections pour les échantillons dérivatisés ont été réalisés en mode splitless et avec un split de 10 $mL.min^{-1}$ pour la thermochimiolyse au TMAH, pour limiter l'impact du TMAH sur le fonctionnement de l'instrument. En effet, ce dernier étant un sel, est connu également pour saturer fortement le système fluidique de l'instrument.

2.3.2. Préparation des échantillons

Pour la dérivatisation de l'échantillon n°57 de la lagune Peña Hueca, seul le MTBSTFA a été utilisé pour deux raisons principales : (i) c'est un travail en cours et la dérivatisation avec le DMF-Dma n'a pas pu être réalisée et (ii) la dérivatisation au MTBSTFA avant dessalage (section IV.2) n'a montré aucune détection, j'ai donc choisi d'utiliser la méthode qui ne pouvait que donner un plus grand nombre de molécules détectées après dessalement. Pour la dérivatisation au MTBSTFA (fournis par Sigma Aldrich, pureté > 99.0%), le même protocole que pour les échantillons Tírez a été employé. Le MTBSTFA a été

dilué dans du DMF avec un ratio 4:1, améliorant grandement son efficacité comme utilisé sur l'expérience SAM de Curiosity (Mahaffy *et al.* 2012). 1 mL d'échantillon a été dessalé puis l'éluat a été évaporé par chauffage à 50 °C sous flux de diazote. Une fois toute l'eau évaporée, 20 µL d'agent de dérivatisation ont été ajoutés puis la réaction de dérivatisation s'est produite à 75 °C pendant 15 min pour le MTBSTFA dans un bloc chauffant. Après réaction, 1 µL de la solution résultante est injecté dans le chromatographe en mode splitless.

La thermochimiolyse au TMAH est réalisée en mode on-line (réaction qui se fait directement dans le pyrolyseur qui est couplé à l'injecteur du GC) au sein d'un pyrolyseur EGA /PY-3030D (Frontier Lab) à 600 °C pendant 10 secondes (Buch *et al.* 2018). Le TMAH utilisé pour cette réaction est fourni par Sigma-Aldrich et est dilué dans du méthanol (25 % w/w). Pour la thermochimiolyse au TMAH, comme pour la dérivatisation, 1 mL d'échantillon est dessalé puis évaporé. Ensuite 20 µL d'eau Milli-Q® sont ajoutés pour transférer le contenu dans les capsules du pyrolyseur, puis évaporés de nouveau. Après évaporation, 4 µL de TMAH sont ajoutés, puis tout le contenu de la capsule est injecté dans la colonne chromatographique avec un split de 10 $mL.min^{-1}$.

Toute la verrerie utilisée pour ces expériences a été nettoyée par solvant (méthanol et dichlorométhane, pureté ≥ 99.0 %) couplé à la sonication puis chauffée à 550 °C pendant 12 heures +/- 2 heures.

3. Résultats

3.1. Optimisation du protocole de dessalement

L'optimisation du protocole de dessalement passe par l'estimation de l'efficacité de celui-ci selon la masse de résine utilisée (en gramme) et le volume d'échantillon (en mL) à dessaler, ce qui permet *in fine* de déterminer quel en est le rapport optimal pour éliminer le maximum de sels possible.

3.1.1. Optimisation du dessalement cationique

La comparaison de la quantification des cations avant et après dessalement a été réalisée par ICP-MS. Pour les deux échantillons Tirez étudiés, la concentration en sodium, magnésium, potassium et calcium a été mesurée (Figure IV-23 et Tableau IV-8).

Les concentrations en sodium et en magnésium pour l'échantillon brut sont beaucoup plus élevées que les valeurs de saturation de l'eau pour ces cations. En effet, les valeurs observées sont de 600 $g.L^{-1}$ pour le sodium et ~500 $g.L^{-1}$ pour le magnésium (Tableau IV-8). À titre d'exemple, les valeurs de saturation à 25 °C sont d'environ 350 $g.L^{-1}$ pour le chlorure de sodium et d'environ 550 $g.L^{-1}$ le chlorure de magnésium à 25 °C. Les différences observées vis-à-vis de ces valeurs pourraient être expliquées par des augmentations de température qui augmentent la solubilité et donc les valeurs de saturation de ces ions dans l'eau. Cependant, l'échantillon n°44 de la lagune del Longar provient de la surface et était à température ambiante lorsqu'il a été prélevé. Par la suite, entre la collecte et le stockage des échantillons à 4 °C, très peu de variations de températures ont pu être subies par l'échantillon. De plus, même avec des variations de température, il reste difficile de supposer de telles différences entre les valeurs de saturation de l'eau et celles mesurées ici. Ces différences pourraient donc plutôt être expliquées par l'utilisation d'une courbe de calibration erronée ou également par des

erreurs de dilution lors de la préparation d'échantillon (dérive des micropipettes, incertitudes liées à l'expérimentateur). Toutefois, étant donné que les courbes de calibration utilisées sont les mêmes pour tous les ratios de dessalement et pour chaque cation, une comparaison relative des valeurs mesurées reste tout de même possible.

La comparaison des concentrations en cations pour les différents ratios masse de résine : volume d'échantillon étudiés avec la résine cationique montre que pour le sodium et le potassium les ratios de 1 : 5 à 4 : 1 permettent un dessalement total. En revanche, avec le ratio de 1 : 15 une augmentation des concentrations est observée pour le sodium, le magnésium et le potassium. En effet, entre le ratio 1 : 5 et 1 : 15, la masse relative de résine diminue, la résine cationique atteint son point de saturation et n'a donc plus de sites d'échange libres pour échanger des cations, car tous les sites ont échangé leurs protons contre les cations des échantillons. Ainsi, tout l'échantillon brut restant non dessalé passant à travers la résine ne peut plus échanger de cations avec les protons de la résine. Ainsi, aucun échange n'est plus effectué et l'échantillon brut est directement élué sans être dessalé. Ce phénomène s'appelle la fuite ionique et justifie pourquoi les concentrations en cation augmentent avec un ratio 1 : 15.

Néanmoins, le dosage des ions magnésium pour le ratio 1 : 15 reste incohérent, étant donné que la valeur mesurée dépasse celle de l'échantillon brut avec une différence proche de 25 %. La comparaison entre le ratio 4 : 1 et 3 : 1 pour le magnésium est également peu cohérente. En effet, avec le ratio 4 : 1, le nombre de sites d'échanges de cations est plus élevé que pour le ratio 3 (ayant une masse de résine plus importante). Pour autant, la quantification donne une concentration en magnésium plus faible pour le ratio 3 : 1 que pour le ratio 4 : 1.

De plus, pour le magnésium, il apparaît que le dessalement est beaucoup moins efficace que pour les autres ions. Ici, il serait possible de supposer l'impact de la valence des ions sur le dessalement, mais le dessalement du calcium étant total pour chaque ratio utilisé (même 1 : 15), cette hypothèse semble être réfutée. Du fait de ces différentes observations, l'explication qui apparaît la plus plausible est une contamination externe (aux échantillons) de magnésium provenant soit de la résine soit du matériel utilisé expliquant pourquoi le dessalement est moins efficace pour cet ion. Il ne semble pas que cela puisse provenir du solvant utilisé pour les dilutions (eau Milli-Q® acidifiée à 2 % avec de l'acide nitrique) car les blancs analytiques composés de solvant seul montrent une non-détection pour le sodium, le calcium et le potassium et une très faible détection pour le magnésium (< 1 ppb) (Tableau IV-8).

Après tous ces constats, l'efficacité du dessalement est la même pour les ratios de 1 :5 à 4 pour tous les ions hormis le magnésium pour lequel le ratio 3 est celui qui fonctionne le mieux. Du fait de cela, et pour limiter l'utilisation de résine, il semble que le ratio 3 (3 : 1) est le plus approprié pour un dessalement cationique quasi-total des échantillons.

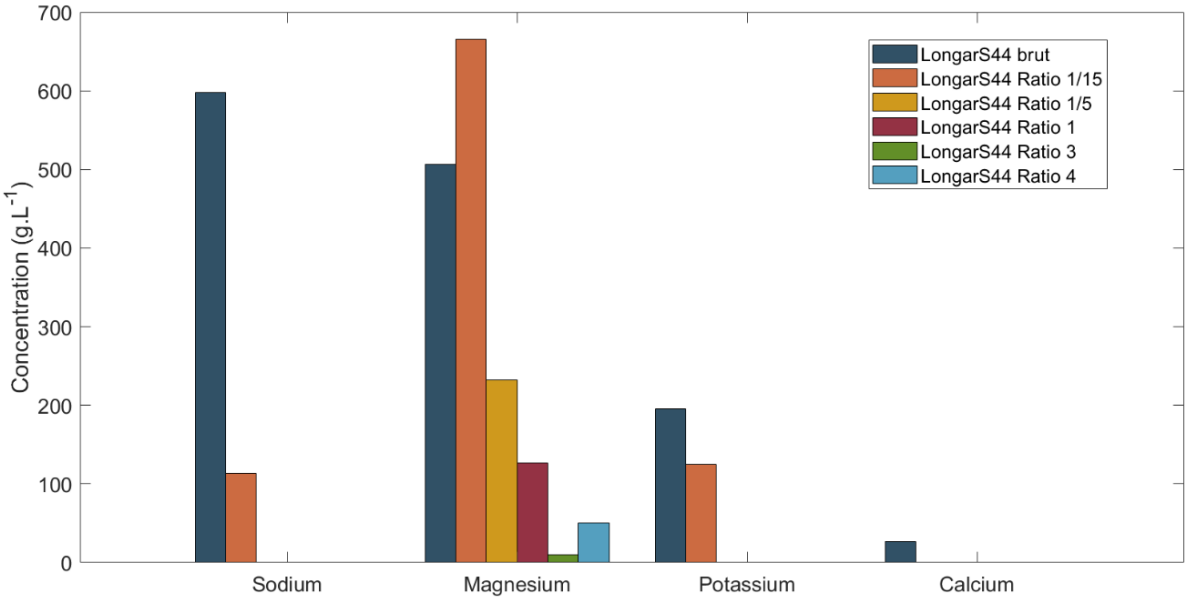


Figure IV-23 : Comparaison des différents ratios de dessalement pour la résine cationique pour les 4 cations majoritaires (Na^+, Mg^{2+}, K^+ et Ca^{2+}) présents dans l'échantillon n°44 de la lagune del Longar. Les valeurs négatives correspondent à des valeurs nulles. Pour rappel, un ratio de 4 correspond à une masse de résine de 4g pour un volume d'échantillon de 1 mL, tous les ratios sont donc exprimés en masse de résine divisée par le volume d'échantillon.

Tableau IV-8 : Concentrations de sodium, de magnésium, de potassium et de calcium obtenues par ICP-MS pour différents ratios de dessalement dans l'échantillon n°44 de la lagune del Longar.

Ratio dessalement	Sodium (ppb)	Magnésium (ppb)	Potassium	Calcium
Blanc	0	0,94	0	0
Echantillon brut	600,5	506,4	195,0	27,7
1/15ème	106,6	668,9	125,8	0
1/5ème	0	248,8	0	0
1	0	107,6	0	0
3	0	13,0	0	0
4	0	48,4	0	0

En parallèle de cela, il est nécessaire de savoir si le protocole utilisé est répétable d'une expérience à l'autre. Pour ce faire, une répétition d'expérience a été effectuée en utilisant le ratio 1 : 1 uniquement, sur l'échantillon n°44 de la lagune del Longar (Figure IV-24). Le même protocole de dessalement avec le même ratio donne les mêmes résultats pour le dosage du sodium, du potassium et du calcium, à savoir un dessalement total pour ces cations. La détection de magnésium est observée pour les deux réplicats avec une différence de quantification notable (108 ppb contre 145 ppb, contre 500 ppb sur l'échantillon brut). Cependant, le dosage du magnésium semble être impactée par des

contaminations externes et aucune répétition d'une même solution (intra-échantillon) n'a été effectuée en ICP-MS. Cependant, un étalon interne à l'analyse en ICP-MS, l'indène, est ajouté après le dessalement pour vérifier la dérive expérimentale qui peut exister, et les valeurs mesurées pour cette molécule sont identiques d'une analyse à l'autre. Les différences observées pourraient donc provenir du dessalement lui-même, ou là encore de contaminations externes. Toutefois, de manière générale, le dessalement cationique semble être répétable d'un échantillon à l'autre, avec les mêmes tendances observées, à savoir l'absence totale de sodium, de potassium et de calcium et un dessalement partiel concernant le magnésium.

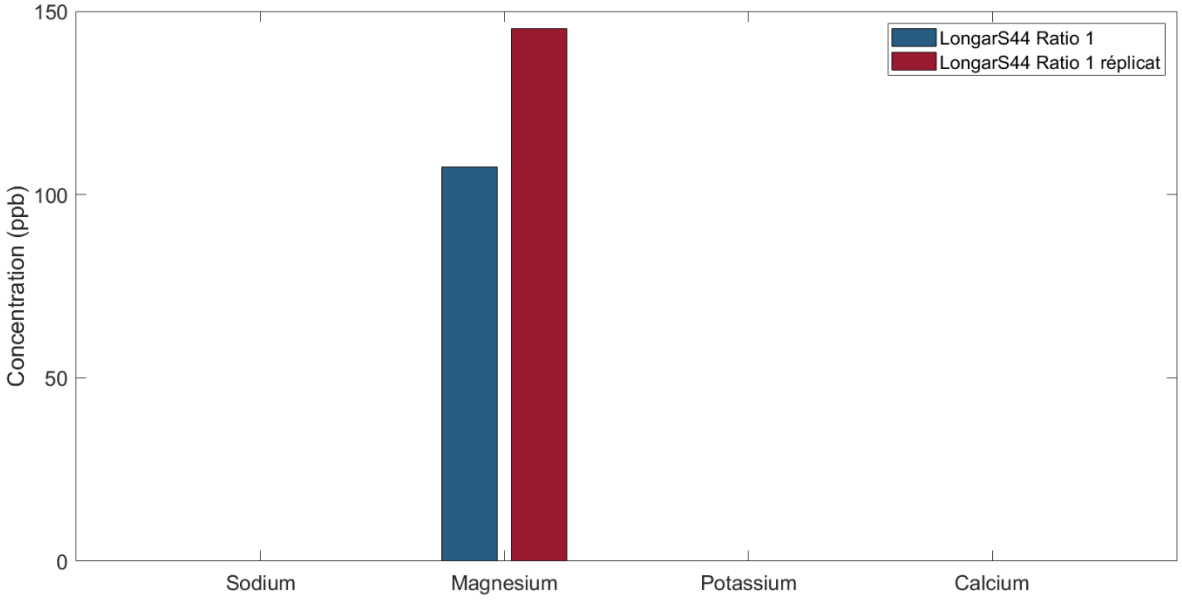


Figure IV-24 : Comparaison de deux réplicats de dessalement avec un ratio de 1 : 1 sur l'échantillon n°44 de la lagune del Longar. Pour le sodium, le potassium et le calcium, les valeurs mesurées sont nulles.

3.1.2. Optimisation du dessalement anionique

L'optimisation du dessalement anionique s'est effectuée par comparaison de différents ratios de dessalement (qui diffèrent pour certains de ceux de la résine cationique) en dosant les ions chlorures et sulfates par chromatographie ionique (principe de la technique rappelé en section IV.I.2.4.2) (Figure IV-25).

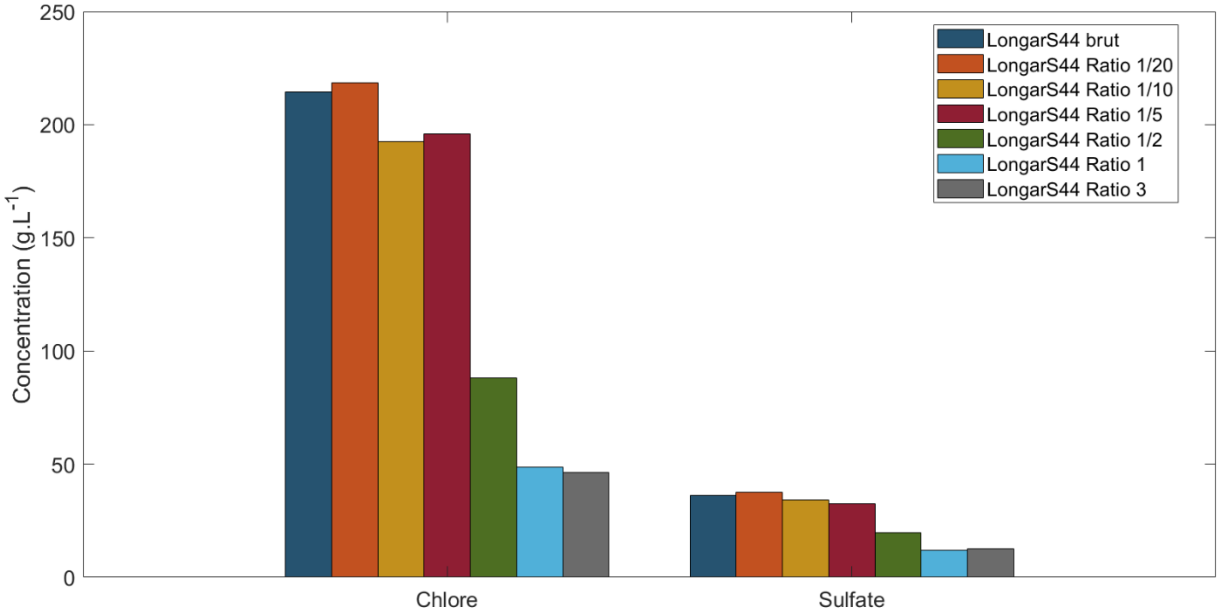


Figure IV-25 : Comparaison de différents ratios de dessalement pour la résine anionique avec l'échantillon n°44 de la lagune del Longar. L'intensité (mesurée en µS) est directement proportionnelle à la concentration en ions chlorure et sulfate.

La comparaison des différents ratios de dessalement anionique montre une tendance très marquée qui correspond parfaitement à ce qui était attendu, à savoir un dessalement de plus en plus efficace avec l'augmentation du ratio et donc de la masse de résine. Comme pour la résine cationique, plus le ratio est faible, plus la résine va être saturée rapidement ce qui provoquera l'élution de l'échantillon brut sans échange ionique (principe de la fuite ionique détaillée précédemment). Voilà pourquoi, les concentrations obtenues pour le ratio de dessalement de 1/20ème sont très proches de celles de l'échantillon brut (Tableau IV-9). Quel que soit le ratio, il n'est pas possible d'atteindre un dessalement total que ce soit pour les ions chlorure ou pour les ions sulfates. Cela signifie encore augmenter le ratio utilisé pour éliminer un maximum d'anions. Basé sur ces observations, nous avons choisi d'utiliser un ratio de dessalement de 4 : 1. Cette proportion, au vu de la concentration obtenue avec un ratio de 3, ne permettra probablement pas un dessalement total des ions chlorure et sulfate. Néanmoins, la résine cationique permet un dessalement quasi-total avec un rapport de 3 entre masse de résine et volume d'échantillon, ce qui signifie qu'il n'y aura plus la présence de sodium, de potassium, de calcium et qu'il restera des résidus de magnésium. De fait, même avec la présence résiduelle d'ions chlorure et de sulfates, la formation de sels sera très limitée voire impossible.

Tableau IV-9 : Concentrations obtenues des ions chlorure et sulfates pour les différents rapports de dessalement effectués sur l'échantillon n°44 de la lagune del Longar. Pour rappel, les concentrations ont été obtenues en rapportant les intensités mesurées sur des courbes des calibration correspondantes. Les concentrations indiquées correspondent à la moyenne de deux réplicats effectués pour chaque ratio de dessalement.

Ratios de dessalement	*Cl^- ($g.L^{-1}$)*	*SO_4^{2-} ($g.L^{-1}$)*
	Longar	
Echantillon brut	214,29	36,26
1/20ème	218,5	37,45
1/10ème	192,69	34,15
1/5ème	195,80	32,44
½	88,11	19,71
1	48,69	11,94
3	46,47	12,78

3.1.3. Mesure du pH avec le protocole optimisé.

Connaissant désormais les ratios de dessalement optimaux pour accomplir une élimination quasi-complète des cations et des anions formant les sels de chlorure et de sulfates, il reste à connaître le pH de nos échantillons une fois dessalés avec le protocole appliqué. Pour suivre l'évolution du pH, une mesure a été réalisée en amont du dessalement, après passage dans une des deux résines (cationique ou anionique) puis après passage dans les deux résines. L'ordre des résines a été inversé pour voir quel était le pH final selon le sens utilisé. Les mesures de pH ont été effectuées sur l'échantillon n°57 de la lagune de Peña Hueca (Tableau IV-10).

Tableau IV-10 : Valeurs de pH obtenue sur l'échantillon n°57 de la lagune de Peña Hueca en faisant varier l'ordre des résines pour le dessalement.

	pH	
Ordre des résines	Cationique puis anionique	Anionique puis cationique
Echantillon brut	6,5	6,5
Après une résine	0,4	13,6
Après dessalement total	11,5	2,3

Les mesures de pH montrent un pH final très alcalin quand la résine cationique est utilisée en première et un pH très acide quand cette même résine est utilisée en deuxième. Cela semble concordant avec ce qui était attendu étant donné que la résine cationique échange des protons, acidifiant la solution alors que la résine anionique échange des ions hydroxyle qui alcalinisent l'échantillon dessalé. Toutefois, comme l'utilisation des résines se fait l'une après l'autre, il aurait

également pu être attendu un retour au pH de l'échantillon brut. Il serait intéressant de voir si l'efficacité de dessalement est différente lorsqu'on change l'ordre des résines sachant que le pH évolue selon l'ordre utilisé.

Comme explicité précédemment, le pH de la solution dessalée peut avoir un impact sur les réactions de dérivatisation qui sont employées dans l'analyse in situ. Il est apparu qu'un pH acide augmentait le rendement de réaction de la dérivatisation contrairement à un pH alcalin. Par conséquent, l'ordre d'utilisation des résines qui semble le plus optimal en prenant en compte ces considérations est le suivant : résine anionique puis résine cationique.

3.1.4. Conclusion sur l'optimisation du protocole de dessalement

Les mesures des concentrations en cations et en anions ainsi que de pH ont permis d'apporter des informations sur les résines utilisées, d'optimiser à la fois le protocole en lui-même ainsi que la quantité de résine à utiliser pour atteindre un dessalement quasi-total des échantillons provenant du système lacustre de Tírez.

Dans un premier temps, les différents dosages de cations et d'anions après dessalement ont permis de déterminer les ratios optimaux pour la résine cationique et la résine anionique. Pour la première, le rapport optimal qui sera utilisé pour le dessalement avant analyse en CPG-SM est de 3 grammes de résine pour 1 mL d'échantillon. Pour la seconde, qui, d'après les résultats, possèdent une capacité d'échange plus faible que la résine cationique le rapport sera de 4 g pour 1 mL d'échantillon. Pour des questions de matériel et d'adsorption sur la résine, le dessalement anionique se fera en série avec deux colonnes remplies chacune avec 2 grammes de résine. Avec de tels ratios, les échantillons seront donc entièrement dénués de sodium, de potassium et de calcium, et comporteront des résidus de chlore, de sulfates et de magnésium. Il a été décidé de ne pas augmenter plus les quantités de résines utilisées, car cela impliquerait une augmentation du volume des échantillons à utiliser et donc une consommation plus importante. De telles expériences pourront être menées après l'obtention des premiers résultats avec le protocole de dessalement présenté ici.

Dans un second temps, les ratios optimaux étant déterminés pour les deux types de résines, les mesures de pH ont permis de connaître l'ordre du dessalement, à savoir la résine anionique en amont de la résine cationique ou inversement. En effet, comme explicité précédemment, le pH a un impact sur les réactions de dérivatisation, et le rendement de ces dernières est plus important à pH acide. De fait, pour obtenir un échantillon dessalé avec un pH acide, il faut d'abord utiliser la résine anionique puis la résine cationique.

3.2. Analyse des échantillons naturels dessalés.

Le protocole de dessalement étant optimisé, l'analyse des échantillons du système lacustre Tírez dessalés va pouvoir être effectuée. L'objectif est donc d'appliquer les méthodes de préparation d'échantillon employées dans l'analyse *in situ* associées à la CPG-SM, comme cela a été fait dans le second volet de ce chapitre sur les échantillons bruts. La comparaison des résultats sur les échantillons bruts et sur ceux dessalés devrait permettre d'évaluer l'impact du sel sur les méthodes de prétraitement d'échantillon et sur la détection de molécules organiques pouvant être relatives à la vie.

Ce travail est actuellement en cours et les résultats présentés sont donc préliminaires. Ainsi, seuls des résultats obtenus avec la dérivatisation au MTBSTFA ainsi qu'avec la thermochimiolyse au TMAH seront décrits. Ces résultats préliminaires ont été obtenus sur l'échantillon de la lagune del Longar S5 comme ceux décrits dans le chapitre II.

Tout d'abord, d'un point de vue uniquement visuel, l'évaporation de l'échantillon après son dessalement ne présente aucun résidu (Figure IV-26), contrairement à ce qui était observé sur l'échantillon brut. Le fait qu'aucun résidu salin ne soit observé a un impact direct sur la qualité de l'évaporation. En effet, l'absence totale de matrice saline va permettre d'évaporer complètement les molécules d'eau qui pouvait être piégées par cette dernière et interférer avec les agents de dérivatisation.

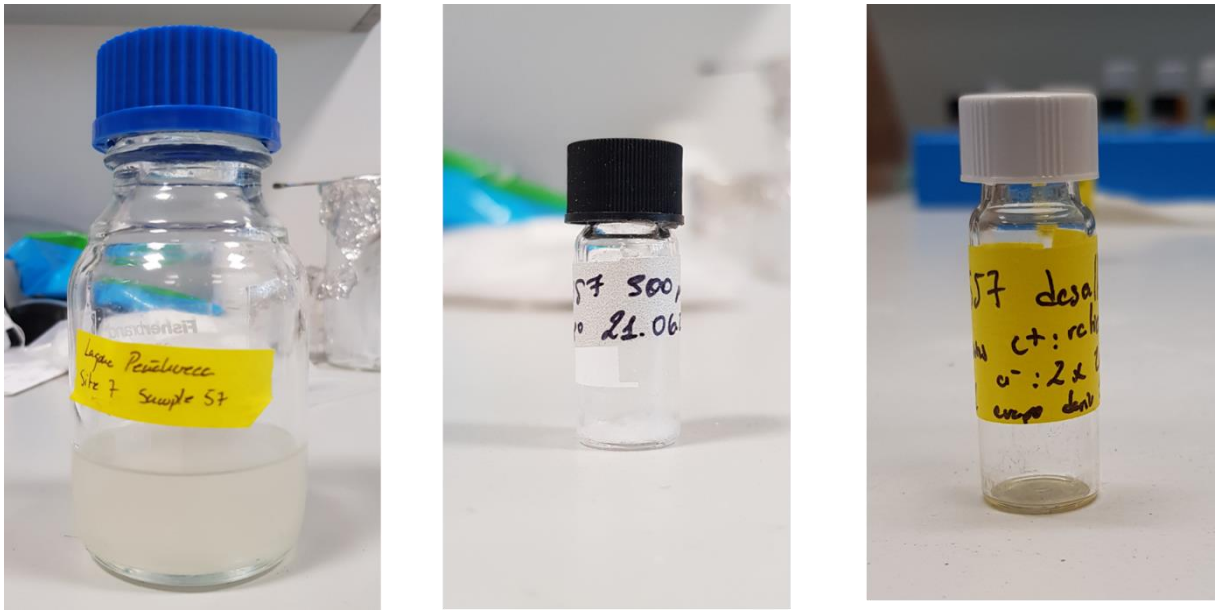


Figure IV-26 : Photos de l'échantillons n°57 de la lagune Peña Hueca (gauche) brut, (milieu) évaporé et (droite) dessalé. L'échantillon évaporé montre un résidu salin blanc dans le fond du flacon (difficilement visible sur la photo). L'échantillon dessalé ne montre plus aucun résidu après dessalement et évaporation.

3.2.1. Dérivatisation au MTBSTFA d'un échantillon dessalé

Dans un premier temps, le dessalement a été appliqué sur l'échantillon n°5 de la lagune del Longar suivi par une dérivatisation au MTBSTFA, dilué dans du DMF pour une comparaison avec les résultats présentés dans le deuxième sous-chapitre de cette étude. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la Figure IV-27.

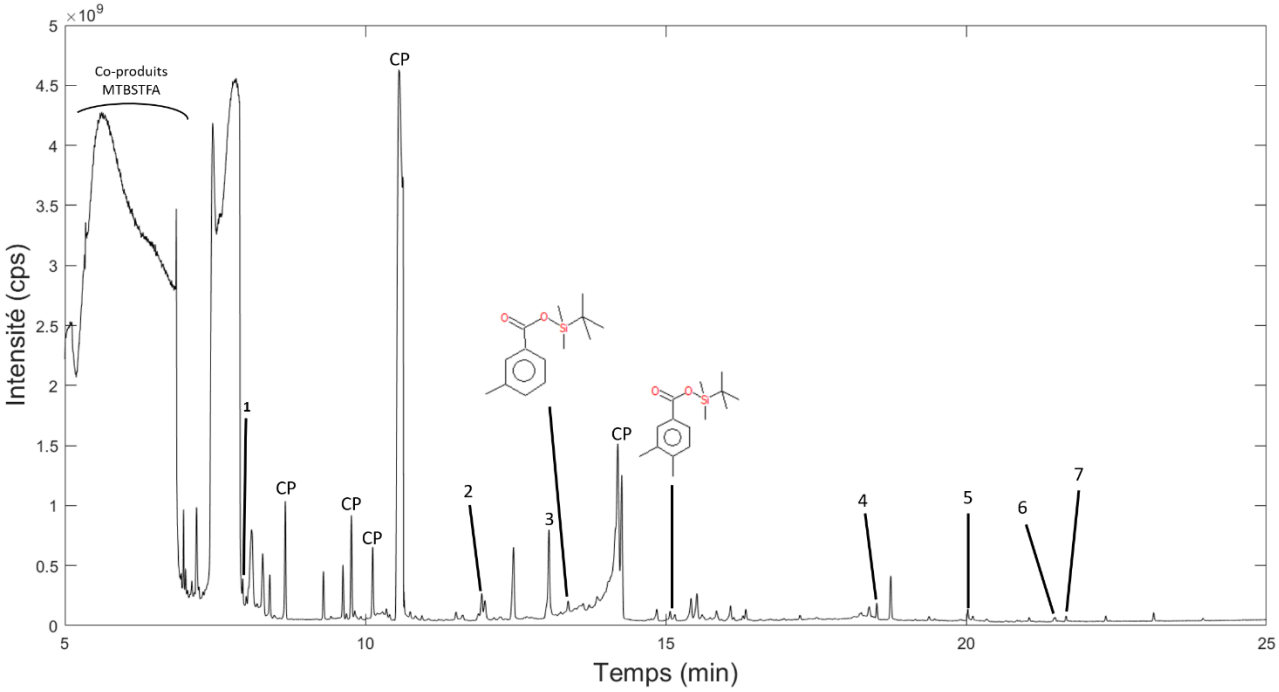


Figure IV-27 : Chromatogramme. Attribution des pics : (CP) Co-produits du MTBSTFA, (1) Acide 2-Butenoïque dérivatisé, (2) Acide lactique dérivatisé, (3) Acide sulfurique dérivatisé, (4) Octadecanenitrile, (5) Acide palmitique dérivatisé (6) Acide oléique dérivatisé, (7) Acide stéarique dérivatisé.

La dérivatisation au MTBSTFA de l'échantillon N°5 de la lagune del Longar après son dessalement permet de détecter 9 molécules, ce qui n'avait pas été le cas avec l'échantillon brut, malgré toutes les conditions testées (Figure IV-27). Il est alors possible de détecter quelques acides gras, d'intérêt pour l'exobiologie, pouvant provenir des membranes des micro-organismes, comme explicité dans le second sous chapitre. Il apparaît donc que le dessalement de l'échantillon permet de détecter des composés organiques avec le MTBSTFA. Ce constat peut s'expliquer de plusieurs façons : la diversité et la concentration de sels dans l'échantillon brut semblent interférer avec le MTBSTFA et inhiber la réaction de dérivatisation et/ou la présence d'eau piégée dans la matrice saline consomme le MTBSTFA ce qui empêche la fonctionnalisation des molécules cibles. Cette deuxième hypothèse ayant été testée en plaçant l'échantillon brut en étuve avant sa dérivatisation semble pouvoir être écartée, mais l'absence totale d'eau même après chauffage ne peut pas être affirmée. De plus, après le dessalement, le pH de la solution est beaucoup plus acide (Tableau IV-10) et d'après une étude effectuée au sein de l'équipe de chromatographie spatiale du LATMOS, cela augmente l'efficacité de la dérivatisation au MTBSTFA, comme c'est le cas pour le DMF-DMA (Boulesteix *et al.* 2023a).

Bien que des molécules organiques soient détectées sur l'échantillon après son dessalement, leur nombre demeure très faible par rapport à ce qui est attendu. De nombreuses optimisations

semblent nécessaires pour essayer de détecter plus de molécules. Ces dernières peuvent avoir été retenues au sein des résine anionique cationique lors du passage de l'échantillon au travers. Pour tester une telle hypothèse, une élution avec un éluant (eau, ammoniaque) pourrait permettre de de récupérer ces composés et de les analyser en CPG-SM ensuite. Aussi, il serait possible de préparer un mélange de standards chimique avec une concentration connues de ces derniers et de mesurer la quantité récupérée en sortie de résine. Cela permettrait d'avoir une idée sur le potentiel d'une résine à retenir la matière organique ainsi que de cibler quelle famille chimique sont plus susceptibles d'être retenues. De plus des expériences de répétabilité devront être réalisées pour vérifier l'efficacité du dessalement et la réplicabilité des résultats pour un même échantillon. Il sera également possible de réaliser des expériences de répétabilité quant à l'adsorption de molécules organiques sur la matrice, pour évaluer si le taux de rétention est le même d'une expérience à l'autre.

3.2.2. Thermochimiolyse au TMAH d'un échantillon Tírez dessalé

La thermochimiolyse au TMAH a été appliquée sur l'échantillon n°5 de la lagune del Longar après son dessalement. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la Figure IV-28.

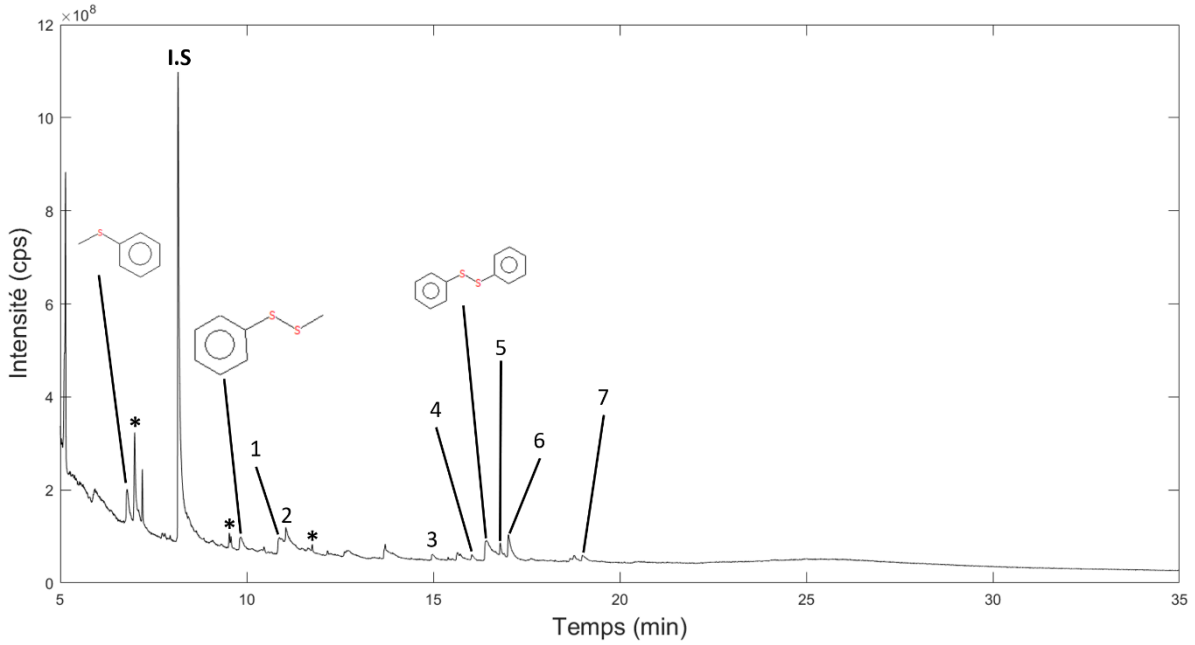


Figure IV-28 : Chromatogramme (Total Ion Current) de la thermochimiolyse au TMAH de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar après son dessalement. Les pics sans annotation correspondent à des molécules qui n'ont pas pu être identifiées. Attribution des pics : (*) Bleeding, (1) Méthyl benzenesulfonate, (2) Diphényle, (3) Méthyl tétradécanoate, (4) Méthyl pentadecanoate, (5) Méthyl palmitoleate, (6) Méthyl palmitate, (7) Méthyl stéarate. Le chromatogramme commence à 5 minutes pour éviter la saturation pouvant être provoquée par la présence de co-produits du TMAH.

La première observation qui peut être faite entre la Figure IV-16 et la Figure IV-28 est la différence sur le nombre de molécules détectées qui est bien inférieure quand l'échantillon est dessalé. Ici, seulement 10 molécules sont identifiées et le nombre de pics est beaucoup plus faible que pour l'échantillon brut. Par exemple, de nombreux acides gras qui étaient détectés avant le

dessalement ne le sont plus après, seuls 6 d'entre eux sont retrouvés sous leur forme dérivatisés. Les dérivés des stéranes, qui étaient considérés comme de potentiels biosignatures ne sont pas non plus observées. De plus, des composés comme les molécules aromatiques soufrées sont identifiées alors que ce n'était pas le cas sur l'échantillon non dessalé. L'origine de telles molécules n'est pas simple à identifier, celles-ci pourraient provenir d'une réaction entre le soufre libéré par la dégradation des sulfates qui restent après dessalement et des cycles aromatiques présents dans l'échantillon. De plus, expliquer la détection de ce composé quand l'échantillon est dessalé et leur absence sur l'échantillon brut n'est pas une chose aisée. Toutefois, plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'observation de ces différences : les molécules organiques détectées quand l'échantillon n'est pas dessalé ont été retenues dans les résines lors du dessalement. En effet, la rétention de matière organique par les résines échangeuses d'ions est un phénomène connu, pouvant perdre de 60 à 90% de la matière organique (Levchuk *et al.* 2018). En outre, la seconde hypothèse repose sur le fait que l'échantillon n'est pas forcément homogène, et peut être plus ou moins riche en matière organique selon la partie prélevée.

L'autre aspect à souligner est l'absence totale de la triméthylamine, co-produit de réaction de la thermochimiolyse avec le TMAH, qui apparaissait comme un pic très large avec l'échantillon brut. L'hypothèse émise précédemment concernant le fait que le TMAH s'adsorbait sur la matrice saline et était relargué au moment du chauffage pourrait donc se confirmer par cette observation.

Au vu des résultats, il s'avère que de nouvelles analyses doivent être réalisées, pour essayer de détecter un plus grand nombre de molécules organiques et retrouver au moins les mêmes composés que dans l'échantillon brut. Une des possibilités pour tester la première hypothèse émise est de passer un éluant au travers de la résine après le dessalement, ainsi il serait possible de récupérer la matière organique qui a été retenue et analyser l'éluat en CPG-SM. L'éluant à utiliser devra être minutieusement choisi pour éviter de récupérer les sels qui ont déjà été fixés lors du dessalement de l'échantillon hypersalin. De plus, réaliser plusieurs réplicats de dessalement est impératif pour estimer l'homogénéité des échantillons. De nombreuses expériences et optimisations restent à réaliser pour parvenir à détecter autant voire plus de molécules organiques qu'avec l'échantillon brut.

4. Conclusion sur le dessalement des échantillons Tirez et perspectives

Les résultats préliminaires obtenus sur les échantillons dessalés montrent que de nombreuses expériences doivent encore être réalisées si l'on souhaite pouvoir évaluer l'impact du sel sur les méthodes de préparation d'échantillon avec les échantillons du système lacustre de Tírez. Parmi ces expériences, la compréhension de la rétention des molécules organique au sein des résines ioniques est une question primordiale pour savoir si dans un échantillon donné, une grande proportion de matière organique est perdue.

De plus, il faudra appliquer les deux autres méthodes de prétraitement d'échantillon qui n'ont pas encore été appliquée, la dérivatisation au DMF-DMA et la pyrolyse. Il sera également possible d'utiliser d'autres agents de thermochimiolyse comme cela a été fait pour l'échantillon brut comme le TMSH, pour évaluer l'interférence due au sel pour cet agent là aussi.

Le dessalement a été effectué sur l'échantillon n°5 de la lagune del Longar. Un aspect qui n'a pas été précisé ici est que cet échantillon est très chargé en sédiments (Tableau IV-2 et Annexe IV-1). Il pourrait être intéressant de filtrer cet échantillon avant de le dessaler pour évaluer l'impact de la charge sédimentaire sur les échanges ioniques. Cette filtration n'a pas été effectuée ici car celle-ci demande beaucoup de temps du fait de la présence de particules de différentes tailles, les pores des filtres se bouchant très rapidement.

Le dessalement a également été effectué sur d'autres échantillons du système lacustre de Tírez, l'analyse des données étant un travail en cours. Il est donc envisageable d'avoir un comparatif entre échantillon brut et échantillon dessalé pour plusieurs échantillons, ayant des concentrations en sels différentes. Selon ces résultats et les conclusions qui en sortiront quant à l'impact du sel sur la détection de matière organique, la spatialisation d'un tel protocole pourra être envisagée et conceptualisée.

IV. Conclusion sur l'étude des échantillons Tírez.

L'étude des échantillons Tírez, considérés comme analogues aux océans d'Europe et potentiellement d'Encelade, a permis d'apporter des éléments pour la préparation des futures missions d'analyse *in situ* sur ces deux satellites glacés, Europa Lander pour Europe et les différents projets de missions New Frontiers pour Encelade. Cette étude a notamment permis de mettre en avant des potentielles interférences analytiques que peuvent constituer les sels pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, une caractérisation de paramètres physico-chimiques des échantillons Trez a été entreprise en qualifiant et en quantifiant la salinité des différentes lagunes échantillonnées. Les échantillons récupérés sont constitués de sodium, magnésium, chlore et sulfate majoritairement. Le potassium et le calcium sont également retrouvés en moindre quantité. Ainsi, les eaux de Tírez sont composées de sels de sulfate et de chlorure, majoritairement NaCl, $MgCl_2$, Na_2SO_4 (thénardite), $MgSO_4$. Différents degrés d'hydratation peuvent ensuite exister résultant dans la formation de sels hydratés comme la mirabilite (Na_2SO_4 10 H_2O) ou encore l'epsomite ($MgSO_4$ 7H_2O). Une caractérisation minérale pourrait être entreprise dans le futur pour pouvoir faire une comparaison avec les résultats de la sonde Galileo et les minéraux hydratés qui ont déjà été identifiés à la surface d'Europe. Les dosages des différents cations et anions présents dans les échantillons montrent des solutions aqueuses proches de la saturation. Outre, la salinité, le carbone et l'azote ont été quantifiés dans différents échantillons de différentes lagunes, montrant des concentrations en carbone total relativement faible. Enfin, des observations microscopiques ont été effectuées pour tenter d'évaluer l'intégrité des cellules de micro-organismes présents dans ces échantillons, étant donné que les échantillons ont été collectés en 2019 et les analyses ont été entamées uniquement en Septembre 2021. Des chaînettes de cyanobactéries sont encore intègres et observables.

Dans un deuxième temps, et dans une optique de préparation des futures missions d'exploration spatiale, les échantillons ont été analysés par CPG-SM avec les différentes méthodes de préparation d'échantillon qui sont utilisées dans l'analyse *in situ* (pyrolyse, dérivatisation et thermochimiolyse).

Ainsi, il a été possible de montrer que, malgré la diversité et les fortes concentrations en sels, la CPG-SM permet la détection de molécules organiques, dont certaines peuvent être associées directement à des phyla ou des familles de micro-organismes, considérées alors comme de potentiels biomarqueurs. Parmi ceux-ci, les dérivés de stéranes ont été identifiés et sont retrouvés dans les membranes des cellules eucaryotes, mais aussi des molécules retrouvées dans les membranes d'archées halophiles comme le dihydrophytol qui a été identifié ou encore certaines directement lié à la présence de chlorophylle dans des cellules végétales ou de cyanobactéries comme le phytol. Enfin, des acides gras ont été détectés, au cœur de la formation des lipides retrouvés dans les membranes procaryotes et eucaryotes. Néanmoins, certaines molécules considérées comme les briques du vivant et couramment recherchées dans l'exploration spatiale comme les acides aminés (et peptides) et les acides nucléiques n'ont pas pu être identifiés. Cette observation a soulevé l'hypothèse de l'impact des sels, notamment sur les méthodes de dérivatisation qui pourrait expliquer l'absence d'identification de telles molécules. Outre les conséquences analytiques, les sels représentent également une véritable menace pour le bon fonctionnement des instruments qui seront embarqués sur les futures sondes, pouvant aller jusqu'à empêcher toute analyse en obstruant partiellement ou totalement les lignes fluidiques. Ces différents constats ont donc motivé la mise en place d'un protocole dessalement des échantillons Tírez.

L'établissement d'un tel protocole et l'analyse des échantillons dessalés ont donc constitué la troisième et dernière partie de ce chapitre. Le dessalement s'est basé sur l'échange d'ions avec des résinions ioniques, permettant, selon les capacités d'échanges de ces dernières une élimination partielle voire totale des différents cations et anions présents dans les échantillons. Le protocole qui a été établi consiste en un tandem de résine échangeuse de cation et d'anion pour éliminer les ions constitutifs des sels. Ce protocole a montré sa capacité à dessaler les échantillons Tírez qui après évaporation ne présente plus aucun résidu salin. Après dessalement, les mêmes méthodes que pour l'analyse des échantillons brutes ont été appliquées, à savoir la dérivatisation au MTBSTFA et la thermochimiolyse au TMAH. Les résultats préliminaires obtenus sur les échantillons dessalés ont montré que la détection de molécules organiques est améliorée pour la dérivatisation au MTBSTFA, avec des détections de molécules organiques après dessalement alors qu'il n'y en avait aucune avant dessalement. Concernant la thermochimiolyse, il semble que la détection de molécules organiques soit dégradée car avant le dessalement de nombreux composés étaient détectés et identifiés dont des potentielles biosignatures, alors qu'après dessalement plus aucun composé n'est observé. De futurs travaux devront être menés pour analyser les échantillons dessalés avec la dérivatisation au DMF-DMA et par pyrolyse pour tenter d'évaluer l'impact des sels sur l'ensemble des méthodes de prétraitements. De plus, il est impératif de comprendre dans quelle mesure les résines ioniques utilisées retiennent la matière organique pour pouvoir conclure sur la pertinence d'un tel système de dessalement pour l'analyse *in situ* sur les mondes océans. En effet, si la perte d'information sur la distribution en molécules organiques dans un échantillon est trop importante, il faudra s'orienter vers un autre protocole de dessalement, ou une étape supplémentaire de récupération de la matière organique adsorbée.

Cette étude a soulevé de nombreuses questions, motivant de futurs travaux en guise de perspectives. Tout d'abord, les protocoles appliqués pour l'analyse chimique des échantillons sont les protocoles standards qui sont utilisés dans l'exploration spatiale. Des optimisations pourront être menées, permettant potentiellement l'extraction et la détection d'autres composés organiques. De plus, la colonne chromatographique utilisée est une colonne de routine et selon les composés ciblés, des expériences sur d'autres types de phase stationnaires pourraient être pertinents. Aussi, il pourrait être intéressant de réaliser une étude de complémentarité des différentes techniques embarquées à bord des futures sondes (CPG-SM, LD-MS et EC-MS), pour souligner la pertinence, la redondance, mais aussi les avantages et inconvénients de chaque méthode, tout cela sur des échantillons considérés comme les plus représentatifs de ce qui peut être analyser.

La chiralité étant une propriété recherchée dans les molécules détectées et la présence d'un potentiel excès énantiomérique étant considérée comme une biosignature phare pour l'exobiologie, l'impact du sel sur la préservation de la chiralité par les méthodes de prétraitements d'échantillon (dérivatisation au DMF-DMA notamment) devra constituer une future étude sur des échantillons hypersalins.

Finalement, concernant le dessalement, les résultats obtenus devront être comparés à d'autres méthodes de dessalement déjà existantes comme l'électrodialyse ou l'osmose inverse par exemple, pour quantifier les pertes de molécules organiques selon la méthode utilisé. Ainsi, basée sur cette comparaison, il pourra être envisagé de développer un prototype de dessalement spatialisable qui serait embarqué sur les futures sondes spatiales. Ce dessalement s'effectuerait donc en amont de l'analyse chimique et d'une méthode de préparation d'échantillon, permettant d'éliminer l'interférence analytique et instrumental que représente le sel pour la recherche de traces de vie sur les mondes océans.

V. Références

Archer Jr P. D., Franz H. B., Sutter B., Arevalo Jr R. D., Coll P., Eigenbrode J. L., Glavin D. P., Jones J. J., Leshin L. A., and Mahaffy P. R. (2014) Abundances and implications of volatile‐bearing species from evolved gas analysis of the Rocknest aeolian deposit, Gale Crater, Mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 119: 237-254.

Baati H., Siala M., Azri C., Ammar E., Dunlap C., and Trigui M. (2022) Genomic analysis of heavy metal-resistant Halobacterium salinarum isolated from Sfax solar saltern sediments. *Extremophiles*, 26.

Bhaumik and Sonawat. (1994) Pyruvate Metabolism in Halobacterium salinarium Studied by Intracellular 13C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Bacteriology*, 176: 2172-2176.

Billi *et al.* (2000) Ionizing-Radiation Resistance in the Desiccation-Tolerant Cyanobacterium Chroococcidiopsis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1489-1492.

Bishop J. L., Franz H. B., Goetz W., Blake D. F., Freissinet C., Steininger H., Goesmann F., Brinckerhoff W. B., Getty S., and Pinnick V. T. (2013) Coordinated analyses of Antarctic sediments as Mars analog materials using reflectance spectroscopy and current flight-like instruments for CheMin, SAM and MOMA. *Icarus*, 224: 309-325.

Bligh E. G., and Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37: 911-917.

Bloch K. E. (1983) Sterol, structure and membrane function. *Critical Reviews in Biochemistry*, 14: 47-92.

Boulesteix D., Buch A., Samson J., Millan M., Jomaa J., Coscia D., Moulay V., McIntosh O., Freissinet C., and Stern J. (2023a) Influence of pH and salts on DMF-DMA derivatization for future Space Applications. *Analytica Chimica Acta*: 341270.

Boulesteix D., Buch A., Williams A., He Y., Freissinet C., Trainer M., Stern J., and Szopa C. (2023b) Comparison of tetramethylammonium hydroxide (TMAH), trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), and trimethylphenylammonium hydroxide (TMPAH) thermochemolysis for in situ space analysis of organic molecules in planetary environments. *Talanta*, 257: 124283.

Braden D. A., Parrack E. E., and Tyler D. R. (2001) Solvent cage effects. I. Effect of radical mass and size on radical cage pair recombination efficiency. II. Is geminate recombination of polar radicals sensitive to solvent polarity? *Coordination Chemistry Reviews*, 211: 279-294.

Bretti C., Cardiano P., Irto A., Lando G., Milea D., and Sammartano S. (2020) Interaction of N-acetyl-L-cysteine with Na+, Ca2+, Mg2+ and Zn2+. Thermodynamic aspects, chemical speciation and sequestering ability in natural fluids. *Journal of Molecular Liquids*, 319: 114164.

Bryson F., Ingall E., Hanna A. M., Cardelino M., Plattner T., Meister M. R., Lawrence J. D., Mullen A. D., Dichek D., and Schmidt B. E. (2022) Development of the Miniature Robotic Electrodialysis (MR ED) System for Small-Scale Desalting of Liquid Samples with Recovery of Organics. *Authorea Preprints*.

Buch A., Morisson M., Szopa C., Millan M., Freissinet C., He Y., Glavin D., Bonnet J.-Y., Coscia D., and Williams A. (2018) Optimization of the TMAH Thermochemolysis Technique for the Detection of Trace Organic Matter on Mars by the SAM and MOMA-Pyr-GC-MS Experiment.49th LPSC Lunar and Planetary Science Conference 2018.

Buffo J., Schmidt B. E., Huber C., and Walker C. C. (2020) Entrainment and dynamics of ocean‐derived impurities within Europa's ice shell. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 125: e2020JE006394.

Bui T. T., Suga K., and Umakoshi H. (2016) Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems. *Langmuir*, 32: 6176-84.

Carlson *et al.* (2009) Europa's surface composition.

Chiavari and Galletti. (1992) Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of aminoa cids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 24: 123-137.

Chivers C., Buffo J., and Schmidt B. (2021) Thermal and chemical evolution of small, shallow water bodies in Europa's ice shell. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 126: e2020JE006692.

Cockell C. S., Schuerger A. C., Billi D., Friedmann E. I., and Panitz C. (2005) Effects of a simulated martian UV flux on the cyanobacterium, Chroococcidiopsis sp. 029. *Astrobiology*, 5: 127-140.

Coelho L. F., Blais M.-A., Matveev A., Keller-Costa T., Vincent W. F., Costa R., Martins Z., and Canário J. (2022) Contamination analysis of Arctic ice samples as planetary field analogs and implications for future life-detection missions to Europa and Enceladus. *Scientific Reports*, 12.

Colella *et al.* (1998) Palmitic acid is associated with halorhodopsin as a free fatty acid Radiolabeling of halorhodopsin with 3 H-palmitic acid and chemical analysis of the reaction products of purified halorhodopsin with thiols and NaBH 4. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1370: 273-279.

Corcelli et al. (1996) Role of palmitic acid on the isolation and properties of halorhodopsin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1281: 173-181.

Cumbers J., and Rothschild L. J. (2014) Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium Chroococcidiopsis (Pleurocapsales). *J Phycol*, 50: 472-82.

DeLuca *et al.* (1990) Direct Analysis of Bacterial Fatty Acids by Curie-Point Pyrolysis Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 62: 1465-1472.

Dey P. (2018) Fluorescence and Confocal Microscope: Basic Principles and Applications in Pathology. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*, Springer Singapore, Singapore, pp 245-252.

Doktorov A. B., and Fedorenko S. G. (2011) The influence of the cage effect on the mechanism of multistage chemical reactions in solutions. In: *Chemistry for Sustainable Development*, Springer, pp 11-34.

Fabbri D., Adamiano A., Falini G., De Marco R., and Mancini I. (2012) Analytical pyrolysis of dipeptides containing proline and amino acids with polar side chains. Novel 2, 5-diketopiperazine markers in the pyrolysates of proteins. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 95: 145-155.

Fairén *et al.* (2023) Ecological successions throughout the desiccation of Tirez

lagoon (Spain) as an astrobiological time-analog for wet-to-dry transitions on Mars. *Nature*.

Freissinet C., Buch A., Sternberg R., Szopa C., Geffroy-Rodier C., Jelinek C., and Stambouli M. (2010) Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 731-740.

Freissinet C., Glavin D. P., Mahaffy P. R., Miller K. E., Eigenbrode J. L., Summons R. E., Brunner A. E., Buch A., Szopa C., Archer P. D. and others. (2015) Organic molecules in the Sheepbed Mudstone, Gale Crater, Mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 120: 495-514.

Gilmore S. F., Yao A. I., Tietel Z., Kind T., Facciotti M. T., and Parikh A. N. (2013) Role of Squalene in the Organization of Monolayers Derived from Lipid Extracts of Halobacterium salinarum. *Langmuir*, 29: 7922-7930.

Glavin D. P., Freissinet C., Miller K. E., Eigenbrode J. L., Brunner A. E., Buch A., Sutter B., Archer Jr P. D., Atreya S. K., and Brinckerhoff W. B. (2013) Evidence for perchlorates and the origin of chlorinated hydrocarbons detected by SAM at the Rocknest aeolian deposit in Gale Crater. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 118: 1955-1973.

Goesmann F., Brinckerhoff W. B., Raulin F., Goetz W., Danell R. M., Getty S. A., Siljeström S., Mißbach H., Steininger H., Arevalo R. D. and others. (2017) The Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA) Instrument: Characterization of Organic Material in Martian Sediments. *Astrobiology*, 17: 655-685.

Goesmann F., Rosenbauer H., Roll R., Szopa C., Raulin F., Sternberg R., Israel G., Meierhenrich U., Thiemann W., and Munoz-Caro G. (2006) Cosac, The Cometary Sampling and Composition Experiment on Philae. *Space Science Reviews*, 128: 257-280.

Gonzalez O., Gronau S., Falb M., Pfeiffer F., Mendoza E., Zimmer R., and Oesterhelt D. (2008) Reconstruction, modeling & analysis of Halobacterium salinarum R-1 metabolism. *Mol. BioSyst.*, 4: 148-159.

Grivard A., Goubet I., Duarte Filho L. M. D. S., Thiéry V., Chevalier S., De Oliveira-Junior R. G., El Aouad N., Guedes Da Silva Almeida J. R., Sitarek P., Quintans-Junior L. J. and others. (2022) Archaea Carotenoids: Natural Pigments with Unexplored Innovative Potential. *Marine Drugs*, 20: 524.

Hand *et al*. (2017) Report of the Ruopa Lander Science Definitions Team.

Hand K., and Chyba C. (2007) Empirical constraints on the salinity of the europan ocean and implications for a thin ice shell. *Icarus*, 189: 424-438.

He. (2021) Search for organic compounds with MTBSTFA/DMF derivatization and TMAH thermochemolysis on Mars.

Jan Schwarzbauer and Branimir Jovančićević. (2020) Introduction to Analytical Methods in Organic Geochemistry.

Kebelmann K., Hornung A., Karsten U., and Griffiths G. (2013) Intermediate pyrolysis and product identification by TGA and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components. *Biomass and Bioenergy*, 49: 38-48.

Kim D. H. (2011) A review of desalting process techniques and economic analysis of the recovery of salts from retentates. *Desalination*, 270: 1-8.

Kleiman *et al*. (1969) Dihydrosterculic acid, a major fatty acid component ofEuphoria longana seed oil. *Lipids*, 4: 317-320.

Kumar M. S., Praveenkumar R., Ilavarasi A., Rajeshwari K., and Thajuddin N. (2012) Oxidative stress response and fatty acid changes associated with bioaccumulation of chromium [Cr (VI)] by a fresh water cyanobacterium Chroococcus sp. *Biotechnology letters*, 34: 247-251.

Lee C. J. D., Mcmullan P. E., O'Kane C. J., Stevenson A., Santos I. C., Roy C., Ghosh W., Mancinelli R. L., Mormile M. R., Mcmullan G. and others. (2018) NaCl-saturated brines are thermodynamically moderate, rather than extreme, microbial habitats. *FEMS Microbiology Reviews*, 42: 672-693.

Levchuk I., Màrquez J. J. R., and Sillanpää M. (2018) Removal of natural organic matter (NOM) from water by ion exchange–a review. *Chemosphere*, 192: 90-104.

Li D., Wang Y., Du H., Xu S., Li Z., Yang Y., and Wang C. (2016) Nanoscale Electric Characteristics and Oriented Assembly of Halobacterium salinarum Membrane Revealed by Electric Force Microscopy. *Nanomaterials*, 6: 197.

Litchfield C. D. (1998) Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & planetary science*, 33: 813-819.

Lorenz R. D., Gleeson D., Prieto-Ballesteros O., Gomez F., Hand K., and Bulat S. (2011) Analog environments for a Europa lander mission. *Advances in Space Research*, 48: 689-696.

Mahaffy *et al.* (2012) The Sample Analysis at Mars Investigation and Instrument suite. *Space Sci Rev*.

Martin-Cuadrado A. B., Senel E., Martínez ‐ García M., Cifuentes A., Santos F., Almansa C., Moreno ‐ Paz M., Blanco Y., García ‐ Villadangos M., and Del Cura M. Á. G. (2019) Prokaryotic and viral community of the sulfate ‐ rich crust from Peñahueca ephemeral lake, an astrobiology analogue. *Environmental microbiology*, 21: 3577-3600.

Martin ‐ Cuadrado A. B., Senel E., Martínez ‐ García M., Cifuentes A., Santos F., Almansa C., Moreno ‐ Paz M., Blanco Y., García ‐ Villadangos M., and Del Cura M. Á. G. (2019) Prokaryotic and viral community of the sulfate ‐ rich crust from Peñahueca ephemeral lake, an astrobiology analogue. *Environmental microbiology*, 21: 3577-3600.

McCord *et al.* (1999) Hydrated salt minerals on Europa's surface from the Galileo near-infrared mapping spectrometer investigation. *Journal of Geophysical Research*, 104.

Mcintosh O., Szopa C., Freissinet C., Buch A., and Boulesteix D. (2022) Analysis of aromatic organic salts with gas chromatography-mass spectrometry and implications for their detection at Mars surface with in situ experiments. Copernicus Meetings.

Millan M., Szopa C., Buch A., Summons R., Navarro‐Gonzalez R., Mahaffy P., and Johnson S. (2020) Influence of calcium perchlorate on organics under SAM‐like pyrolysis conditions: Constraints on the nature of Martian organics. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 125: e2019JE006359.

Moldoveanu. (2009) Pyrolysis of organic molecules applications to health and envrionmental issues.

Montoya L., Lozada-Chavez I., Amils R., Rodriguez N., and Marin I. (2011) The sulfate-rich and extreme saline sediment of the ephemeral tirez lagoon: a biotope for acetoclastic sulfate-reducing bacteria and hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Int J Microbiol*, 2011: 753758.

Montoya L., Vizioli C., Rodríguez N., Rastoll M., Amils R., and Marin I. (2013) Microbial community composition of Tirez lagoon (Spain), a highly sulfated athalassohaline environment. *Aquatic Biosystems*, 9: 19.

Morisson M., Szopa C., Carrasco N., Buch A., and Gautier T. (2016) Titan's organic aerosols: Molecular composition and structure of laboratory analogues inferred from pyrolysis gas chromatography mass spectrometry analysis. *Icarus*, 277: 442-454.

Mormile M. R., Biesen M. A., Gutierrez M. C., Ventosa A., Pavlovich J. B., Onstott T. C., and Fredrickson J. K. (2003) Isolation of Halobacterium salinarum retrieved directly from halite brine inclusions. *Environmental Microbiology*, 5: 1094-1102.

Moulay V., Freissinet C., Rizk-Bigourd M., Buch A., Ancelin M., Couturier E., Breton C., Trainer M. G., and Szopa C. (2023) Selection and Analytical Performances of the Dragonfly Mass Spectrometer Gas Chromatographic Columns to Support the Search for Organic Molecules of Astrobiological Interest on Titan. *Astrobiology*, 23: 213-229.

Murtey M. D., and Ramasamy P. (2016) Sample preparations for scanning electron microscopy–life sciences. *Modern electron microscopy in physical and life sciences*, 2.

Nandagopal P., Steven A. N., Chan L.-W., Rahmat Z., Jamaluddin H., and Mohd Noh N. I. (2021) Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology*, 10: 1061.

Nas F., Aissaoui N., Mahjoubi M., Mosbah A., Arab M., Abdelwahed S., Khrouf R., Masmoudi A. S., Cherif A., and Klouche-Khelil N. (2021) A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant Bacillus spp. isolated from the Great Sebkha of Oran. *Int Microbiol*, 24: 455-470.

Navale V. (1992) A study of chemical transformation of glycerol ether lipids to hydrocarbons by flash and hydrous pyrolysis. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 23: 121-133.

Nes W. R. (1974) Role of sterols in membranes. *Lipids*, 9: 596-612.

Oren A. (1999) Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. *Hydrobiologia*, 405: 1-9.

Oren A. (2010) The dying Dead Sea: The microbiology of an increasingly extreme environment. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 15: 215-222.

Orphan V. J., Hinrichs K.-U., Ussler W., Paull C. K., Taylor L. T., Sylva S. P., Hayes J. M., and Delong E. F. (2001) Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1922-1934.

Ourisson G., and Rohmer M. (1992) Hopanoids. 2. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Accounts of Chemical Research*, 25: 403-408.

Oyo-Ita I. O., Sam E. S., Oyo-Ita O. E., Arnold T. E., Inyang D. O., and Werne J. P. (2022) Stable carbon isotope and n-alkane distributions in sediment cores from saline and freshwater Gabu lakes, Southeast Nigeria: Environmental implications.

Pavlov A., Vasilyev G., Ostryakov V., Pavlov A., and Mahaffy P. (2012) Degradation of the organic molecules in the shallow subsurface of Mars due to irradiation by cosmic rays. *Geophysical research letters*, 39.

Poch O., Kaci S., Stalport F., Szopa C., and Coll P. (2014) Laboratory insights into the chemical and kinetic evolution of several organic molecules under simulated Mars surface UV radiation conditions. *Icarus*, 242: 50-63.

Postberg F., Kempf S., Schmidt J., Brilliantov N., Beinsen A., Abel B., Buck U., and Srama R. (2009) Sodium salts in E-ring ice grains from an ocean below the surface of Enceladus. *Nature*, 459: 1098-1101.

Preston L. J., and Dartnell L. R. (2014) Planetary habitability: lessons learned from terrestrial analogues. 13: 81-98.

Prieto-Ballesteros O. (2003) Tírez Lake as a Terrestrial Analog of Europa.

Prieto-Ballesteros O., Rodríguez N., Kargel J. S., Kessler C. G., Amils R., and Remolar D. F. (2003) Tirez lake as a terrestrial analog of Europa. *Astrobiology*, 3: 863-877.

Rodriguez-Valera F., Ventosa A., Juez G., and Imhoff J. F. (1985) Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11: 107-115.

Schrödter and Baltes. (1991) Pyrolysis of various furan model compounds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 19: 131-137.

Shankar R., Kolandaivel P., and Senthilkumar L. (2011) Interaction studies of cysteine with Li+, Na+, K+, Be2+, Mg2+, and Ca2+ metal cation complexes. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 24: 553-567.

Sharathchandra K., and Rajashekhar M. (2011) Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *J Algal Biomass Utln*, 2: 83-97.

Smith G. G., Reddy G. S., and Boon J. J. (1988) Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the Curie-point pyrolysis products of some dipeptides and their diketopiperazine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 203-211.

Sojinu S. O., Sonibare O. O., Ekundayo O., and Zeng E. Y. (2012) Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and n-alkanes as indicators. *Science of the Total Environment*, 441: 89-96.

Stivaletta N., Barbieri R., and Billi D. (2012) Microbial colonization of the salt deposits in the driest place of the Atacama Desert (Chile). *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42: 187-200.

Tara L. Salter *et al.* (2022) Mass Spectrometric fingerprints of bacteria and archaea for life detection on icy moons. *Astrobiology*, 22.

Tornabene T., Langworthy T., Holzer G., and Oro J. (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic "archaebacteria". *Journal of Molecular Evolution*, 13: 73-83.

Trumbo *et al.* (2022) A New UV Spectral Feature on Europa: Confirmation of NaCl in Leading-hemisphere Chaos Terrain.

Trumbo S. K., Brown M. E., and Hand K. P. (2019) Sodium chloride on the surface of Europa. *Science Advances*, 5: eaaw7123.

Volkman J. K., Holdsworth D. G., Neill G. P., and Bavor Jr H. (1992) Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Science of the Total Environment*, 112: 203-219.

Wampler. (2006) Applied Pyrolysis Handbook.

Conclusions générales et perspectives

La recherche de vie extraterrestre est un objectif central de l'exploration spatiale depuis quelques décennies. Alors que la recherche de vie sur Mars s'est orientée vers la quête de traces de vie passée, la présence d'océans d'eau liquide sous la surface de certains satellites glacés du système solaire externe laisse y espérer la présence de vie actuelle. Parmi ces lunes, Titan, Europe et Encelade ont un intérêt particulier. Titan est considéré comme un laboratoire de chimie organique à l'échelle planétaire du fait de sa chimie atmosphérique, faisant de ce satellite un endroit idéal pour l'étude de la mise en place d'une chimie prébiotique, et pour la récolte d'informations pouvant apporter des indices quant à l'émergence de la vie sur Terre. Europe et Encelade, quant à elles, se ressemblent sur leur structure interne impliquant une interface entre océan d'eau liquide et plancher rocheux. Ces deux lunes sont considérées aujourd'hui comme des lieux du système solaire où la vie, telle qu'on la connait, pourrait se développer.

L'analyse *in situ* est un moyen indispensable pour la quête de chimie prébiotique ou de traces de vie passées ou actuelles sur ces satellites glacés. La recherche de telles signatures passe par l'analyse chimique *in situ* qui est notamment effectuée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans l'exploration spatiale. Cette méthode sera embarquée à bord de la sonde *Dragonfly* au sein de l'instrument DraMS et est candidate pour être intégrée à bord de missions pour Europe (instrument EMILI pour la mission *Europa Lander*) et Encelade (appel d'offre New Frontiers 5). Toutefois, un des inconvénients de la CPG est sa nécessité à analyser des molécules volatiles, ce qui n'est pas toujours le cas des molécules recherchées en exobiologie (*i.e.* acides aminés, acides nucléiques, acides gras). Ainsi, associées à la CPG, des méthodes de préparation d'échantillon (pyrolyse, dérivatisation et thermochimiolyse), ont été développées pour élargir le spectre d'analyse chimique de la CPG-SM, permettant d'étendre la gamme des molécules analysées.

L'objectif central de ce doctorat était donc d'optimiser et de valider des méthodes analytiques pour la recherche de biosignatures organiques à la surface de Titan, Europe ou Encelade. Pour ce faire, chaque étude s'est appuyée sur l'étude de standards chimiques, d'échantillons de synthèse, mais également des échantillons naturels terrestres (lac hypersalin). Une telle approche a permis d'obtenir des résultats sur des échantillons à différents degrés de complexité moléculaire (diversité et concentration), tout en obtenant des données représentatives des analyses qui seront réalisées sur les mondes océans. Ce travail a abouti à une évaluation des capacités analytiques de la CPG-SM et des méthodes de préparation d'échantillon associées. Cela a aussi permis de prendre en considération les contraintes analytiques attendues sur les différents mondes océans (richesse et diversité organique pour Titan, présence de sels et d'eau pour Europe et Encelade dans les échantillons).

Les deux premières études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent directement dans la préparation de la mission *Dragonfly* et dans la future interprétation de ses données *in situ*.

La première étude s'est intéressée au processus de dérivatisation avec le diméthylformamide diméthyle acétal (DMF-DMA) de composés azotés portant des fonctions amines ou amides, attendues

à la surface de Titan, mais encore jamais détectées *in situ*. Ces fonctions chimiques sont polaires et peuvent, selon la longueur de leur chaîne carbonée, être difficilement détectables en CPG-SM seule car très réfractaires. La dérivatisation au DMF-DMA, embarquée à bord de la sonde Dragonfly, est une méthode de prétraitement d'échantillons qui peut permettre l'analyse de telles molécules en abaissant leur polarité. Toutefois, la réactivité de ces fonctions chimiques avec le DMF-DMA n'est que peu référencée dans la littérature.

Les amines et les amides primaires forment une molécule diméthylformamidinée correspondante alors que trois molécules majoritaires sont observées pour les amines secondaires : la forme méthylée, diméthoxyméthylée et formylée. Pour les amides secondaires, la forme principale observée est la forme non dérivatisée. De plus, d'autres formes minoritaires, produits de la dérivatisation sont également identifiées selon la nature de la fonction chimique (aldéhyde correspondant pour les amines primaires, ester pour les amides primaires, etc). Ces résultats ont abouti à la création d'une base de données spectrales, inexistante à ce jour pour la dérivatisation au DMF-DMA, qui pourra servir pour l'analyse des données *in situ* envoyées par *Dragonfly*. Néanmoins, des optimisations de protocole de dérivatisation (durée et température de réaction), particulièrement pour les amides secondaires seront à réaliser pour tenter de comprendre le schéma réactionnel avec cette fonction chimique et les formes dérivatisées pouvant en résulter.

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées pour mesurer l'impact de la dérivatisation sur ces dernières. La dérivatisation permet d'améliorer les limites de détections et quantification d'un ordre de grandeur pour les amines et amides primaires. Pour les amines secondaires qui présentent trois formes dérivatisées, les limites de détection et de quantification ne sont pas améliorées. Une étude quantitative similaire devra être menée sur une gamme de composé plus large (amine secondaire aromatique, amide primaire et secondaire aromatique), pour évaluer l'intérêt de la dérivatisation sur la détection de ces molécules par rapport aux autres méthodes d'analyse telle que la pyrolyse. Ainsi, il pourra être souligné la redondance et la complémentarité de ces méthodes à bord de la sonde *Dragonfly*, dans l'optique de la détection de biomarqueurs.

Toujours dans un objectif d'accroissement de la complexité moléculaire des échantillons étudiés, la dérivatisation de biomolécules d'intérêt comme les dipeptides ou les acides nucléiques a été étudiée. L'objectif était d'identifier les formes dérivatisées et d'évaluer les capacités de la dérivatisation à dégrader les polymères en monomères, ces derniers étant détectables en CPG-SM. Des résultats préliminaires ont montré que la dérivatisation des dipeptides fonctionne et donne la forme dérivatisée attendue (diméthylformamidination sur l'amine primaire, amide secondaire de la liaison peptidique non modifiée et méthylation sur le carboxyle). Toutefois, de nombreuses autres formes, relativement abondantes par rapport à la forme attendue, ont été détectées mais n'ont pas pu être identifiées. Concernant les nucléotides, des schémas réactionnels et cinétiques entre clivage de la liaison osidique et dérivatisation semblent apparaître, mais de nombreuses expériences futures sont nécessaires pour améliorer la détection de tels composés. Par la suite, il faudra élargir la gamme de composés étudiés (avec des tripeptides par exemple) et potentiellement optimiser le protocole de dérivatisation. En effet, cela pourra permettre par exemple le clivage de la liaison peptidique entre les acides aminés pour parvenir à détecter ces derniers sous leur forme dérivatisée. La détermination des

limites de détection et de quantification des dipeptides et des nucléosides pourra également être réalisée pour comparer les capacités de la dérivatisation CPG-SM avec les autres méthodes analytiques comme la chromatographie en phase liquide. Comme dernière perspective qui me semble pertinente pour cette partie, la chiralité et la séparation énantiomérique, notamment pour les dipeptides qui présentent quatre énantiomères, devront être étudiées. Ainsi, la séparation de ces quatre isomères optiques sera évaluée et optimisée pour pouvoir quantifier un potentiel excès énantiomérique sur d'autres corps planétaires, considéré comme un bioindice.

Enfin, en tant qu'échantillons les plus représentatifs à notre disposition aujourd'hui, des tholins (analogues de synthèse des aérosols de Titan), produits au LATMOS, ont été dérivatisés avec le DMF-DMA. Leur analyse n'a permis de révéler que très peu de molécules dérivatisées par rapport à la complexité moléculaire de ces échantillons et des fonctions dérivatisables attendues (amines notamment). De nombreuses expériences futures devront être réalisées, pour tenter d'extraire un plus grand nombre de molécules. Une identification à partir des spectres de masse pourra être entreprise pour enrichir la base de données actuelle trop pauvre pour permettre l'identification de composés dérivatisés au sein des tholins. Des optimisations ont déjà été réalisées sur le ratio entre volume d'agent de dérivatisation et masse de tholins, pour trouver le bon compromis entre un haut rendement de réaction et une faible dilution. L'autre aspect important ici aussi est l'étude de la chiralité sur les tholins, pour estimer les performances séparatives de la dérivatisation CPG-SM pour séparer les énantiomères au sein d'un échantillon aussi complexe.

Les analyses qui seront réalisées par DraMS nécessitent encore d'être optimisées, pour parvenir à récolter le maximum d'information avec les méthodes analytiques qui seront embarquées. Les dix prochaines années, avant l'arrivée de la sonde *Dragonfly*, doivent donc être consacrées à ce type d'étude, à la fois pour préparer les conditions analytiques, définies comme optimales qui seront utilisées sur DraMS mais également pour aider à l'interprétation des futures données *in situ*.

La deuxième problématique de ce manuscrit s'inscrit dans le développement instrumental de DraMS-GC, en ayant pour objectif de sélectionner et caractériser les colonnes chromatographiques qui seront à bord de la sonde *Dragonfly*. Dans un premier temps, il s'agissait de sélectionner la phase stationnaire qui sera utilisée pour la séparation dite générale. Pour ce faire, quatre phases stationnaires ont été comparées en étudiant leur efficacité chromatographique ainsi que leurs capacités séparatives pour une large gamme de composés potentiellement attendus sur Titan. En considérant également les propriétés mécaniques, de résistance thermique et l'héritage spatiale de chaque colonne étudiée, il est apparu que la colonne chromatographique RTX-5 (95 % de polysiloxane et 5 % de diphényle) était la plus appropriée pour être embarquée à bord de l'instrument DraMS. C'est cette même colonne qui a été sélectionnée pour le prototype de l'instrument EMILI, instrument faisant partie de la charge scientifique du concept de mission *Europa Lander*. Par la suite, les performances analytiques des deux colonnes de DraMS (générale et chirale) ont été caractérisées. Des mélanges de standards chimiques composés de plusieurs familles chimiques ainsi que des tholins en pyrolyse et en dérivatisation ont été analysés, dans des conditions analytiques (débit gaz vecteur, programme de température du four, etc.) compatibles avec l'utilisation de DraMS. Les résultats ont montré que les

deux colonnes étaient capables de séparer un grand nombre de composés, provenant de différentes familles chimiques, en détectant des composés possédant jusqu'à 25 atomes de carbone, dans des durées d'analyses compatibles avec une analyse *in situ* (<1 heure). Cette longueur de chaîne carbonée est une limite basse, des composés plus lourds n'ayant pas encore été analysés. De plus, les deux colonnes ont montré de la redondance et de la complémentarité en termes d'analyse, aussi bien sur la détection que sur les ordres d'élutions. Ces deux propriétés peuvent faciliter certaines identifications (lors de coélutions par exemple) mais aussi permettre d'outrepasser des problèmes techniques qui pourraient subvenir sur Titan, empêchant par exemple le fonctionnement d'une des deux colonnes. Enfin, dans l'optique d'évaluer la séparation énantiomérique avec la colonne chirale, plusieurs composés de différentes familles chimiques (alcools, amines, acides carboxyliques, nitriles) ont été analysés dans deux conditions : avec et sans dérivatisation. Il apparaît que ces deux conditions sont complémentaires pour achever la séparation énantiomérique des composés. Ainsi, quelle que soit la famille chimique, il sera possible de quantifier un excès énantiomérique, si celui-ci existe à la surface de Titan. La recherche et la découverte d'un déséquilibre énantiomérique pourrait représenter un potentiel bioindice.

Cette étude a montré que les deux colonnes qui seront intégrées à DraMS-GC ont les capacités analytiques répondant aux exigences scientifiques de la mission *Dragonfly.* Outre l'intérêt pour la mission *Dragonfly*, ces travaux renforcent les connaissances sur les phases stationnaires pour la séparation chromatographique de nombreux composés et pourront donc être utilisés pour la préparation de futures missions d'analyse *in situ* et le développement des futurs chromatographes en phase gazeuse spatiaux.

En changeant de cible planétaire et toujours dans une optique de préparation des futures missions d'analyse *in situ l*e dernier chapitre de ce manuscrit s'intéresse aux analyses qui pourront être réalisées par CPG-SM et les méthodes de prétraitement d'échantillon associées à la surface d'Europe et d'Encelade. Les analyses de laboratoire ont été réalisées sur des échantillons analogues aux océans des deux lunes glacées en termes de salinité, provenant de quatre lagunes du système lacustre Tírez (lac hypersalin). L'étude de ces échantillons s'est décomposée en trois parties : une sur la caractérisation physico-chimique des échantillons, une sur les capacités de détection de molécules organiques en CPG-SM et de méthodes de prétraitement associées et une dernière sur la mise en place d'un protocole de dessalement.

La caractérisation de la physico-chimie des échantillons Tirez a commencé par la mesure du contenu en carbone et en azote total. De futures analyses, en ne considérant que le carbone organique, seront requises. La salinité des échantillons a été évaluée à la fois qualitativement et quantitativement, car celle-ci est peu connue. Il est apparu que les échantillons sont composés de sels de chlore et de sulfates avec majoritairement du sodium et du magnésium pour la partie cationique, quelle que soit la lagune d'origine des échantillons. Enfin, l'intégrité des cellules de micro-organismes présents dans les échantillons a également été estimée par microscopie. Des chaînettes de cyanobactéries ont été identifiées, signifiant que certaines des cellules, même après deux ans de

stockage à 4 °C peuvent encore être intègres (ce qui ne signifie pas vivantes). Cette information est capitale pour évaluer les capacités des méthodes de prétraitements d'échantillons à lyser les membranes cellulaires pour permettre la libération du contenu moléculaire organique intracellulaire pouvant être des biosignatures. Pour de futures analyses, une caractérisation de la minéralogie ainsi que des sels hydratés présents pourra être envisagée pour faire un parallèle direct avec ceux qui ont été identifiés à la surface d'Europe. Cette mesure permettra de connaître le degré d'hydratation des échantillons, qui peut avoir un impact direct sur les méthodes de préparation d'échantillons employées, celles-ci étant sensibles à l'eau. De fait, cette information permettra d'optimiser au mieux les méthodes d'évaporation de l'eau, indispensables pour l'analyse *in situ* des mondes océans tels qu'Europe et Encelade.

J'ai ensuite effectué l'évaluation des capacités de la CPG-SM et des méthodes de prétraitements d'échantillons associées à détecter des molécules organiques en lien direct avec des micro-organismes, en présence de fortes concentrations en sels. En effet, de nombreux paramètres peuvent interférer avec l'analyse et les méthodes utilisées en amont de la CPG-SM comme le pH, la teneur en eau des échantillons ou encore la présence de sels. C'est l'impact de ces derniers qui a été évalué ici. Les résultats ont montré que toutes les méthodes de préparation d'échantillon (pyrolyse, dérivatisation au DMF-DMA ou thermochimiolyse) permettent la détection de molécules organiques, certaines pouvant être directement reliées à des micro-organismes qui étaient ou sont présents dans les échantillons. Toutefois, parmi ces méthodes, la dérivatisation au MTBSTFA n'a pas permis de détecter de molécules organiques. Plusieurs hypothèses ont été avancées quant à ces résultats et de nombreuses optimisations semblent nécessaires pour parvenir à détecter des molécules organiques et de potentielles biosignatures. De plus, aucune méthode employée n'a permis la détection d'acides aminés ou encore d'acides nucléiques. Différentes hypothèses ont été avancées, et la présence de sels représente l'une d'entre elle. Un protocole de dessalement a été mis en place, dans le troisième volet de cette étude, pour tenter d'évaluer l'impact des sels, notamment sur la dérivatisation. À l'avenir et en parallèle du dessalement des échantillons, la caractérisation organique par CPG-SM devra être poursuivie, en continuant l'analyse des données obtenues sur les échantillons des autres lagunes que celle étudiée. Il sera également possible d'analyser ces mêmes échantillons par d'autres méthodes analytiques telles que la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), élargissant la gamme de composés détectables.

Le principe du dessalement des échantillons Tírez s'est appuyé sur l'utilisation de résines échangeuses d'ions pour éliminer à la fois les cations et les anions constitutifs des sels. Le protocole qui a été mis en place a montré sa capacité pour éliminer l'intégralité des cations présents dans les échantillons de Tírez et donc empêcher la formation de sels malgré la présence d'anions résiduels après dessalement. Les analyses préliminaires avec la dérivatisation au MTBSTFA permettent de détecter des molécules organiques quand l'échantillon est dessalé, ce qui n'était pas le cas en présence de sels. En revanche, l'analyse avec la thermochimiolyse au TMAH, après dessalement, ne montre plus aucune détection, alors que de nombreux composés étaient détectés en présence de sels. Cela pourrait être dû à la rétention des molécules organiques par les résines échangeuses d'ions. Ainsi, ce protocole nécessite encore d'être optimisé pour permettre la détection des mêmes molécules qu'en

présence de sels sur les échantillons bruts voire même un plus grand nombre. Il faudra réussir à quantifier la quantité de matière organique qui peut être perdue suite à ce protocole de dessalement pour évaluer la pertinence d'une telle méthode. C'est le travail qui sera initié par le doctorant qui prendra la suite de mes travaux. Suite à cela, et selon les résultats obtenus, la spatialisation d'un tel protocole pourra être envisagée.

Tous ces travaux font donc apparaître de nombreuses perspectives. Dans l'optique d'élargir le spectre d'analyse chimique, les échantillons pourront être analysés avec d'autres techniques analytiques qui sont proposées pour être embarquées à bord des concepts de missions à destination d'Europe et d'Encelade. Parmi celles-ci se trouvent la désorption laser couplée à la spectrométrie de masse (développée au centre NASA Goddard) ou l'électrophorèse capillaire (prototype spatialisable au centre NASA JPL). Ainsi, la complémentarité entre les différentes méthodes analytiques spatialisables actuellement pourra être évaluée sur des échantillon représentatifs. Aussi, la présence de molécules chirales dans ces échantillons devra être évaluée pour, par la suite, réussir à mesurer l'impact des sels sur la séparation énantiomérique. En effet, si les sels interfèrent avec la dérivatisation au DMF-DMA (indispensables pour l'analyse d'acides aminés par exemple) ou avec la séparation énantiomérique, la quantification d'un déséquilibre chiral ne sera pas possible.

Dans une optique plus large que l'exploration d'Europe et d'Encelade, l'étude sur de tels échantillons analogues peut également être transposée pour le développement de futures missions d'analyse *in situ* à destination de corps planétaires sur lesquels les sels ont été identifiés ou sont attendus (*e.g.* Cérès (Nathues *et al.* 2022), Mars). En effet, les sels font partis des composés qui semblent être ubiquitaires dans le système solaire, entrant dans la composition des surfaces planétaires et pouvant venir directement interférer avec la détection de molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie. Ces derniers peuvent à la fois dégrader le fonctionnement instrumental mais aussi les capacités analytiques de la CPG-SM et des méthodes de prétraitements employées. Cette problématique doit donc être prise en compte dans tous les futurs développements d'instruments d'analyse *in situ* qui seront envoyés sur des corps planétaires où les sels (qu'ils soient de chlore, de sulfate, d'ammonium ou de phosphate) sont susceptibles d'être présents.

À travers les travaux qui ont constitué ce manuscrit, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a, une nouvelle fois, prouvé ses capacités analytiques pour répondre à des problématiques d'analyse *in situ*. Cette technique, associées aux méthodes de préparation d'échantillon utilisées dans l'exploration spatiale, a montré ses aptitudes pour la détection et l'identification de molécules organiques qui peuvent être impliquées dans le développement d'une chimie prébiotique, ou directement liées au vivant tel que l'on connaît su Terre. La chromatographie en phase gazeuse demeure un instrument de premier choix pour l'analyse *in situ* de Titan, Europe et Encelade.

La recherche de vie extra-terrestre dans le système solaire est une problématique qui a longtemps été associée à Mars et qui, depuis la découverte des mondes océans, s'est élargie et a suscité un fort intérêt. L'émergence de la vie sur Terre demeure aujourd'hui un mystère et la compréhension de l'évolution de l'inerte au vivant, de la chimie à la biologie, de la matière organique

aux premières cellules restent une question centrale. Découvrir une chimie prébiotique sur Titan ou la vie au sein des océans d'Europe et d'Encelade apporteraient de précieuses informations quant aux questions auxquelles s'intéresse l'exobiologie. L'apparition de la vie ne serait plus un phénomène ponctuel et unique liée à l'évolution de la Terre, mais pourrait être un phénomène bien plus ubiquitaire qu'attendu, qui existerait sur de nombreux autres objets célestes de notre Univers. Les considérations quant à l'apparition de la vie, telle que nous la connaissons sur Terre, comme étant le fruit d'une succession d'évènements probabilistes, seraient alors profondément remises en question.

Annexes

Chapitre Annexe : Détection de molécules organiques provenant de la souche *Halobacterium salinarum* dans des cristaux d'halite (NaCl) en préparation à l'analyse *in situ* sur Encelade et Europe.

1. Objectifs

La recherche de molécules organiques, potentiellement des biosignatures, à la surface d'Encelade et d'Europe est un objectif principal des concepts de missions d'analyse *in situ* (qui devraient voir le jour dans les prochaines décennies) à destination de ces deux satellites. Cette quête de molécules organiques, pouvant indiquer la présence de vie passée ou actuelle, est notamment effectuée depuis plusieurs missions d'analyse *in situ* par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Toutefois, sur Encelade et Europe, du chlorure de sodium a été identifié, par analyse *in situ* (Postberg *et al.* 2009) et par des observations avec des télescopes spatiaux (Trumbo *et al.* 2022; Trumbo *et al.* 2019). Les sels sont connus pour dégrader le fonctionnement instrumental, entraver les performances analytiques de la CPG-SM et interférer avec les méthodes de prétraitements d'échantillons (Freissinet *et al.* 2015; Millan *et al.* 2020). Ces différents effets pourraient empêcher la détection et l'identification de molécules organiques d'intérêt pour l'exobiologie.

Du fait de l'impact potentiel du chlorure du sodium, en parallèle et à l'instar des analyses effectuées dans la section IV.II sur les échantillons naturels de Tírez, j'ai décidé d'étudier des échantillons synthétiques salins. Ces échantillons sont des cristaux d'halite (NaCl) contenant une souche d'archée halophile, *Halobacterium salinarum.* De tels échantillons ont été choisis car ceux-là permettent de réduire la complexité de micro-organismes, moléculaire, mais également saline en comparaison avec les échantillons de Tírez. Il est donc possible d'avoir le contrôle sur la nature et la concentration des sels ainsi que sur la diversité d'espèces présentes.

Cette étude naît d'une collaboration que j'ai pilotée avec le Museum National d'Histoire Naturelle et plus précisément avec le Dr Adrienne Kish et son doctorant Charly Favreau (devenu docteur depuis). Ces échantillons sont synthétisés au sein du Museum d'Histoire Naturelle dans l'équipe Biochimie des Interactions Moléculaires.

L'objectif de cette étude est, comme pour les échantillons Tírez, d'évaluer la capacité de la CPG-SM et des méthodes de prétraitements d'échantillon à détecter des molécules organiques relatives à la souche *Halobacterium salinarum* en présence de cristaux d'halite. Mesurer l'impact du sel sur les capacités de détection sur les instruments et méthodes d'analyse *in situ,* permettra de montrer les interférences possibles que peuvent représenter les sels et de justifier le besoin du développement d'un protocole de dessalement. L'étude des échantillons naturels de Tírez a soulevé de nombreuses hypothèses, dont la majorité n'ont pu être confirmées ou réfutées. Les échantillons synthétiques étant moins complexes (=une seule souche et un seul sel), les impacts du sel qui seront avancés, s'il est possible de les évaluer, seront directement liés à la présence de chlorure de sodium. Il n'y aura donc pas d'effets potentiellement combinés de plusieurs sels contrairement aux échantillons Tírez.

2. Matériels et méthodes

2.1. Les échantillons de synthèse

L'échantillon étudié ici est composé de cristaux d'halite dans lesquels la souche *Halobacterium salinarum* a été inoculée. *Halobacterium salinarum* est une archée halophile pouvant résister à différents stress environnementaux comme notamment des concentrations en chlorure de sodium élevées. Cette espèce a été choisie comme souche d'étude car c'est une souche modèle très simple à cultiver en laboratoire et dont le génome complet a été séquencé. Ainsi, les voies métaboliques, que ce soit dans des conditions aérobiques (cycle de Krebs et photosynthèse basée sur la bactériorhodopsine) ou anaérobiques (métabolisme de l'arginine).

Je n'ai pas personnellement participé à la synthèse de l'échantillon étudié, celle-ci a été réalisée par Charly Favreau selon le protocole de préparation des échantillons qui est présenté en Figure 1. En plus de l'échantillon de cristaux d'halite inoculés par *Halobacterium salinarum* (nommé TNPA Hbt), un échantillon avec l'halite seule (nommé TN) , ainsi que l'halite et le milieu de culture sans l'archée (nommé TNPA) ont également été analysés. Ces échantillons sont considérés comme des blancs à différents niveaux du protocole de préparation de l'halite avec *Halobacterium salinarum*. Ainsi, ils permettent de connaître toutes les contaminations qui peuvent provenir d'autres sources qu'*Halobacterium salinarum*. Parmi ces autres sources, il y a tout d'abord les tampons utilisés pour la synthèse des échantillons (Figure 2), le milieu de culture mais aussi les contaminations liées à l'utilisateur. En effet, les protocoles de stérilisation ne sont pas les mêmes dans des laboratoires de biologie (ce qui est le cas du laboratoire du Museum) et dans des laboratoires de chimie. Les biologistes veulent éviter toute contamination biologique alors que les chimistes veulent éviter tout contamination moléculaire, et particulièrement organique dans notre cas.

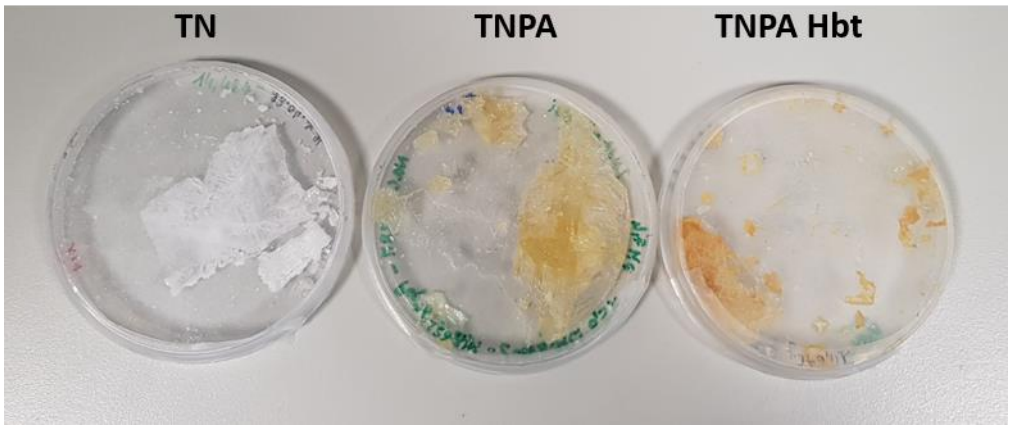


Figure 1 : Échantillons synthétiques étudiés, provenant du Museum Nationale d'Histoire Naturelle. TN : halite seule, TNPA : halite + milieu de culture, TNPA Hbt : TNPA + souche Halobacterium salinarum.

Halite protocol

Crystallization buffers :

for Halite only (=TN buffer)
- Tris-HCl pH 7.4 100 mM.
- NaCl 4.28 M.
- adjust pH to 7.4 with HCl or NaOH

AUTOCLAVED

for Halite with haloarchaea (TNPA buffer)
- Tris-HCl pH 7.4 100 mM
- NaCl 4.28 M
- Peptone (Oxoid LP0034) 1%
- adjust pH to 7.4 with HCl or NaOH

AUTOCLAVED
- L-Arginine.HCl 0.5% (0.22 µm filtration)

Prepare halite crystals without cells :

1/ drop the good volume in Petri dish

2/ incubate the Petri dish for weeks or month in heat chamber

-> for smaller crystals, you can use incubator (higher air flow)

3/ **Do not move the dishes as long as there is still liquid in them !**

Prepare halite crystals with cells :

① collect cells with centrifugation (slow ± 7 000 xg)

② wash cell pellets with crystallization buffer (remove all salt from the medium)

③ centrifuge again (slow ± 7 000 xg)

④ Resuspending cell pellets with crystalization buffer : **10 mL for 500 mg cell pellet** (slowly, no more than 200 rpm with rotary agitator)

⑤ drop the result in Petri dish

⑥ incubate the Petri dish for weeks or month in heat chamber / incubator

⑦ **Do not move the dishes as long as there is still liquid in them !**

Hbt. salinarum growth conditions

- Complex medium = "GN101"
  - ↳ NaCl 4,28 M
  - ↳ $MgSO_4$-$7H_2O$ 81 mM
  - ↳ KCl 27 mM
  - ↳ 3Na-Citrate-$2H_2O$ 10 mM
  - ↳ Peptone Oxoid LP0034 1% (w/v)
- 37°C - 180 rmp

Figure 2 : Protocole de préparation des cristaux d'halite seuls et des cristaux d'halite inoculés avec Halobacterium salinarum.

2.2. Instrumentation et les protocoles analytiques

Les protocoles analytiques appliqués dans cette étude sont identiques à ceux employés pour les travaux sur les échantillons Tírez. Les différentes méthodes utilisées reprennent donc les conditions décrites dans le chapitre IV.

Chaque méthode de préparation d'échantillon nécessitant des configurations particulières, les analyses ont été effectuées sur des instruments différents, décrits ci-dessous. Chaque analyse a été réalisée sur une colonne RTX-5 (Restek), d'une longueur de 30 mètres, un diamètre interne de 0,25 mm et une phase stationnaire composée de 95 % de diméthylpolysiloxane et 5 % de diphényle et d'épaisseur 0,25 µm. Cette colonne est connue pour sa robustesse (notamment thermique) et a un

héritage important dans la chromatographie spatiale passée (Goesmann *et al.* 2017; Goesmann *et al.* 2006; Mahaffy *et al.* 2012) et sera également envoyée sur Titan à bord de la sonde Dragonfly (Moulay *et al.* 2023). Pour toutes les analyses, la température des injecteurs, des lignes de transfert et des sources de chaque instrument était fixée à 250 °C. L'énergie utilisée pour l'ionisation est de 70 eV. Le gaz vecteur est de l'hélium (AirLiquide, pureté > 99,999%) utilisé à un débit constant de 1mL.min^{-1}. Les analyses SM s'étendent des *m/z* = 40 à *m/z* = 700. Le programme de température des différents chromatographes en phase gazeuse utilisés est identique, à savoir une température qui débute à 50 °C, augmente jusqu'à 300 °C avec une rampe de 10 °C.min^{-1}. La température finale est maintenue au minimum 15 minutes.

Pour chaque condition étudiée, deux analyses indépendantes ont été réalisées permettant de s'assurer de la répétabilité des expériences.

2.2.1. Pyrolyse CPG-SM

Les analyses en pyrolyse CPG-SM ont été effectuées avec un pyrolyseur CDS 6200 (CDS Analytical). Ce pyrolyseur est couplé au chromatographe en phase gazeuse Trace 1300 (Thermo Fisher Scientific) par l'intermédiaire d'une ligne de transfert dont la température a été fixée à 280 °C. La température de l'interface du pyrolyseur est de 250 °C. Les échantillons ont été pyrolysés avec deux méthodes différentes : (i) en pyrolyse flash pendant 30 secondes à 300, 500 et 800 °C ainsi qu'en (ii) pyrolyse lente par l'utilisation d'une rampe de chauffage, avec une température dans la chambre de pyrolyse débutant à 100 °C, augmentant avec une rampe de 100 °C.min^{-1} pour atteindre une température finale de 800 °C maintenue pendant 30 secondes. Une telle méthode s'apparente à ce qui est utilisé sur l'instrument MOMA à bord du rover Rosalind Franklin (Goesmann *et al.* 2017). Les molécules extraites avec l'augmentation de la température sont envoyées et adsorbées dans un piège contenant du Tenax®, refroidi à -40 °C par de l'azote liquide. Une fois la rampe de pyrolyse achevée, le flux d'hélium est inversé dans le piège et ce dernier est chauffé à 280 °C pour la désorption des molécules piégées, celles-ci étant ensuite transférées dans la colonne chromatographique par la ligne de transfert. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé pour la pyrolyse est un Trace 1300 couplé à un spectromètre de masse ISQ (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque analyse en pyrolyse, 5 mg d'échantillon sont analysés.

2.2.2. Dérivatisation CPG-SM

La dérivatisation a été employée pour cibler les molécules polaires ne pouvant être détectées directement par une analyse classique en CPG-SM en raison de leur polarité et leur masse moléculaire plus élevées (volatilité moindre). Deux agents de dérivatisation, employés pour l'analyse spatiale *in situ,* ont été utilisés : le diméthlyformamide diméthyl acétal (DMF-DMA) et le N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA). Le second a été dilué dans du DMF (ratio 4 : 1 respectivement), augmentant significativement le rendement de dérivatisation, comme cela est fait sur l'instrument SAM sur Mars (Mahaffy *et al.* 2012). Les deux agents de dérivatisation sont fournis par Sigma Aldrich et ont une pureté supérieure à 99,0 %.

Le même protocole expérimental de dérivatisation off-line a été utilisé pour les deux agents de dérivatisation. La réaction chimique s'effectue dans un bloc chauffant extérieur au CPG-SM. Le

protocole utilisé est le suivant : 20 µL d'agent de dérivatisation sont ajoutés à 10 mg des différents échantillons (TN, TNPA et TNPA + *halobacterium salinarum*). La dérivatisation au DMF-DMA s'effectue à 145 °C pendant 3 minutes (Freissinet *et al.* 2010) et celle au MTBSTFA à 75 °C pendant 15 minutes. Ensuite, 1 µL de la solution résultante est injecté pour l'analyse en CPG-SM en mode splitless. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Trace 1300 qui est couplé à un spectromètre de masse TSQ9000 constitué par un triple quadrupôle (les deux fournis par Thermo Fisher Scientific).

Pour chacune des dérivatisations, un blanc de dérivatisation (agent dérivatisant analysé seul avec le même protocole) a été réalisé permettant de connaître les produits secondaires issus uniquement du DMF-DMA et du MTBSTFA qui se forment durant la réaction de dérivatisation et l'analyse chromatographique.

2.2.3. La thermochimiolyse au TMAH

La thermochimiolyse a été réalisée avec du tetraméthylammonium hydroxide TMAH (dilué à 25 % w/w dans du méthanol, Merck) en mode on-line (réaction qui se fait directement dans le système d'injection). La réaction est effectuée à la température ayant le meilleur rendement de réaction, 600 °C (Buch *et al.* 2018), dans le four du pyrolyseur EGA/PY-3030D (FrontierLab). Le pyrolyseur est directement installé sur l'injecteur du chromatographe. 10 mg de résidu provenant de l'évaporation de l'échantillon de la lagune del Longar ont été pyrolysés avec 4 µL de TMAH pendant 10 secondes. Le contenu total de la capsule a été injecté avec un split de 20 $mL.min^{-1}$ (ratio 1:20) dans un chromatographe Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse ISQ simple quadrupôle.

3. Résultats

Pour chaque méthode de préparation d'échantillon employée, une comparaison est faite entre l'halite seule (TN), l'halite et le milieu de culture (TNPA) et l'halite, le milieu de culture inoculés par *Halobacterium salinarum* (TNPA Hbt). Ainsi, il est possible d'inférer ce qui provient uniquement de la souche Halobacterium salinarum en éliminant toutes les molécules considérées comme de la contamination provenant soit de la préparation de l'halite soit de l'halite avec le milieu de culture.

3.1. Pyrolyse-CPG-SM

Les résultats présentés en Figure 3 correspondent à la pyrolyse rampe des échantillons TN, TNPA et TNPA Hbt. La pyrolyse flash (300 °C, 500 °C et 800 °C) de l'échantillon TNPA Hbt a aussi été réalisée et est présentée en figure supplémentaire après les références relatives à ce chapitre annexe.

La pyrolyse de l'halite seule (Figure 3) montre de nombreux pics pour un échantillon étant sensé contenir uniquement du NaCl. Le pic de chlorure d'hydrogène aux alentours de 13 minutes témoigne de la pyrolyse du chlorure de sodium. Les autres pics n'ont pas été analysés car leur identification n'apporte pas d'information quant à l'objectif de cette étude. Cette première analyse montre que de nombreuses contaminations sont présentes sur l'halite seule, ce qui signifie que de nombreux pics chromatographiques sur l'analyse de l'échantillon d'intérêt (TNPA Hbt) ne proviendront pas de l'archée halophile, mais des protocoles utilisés pour la synthèse du sel.

En comparant désormais la pyrolyse rampe de l'échantillon TNPA avec l'échantillon TNPA Hbt, il apparaît, comme cela était attendu du fait de la richesse organique du milieu de culture, que les deux chromatogrammes sont très similaires. Cela signifie que de très nombreux composés proviennent de l'échantillon TNPA ce qui complique voire rend impossible l'identification de composés au sein de l'échantillon TNPA Hbt pouvant être associés à *Halobacterium salinarum*. En effet, de trop nombreuses coélutions sont observées, résultant en des spectres de masses pollués par plusieurs molécules. Toutefois, quelques molécules ont tout de même pu être identifiées, directement liées à la présence de l'archée halophile dans l'échantillon, comme le dihydrophytol ou encore squalène et ses isomères qui proviennent de la membrane d'*Halobacterium salinarum*. De plus, des composés aliphatiques sont également observés pouvant provenir de la décarboxylation des éthers de glycérol présent dans la membrane de l'archée halophile étudiée. Enfin, des dérivés furanes pouvant provenir de la dégradation thermique des sucres ainsi qu'une molécule pouvant résulter de la dégradation des acides aminés du milieu de culture (indole, pyrole, pyridine) ont été identifiés.

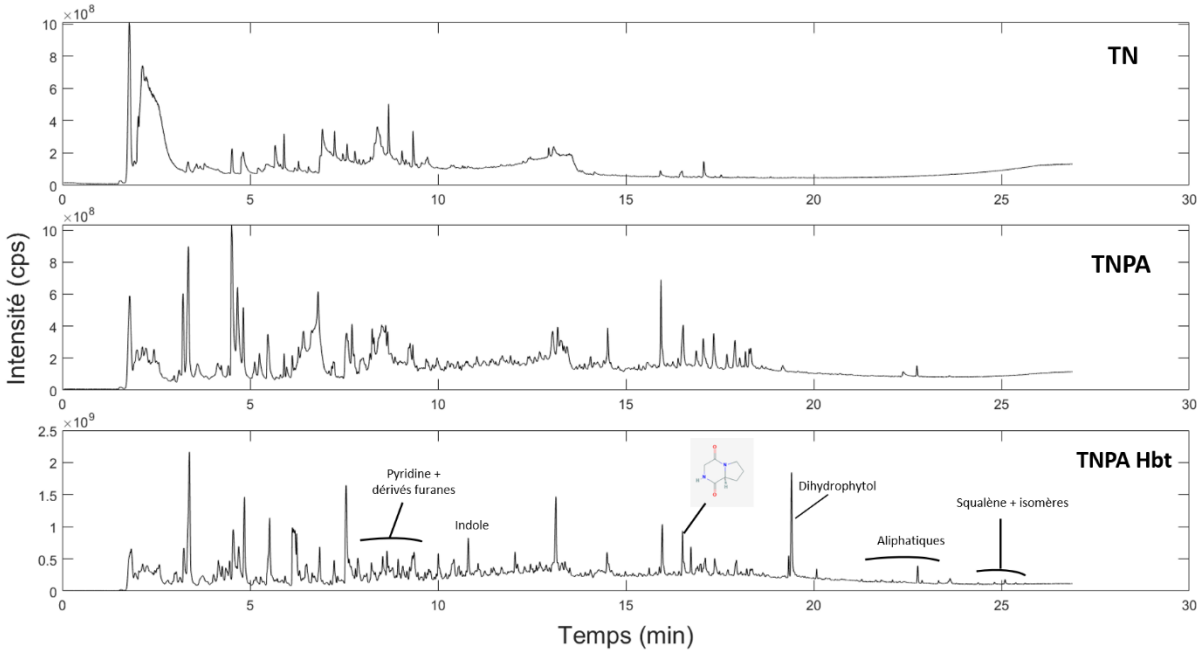


Figure 3 : Chromatogrammes (en TIC) des différents échantillons étudiés : TN → halite seule, TNPA → Halite + milieu de culture, TNPA Hbt → halite + milieu de culture + Halobacterium salinarum. La pyrolyse rampe débute à 100 °C et augmente jusqu'à 800 °C avec une rampe de température de 100 °C.min^{-1}.

Les résultats de pyrolyse rampe montrent que le milieu de culture contient de nombreuses molécules organiques, notamment liées à la présence de peptone, ce qui rend l'identification de composés provenant de *Halobacterium salinarum* très compliqué.

3.2. Dérivatisation-CPG-SM

La dérivatisation associée à la CPG-SM a été effectuée avec le MTBSTFA dilué dans le DMF et avec le DMF-DMA. Comme pour la pyrolyse rampe, une comparaison est réalisée entre les analyses effectuées sur les échantillons dits blanc « TN » et « TNPA » ainsi que sur l'échantillon d'intérêt TNPA Hbt.

3.2.1. Dérivatisation avec le MTBSTFA-DMF

La comparaison des chromatogrammes des différents échantillons (TN, TNPA et TNPA Hbt) après leur dérivatisation au MTBSTFA-DMF est présentée Figure 4.

Tout d'abord, l'échantillon TN ne montre que très peu de pics, hormis des composés non identifiés. Ces composés sont donc également retrouvés dans le TNPA et dans le TNPA Hbt (*e.g.* le pic à 17 et à 19 minutes).

En comparant le TNPA et le TNPA Hbt, aucune différence de détection n'est observée entre les deux chromatogrammes, toutes les molécules identifiées semblent provenir de l'échantillon TNPA et donc du milieu de culture. En effet, ce dernier contient de la peptone qui est constituée d'acides aminés tels que ceux identifiés sur les chromatogrammes, à savoir l'alanine, la glycine, la valine et la leucine. Les différences d'intensité des pics chromatographiques entre l'échantillon TNPA et TNPA Hbt semblent montrer qu'il y ait une quantité supplémentaire d'acides aminés en présence de *Halobacterium salinarum*, notamment pour l'alanine et la glycine. Toutefois, tenter de quantifier la proportion d'acides aminés provenant de la souche et non du milieu de culture demeure compliqué. En effet, les échantillons, d'après leur aspect visuel (Figure 1) n'apparaissent pas homogènes au sein d'un même cristal et il peut donc y avoir une plus grande quantité de milieu de culture dans l'une des analyses par rapport aux autres, justifiant ces différences d'intensités.

Hormis ces acides aminés, aucune autre molécule d'intérêt pour l'exobiologie, pouvant par exemple provenir des membranes cellulaires ou bien de l'ADN (nucléotides, nucléosides ou nucléobases) des cellules d'archées halophiles présentes dans l'échantillon TNPA Hbt, n'est détectée. Cette non-détection peut être expliquée par différentes hypothèses, dont certaines ont déjà été soulignées pour les échantillons de Tírez (chapitre IV) : (i) l'halite peut inhiber la réaction de dérivatisation ce qui empêche la détection de telles molécules polaires qui doivent être impérativement dérivatisées pour être détectées en CPG-SM. (ii) le protocole de dérivatisation utilisé (75 °C pendant 15 minutes) ne permet pas de lyser les cellules archées. Ainsi, les parois cellulaires ne sont pas fragmentées et le contenu intracellulaire, dans lequel se trouve les molécules relatives à l'ADN, n'est pas libéré. Ceci peut par exemple justifier le fait que le dihydrophytol est détecté par la pyrolyse mais pas avec la dérivatisation au MTBSTFA.

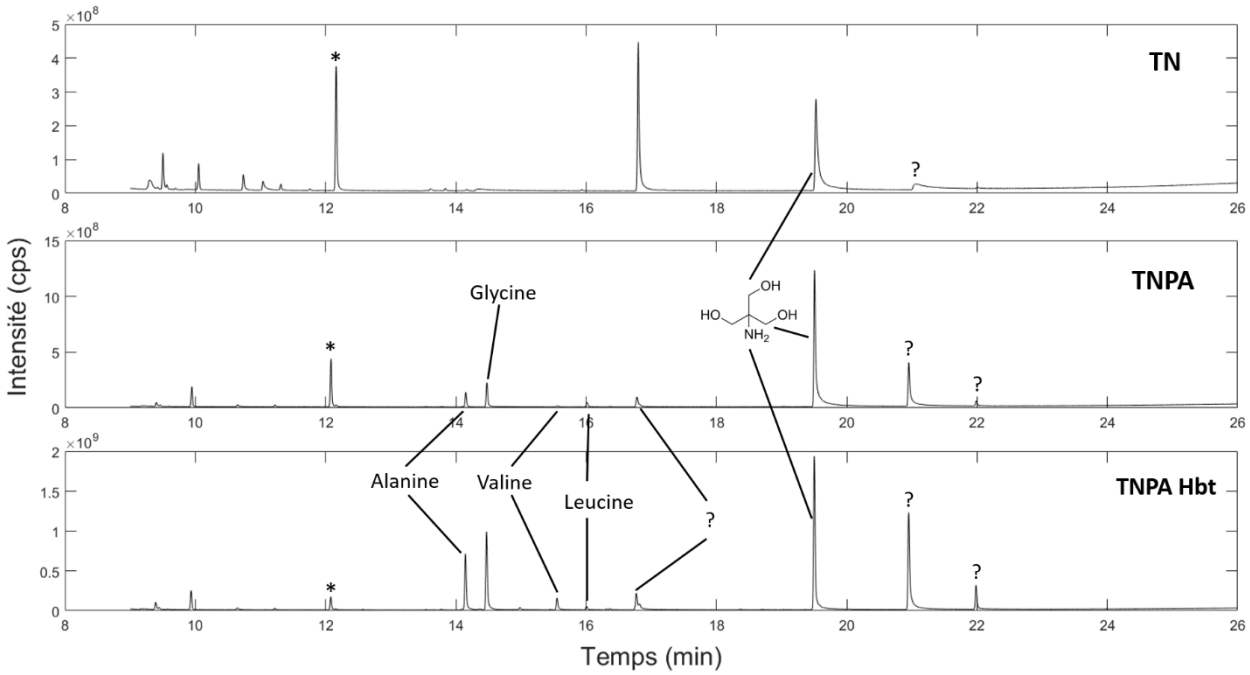


Figure 4 : Chromatogrammes (TIC) des échantillons (haut) TN, (milieu) TNPA et (bas) TNPA Hbt après leur dérivatisation au MTBSTFA dilué dans du DMF. (*) Co-produit MTBSTFA. (?) Les molécules n'ont as pu être identifiées. Toutes les molécules identifiées ont été détectées sous leur forme dérivatisée.

De futures expériences seront donc nécessaires pour essayer de comprendre pourquoi des composés lipidiques ou relatifs à l'ADN ne sont pas détectés. Différents protocoles de dérivatisation pourront être employés en modifiant la température pour voir si cela permet la lyse cellulaire et donc le relargage du contenu organique intracellulaire. De plus, une étude récente a été menée dans l'équipe de chromatographie spatiale du LATMOS, pour évaluer l'impact des sels de chlorure sur la dérivatisation au MTBSTFA de molécules organiques et devrait être publiée sous peu. Ainsi, des éléments de réponses pourront être apportés quant à ces hypothèses.

3.2.2. Dérivatisation avec le DMF-DMA

La comparaison des chromatogrammes des différents échantillons (TN, TNPA et TNPA Hbt) après leur dérivatisation au DMF-DMA est présentée Figure 5.

La dérivatisation au DMF-DMA de l'échantillon TN, tout comme celle au MTBSTFA-DMF, ne présente que très peu de pics, les contaminations provenant de l'halite seule ne sont donc pas nombreuses. En revanche, la dérivatisation de l'échantillon TNPA (halite + milieu de culture), montre de très nombreux pics parmi lesquels des acides aminés (la leucine, l'acide glutamique, la phénylalanine, la lysine et l'ornithine), ainsi que des molécules supposées aliphatiques. Les acides aminés, comme explicité précédemment pour la dérivatisation au MTBSTFA-DMF, proviennent de la peptone oxoid qui est un constituant du milieu de culture. Certains de ces acides aminés sont également retrouvés dans l'échantillon TNPA Hbt, ce qui ne permet pas de savoir si une partie de ces acides aminés provient de la souche *Halobacterium salinarum*. Le milieu de culture employé ici

représente également, pour la dérivatisation au DMF-DMA, un biais analytique qui empêche l'exploitation des résultats pour les molécules détectées.

Un aspect supplémentaire à souligner est la présence d'un plus grand nombre de pics chromatographiques pour l'échantillon TNPA que pour l'échantillon TNPA Hbt. C'est pourtant l'inverse qui était attendu du fait de la présence de la souche d'archée halophile dans l'échantillon TNPA. C'est une observation qu'il reste à explorer, mais des contaminations lors de la synthèse des échantillons pourraient expliquer ces observations.

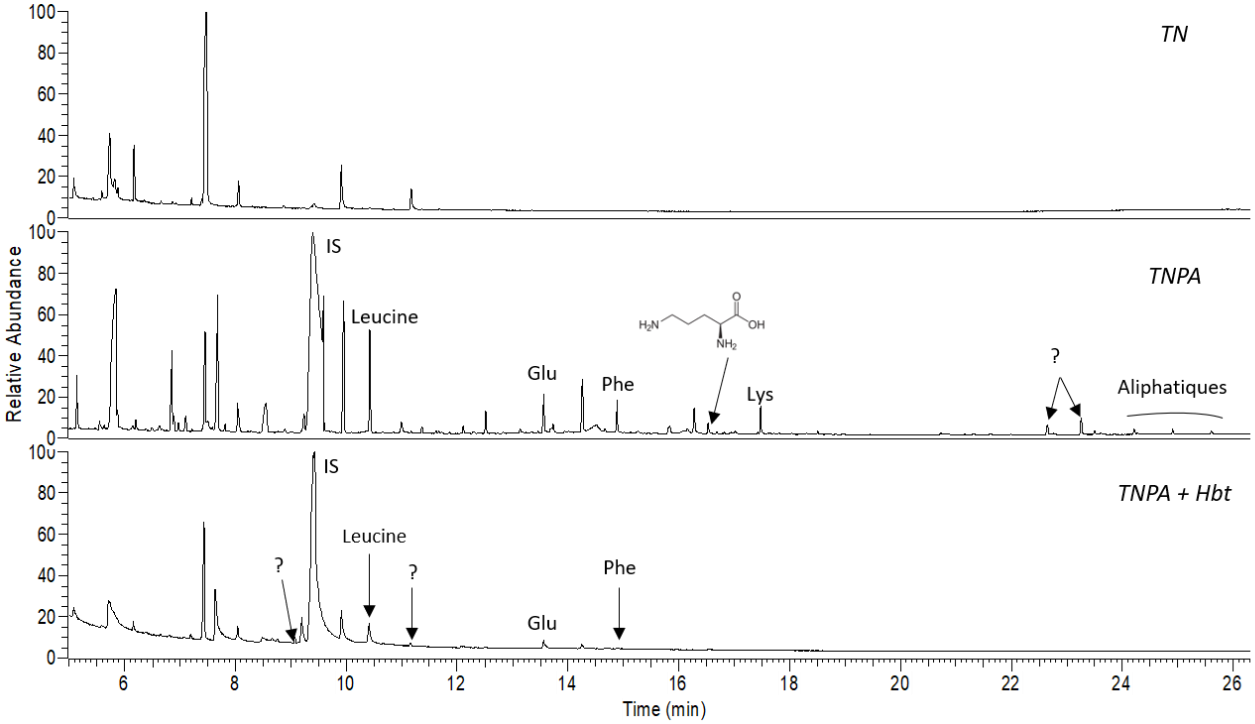


Figure 5 : Chromatogrammes (TIC) des échantillons (haut) TN, (milieu) TNPA et (bas) TNPA Hbt après leur dérivatisation au DMF-DMA. (IS) Etalon interne (?) Les molécules n'ont pas pu être identifiées. Toutes les molécules identifiées ont été détectées sous leur forme dérivatisée hormis les molécules annotées par la mention « aliphatiques ». Ces dernières présentent des schémas de fragmentation typiques de molécules aliphatiques mais leur identification n'est pas possible.

La dérivatisation au DMF-DMA, à l'instar de celle au MTBSTFA, ne semble pas permettre de détecter des composés membranaires ou relatifs à l'ADN contenu dans le milieu intracellulaire au sein des cellules d'archées. Ainsi, le protocole de dérivatisation employé (145 °C pendant 3 minutes) ne semble pas permettre de lyser la paroi cellulaire des archées. Des analyses supplémentaires en optimisant le protocole de dérivatisation semblent requises pour tenter de lyser les cellules pour accéder au contenu intracellulaire. Ainsi, il sera possible de savoir quelles molécules sont détectables en dérivatisation CPG-SM parmi celles contenues dans une cellule.

3.3. Thermochimiolyse-CPG-SM

La comparaison des chromatogrammes des différents échantillons (TN, TNPA et TNPA Hbt) après leur thermochimiolyse au TMAH est présentée Figure 6.

La thermochimiolyse de l'échantillon TN donne des pics intenses avant 10 minutes et très peu après, ne contaminant très peu que les parties du chromatogramme d'intérêt avec cette méthode de préparation d'échantillon. En effet, cette méthode cible des macromolécules donc des composés lourds qui seront logiquement élués après 10 minutes d'analyse avec les conditions opératoires utilisées. L'analyse de l'échantillon TNPA montre un nombre plus important de pics que l'échantillon TNPA Hbt, comme ce qui était observé pour la dérivatisation au DMF-DMA. Cela pourrait potentiellement être expliqué par le fait que le milieu de culture est consommé par *Halobacterium salinarum* ce qui diminue le nombre de molécules organiques dans l'échantillon TNPA Hbt. Comme pour la pyrolyse, un tel chromatogramme avec le TNPA complique fortement l'identification de molécules d'intérêt avec l'échantillon TNPA Hbt. De plus, dans l'échantillon TNPA, une molécule correspondant à une cyclisation d'acides aminés est observée (molécule dont la structure est annotée sur la Figure 6) due à la pyrolyse liée à la thermochimiolyse (600 °C)(Moldoveanu 2009). Le milieu de culture employé pour la croissance de *Halobacterium salinarum*, n'est donc pas approprié pour la recherche de composés organiques d'intérêt pour l'exobiologie comme les acides aminés en CPG-SM.

Les seuls composés d'intérêt pour mon étude sont le dihydrophytol (qui a déjà été détecté avec la pyrolyse) et le composé aliphatique dont la structure est précisée sur la Figure 6. Ces deux composés proviennent très probablement de la membrane des archées, ce qui signifie que la thermochimiolyse, comme la pyrolyse et contrairement à la dérivatisation, permet la lyse cellulaire et la fragmentation des parois membranaires.

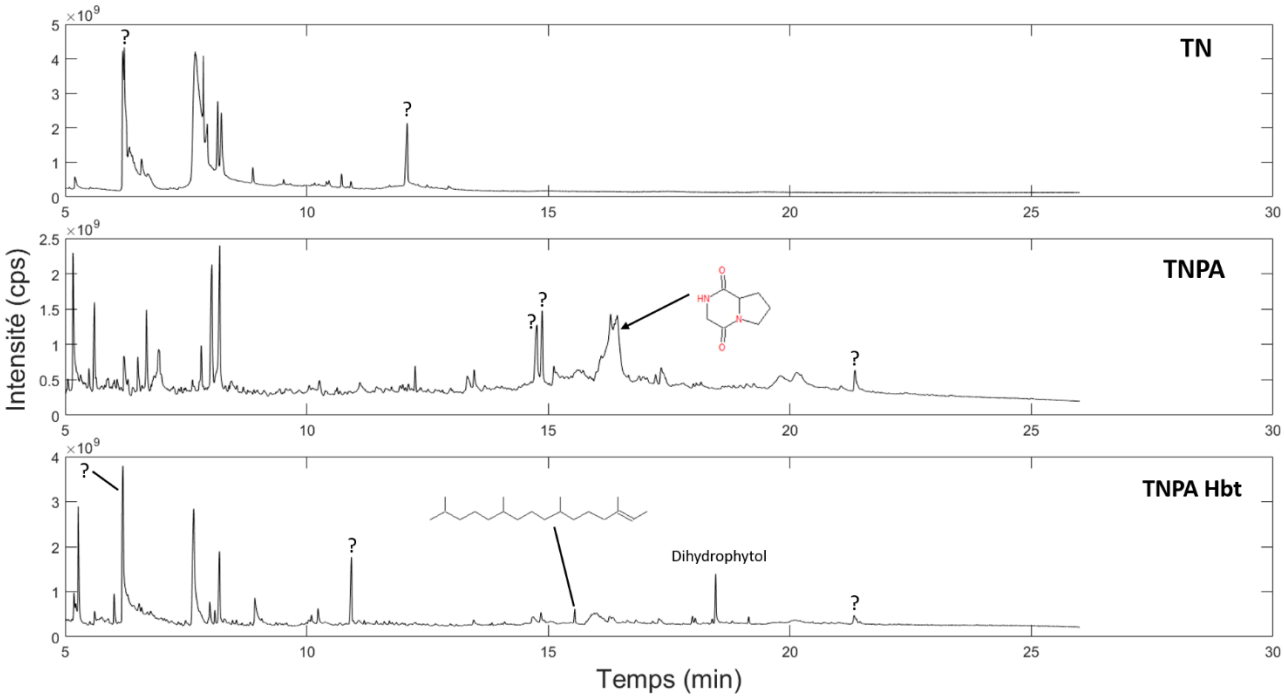


Figure 6 : Chromatogrammes (TIC) des échantillons (haut) TN, (milieu) TNPA et (bas) TNPA Hbt thermochimiolysés au TMAH. (?) Les molécules n'ont pas pu être identifiées. Ces dernières présentent des schémas de fragmentation typiques de molécules aliphatiques mais leur identification n'est pas possible. Tous les pics n'ayant pas d'annotation ou de « ? » n'ont pas pu être identifiés.

Pour cette méthode de préparation d'échantillons, de futures analyses seront également nécessaires, notamment en optimisant les températures pour tenter de détecter des molécules relatives à l'ADN. En effet, la température employée est trop élevée pour permettre la détection d'acides aminés ou de nucléobases par exemple, et il faut plutôt utiliser des températures avoisinant les 400 °C (température qui suffit à lyser les parois cellulaires) (He 2021).

4. Discussion

L'étude de cristaux d'halite inoculés par la souche *Halobacterium salinarum*, en collaboration avec le Museum National d'Histoire Naturelle, avait pour objectif d'évaluer les capacités de la CPG-SM et des méthodes de préparation d'échantillons associées (pyrolyse, dérivatisation et thermochimiolyse) à détecter et identifier des molécules directement associées à la présence de la souche d'archée. Ces travaux avaient comme intérêt d'être complémentaires de l'étude menée sur les échantillons de Tírez, en analysant des échantillons considérés comme moins complexes (un seul sel et une seule souche) que des échantillons naturels.

Les résultats ont montré que le milieu de culture utilisé dans la synthèse des échantillons pour la croissance de la souche *Halobacterium salinarum* est source de nombreuses contaminations du fait notamment de la présence de peptone dans sa composition. La peptone est un mélange d'acides aminés, qui ont été notamment détectés par la dérivatisation. L'interprétation, quant à la détection de tels acides aminés pouvant provenir de l'archée halophile est donc compliquée à poser.

De plus, les résultats obtenus en pyrolyse et en thermochimiolyse sur l'échantillon contenant seulement l'halite et le milieu de culture montrent de très nombreux pics du fait de la richesse organique du milieu de culture. En effet, avec la température employée pour les deux méthodes, les composés organiques se dégradent aboutissant à la détection de nombreux pics chromatographiques. Par conséquent, la détection et l'identification de molécules associées à *Halobacterium salinarum* est d'autant plus compliquée que de nombreuses coélutions sont observées. Concernant la dérivatisation (MTBSTFA-DMF ou DMF-DMA), seuls les composés provenant de l'échantillon TNPA sont détectées sur l'échantillon TNPA Hbt. Quelle que soit la méthode de préparation d'échantillon utilisée, les résultats montrent que le milieu de culture employé n'est pas compatible avec les méthodes que nous employons pour la détection d'acides aminés.

Toutefois, parmi les molécules d'intérêt en exobiologie, il y a également celles relatives aux parois membranaires (esters et éther de glycérol) et à l'ADN. Concernant les premières d'entre elles, le dihydrophytol a été détecté avec la pyrolyse et la thermochimiolyse, ce qui n'était pas le cas pour la dérivatisation. Cela laisse donc supposer que les deux premières méthodes permettent la lyse cellulaire des parois des cellules d'archée, alors que la dérivatisation ne le permet pas. Cependant, quelle que soit la méthode employée, aucune molécule relative à l'ADN comme les nucléotides, nucléosides ou nucléobases n'ont été détectées (non attendues avec la pyrolyse car composés trop polaires). La température employée pour la pyrolyse et la thermochimiolyse sont trop élevées et engendrent donc une dégradation de ces composés. Concernant la dérivatisation, si celle-ci ne permet pas la lyse cellulaire alors il n'est pas possible d'avoir accès au contenu intracellulaire et donc à ces molécules.

De futurs travaux seront donc nécessaires pour tenter de détecter les molécules relatives à l'ADN mais également de parvenir à lyser les cellules avec les méthodes de dérivatisation employées. Cela passera par l'optimisation des protocoles de dérivatisation, notamment la température et la durée utilisées. Il s'agit de trouver un compromis entre lyse cellulaire et intégrité des composés relargués suite à la lyse pour leur détection. De plus, il serait intéressant de réfléchir à l'utilisation de milieux de culture différents qui n'interfèreraient pas avec la détection des molécules organiques qui nous intéressent. Les coélutions et les contaminations observées avec ces échantillons sont trop importantes pour identifier les composés qui sont ciblés. Ainsi, il est compliqué de pouvoir interpréter les résultats pour émettre des hypothèses voire des conclusions quant à l'impact du sel sur les méthodes de prétraitement d'échantillons couplées à la CPG-SM.

5. Références

Buch A., Morisson M., Szopa C., Millan M., Freissinet C., He Y., Glavin D., Bonnet J.-Y., Coscia D., and Williams A. (2018) Optimization of the TMAH Thermochemolysis Technique for the Detection of Trace Organic Matter on Mars by the SAM and MOMA-Pyr-GC-MS Experiment.49th LPSC Lunar and Planetary Science Conference 2018.

Freissinet C., Buch A., Sternberg R., Szopa C., Geffroy-Rodier C., Jelinek C., and Stambouli M. (2010) Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 731-740.

Freissinet C., Glavin D. P., Mahaffy P. R., Miller K. E., Eigenbrode J. L., Summons R. E., Brunner A. E., Buch A., Szopa C., Archer P. D. and others. (2015) Organic molecules in the Sheepbed Mudstone, Gale Crater, Mars. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 120: 495-514.

Goesmann F., Brinckerhoff W. B., Raulin F., Goetz W., Danell R. M., Getty S. A., Siljeström S., Mißbach H., Steininger H., Arevalo R. D. and others. (2017) The Mars Organic Molecule Analyzer (MOMA) Instrument: Characterization of Organic Material in Martian Sediments. *Astrobiology*, 17: 655-685.

Goesmann F., Rosenbauer H., Roll R., Szopa C., Raulin F., Sternberg R., Israel G., Meierhenrich U., Thiemann W., and Munoz-Caro G. (2006) Cosac, The Cometary Sampling and Composition Experiment on Philae. *Space Science Reviews*, 128: 257-280.

He. (2021) Search for organic compounds with MTBSTFA/DMF derivatization and TMAH thermochemolysis on Mars.

Mahaffy *et al.* (2012) The Sample Analysis at Mars Investigation and Instrument suite. *Space Sci Rev*.

Millan M., Szopa C., Buch A., Summons R., Navarro-Gonzalez R., Mahaffy P., and Johnson S. (2020) Influence of calcium perchlorate on organics under SAM-like pyrolysis conditions: Constraints on the nature of Martian organics. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 125: e2019JE006359.

Moldoveanu. (2009) Pyrolysis of organic molecules applications to health and envrionmental issues.

Moulay V., Freissinet C., Rizk-Bigourd M., Buch A., Ancelin M., Couturier E., Breton C., Trainer M. G., and Szopa C. (2023) Selection and Analytical Performances of the Dragonfly Mass Spectrometer Gas Chromatographic Columns to Support the Search for Organic Molecules of Astrobiological Interest on Titan. *Astrobiology*, 23: 213-229.

Postberg F., Kempf S., Schmidt J., Brilliantov N., Beinsen A., Abel B., Buck U., and Srama R. (2009) Sodium salts in E-ring ice grains from an ocean below the surface of Enceladus. *Nature*, 459: 1098-1101.

Trumbo *et al.* (2022) A New UV Spectral Feature on Europa: Confirmation of NaCl in Leading-hemisphere Chaos Terrain.

Trumbo S. K., Brown M. E., and Hand K. P. (2019) Sodium chloride on the surface of Europa. *Science Advances*, 5: eaaw7123.

Figure supplémentaires relatives au chapitre Annexe sur les échantillons du Museum National d'Histoire Naturelle.

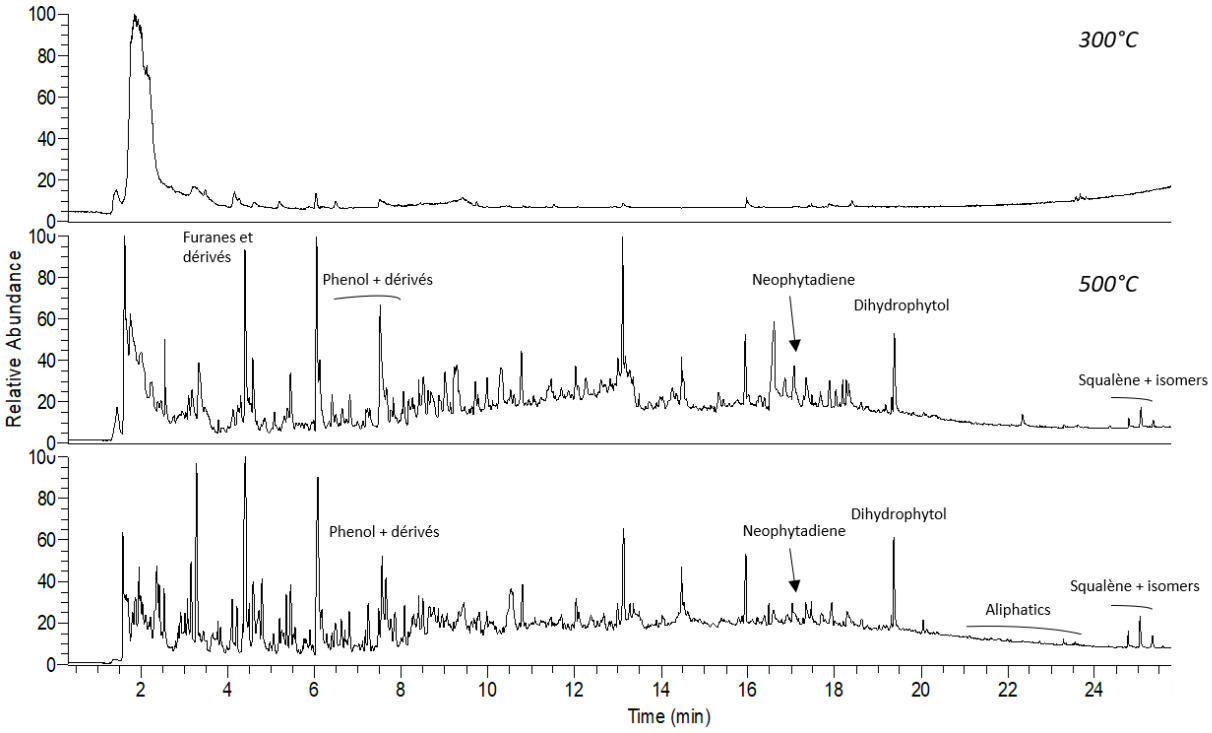


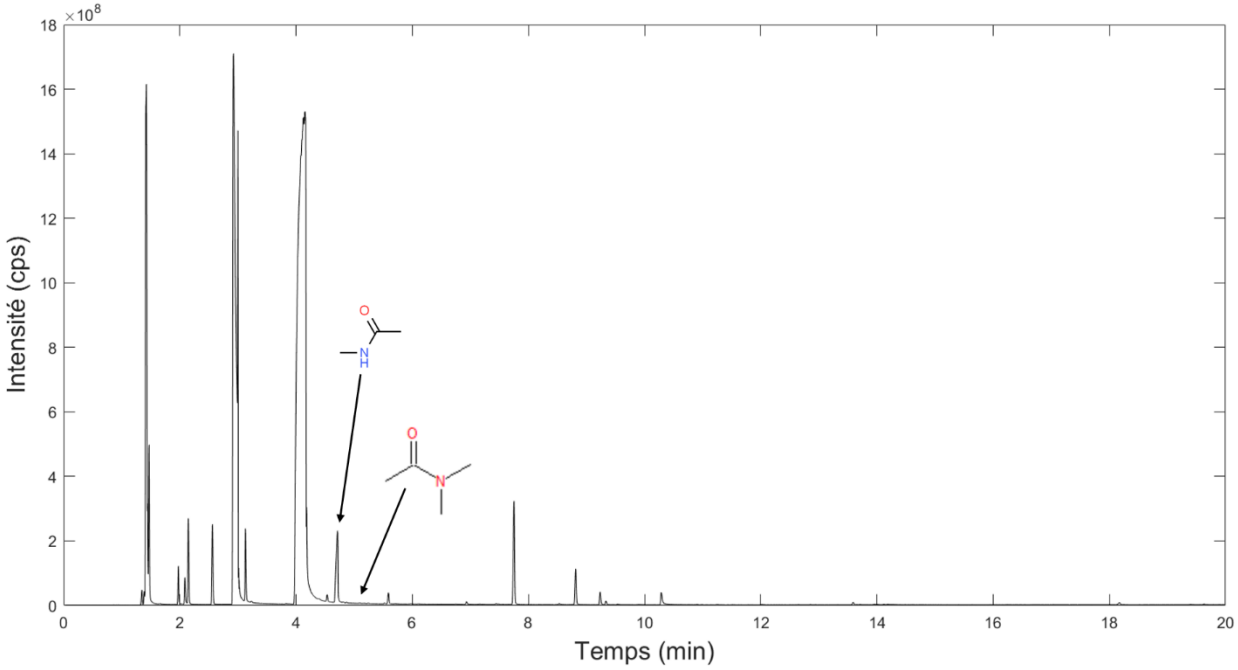
Figure Annexe 1 : Chromatogrammes (TIC) de l'échantillon TNPA Hbt à (haut) 300 °C, (milieu) 500 °C et (haut) 800 °C. Seules les molécules qui ont pu être identifiées ont été annotées. Les nombreuses coélutions empêchent l'identification de tous les pics chromatographiques ne possédant pas d'annotation.

Il y a très peu de molécules qui sont détectées à 300 °C, et aucune identification n'a été possible. En comparant les chromatogrammes à 500 °C et à 800 °C, de nombreuses similarités apparaissent dans la détection de molécules, avec notamment la détection de dihydrophytol, spécifique de la membrane des halophiles (comme déjà explicité dans le chapitre IV). Le squalène et ses isomères sont également détectés à ces deux températures qui sont des triterpènes constitutifs des lipides retrouvés dans les membranes des archées également. Enfin, des dérivés du phénol ainsi que des furanes sont également observés. Ces composés peuvent, respectivement provenir de la dégradation des peptides et des glucides avec la température.

Tout comme pour la pyrolyse rampe, la dérivatisation (DMF-DMA ou MTBSTFA) et la thermochimiolyse au TMAH, il y a de nombreuses molécules identifiées dans l'échantillon TNPA Hbt qui proviennent du milieu de culture et qui sont détectées avec l'échantillon TNPA (donnée non montrée). Ainsi, à l'instar des conclusions posées pour les autres méthodes de préparation d'échantillon, le milieu de culture ici n'est pas approprié aux analyses en CPG-SM que nous utilisons, engendrant un trop grand nombre de coélutions et des contaminations qui correspondent à des molécules pouvant être d'intérêt dans le cadre de notre étude (tels que les produits de dégradation des acides aminés par exemple).

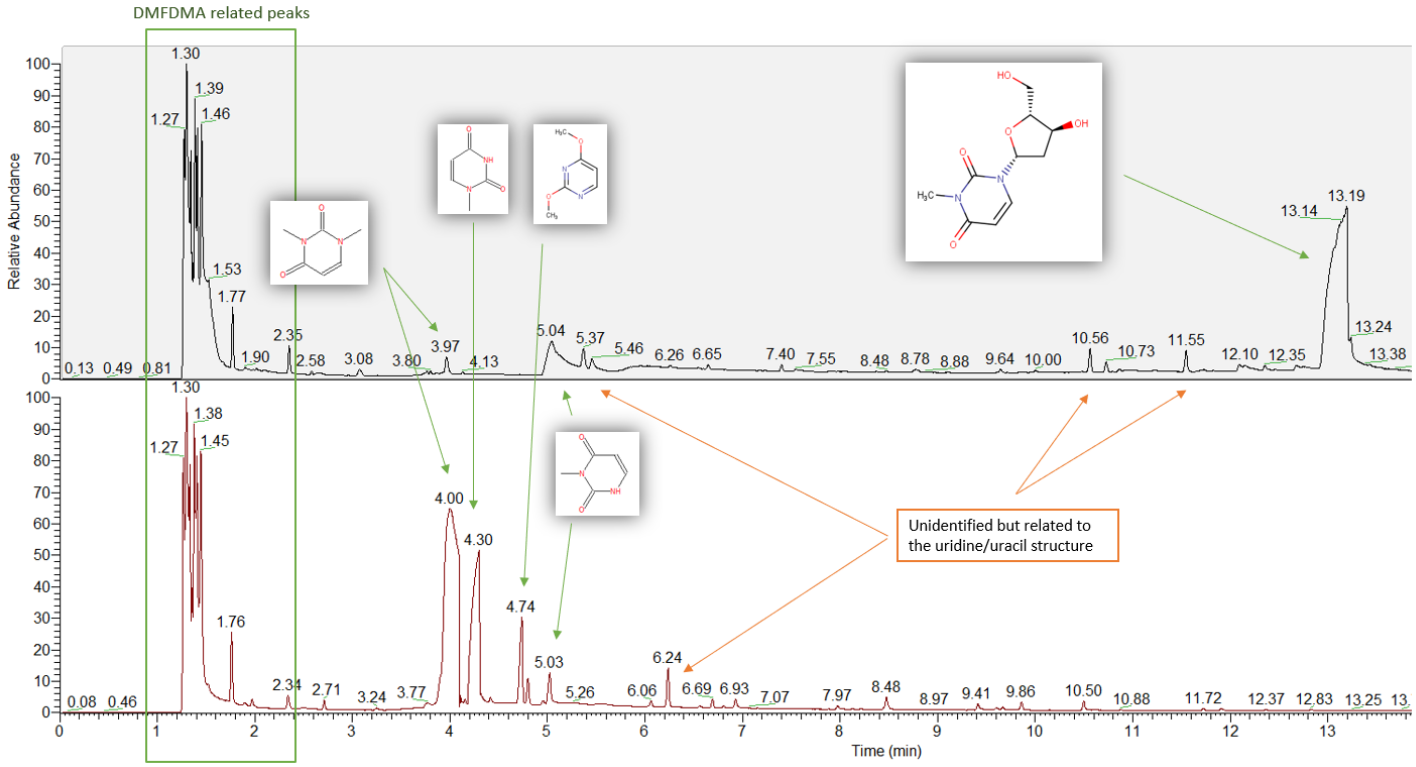
Annexes relatives au Chapitre II – Étude de la dérivatisation au DMF-DMA de composés azotés

Annexe-II-1 : Seconde analyse de la dérivatisation au DMF-DMA de la N-méthylacétamide (amide secondaire). Le chromatogramme a été obtenu à partir du signal TIC. Les pics non annotés correspondent aux co-produits du DMF-DMA



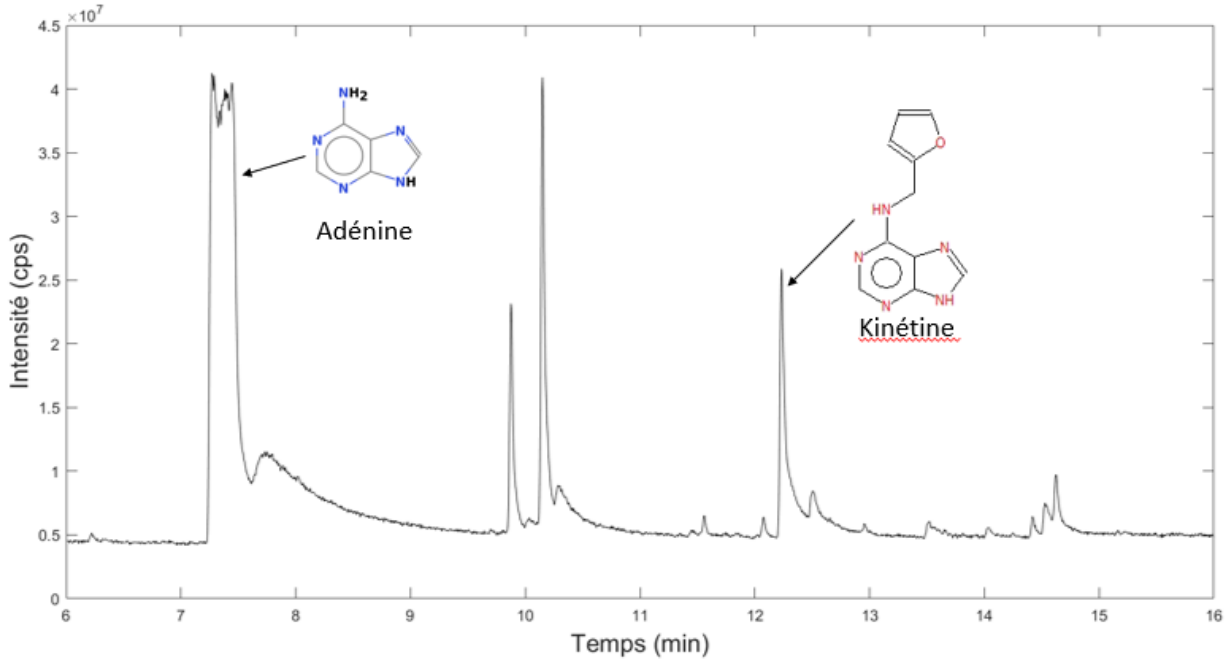
Contrairement à la Figure II-9, les formes avec un carbone supplémentaire et la forme diméthylformamidinée ne sont pas observées. En revanche, la forme méthylée de la N-méthylacétamide est identifiée bien que très proche du bruit de fond. À noter que ce n'est pas le même programme de température qui a été utilisée (température de départ de 40 °C ici), mais cela ne devrait pas impacter sur les formes dérivatisées obtenues.

Annexe II-2 : Dérivatisation de l'uracile et de l'uridine. Crédits : Antoine Palanca



Légende Annexe II-2 : Chromatogrammes (TIC) de (haut) l'uridine et (bas) l'uracile après leur dérivatisation au DMF-DMA. Pour l'uridine, le pic à 13,19 min témoigne du succès de la dérivatisation avec ce désoxynucléoside, avec la méthylation de l'amine secondaire de l'uridine. De plus, le pic à 5,04 min sur le chromatogramme de l'uridine montre l'uracile qui a été dérivatisée sur une des fonctions amines secondaires et l'autre (celle impliquée dans la liaison osidique) qui n'a pas été modifiée.

Annexe II-3 : Chromatogramme de l'adénosine triphosphate (ATP) dérivatisée au DMF-DMA.



Légende Annexe II-3 : Chromatogramme (TIC) de l'ATP après sa dérivatisation au DMF-DMA. Les deux seules molécules qui ont pu être identifiées sont l'adénine non dérivatisée et la kinétine. Cette dernière provient potentiellement de la pyrolyse liée à la température utilisée (i.e. 145 °C) pour la réaction de dérivatisation. Aucune molécule identifiée ne permet d'assurer que la dérivatisation au DMF-DMA a fonctionné.

Annexes relatives au Chapitre III – Colonne DraMS

Annexe III-1 : Temps de rétention de chaque standard chimique analysés sur la RTX-5, la RTX-20, la RTX-35, la RTX-1701 et la CP Chirasil-Dex. Les temps morts variant de 2,09 minutes à 2,12 minutes. La notation $C_{X:Y}$ donne le nombre d'atomes de carbone (X) dans la molécule ainsi que le nombre d'insaturations (Y). Comme un GC-FID a été utilisé, certains composes ne peuvent pas être identifies strictement notamment pour le mélange de FAMEs. * Molécules chirales. Le four du CPG a été chauffé de 40 °C (maintenue 2 minutes) jusqu'à 250 °C (RTX) ou 200 °C (CP Chirasil-Dex avec une rampe de 10 °C.min^{-1}. La température maximale a au moins été maintenue 5 minutes ou plus selon la composition des mélanges. Seulement pour le mélange d'amines, la température maximale était de 270 °C.

Famille chimique	Molécule	RTX-5	RTX-20	RTX-1701	RTX-35	ChDex
Alcanes	Octane	6.0	5. 5	5.4	5.1	
	Nonane	7.8	7.3	7.1	6.8	6.6
	Undecane	11.1	10.7	10.4	10.1	9.5
	Dodecane	12.6	12.2	11.9	11.7	10.8
	Hexadecane	17.8	17.4	17.7	16.9	15.4
Nitriles	Butyronitrile	4.1	4.7	5.6	5.0	3.9
	Pentanenitrile	5.7	6.5	7.4	6.8	5.9
	Hexanenitrile	7.5	8.3	9.2	8.6	7.7
	Heptyl cyanide	10.9	11.6	12.5	11.8	10.4
	Nonanenitrile	12.5	13.1	14.0	13.2	11.6
HAPs	Benzene	3.9	4.1	4.1	4.2	4.0
	Pyridine	5.1	5.8	6.1	6.1	5.3
	Naphthalene	12.7	13.5	13.5	13.9	11.5
Amines (Non-dérivatisées)	Butylamine	3.6	3.6	3.8	3.6	
	Pyridine	5.1	5.8	6.1	6.1	
	Hexylamine	6.8	6.9	7.0	6.8	
	Octanamine	10.3	10.4	10.5	10.2	
	Decanamine	13.4	13.5	13.5	13.3	

	Tetradecanamine	18.5	18.5	18.5	18.3	
	Hexadecanamine	20.7	20.7	20.7	20.5	
	Octadecanamine	22.7	22.7	22.6	22.5	
	Didecanamine	23.5	23.4	23.2	23.0	
Amines (Dérivatisées avec le DMF-DMA)	Butanamine derivatisée	9.5	9.8	9.8	9.9	7.9
	Hexanamine derivatisée	12.7	12.9	12.8	12.9	10.7
	Octanamine derivatisée	15.4	15.6	15.4	15.6	13.2
	Decanamine derivatisée	17.9	18.0	17.8	17.9	15.4
	Tetradecanamine derivatisée	21.9	22.2	22.0	22.1	25.1
	Hexadecanamine derivatisée	23.9	24.1	23.8	23.9	
	Octadecanamine derivatisée	26.3	25.8	25.6	25.6	
	2-aminopentane*					7.6
						7.7
	2-aminoheptane*					10.3
						10.3
Acides aminés (Dérivatisés au DMF-DMA)	DL - Serine derivative	9.7	10.9	11.6	11.4	
	DL – Alanine derivative	12.9	13.7	13.9	14.1	
	DL- Leucine derivative	15.1	15.9	16.1	16.2	
	DL- Glutamic acid derivative	18.3	19.4	19.9	20.0	
	DL Lysine derivative	22.1	23.4	23.5	24.0	
	Methyl butyrate	4.8	5.0	5.2	5.0	4.5
	Methyl hexanoate	8.2	8.5	8.7	8.5	7.5

	Methyl octanoate	11.5	11.8	11.9	11.7	10.2
	Methyl decanoate	14.4	14.6	14.7	14.5	12.7
	Methyl undecanoate	15.7	15.9	16.0	15.8	13.8
	Methyle laurate (C_{12})	17.0	17.1	17.2	17.0	14.9
	Methyl tridecanoate	18.0	18.3	18.3	18.1	16.0
	Methyl myristate (C_{14})	19.3	19.4	19.4	19.3	17.1
Fatty acid methyl ester (FAMEs)	Methyl myristoleate ($C_{14:1}$)	19.1	Not detected or coelution	Not detected or coelution	19.2	17.0
	Methyl pentadecanoate	20.3	20.5	20.5	20.4	18.5
	Methyl cis-10-pentadecanoate	20.2	Not detected or coelution	Not detected or coelution	20.3	18.4
	Methyl palmitate (C_{16})	21.4	21.5	21.5	21.5 ?	20.4
	Methyl palmitoleate ($C_{16:1}$)	21.1	21.4	21.4	21.3	20.0
	Methyl heptadecanoate	22.3	22.4	21.4	22.2	23.0
	Cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester	22.1	22.4	22.3	22.2	22.5
	Methyl stearate (C_{18})					
	Trans-9-Elaidic acid methyl ester ($C_{18:1}$)					
	Cis-9-Oleic acid methyl ester ($C_{18:1}$)					
	Methyl linolelaidate ($C_{18:2}$)		From 23.3 to 23.5	From 23.2 to 23.5	23.1 and coelution for the	From 25.2 to 26.7
	Methyl linoleate ($C_{18:2}$)	From 22.8 to 23.3				

Methyl γ-linolenate ($C_{18:3}$)				other peaks ?
Methyl linolenate ($C_{18:3}$)				
Methyl arachidate (C_{20})	24.5			
Methyl cis-11-eicosenoate ($C_{20:1}$)	24.3			
Cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester ($C_{20:2}$)	24.2			
Cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester ($C_{20:3}$)				
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester ($C_{20:3}$)		From 25.5 to 25.8	From 25.3 to 25.8	25.2 and coelution for the other peaks ?
cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester($C_{20:4}$)				
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester ($C_{20:5}$)	23.9			
	23.8			
Methyl heneicosanoate ($C_{21:0}$)	25.5	27.1	27.0	26.6
Methyl behenate ($C_{22:0}$)				
Methyl erucate ($C_{22:1}$)				
cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester ($C_{22:2}$)				

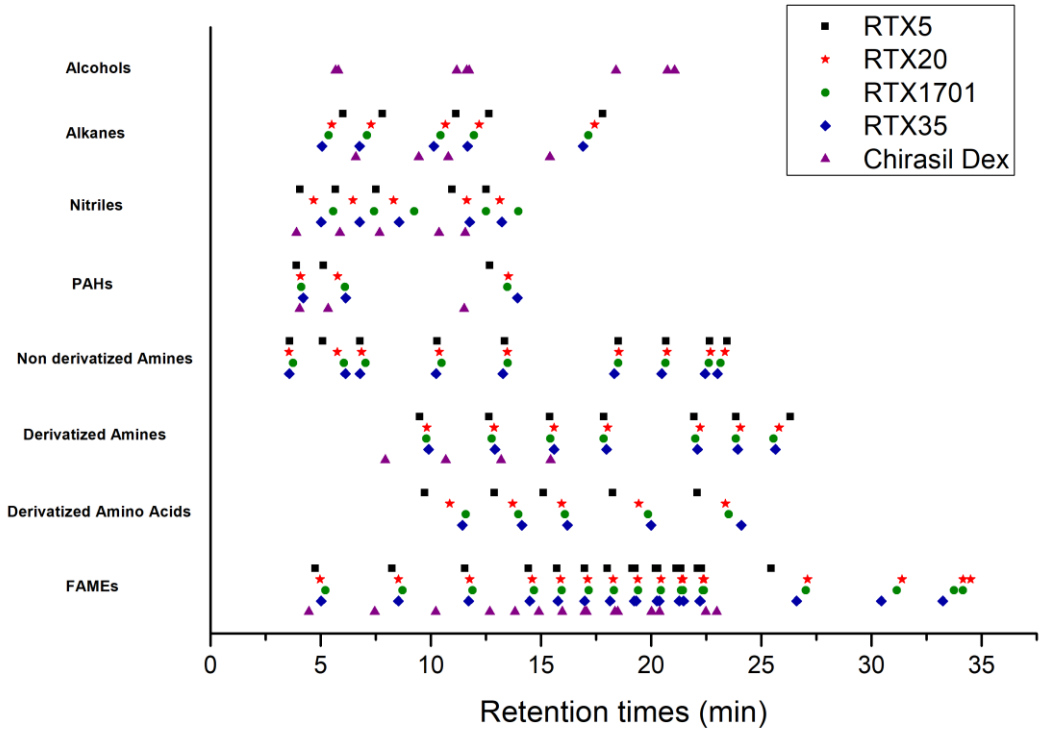
	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester ($C_{22:6}$)	From 26.8 to 28.7	From 28.9 to 29.0	From 28.6 to 28.9	28.3 and coelution for the other peaks ?	
	Methyl tricosanoate (C_{23})	30.9	31.4	31.2	30.5	
	Methyl lignocerate (C_{24})	Not identifiable	34.5	34.2	33.2	
	Methyl nervonate ($C_{24:1}$)	Not identifiable	34.2	33.8	Not identifiable	
	Butan-2-ol*					5.7
						5.8
Alcools	Pentanol					11.2
	Hexan-2-ol*					11.6
						11.7
	Octanol					18.4
	Phenylethanol*					20.7
						21.1

Annexe III-2 : Récapitulatif des paramètres chromatographiques principaux mesurés et calculés pour l'efficacité optimale des différentes colonnes. La valeur de HEPT minimale est déterminée à partir des courbes de Golay Figure III-1. La Vitesse optimal moyenne nommée U est calculée en utilisant la longueur de la colonne ainsi que le temps mort obtenu avec le méthane. Enfin, le débit correspondant à l'efficacité maximale est calculé en multipliant la Vitesse U par la section de la colonne.

Compound		Pentanenitrile		Naphtalène		Acide octanoïque		Décanamine	
Temperéture (°C)		100	150	100	150	100	150	100	150
RTX-5	Minimum HEPT (mm)	0.31	0.37	0.21	0.30	/	/	0.16	0.25
	U ($cm \cdot s^{-1}$)	25.0	28.6	36.8	34.0	/	/	30.9	23.04
	Débit ($mL \cdot min^{-1}$)	0.74	0.84	1.08	1.00	/	/	0.91	0.68

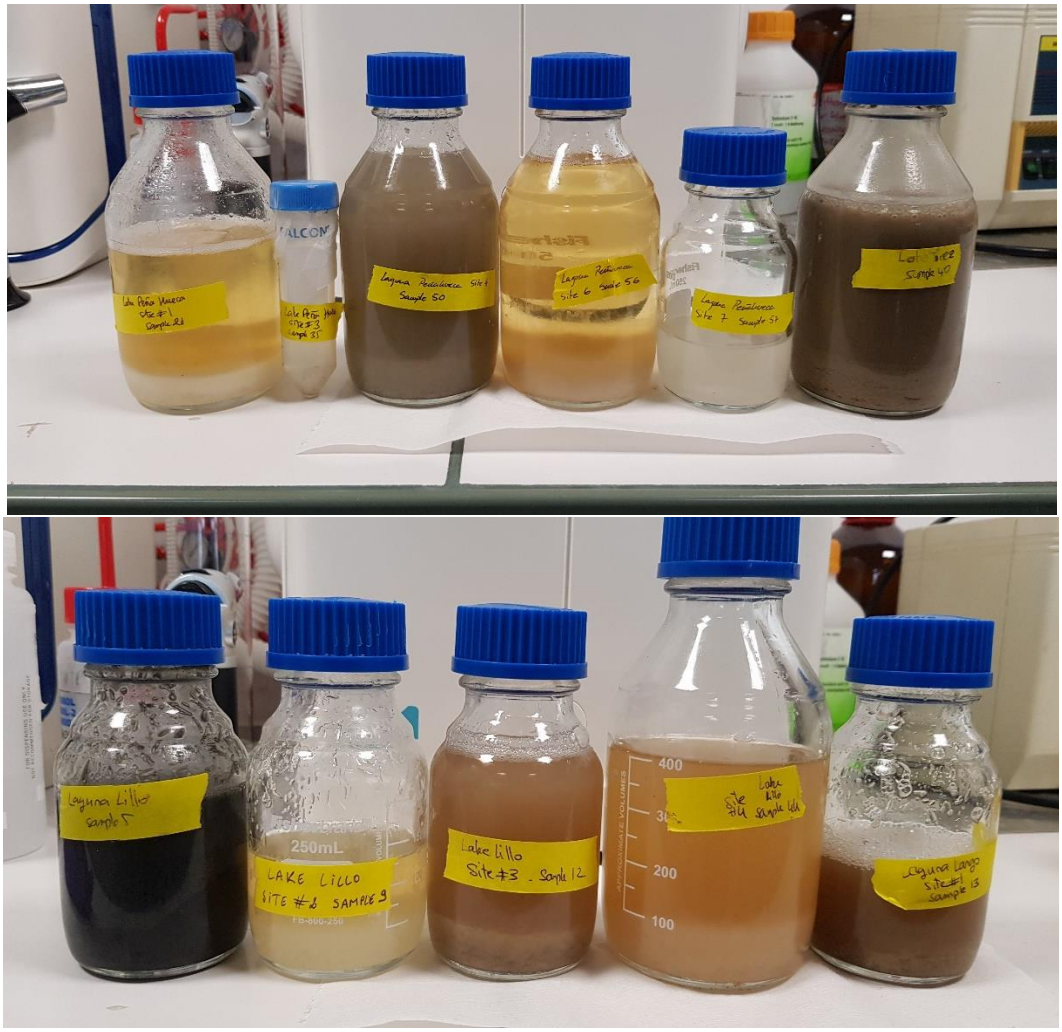
RTX-20	Minimum HEPT (mm)	0.22	0.22	0.23	0.21	/	0.25	/	0.21
	U (cm.s^{-1})	37.9	45.5	37.9	34.9	/	34.9	/	34.9
	Débit (mL·min^{-1})	1.12	1.34	1.12	1.03	/	1.03	/	1,03
RTX-35	Minimum HEPT (mm)	0.31	0.35	0.28	0.26	/	0.31	/	0.26
	U (cm·s^{-1})	31.3	28.9	31.3	34.2	/	23.4	/	28.9
	Débit (mL·min^{-1})	0.92	0.85	0.92	1.01	/	0.69	/	0.85
RTX-1701	Minimum HEPT (mm)	0.30	0.37	0.23	0.26	0.28	0.30	0.21	0.21
	U (cm·min^{-1})	25.8	29.3	38.3	29.3	38.3	34.9	32.3	34.9
	Débit (mL·min^{-1})	0.76	0.86	1.13	0.86	1.13	1.03	0.95	1.03
						Derivatized octanoic acid		Derivatized hexylamine	
Chirasil-Dex	Minimum HEPT (mm)	0.29	0.92	0.30	0.49	0.33	0.42	0.36	0.39
	U (cm·s^{-1})	21.93	20.13	21.93	20.13	21.93	20.13	29.14	20.13
	Débit (mL·min^{-1})	0.65	0.59	0.65	0.59	0.65	0.59	0.86	0.59

Annexe III-3 : Séparation et rétention d'un grand nombre de standards chimiques provenant de différentes familles avec les colonnes RTX et la colonne chirale de DraMS-GC (CP ChirasilDex).


RTX5
RTX20
RTX1701
RTX35
Chirasil Dex
Alcohols
Alkanes
Nitriles
PAHs
Non derivatized Amines
Derivatized Amines
Derivatized Amino Acids
FAMEs
0
5
10
15
20
25
30
35
Retention times (min)

Annexes relatives au Chapitre IV - Étude des échantillons Tírez.

Annexe IV-1 : Images des différentes échantillons collectés qui ont été étudiés dans cette étude.



Légende : De gauche à droite : Peña Hueca S21, Peña Hueca S35 (Tube Falcon), Peña Hueca S50, Peña Hueca S56, Peña Hueca S57, Tirez S40, Longar S5, Longar S9, Longar S12, Longar S44 et Larga S13. Sur les étiquettes des bouteilles apparaissent pour certains échantillons « Laguna Lillo ». Cette lagune correspond à la lagune del Longar.

Annexe IV-2 : Estimation de la fraction solide des échantillons liquides

La masse solide présente dans certains des échantillons aqueux collectés (ceux répertoriés dans le Tableau IV-1) a été mesurée pour un volume de solution donné. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IV-2. Il faut souligner que ces résultats ne permettent que d'avoir un ordre de grandeur de la masse solide présente dans les échantillons. En effet, l'évaporation d'échantillon (flux de N_2 et chauffage à 50 °C) hypersalin est une étape qui est laborieuse du fait de la présence de grandes quantités de sels qui piègent des résidus d'eau. Dans la pesée de la masse solide il y a donc une contribution de ces derniers qu'il est très complexe d'éliminer définitivement.

Tableau IV-2 : *Proportion de masse solide (sels et sédiments) dans les échantillons aqueux des différentes lagunes échantillonnées.*

Echantillon	Masse de 150 µL (mg)	Masse de solide après évaporation (mg)	Pourcentage de masse solide
Lagune del longar Sample 5	205,8	132,1	64,2 %
Lagune del Longar Sample 9	177,5	116,9	65,9 %
Lagune del longar Sample12	203,33	143,3	70,5 %
Lagune del longar Sample 44	176,4	122,2	69,3 %
Lagune Larga S.13	179,1	109,4	61,1 %
Lagune de Peña Hueca Sample 21	198,5	166,9	84,1 %
Lagune de Peña Hueca Sample 35	186,3	82,7	44,4 %
Lagune de Peña Hueca Sample 50	181,4	150,1	82,7 %
Lagune de Peña Hueca Sample 56	192,1	162,2	84,4 %
Lagune de Peña Hueca Sample 57	188,1	87,9	46,7 %
Lagune de Tirez Sample 40	200,1	142,9	71,4 %

En estimant la masse solide dans les échantillons aqueux, il apparaît que celle-ci semble constituer la majeure partie des échantillons quelle que soit la lagune de provenance, même si une contribution de l'eau (difficile à estimer) est à considérer dans la masse pesée. Pour deux des

échantillons de la lagune de Peña Hueca (n°21 et n°35), la proportion de solide dans les échantillons dépassent même les 80 %. Selon la nature des échantillons (Tableau IV-1), cette masse solide est constituée par des sels et/ou des sédiments, ce qui peut également expliquer des différences d'un échantillon à l'autre, même au sein d'une même lagune.

Annexe IV-3 : Courbes de calibration des ions chlore et sulfates pour l'analyse par chromatographie ionique

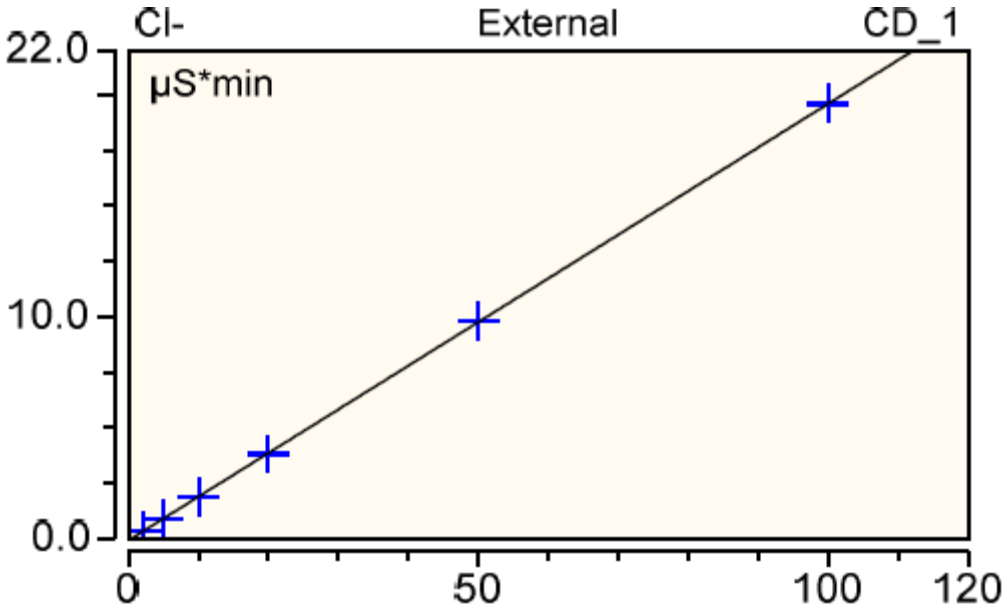


Figure 1 : Courbe de calibration des ions chlore pour l'analyse en chromatographie ionique. La mesure en intensité a été effectuée pour 6 concentrations différentes en ions chlore.

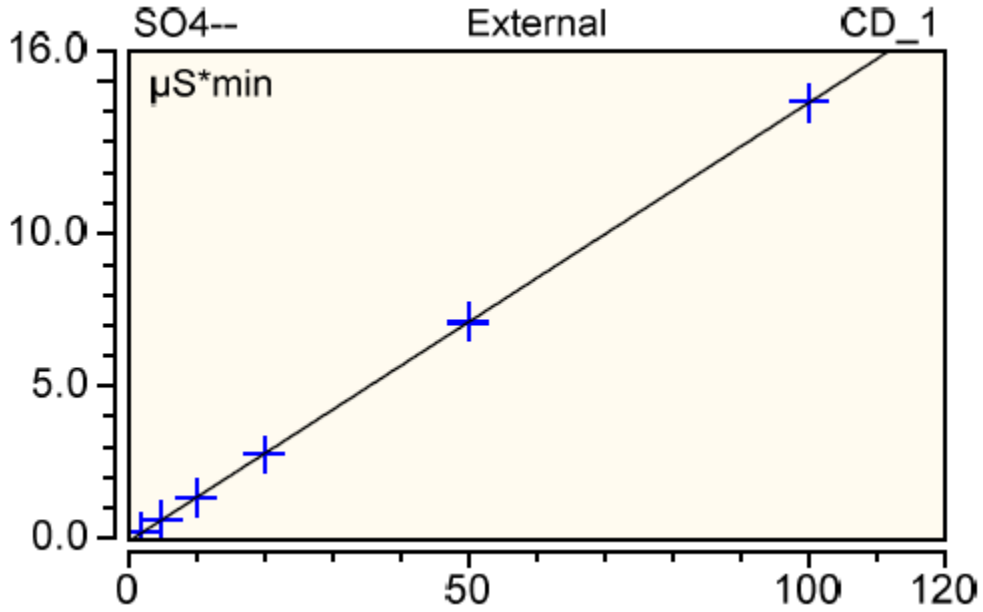
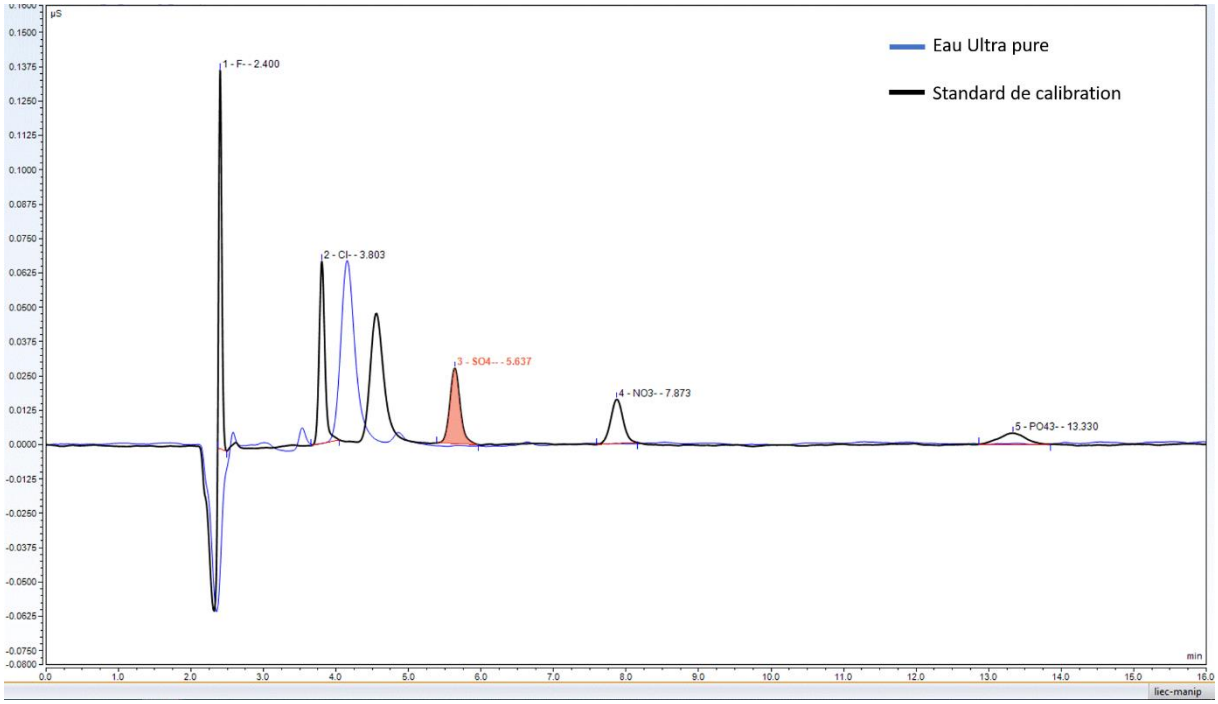
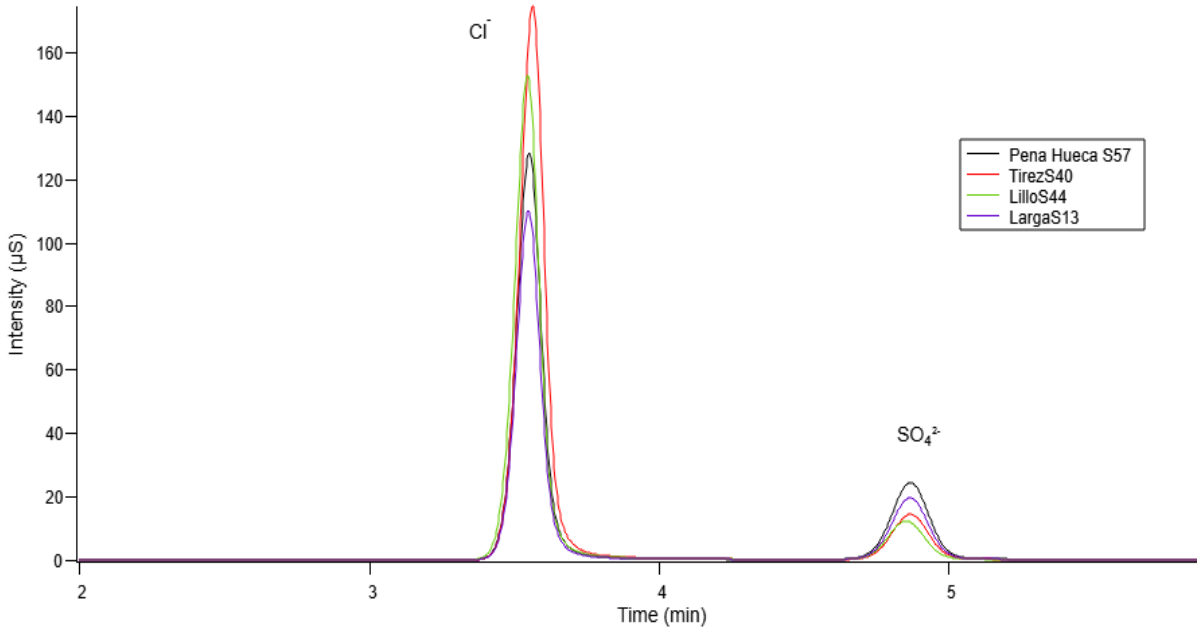


Figure 2 : Courbe de calibration des ions sulfate. La mesure en intensité a été effectuée pour 6 concentrations différentes en ions sulfates.

Annexe IV-4 : Comparaison blanc (eau ultra pure) et standards de calibration en chromato ionique

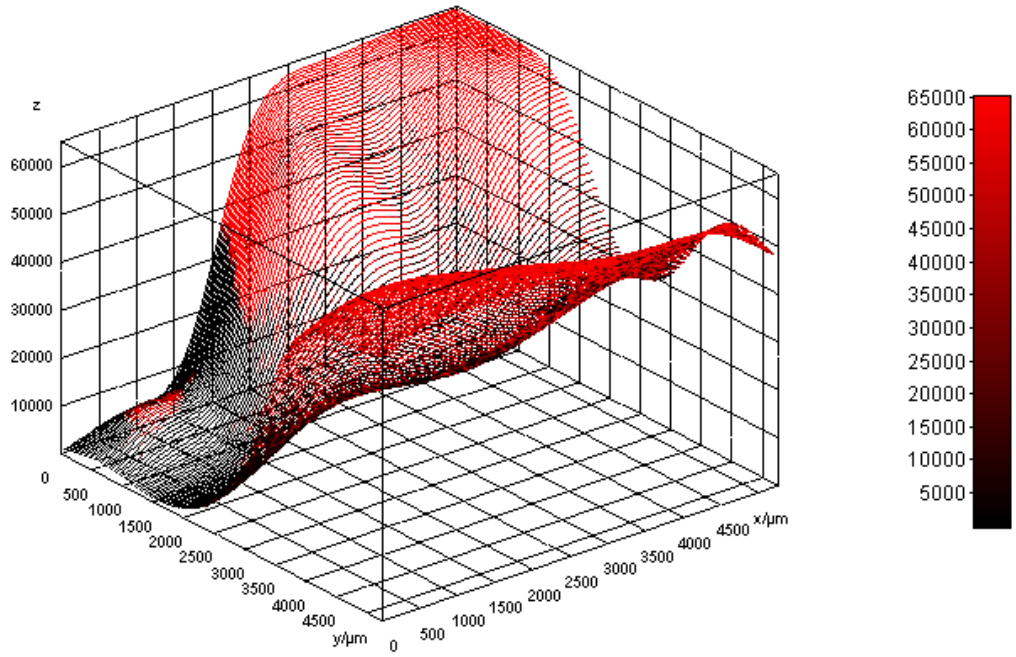


Annexe IV-5 : Comparaison de quatre échantillons provenant chacun d'une lagune du système Tírez.



Légende : Superposition des chromatogrammes des ions chlorure et sulfate pour quatre échantillons du système lacustre de Tírez, chacun provenant d'une lagune différente. L'intensité mesurée (en µS) est directement proportionnelle à la quantité d'ions présents dans l'échantillon.

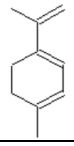
Annexe IV-6 : Topographie de l'échantillon de la lagune del Longar (n°5) sur la lame pour la microscopie confocale.

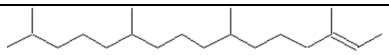


Légende : Topographie de l'échantillon n°5 de la lagune del Longar obtenue en microscopie confocale. L'unité de l'axe est le µm comme pour l'axe de abscisses et des ordonnées.

Annexe IV-7 : Tableau des temps de rétention de la pyrolyse de l'échantillon N°5 de la lagune del Longar

RT	Compounds
1,84	SO_2
2,30 → 2,77	HCl
2,94	2,5 – Dimethylfuran
3,45	Toluène
3,50	2-methylthiophène
3,96	Cyclotrisiloxane hexamethyl
4,36	2-methylthiophane
4,50	Ethylbenzene
4,59	1,3 – Dimethylbenzene
4,90	Benzene avec methylation différente
5,05	Acetylfuran
5,38	?
5,52	2-cyclopenten-1-one, 3,4 dimethyl
5,85	5-methyl-2-furanaldehyde
5,96	Mesitylène or isomer
6,14	Benzene 1-ethyl-2methyl

6,25	Cyclotetrasiloxane octamethyl
6,34	Benzene 1-ethyl-3methyl
6,58	?
6,66	Toluène-p-chloro
6,79	1,2,3 Trimethylbenzene
7,01	Benzocyclopentane
7,10	Benzeneacetaldehyde
7,15	3-methylphenylacetylene
7,22	2-methylphenol
7,29	?
7,37	?
7,53	Phenol-4-methyl
7,57	
7,70	?
7,76	
7,82	Undecane
7,94	? M = 267 et 285
8,03	?
8,09	2-methylbenzofuran
8,18	P-xylène-2-ethyl
8,24	Benzene 1,2,4,5 tetramethyl
8,55	Idem pyro 800
8,64	Phenol 2,5 dimethyl
8,71	Indene 1-methyl
8,80	Naphthalene 1,2 dihydro
8,91	?
9,17	1-Dodecene
9,27	Naphthalène coélué
9,40	Idem pyro 800
9,74	?
10,01	Benzenepropanenitrile
10,57	?
10,82	Naphthalene methylated
10,97	Idem 11,00 in pyro 800
11,07	Idem 11,08 in pyro 800
11,90	Idem 11,93 in pyro 800
12,16	Dodecanal
12,28	Naphthalène 1,7 dimethyl
12,48	Naphthalène 1,7 dimethyl
12,53	Naphthalène 2,7 dimethyl
12,94	?
13,12	? (composé silicié)
13,17	Cycloheptasiloxane tetradeamethyl
13,24	Pentadecane
13,63	Hexathiane
14,35	1-Hexadecanol

14,42	Hexadecane
14,63	?
14,96	Silice compound
15,14	Cyclooctasiloxane hexadecamethyl
15,33	8-Heptadecene
15,48	Heptadecane
15,55	
15,98	?
16,01	Aliphatic probably
16,28	?
16,50	
16,72	Hexadecane ramifié
16,86	?
16,97	Idem pyro 800
17,10	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl-,
17,57	Idem 17,61 pyro 800
17,71	Hexadecanitrile
18,12	Silice
18,37	Silice
18,76	Phytol
19,33	Chlorooctadecane
19,56	Octathiane
19,76	Bleeding
19,88	Cycle soufré ramifié ?
20,12	Idem 19,88, isomer ?
20,33	Idem 20,38 pyro 800
21,02 et 22,18	Bleeding
22,87	Aliphatique
22,98 ; 23,63 ; 24,36 ; 25,76	Alpihatique

Annexe IV-8 : Tableau des temps de rétention et des composés correspondants de al thermochimiolyse au TMSH de *Chroococcidiopsis cubana*

Tableau temps de rétention de la thermochimiolyse au TMSH pyrolyse 600 des cyanobactéries,

RT	Compounds
Premiers pics : 1,53 → 1,94	Probablement des pics liés au TMSh car différents du TMAH avec du soufre,
2,52	Isovaleronitrile
2,56	?
2,68	?
2,82	Toluene
3,11	? (pyro probablement)
3,19	3-Furaldehyde
3,39	Furfural
3,46	Valeronitrile 4-methyl
3,50	Pyrrole 2-methyl
3,65	2-furanmethanol
3,71	?
3,78	p-xylene
4,06	Styrene
4,20	Methyl methylthioacetate
4,27	Acetylfuran
4,33	?
4,39	?
4,62	?
4,86	?
5,02	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-
5,16	?
5,35	Idem TMAH
5,86	
5,98	Idem TMAH à 5,95, furan derivative
6,17	Idem TMAH but unidentified
6,37	Phenol 2 methyl
6 ;69	Idem TMAH, p-cresol
7,86	?
8,04	Phenol 4-ethyl
8,64	?
8,83	?
8,93	Benzofuran
9,57 ; 9,68 ; 9,82	Idem TMAH
9,99 ; 10,13	?
10,55	Idem TMAH, Trimethyl naphthalene (ionene)
11,04	Indole derivative, idem TMAH
10,91 ; 11,39 ; 11,45	?
11,56 ; 11,65 ; 11,83	Idem TMAH
11,78	Aliphatic probably an alkane

12,18	?
12,27	Pentadecane
12,47	?
12,54	?
12,71	?
13,02	?
13,10	?
13,38	?
13,47	Hexadecane potentiellement
13,72	?
13,94	?
14,00	?
14,28	?
14,67	Heptadecane
14,92	?
15,10	Heptadecane 7 methyl
15,12	Heptadecane avec ramification différente
15,47	?
15,54	Aliphatic ramifié mais pas simple à identifier
15,63	?
16,02	Aliphatic C_{20} potentiellement
16,12	Phytol acetate
16,16	Spectre très proche de 16,02 donc quelque chose de similaire
16,34	?
16,54	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
16,76	Hexadecanenitrile
16,98	Palmitic acid deriv
17,42	Palmitoleic acid
17,65	Palmitic acid non deriv
18,13	?
18,31	?
18,67	Linolenic acid methyl ester
18,73	Octadecanenitrile poss
18,78	Phytol
19,25	Linolenic acid non deriv
19,38	?
19,56	Palmitamide
19,77	?
19,95	?
20,01	?
20,13	?
21,01	?
21,08	Unsaturated fatty acids ethyl ester probable
21,25	Octadecanamide
21,42	?
21,86	?
22,01	Glycerol 1 palmitate
22,10	?
22,25	2-Monopalmitin

22,39	?
22,94	?
23,43	Unsaturated fatty acid
23,67	Pourrait être comme le 2-monopalmitin mais avec un acide gras plus long,
25,46	?
26,20	γ-tocopherol
26,91	Vitamine E ou α-tocopherol
29,09	?
32,33	?
32,57	?
35,31	?