AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

107 141 . b 107141 ~~S/Mz 96/88~~

THESE

présentée

A l'UNIVERSITE DE METZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ

Spécialité : Chimie-Physique

par

Sandrine PETER

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19960765
Cote S/Mz 96/38
Loc Magasin

Etude des mécanismes de la pyrolyse flash et de la pyrolyse laser par spectrométrie de masse : application aux polymères synthétiques et naturels

Soutenue le 14 novembre 1996 devant la commission d'examen :

Président de Jury	**Jean François MULLER**, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de Thèse
Rapporteurs	**Yannik HOPPILLIARD**, Directeur de Recherche à l'Ecole Polytechnique, Palaiseau
	Raymond HOURIET, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne
Examinateurs	**Daniel BURNEL**, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université Henri Poincaré, Nancy
	Jean-Claude BLAIS, Chargé de Recherche à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Eric POITEVIN, Docteur, Ingénieur de Recherche et Développement, Société Vittel

AVANT PROPOS

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'université de Metz que dirige Monsieur le Professeur Jean François Muller.

Je lui exprime ici ma sincère gratitude pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour l'intérêt qu'il a témoigné à cette étude, les moyens matériels qu'il a mis à ma disposition et de m'avoir permis, grâce à ses conseils, de mener à bien ce travail. Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'adresse mes respectueux remerciements à Madame Yannick Hoppilliard, Directeur de Recherches au CNRS à l'Ecole Polytechnique de Paris et à Monsieur Raymond Houriet, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail en acceptant d'être rapporteurs.

Que Messieurs le Professeur Daniel Burnel, à la Faculté de Médecine de Nancy-Vandoeuvre, le Docteur Jean Claude Blais, Chargé de Recherches au CNRS à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris et le Docteur Eric Poitevin, Ingénieur de Recherche et Développement de la société Vittel soient remerciés pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont aussi Monsieur Lionel Vernex-Loset pour sa collaboration et sa complicité sans faille tout au long de ces quatre années, nos discussions et son aide à la rédaction de cet ouvrage.

Que Monsieur Adam Hachimi reçoive tous mes remerciements pour son soutient moral et scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame Martine Flerès pour sa gentillesse sans égale, sa bonne humeur et ses compétences de coordinations.

Merci à tous mes collègues qui ont contribué à maintenir une ambiance chaleureuse et bon enfant au sein du laboratoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION i

1. LA PYROLYSE THERMIQUE 1

1.1. GENERALITES 1
1.2. MECANISMES DE DEGRADATION 2
1.2.1. LA COUPURE ALEATOIRE DE LA CHAINE PRINCIPALE 2
1.2.2. LA DEPOLYMERISATION 3
1.2.3. LES REACTIONS DES GROUPES LATERAUX 3
1.2.4. LES FORCES RELATIVES DES LIAISONS 4
1.3. INSTRUMENTATION ET ANALYSES 5
1.3.1. PYROLYSE PAR FOUR 5
1.3.1.1. Instrumentation 6
1.3.1.2. Contrôle de la température 7
1.3.1.3. Avantages de la pyrolyse par four 7
1.3.1.4. Inconvénients 7
1.3.2. FILAMENT RESISTIF 8
1.3.2.1. Instrumentation 8
1.3.2.2. Avantages des filaments résistifs 10
1.3.2.3. Inconvénients 10
1.3.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET REPRODUCTIBILITE 12
1.3.3.1. Taille et forme de l'échantillon 12
1.3.3.2. Homogénéité 13
1.4. EXEMPLES ET APPLICATIONS 14
1.4.1. POLYMERES SYNTHETIQUES 14
1.4.2. CRIMINALISTIQUE 15
1.4.3. FIBRES ET TEXTILES 16
1.4.4. PAPIERS, ENCRES ET PHOTOCOPIES 16
1.4.5. OEUVRES D'ART ET PIECES DE MUSEES 16
1.4.6. PRODUITS NATURELS ET BIOLOGIQUES 17
1.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 18

2. PYROLYSE THERMIQUE 20

2.1. INTRODUCTION 20
2.2. L'IMPACT ELECTRONIQUE 21
2.2.1. PRINCIPE 21
2.2.1.1. Courbe d'ionisation 21
2.2.1.2. Conclusion 23
2.3. LA PYROLYSE PAR POINT CURIE/MS 24
2.3.1. DESCRIPTION DU MONTAGE COMMERCIAL RAPyD 400 24
2.3.2. L'ANALYSE DES DONNEES 25
2.3.3. LES AVANTAGES 26
2.3.4. LES INCONVENIENTS 26
2.4. LE COUPLAGE PYROLYSE GC/MS 27
2.4.1. INTRODUCTION 27

2.4.2. L'APPAREILLAGE GC/MS 28
2.4.2.1. La chromatographie en phase gazeuse 29
2.4.2.1.1. Le système d'injection 29
2.4.2.1.2. Le gaz vecteur 34
2.4.2.1.3. Le four du chromatographe 35
2.4.2.1.4. La colonne de chromatographie 35
2.4.2.1.5. La ligne de transfert 36
2.4.2.2. Le spectromètre de masse (Filtre quadripolaire, HP 5890 Série II) 37
2.4.2.2.1. La source d'ions 37
2.4.2.2.2. Principe de fonctionnement de la source d'ions à impact électronique 39
2.4.2.2.3. Nécessité du vide 40
2.4.2.2.4. L'analyseur quadripolaire 40
2.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **45**

3. LA PYROLYSE LASER **47**

3.1. INTRODUCTION **47**
3.2. LASER ND/YAG **49**
3.2.1. PREAMBULE : LES LASERS 49
3.2.2. PRINCIPES PHYSIQUES DE FONCTIONNEMENT DU LASER (2) 49
3.2.2.1. Le milieu actif : base atomique du système 50
3.2.2.2. Le pompage : création d'une inversion de population 52
3.2.2.3. La cavité résonante 52
3.3. INTERACTION LASER - MATIERE **53**
3.3.1. LES DIFFERENTES ZONES ISSUES D'UN IMPACT DU LASER 53
3.3.2. LES PROCESSUS D'ABLATION EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE 55
3.3.2.1. Interaction de type thermique 55
3.3.2.2. Interaction de type photochimique 55
3.3.3. FORMATION DES IONS EN FONCTION DE L'IRRADIANCE LASER (5) 57
3.4. L'ENCEINTE D'ABLATION LASER **61**
3.4.1. INTRODUCTION 61
3.4.2. CAHIER DES CHARGES 61
3.4.3. CONCEPTION DE L'ENCEINTE D'ABLATION LASER 62
3.4.4. LES OPTIQUES 64
3.4.5. LES INTERFACES DE SORTIE 65
3.4.5.1. L'analyse indirecte 66
3.4.5.2. L'analyse directe 67
3.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **70**

4. ETUDE DE DEUX POLYMERES SYNTHETIQUES **71**

4.1. INTRODUCTION **71**
4.2. PRESENTATION DES POLYMERES ETUDIES **72**
4.3. PYROLYSE LASER FT/MS **73**
4.3.1. SPECTRES DE MASSE OBTENU POUR L, AVEC UNE LONGUEUR DE 193 NM 73
4.3.2. MECANISME DE FRAGMENTATION ET D'IONISATION 74
4.3.3. CONCLUSION 75
4.4. PYROLYSE THERMIQUE CG/SM **76**
4.4.1. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES 76
4.4.2. RESULTATS ET MECANISMES DE DEPOLYMERISATION 78
4.4.2.1. Polymère (L) 78
4.4.2.2. Polymère (M) 80
4.5. CONCLUSION **81**

5. ETUDE COMPAREE DE LA PYROLYSE THERMIQUE ET DE LA PYROLYSE LASER COUPLEES A LA GC/MS DES MATRICES MALDI **83**

5.1. INTRODUCTION **83**
5.2. PRESENTATION DES ACIDES ORGANIQUES UTILISES **85**
5.3. CONDITIONS EXPERIMENTALES **86**
5.3.1. PYROLYSE THERMIQUE 86
5.3.2. PYROLYSE LASER 87
5.3.3. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET SPECTROMETRIE DE MASSE 87
5.4. PYROLYSE THERMIQUE GC/MS **88**
5.4.1. RESULTATS EXPERIMENTAUX 88
5.4.2. CLASSIFICATION DES MATRICES EN FONCTION DE LA DECARBOXYLATION 90
5.4.3. CONCLUSION 91
5.5. PYROLYSE LASER GC/MS **92**
5.5.1. LIMITE DE DETECTION EN FONCTION DU TEMPS D'ABLATION 92
5.5.2. RESULTATS EXPERIMENTAUX 94
5.5.3. MECANISMES DE PYROLYSE LASER 94
5.5.4. CONCLUSION 97
5.6. APPLICATION : L'EFFET DE COVAPORISATION **98**
5.6.1. INTRODUCTION 98
5.6.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES 98
5.6.3. RESULTATS 99
5.6.4. CONCLUSION 103
5.7. CONCLUSION **103**

6. ETUDE COMPAREE DES PYROLYSES PAR FOUR, FILAMENT ET LASER, APPLIQUEES A DES ACIDES AMINES CONTENUS DANS LE CHEVEU **105**

6.1. INTRODUCTION **105**
6.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES **107**
6.2.1. CHOIX DES ACIDES AMINES 107
6.2.2. CHOIX DES MASSES DE PRODUITS PYROLYSES 108
6.2.3. PARAMETRES INSTRUMENTAUX 109
6.3. MECANISMES DE PYROLYSE THERMIQUE **110**
6.3.1. MECANISMES GENERAUX 110
6.3.1.1. La décarboxylation 110
6.3.1.2. La déshydratation avec formation d'une α lactame 113
6.3.1.3. Déshydratation des diacides 113
6.3.1.4. Formation de 2,5 dicétopipérazine, 3,6-disubstituées 114
6.3.1.5. Coupure radicalaire des groupements latéraux 114
6.4. COMPARAISON DES TROIS MODES DE PYROLYSE **116**
6.4.1. LES MECANISMES DE PYROLYSE DE L-CYSTINE 117
6.4.2. LES MECANISMES DE PYROLYSE DE L-PHENYLALANINE 118
6.4.3. LES MECANISMES DE PYROLYSE DE L-TRYPTOPHANE 119
6.4.4. LES MECANISMES DE PYROLYSE DE LA L-TYROSINE 119
6.4.5. LES MECANISMES DE PYROLYSE DE LA L-METHIONINE 120
6.5. CONCLUSION **121**
6.6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **122**

7. ETUDE D'UN POLYMERE NATUREL COMPLEXE : LE CHEVEU **123**

7.1. INTRODUCTION **123**
7.2. BIBLIOGRAPHIE **125**
7.2.1. MORPHOLOGIE ET HISTOLOGIE DES POILS ET DES CHEVEUX 125

7.2.1.1. Le bulbe pilaire (figure 7.2.2) 126
7.2.1.2. La tige pilaire (figure 7.2.3) 127
7.2.1.3. La glande sébacée 128
7.2.2. CONSTITUTION DE LA TIGE PILAIRE 129
7.2.2.1. Acides aminés constituants la kératine 129
7.2.2.2. Les acides aminés N- et C- terminaux de la kératine du cheveu 133
7.2.2.3. Structure des liaisons peptidiques dans la kératine 134
7.2.2.4. Minéraux contenus dans la tige pilaire (4) 134
7.2.3. PROPRIETES PHYSIQUES DU CHEVEU OU DU POIL (1) 135
7.2.4. CYCLE PILAIRE 136
7.2.5. CROISSANCE DES POILS ET DES CHEVEUX 137
7.2.5.1. Généralités 137
7.2.5.2. Facteurs de croissance 138
7.2.6. CONCLUSION 139
7.3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 140
7.3.1. RECHERCHE DES PARAMETRES DE TEMPERATURE 140
7.3.2. ECHANTILLONNAGE DES CHEVEUX 141
7.3.3. PARAMETRES INSTRUMENTAUX 142
7.4. PYROLYSE THERMIQUE DE QUELQUES PEPTIDES 143
7.4.1. CHOIX DES PEPTIDES 143
7.4.2. PYROLYSE THERMIQUE DU PEPTIDE POLY (PRO-GLY-PRO) 143
7.4.2.1. Présentation 143
7.4.2.2. Résultats et mécanismes de dégradation 144
7.4.2.3. Conclusion 146
7.4.3. PYROLYSE THERMIQUE DU PEPTIDE POLY(L-LEUCINE) 147
7.4.3.1. Présentation du polymère 147
7.4.3.2. Résultats et mécanismes 147
7.4.3.3. Conclusion 150
7.4.4. PYROLYSE THERMIQUE DU PEPTIDE POLY(GLU-ALA-TYR) 6:3:1 150
7.4.4.1. Présentation du peptide 150
7.4.4.2. Résultats et mécanismes 151
7.4.5. CONCLUSION 153
7.5. PYROLYSE THERMIQUE GC/MS DE CHEVEUX 154
7.5.1. INTRODUCTION 154
7.5.2. RESULTATS 154
7.5.3. MECANISMES DE DEGRADATION 155
7.5.3.1. Association à un acide aminé 155
7.5.3.2. Recombinaisons dues à la chaîne peptidique 157
7.5.3.3. Analyse du sébum de l'individu B 158
7.5.4. CONCLUSION 160
7.6. PYROLYSE THERMIQUE CG/FID 161
7.6.1. INTRODUCTION 161
7.6.2. PRESENTATION DES CHEVEUX ETUDIES PAR GC/FID 161
7.6.3. RESULTATS PRELIMINAIRES 163
7.6.3.1. Pyrogrammes enregistrés pour les individus AN et SA 163
7.6.3.2. Détermination des pics caractéristiques 164
7.6.3.3. Différenciation des 10 individus à partir des pics sélectionnés 165
7.6.4. CONCLUSION 168
7.7. PYROLYSE CG/FID D'ACIDES AMINES 169
7.7.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES 169
7.7.2. RESULTATS OBTENUS POUR LE CHEVEU 169
7.7.3. COMPARAISONS AVEC LES RESULTATS OBTENUS POUR LES ACIDES AMINES 171
7.7.4. CORRESPONDANCE ENTRE LES PICS OBTENUS PAR GC/FID ET GC/MS 172
7.7.5. ASSOCIATION DES PICS DISCRIMINANTS AVEC LES ACIDES AMINES 173
7.7.6. CONCLUSION 174
7.8. PYROLYSE LASER GC/MS D'UN CHEVEU 175

7.8.1. PARAMETRES INSTRUMENTAUX 175
7.8.2. PYROGRAMME DE LA PASTILLE DE CHEVEUX 176
7.8.3. CONCLUSION 178
7.9. CONCLUSION 179
7.10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180

CONCLUSION 182

ANNEXES 184

Introduction

La spectrométrie de masse est devenu, depuis les vingt dernières années, un outil irremplacable pour l'analyse et la caractérisation des polymères. Plusieurs techniques d'ionisation ont été testées, allant de la désorption de champs à l'électrospray.

Parmi celles-ci, il apparaît que la désorption assistée par matrice et l'électrospray sont les modes d'ionisation qui permettent d'obtenir la distribution des oligomères. Néanmoins, lorsque le degré de polymérisation est élevé, ce qui implique en général une énergie de réseau élevée, ces deux modes d'ionisation sont souvent mis à défaut.

Dans ce cas, la pyrolyse MS ou la pyrolyse GC/MS donnent des renseignements complémentaires souvent indispensables pour l'établissement ou le contrôle des structures.

La pyrolyse flash (Py) provoque la décomposition thermique d'un polymère ou d'un matériau complexe en une série de molécules organiques de faibles poids moléculaires, donc volatiles dans la plupart, et caractéristiques du matériau d'origine.

Le couplage Py MS permet l'analyse directe par spectrométrie de masse de la phase gazeuse produite lors de la pyrolyse. Les spectres de masses obtenus ont la particularité, pour un matériau donné, d'être reproductibles. Ils constituent une empreinte spectrale fiable. Cependant, l'interprétation du spectre de masse, devenant très vite compliqué, nécessite une analyse statistique des données spectrales (ACP), en particulier dans le cas de copolymères.

C'est la raison pour laquelle le couplage Py GC, puis Py GC/MS, apparut comme une alternative prometteuse.

Dans le cas d'un polymère naturel complexe comme le cheveu, les premiers résultats obtenus par De Forest (1969) (1), puis par Fouweather et

Porter (1973) (2) ont montré qu'un petit fragment de cheveu fournissait un pyrogramme très dense.

Le couplage Py GC/GC/MS permis à Munson (1985) (3) d'améliorer la séparation des pics chromatographiques et l'identification d'un petit nombre de composés majoritaires qui semblaient être différents d'un individu à l'autre.

En 1987, utilisant les capacités d'un triple quadrupole en mode MS/MS, il remarqua que les fragmentogrammes de deux pics de masses m/z = 100 et m/z = 154 pouvaient provenir de combinaisons de deux acides aminés. Basant une étude de discrimination sur ces deux pics, cinq individus présentèrent les mêmes fragmentogrammes. Il en conclut qu'il n'était pas possible de différencier des individus à l'aide de composés issus de la pyrolyse de moins de trois acides aminés.

Une étude plus récente menée par Ishiwaza et Misawa (1990) (4), avec un couplage Py GC, mais avec des conditions expérimentales différentes, montre la formation d'un nombre restreint de composés comme le propionitrile, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, styrène, la pyridine et les isomères du xylène et ce à partir des cheveux mais aussi des principaux acides aminés qui les constituent. Ils ont montré que les proportions de benzène, de toluène et de styrène variaient d'un individu à l'autre. Sur les cheveux de 16 personnes, ils ont noté qu'une seule paire de cheveux indiscernable.

Devant ces résultats contradictoires, mais globalement encourageants, il nous a semblé utile d'étudier de façon plus approfondie la pyrolyse anaérobie des cheveux et des fibres polymèriques.

Par la suite, la recherche de conditions expérimentales permettant de réduire la taille de l'échantillon et d'avoir un contrôle rigoureux de la température de pyrolyse et du transfert de la chaleur au sein de l'échantillon, nous a conduit à envisager l'utilisation de l'ablation laser.

L'irradiation laser permet en effet de se défaire du transfert de chaleur, fonction de la conductivité thermique, de la masse et de la morphologie de l'échantillon. Elle permet de déposer une énergie contrôlée sur la surface de l'échantillon.

Nous proposons un modèle d'enceinte d'irradiation laser que nous avons conçue. Avec cette interface, nous avons réalisé des pyrolyses laser GC/MS de différents types d'échantillons exposés dans ce travail (dont des acides utilisés comme matrice en MALDI[1]).

[1] MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation

La rédaction de ce manuscrit a été organisée de la manière suivante :

Après la partie bibliographique, qui rappelle le principe et les mécanismes de la pyrolyse thermique, deux premiers chapitres exposent l'instrumentation que nous avons utilisée. Ils rassemblent l'ensemble des moyens nécessaires pour la pyrolyse par filament et/ou la pyrolyse par four tubulaire que nous avons couplées à un spectromètre de masse quadripolaire.

Le chapitre III traite des mécanismes d'irradiation laser, des interactions laser/matière et de l'enceinte d'ablation laser.

Les résultats expérimentaux obtenus s'articulent autour de deux idées directrices :

- ✓ la caractérisation des molécules formées lors d'une pyrolyse, afin d'établir les mécanismes de rupture d'une liaison peptidique.
- ✓ l'étude de l'irradiation laser employée comme moyen de pyrolyse.

Dans le chapitre IV, nous avons défini les conditions expérimentales optimales de la pyrolyse thermique GC/MS à partir de deux polymères synthétiques. Nous montrons en particulier que la pyrolyse thermique GC/MS est dans ce cas un outil privilégié pour mettre en évidence les proportions relatives des monomères de ces deux copolymères.

Dans le chapitre V, nous montrons la possibilité d'appliquer l'ablation/pyrolyse laser à des acides afin de dégager des informations complémentaires pour l'étude du mécanisme MALDI.

Puis, nous avons appliqué dans le chapitre VI les trois modes de pyrolyse (four, filament et laser) aux acides aminés contenus dans les cheveux. Nous nous sommes attachés à définir les mécanismes de pyrolyse et à évaluer les ressemblances et les dissemblances d'action des trois modes.

Enfin, dans le chapitre VII, nous étudions la pyrolyse GC/MS des cheveux. L'identification des pyrolysats est réalisée par comparaison avec les résultats obtenus pour les acides aminés et des polypeptides étudiés dans les conditions. Un essai de discrimination des cheveux y est reporté, ainsi qu'un essai de pyrolyse laser GC/MS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 P.R. Deforest, *Pyrolysis gas chromatography crime dissertation*, Ph D thesis, University of California Berkeley, (1969), University microfilm order n°706029.

2 C. Fouweather, J. Porter, *An appraisal of human head hair as forensic evidence*, CRE Report n°98, Home Office Central Research Etablishment Aldermaston, (1973)

3 T.O. Munson, J. Vick, *J. Anal. Applied Pyrolysis*, 1985, **8**, 493.

4 F. Ishizawa, S. Misawa, *J. Forensic Sci. Soc.*, 1990, **30**, 201.

1. La pyrolyse thermique

La définition du terme **pyrolyse** indique la rupture de liaisons chimiques par l'action unique de l'énergie thermique.

Nous avons considéré que l'énergie thermique peut être apportée à un échantillon suivant deux modes :

- ✓ la chaleur produite par un four ou un filament,
- ✓ l'échauffement induit par une irradiation laser.

Nous exposons dans ce chapitre la pyrolyse thermique ainsi que les montages que nous avons utilisés. La pyrolyse laser fera l'objet du troisième chapitre.

1.1. GENERALITES

La pyrolyse thermique est une technique d'analyse, étudiant le comportement de molécules pendant leur pyrolyse à partir des fragments résultants. L'analyse de ces fragmentations permet d'obtenir des informations sur la structure de la molécule de départ.

L'analyse des ruptures pyrolytiques présente une certaine analogie avec celle des processus qui interviennent lors de la production d'un spectre de masse.

L'énergie apportée à la molécule étudiée provoque sa décomposition en fragments stables. Si les paramètres d'énergie (température et vitesse de chauffe) sont reproductibles, les coupures sont caractéristiques de la molécule de départ. Elles sont basées sur les énergies des différentes liaisons.

Les appareillages peuvent analyser des produits sous toutes formes (de gazeuse à solide). Ils sont particulièrement adaptés aux échantillons qui nous intéressent : **les polymères**.

La chromatographie en phase gazeuse (GC), la spectrométrie de masse (MS) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont souvent utilisées en routine pour analyser des échantillons comme des polymères synthétiques, des biopolymères, des matériaux composites et des produits industriels complexes.

Plusieurs ouvrages présentant aussi bien les aspects théoriques que pratiques ont été publiés : par exemple, un texte d'introduction par Irwin [1] et une compilation des applications de la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse par Liebman et Levy [2].

1.2. MECANISMES DE DEGRADATION

La dégradation d'une molécule lors de la pyrolyse est causée par la dissociation d'une liaison chimique et notamment par la production de radicaux libres. Les processus généralement employés pour expliquer le comportement de ces molécules sont basés sur des mécanismes de dégradation radicalaire.

Le mode de fragmentation et l'identité des fragments produits dépendent du type de liaison mis en jeu et de la stabilité des plus petites molécules formées.

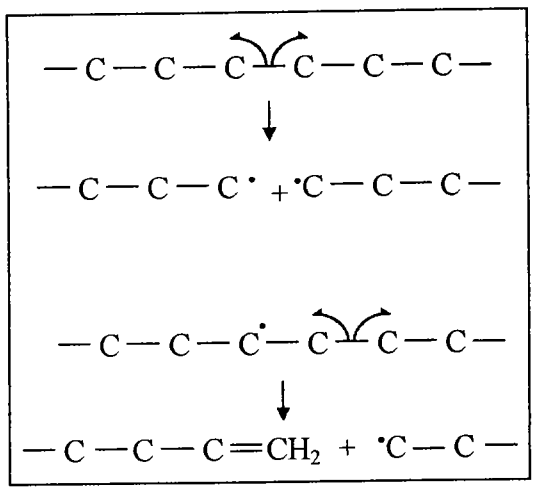
Si la molécule de départ comporte une longue chaîne carbonée, comme de nombreux polymères, il est probable que la chaîne se brise de façon aléatoire pour produire des petites molécules chimiquement similaires à la molécule parent. Certains des fragments de plus hautes masses peuvent préserver l'information structurelle de la chaîne polymérique. Le nombre et l'abondance relative des molécules spécifiques plus petites donnent une information directe sur la structure de la macromolécule.

Nous allons décrire les mécanismes de dégradation traditionnellement employés pour expliquer le comportement pyrolytique des macromolécules.

1.2.1. La coupure aléatoire de la chaîne principale

La coupure d'une molécule à longue chaîne, comme un polymère synthétique à liaison carbonée en une distribution de molécules plus petites, est due à une coupure aléatoire.

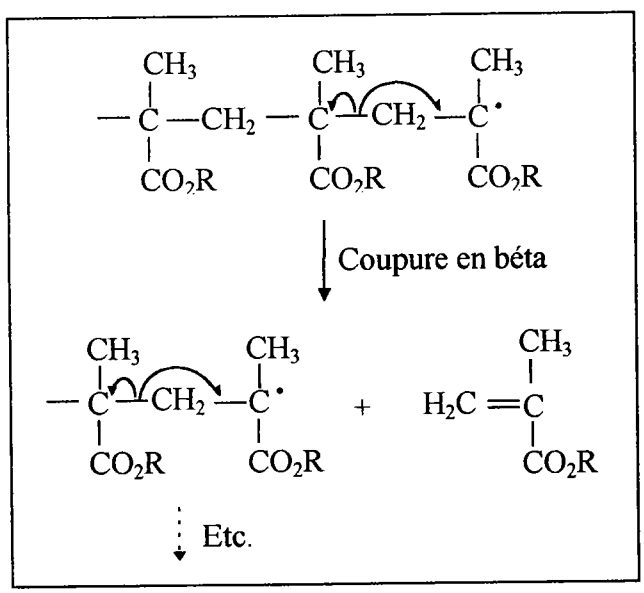
Si toutes les liaisons sont à peu près de la même force, il n'y a aucune raison qu'une se brise plutôt qu'une autre, et par conséquent le polymère se fragmente pour donner une large distribution de molécules plus petites.



1.2.2. La dépolymérisation

La dépolymérisation est le départ successif des monomères de la chaîne, quelquefois comparée à l'ouverture d'une fermeture éclair, après une éventuelle coupure initiale.

Dans le cas idéal, le monomère est le seul produit de la pyrolyse.



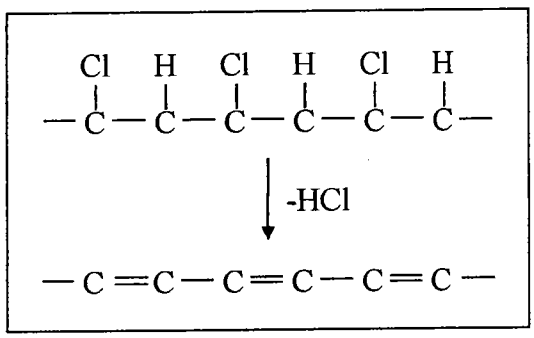
1.2.3. Les réactions des groupes latéraux

Contrairement aux deux cas précédent, la coupure de la chaîne polymérique n'est pas la première étape du mécanisme.

Les groupes latéraux se dissocient de la chaîne, laissant une structure polyinsaturée.

Lors d'un chauffage long, cette structure insaturée se cyclise et forme des composés aromatiques par déshydrogénation.

Par exemple, quand le chlorure de polyvinyle est pyrolysé, il se forme des aromatiques, spécialement benzène, toluène, et naphtalène. Ceci résulte d'un mécanisme en deux étapes qui commence par l'élimination de HCl de la chaîne polymérique, laissant une structure polyinsaturée. Lors d'un chauffage plus long, cette structure insaturée conduit aux composés aromatiques précités.



1.2.4. Les forces relatives des liaisons

Afin de trouver quel type de mécanisme de dégradation particulier un polymère va suivre, il suffit de considérer la dégradation thermique comme un processus radicalaire.

Tous les produits de dégradation identifiés qu'ils soient majoritaires ou minoritaires peuvent être expliqués en tenant compte des règles générales suivantes :

- ✓ Les mécanismes de dégradation sont des processus radicalaires et sont initiés par la rupture initiale de la liaison la plus faible.
- ✓ La composition des pyrolysats est basée sur la stabilité des radicaux libres impliqués et celles des molécules produites.
- ✓ La stabilité des radicaux libres suit l'ordre général :

$$^{\bullet}CR_3 > {}^{\bullet}CHR_2 > {}^{\bullet}CH_2R > {}^{\bullet}CH_3.$$

- ✓ Les réarrangements intramoléculaires qui conduisent à des radicaux libres plus stables jouent un rôle important, particulièrement dans le cas de transfert d'atomes d'hydrogène.

1.3. *INSTRUMENTATION ET ANALYSES*

Habituellement, une analyse par pyrolyse comprend la préparation de l'échantillon, sa pyrolyse, le transfert du pyrolysat vers l'instrument d'analyses et finalement l'analyse.

Les appareils qui sont réellement disponibles pour équiper un laboratoire sont soit des fours isothermes ou programmables, soit des filaments chauffés par voies inductive ou résistive.

Notre choix s'est porté sur un pyrolyseur à filament résistif pour 4 raisons essentielles :

- ✓ nos échantillons ont souvent une composition inconnue,
- ✓ la gamme de températures de pyrolyse doit être grande,
- ✓ la possibilité de contrôler la vitesse de chauffe du filament,
- ✓ la possibilité de pyrolyser des échantillons de petites tailles.

Ainsi, nous insisterons particulièrement sur les deux montages que nous avons employés :

- ✓ un four tubulaire de notre conception,
- ✓ un filament chauffé par voie résistive.

1.3.1. Pyrolyse par four

Généralement en pyrolyse, il est essentiel de chauffer un petit échantillon jusqu'à sa température finale aussi rapidement que possible.

La reproductibilité d'une expérience dépend fortement de la capacité du pyrolyseur à chauffer uniformément l'échantillon, et à atteindre la température finale avant que la dégradation n'ait commencé.

Il existe cependant des expériences et des conditions pour lesquelles il n'est pas souhaitable de pyrolyser l'échantillon si rapidement ou en si petite quantité.

Nous avons conçu un montage permettant de pyrolyser une masse d'environ quelques milligrammes afin d'obtenir des solutions concentrées en produits formés. L'intérêt est de pouvoir analyser la solution par différentes techniques le cas échéant et d'avoir dans le couplage avec la GC/MS, des pics chromatographiques importants et spectres de masse interprétables.

1.3.1.1. *Instrumentation*

Nous avons conçu et fait réaliser un montage en Quartz permettant la pyrolyse flash en atmosphère inerte (balayage par un flux d'hélium) de quelques milligrammes de produit (figure 1.3.1).

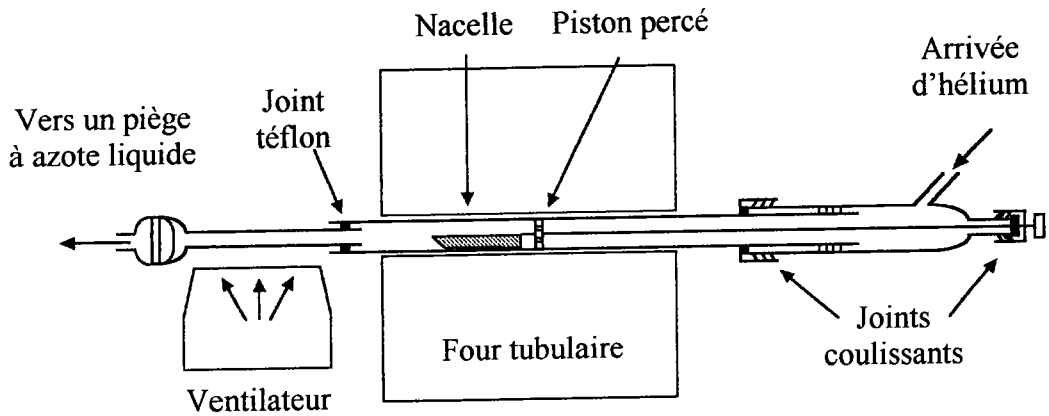


Figure 1.3.1 Montage schématique de la pyrolyse par four tubulaire

La pyrolyse flash dans le four tubulaire est conduite en deux étapes :

- ✓ L'échantillon placé dans une nacelle en porcelaine est introduit dans le tube central en Quartz (partie non chauffée). Ce tube central est clos hermétiquement. Un balayage d'hélium est assuré pendant 10 min. permettant de chasser l'air et l'eau résiduelle contenus dans le montage.
- ✓ Ensuite, à l'aide d'un piston percé, la nacelle est introduite dans le four où règne la température voulue[1]. Elle reste dans le four pendant 5 minutes.

L'enceinte tubulaire en Quartz est constamment balayée par un flux d'hélium, ceci permet de conserver une atmosphère inerte dans le four et d'extraire les produits formés assez rapidement.

A la sortie du four, un ventilateur refroidit le tube afin de condenser la majorité des pyrolysats (à peu près 80%). Un piège réfrigéré à l'azote liquide est placé en aval de façon à condenser les éventuels produits plus volatils.

Nous ne nous sommes intéressés qu'aux produits condensés à la sortie du four. L'expérience nous a montré que la majorité des produits se condensent dans cette partie du montage.

[1] Les fentes aménagées dans le piston permettent de balayer la partie du tube placée dans le four sans discontinuité.

La nacelle est extraite du four. Une fois le montage froid, le tube central est démonté et rincé avec du méthanol, permettant ainsi d'analyser les produits condensés sur les parois.

1.3.1.2. *Contrôle de la température*

Le chauffage du four de pyrolyse isotherme est réalisé en plaçant une partie du tube central à l'intérieur d'un four tubulaire. La température dans le tube en quartz est induite par celle des parois du four tubulaire.

Le capteur de température du four tubulaire se situe entre ses parois et sa source de chauffage. Nous connaissons ainsi la température des parois du four tubulaire. Cependant, nous n'avons pas une indication exacte de la température dans le tube de quartz.

Nous devons, dans ce cas, tenir compte d'effets de gradient de température ou d'une vitesse de chauffe plus faible.

Le gaz vecteur doit avoir un débit permettant d'évacuer rapidement les pyrolysats hors du four.

Avec un débit trop faible, l'échantillon se dégrade et le pyrolysat peut avoir le temps d'interagir avec les parois du four, donnant lieu à une pyrolyse secondaire.

1.3.1.3. *Avantages de la pyrolyse par four*

- ✓ Le montage permet la pyrolyse d'une quantité importante de produit.
- ✓ Les pyrolysats en solution peuvent être analysés par plusieurs techniques en parallèle.
- ✓ Il est peu onéreux et facile d'emploi.
- ✓ Il fonctionne de façon isotherme, donc il n'y a pas besoin de contrôler une rampe de chauffe ou une durée de pyrolyse.

1.3.1.4. *Inconvénients*

- ✓ La taille et la forme de la chambre de pyrolyse impose un volume important à balayer par le gaz vecteur.
- ✓ La nature du chauffage et l'introduction de l'échantillon dans le four empêchent de connaître la façon dont la température se répartit dans l'échantillon, ce qui dépend de sa nature, de sa taille et de sa forme.

- ✓ La température dans le tube en quartz ne peut pas être évaluée correctement.
- ✓ La nacelle en porcelaine a une certaine inertie thermique et induit des effets de gradient de température à l'échantillon.

1.3.2. Filament résistif

Nous avons choisi le filament résistif pour effectuer une pyrolyse thermique rapide de petites quantités de composés de natures complexes et/ou inconnues dans des conditions contrôlées.

Nous avons opté dans un premier temps pour la gamme étendue de températures de pyrolyse du filament résistif (jusqu'à 1400°C avec des incréments de 1°C).

Plaçant la reproductibilité de la température de pyrolyse en arrière plan pour le moment, nous avons écarté la pyrolyse par filament inductif (point de Curie). Essentiellement, car les température de la pyrolyse à point Curie sont relativement limitées.

Les 10 à 20 alliages composant les filaments et couvrant une gamme de températures allant de 350 à 1380 °C, ne permettent pas d'effectuer des pyrolyses à des températures intermédiaires de celles proposées.

Ainsi, si on veut étudier le comportement d'un produit à différentes températures de pyrolyse, il faut utiliser un filament de composition différente à chaque manipulation.

1.3.2.1. Instrumentation

Notre pyrolyseur est un "pyroprobe 1000" de CDS (figure 1.3.2). Il est à filament résistif de platine permettant d'explorer une large de gamme de températures pouvant atteindre 1400 °C, avec des incréments de 1°C.

Le courant appliqué passe directement dans le filament. Cela signifie que le filament est connecté physiquement au contrôleur de température de l'appareil.

L'échantillon est porté de la température ambiante à celle de pyrolyse en chauffant un filament en un temps très court.

La vitesse de montée en température s'échelonne de 20°C/ms à 0,01°C/ms. Ainsi, pour atteindre la température de pyrolyse de 700°C à partir

de la température ambiante de l'enceinte (100°C par exemple), le temps nécessaire peut varier de 30 millisecondes à une minute.

La température finale peut être maintenue de 0,01 à 99,99 secondes.

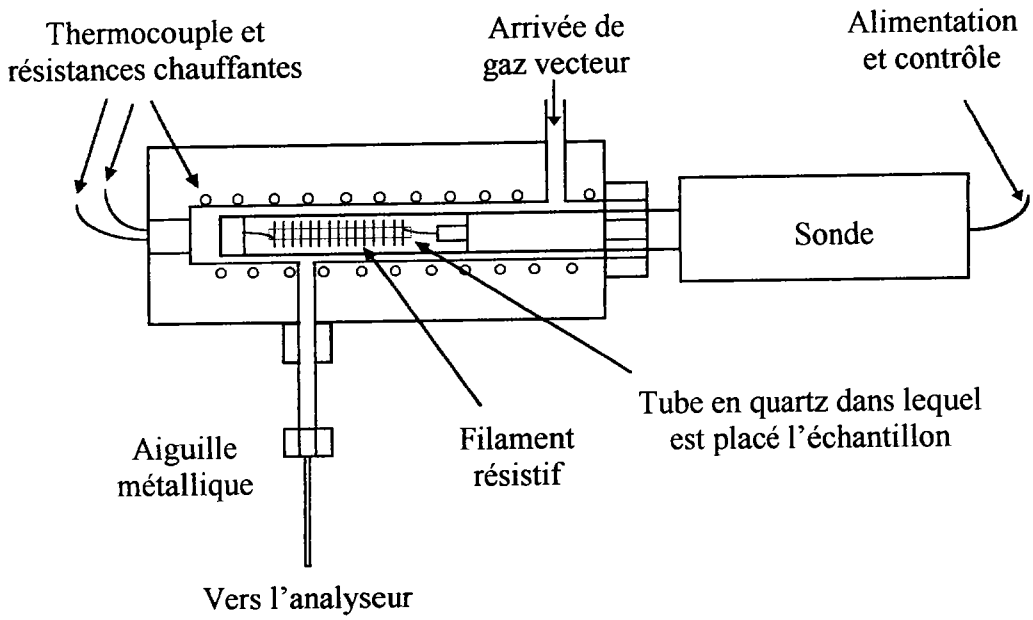
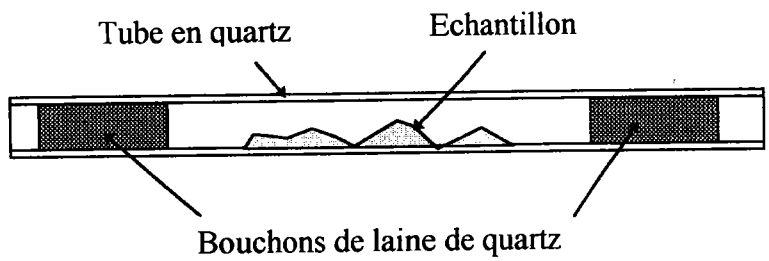


Figure 1.3.2 Schéma du pyrolyseur CDS pyroprobe 1000

La température de l'enceinte de pyrolyse peut être chauffée jusqu'à 350°C avec un incrément de 1°C.

L'enceinte est balayée par un flux de gaz vecteur. Dans notre cas, nous avons choisi l'hélium. Les produits issus de la pyrolyse sont acheminés vers l'injecteur du chromatographe par l'intermédiaire d'une aiguille chauffée par conduction.

Les échantillons, après avoir été exactement pesés par microbalance, sont conditionnés dans des tubes de quartz de diamètre de 2 mm et d'une longueur de 2,5 cm, fermés à leur extrémité par des bouchons de laine de quartz. La figure suivante représente un tube de quartz prêt à l'analyse.



Il est essentiel de peser les échantillons afin d'avoir des pyrolyses les plus reproductibles possibles. En général, les masses d'échantillons sont d'environ 10 à 50 µg, quand la totalité de l'échantillon est susceptible de se vaporiser. Dans le cas de mélange avec des produits minéraux, la masse peut atteindre quelques milligrammes.

De la préparation des échantillons dépend largement la qualité du résultat. Il est nécessaire d'éviter toute contamination, tant de l'échantillon à analyser que du matériel utilisé pour la préparation de l'analyse (laine de quartz et tube de quartz, pince et scalpel).

De plus, la mise en place du tube de quartz entre les spires du filament doit être minutieuse. La pyrolyse ne pourra être reproductible que si l'échantillon est parfaitement placé dans le filament et si l'enroulement des spires n'est pas altéré.

La géométrie de l'enceinte de pyrolyse permet l'entrée d'air lors de l'introduction de la sonde de pyrolyse. Aussi, il est nécessaire de laisser un temps de repos après avoir placé la sonde dans l'enceinte, afin que l'air puisse être purgé par le courant d'hélium.

1.3.2.2. *Avantages des filaments résistifs*

- ✓ La température atteinte par le filament, sous atmosphère inerte, se situe dans une gamme étendue (allant jusqu'à 1400°C),
- ✓ un même échantillon peut être chauffé à différentes températures successives, sans à avoir à changer le filament,
- ✓ le contrôle de la vitesse de chauffage du filament permet d'étudier l'effet d'un chauffage lent sur l'échantillon et de réaliser des analyses thermogravimétriques.

1.3.2.3. *Inconvénients*

- ✓ Le filament étant chauffé de manière résistive, il doit être physiquement relié à un contrôleur, ce qui pose principalement deux problèmes :
  - ✗ il est difficile d'automatiser le processus, plusieurs échantillons ne pouvant pas être transmis au même filament, ou plusieurs filaments ne pouvant pas être reliés au même contrôleur.
  - ✗ le contrôle de la température d'un filament est basé sur la résistance de tout le filament (donc de toutes ses boucles et de ses contacts). Il suffit qu'une boucle soit endommagée pour que la résistance totale

du filament soit faussée, et donc le contrôle de température soit moins précis.

✓ Un inconvénient supplémentaire vient du fait que le filament se trouve dans une enceinte chauffée. Par conséquent, il convient d'ajuster la température globale de l'enceinte en dessous de la température de dégradation des molécules, mais au-dessus de leur point d'ébullition. En général, cette température est d'environ 200°C.

α α α

1.3.3. Préparation des échantillons et reproductibilité

Il ne suffit pas d'avoir un pyrolyseur pour lequel la température finale et la vitesse de pyrolyse soient bien définis pour garantir des résultats reproductibles. L'échantillonnage, la manipulation des échantillons, l'introduction et le transfert du pyrolyseur vers l'appareil d'analyses doivent être réalisés en prenant en compte les paramètres pouvant influer sur les résultats.

Il est relativement facile d'introduire 1 microlitre d'échantillon dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse avec une microseringue. Préparer et introduire un échantillon solide qui ne fait que quelques microgrammes est plus délicat. En particulier si l'échantillon est fait d'une matière insoluble, ou de couches de produits différents, comme des plantes ou des couches de peinture, de nombreux problèmes se posent. Les expérimentateurs sûrs de leur préparation et de leur méthode d'analyse doivent toujours se demander si le petit échantillon prélevé qu'ils étudient est vraiment représentatif du reste du produit à analyser.

1.3.3.1. Taille et forme de l'échantillon

Si un produit est soluble, des quantités de l'ordre du microlitre de solution peuvent être injectées dans le pyrolyseur. La température de l'enceinte doit permettre une vaporisation immédiate du liquide évitant ainsi des gradients de température au niveau de l'échantillon.

Un des avantages de la pyrolyse comme une technique analytique est la possibilité d'analyser des produits solides, de solubilité limitée comme les polymères. Dans ce cas, il est nécessaire d'analyser des échantillons de mêmes forme et taille, de manière à obtenir des résultats reproductibles. En général, on utilise 10 à 50 µg d'échantillons pour une pyrolyse couplée à la CG, et le double pour un couplage par FTIR.

Afin d'éviter les gradients de température au sein de l'échantillon, il est préférable de pyrolyser une tranche fine plutôt qu'un cube ou une sphère.

Dans tous les cas, il est important d'utiliser toujours la même quantité de produit pour être sûr que son chauffage soit identique dans chaque expérience.

1.3.3.2. *Homogénéité*

Un problème qui se pose constamment aux analystes est de s'assurer qu'un échantillon solide est homogène et donc représentatif du matériau d'où il provient.

Des échantillons sont parfois tellement différents d'un bout à l'autre d'un produit que leur hétérogénéité est évidente. Des éléments comme les plantes vivantes, les roches et les terres, les textiles et les produits laminés donnent clairement des échantillons différents s'ils sont prélevés à des endroits différents.

Des chercheurs travaillant sur des échantillons hétérogènes ont mis au point plusieurs méthodes pour s'affranchir de ce problème :

- ✓ l'échantillon peut être divisé en une fine poudre, dont de petites quantités seront prélevées pour analyses. Il est préférable de réaliser cette opération à froid (broyage sous azote liquide). Ainsi, la poudre obtenue ne subit pas d'éventuelles dégradations thermiques lors du broyage.
- ✓ l'échantillon peut être haché finement, plusieurs petits fragments étant analysés ensemble.
- ✓ Une autre façon de procéder avec des échantillons hétérogènes est d'analyser chaque constituant séparément. Les appareils étant suffisament sensibles pour pouvoir travailler avec de très petites quantités de produit, il est parfois possible de prélever portion par portion d'un échantillon global et de les analyser une à une. Cette approche est fastidieuse mais nécessaire.

1.4. EXEMPLES ET APPLICATIONS

Les produits polymériques, soit synthétiques comme les polyoléfines, les nylons et les acryliques, soit naturels comme la cellulose, les résines et les protéines se comportent de façon reproductible lorsqu'ils sont exposés à des températures de pyrolyse.

La pyrolyse peut être considérée comme une technique de préparation d'échantillons pour permettre l'analyse de produits complexes en utilisant des appareils de laboratoire classiques.

1.4.1. Polymères synthétiques

L'application qui est peut être la plus large de la pyrolyse analytique concerne les polymères synthétiques, aussi bien comme point de départ d'analyse de produits et de contrôle qualité, que comme contrôle de longévité, de dynamique de dégradation et de stabilité thermique des polymères.

Des homopolymères peuvent être distingués les uns par rapport aux autres. Par exemple, citons le poly(éthyléne) par rapport au poly(propyléne) (figure 1.4.1) ou le poly(méthylméthacrylate) du poly(butyl méthacrylate).

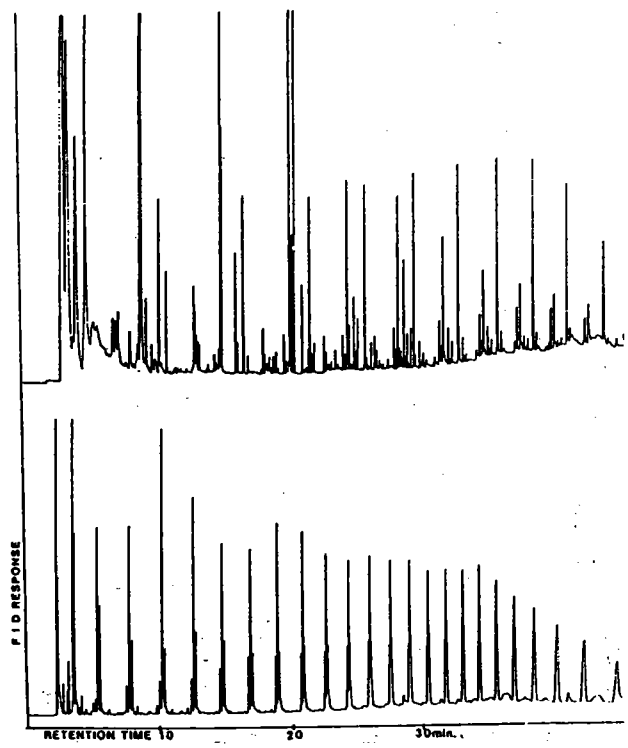


Figure 1.4.1 Pyrogrammes de polypropylène et de polyéthyléne (750°C, 10 s.) [3]

De plus, puisque la pyrolyse génère dans de nombreux cas des fragments qui possèdent la structure moléculaire de départ, il est possible de

faire des distinctions plus précises. Des études sur les défauts de structure, les ramifications, les liaisons tête-à-tête et queue-à-queue ont été réalisées.

Des études sur des copolymères ont permi d'identifier les monomères impliqués et même les quantités relatives de chaque monomère présent dans le polymère final [4,5]. On peut aussi étudier la stéréochimie de polymères car le positionnement de groupes orientés différemment stéréochimiquement donne des pyrolysats différents [6].

Quand un copolymère est pyrolysé, le pyrogramme obtenu peut être assez compliqué, comme dans le cas de polyoléfines, ou plus simple si la chaîne polymérique se fragmente en un seul type de monomère.

Si les monomères sont tous des méthacrylates par exemple, le pyrogramme montrera des pics majoritaires correspondant à chaque monomère mis en jeu [7].

Il est possible d'obtenir des informations indiquant si l'échantillon est un mélange physique d'homopolymères, ou s'il résulte de la copolymérisation de monomères. Dans ce dernier cas, les fragments présents comporteront les molécules des deux monomères.

Il est possible d'identifier de petits fragments provenant de l'un ou l'autre des monomères, et donc d'étudier l'effet des concentrations relatives des monomères sur l'abondance des pics spécifiques du pyrogramme.

1.4.2. Criminalistique

L'application de la pyrolyse à l'étude d'affaires en criminalistique a une longue histoire bien documentée dont une étude de la pyrolyse couplée à la spectrométrie de masse en 1977 par Saferstein et Manura [8], et une revue générale par Wheals [9]. Une large variété d'échantillons a été étudiée comme du chewing-gum, des éléments caoutchouteux et plastiques d'automobiles, des drogues et des taches de sang.

L'application la plus répandue est l'analyse d'écailles de peinture, une application standard de nombreux laboratoires aidés par d'importantes bibliothèques de pyrogrammes et d'exemples de produits. Munson et coll. [10] ont décrit leur travail utilisant la pyrolyse couplée à la CG/MS pour l'analyse d'échantillons de peinture, et Fukuda [11] a publié des résultats sur presque 80 types de peintures utilisées dans l'industrie automobile japonaise. La même technique peut être appliquée à des peintures de façades, des revêtements de surface comme les vernis pour instruments de musique.

Il n'est pas toujours nécessaire d'identifier tous les constituants du produit pour effectuer des comparaisons entre peintures. Par exemple,

l'inversion de l'abondance relative de pics prépondérants dans des pyrogrammes de diverses peintures peut suffire à les différencier.

1.4.3. Fibres et textiles

Presque tous les vêtements sont faits de fibres de polymères naturels comme les protéines de soie et de laine, la cellulose du coton, ou de polymères synthétiques comme les nylons et les polyesters, ou d'un mélange des deux (naturel et synthétique). Comme ces polymères sont chimiquement différents, les pyrolysats résultant sont tous distincts et permettent réellement d'analyser les fibres.

Tsuge et coll. [12] ont réalisé un travail significatif pour analyser et comparer différents nylons. Une étude comparable a été réalisée par Saglam [13] sur des copolymères de méthacrylate/acrylonitrile et acrylate. Un article de revue d'analyse de fibres par pyrolyse couplée à la spectrométrie de masse a été publié par Huges et coll. [14].

1.4.4. Papiers, encres et photocopies

Le papier, constitué principalement de cellulose, les encres d'imprimerie, de stylos et de photocopies, ont été analysés par pyrolyse, sous forme de produits purs ou complexes, provenant de documents réels. Zimmerman et coll. [15] ont utilisé la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse pour étendre l'identification spécifique de rouleaux de photocopieuses. L'encre de stylos à bille, différents papiers et l'empreinte de photocopieurs ont été analysés en utilisant une combinaison d'échantillons de référence et de pyrolyses par Wampler et Levy [16].

1.4.5. Oeuvres d'art et pièces de musées

Des oeuvres d'art de valeur comme les peintures, les meubles et les pièces archéologiques sont souvent étudiées par pyrolyse des matériaux non volatiles utilisés dans leur confection. Les peintures, vernis, glus, pigments, cires et reliures sont analysés dans des buts d'authentification et/ou de conservation. [17,18]

1.4.6. Produits naturels et biologiques

Un domaine d'étude en pyrolyse qui voit son intérêt grandir rapidement est l'application aux biopolymères et aux produits naturels. Bien que les sources de carburant [19,20], les produits pétroliers [21,22] et les charbons [23,24] soient étudiés depuis des décennies, des analyses récentes par pyrolyse ont été menées sur ces composés, de même que sur les produits du sol [25], les micro-organismes [26,27] et la biomasse [28].

Bien que les échantillons biologiques soient plus complexes que des polymères purs, leur dégradation doit suivre les mêmes types de processus chimiques, produisant une distribution d'éléments volatils, qui, même complexe, est aussi représentative du produit de départ.

Les biopolymères comprennent les polyamides, comme les protéines et les polysaccharides ou la cellulose. Les produits biologiques sont des systèmes complexes basés sur de tels biopolymères, avec d'autres composants, parfois caractéristiques. Le bois par exemple, constitué des macromolécules de base cellulose et lignine ; présente différentes essences définies par la présence et la quantité de substances additionnelles, pouvant inclure des terpènes.

α α α

1.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. W.I. Irwin, *Analytical Pyrolysis : A Comprehensive Guide*, Marcel Dekker, New-York (1982)
2. S.A. Liebman and E.J. Levy, *Pyrolysis and GC in Polymer Analysis*, Marcel Dekker, New-York (1985)
3. S. Tsuge, Y.Sugimura, T. Nagaya, T. Murata et T. Takeda, *Macomolecules*, 13, 928-932 (1980)
4. J.J. Shen and E. Woo, *LC/GC, 6*, 11: 1020-1022 (1988)
5. D.Weber, *Int. Lab.*, 9, 51-54 (1991)
6. S. Tsuge, Y. Sugimura and T. Nagaya, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 1, 221-229 (1980)
7. S.C.Israel, W.C. Yang and M. Bechard, *J. Macromol. Sci. Chem.*, A22 (5-7), 779-801 (1985).
8. R. Saferstein and J.J. Manura, *J. Forens. Sci.*, 22, 749-756 (1977)
9. B.B. Wheals, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 2, 277-292, (1981)
10. T.T. Munson, D.G. McMinn and T.L. Carlson, *J; Forens. Sci.*, 30, 1064-1073 (1985)
11. K. Fukuda, *Forens. Sco. Inter.*, 29, 227-236 (1985)
12. S. Tsuge, H. Ohtani, T. Nagaya and Y. Sugimura, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 4, 117-131 (1982)
13. M. Saglan, *J. Appl. Polymer. Sci.*, 32, 5717-5726 (1986)
14. C. Hughes, B.B. Wheals and M.J. Whitehouse, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 103, 482-491 (1978)
15. J. Zimmerman, D. Mooney and M.J. Kimmet, *JFSCA*, 31, 2, 489-493 (1986)
16. T.P. Wampler and E.J. Levy, *LC-GC*, 4, 11, 1112-1116 (1987)
17. P. Richardin, S. Bonnassies et F. Flieder, *Les documents graphiques et photographiques*, Archives nationales, Paris (1986)
18. G. Chivari, G.C. Galletti, G. Lanterna and R. Mazzeo, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 24, 227-242 (1993)]
19. R.P. Philip, *Org. Geochem.*, 6, 489-501 (1984)
20. H. Bar, R. Ikan and Z. Aizenshtat, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 1, 222-229 (1980)
21. A.J. Barwise, A.L. Mann, G. Eglinton, A.P. Gowear, A.M. Wardroper and C.S. Gutteridge, *Org. Geochem.*, 6, 343-349 (1984)
22. A.K. Burnham, R.L. Braun, H.R. Gregg, A.M. Samoun, *Energy Fuels*, 1, 452-458 (1987)
23. J.J. Delpuech, D. Nicole, D. Cagniat, P. Cleon, M.C. Foucheres, D. Dumay, J.P. Aune and A. Genard, *Fuel. Proc. Technol.*, 12, 205-241 (1986)
24. A.M. Harper, H.L.C. Meuzelaar, P.H. Given, *Fuel*, 63, 793-802 (1984)

25. J.M. Bracewell and G.W. Robertson, *Geoderma*, 40, 333-344 (1987)
26. H. Engman, H.T. Mayfield, T. Mar, W. Bertsch, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 6, 137-156 (1984)
27. C. Gutteridge, *Meth. Microbiol.*, 19, 227-272 (1987)
28. T.A. Milne and M.N. Soltys, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 5, 111-131 (1983)

2. Pyrolyse thermique et spectrométrie de masse

2.1. INTRODUCTION

La spectrométrie de masse associée à la pyrolyse peut prendre deux formes instumentales voisines faisant généralement appel à un analyseur quadripolaire :

- ✓ la pyrolyse MS, donne une empreinte spectrale globale du mélange de molécules formées lors de la pyrolyse. Le montage du système commercial RAPyD 400 illustre cette technique.
- ✓ la pyrolyse GC/MS, les pyrolysats sont séparés par chromatographie en phase gazeuse, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Nous exposons le montage pyrolyseur - GC/MS de notre laboratoire.

L'ionisation des molécules est, dans les deux cas de figure, faite par impact électronique ou ionisations chimiques. Nous rappelons les principes généraux de l'impact électronique, seul mode d'ionisation utilisé lors de ce travail.

2.2. *L'IMPACT ELECTRONIQUE*

Les deux modes d'ionisation accessibles avec un spectromètre de masse à filtre quadripolaire sont l'impact électronique et l'ionisation chimique en mode positif ou négatif.

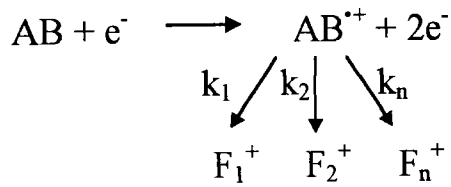
Dans notre travail, nous avons uniquement utilisé l'impact électronique à 10 eV et à 70 eV. Seul ce mode sera donc développé.

2.2.1. Principe

L'interaction entre les électrons accélérés et les molécules neutres présentes dans la source du spectromètre de masse conduit à des ions positifs et négatifs.

Dans le cas présent, seuls les ions positifs majoritairement créés par impact électronique sont pris en compte. La principale réaction de formation des ions positifs est :

l'ionisation simple



AB : molécule de départ,
k_x : constante de vitesse,
F_x^+ : fragments.

Un électron entre en collision avec la molécule AB et provoque l'éjection d'un électron.

Dans les conditions usuelles, la formation d'ions moléculaires doublement chargés est négligeable. (1)

2.2.1.1. Courbe d'ionisation

Les variations de courant d'ions en fonction de l'énergie des électrons ionisants sont représentées par une courbe d'ionisation (figure 2.2.1). Celle-ci se compose de quatre parties:

- ✓ une zone seuil,

- ✓ une zone linéaire de croissance rapide,
- ✓ un maximum,
- ✓ puis une zone de décroissance lente (2).

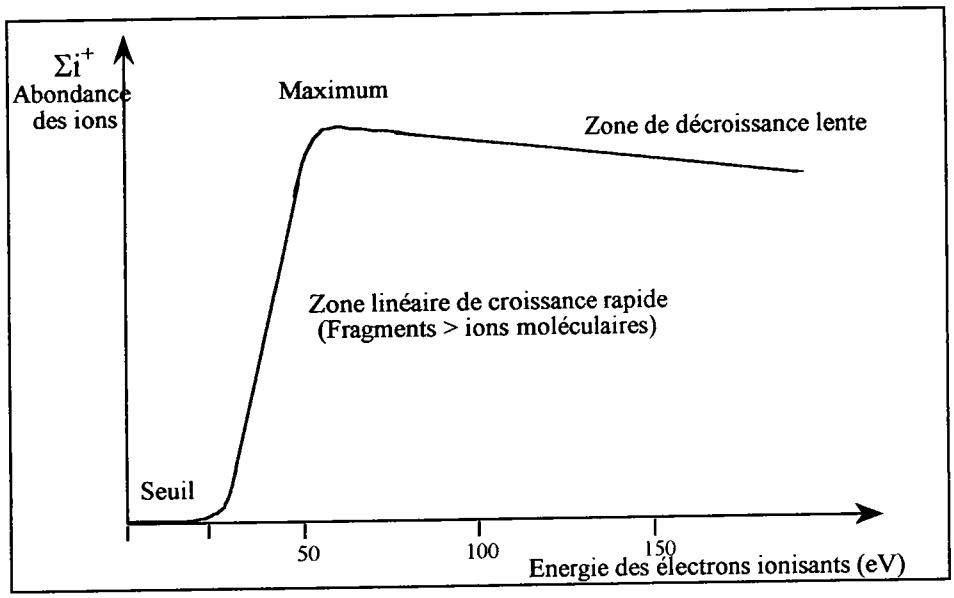


Figure 2.2.1 Courbe d'ionisation représentant l'abondance des ions (Σi^+ : somme ionique) en fonction de l'énergie des électrons incidents.

L'efficacité d'ionisation croit rapidement pour une énergie comprise entre 15 et 40 eV. Un maximum est atteint aux environs de 50 eV pour la plupart des molécules organiques.

Le potentiel d'ionisation d'une molécule est l'énergie nécessaire pour arracher un électron de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie. Il correspond approximativement au seuil de la courbe relative au courant d'ions total (TIC).

Pour une substance donnée, il est possible d'accroître le taux d'ionisation en augmentant :

- ✓ l'énergie des électrons (cf. courbe d'ionisation),
- ✓ la quantité des électrons émis (courant d'émission),
- ✓ la quantité d'échantillon dans la source, bien qu'une forte pression puisse entraîner l'apparition de réactions ions-molécules.

2.2.1.2. Conclusion

L'impact électronique est un mode d'ionisation qui offre de nombreux avantages :

- ✓ une grande souplesse d'utilisation,
- ✓ une bonne efficacité d'ionisation,
- ✓ un contrôle précis de l'intensité du faisceau d'électrons,
- ✓ une stabilité et une reproductibilité du processus d'ionisation (à 70 eV).

Son principal inconvénient est en général la très faible proportion d'ions moléculaires présents dans le spectre de masse. Il est toutefois possible de favoriser leur formation en diminuant l'énergie des électrons jusqu'à une valeur voisine de 10 eV ou mieux, en utilisant l'ionisation chimique.

A l'inverse, les nombreux fragments obtenus permettent de vérifier ou d'élucider rapidement, en combinaison avec d'autres techniques (spectre IR, UV, RMN, etc...), la structure chimique de la substance analysée.

Enfin, les spectres de masse de référence qui servent à l'élaboration de bibliothèques sont tous réalisés en impact électronique à 70 eV.

Pour faciliter l'exploitation des spectres de masse, beaucoup d'auteurs ont proposé des processus types de fragmentations pour une grande quantité de molécules organiques (3, 4, 5).

α α α

2.3. LA PYROLYSE PAR POINT CURIE/MS

Le premier couplage pyrolyseur/spectromètre de masse a probablement été décrit par Meuzelaar et Kistemaker en 1973 (6).

Cet instrument utilisait la méthode de pyrolyse par point Curie décrite par Giacobbo et Simon (7), et était basé sur un spectromètre de masse quadripolaire. Ce système donna naissance à deux instruments commerciaux, cependant leur coût était trop élevé.

Il fallu attendre des modèles automatisés et des systèmes de traitement de données statistiques performants pour obtenir des appareils plus abordables et plus aisés d'utilisation. Un des couplages les plus récents, le RAPyD 400 (Horizon Instruments), offre une gamme de masse de 12 à 400 u.

La pyrolyse MS a trouvé de nombreuses applications en microbiologie, géochimie, et en sciences du sol et des polymères (8).

2.3.1. Description du montage commercial RAPyD 400

Cet instrument utilise un spectromètre de masse quadripolaire, la volatilisation et l'introduction des échantillons sont assurées par un chauffage par point Curie.

Le système est automatisé et peut contenir jusqu'à 150 échantillons qui sont immédiatement analysables.

Le système comporte trois éléments de base, voire la figure 2.3.1 :

- le système de vide (pompe turbomoléculaire)
- le système d'introduction
- l'analyseur quadripolaire

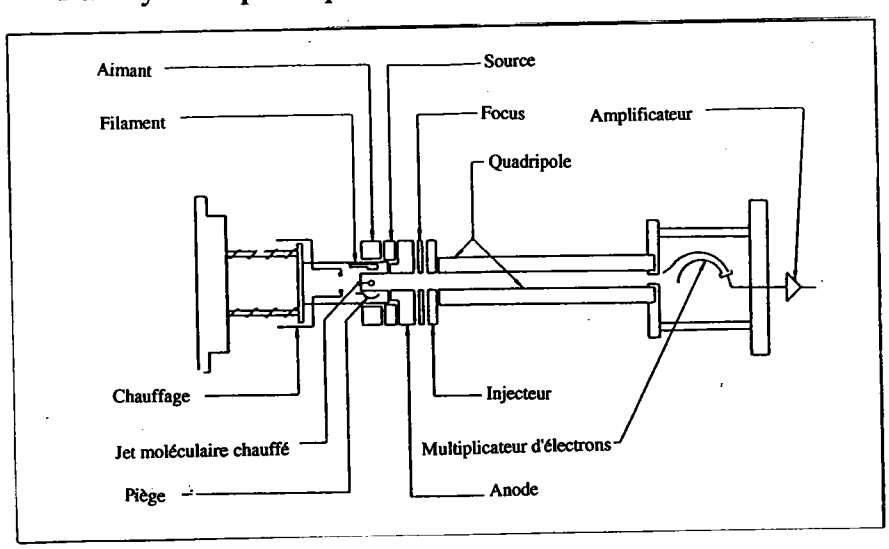


Figure 2.3.1 Schéma général du RAPyD 400

Le système d'introduction de l'échantillon est connecté à la source d'ions par un tube chauffé. Autour de la source est placé un doigt froid réfrigéré par de l'azote liquide, qui capte le surplus de produits issus de la pyrolyse, permettant d'éviter toute interférence entre deux analyses.

A tour de rôle, chaque tube placé dans le chargeur automatique, est présenté au système d'introduction. Le joint, qui obture le tube d'échantillonnage est utilisé pour créer un espace clos contre la source d'ions. L'air contenu dans le tube est évacué, ce qui permet de créer un espace d'expansion entre l'échantillon et la source d'ions.

Quand une pyrolyse est effectuée, le pyrolysat s'étend dans l'espace vacant et atteint la source d'ions par un passage chauffé. En arrivant dans la source d'ionisation, le gaz de pyrolysats est soumis à un bombardement électronique d'une énergie nominale de 25 eV. Les molécules ionisées résultantes sont accélérées vers l'analyseur quadripolaire. Le spectre de masse des pyrolysats est enregistré à l'aide d'un multiplicateur d'électrons opérant en mode compte/pulse.

2.3.2. L'analyse des données

Afin de réduire la complexité du spectre de masse obtenu pour l'ensemble des molécules issues d'une même pyrolyse, on fait appel à des traitements statistiques.

Ces techniques numériques permettent l'identification ou la différenciation des substances chimiques. C'est un moyen de faire des mesures quantitatives relativement plus simples, et ensuite d'utiliser les données obtenues pour avoir un plus grand nombre d'informations sur les différences entre les échantillons.

La spectrométrie de masse est particulièrement adaptée à l'analyse statistique des données pour deux raisons :

- ✓ en spectrométrie de masse quadripolaire, la résolution ($m/\Delta m$) est constante. Si $z = 1$, la séparation entre deux pics est d'une unité de masse atomique. Les ions sont enregistrés selon une certaine gamme de masses entières,
- ✓ il est possible de mesurer (et de numériser) l'intensité relative des ions pour chaque rapport masse/charge. Le résultat se présente sous forme d'une matrice de données à deux dimensions pour chaque composé analysé.

Les méthodes statistiques à variables multiples permettent de réduire la complexité de ces matrices à une forme plus interprétable, généralement des graphiques en deux ou trois dimensions seulement. Ceci est réalisé par l'analyse en composantes principales, l'analyse par variables canoniques et les analyses d'agrégation.

2.3.3. Les avantages

- ✓ Les spectres de masse sont caractéristiques des échantillons et permettent des identifications par ''empreinte spectrale''.
- ✓ Les analyses sont très rapides.
- ✓ L'échelle de masse linéaire et reproductible facilite la collection de renseignements pour le traitement informatique.
- ✓ Le transfert des molécules du pyrolyseur au spectromètre de masse est très efficace permettant une grande sensibilité de détection des molécules.
- ✓ Le système est facilement automatisable.
- ✓ La rapidité d'analyse permet le passage d'étalons pouvant donner des renseignements sur la nature de l'échantillon analysé.

2.3.4. Les inconvénients

- ✓ Un seul composé peut donner plusieurs pics sur le spectre.
- ✓ Plusieurs composés peuvent donner le même ion fragment.
- ✓ Les composés isomériques ne sont pas différenciés car ils donnent le même pic sur le spectre de masse.

2.4. LE COUPLAGE PYROLYSE GC/MS

2.4.1. Introduction

Le couplage de la pyrolyse avec un système de chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse permet d'allier les avantages de séparation de la chromatographie avec ceux de détection et d'identification de la spectrométrie de masse. Il est appliqué à l'étude des mélanges gazeux de composés pyrolysés.

Nous avons choisi un pyrolyseur à filament résistif (description chapitre I) qui permet d'utiliser une large gamme continue de températures (incrément de 1°C). L'analyse d'échantillons polymériques, quelquefois de type inconnu, nécessite un accès rapide à des températures de pyrolyse différentes.

Cet appareil permet d'analyser des échantillons aussi bien solides que liquides. De plus, l'introduction de l'échantillon avec une sonde permet de retirer aisément les résidus non vaporisés après pyrolyse de l'enceinte.

La multitude de produits formés par pyrolyse de produits polymériques naturels nous a conduit à opter pour une séparation chromatographique préalable à l'analyse par spectrométrie de masse. Le tri effectué par la colonne permet d'individualiser chaque molécule et d'obtenir un spectre de masse caractéristique.

L'identification de chaque molécule est plus facile que dans un spectre global de pyrolyse MS. La recherche des mécanismes de pyrolyse est aussi facilitée.

2.4.2. L'appareillage GC/MS

Le montage de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie comporte, classiquement (figure 2.4.1) :

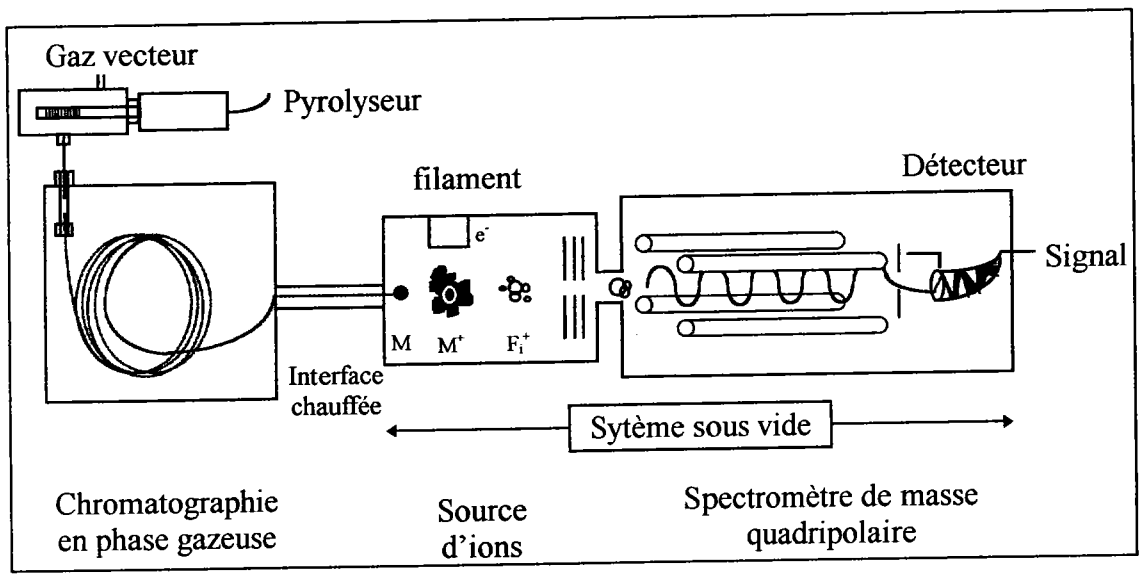


Figure 2.4.1 Schéma de principe du GC/MS (HP 5890 A)

- ✓ Un chromatographe en phase gazeuse comprenant un système de régulation en gaz vecteur, une colonne de chromatographie située dans un four programmable en température, un système de transfert de l'échantillon en phase vapeur vers la source du spectromètre de masse.
- ✓ Une source d'ions qui ionise la substance à analyser, formant des espèces ioniques différentes qui seront accélérées, focalisées et conduites vers le filtre de masse.
- ✓ Un filtre de masse ou analyseur qui sépare les espèces ioniques en faisceaux distincts, individualisés et caractérisés par le rapport masse/charge des ions qui composent chacun d'eux.
- ✓ Un détecteur (multiplicateur d'électrons à dynode continue) qui collecte les ions et amplifie le signal obtenu.
- ✓ Un système de pompage qui maintient le vide entre 2.10^{-6} et 5.10^{-7} torr dans tout le spectromètre de masse, composé de pompes à palettes qui assurent le vide primaire et de pompes à diffusion pour le vide plus poussé.
- ✓ Un ensemble informatique dont les fonctions sont l'intégration, le traitement et le stockage des données.

2.4.2.1. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie gazeuse (GC) constitue la première étape de la séparation bidimensionnelle réalisée par le couplage GC/MS.

Introduite dès 1952 par James et Martin, la chromatographie gaz-liquide (CGL) peut être définie comme une méthode de migration différentielle, affectant deux ou plusieurs composés d'un mélange, par entraînement au moyen d'une phase mobile gazeuse et passage sur une phase fixe dite stationnaire qui présente une affinité distincte pour chacun des composés à séparer. Entre ces deux phases s'établit une succession d'échanges aboutissant à des équilibres.

Dans le type de chromatographie retenue, la phase mobile est gazeuse et la phase stationnaire est un film (9,10).

2.4.2.1.1. Le système d'injection

La substance à analyser, migrant dans la phase mobile gazeuse, doit se trouver à l'état de vapeur à l'intérieur de la colonne. La volatilisation a lieu dans l'injecteur du chromatographe pour les échantillons liquides. Dans le cas des composés issus de la pyrolyse, l'état gazeux y est maintenu.

Nous allons décrire deux types d'injecteur :

- ✓ Split/splitless (avec ou sans division),
- ✓ ''On-column'' (dans la colonne).

L'injecteur Split (avec division)

L'injecteur en division conventionnel est à vaporisation flash.

La fraction liquide, introduite avec une seringue, est immédiatement volatilisée et une petite fraction des produits vaporisés est introduite dans la colonne, tandis que la majeure partie est ventilée vers l'extérieur (figure 2.4.2).

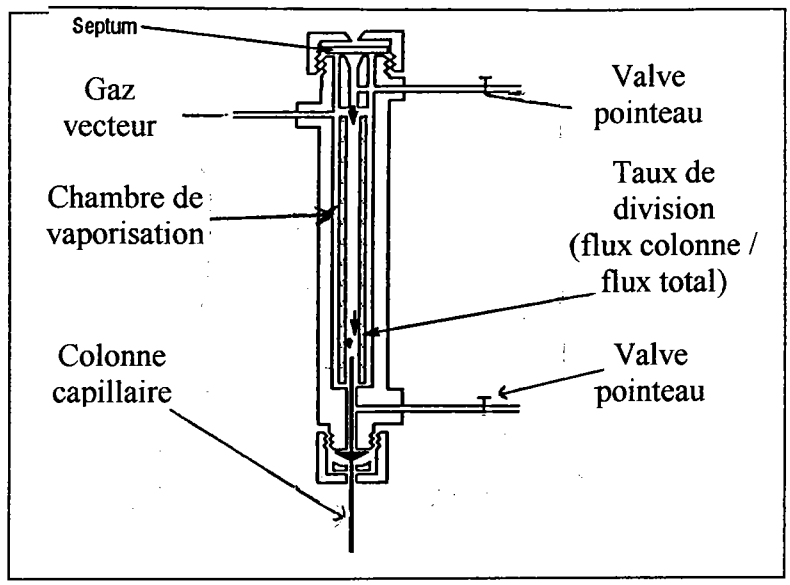


Figure 2.4.2 Injecteur avec division

Ce type d'injecteur induit des discriminations de détection des différents composés, dues à la quantité, la volatilité et la polarité de chacun d'entre eux. La non linéarité peut être minimisée par une évaporation complète de l'échantillon, suivie d'une homogénéisation avec le gaz porteur avant l'introduction dans la colonne. Ceci peut se faire par :

- ✓ une augmentation de la température d'injection;
- ✓ une optimisation de la configuration de la chambre d'injection (forme des liners[1]) (figure 2.4.3).

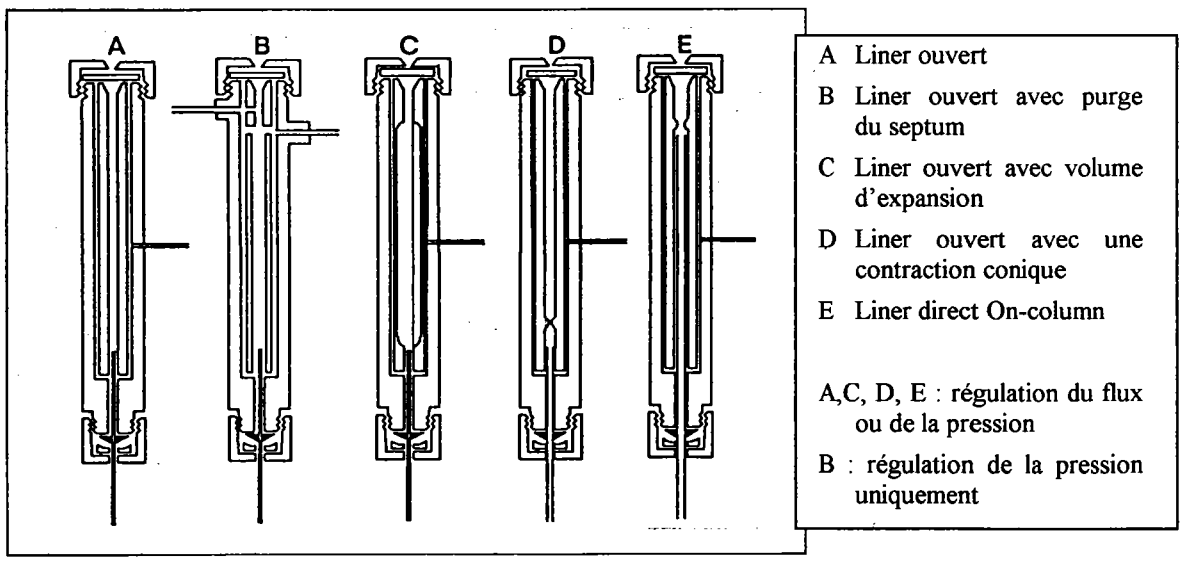


Figure 2.4.3 Forme des liners

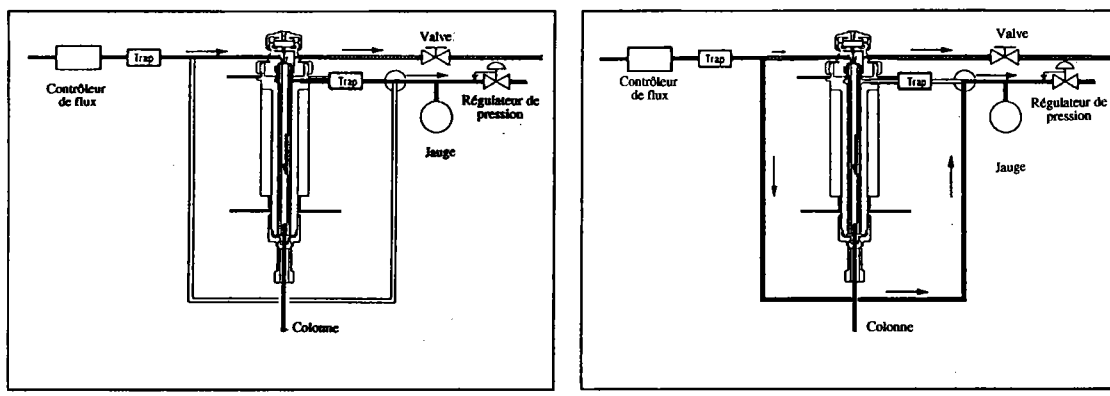
[1] liner : tube en quartz de géométrie variable permettant la vaporisation des molécules et leur mélange au gaz vecteur.

L'injecteur Splitless (sans division)

Dans cette configuration, la totalité de l'échantillon est injecté dans la colonne.

Après l'injection, on applique un temps de latence (de 30 à 80 sec.) pendant lequel les vapeurs solvant-solutés peuvent atteindre la colonne. Les vapeurs résiduelles sont évacuées vers la ligne de purge.

L'intervalle de temps entre l'injection et la ventilation est fonction du solvant, des solutés, du volume de la chambre de vaporisation, du volume injecté, de la vitesse d'injection et de la vélocité du gaz vecteur.



Représentation de l'injecteur avant et après l'injection.

Représentation de l'injecteur pendant l'injection

Figure 2.4.4 Représentation schématique de l'injecteur sans division

Les performances de l'injecteur sans division dépendent de l'optimisation des variables expérimentales suivantes :

- la taille de l'échantillon,
- la vitesse d'injection,
- le temps de purge,
- la température d'injection,
- la température initiale de la colonne,
- la sélection du gaz porteur,
- le taux de flux.

Des règles ne peuvent pas être avancées et certaines des variables ne peuvent être ajustées que par des essais successifs.

Cependant, certaines erreurs caractéristiques peuvent être éliminées. En injection sans division, la largeur des pics est affectée par deux phénomènes :

✓ Elargissement des pics dans le temps, qui est dû au transfert lent de la chambre de vaporisation vers la tête de colonne (quelques millisecondes). Il est éliminé par deux techniques :

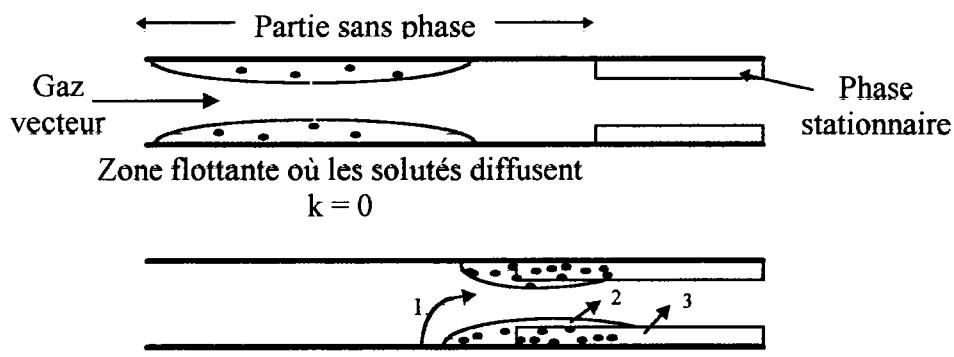
✗ *l'effet de solvant* : la température de la colonne est inférieure de 20 à 30°C à la température d'ébullition du solvant. Le solvant se concentre en tête de colonne où il est retenu par la phase stationnaire. Ce bouchon liquide agit temporairement comme un film de phase stationnaire épais, retenant les solutés vaporisés.

✗ *la focalisation thermique* : le solvant reste vaporisé tandis que les solutés sont condensés sur la phase stationnaire. La température de la colonne est supérieure à la température de vaporisation du solvant.

✓ Elargissement des pics dans l'espace, une fois dans la colonne, les solutés se répandent dans une partie de la longueur de la colonne, principalement en inondant la phase liquide.

✗ Un Piège de rétention (''*Retention Gap*''), longueur de colonne sans phase placée avant la colonne de séparation, permet de réduire ce phénomène.

Les solutés ont un taux de partition k proche de zéro. Après l'évaporation du solvant, tous les solutés répandus dans la partie flottante sont amenés dans la phase de la colonne où ils sont retenus (figure 2.4.5).



1. Solvant et solutés se déplacent dans la zone flottante de l'arrière vers l'avant.
2. Concentration des solutés dans le solvant : k solutés = 1 à 5 fois k solvant
3. Concentration des solutés dans la phase stationnaire: k solutés >> k

Figure 2.4.5 Mode de fonctionnement du Retention Gap

L'injecteur On-Column (sur colonne)

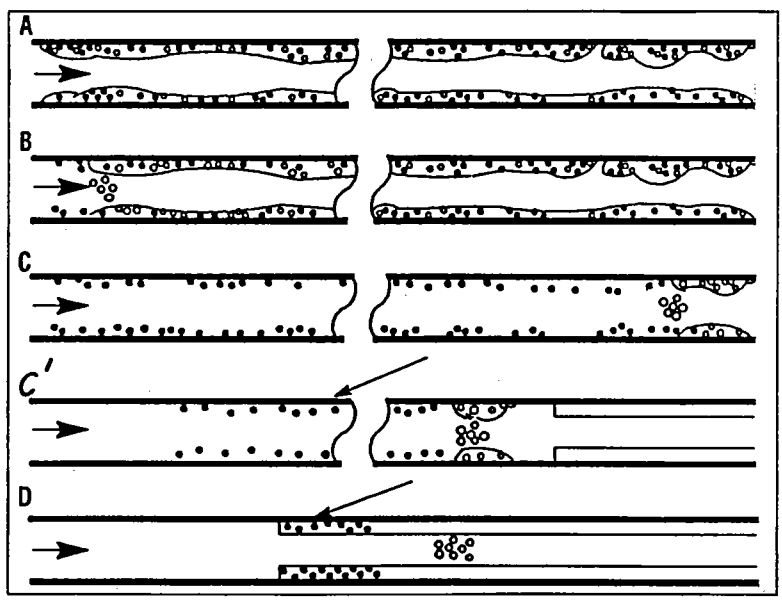
Le système permet d'introduire les échantillons directement dans la colonne.

Certains paramètres sont en relation les uns avec les autres : la température initiale de la colonne, la nature du solvant, le taux d'injection, le volume injecté et l'échelle d'ébullition des composés de l'échantillon.

Cette technique est idéale pour les échantillons de volume compris entre 0,5 et 2 µl. L'injection doit être faite le plus rapidement possible avec une température de four inférieure ou égale au point d'ébullition du solvant.

L'injection rapide permet une diffusion rapide de l'échantillon dans la colonne sans discrimination de volatilité ou de composition chimique.

La température du four doit être plus élevée que pour une injection sans division. En effet, l'échantillon doit être évaporé instantanément. Pendant l'injection, solvant et solutés s'étalent dans la phase stationnaire jusqu'à ce qu'un film stable de solvant soit formé par le gaz vecteur. Il est essentiel de réduire la longueur mouillée, car les solutés sont distribués sur toute la distance (figure 2.4.6).



A L'échantillon est distribué sur la zone humide.

B Les composés les plus volatils commencent à se condenser dans le solvant.

C Les composés les moins volatils restent sur la phase stationnaire.

C' Les composés volatils sont recondensés par le piège solvant, pendant que les composés moins volatils se distribuent le long de la zone humide.

D La refocalisation peut être effectuée en appliquant un piège de rétention.

Figure 2.4.6 Représentation de l'injection On-column

En absence de solvant, comme dans le cas de la pyrolyse, la condensation des composés sur la colonne est induite par une température faible de l'injecteur et/ou de la colonne. En utilisant un piège cryogénique, la condensation en tête de colonne est rapide. La longueur de phase mouillée est réduite ce qui améliore la forme des pics et la résolution.

✓ Ses avantages : élimination des discriminations,
élimination d'altérations de l'échantillon,
haute précision analytique,
indépendance de l'opérateur.

✓ Ses désavantages : les échantillons doivent être relativement propres,
les composés non volatils peuvent migrer dans la colonne,
les échantillons doivent être dilués.

2.4.2.1.2. Le gaz vecteur

Le choix du gaz vecteur se fait par l'observation des courbes de Van Deemter (figure 2.4.7).

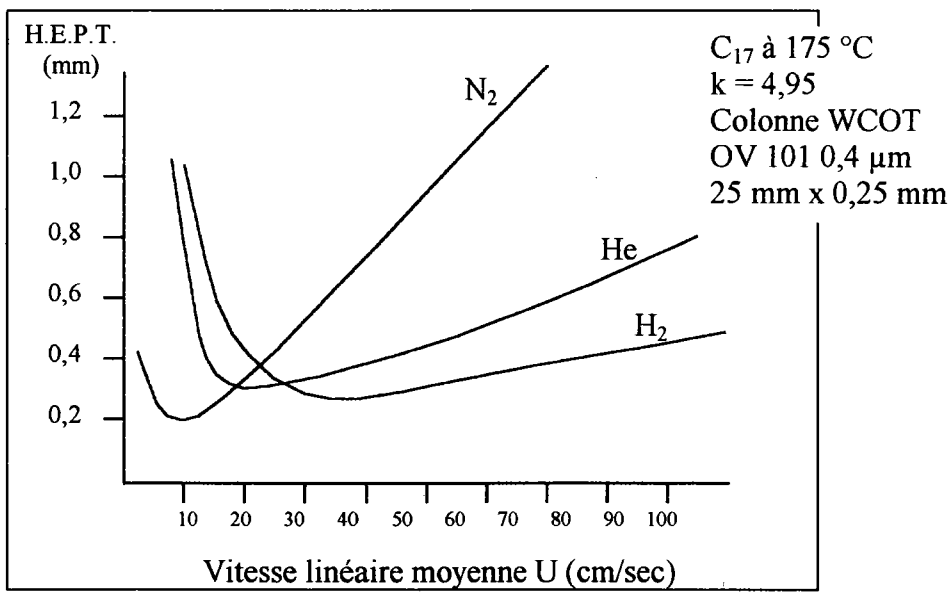


Figure 2.4.7 Courbe de Van Deemter représentant H.E.P.T. = f(U)

Ces hyperboles, caractéristiques des trois gaz les plus couramment utilisés, représentent la valeur de la H.E.P.T. (Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique) en fonction de U (vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur). Rappelons que la notion de H.E.P.T. est directement liée au nombre de plateaux théoriques n qui permet d'estimer l'efficacité de la colonne de chromatographie (11, 12).

$$HEPT = L/n$$

L : longueur de la colonne
n : nombre de plateaux théoriques

Pour un gaz donné, il correspond à une valeur critique de U (U opt.) une hauteur équivalent à un plateau théorique minimum (H.E.P.T. min.) pour laquelle l'efficacité de la colonne est optimale (13).

Pour des vitesses linéaires moyennes plus grandes que la valeur de U opt., la perte d'efficacité de la colonne est moindre avec l'usage de l'hélium ou de l'hydrogène. L'utilisation de ces deux gaz permet de travailler avec des vitesses plus grandes que celles correspondant à l'optimum, diminuant notablement le temps d'analyse, sans pour cela altérer sévèrement les performances de la colonne.

2.4.2.1.3. Le four du chromatographe

C'est une enceinte close, thermostatée, dont la température peut être soit maintenue constante (mode isotherme), soit programmée dans le temps suivant différents gradients de température (mode programmation).

2.4.2.1.4. La colonne de chromatographie

C'est l'élément de base du chromatographe (14); son rôle est de séparer complètement les différents constituants d'un mélange complexe dans le temps le plus court possible avec les meilleures performances possibles.

Les colonnes capillaires sont constituées par un capillaire en silice fondue étiré sur une longueur variable (0,3 à 100 m) et gainé extérieurement d'un revêtement de Téflon.

La phase stationnaire est déposée sur la paroi interne du capillaire sous la forme d'un film dont l'épaisseur varie entre 0,12 et 0,25 µm, ménageant une lumière centrale de diamètre compris entre 0,2 et 0,3 mm.

La phase stationnaire permet de séparer les composés sur la base de leur point d'ébullition (phases non-polaires). Plus la polarité de la phase stationnaire augmente, plus les composés polaires sont retenus en fonction de l'interaction des dipoles et les liaisons hydrogène. Les composés polaires seront davantage retenus que les composés non-polaires.

Les qualités d'une colonne capillaire sont évaluées par quatre paramètres :

- ✓ l'efficacité, qui est fonction du nombre de plateaux théoriques n et donc de la hauteur équivalente à un plateau théorique :

$$HEPT = L/n = f(U)$$

- ✓ la sélectivité α qui rend compte de la position relative de deux pics consécutifs,
- ✓ la résolution R qui permet d'estimer le degré de séparation de deux pics consécutifs,
- ✓ le coefficient d'imprégnation C% qui évalue l'efficacité de remplissage de la colonne capillaire en phase stationnaire.

Dans notre stratégie d'analyse des matériaux polymériques, nous avons opté pour des phases stationnaires non-polaires (HP1). Ces phases séparent les composés essentiellement en fonction de leur point d'ébullition.

Les phases non-polaires permettent grâce à leur stabilité thermique d'explorer des températures allant de -60°C à 350°C. Un avantage supplémentaire de la stabilité thermique des phases est un bruit de fond très faible (faible décomposition de la phase), permettant de détecter les pics de faibles intensités.

Les longueurs de colonne sont de 25 mètres. Dans un souci économique, nous avons opté pour un changement régulier des colonnes plutôt qu'une meilleure séparation sur une colonne plus longue. Ce changement régulier permet d'avoir des performances correctes pour la recherche des éléments minoritaires présents dans le cas des polymères naturels, en particulier.

2.4.2.1.5. La ligne de transfert

L'emploi de colonne capillaire en silice fondue, parfaitement souple et pratiquement incassable, évite l'emploi de séparateurs (à jet moléculaire ou à membrane) toujours indispensables lors du couplage d'une colonne remplie à un spectromètre de masse. Les faibles débits en gaz vecteur (1 à 2 ml/min)

sont en effet compatibles avec le vide intense qui existe dans le compartiment source du spectromètre de masse.

La ligne de transfert entre le chromatographe en phase gazeuse et le spectromètre de masse est constituée par un capillaire métallique placé dans une enceinte chauffée et à l'intérieure de laquelle se trouve la colonne. Par ce couplage direct, les composés sont acheminés jusqu'à l'entrée de la source où ils pénètrent tour à tour en fonction de leur temps de rétention respectifs.

2.4.2.2. Le spectromètre de masse (Filtre quadripolaire, HP 5890 Série II)

2.4.2.2.1. La source d'ions

Les molécules neutres qui parviennent à l'intérieur du spectromètre de masse sont ionisées dans une chambre en acier inoxydable d'un volume réduit de l'ordre du cm^3. (15, 16, 17)

La source d'ions est composée des éléments suivants (figure 2.4.8) :

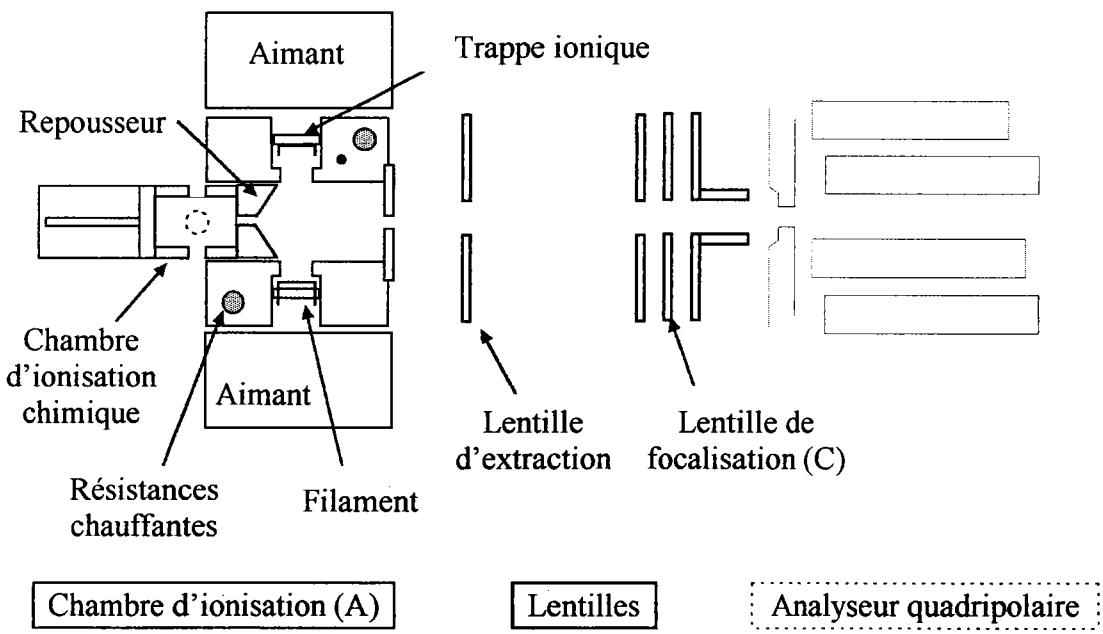


Figure 2.4.8 Schéma de la source d'ionisation

- un filament émetteur d'électrons,
- un collecteur d'électrons ou trappe ionique,
- une chambre d'ionisation (A),

- un repousseur,
- des lentilles d'extraction (B) et de focalisation (C),
- un système de chauffage et de contrôle des températures,
- un ensemble de deux aimants, qui impose une trajectoire hélicoïdale aux électrons émis, disposés de part et d'autre du filament et de la trappe ionique (D).

La géométrie de la chambre d'ionisation peut être modifiée permettant d'utiliser trois méthodes basées sur l'impact électronique (18) (figure 2.4.9) :

✓ l'impact électronique,

✓ les ionisations chimiques positive et négative.

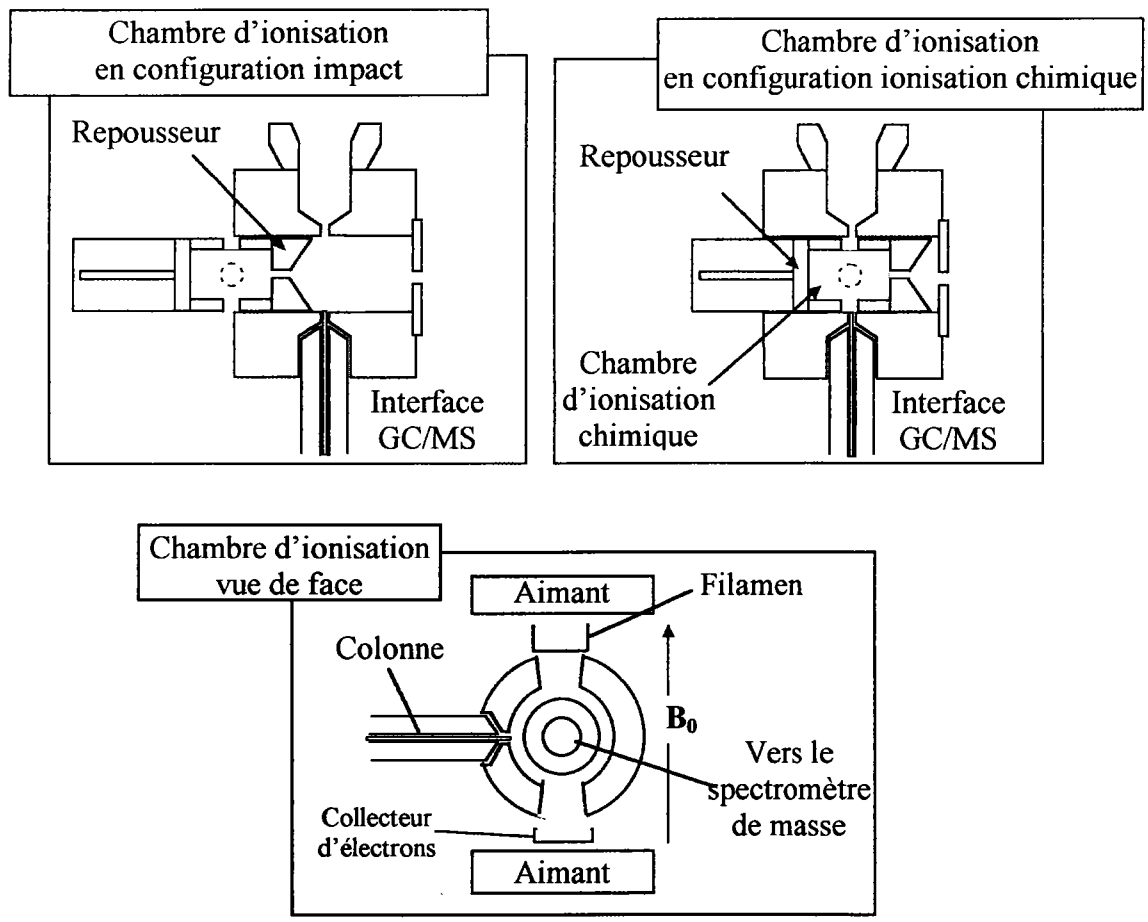


Figure 2.4.9 Représentation de la chambre d'ionisation dans les deux modes

2.4.2.2.2. Principe de fonctionnement de la source d'ions à impact électronique

Les molécules neutres introduites dans la chambre d'ionisation sont soumises à l'action d'un faisceau d'électrons obtenu par émission thermoélectronique à partir d'un filament en rhénium ou en tungstène porté à haute température (2000°C) (figure 2.4.10).

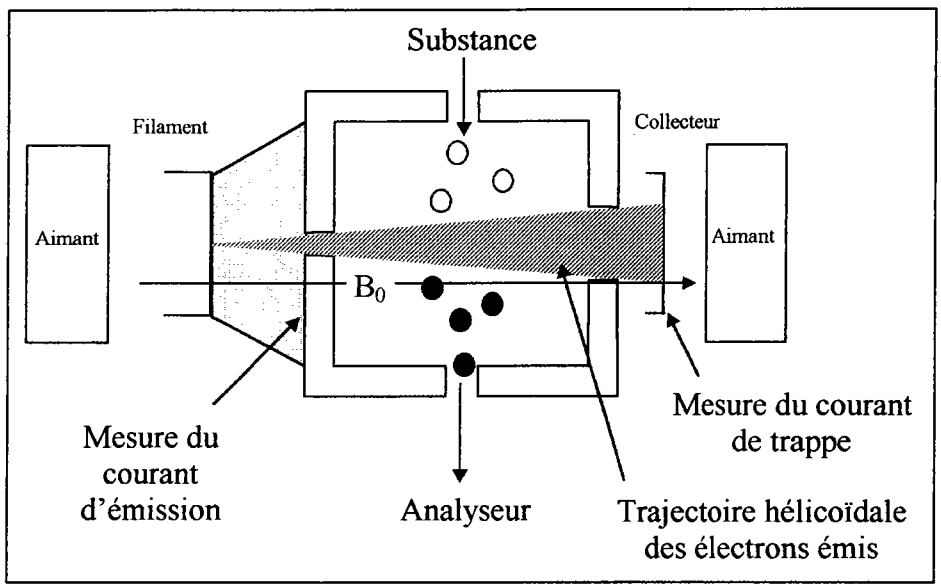


Figure 2.4.10 Fonctionnement de la source d'ions en mode impact électronique.

Les électrons sont accélérés au moyen d'une différence de potentiel appliquée entre le filament et le bloc source. Ils traversent la chambre d'ionisation et sont recueillis sur une anode ou trappe d'ions située à l'opposé du filament.

Durant leur traversée, un faible champ magnétique dirigé entre le filament et la trappe ionique impose aux électrons émis une trajectoire hélicoïdale qui accroît considérablement la probabilité de collisions avec les molécules neutres présentes dans la source.

Les électrons qui frappent la paroi de la source constituent le courant d'émission, dont l'intensité varie avec le chauffage du filament (3 à 4 ampères). Il représente la quantité d'électrons ionisants émis par le filament.

Les électrons qui pénètrent dans la source constituent le courant d'ionisation, dont l'intensité varie en fonction de l'intensité qui parcourt le filament.

Le courant d'électrons recueilli au niveau de la trappe (entre 100 et 200 mA) sert à réguler le chauffage du filament et donc la quantité d'électrons émis.

Un faible champ électrique transversal de quelques volts, créé par une électrode (le repousseur), provoque la sortie des ions.

Ils sont accélérés puis focalisés par une optique cylindrique composée de plaques métalliques parallèles, percées de fentes et portées à des potentiels convenables, qui procure l'énergie cinétique voulue aux ions. Le faisceau d'ions pénètre ensuite dans le filtre de masse.

La source d'ions est maintenue à une température de l'ordre de 200°C, pour éviter la condensation des produits à analyser sur les parois de la chambre d'ionisation.

2.4.2.2.3. Nécessité du vide

Le vide qui règne dans le compartiment source du spectromètre de masse est de l'ordre de 2.10^{-6} à 5.10^{-7} torr; ceci est nécessaire car (19) :

- ✓ les ions produits dans la source doivent atteindre le détecteur sans subir de collisions,
- ✓ pour des pressions supérieures à 0,5 torr, des réactions ions-molécules peuvent avoir lieu dans la source, ce qui modifie les fragmentations,
- ✓ l'air s'ionise avec l'échantillon, ce qui introduit des pics parasites dans le spectre de masse de l'échantillon,
- ✓ le filament et le détecteur sont particulièrement sensibles à l'oxygène.

La distance moyenne parcourue par une molécule neutre sans subir de collisions est appelée libre parcours moyen. A la pression de la source, il est de l'ordre de quelques dizaines de mètres ce qui est bien supérieur à la distance pour atteindre le détecteur (environ 50 cm).

Ainsi, les réactions ion-molécules sont pratiquement inexistantes. Le temps de résidence d'un ion dans la source du spectromètre de masse est d'environ de 10^{-6} s. : ce temps varie légèrement avec le potentiel du repousseur.

2.4.2.2.4. L'analyseur quadripolaire

Les performances d'un tel analyseur sont liées à trois paramètres (20) :

- ✓ la limite en masse qui détermine la valeur limite du rapport m/z mesurable,
- ✓ la transmission qui est le rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui produit dans la source,

✓ la résolution R qui définit la capacité à séparer deux pics de rapport m/z voisins. On admet que deux pis sont résolus lorsque l'intensité de la vallée entre ces pics égale 10% de l'intensité du pic le plus faible (résolution à 10%) (figure 2.4.11).

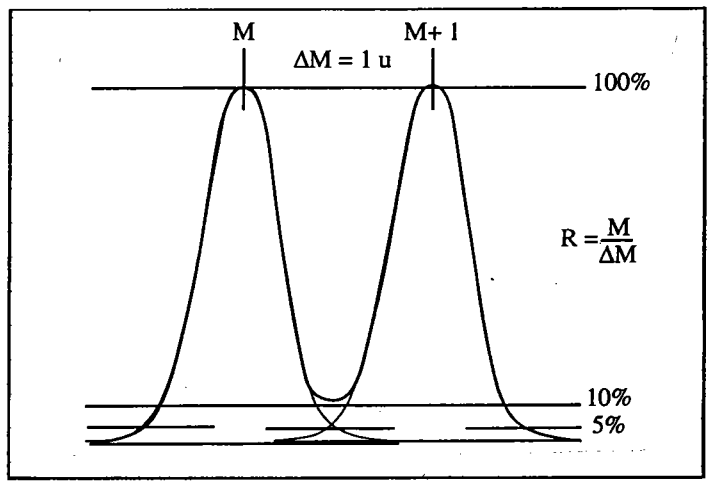


Figure 2.4.11 Définition de la résolution (M à 10 % de vallée)

Les premières utilisations du quadripôle comme analyseur en spectrométrie de masse ont été réalisées au début des années 1950 par Paul et Steinwedel (21). Son principe, particulièrement complexe, a été largement étudié par Campana (22) et Dawson (23).

Description du filtre de masse

Le but du filtre de masse ou analyseur de masse est de disperser le faisceau primaire, non résolu, composé d'ions moléculaires et de fragments obtenus à l'intérieur d'une chambre d'ionisation après impact électronique ou ionisation chimique, en faisceau d'ions individualisés caractérisés par leur rapport masse sur charge.

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre barres métalliques parallèles situées au sommet d'un carré. Les barres opposées, reliées électriquement deux à deux, sont portées au même potentiel $+\Phi_0$ ou $-\Phi_0$ et les barres adjacentes sont portées au potentiel opposé. Ce potentiel comprend une composante continue U et une composante sinusoïdale $V\cos\omega t$.

Equations de mouvement et principe de séparation des ions

Dans le système de coordonnées (x, y, z), les ions se déplacent selon l'axe z. Ils sont soumis au champ électrique dérivant du potentiel $\Phi(x,y)$ appliqué entre les barres. On a alors le système d'équations suivant (20, 22):

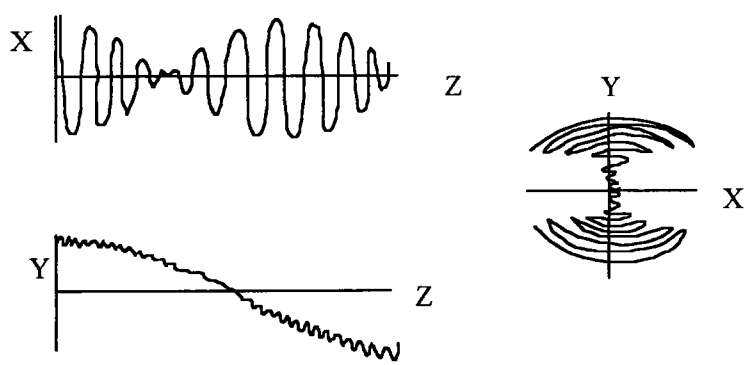
$$m(d^2x/dt^2) = -ze(\delta\Phi/\delta x)$$
$$m(d^2y/dt^2) = -ze(\delta\Phi/\delta y)$$
$$m(d^2z/dt^2) = 0$$
$$\Phi(x,y) = \Phi_0(x^2 - y^2)/r_0^2$$

Après calcul et en posant $u = x$ ou y, $\xi = \omega t/2$, $a_u = 8zeU/mr_0^2\omega^2$ et $q_u = 4zeV/mr_0^2\omega^2$, on obtient les équations de Mathieu :

$$d^2u/d\xi^2 + (a_u - 2q_u\cos 2\xi)u = 0$$

La résolution des équations de Mathieu conduit à deux classes de solutions (24) :

✓ les trajectoires stables, l'ion se propage dans la direction de l'axe Z de l'analyseur avec des oscillations d'amplitudes inférieures à r_0,



✓ les trajectoires instables où l'amplitude des oscillations croît exponentiellement, l'ion se décharge sur les barres.
Les ions plus légers que la masse choisie, se rapprochent des électrodes chargées positivement (axe des x), malgré les charges répulsives existantes.
Les ions plus lourds que la masse choisie finissent par percuter les électrodes chargées négativement (axe des y).

Les couples de solutions (a_u, q_u) pour lesquels la trajectoire de l'ion est stable sont représentés sur le diagramme de stabilité (figure 2.4.12). Les conditions intéressantes pour la spectrométrie de masse sont celles pour lesquelles a et q ont des valeurs inférieures à l'unité.

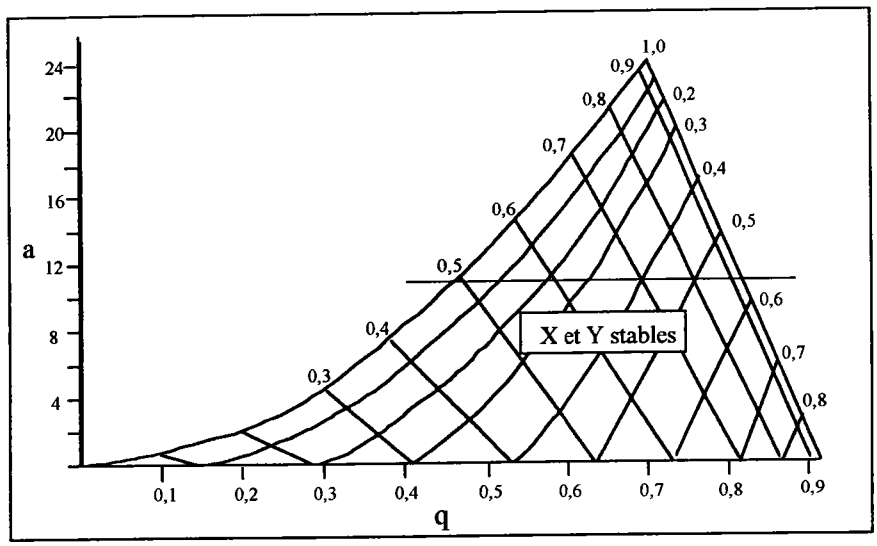


Figure 2.4.12 Diagramme de stabilité dans les axes X et Y (doc. Finnigan Mat.)

Pour un couple U et V donné, r_0 et ω étant fixés, les ions de rapport m/z différents sont sur une droite appelée droite de fonctionnement d'équation :

$$a_u = 2(U/V)q_u$$

Cette droite coupe le diagramme de stabilité en deux points $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$. Seuls les ions pour lesquels la valeur m/z est comprise entre $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$ ont des trajectoires stables et sont transmis par le quadripôle.

Si le rapport U/V est bien choisi, la droite de fonctionnement pourra couper la zone de stabilité en son sommet, réduisant la gamme de valeurs de m/z transmises par le quadripôle. C'est donc le rapport (U/V) qui détermine la résolution R.

Le balayage des valeurs U et V, tout en gardant le rapport (U/V) constant permet d'amener successivement les différentes valeurs de m/z dans la zone de stabilité (figure 2.4.13).

Le quadripôle transmet donc les ions dans l'ordre croissant des valeurs m/z avec une résolution R (= $\Delta M/M$) constante. En pratique, R croît avec m/z, la différence $\Delta(m/z)$ étant maintenue constante sur toute la gamme de masse.

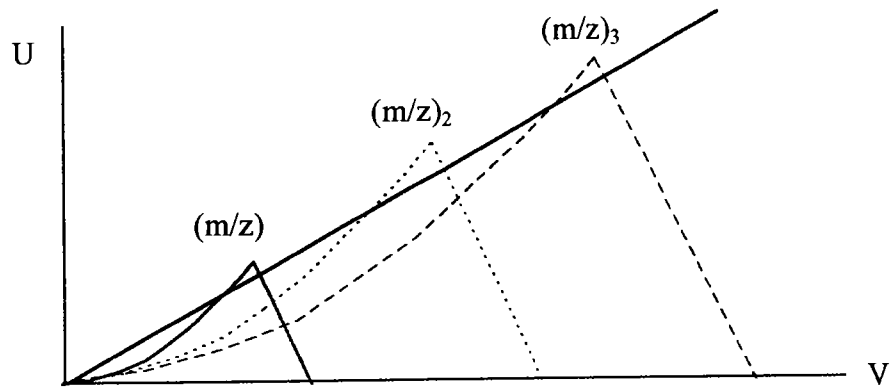


Figure 2.4.13 Zones de stabilité en fonction de U et V pour des ions de rapport m/z différents ($(m/z)_1<(m/z)_2<(m/z)_3$). D'après De Hoffman (20)

Les performances

Le spectromètre de masse à filtre quadripolaire présente de nombreux avantages :

- ✓ grande souplesse d'emploi,
- ✓ manipulation aisée et réglages simples,
- ✓ encombrement peu important,
- ✓ balayage rapide de la gamme de masse explorée.

Les limitations inhérentes à ce type d'appareil sont :

- ✓ la gamme de masse réduite (jusqu'à 2000 u.),
- ✓ un pouvoir de résolution limité, constant sur la gamme de masse. En général, la résolution est dite unitaire pour la gamme de masse explorée,
- ✓ la faible discrimination des masses supérieures à 450 u.

2.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Y. George, *Cours d'initiation au couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse*, Hewlett Packlard, Orsay, (1984)
2. P. Longevialle, *Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques*, Masson éd., Paris (1981)
3. K. Biemann, *Mass Spectrometry - Organic Chemical Applications*, Mc Graw Hill ed., New-York (1962)
4. 28. H.C. Hill, *Introduction to Mass Spectrometry*, Benjamin W.A., 2nd Ed., New-York (1973)
5. 43. F.W. McLafferty, *Interpretation of Mass Spectra*, Third Edition, Organic Chemistry Series, N.J. Turro Ed., University Science Books, Mill Walley, (1980)
6. H.L.C. Meuzelaar, P.G. Kistemaker, *Techniques for Fast and Reproducible Fingerprinting by Pyrolysis Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 1973, **45**, 587
7. H. Giacobbo and W. Simon, *Pharm. Acta Helvetica*, 1964, **39**, 162.
8. Maddock and T.W. Ottley, *Applied Pyrolysis Handbook*, pp 57-76 ()
9. H. Herilier, M. Ferkioui, *Chromatographie en Phase Gazeuse Haute Performance*. II. Préparation des Colonnes Capillaires Verre, Lyon Pharmaceutique, 32, 6, 335-341 (1981)
10. G. Lavoue, *la Chromatographie en Phase Gazeuse et ses Applications*, Labo France Ed, Paris (1976)
11. G. gaspar, R. Annino, C. Vidal-Madjar, G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **50**, 11, 1512-1518 (1978)
12. W. Jennings, *Gas Chromatography with Glass Capillary Columns* (second edition), Academic Press, New York (1980)
13. D. Ramond, *la Pratique de la Chromatographie en Phase Gazeuse*, Division Analytique - Hewlett Packard, Orsay (1980)
14. M. Rigaud, Thèse pour l'obtention du Doctorat d'Etat ès Sciences : *Chromatographie en Phase Gazeuse sur Colonnes Capillaires en Verre Couplée à la Spectrométrie de Masse pour l'Analyse des Métabolites des Acides Gras Polydesaturés*, Université de Strasbourg (1979)
15. J.H. Beynon, *Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry* - Appendix 6., Elsevier Pub., New-York (1960)
16. E.R. Garrett, J.L. Hirtz, *Drug Fate and Metabolism. Methods and Techniques* (Vol. 1 and 2), M. Dekker Inc., New-York (1978)
17. J. Grimshaw, *Mass Spectrometry In Comprehensive Analytical Chemistry*, Svehla G. Ed., Elsevier, Amsterdam (1981)

18. F. Maquin, *Progrès Récents en GC/MS*, Spectra 2000, **7**, 66-71 (1979)
19. F. Leyder, *L'importance du Vide en Spectrométrie de Masse*, Spectra 2000, **7**, 32-34 (1979)
20. De Hoffman E., Charette J., Stroobant V., *Spectrométrie de Masse*, Masson, (1994).
21. Paul W., Steinwedel H., *Z. Naturforsh.* , 1953, **8a**, 448.
22. Campana J.E., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 1980, **33**, 101.
23. Dawson P.H., *Mass Spectrom. Rev.*, 1986, **5**, 1.
24. Campbell R., *Théorie Générale de l'équation de Matthieu*, Masson, 1995 ; March R.E., Hugues R.J., *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons, (1989)

3. La pyrolyse laser

3.1. INTRODUCTION

Après avoir étudié la pyrolyse thermique de certains produits, nous avons tenté de comprendre les phénomènes entrant en jeu lors d'une ablation laser.

L'impact laser sur une surface induit la formation d'un plasma ou d'un micro plasma. Ce nuage gazeux est constitué d'ions positifs ou négatifs, de radicaux, d'électrons et majoritairement de molécules neutres. Le rapport ion/molécule neutre varie d'environ 10^{-4} à 10^{-5}.

Les molécules neutres étant les espèces les plus abondantes formées lors d'une impulsion laser, nous avons pensé les analyser par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Pour ce faire, il a fallu concevoir et faire réaliser une enceinte de pyrolyse laser compatible avec la chromatographie en phase gazeuse et faire quelques modifications au niveau du système d'injection.

De plus, l'irradiation laser présente quelques avantages sur la pyrolyse thermique :

- ✓ la longueur d'onde accordable peut induire des mécanismes différents allant des processus purement thermiques en Infrarouge (IR) aux processus purement photochimiques en Ultraviolet lointain (UV),

✓ l'énergie "déposée" sur l'échantillon est modulable, permettant ainsi d'en ajuster la valeur suivant le type de molécule à désorber :

- ☞ soit en faisant varier le diamètre de l'impact laser de quelques microns[1] à quelques millimètres,
- ☞ soit en maintenant le diamètre constant mais en plaçant une lame semi-transparente sur le chemin optique,
- ☞ soit en jouant sur la tension de l'amplificateur du laser,
- ☞ soit en décalant le déclenchement des cellules de Pockels par rapport au maximum de fluorescence.

Dans notre travail, nous avons choisi d'utiliser un laser Nd/Yag. Ce laser possède quatre longueurs d'onde disponibles : 1064, 532, 355 et 266 nm.

Ce chapitre va s'articuler autour de trois grands axes :

- ✓ présentation du laser,
- ✓ mécanismes de l'interaction laser-matière,
- ✓ description de l'enceinte de pyrolyse laser.

α α α

[1] Les limites de focalisation des lasers dépendent des lois de la diffraction et par conséquent de la longueur d'onde du laser.

3.2. LASER ND/YAG

3.2.1. Préambule : les lasers

Le principe de l'émission stimulée, préambule indispensable à la découverte du phénomène laser[2], avait été décrit par Einstein en 1917. Ce sont deux français : Jean Brossel et Alfred Kastler[3] qui ont mis au point en 1950, une méthode de pompage optique pour obtenir l'inversion de population nécessaire à la génération d'un faisceau de lumière cohérent. Finalement, c'est en 1960 que Maiman met au point le premier laser à rubis; quelques temps plus tard, Javan développe le laser visible hélium-néon. (1)

Le développement de l'utilisation du laser en chimie analytique et plus spécialement en spectrométrie de masse a été assez lent. Ceci est en grande partie dû à un coût important des lasers. Cependant, depuis ces cinq dernières années, la mise au point d'appareillage de routine (pour le MALDI[4] par exemple) et la commercialisation de petits lasers (lasers à azote) peu coûteux, généralisent l'usage de ce type de couplage microsonde laser - spectrométrie de masse.

3.2.2. Principes physiques de fonctionnement du laser (2)

Un oscillateur laser doit comporter au minimum trois éléments fondamentaux :

- ✓ un milieu actif
- ✓ un système de pompage
- ✓ une cavité résonante

Il convient de rappeler les principes de base d'absorption, d'émissions spontanée et stimulée.

Le passage d'un atome de l'état fondamental à un état excité se traduit par l'**absorption** d'une énergie extérieure. Cette énergie peut être de type

[2] LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
[3] Prix Nobel en 1966
[4] MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

cinétique ou électromagnétique. Dans ce dernier cas, le rayonnement arrivant sur l'atome sera partiellement ou totalement absorbé.

L'absorption d'énergie électromagnétique par un atome obéit à la relation $\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$, dans lequelle E_1 est le niveau d'énergie initial de l'atome, et E_2 ($>E_1$) le niveau où il se trouve porté par l'absorption du photon de fréquence $h\nu$.

L'émission spontanée correspond à la perte spontanée de cette énergie sous forme d'une radiation électromagnétique obéissant à la même relation que dans le cas de l'absorption $\Delta E = h\nu$, ΔE répresentant l'énergie perdue par l'atome et ν la fréquence du rayonnement émis.

L'émission spontanée est incohérente : il n'y a pas de relation de phase, de direction, de polarisation entre les émissions de tous les atomes. Seule la fréquence est fixée par l'intervalle des niveaux d'énergie entre lesquels s'effectue la retombée.

On parle d'**émission stimulée,** lorsque le photon absorbé a la même fréquence que le photon dont il induit l'émission. Le photon inducteur est de même énergie que celle du photon libéré par l'atome retombant au niveau d'énergie inférieure.

Les rayonnements inducteurs et induits ont la même phase, la même direction et la même polarisation. Il n'y a plus de discrimination entre les photons. Tout se passe comme si il y avait une « Amplification de Lumière par Emission Stimulée du Rayonnement » d'où le terme de LASER.

Après ces définitions, examinons les différents constituants d'un laser.

3.2.2.1. Le milieu actif : base atomique du système

C'est un milieu qui possède une structure appropriée de niveaux d'énergie discrets s'excitant facilement et possédant la capacité de stocker l'énergie reçue de l'extérieur.

Le milieu actif d'un laser Nd/YAG est solide. Il est constitué par l'ion trivalent d'une terre rare (Nd^{3+}) présent comme dopant dans un cristal de Grenat d'Yttrium et d'Aluminium (YAG). La concentration en Néodyme est généralement de 1% en masse, soit une concentration atomique de 10^{20} atomes/cm^3 considérée optimale pour le fonctionnement du laser.

L'émission laser se fait à une longueur d'onde déterminée par deux états d'énergie de cette structure, sur une transition où le système présente une émission spontanée correspondant à une durée de vie relativement longue du niveau supérieur (état métastable).

Lorsque les atomes de Néodyme sont excités par une source externe de lumière, ils sont portés à un niveau d'énergie excité. Une fois dans cet état, ils redescendent à un niveau métastable, produisant une inversion de population entre les états $^4F_{3/2}$ et $^4I_{11/2}$. Ensuite, les atomes retournent à un niveau fondamental selon un processus non radiatif rapide (figure 3.2.1).

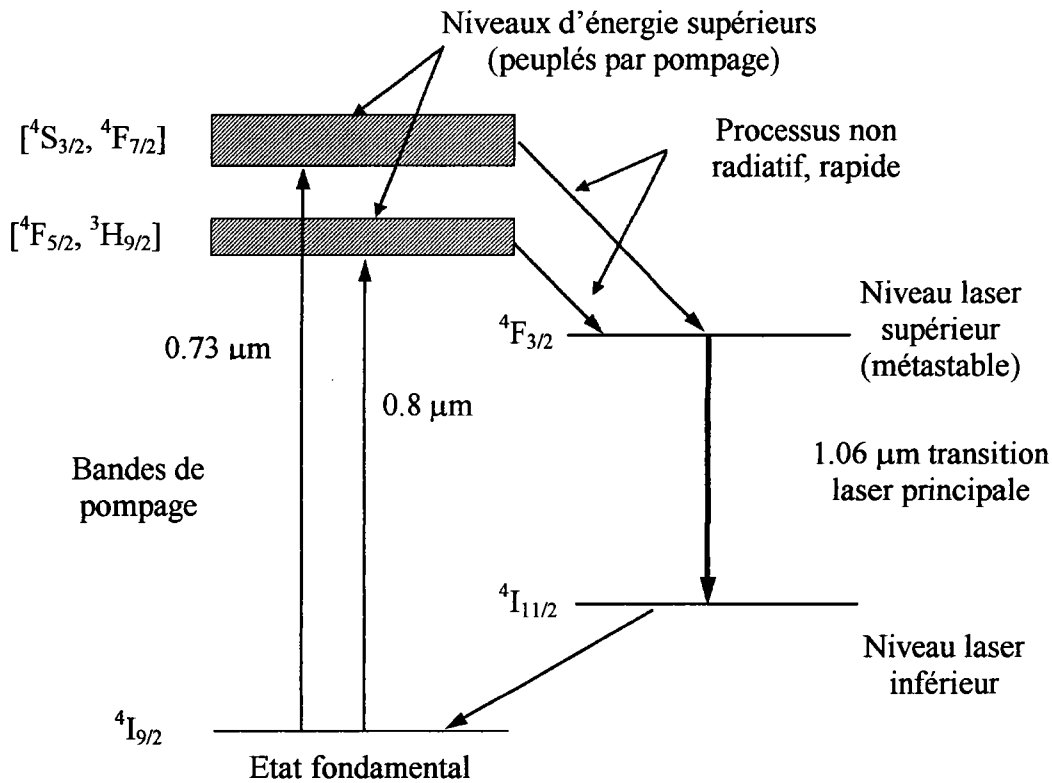


Figure 3.2.1 Diagramme simplifié des niveaux d'énergie d'un laser Nd/YAG

Ce schéma correspond à un laser à quatre niveaux dont l'émission dominante se situe à 1064 nm.

Toutefois, il est possible de générer les deuxième, troisième et quatrième harmoniques de cette fréquence fondamentale à l'aide de cristaux non linéaires (KDP) afin d'obtenir des longueurs d'onde de 532, 335 et 266 nm. Ainsi, l'émission peut être déplacée dans le visible et l'U.V.

3.2.2.2. Le pompage : création d'une inversion de population

Dans un corps à l'équilibre à température ambiante, il n'existe pratiquement pas d'atomes à l'état excité. Un rayonnement incident a une probabilité nulle de provoquer une émission stimulée importante et une probabilité très proche de un d'être absorbé.

Pour avoir une émission stimulée, il faut que le nombre d'atomes N_2 d'un état excité E_2 soit supérieur au nombre d'atomes N_1 de l'état fondamental E_1.

Cette inversion de population sera réalisée, hors de l'équilibre thermique, par une excitation extérieure appelée pompage. Le pompage permet en effet de porter les atomes du milieu actif dans leurs niveaux énergétiques supérieurs et de maintenir ce déséquilibre thermodynamique nécessaire à l'inversion de population.

Dans le cas du laser Nd/YAG, le pompage est assuré par une lampe flash (pompage optique incohérent). Les bandes d'émission de cette source sont centrées sur les deux principales bandes d'absorption de Nd^{3+} (0,73 µm et 0,8 µm).

3.2.2.3. La cavité résonante

Elle est constituée de deux miroirs hautement réfléchissants parallèles placés face à face : ces réflecteurs renvoient l'onde électromagnétique en de multiples passages aller et retour dans le milieu actif, amplifiant ainsi le champ électromagnétique dans la cavité (figure 3.2.2).

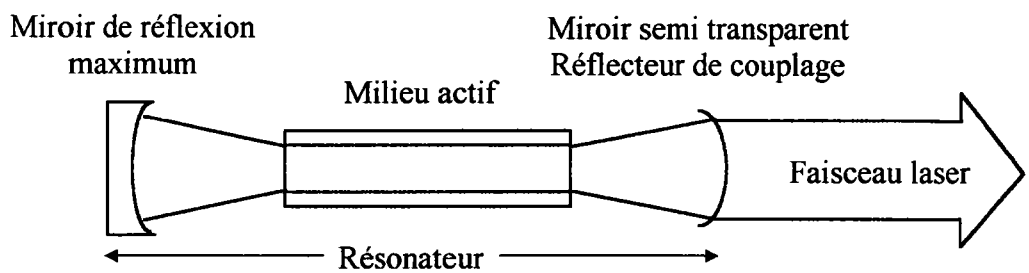


Figure 3.2.2 schéma de principe de la cavité résonante

Le couplage optique vers l'extérieur s'effectue en rendant semi-transparent un des miroirs ou encore en perçant un orifice dans un des miroirs.

3.3. INTERACTION LASER - MATIERE

Les caractéristiques de l'ionisation laser sont différentes suivant que la cible est sous forme gazeuse ou solide.

En phase gazeuse, les processus d'ionisation sont assez bien connus. En général, l'ionisation nécessite une énergie relativement faible. On peut appliquer les principes généraux de la spectroscopie électronique des atomes ou des molécules.

Les mécanismes qui régissent l'ionisation des solides sont beaucoup plus complexes. Le même laser permet le passage de la matière de l'état condensé à l'état gazeux et l'ionisation d'une partie des atomes et des molécules. De ce fait, les mécanismes de l'ionisation laser des matériaux solides sont très complexes et très difficiles à modéliser. Nous allons essayer de schématiser le rôle du faisceau laser pour chacun de ces deux phénomènes.

3.3.1. Les différentes zones issues d'un impact du laser

L'un des plus anciens modèle sur l'ablation/ionisation laser des solides est celui qui a été proposé par Herculès en 1982 (3).

Lors de l'impact entre un faisceau laser et la surface d'un matériau de nombreux processus interviennent :

- ✓ l'ionisation directe : désorption directe, mais non prouvée d'espèces pré-chargées dans le solide,
- ✓ l'ionisation secondaire : ionisation de la phase gazeuse susjacente due à l'ablation (effet d'écran),
- ✓ les réactions ions-molécules en phase gazeuse dans le panache.

L'importance des zones, décrites ci-après, ainsi que l'épaisseur de la partie ablatée dépendent essentiellement de la nature du matériau, de la longueur d'onde et de l'irradiance du faisceau laser incident.

L'influence de ces deux derniers paramètres sera décrite dans les chapitres suivants.

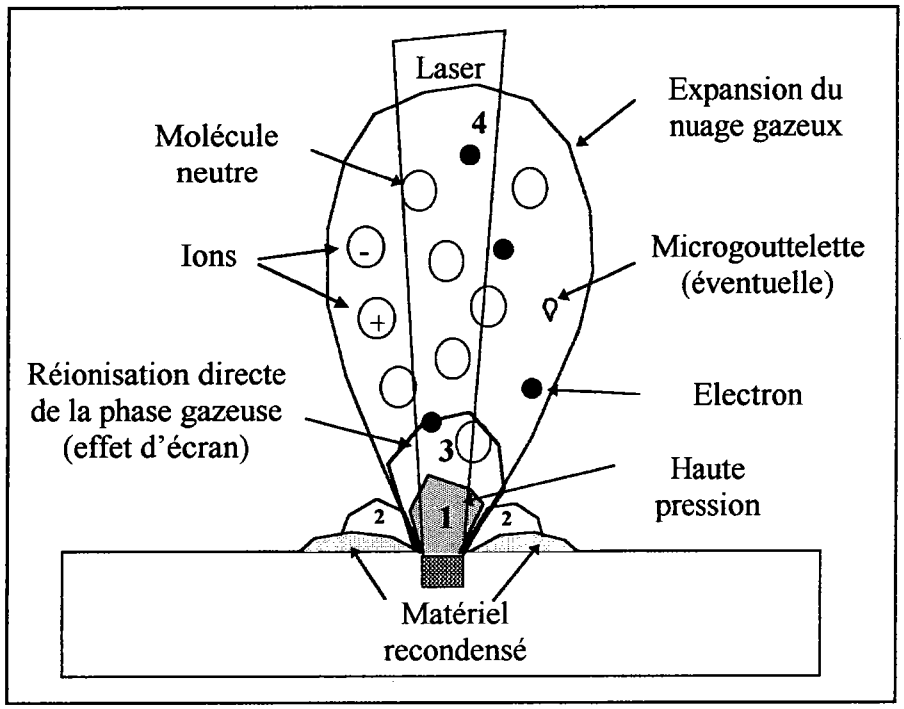


Figure 3.3.1 Schéma général de l'ablation laser

Lorsque l'on considère une vaporisation/ionisation laser, on peut différencier quatre types de mécanismes correspondant à différentes zones géographiques de la surface (figure 3.3.1) :

✓ la région (1), où se produit l'impact laser, est caractérisée par une ionisation directe du matériau solide, surtout à forte irradiance. La température dans cette zone peut atteindre 3000 à 6000 K, à haute irradiance. Dans ces conditions, il apparaît que seul des ions atomiques et quelques fragments moléculaires peuvent être émis.

✓ la région (2), adjacente à la région (1), est une zone de désorption. Elle est caractérisée par un fort gradient thermique dû à l'onde de choc issue de l'impact laser. Les ions de haut poids moléculaire ainsi que les molécules neutres sont émis dans cette zone.
D'autre part, un certain nombre d'ions résultants de réactions en phase solide semblent pouvoir provenir de cette zone.

✓ la région (3) correspond à la réionisation du nuage gazeux (effet d'écran),

✓ la région (4) correspond à l'espace de libération des ions dans le vide.

Les réactions ions-molécules responsables de la formation des ions pseudomoléculaires et des clusters se font dans les zones à fort taux de collisions (donc de hautes pressions) (régions 1, 2 et 3).

3.3.2. Les processus d'ablation en fonction de la longueur d'onde

En fonction de la longueur d'onde du laser incident, les mécanismes d'ablation peuvent être très différents. Pour donner les extrêmes, dans l'infra-rouge, les mécanismes seront plutôt de type thermique alors que dans l'ultra-violet lointain, ils seront plutôt photochimiques.

3.3.2.1. Interaction de type thermique

L'énergie apportée par le rayonnement laser se disperse dans le matériau par conduction thermique.

Le quantum d'énergie (hν) des protons n'est pas suffisant pour induire l'ionisation directe. Par contre, c'est leur nombre qui provoque un échauffement de la surface par chocs successifs. Il en résulte une fusion et une vaporisation du matériau conduisant à la formation d'un microplasma.

On peut considérer, en première approximation, que l'effet du rayonnement laser est identique à celui d'une source de chaleur disposée en surface du matériau. Il s'en suit une propagation du front de chaleur en profondeur.

L'épaisseur ablatée par impact laser dépend de :

- ✓ la réflectivité du matériau à la longueur d'onde utilisée,
- ✓ l'absorption de la longueur d'onde par le matériau,
- ✓ l'irradiance (W/cm^2),
- ✓ du gaz environnant,
- ✓ de l'onde de choc éventuellement induite.

3.3.2.2. Interaction de type photochimique

D'après Srinivasan (4), le processus d'ablation peut se décomposer en trois grandes étapes successives (figure 3.3.2) :

- ✓ absorption des photons UV par le matériau,
- ✓ rupture des liaisons les plus faibles,

✓ ablation du matériau.

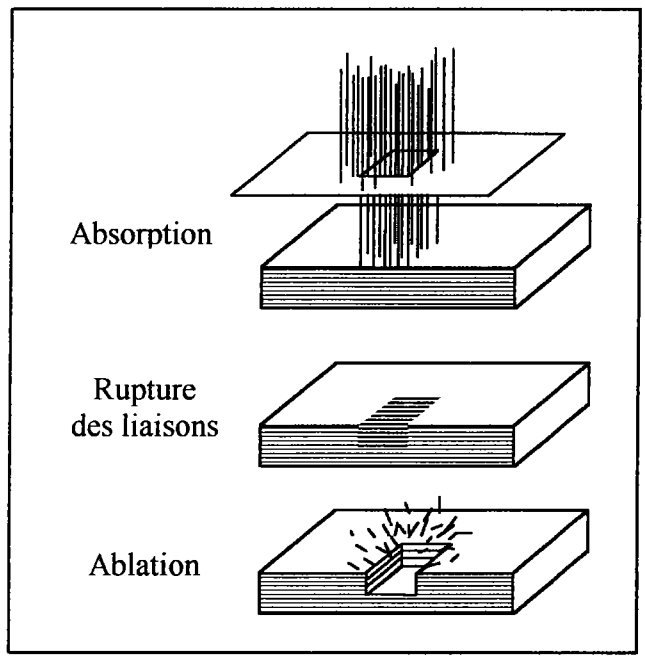


Figure 3.3.2 Trois phases du processus d'ablation d'après Srinivasan (4)

Trois mécanismes peuvent conduire à cette décomposition ablative :

✓ tout d'abord, l'absorption de photons UV conduit les molécules cibles à des niveaux énergétiques supérieurs à leur limite de dissociation. Cette étape est extrêmement courte : t << 1ns. Elle provoque de nombreuses ruptures de liaisons homolytiques (radicalaire) induisant l'ablation du substrat.

✓ L'absorption des premiers photons UV provoque un échauffement de la surface au point d'impact conduisant à un peuplement des états vibrationnels excités de la molécule. Si la durée de vie de cet état vibrationnel, est suffisamment long pour qu'il y ait réabsorption d'un second photon provenant d'une même impulsion laser, on peut également observer la dissociation photochimique des molécules.

✓ Les molécules excitées (mais non ablatées) se relaxent par redistribution de l'excès d'énergie sous forme de mouvements rotationnels et vibrationnels aux molécules voisines. Ceci se caractérise par un échauffement très rapide et localisé de l'échantillon. L'absorption de plusieurs photons successifs dans une même zone permet l'obtention de températures suffisantes pour permettre une décomposition thermique des molécules au niveau de leurs liaisons les plus faibles (liaisons hydrogènes, interactions ioniques ...).

Si le nombre de liaisons rompues par l'ensemble de ces processus est suffisant, on assiste à une augmentation brutale de la pression locale conduisant à une éjection de matière sous forme gazeuse.

L'excès d'énergie apporté par le faisceau laser se dissipe en énergie de translation. Les modèles simples mis au point sur les polymères peuvent être étendus à d'autres matériaux. On peut, en première approximation, déterminer la profondeur ablatée par impact laser :

$$Z_c = 1/a \, . \, \ln(I/I_c)$$

Z_c profondeur ablatée par impact laser en cm,

a coefficient d'absorption du matériau à la longueur d'onde du laser en cm^{-1},

I irradiance du laser incident en W/cm^2,

I_c irradiance seuil d'ablation en W/cm^2.

3.3.3. Formation des ions en fonction de l'irradiance laser (5)

La plupart des ions (négatifs ou positifs) donnant des informations sur la nature du matériau analysé sont formés lors de la phase d'expansion du nuage gazeux induit par l'impact laser. La nature de ce nuage gazeux est différente selon l'irradiance du laser.

De plus, il apparaît que le rapport ions/neutres formés lors d'une impulsion laser dépend également directement de l'irradiance laser . En effet, pour des irradiances supérieures à 10^9 W/cm^2, il serait de 0,01 à 0,001, alors qu'il ne serait plus que de 10^{-5} pour des irradiances inférieures à 10^8 W/cm^2 (3).

On peut ainsi distinguer trois processus d'ablation/ionisation en fonction de l'irradiance sur l'échantillon :

✓ entre 10^4 - 10^6 W/cm^2 (seuil d'ablation[5] selon les matériaux) et 10^7 à 10^8 W/cm^2, les processus de désorption laser dominent. Ils permettent dans de nombreux cas de mettre en évidence les ions moléculaires ou quasimoléculaires [6] correspondants.

[5] Seuil d'ablation : énergie minimum à fournir au matériau pour le désorber.

[6] Ion quasimoléculaire : ion positif obtenu par protonation ou cationisation de la molécule ou dans le cas des ions négatifs par déprotonation.

- ✓ entre 10^8 W/cm^2 (seuil d'ignition moyen du plasma[7]) et 10^{10} W/cm^2 : les ions élémentaires sont généralement toujours présents mais accompagnés d'agrégats ionisés dont la nature dépend du solide étudié,
- ✓ à irradiance élevée (I > 10^{10} W/cm^2) : la température du plasma et le taux d'ions augmentent. Les ions détectés sont en général élémentaires.

Une étude réalisée dans notre laboratoire par ablation/ionisation laser FT/MS, sur un polymère synthétique (PET : poly(éthylène terephtalate)) permet de montrer l'influence de l'irradiance sur les ions produits.

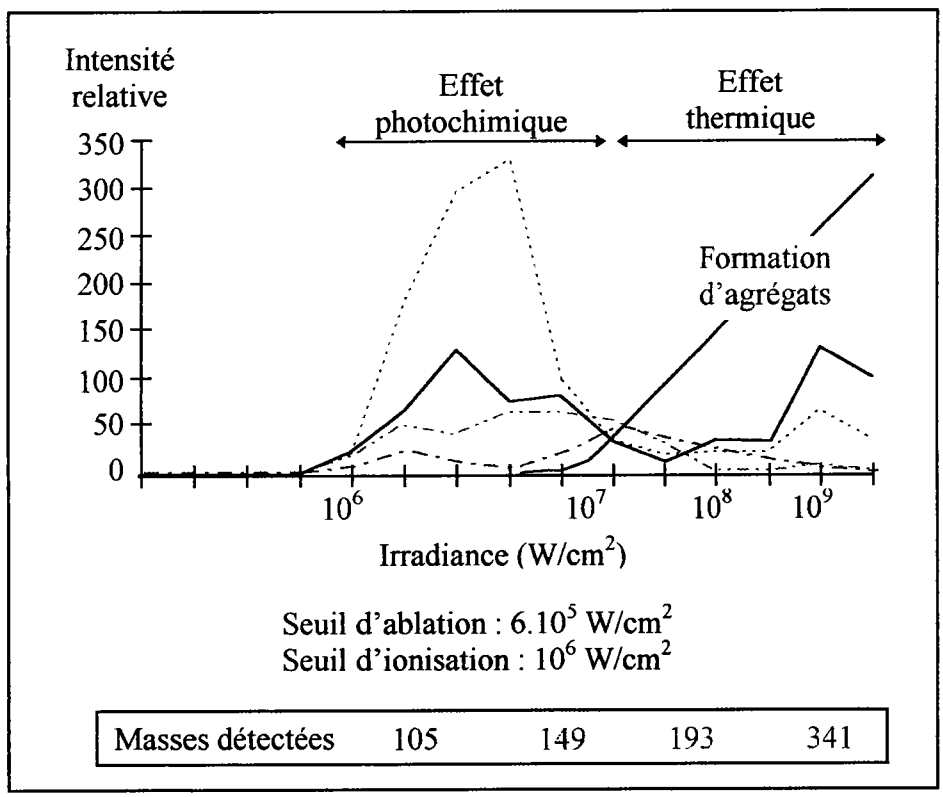


Figure 3.3.3 Fragmentation en fonction de l'irradiance à λ = 193 nm du PET

Le seuil d'ablation a été déterminé par la pesée de l'échantillon avec une microbalance à "cristal de quartz" pendant l'irradiation laser.

A faible irradiance (entre 10^6 et 10^7 W /cm^2), le fragment prédominent du spectre est m/z = 149. La coupure dont il est issu, est due à un effet photochimique du laser.

[7] Pratiquement on peut déterminer le seuil d'ignition du plasma par la présence sur l'écran de visualisation d'un "flash" au point d'impact du laser.

A irradiance plus élevée (> 10^7 W/cm^2), la formation des agrégats ionisés augmente.

A faible et moyenne irradiances, le phénomène d'ablation laser se déroule en deux grandes étapes :

- ✓ dans un premier temps, les photons émis par le faisceau laser sont absorbés par le matériau solide. Cette étape est gouvernée par le coefficient d'absorption linéaire α (cm^{-1}). Plus ce coefficient est élevé, plus le seuil d'ablation du matériau est faible.

  Ce coefficient peut-être mis en relation avec la longueur d'onde à laquelle le matériau absorbe. Plus le matériau est transparent à la longueur d'onde du laser utilisé, plus le seuil d'ablation est élevé.

- ✓ Une fois le seuil d'ablation franchi, un effet d'écran (6) est observé. Celui-ci est dû aux particules émises par le matériau (ions, radicaux, molécules neutres, électrons). De ce fait, la totalité des photons de l'impulsion laser n'est pas efficace pour l'ablation. La vitesse instantanée d'ablation mesurée en Å/ns est proportionnelle à la différence entre l'intensité laser "efficace" (c'est à dire arrivant réellement sur la surface) et le seuil d'ablation.

  Cette différence représente la quantité d'énergie réellement utilisée pour l'ablation:

$$v = k(I_0 e^{-\beta x} - I_s)$$

v vitesse de propagation de l'interface mouvante,
k constante de vitesse d'ablation,
I_0 intensité instantanée atteignant l'interface solide-gaz,
ß coefficient d'absorption de la phase gazeuse formée par les fragments éjectés,
x position de l'interface,
I_S intensité instantanée au seuil d'ablation.

Cet effet d'écran a notamment été décrit par V. Granier et S Lazare (6) sur l'étude des polymères (figure 3.3.4).

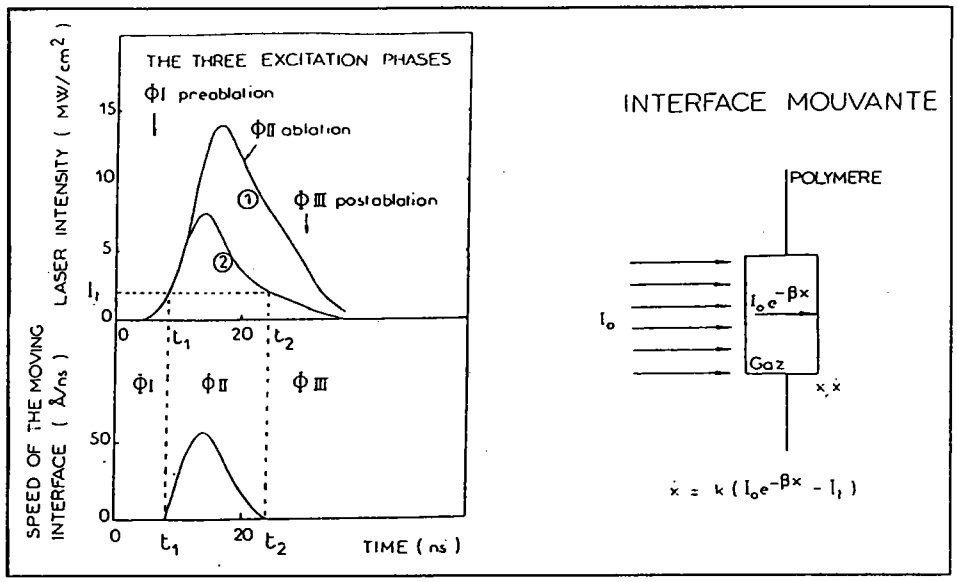


Figure 3.3.4 l'effet d'écran selon V. Granier et S. Lazare

On constate sur ces courbes que l'intensité laser sur l'échantillon en fonction du temps I(t) est bien inférieure à l'intensité théorique émise par le laser $I_0(t)$. La détermination du coefficient d'écran ß a été réalisée par expérimentation avec une microbalance à quartz.

α α α

3.4. L'ENCEINTE D'ABLATION LASER

3.4.1. Introduction

Comme nous l'avons vu, la pyrolyse thermique est une méthode efficace pour dégrader de façon contrôlée une molécule initiale de poids moléculaire élevé en molécules plus petites et volatiles.

Cependant, le point critique dans les expériences de pyrolyse de macromolécules complexes est la reproductibilité des résultats. Sans tenir compte des problèmes relatifs au couplage de la chambre de pyrolyse et de l'instrument d'analyse, beaucoup de problèmes peuvent provenir des conditions de pyrolyse, en particulier le contrôle de la température et le mode de chauffage.

Néanmoins, la température de pyrolyse est un paramètre qui, à lui seul, n'est pas suffisant pour décrire le procédé de pyrolyse (8).

L'énergie thermique (E_t) déposée sur l'échantillon en un temps donné est fonction de la capacité thermique (C) de cet échantillon et de la vitesse de transfert de la chaleur. Autrement dit, C dépend de la conductivité et de la capacité calorifique spécifique, alors que le transfert de chaleur est fonction de la conductivité thermique, de la masse et de la morphologie de l'échantillon.

En tenant compte des paramètres précédents, la reproductibilité est souvent faible, en particulier pour les molécules d'origine biologique en raison de leur complexité. L'irradiation laser est une méthode prometteuse lorsque l'énergie déposée sur l'échantillon est contrôlée rigoureusement.

3.4.2. Cahier des charges

Il n'existe pas de montage standard de pyrolyse par irradiation laser. En effet, tous les montages rencontrés dans la bibliographie sont de types différents (7, 8, 9, 10). Cependant chacun de ces montages doit tenir compte de certaines contraintes techniques telles que :

- ✓ l'énergie apportée sur l'échantillon doit permettre son ablation sans endommager les dispositifs optiques placés sur le chemin du laser.
- ✓ l'enceinte doit comporter une fenêtre transparente à la longueur d'onde du faisceau incident pour permettre l'irradiation de l'échantillon,
- ✓ le matériau de l'enceinte doit être le plus inerte possible vis à vis des échantillons analysés,

- ✓ le volume interne de la chambre de pyrolyse doit être petit, facilement balayé par un gaz vecteur dont le flux est compatible avec les capacités d'une colonne de chromatographie,
- ✓ le transfert des pyrolysats vers l'injecteur doit être rapide,
- ✓ un système de concentration/désorption des pyrolysats, avant l'injection dans la colonne capillaire est indispensable pour avoir une résolution correcte des pics chromatographiques,
- ✓ le montage doit être peu onéreux.

3.4.3. Conception de l'enceinte d'ablation laser

En tenant compte des caractéristiques techniques précédentes, nous avons imaginé plusieurs montages. Celui que nous avons retenu (figure 3.4.1) répond le mieux à nos exigences.

Il permet l'introduction aisée de l'échantillon, présente un faible volume interne et un bon transfert des pyrolysats vers l'injecteur. Son nettoyage est facile. Il permet un changement simple et rapide du disque de quartz (fenêtre transparente). De plus, le coût d'utilisation, essentiellement le prix du hublot de quartz (taille standard), est faible.

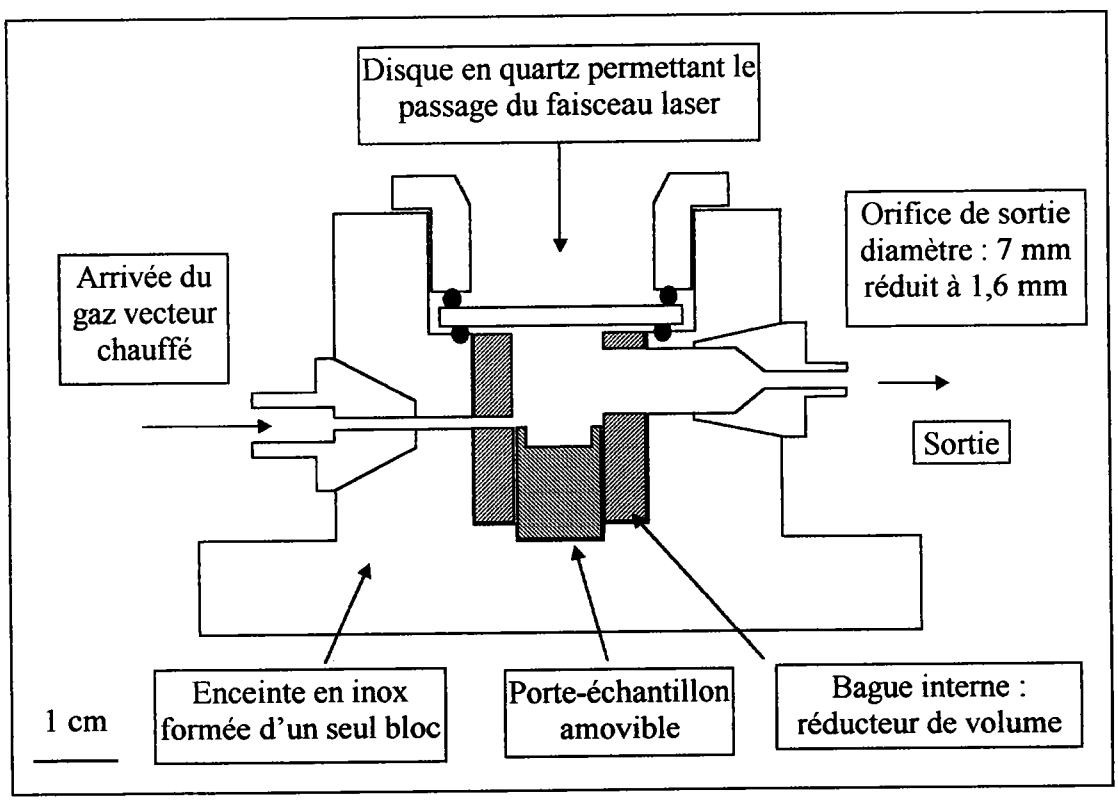


Figure 3.4.1 Schéma de l'enceinte d'ablation laser

L'ensemble du montage a été réalisé en acier inoxydable inerte. Le corps de l'enceinte est sphérique et totalement étanche puisque réalisé en une seule partie.

Les dimensions internes de l'enceinte ont été choisies afin de réduire au minimum le volume interne tout en préservant le hublot intact à l'irradiation laser (figure 3.4.2). Celui-ci se trouve à 1 cm de l'échantillon.

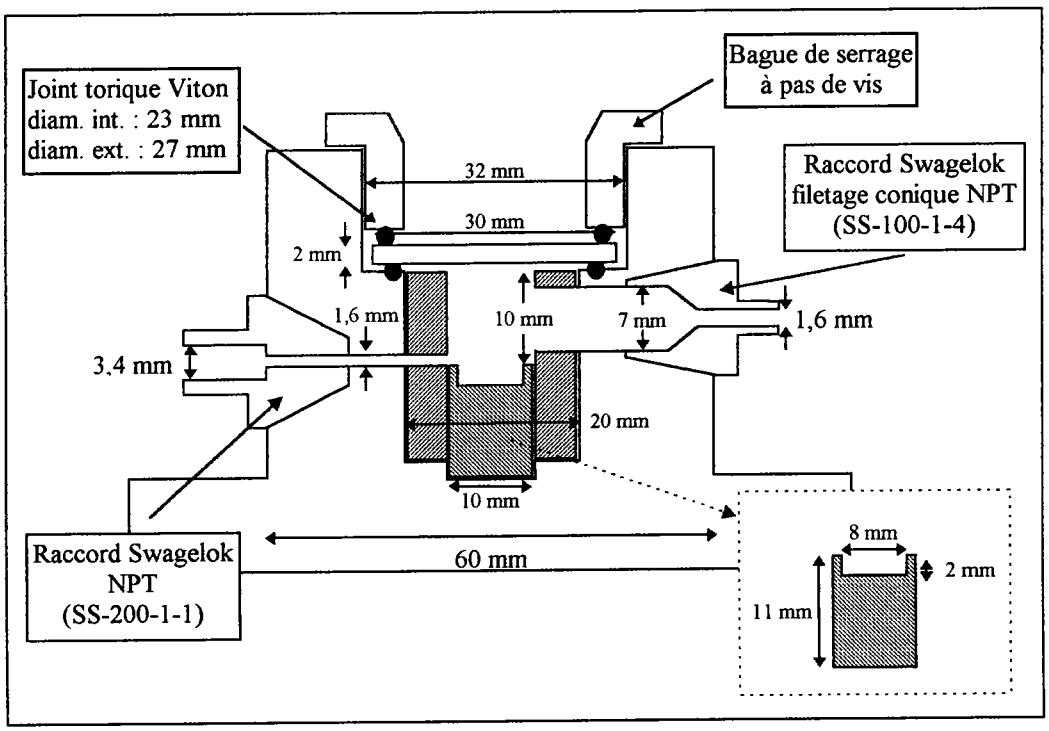


Figure 3.4.2 Dimensions de l'enceinte de pyrolyse laser

Nous avons conçu le montage de façon à disposer de deux diamètres de lumière centrale, en fonction de la taille des échantillons à analyser.

Si la bague interne est en place, le diamètre interne de l'enceinte est de 1 cm et le volume est de 0,78 cm^3. Toutes nos expériences ont été réalisées avec ce volume. Avec un flux d'hélium de 20 ml/mn, l'atmosphère de l'enceinte se renouvelle en un peu plus de 2 secondes.

Si cette bague est absente le diamètre est de 2 cm, le volume est alors de 6.28 cm^3.

Le disque de quartz placé sur le dessus de l'enceinte permet le passage du faisceau laser. Il a été choisi en matériau Suprasil (verre synthétique de silice pure fondue), permettant un large domaine de longueurs d'onde (190 nm $< \lambda <$ 2000 nm) et ceci avec un faible taux d'absorption (< 10%).

Les dimensions du disque (diamètre 30 mm, épaisseur 2 mm) étant standard, son prix est raisonnable.

Le disque de quartz est maintenu par un système de serrage à filetage et de joints toriques viton, qui rendent le montage parfaitement étanche. Ce système de fixation permet un nettoyage facile et rapide de l'enceinte et du hublot.

Le porte-échantillon est un petit cylindre en acier inoxydable dans lequel est gravée une encoche de façon à maintenir l'échantillon immobile à l'intérieur de l'enceinte.

L'arrivée de gaz vecteur (hélium) est thermostatée (50°C), de façon à maintenir ses caractéristiques constantes à l'intérieur de l'enceinte. Le flux est maintenu à 20 ml/min.

L'efficacité du balayage est assurée par les deux raccords swageloks d'entrée et de sortie.

Le raccord Swagelok d'entrée a été choisi de diamètre réduit pour concentrer le flux d'hélium sur la surface de l'échantillon.

Celui de sortie a été choisi en forme d'entonnoir. L'extrémité interne est large pour avoir une grande surface de capture des pyrolysats formés. L'extrémité rétrécie de sortie permet d'installer deux types d'interface :

- ✓ un piège à charbon actif pour des analyses indirectes,
- ✓ une aiguille métallique pour une analyse directe en chromatographie en phase gazeuse.

3.4.4. Les optiques

La distance entre l'échantillon et le disque de quartz (hublot) est très petite. L'énergie apportée à l'échantillon doit permettre son ablation, or il faut également respecter le seuil d'ablation du hublot.

Les dimensions extérieures de l'enceinte permettent l'irradiation laser suivant deux modes en fonction de l'irradiance nécessaire à la pyrolyse de l'échantillon (figure 3.4.3).

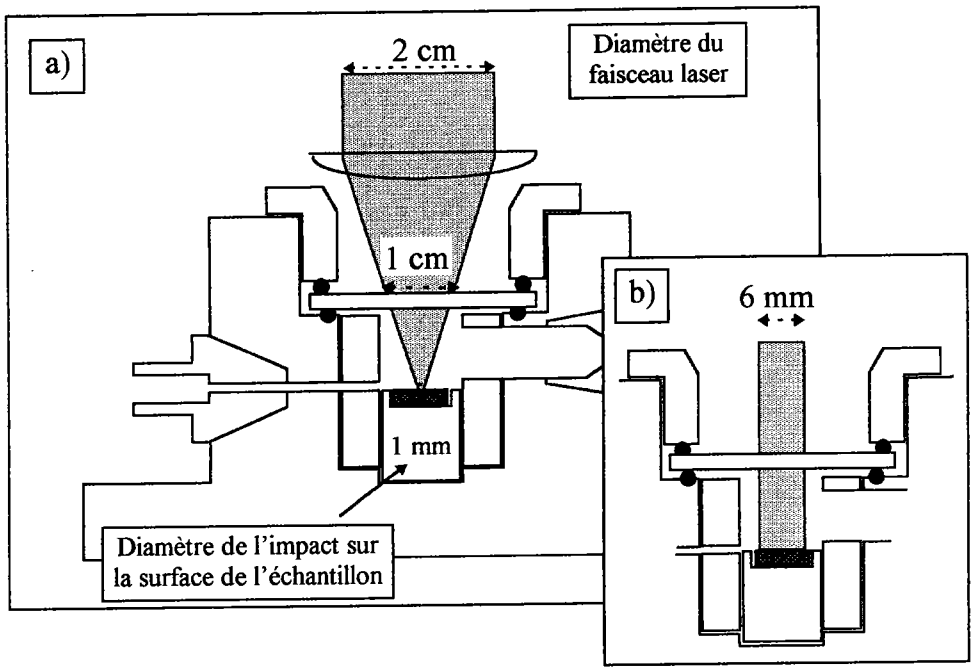


Figure 3.4.3 Les montages optiques

a) à irradiance élevée (> 10^8 W/cm^2), une lentille de focale très courte (30 mm) est placée avant le hublot, réduisant la taille du faisceau et augmentant ainsi l'irradiance sur l'échantillon.

b) à irradiance plus faible, c'est à dire quand l'irradiance incidente est inférieure au seuil d'ablation du disque (d'environ 10^8 W/cm^2), le montage est utilisé tel quel. Un cache placé avant le hublot, permet de réduire le diamètre du faisceau laser à la dimension voulue, dans notre cas 6 mm.

3.4.5. Les interfaces de sortie

Les deux interfaces de sortie que nous avons utilisé sont des pièges :

- ✓ L'un est un piège à charbon actif, qui permet d'installer l'enceinte à proximité du laser.
- ✓ L'autre est un piège cryogénique, lorsque l'enceinte est connectée au GC/MS.

Dans les deux cas, un balayage d'hélium est assuré pendant 5 minutes après avoir placé l'échantillon dans l'enceinte. Cette purge permet de

remplacer l'air contenu dans l'enceinte par de l'hélium. L'irradiation laser peut se faire dans une atmosphère relativement inerte.

3.4.5.1. L'analyse indirecte

Les dimensions réduites de l'enceinte permettent de la déplacer facilement (en fonction du laser utilisé), ce qui en fait un instrument d'analyse mobile. Cette mobilité permet de minimiser le trajet optique du laser et de réduire l'utilisation de prismes.

Un flux d'hélium balaye les pyrolysats formés lors de l'irradiation vers la sortie de l'enceinte où ils sont adsorbés dans un piège de charbon actif (figure 3.4.4).

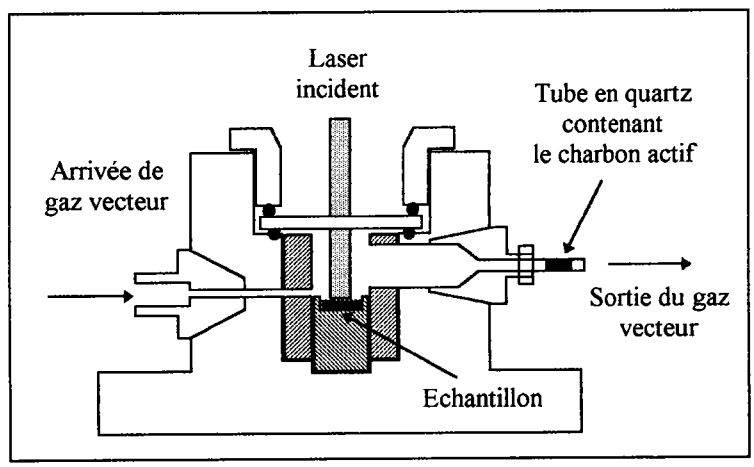


Figure 3.4.4 Montage indirect avec le piège de charbon actif

Le tube en quartz est fixé de façon étanche au raccord de sortie du montage. Ses dimensions sont réduites à celles d'un tube en quartz de pyrolyseur à filament (0,2 mm de diamètre et 2,5 cm de long).

L'expérience terminée, le tube est désolidarisé de l'enceinte. Les molécules piégées sont alors désorbées par l'intermédiaire de la sonde du pyrolyseur comme dans le cas d'une pyrolyse classique.

La température du filament doit permettre la désorption des molécules sans induire de dégradations thermiques. Cette température est ajustée par des essais successifs, ce qui implique une longue série d'essais ; comparé au temps d'ablation laser qui est très court, une minute au maximum dans la plupart des expériences.

Les avantages du piège à charbon actif :

- ✓ l'enceinte est mobile, elle peut être déplacée,
- ✓ l'utilisation de différents lasers est possible,
- ✓ la charge en pyrolysats du piège est importante,
- ✓ peu de problèmes avec le débit de gaz vecteur.

Les inconvénients :

- ✓ l'étanchéité entre l'enceinte et le piège est délicate à obtenir, ceci est dû aux faibles dimensions du piège,
- ✓ la désorption faite par chauffage implique de possibles dégradations secondaires,
- ✓ le charbon actif se dégrade sous l'effet de températures supérieures à 400°C ou d'expériences répétées, induisant des pics chromatographiques parasites.

3.4.5.2. *L'analyse directe*

Pour l'analyse directe, c'est à dire lorsque l'enceinte est installée à proximité du four du chromatographe, une aiguille métallique assure la liaison entre l'enceinte et l'injecteur du chromatographe (figure 3.4.5).

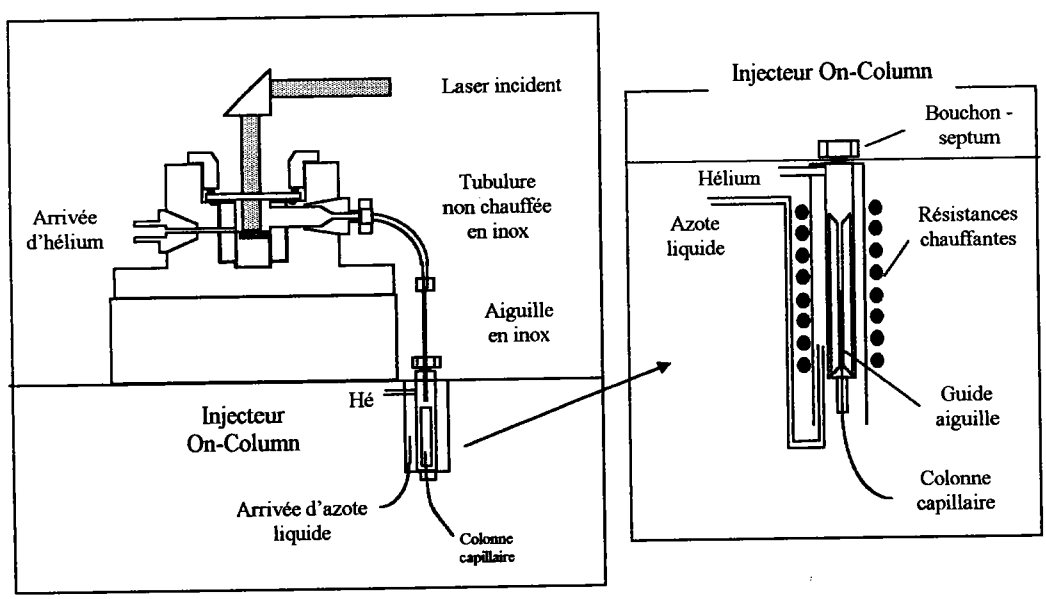


Figure 3.4.5 Schéma du couplage direct enceinte - injecteur On-column

Le diamètre de l'aiguille est adapté au flux qui balaye l'enceinte et à la taille interne de l'injecteur On-column. Le flux d'hélium issu de l'enceinte permet le passage des molécules sans créer de surpression dans l'injecteur.

L'aiguille métallique ne peut s'insérer dans la colonne, à l'inverse des aiguilles traditionnelles (de 0,1 à 0,3 µm) employées pour ce type d'injecteur.

Cependant, la géométrie de l'injecteur permet d'installer l'aiguille assez profondément pour assurer le passage du gaz à travers le septum et suffisamment peu pour se situer dans le volume libre avant le guide-aiguille de la colonne.

Nous avons choisi un injecteur On-column car il transmet sans division et sans discrimination la totalité des molécules volatiles vers la colonne. Il peut être réfrigéré par de l'azote liquide, ce qui permet de piéger les molécules issues de la pyrolyse et de les condenser avant l'analyse par GC/MS.

Pendant l'irradiation laser, l'aiguille est installée dans l'injecteur. Le flux en gaz vecteur de l'enceinte balaie la colonne capillaire avec une pression légèrement supérieure à celle du flux de l'injecteur. L'injecteur et le four sont refroidis (piège cryogénique) afin de piéger et de condenser les molécules dans l'injecteur.

L'irradiation terminée, l'enceinte continue à être balayée pendant quelques secondes afin de diriger l'ensemble des pyrolysats vers l'injecteur. Puis l'aiguille est retirée du septum.

La colonne est ventilée sans discontinuité, le flux de gaz vecteur étant assuré par l'arrivée d'hélium de l'injecteur.

L'injecteur ainsi que le four sont réchauffés selon des montées en température distinctes, créant un temps zéro pour l'injection des molécules. L'injecteur est réchauffé rapidement. Le four est chauffé avec une montée en température plus lente inférieure à 10°C/minute.

Les avantages du montage direct :

- ✓ les pyrolysats formés sont dirigés vers l'injecteur,
- ✓ le piège cryogénique permet la concentration des molécules en tête de colonne,
- ✓ l'analyse des molécules très volatiles est possible,

- ✓ un nombre d'impacts faible (entre 50 et 200) produit suffisamment de matière pour conduire une analyse et permet d'effectuer rapidement d'autres irradiations,
- ✓ l'utilisation de l'aiguille permet de dissocier l'enceinte et l'injecteur sans avoir de problème de flux de gaz vecteur,
- ✓ l'injecteur On-column permet de concentrer les pyrolysats et de les transmettre sans discrimination vers la colonne. Les quantités de molécules peuvent être faibles.

L'inconvénient principal du montage est la géométrie de l'injecteur. L'injecteur comporte deux zones (figure 3.4.6) :

- un volume vide sous le septum balayé par le flux d'hélium,
- une zone où se place un guide-aiguille pour les injections dans la colonne. Seule cette partie est entourée des résistances chauffantes.

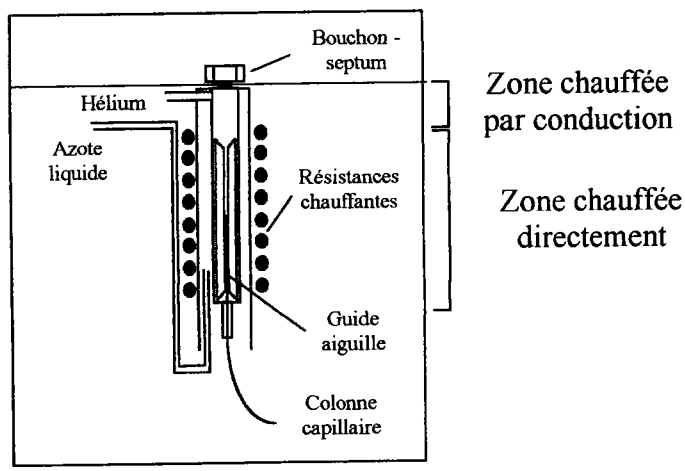


Figure 3.4.6 Injecteur On-column

Les pyrolysats peu volatils se déposent dans la première zone de l'injecteur sous l'effet cryogénique.

Lors du chauffage de l'injecteur, cette zone se réchauffe par conduction et non directement. La désorption des molécules peu volatiles se fait en plusieurs temps. Le chromatogramme peut comporter deux pics dus à la désorption en deux temps de la même molécule.

3.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. The laser Guidebook (Second edition)
   J. Hecht - MC GAW HILL, New York, (1992)
2. Principles of Lasers (Third edition)
   O. Svelto - PLENUM, New York, (1989)
3. D.M. Hercules, R.J. Day, K. Balasanmugan, T.A. Dang, D.C.P. Li, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 280 A
4. Srinivasan R., Braren B., *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 1303
5. Muller J.F., Pelletier M., Krier G., Weil D., Campana J., *Microbeam Analysis Ed.*
   P.E. Russel - San Francisco Press, 1989, 311
6 Lazare S., Granier V., *Laser Chem.*, 1989, **10**, 25
7. Greenwood P.F., Zhang E., Vastola F.J. and Hatcher P.G., *Anal. Chem*; 1993, **65**, 1937-1946
8. Cecchetti W., Polloni R. and al., *Journal of Analytical ans Applied Pyrolysis*, 1992, **23**, 165-173
9. Stout S.A. and Hall K., *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1991, **21**, 195-205
10. Choi Y., Lee H., Fountain S.T. and Lubman M., *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 1994, **5**, 106-112

4. Etude de deux polymères synthétiques

4.1. INTRODUCTION

Nous montrons avec cet exemple, la spécificité de la pyrolyse thermique couplée à la CG/SM pour l'analyse de polymères synthétiques, ainsi que l'aide qu'elle peut apporter en complément à d'autres techniques d'analyse.

Pour ce faire, nous avons choisi deux polymères synthétiques industriels représentatifs de la potentialité de la pyrolyse GC/MS. L'un deux (L) de structure et de composition connues, nous a servi de référence. L'autre (M) de structure proche de (L) est l'échantillon à analyser.

L'analyse par pyrolyse laser était difficile car les deux polymères sont transparents aux longueurs d'ondes incidentes habituellement utilisées.

De très nombreux auteurs ont établi par pyrolyse thermique les relations entre les monomères présents dans les copolymères (cf I-1), les mécanismes de ruptures en fonction de la nature ou de la proportion de chacun des monomères. De même, nous avons pu, grâce à la pyrolyse thermique :

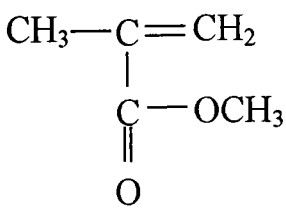
- ✓ définir les monomères présents dans les polymères,
- ✓ donner leur proportion,
- ✓ définir les additifs présents,
- ✓ établir les mécanismes de pyrolyse.

4.2. PRESENTATION DES POLYMERES ETUDIES

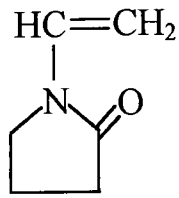
Dans cette étude, nous avons réalisé les tests de faisabilité avec deux copolymères constitués de méthacrylate de méthyle (MMA) et de N-Vinyl 1, pyrrolidone 2 (NVP).

Le premier polymère L comporte :

- ✓ 30% de MMA (Pic moléculaire $M^{\bullet+}$, m/z = 100),
- ✓ 70% de NVP (Pic moléculaire $M^{\bullet+}$, m/z = 111),
- ✓ moins de 0,2 % en poids de trois additifs de type connu.



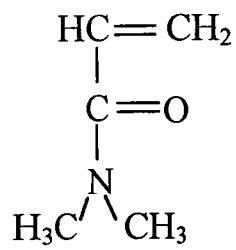
MMA



NVP

Le second copolymère M est l'association de trois monomères en proportions inconnues :

- ✓ le méthacrylate de méthyle (MMA),
- ✓ le N-Vinyl 1, pyrrolidone 2 (NVP),
- ✓ le DiMéthylAcrylAmide (DMAA) (Pic moléculaire $M^{\bullet+}$, m/z = 99).



DMAA

4.3. PYROLYSE LASER FT/MS

Avant l'arrivée du chromatographe en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse au laboratoire, l'analyse des polymères (L) et (M) posait quelques problèmes. Nous exposons les résultats obtenus pour le polymère (L).

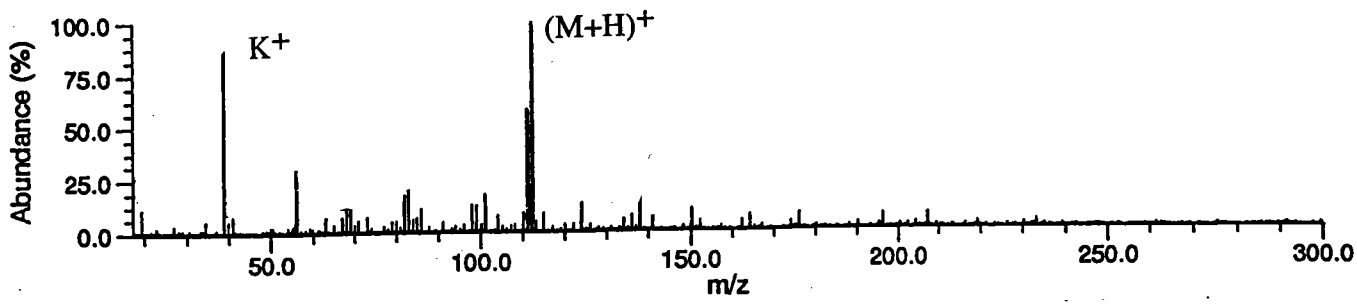
L'analyse par pyrolyse laser FT/ICR/MS ont été réalisées avec trois longueurs d'onde, la première provoquant un effet essentiellement photonique (λ = 193 nm), les deux autres (λ = 249 et 335 nm) provoquant un effet vraisemblablement mixte : thermique et photonique.

Les spectres de masse obtenus lors de l'irradiation de L avec ces trois longueurs d'onde ne montrent pas de différence significative. Le matériau semble être transparent à ces longueurs d'ondes.

4.3.1. Spectres de masse obtenu pour L, avec une longueur de 193 nm

Seul le monomère NVP conduisant à un ion très stable a été détecté, en mode positif, et identifié.

Mode de détection positif



Mode de détection négatif

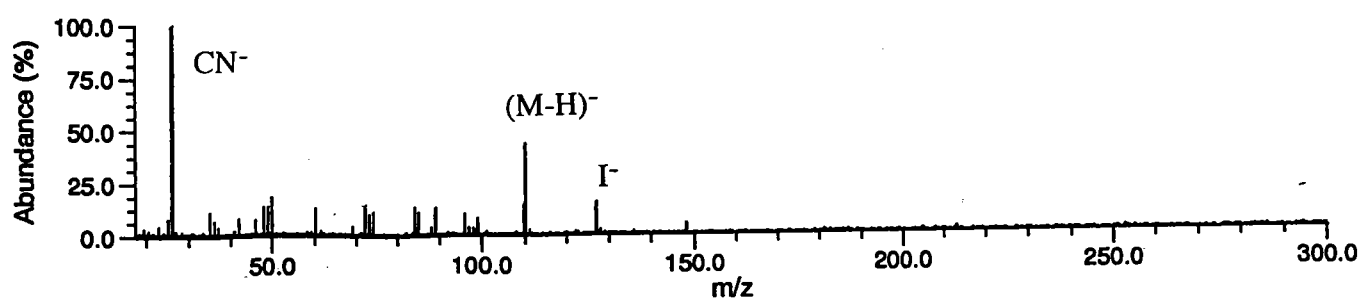


Figure 4.3.1 Spectres de masse obtenus par analyse FT/ICR/MS

4.3.2. Mécanisme de fragmentation et d'ionisation

En mode de détection positif, seul le pic de masse m/z = 112 est visible sur le spectre. Ce pic correspond à la molécule protonée NVP formée selon le mécanisme ci après (figure 4.3.2).

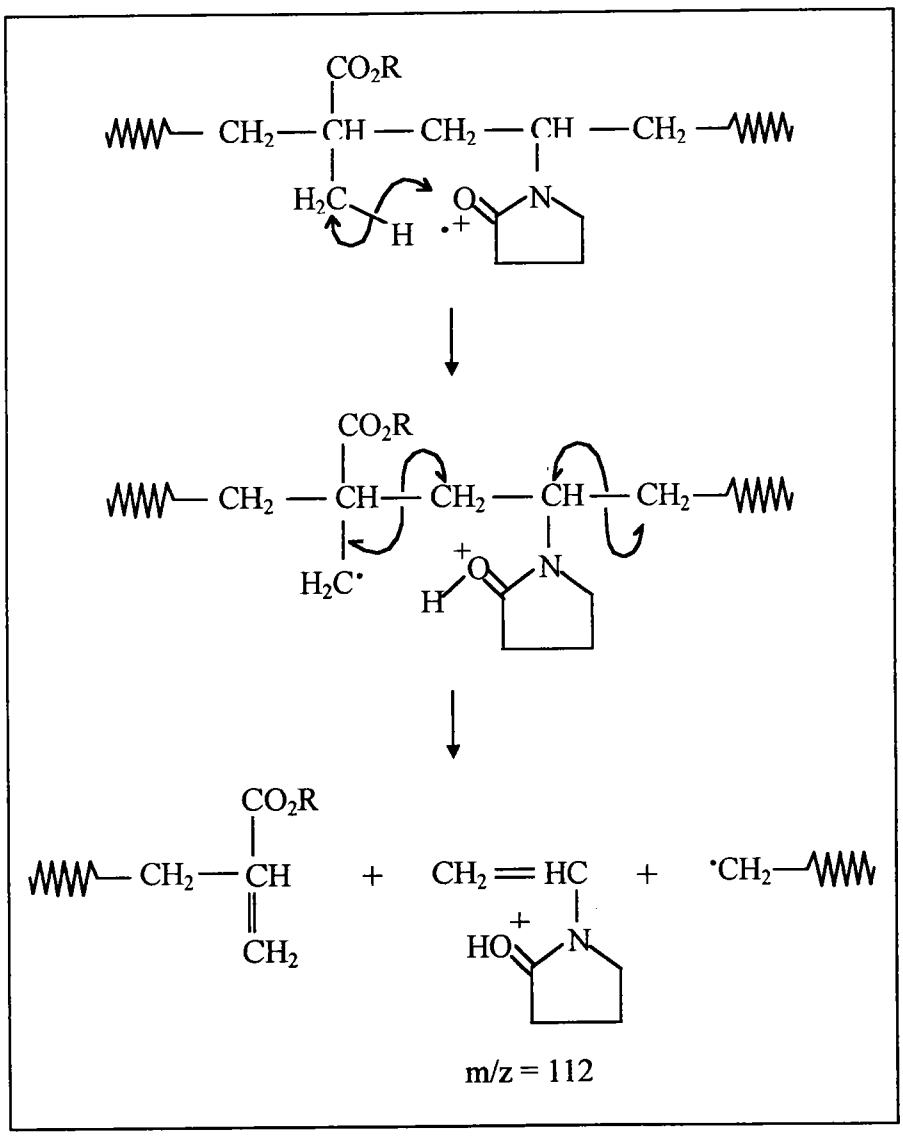


Figure 4.3.2 Mécanisme de fragmentation et d'ionisation: obtention de l'ion m/z = 112 correspondant au monomère NVP protoné

Le site de première ionisation est systématiquement l'atome d'oxygène, la décomposition/ionisation se fait sur le monomère NVP. C'est essentiellement ce monomère qui est détecté, sous la forme quasi moléculaire $(NVP+H)^+$.

Une réaction de propagation radicalaire peut se produire, mais dans ce cas, nous ne pouvons détecter ces fragments non chargés.

En mode négatif, un seul pic significatif est détecté. Il s'agit de la masse m/z = 110, qui correspondrait à (NVP-H) chargé négativement.

4.3.3. Conclusion

L'analyse par pyrolyse laser FT/MS montre la présence du monomère N- Vinyl Pyrrolidone (NVP). Seul ce monomère est susceptible de s'ioniser efficacement et donc d'être détecté. Cette information n'est pas suffisante pour caractériser le polymère.

Nous allons donc soumettre les polymères à la pyrolyse thermique CG/MS.

α α α

4.4. PYROLYSE THERMIQUE CG/SM

Le polymère (L) sert de standard. Ainsi, le protocole d'analyse du polymère (M) est établi à partir des résultats obtenus pour le polymère (L).

Les conditions de pyrolyse étant essentielles pour la dégradation de polymères synthétiques, nous avons effectué quelques variations de température de pyrolyse, de vitesse de montée en température et de température d'interface.

4.4.1. Mise au point des conditions expérimentales

Le but de ce travail est de mettre au point une méthode pour obtenir la proportion des monomères constituant les deux polymères. Plusieurs paramètres expérimentaux ont été étudiés :

- ✓ la masse de produit pyrolysée,
- ✓ la température de pyrolyse et de l'interface,
- ✓ le temps de pyrolyse,
- ✓ la vitesse du gaz vecteur,
- ✓ la longueur de la colonne,
- ✓ la montée en température du four.

Certains de ces paramètres sont essentiels. La propagation de la chaleur au sein de l'échantillon doit être uniforme et rapide. Pour cela, le volume, donc la masse de produit, doit être assez faible. Nous avons pu pyrolyser 60 µg de produit L, sans apparemment induire de mécanismes de dégradations secondaires. L'échantillon L semble bien conduire la chaleur. De plus, une quantité de 60 µg offre une sensibilité suffisante pour la détection.

La montée en température de pyrolyse, si elle est rapide (20°C/ms), permet d'effectuer une pyrolyse uniforme de l'échantillon.

Une montée moins rapide induit des gradients de températures au sein de l'échantillon ce qui provoque des phénomènes de pyrolyse différents. Dans notre cas, une montée en température de 0,1 °C/ms induit quelques produits de recombinaison minoritaires.

La température de l'interface du pyrolyseur doit être ajustée afin d'éviter des dégradations de l'échantillon avant la pyrolyse et la condensation des molécules formées pendant la pyrolyse sur les parois de l'interface.

La température de l'interface semble avoir peu d'influence sur les produits formés pendant ou après la pyrolyse de notre polymère (L). Une température de 180°C est un bon compromis pour transmettre les composés formés sans induire de réactions supplémentaires à la pyrolyse.

Un flux rapide de gaz vecteur (hélium) permet d'évacuer rapidement les pyrolysats formés. Nous l'avons fixé à 20 ml/min.

Une phase apolaire (100% de diméthylpolysiloxane) permet une bonne séparation des composés en fonction essentiellement de leur point d'ébullition. Les monomères issus de la pyrolyse étant peu nombreux, une longueur de colonne de 25 mètres permet d'avoir une résolution correcte.

Après de nombreux essais, nous sommes parvenus à un protocole qui semble adapté à notre problème (tableau 4.4.1).

Paramètres	Choix
Masse de polymère	60 µg
Température de l'interface	180°C
Vitesse de montée en température du filament	20°C/ms
Température affichée[1] de pyrolyse	500°C
Temps de pyrolyse	5 secondes
Flux de gaz vecteur (hélium)	20 ml/min
Colonne HP1 (type non polaire, phase : 100% diméthylpolysiloxane)	long. : 25 m., diam. : 0,22 mm, épais. du film : 0,33 µm
Températures des éléments du GC/MS	
Injecteur (mode splitless)	250°C
Four	50°C pendant 2 min. jusqu'à 290°C à 10°C/min.
Interface GC/MS	250°C
Source d'ionisation	200°C

Tableau 4.4.1 Paramètres du protocole

[1] La température réelle au sein de l'échantillon est toujours légèrement inférieure à celle affichée.

4.4.2. Résultats et mécanismes de dépolymérisation

4.4.2.1. Polymère (L)

L'analyse avec ces paramètres instrumentaux, donne des chromatogrammes présentant principalement les deux monomères du polymère L (figure 4.4.1 et 4.4.2). Nous n'observons ni dimère, ni trimère.

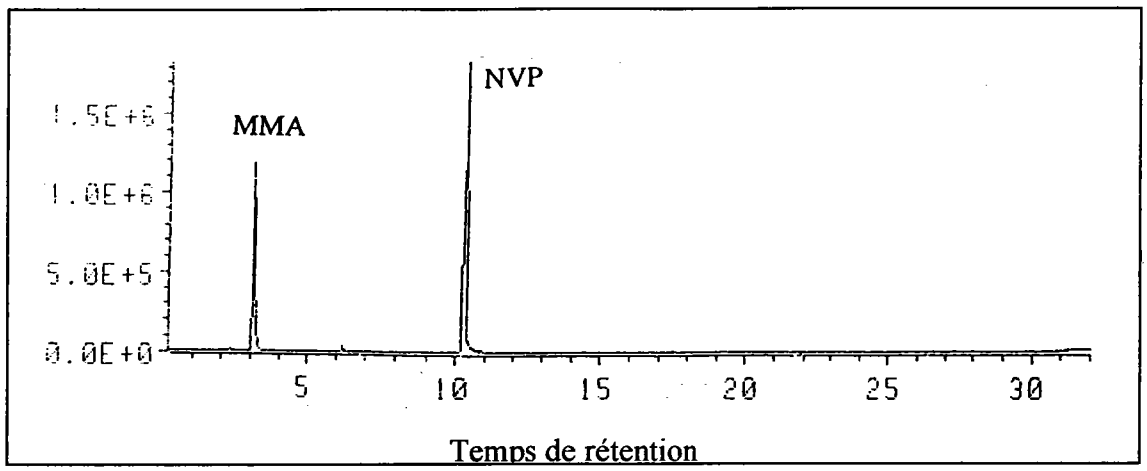
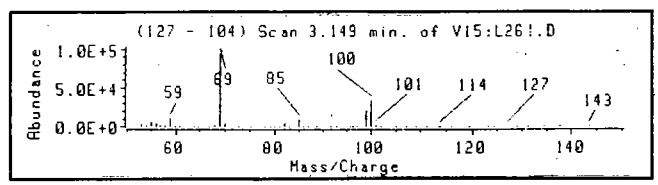


Figure 4.4.1 Pyrogramme du polymère (L), en courant ionique total

Par pyrolyse thermique et avec notre protocole, nous obtenons les proportions de monomères annoncées soit 30% de MMA et 70% de NVP. Ces chiffres ont été obtenus en intégrant l'aire des pics.

Méthacrylate de méthyle



N-vinyl 1, pyrrolidone 2

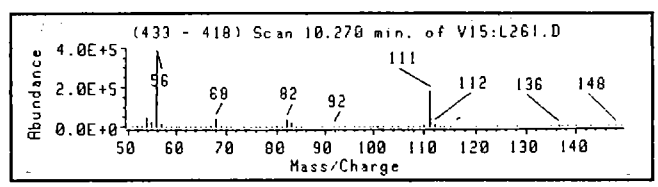


Figure 4.4.2 Spectres de masse (IE 70 eV) des deux monomères

De plus, nous montrons que le mécanisme de pyrolyse est une dépolymérisation (monomère par monomère) suivant le modèle de la propagation radicalaire (Figure 4.4.3).

Le mécanisme de pyrolyse du polymère (L) permet de libérer les monomères séparément. Ainsi, trouver la nature des monomères et leur rapport au sein du polymère est particulièrement aisé.

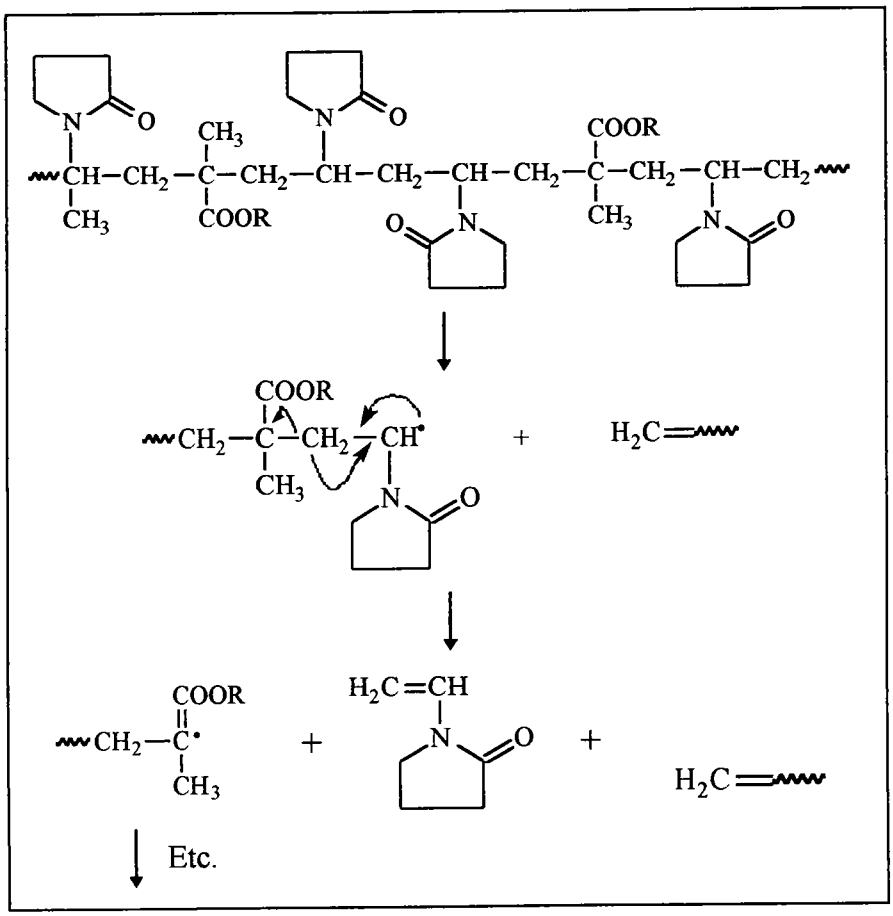


Figure 4.4.3 Dépolymérisation radicalaire conduisant à la libération de NVP

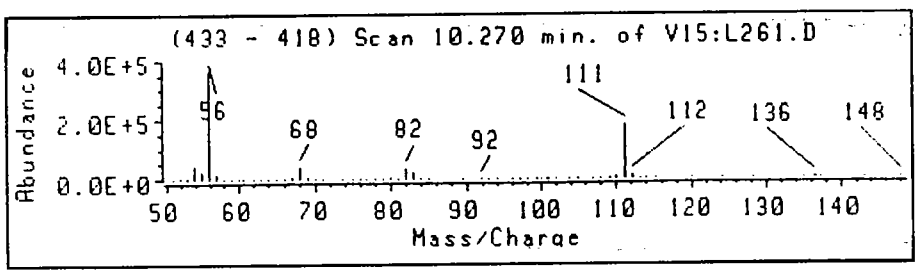


Figure 4.4.4 Spectre de masse du monomère NVP (IE)

Aucun des additifs présents dans le polymère n'a pu être détecté.

Les additifs (de type connu) ont été injectés en solution et analysés par GC/MS sans problème. Leur absence des pyrogrammes du polymère n'est pas due à leur nature chimique mais plutôt à la faible proportion (0,2%) au sein de l'échantillon.

4.4.2.2. Polymère (M)

L'échantillon M, soumis aux mêmes conditions de pyrolyse, se dégrade pour donner quatre pics (figure 4.4.5): les trois monomères MMA, NVP et DMAA, et l'additif (A) (figure 4.4.6).

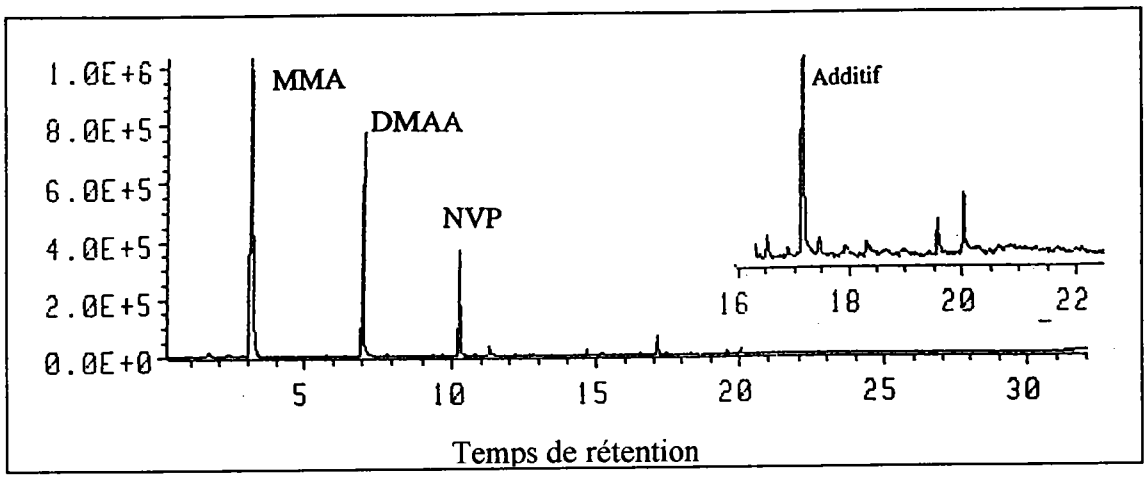


Figure 4.4.5 Pyrogramme du polymère (M)

MMA (3,1 min)

DMAA (7,0 min)

NVP (10,2 min)

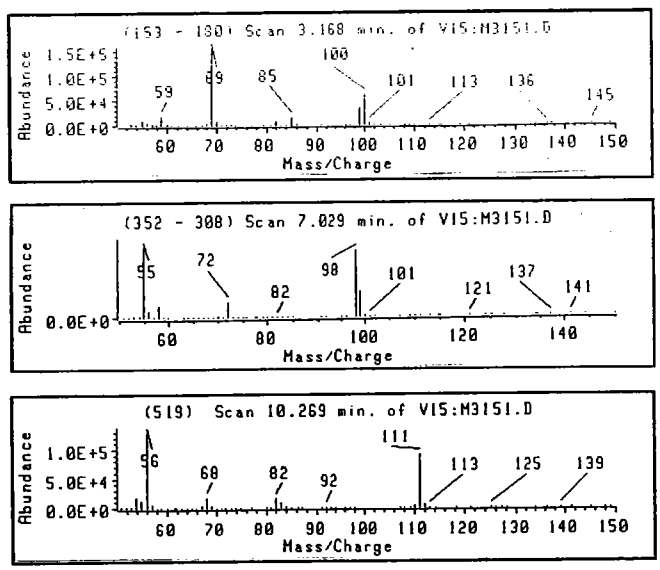


Figure 4.4.6 Spectres de masse des trois monomères (IE à 70 eV)

L'intégration des aires des pics donne les pourcentages suivants :

- ✓ 50% de MMA,
- ✓ 30% de DMAA,
- ✓ 15% de NVP,
- ✓ 5% d'un additif de réticulation (A).

La dépolymérisation se fait, comme pour le polymère (L), par un mécanisme de propagation radicalaire, libérant séparément les trois unités, ainsi qu'un agent de réticulation.

Le polymère (M) réagit de la même façon à la pyrolyse thermique que le polymère (L). Nous avons ainsi défini les monomères qui le constituent, établi les proportions de chacun et détecté l'additif (que nous avons noté A).

4.5. CONCLUSION

Pour les deux copolymères, la pyrolyse thermique s'avère être particulièrement adaptée. En effet, elle permet de les décomposer en leurs constituants selon un processus de dépolymérisation radicalaire. Cette dégradation libère les monomères sous leur forme native et limite leurs recombinaisons.

La séparation, l'identification et la quantification sont ainsi rendues très faciles.

La recherche d'éléments trace comme les additifs, est limitée par leur quantité dans le mélange et/ou leur affinité pour la phase de la colonne. Ils doivent représenter au moins 5% du mélange (soit un poids 3 µg), pour pouvoir être détectés directement par pyrolyse CG/SM.

Pour des copolymères particulièrement résistants à l'irradiation laser, la pyrolyse thermique est un moyen de dégradation efficace.

5. Etude comparée de la pyrolyse thermique et de la pyrolyse laser couplées à la GC/MS des matrices MALDI

5.1. INTRODUCTION

Une application de l'ablation/ionisation laser permet de désorber et d'ioniser des molécules de haut poid moléculaire sans fragmentation. Cette technique est l'ablation/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

Le principe consiste à utiliser une molécule appelée matrice, absorbant la longueur d'onde du laser incident qui ne dégrade pas la molécule cible. L'irradiation laser induit la fragmentation de la matrice, permettant alors l'éjection et l'ionisation douce de la molécule cible. La détection de ces ions se fait par des spectromètres à temps de vol ou à résonance cyclotronique.

On émet l'hypothèse que les molécules générées par impact laser ont une grande vitesse d'éjection et facilitent la désorption des molécules cibles. Cependant, le mécanisme du processus de désorption[1] reste mal connu.

Des études réalisées par FT/ICR/MS ont montré une certaine diversité des ions générés et des mécanismes de formation.

---

[1] conversion des molécules d'échantillon de la phase condensée à la phase gazeuse

Les résultats obtenus permettent de classer ces différents acides en trois groupes distincts selon le type d'ions formés :

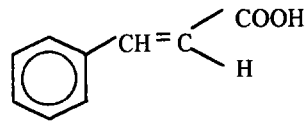
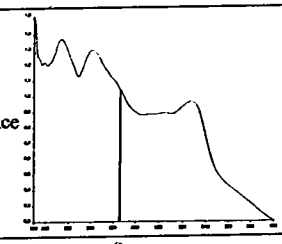
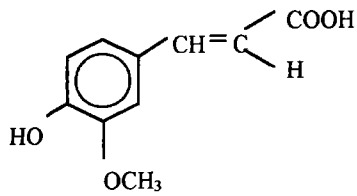
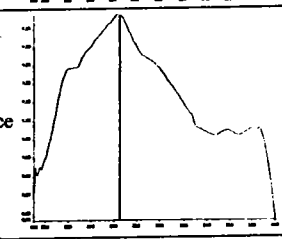
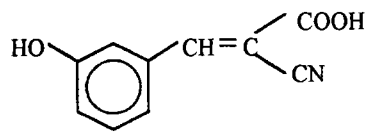
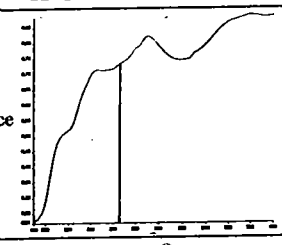
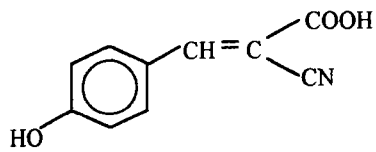
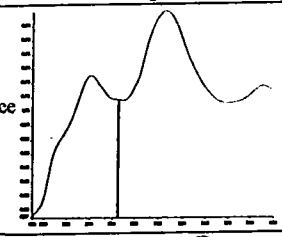
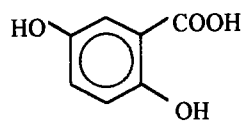
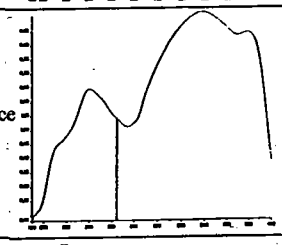
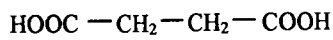
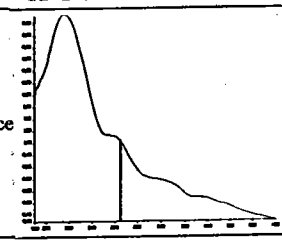
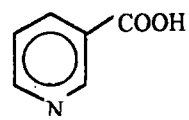
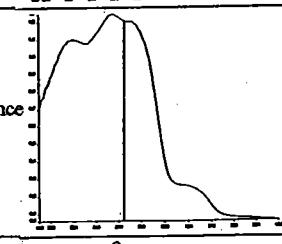
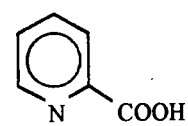
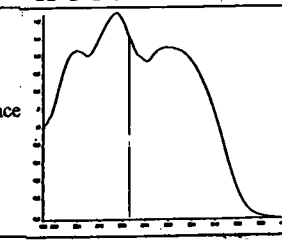
- ✓ des dimères,
- ✓ des dimères décarboxylés,
- ✓ des monomères décarboxylés.

Il apparaît que les matrices ont tendance à se décarboxyler facilement. Pour mettre en évidence le dégagement de dioxyde de carbone et identifier les molécules neutres formées, nous allons analyser ces acides organiques par pyrolyses thermique et laser couplées à la GC/MS.

Ceci se justifie d'autant plus que, lors d'un impact laser (à faible irradiance), la grande majorité des espèces formées (> 99 %) sont des molécules neutres.

α α α

5.2. *PRESENTATION DES ACIDES ORGANIQUES UTILISES*

Acide cinnamique		
Acide ferulique		
Acide α cyano 3 hydroxycinnamique		
Acide α cyano 4 hydroxycinnamique		
Acide 2,5 dihydroxybenzoïque		
Acide succinique		
Acide nicotinique		
Acide picolinique		

Acide	Absorbance à 266 nm
Acide cinnamique	1,05
Acide ferulique	1,39
Acide α cyano-3-hydroxycinnamique	0,73
Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	0,68
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	0,54
Acide succinique	0,45
Acide nicotinique	1,2
Acide picolinique	1,1

Tableau 5.2.1 Absorbances à 266 nm des acides organiques

5.3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

5.3.1. Pyrolyse thermique

La température de l'interface du pyrolyseur est importante car elle peut soit agir sur l'échantillon avant la pyrolyse, soit induire des dégradations secondaires sur les pyrolysats formés.

Ainsi, pour chaque matrice, une température d'interface a été définie en fonction de la température de vaporisation de chacune d'elles déterminée sur un banc Kofler (tableau 5.3.1).

Acide organique	Température d'interface
acide cinnamique	70°C
acide ferulique	120°C
acide α cyano- 3-hydroxycinnamique	200°C
acide α cyano-4-hydroxycinnamique	200°C
acide 2,5-dihydroxybenzoïque	220°C
acide succinique	70°C
acide nicotinique	70°C
acide picolinique	70°C

Tableau 5.3.1 Températures de vaporisation des acides organiques

La température, la montée en température et le temps de pyrolyse sont fixés pour chaque échantillon à : 600°C, 20°C/ms et 5 secondes.

La masse d'échantillon pyrolysée est d'environ 80 µg

5.3.2. Pyrolyse laser

Les échantillons sont des poudres capables de se vaporiser sous l'effet des impacts laser. Afin d'avoir une surface plane et d'éviter que le gaz vecteur ne véhicule la poudre vers la colonne, les échantillons sont compactés en pastille.

Les pastilles sont formées à partir de quelques mg de poudre et pressées successivement à 2, 4 et 6 tonnes pendant un temps de 5 minutes.

La longueur d'onde utilisée (λ =266 nm) permet une analyse 'directe'.

La majorité des acides organiques absorbent cette longueur. Les spectres d'absorption présentés page 85, ont été réalisés sur les poudres pastillées. L'enregistrement des spectres a été effectué en mode réflectance. Un traitement informatique permet de les transposer en absorbance.

L'irradiance est d'environ 8.10^6 W/cm^2. Elle correspond aux valeurs utilisées en MALDI.

Le flux d'hélium chauffé à 50°C, balaye l'enceinte à la vitesse de 20 ml/min. Le diamètre de l'enceinte étant de 1 cm, les pyrolysats sont évacués vers l'injecteur en un peu plus de deux secondes.

5.3.3. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

Paramètres GC/MS	Pyrolyse thermique	Pyrolyse laser
Injecteur température	Split/splitless 200°C	On-column cryogénique 0°C pdt 2 min., puis 300°C
Colonne HP1 (non polaire) diamètre : 0,2 mm ép. du film : 0,33 µm	l = 25 mètres	l = 12 mètres
Four	35°C pdt 2 min., puis 20°C/min. jusqu'à 280°C	0°C pdt 2 min., puis 15°C/min. jusqu'à 300°C
Température d'interface	300°C	300°C
Température de source	240°C	240°C
Ionisation par I.E.	70 eV	70 eV
Domaine de masses balayées	m/z = 35 à 250	m/z = 30 à 250

5.4. PYROLYSE THERMIQUE GC/MS

Dans le cas de la pyrolyse thermique, seule la chaleur provoque la dégradation des acides organiques. Nous pouvons ainsi appréhender et caractériser les mécanismes dus à un effet thermique.

5.4.1. Résultats expérimentaux

Les acides étudiés sont caractérisés par une décarboxylation, sauf les acides succinique et 2,5 DHB qui se déshydratent (tableau 5.4.1).

Matrices	Molécules majoritaires détectées	Mécanismes
Acide cinnamique	**Styrène**	Décarboxylation
Acide ferulique	**2-méthoxy-4-vinylphénol**	Décarboxylation
Acide α cyano-3-hydroxycinnamique	**8-quinolinol** et **6-quinolinol**	Décarboxylation et réarrangement
Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	**7-quinolinol**	Décarboxylation et réarrangement
Acide 2,5-dihydroxy-benzoïque	3-phénoxyphénol **Acide benzoïque phényl ester**	Réactions intermoléculaires
Acide succinique	**Dihydro-2,5-furanedione**	Déshydratation
Acide nicotinique	**Pyridine**	Décarboxylation
Acide picolinique	**Pyridine**	Décarboxylation

Les molécules notées en caractères gras sont les constituants majoritaires du chromatogramme

Tableau 5.4.1 Molécules formées lors de la Prolyse thermique GC/MS des différents acides étudiés.

Les pyrogrammes présentent les pics correspondant au dioxyde de carbone et aux molécules décarboxylées. Lorsqu'elle se produit, la réaction est unique.

L'effet thermique induit la coupure radicalaire de la liaison la plus faible de la molécule, produisant ainsi pour la majorité des acides, un dégagement de dioxyde de carbone.

La structure asymétrique de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique explique la formation de deux molécules issues de la décarboxylation.

Dans le cas de l'acide succinique, la déshydratation est une réaction plus facile que la décarboxylation.

La résistance de l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque à la chaleur est très importante. Le pyrogramme obtenu présente peu de pics d'abondances faibles ne permettant pas de déduire un mécanisme type de cet acide.

L'acide ferulique présente le pyrogramme type des molécules qui se décarboxylent (figure 5.4.1).

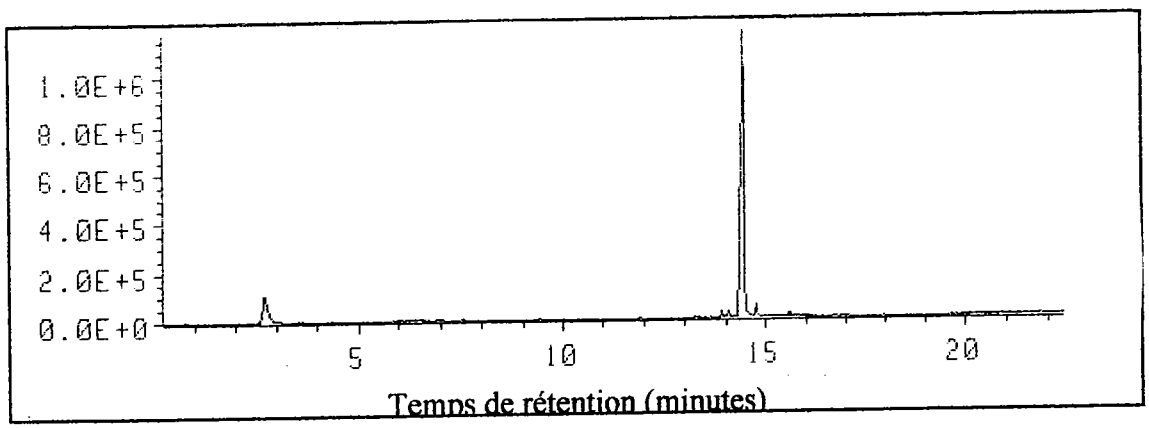
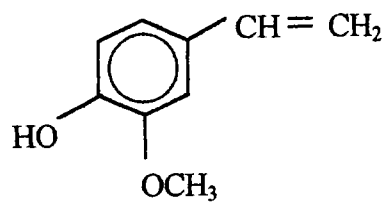


Figure 5.4.1 Pyrogramme thermique de l'acide ferulique

Il est caractérisé par le dioxyde de carbone et du composé de décarboxylation correspondant, le 2-méthoxy-4-vinylphénol :



m/z ($M^{\bullet+}$) = 150

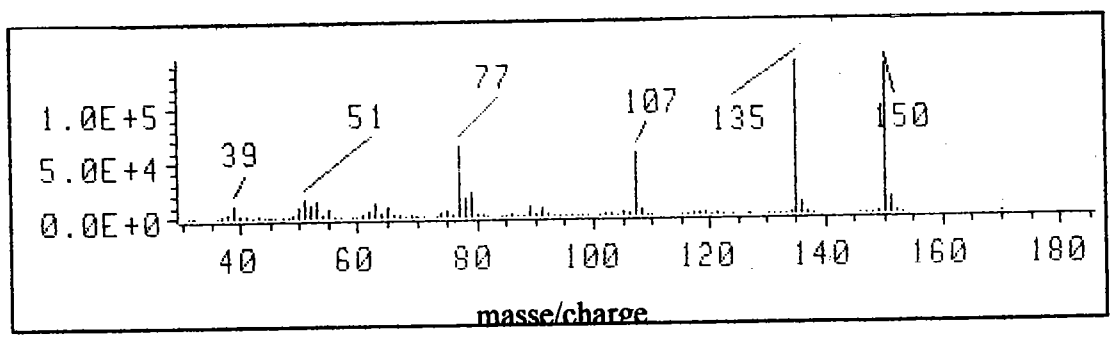


Figure 5.4.1 Spectre de masse du pic de temps de rétention 14,5 min.

5.4.2. Classification des matrices en fonction de la décarboxylation

La pyrolyse thermique induit la décarboxylation des acides organiques. En intégrant l'aire du pic de dioxyde de carbone, nous pouvons classer les acides organiques en fonction de leur tendance à se décarboxyler.

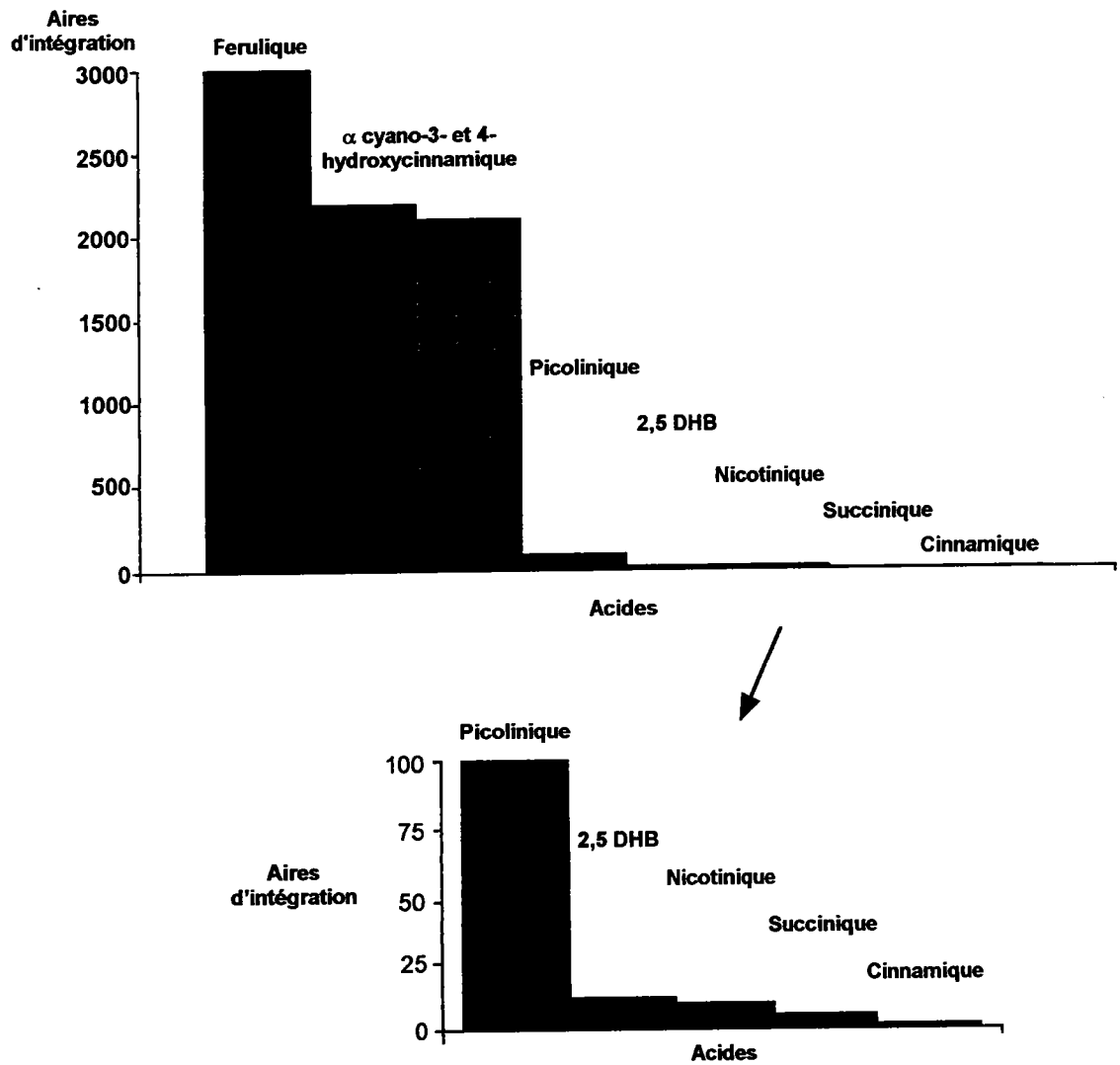


Figure 5.4.2 Classement des acides organiques en fonction de la production en dioxyde de carbone (aires sous pic intégrées).

L'acide ferulique et les isomères 3 et 4 d'acide α cyano, hydroxy-cinnamique semblent être les matrices les plus favorables à ce dégagement de CO_2.

5.4.3. Conclusion

Une pyrolyse thermique GC/MS, dans des conditions adaptées de températures d'interface et de pyrolyse, montre que les acides organiques ont tendance à se décarboxyler.

Ce phénomène de décarboxylation, supposé exister lors d'une impulsion laser en analyse par FT/ICR/MS, est confirmé. Le CO_2, ainsi que les molécules neutres formées peuvent effectivement participer au dégagement gazeux.

La classification des matrices en fonction de leur aptitude à produire ce gaz, indique que l'acide ferulique est le plus productif dans ce contexte.

α α α

5.5. *PYROLYSE LASER GC/MS*

La pyrolyse thermique permet de montrer que le mécanisme de dégradation prédominant des acides est la décarboxylation. L'énergie apportée à l'échantillon est purement thermique.

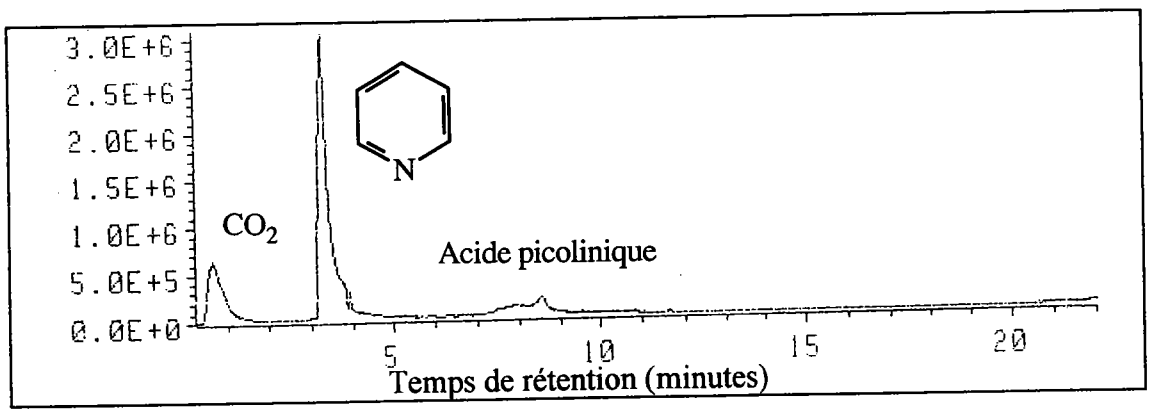
L'enceinte de pyrolyse laser permet d'étudier le comportement de ces acides organiques soumis à une irradiation laser.

L'analyse directe avec une longueur d'onde de 266 nm donne des résultats reproductibles et interprétables.

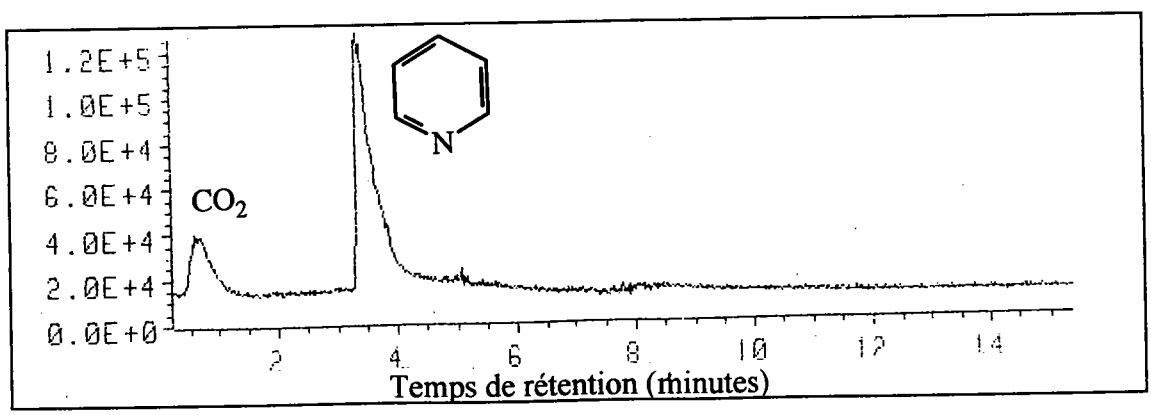
5.5.1. Limite de détection en fonction du temps d'ablation

Nous avons soumis l'acide picolinique à une ablation laser de longueur d'onde λ = 266 nm, avec une fréquence de 10 Hz à différents temps d'irradiation, ceci pour définir quel temps d'irradiation est suffisant pour obtenir des pics visibles.

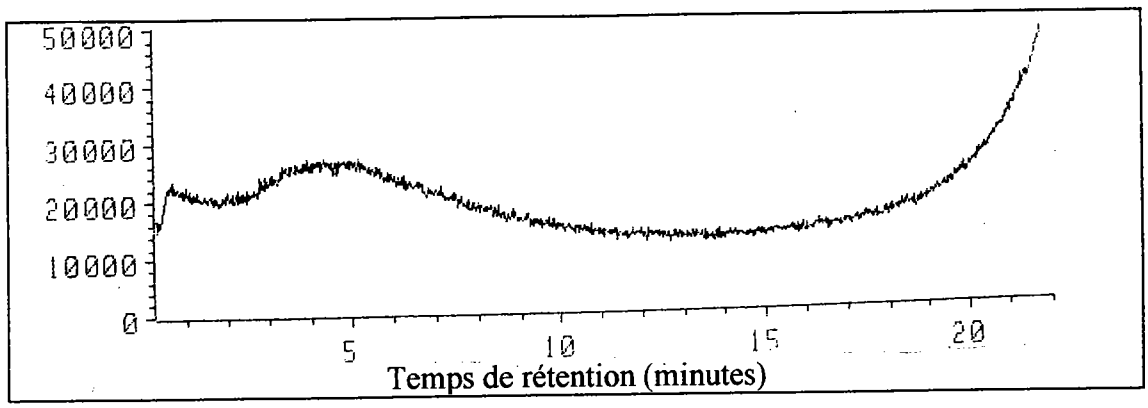
Ablation laser de la pastille pendant 15 secondes



Ablation laser pendant 3 secondes



Ablation laser pendant 1 seconde



Les résultats obtenus montrent que la désorption de l'acide picolinique est importante pour un temps d'ablation de 15 secondes. Ce temps d'irradiation sera appliqué aux acides aminés dans la suite du chapitre.

α α α

5.5.2. Résultats expérimentaux

Le tableau suivant indique les molécules majoritaires des pyrogrammes.

Matrices	Molécules détectées	Mécanismes
Acide cinnamique	**Benzène-éthenyl** **Styrène** Acide cinnamique	Décarboxylation Vaporisation
Acide ferulique	2-méthoxy-4-vinylphénol **Acide ferulique**	Décarboxylation Vaporisation
Acide α cyano-3-hydroxycinnamique	**8-Quinolinol et 6-Quinolinol** **Acide α cyano-3-hydroxycinnamique**	Décarboxylation Vaporisation
Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	**7-Quinolinol** Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	Décarboxylation Vaporisation
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	**Acide 2,5 dihydroxybenzoïque**	Vaporisation
Acide succinique	/	/
Acide nicotinique	**Pyridine** Acide nicotinique	Décarboxylation Vaporisation
Acide picolinique	**Pyridine** Acide picolinique	Décarboxylation Vaporisation

Tableau 5.5.1 Molécules majoritaires du pyrogramme et mécanismes de formation

Les matrices se comportent de la même façon, mis à part l'acide succinique qui continue à avoir un comportement différent, aucun pic n'étant détecté.

5.5.3. Mécanismes de pyrolyse laser

Nous pouvons noter deux mécanismes prédominants lors de l'irradiation laser :

- ✓ la décarboxylation,
- ✓ la vaporisation de la molécule **intacte**.

L'irradiation laser provoque la décarboxylation des acides. Son effet est purement thermique. La liaison la plus facile à rompre étant la liaison carboxylique, il est naturel de trouver ce mécanisme lors de l'ablation laser comme lors de la pyrolyse thermique.

Le deuxième phénomène est la volatilisation des molécules intactes. L'échantillon se vaporise sous l'effet des impacts du laser et atteint l'injecteur sans être modifié. Nous avons à faire au mécanisme de désorption.

Il se produit même de façon exclusive pour l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque. Cet acide étant thermiquement plus résistant (cf figure 5.4.1), seule la désorption est réalisée.

Avec un irradiance d'environ 8.10^6 W/cm^2, nous avons atteint le seuil de désorption de l'acide.

L'acide ferulique présente les mécanismes de décarboxylation et de volatilisation, nous continuons à le prendre comme exemple (figure 5.4.3).

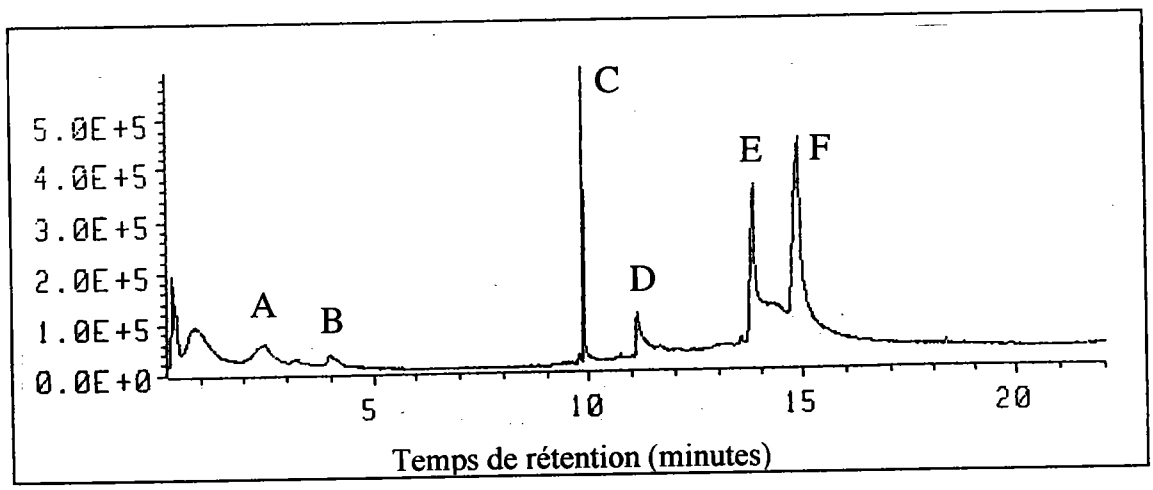
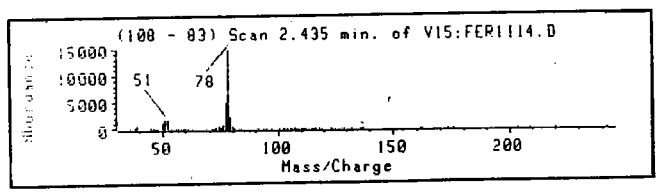


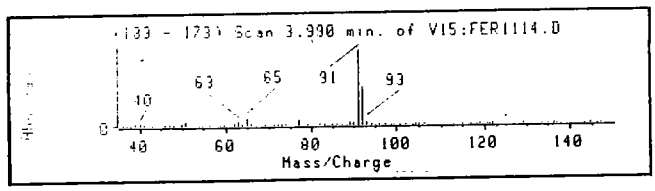
Figure 5.4.3 Chromatogramme d'ablation laser de l'acide ferulique

Les spectres de masse de chacun des pics sont présentés ci-après.

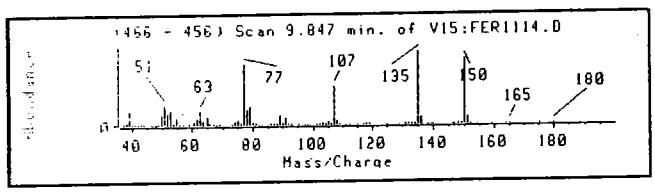
A. Benzène
(2,4 min.)



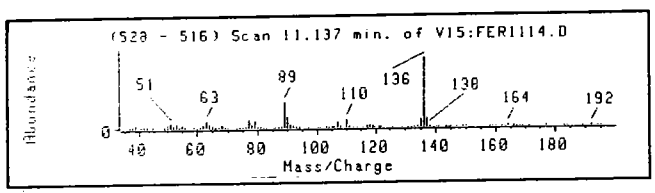
B. Toluène
(4,0 min.)



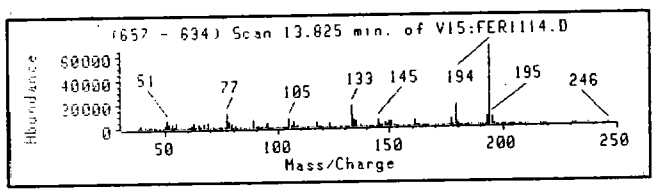
C. 2-méthoxy-4-vinylphénol
(9,8 min.)



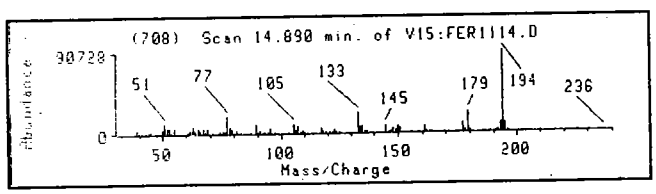
D. Acide décarboxylé
et déshydraté
(11,1 min.)



E. Acide ferulique
(13,8 min.)



F. Acide ferulique
(14,9 min.)



Remarque sur l'instrumentation

Les deux pics situés à 13,8 et 14,9 minutes sont issus de la même molécule et non pas d'isomères.

Une analyse de l'acide ferulique par injection en solution a montré que le produit présente un seul isomère. Les deux pics sont en fait dus à une désorption décalée dans le temps du même produit.

En fait, la géomètrie de l'injecteur permet d'expliquer cette désorption en deux temps. L'injecteur est constitué de deux zones chauffées différemment.

Les molécules provenant de l'aiguille de l'enceinte se déposent sur les parois réfrigérées par azote liquide de l'injecteur. La désorption des pyrolysats se fait par chauffage. Or, la partie inférieure de l'injecteur est entourée par les

résistances chauffantes, alors que la partie supérieure est chauffée par conduction (cf chapitre III).

La réalisation d'un nouveau corps d'injecteur pourra permettre de se défaire de ce problème (figure 5.5.1.). Le guide aiguille de la colonne serait remplacé par un cylindre de diamètre interne plus large. La partie supérieure du cylindre serait plus épaisse, réduisant le volume non chauffé. Deux orifices seraient percés pour permettre le passage du gaz vecteur de la colonne et l'introduction de l'aiguille de l'enceinte. La partie inférieure du cylindre serait de même géométrie que le guide aiguille, assurant ainsi les mêmes fonctions.

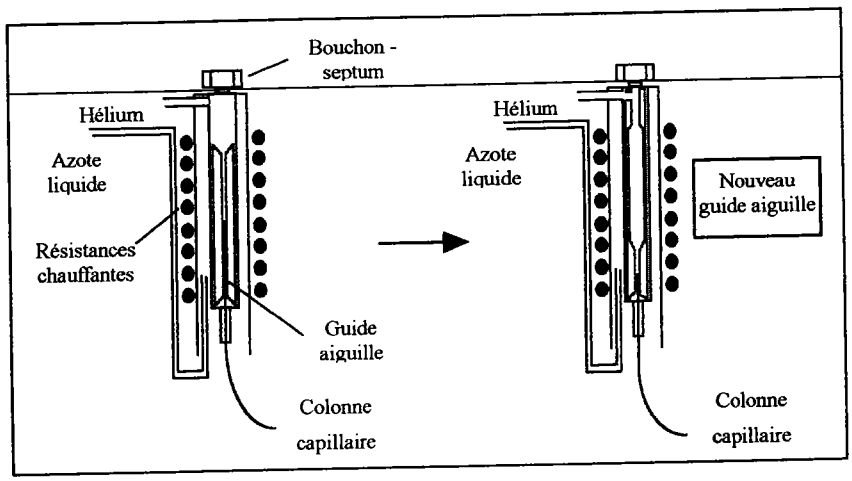


Figure 5.5.1 Nouveau corps d'injecteur

5.5.4. Conclusion

L'ablation laser montre un phénomène supplémentaire à la décarboxylation, c'est la volatilisation intacte de la molécule neutre. Nous avons un effet de souffle, qui libére à la fois la molécule intacte et la molécule décarboxylée.

L'énergie apportée par le laser incident produit une vaporisation de la matrice. L'excès d'énergie impose à la molécule de se stabiliser par rupture de la liaison la plus faible, celle de la fonction acide. Il apparaît également que la fonctionalisation de l'acide, utilisé comme matrice, induit plus ou moins fortement la coupure de la liaison responsable du départ du groupement carboxyle.

Couplé au dégagement de dioxyde de carbone, le dégagement d'acide intact joue un rôle important lors de la détente adiabatique qui suit l'ablation laser.

5.6. APPLICATION : L'EFFET DE COVAPORISATION

5.6.1. Introduction

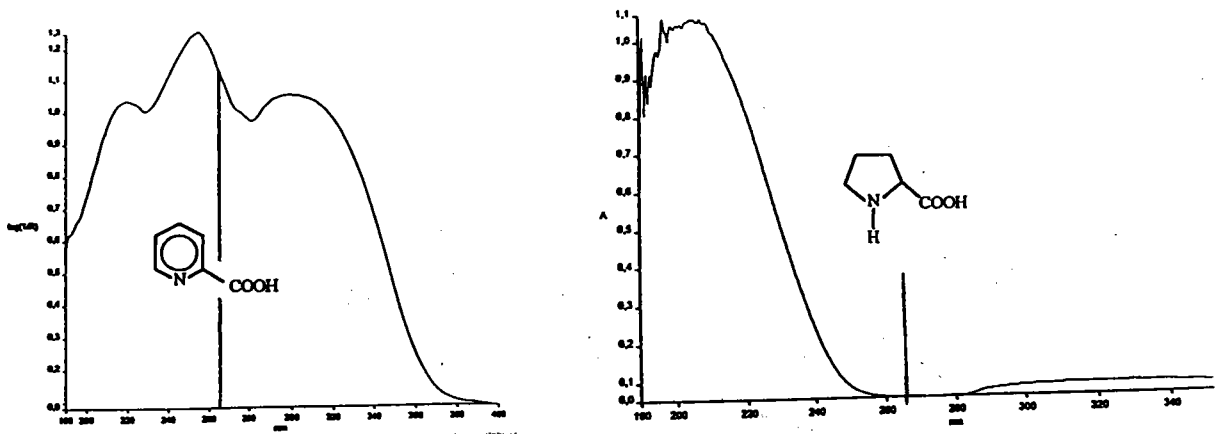
Le principe de la MALDI est de détecter une molécule cible intacte ionisée grâce à une molécule matrice.

La matrice absorbe préférentiellement la longueur d'onde incidente alors que la cible y est totalement transparente. L'irradiation laser provoque la dégradation des molécules de matrice. L'effet induit est double, il permet la vaporisation de la molécule cible et l'acquisition d'une charge.

Par pyrolyse laser GC/MS, nous avons reproduit le mélange d'une molécule transparente avec une molécule absorbant la longueur d'onde incidente. Il semble intéressant de connaître l'effet de la matrice, par la détection des molécules neutres formées, avec notre montage.

5.6.2. Conditions expérimentales

L'acide picolinique absorbant préférentiellement la longueur d'onde de 266 nm a été mélangé à la L-proline, acide aminé transparent (figure 5.6.1).



Acide picolinique L-Proline

Figure 5.6.1 Spectres d'absorption U.V. des pastilles d'acide picolinique et de L-proline

Nous avons compacté sous forme de pastille, les poudres :

- ✓ d'acide picolinique,
- ✓ de L-proline;
- ✓ du mélange acide picolinique - L-proline, en proportions différentes (1/1, 1/10 et 1/100).

Les pastilles ont été irradiées par un faisceau laser de longueur d'onde λ = 266 nm, à la fréquence de 10 Hz, pendant 15 secondes. L'énergie appliquée varie de 70 à 80 mJ. La surface irradiée est de 6 mm. L'irradiance pour les trois pastilles est d'environ 8.10^6 W/cm^2.

5.6.3. Résultats

Nous retrouvons, pour l'acide picolinique, les deux mécanismes de pyrolyse laser, la décarboxylation et la vaporisation (figure 5.6.2). La molécule de dégradation majoritaire est la pyridine.

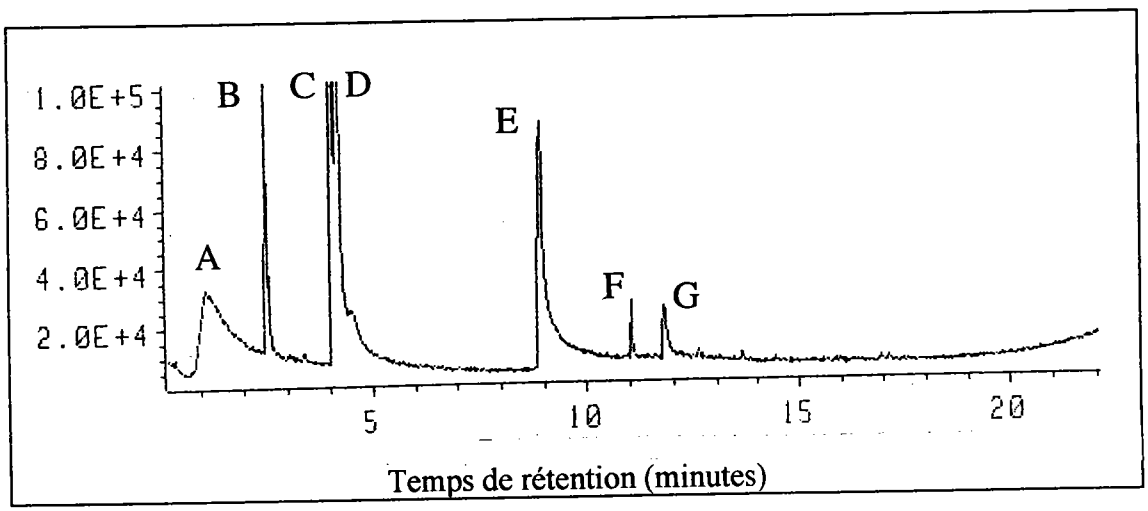


Figure 5.6.2 Pyrogramme de l'acide picolinique

Pic	m/z	Molécule
A	**44**	CO_2
B	**44**	CO_2
C	52, **79**	Pyridine
D	52, **79**	Pyridine
E	52, 78, 79, 106, 123	Acide picolinique
F	51, 78, 102, 128, 155, **156**	2,2' Bipyridine
G	51, 78, 104, 130, 155, **156**	2,3' Bipyridine

L'acide picolinique est une matrice idéale pour la pyrolyse laser GC/MS. Outre la vaporisation de l'acide organique intact, le pyrogramme présente un seul pic de dégradation correspondant à la pyridine.

Il convient maintenant de définir les proportions du mélange acide picolinique - L-proline.

Généralement en MALDI, les proportions de mélange molécule cible - matrice sont de l'ordre 1/1000. Le mélange comporte un large excès de matrice.

En ablation laser CG/SM, le mélange 1/1 de L-proline et d'acide picolinique donne un chromatogramme essentiellement constitué des pyrolysats de l'acide picolinique (figure 5.6.3). La proportion de la matrice est trop importante.

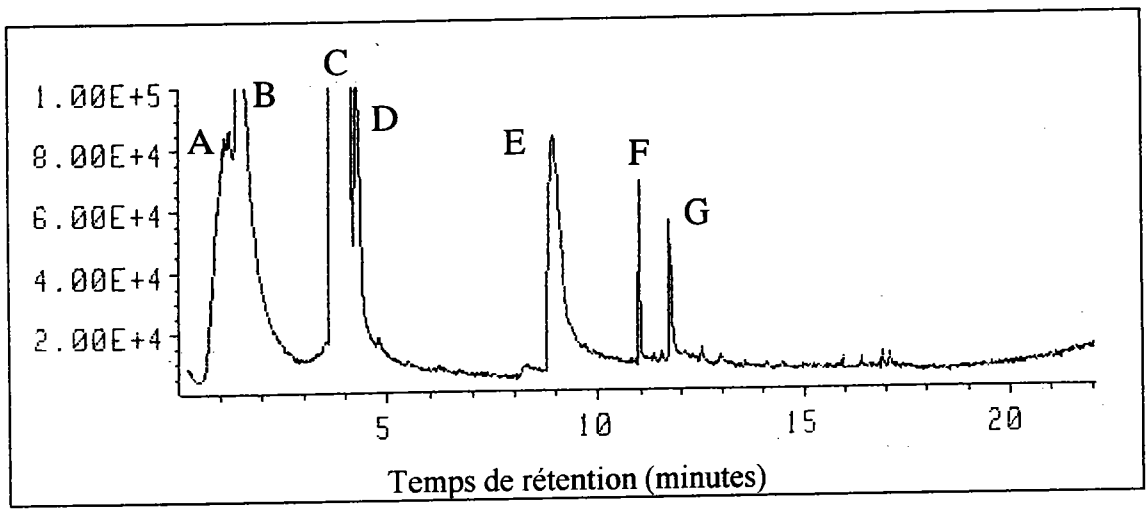


Figure 5.6.3 Pyrogramme *d'ablation laser du mélange 1/1 de L-proline - Acide picolinique*

Les molécules formées par la dégradation de l'acide picolinique masquent la détection des produits formés par la L-proline et particulièrement la molécule de L-proline intacte.

Le mélange 10/1 permet de désorber la L-proline sans dégradation. De plus, la quantité vaporisée peut être détectée (figure 5.6.4).

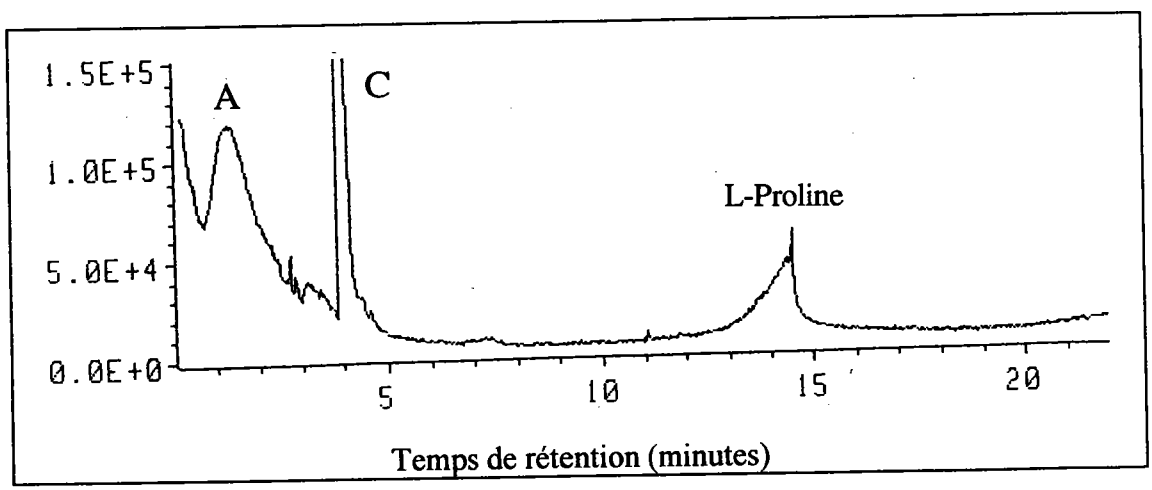


Figure 5.6.4 Pyrogramme du mélange10/1 (L-proline - Acide picolinique)

Nous détectons la L-proline désorbée sans dommage, lorsqu'elle est en excès par rapport à l'acide picolinique. Nous avons des proportions inverses de celle employées en MALDI.

Nous avons reproduit l'"effet de souffle" de la matrice. La matrice semble supporter l'énergie apportée par le faisceau laser. Elle se décarboxyle pour évacuer l'excès d'énergie, produisant une pression sur les molécules qui la côtoient. Les molécules visées sont alors expulsées intactes hors de la pastille.

Aucun pic d'acide picolinique n'étant détecté, la réaction de décarboxylation semble être totale.

La quantité d'acide picolinique peut être encore diminuée. Un mélange avec une proportion de 1/100 en acide organique, permet de désorber la L-proline (figure 5.6.5). Le rendement de la réaction est légèrement diminué.

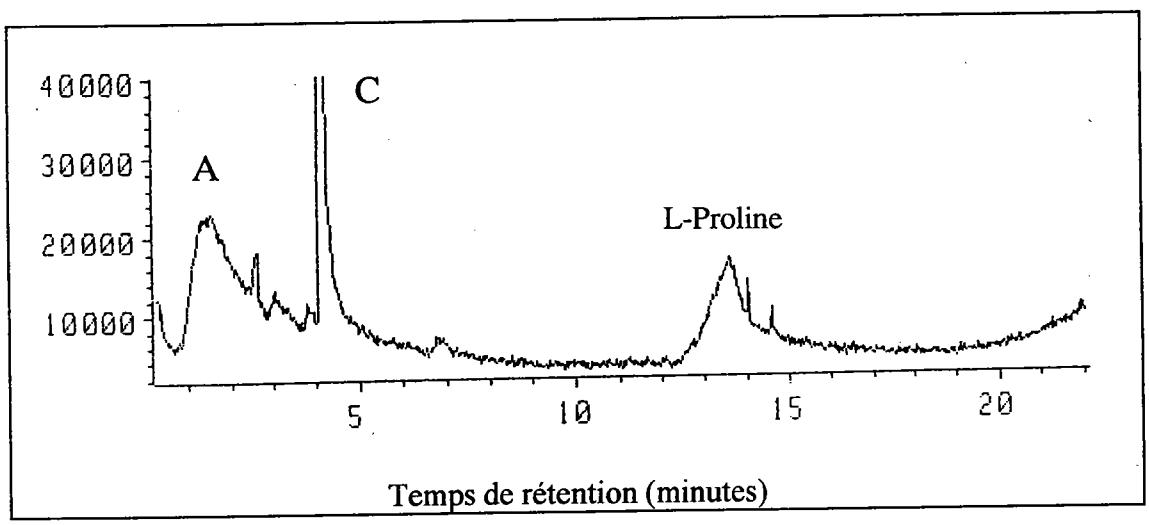


Figure 5.6.5 Mélange L-proline - Acide picolinique avec la proportion 100/1

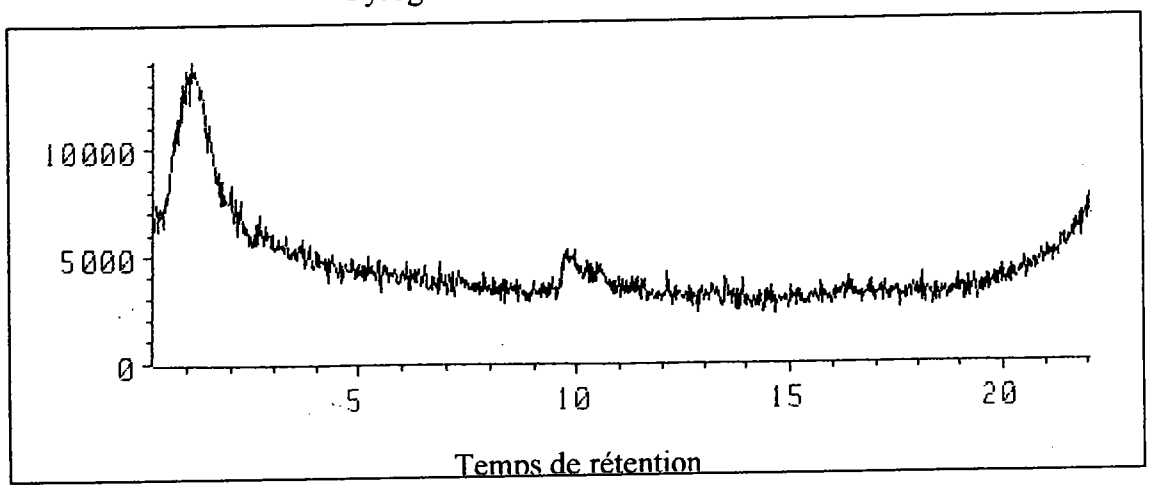
Une remarque est à apporter au sujet de la dégradation de la L-proline qui pourrait produire elle aussi la pyridine en se décarboxylant.

Nous avons soumis la L-leucine au même test en faisant varier les proportions du mélange avec l'acide picolinique. Nous observons les mêmes mécanismes.

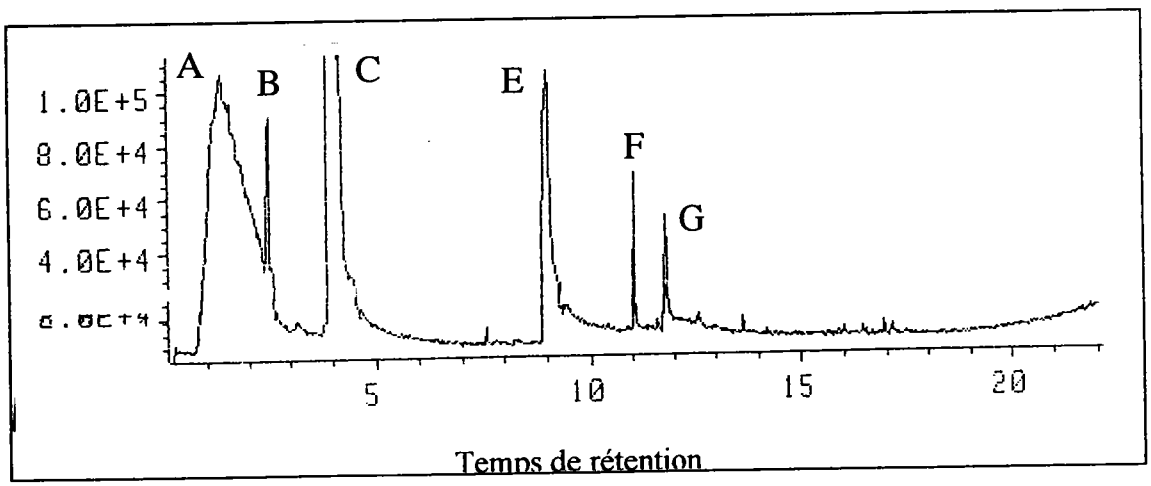
La L-leucine n'est pas visible si la proportion est de 1/1 (figure 5.6.6). Dès que la proportion atteint 10/1, la molécule de L-leucine est désorbée sans dommage.

Il semblerait que nous atteignions un seuil d'efficacité de l'acide picolinique. L'"effet de souffle" semble diminué et se perd dans l'ensemble de la pastille, provoquant peu l'expulsion des molécules environnantes.

Pyrogramme de la L-leucine seule



Pyrogramme du mélange L-leucine - Acide picolinique 1/1



Pyrogramme du mélange L-leucine - Acide picolinique 10/1

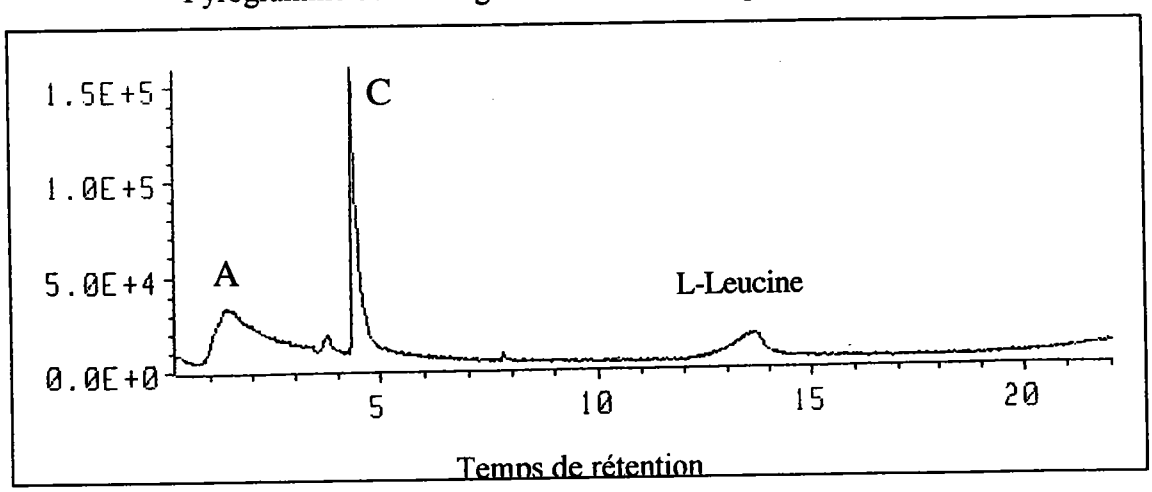


Figure 5.6.6 Pyrogrammes d'ablation laser du mélange L-leucine - Acide picolinique

5.6.4. Conclusion

La pyrolyse laser GC/MS montre l'effet de covaporisation de la matrice sur la molécule cible.

L'utilisation d'une molécule absorbant la longueur d'onde incidente permet de désorber une molécule transparente. La décarboxylation de la molécule absorbant provoque une surpression locale. La molécule transparente est alors éjectée, intacte, de la pastille par cet "effet de souffle".

L'"effet de souffle" est assuré pour de petites quantités de molécules absorbantes. Un mélange comportant 1/100 de molécule cible permet encore de détecter une molécule cible. Le rendement est toutefois plus important avec une proportion de 1/10.

5.7. CONCLUSION

La pyrolyse laser GC/MS permet l'analyse des neutres formés lors d'une irradiation laser d'un produit solide. Nous avons montré l'existence de trois phénomènes :

- ✓ la décarboxylation, effet purement thermique du faisceau laser,
- ✓ la vaporisation intacte de la molécule irradiée,
- ✓ la covaporisation d'une molécule transparente à la longueur d'onde utilisée.

Les deux derniers mécanismes peuvent être dûs à un "effet de souffle". La décarboxylation de la molécule provoque une surpression locale qui induit la désorption des molécules cibles.

L'"effet de souffle" est réalisé pour de faibles quantités de molécules absorbant la longueur d'onde (1/10).

Nous pouvons penser que le large excès de matrice en MALDI intervient davantage sur la protonation de la molécule cible que sur sa covaporisation. Cependant, l'ensemble des molécules neutres formées, CO_2 et molécules décarboxylées, peut intervenir sur la propulsion du nuage gazeux.

6. Etude comparée des pyrolyses par four, filament et laser, appliquées à des acides aminés contenus dans le cheveu

6.1. INTRODUCTION

Pour comprendre comment un cheveu, matrice naturelle extrêmement complexe, se comporte par rapport à une pyrolyse thermique, il est essentiel d'analyser au préalable par pyrolyse les principaux acides aminés[1] constituants la kératine. Ainsi nous pourrons trouver les mécanismes de dégradation induits par la pyrolyse susceptibles de se produire dans le cas du cheveu.

Ces acides aminés ont été soumis à trois pyrolyses différentes :

✓ Quelques milligrammes d'acides aminés ont été soumis à une pyrolyse par four tubulaire. La température est fixée à 750°C. Dans ce cas, nous obtenons l'effet du gradient de température et du confinement de la phase vapeur sur une masse importante de produit.

[1] Les acides aminés décrits dans le chapitre bibliographique et présentant une proportion supérieure à 20 µmol/g de cheveu.

- ✓ Quelques dizaines de microgrammes de produits sont pyrolysées par filament avec une température de pyrolyse de 600°C et une température d'interface de 175°C. Ces températures déterminées par analyse thermogravimétrique sont adéquates à la pyrolyse des cheveux.

- ✓ Des pyrolyses laser couplées avec la GC/MS ont été mises en oeuvre sur ces acides aminés. Cette technique permet d'étudier les mécanismes de dégradation induits par un impact laser.

La spectrométrie de masse (GC/MS) est à chaque fois la technique de détection associée.

Ces trois modes de pyrolyse permettent d'explorer deux voies :

- ✓ l'effet du mode de pyrolyse sur la dégradation des acides aminés,
- ✓ la caractérisation de chaque acide par ses pyrolysats.

Les pyrogrammes, ainsi que les spectres de masse et les structures moléculaires possibles de chaque pyrolysat sont présentés en annexes 1 à 35.

Les spectres de masse ont été interprétés en rassemblant l'ensemble des informations suivantes :

- ✓ la correspondance, pour la pyrolyse par filament, des spectres de masse obtenus en impact électronique à 70 eV et à 10 eV, ce qui permettait de trouver le pic moléculaire (dans certains cas),
- ✓ la confrontation avec les spectres de masse enregistrés dans la bibliothèque spectrale Wiley (assez limitée, en particulier pour les molécules soufrées),
- ✓ la recherche des mécanismes de pyrolyse présents dans la bibliographie (1-15).

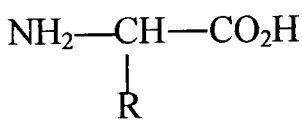
Dans chacun des cas, seules les structures moléculaires possibles ont été indiquées. La recherche des mécanismes est basée sur l'ensemble de ces structures.

Cependant, pour la recherche des correspondances entre les pyrolysats des acides aminés et ceux du cheveu, l'ensemble des pics a servi de base de données (cf. chapitre VII).

6.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

6.2.1. Choix des acides aminés

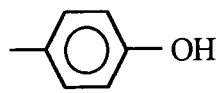
Nous avons soumis à l'analyse par pyrolyse CG/SM, les principaux acides aminés contenus dans la kératine. Les acides aminés sont constitués d'un motif de base et d'un groupe caractéristique, que nous appelons chaîne latérale.

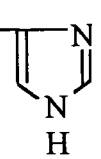
Motif de base : 

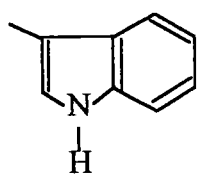
Glycine R : —H

Leucine R : —CH_2—CH $(CH_3)_2$

Phénylalanine R : —CH_2—

Tyrosine R :—CH_2— 

Histidine R : —CH_2— 

Tryptophane R : —CH_2— 

Lysine R :—$(CH_2)_4$—NH_2

Arginine R :— $(CH_2)_3NH$—C(=NH)—NH_2

Acide Glutamique R :—$(CH_2)_2$ CO_2H

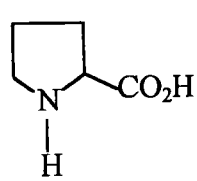
Acide Aspartique R :—CH_2 CO_2H

Thréonine R : —CH(OH)—CH_3

Sérine R : —CH_2 OH

Méthionine R : —$(CH_2)_2$ S CH_3

Cystine R :— CH_2 S S CH_2—CH(CO_2H)—NH_2

Proline : 

6.2.2. Choix des masses de produits pyrolysés

Les trois modes de pyrolyse demandent des quantités différentes d'échantillon pour obtenir un résultat interprétable. La quantité de pyrolysats formés doit permettre de :

- ✓ former des pics chromatographiques sortant bien du bruit de fond,
- ✓ . d'acquérir un spectre de masse lisible et interprétable.

La pyrolyse par four tubulaire permet de pyrolyser de relativement grandes quantités de produit. Pour chaque acide aminé, nous avons pesé 0,2 grammes (pesée exacte).

Les pyrolysats formés sont récupérés sur un dispositif réfrigéré, solubilisés dans du méthanol et ensuite analysés par GC/MS.

Cette méthode présente deux caractéristiques :

- ✓ le temps de pyrolyse est inférieur à dix secondes, néanmoins, il existe un gradient de température au sein de la matière pendant la montée en température,
- ✓ le nuage gazeux formé par pyrolyse flash est entraîné par un courant de gaz inerte (Hélium, P atm.) vers les parois froides du piège,

La pyrolyse thermique par filament, de part sa configuration, permet la pyrolyse d'échantillons de volumes plus faibles. Les quantités mises en jeu sont comprises entre 80 et 100 µg.

Des essais avec des quantités de l'ordre 20 µg donnent des pyrogrammes encore exploitables. Cependant, l'interprétation des spectres de masse devient plus délicate.

La troisième méthode, **la pyrolyse laser** couplée à la GC/MS, fonctionne sur un principe différent : l'ablation/désorption laser. Elle nécessite peu de matière. Nous avons évalué que la quantité de matière vaporisée est inférieure à 20 µg.

Toutefois, la quantité utilisée pour l'échantillonnage est, dans un premier temps, plus importante. En effet, l'analyse nécessite de compacter les poudres sous forme de pastilles, afin que l'échantillon ne soit pas entraîné par le flux de gaz vecteur.

Quelques milligrammes d'acide aminé sont pressés successivement à des pressions de 2, 4 et 6 tonnes. Chaque pression est exercée pendant 5 minutes.

6.2.3. Paramètres instrumentaux

Nous avons fixé certains paramètres instrumentaux pour les trois séries d'analyse :

- ✓ la phase de la colonne (apolaire type HP1), l'épaisseur du film (0,33 µm), ainsi que le diamètre interne (0,2 mm),
- ✓ les températures d'interface (300°C) GC/MS et de source d'ionisation (240°C),
- ✓ le mode d'ionisation est l'impact électronique.

Les autres paramètres sont propres à chaque méthode :

Paramètres	Pyrolyse par four	Pyrolyse par filament	Pyrolyse laser
Température de pyrolyse	750°C	600°C	/
Temps de pyrolyse	10 secondes	5 secondes	/
Flux d'hélium	/	20 ml/min.	20 ml/min.
Température interface	750°C	175°C	30°C à 40°C
Température injecteur	200°C	200°C	de 0°C à 300°C
Température four	35°C (2 min.) puis 6°C/min. jusqu'à 290°C	35°C (2 min.)	0°C (2 min.) 15°C/min. jq 300°C
Longueur colonne	25 mètres	25 mètres	12 mètres
Mode d'ionisation	IE à 70 eV	IE à 10 et 70 eV	IE à 70 eV
Masses enregistrées	de 35 à 300	de 32 à 250	de 32 à 250

Les analyses spectrales ont été effectuées en impact électronique. A 70 eV, nous pouvions utiliser les ressources de la bibliographie spectrale Wiley.

A 10 eV, la présence du pic moléculaire est favorisée et le spectre de masse peut être plus simple à analyser.

Les résultats exposés pour la pyrolyse laser GC/MS, sont réalisés avec les paramètres suivants :

- ✓ la longueur d'onde λ = 266 nm est générée par un laser Nd/YAG quadruplé,
- ✓ l'irradiance appliquée sur un diamètre de 6 mm est de 3.10^7 W/cm^2,
- ✓ l'échantillon est irradié pendant 30 secondes à la fréquence de 10 hertz.

6.3. MECANISMES DE PYROLYSE THERMIQUE

Certains acides aminés (glycine, sérine et thréonine) conduisent à de nombreux pics de faibles intensités. De ce fait, ils sont particulièrement difficiles à caractériser. Les acides aminés dont les pyrogrammes sont plus fournis ont permis d'établir un certain nombre de mécanismes de dégradation.

6.3.1. Mécanismes généraux

Au vu de nos résultats et de ceux déjà publiés pour l'un ou l'autre des aminoacides, nous avons tenté de donner une vision globale des mécanismes de pyrolyse.

Les principaux mécanismes ont été reportés dans la figure 6.3.1. Dans certains cas, ils ont été validés par des travaux antérieurs, d'autres ont été proposés à partir de nos résultats expérimentaux. Les chiffres en indices correspondent à la publication qui valide le résultat.

Pour la plupart des acides aminés 1,2 voire 3 mécanismes émergent, comme cela est indiqué en gras, dans le tableau 6.3.1. Celui-ci rassemble l'ensemble des résultats obtenus à partir des trois modes de pyrolyse.

Parmi ces mécanismes, nous détaillerons ceux qui sont le plus fréquemment rencontrés ainsi que deux très particuliers ([7] et [8]).

6.3.1.1. La décarboxylation

Ce mécanisme est général à tous les acides aminés. Les pyrolyses thermiques par four et par filament ont un effet assez semblable sur les acides aminés.

Outre la détection de dioxyde de carbone, nous pouvons détecter l'amine correspondant à la décarboxylation.

C'est le cas de la phénylalanine (annexes 6 et 7), de la tyrosine (annexes 8 et 9), de la cystine (annexes 25 et 26), de la méthionine (annexe 29) et du tryptophane (annexes 33 et 35).

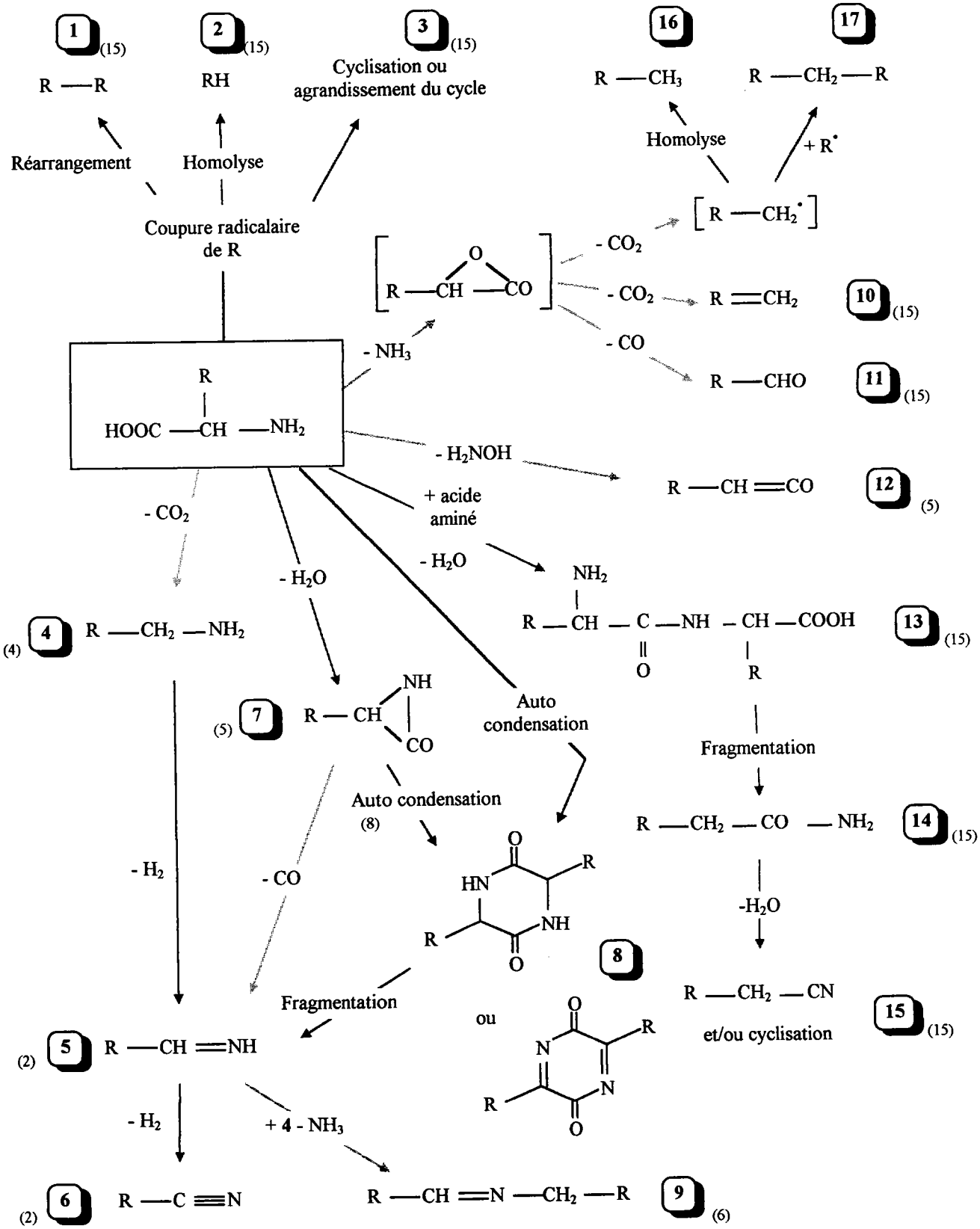


Figure 6.3.1 Mécanismes de pyrolyse

Tableau 6.3.1 Mécanismes de pyrolyse des acides aminés du cheveu

	Mécanisme	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Gly								fi	F fi					F fi				
	Leu		fi						fi	**F fi**			fi	fi	F fi			fi La	F fi La
La→	Phé	**La**	F fi	fi La		**fi La**	F	F fi	F fi			fi	F	F			fi		
La→	Tyr	La	F fi	**F fi**		**F fi La**						F fi						F fi	
	Lys								**F fi**			F fi		F					
	Arg	F fi			F fi				**F fi***										
	His			**F fi**	F fi												fi	F fi	
	Asp								**F fi****										
	Glu	F				**F fi****													
	Thr								fi										
	Sér					**fi**			fi	fi				F fi					
La→	Cys	La		fi La		fi	fi		F fi La	fi La				fi					
La→	Mét	La	fi	fi		**fi**			**F fi**	F fi	fi	fi	F fi	F					
	Pro					fi	fi			**F fi**									
La→	Try			**F fi La**	F fi La	F La		F				F fi La		F				F fi	

Légende

Mécanisme trouvé en pyrolyse par four : **F**
Mécanisme trouvé en pyrolyse par filament : **fi**
Mécanisme trouvé en pyrolyse laser : **La**

0 : désorption de l'acide aminé intact
La→ : acide aminé réagissant à l'irradiation laser
* : avec perte de guanidino
** : associé à un deuxième mécanisme

Tableau 6.3.1 Mécanismes de pyrolyse des acides aminés du cheveu

	Mécanisme	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Gly								fi	F fi					F fi				
	Leu		fi						fi	**F fi**			fi	fi	F fi			fi La	F fi La
La→	Phé	**La**	F fi	fi La		**fi La**	F	F fi	F fi			fi	F	F			fi		
La→	Tyr	La	F fi	**F fi**		**F fi La**						F fi						F fi	
	Lys								**F fi**			F fi		F					
	Arg	F fi			F fi				**F fi***										
	His			**F fi**	F fi												fi	F fi	
	Asp								**F fi****										
	Glu	F				**F fi****													
	Thr								fi										
	Sér					**fi**			**fi**	fi				F fi					
La→	Cys	La		**fi La**		fi	fi		**F fi La**	fi La				fi					
La→	Mét	La	fi	fi		**fi**			**F fi**	F fi	fi	fi	F fi	F					
	Pro					fi	fi			**F fi**									
La→	Try			**F fi La**	F fi La	F La		F				F fi La		F				F fi	

Légende

Mécanisme trouvé en pyrolyse par four : **F**
Mécanisme trouvé en pyrolyse par filament : **fi**
Mécanisme trouvé en pyrolyse laser : **La**

0 : désorption de l'acide aminé intact
La→ : acide aminé réagissant à l'irradiation laser
* : avec perte de guanidino
** : associé à un deuxième mécanisme

6.3.1.2. *La déshydratation avec formation d'une α lactame*

Cette réaction concerne la plupart des acides aminés, quelle que soit leur nature.

Elle a été mise en évidence pour les acides aminés suivants : glycine (annexe 2) - lysine (annexes 11 et 12) - arginine (annexes 13 et 14)- thréonine (annexe 22) - cystine (annexes 25 et 26) - méthionine (annexes 28 et 29).

C'est particulièrement vrai pour la cystine, l'arginine et la lysine.

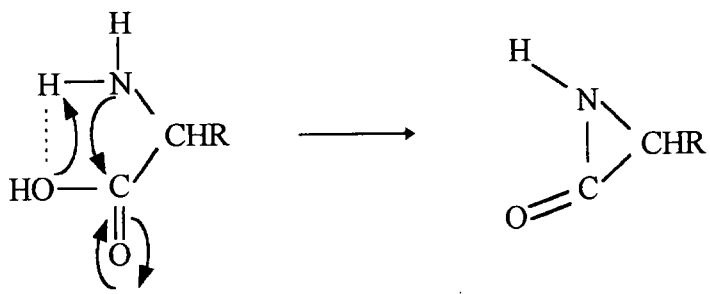
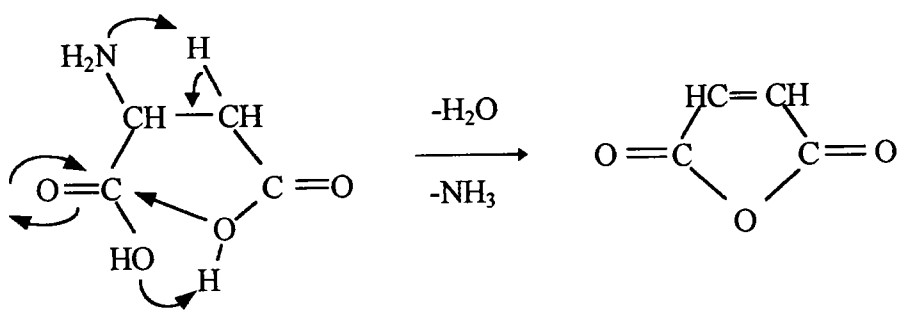


Figure 6.3.1 Mécanisme de formation d'une α lactame

6.3.1.3. *Déshydratation des diacides*

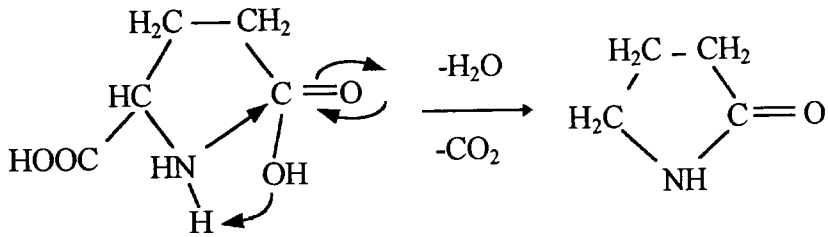
La déshydratation des diacides se fait en deux temps. La présence des deux fonctions acides influe sur la réactivité de la molécule.

Pour l'acide aspartique (annexes 17 et 18), la déshydratation est accompagnée de perte d'ammoniaque :



2,5-Furanedione

Pour l'acide glutamique (annexes 19 et 20), il y a perte de H_2O et de CO_2 :



2-Pyrrolidinone

6.3.1.4. *Formation de 2,5 dicétopipérazine, 3,6-disubstituées*

La pipérazine-dione,-disubstituée peut être formée :

- ✓ soit par condensation de deux α lactames,
- ✓ soit par condensation directe de deux acides aminés.

Il semblerait, si l'on se réfère aux travaux de M. A. Posthumus et N. M. M. Nibbering (5) sur la méthionine, que le mécanisme de formation de la 2,5 dicétopipérazine implique la condensation de deux α-lactames (figure 6.3.2).

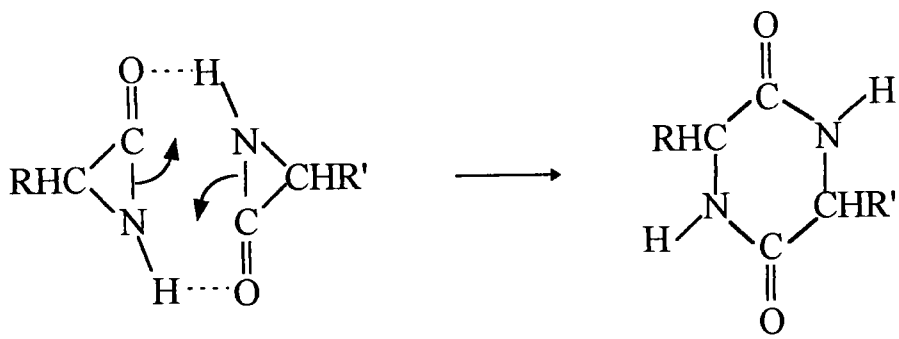


Figure 6.3.2 Formation d'une 2,5 pipérazinedione, 3,6-disubstituée

Néanmoins, les deux mécanismes sont possibles. Ce type de molécule a été identifié pour la glycine, la leucine, la méthionine et la proline.

Pour la proline, la cycloproproline est la molécule principale formée (annexes 31 et 32).

6.3.1.5. *Coupure radicalaire des groupements latéraux*

Ce mécanisme apparaît essentiellement pour les acides aminés comportant un cycle aromatique ou un hétérocycle.

Les molécules issues de cette réaction se trouvent sous deux formes :

- ✓ hydrogénées sous la forme R-H (mécanisme (2)),
- ✓ réarrangées entre elles sous la forme R-R (mécanisme (1)).

La première forme est commune à l'histidine (annexes 15 et 16), la phénylalanine (annexes 5 et 6), le tryptophane (annexes 33 et 34) et la tyrosine (annexes 8 et 9).

Dans le cas du tryptophane, la chaîne latérale se stabilise aussi sous forme de quinoline, composé aromatique plus stable que l'indole.

Le réarrangement a été identifié pour la phénylalanine (benzène-1,1'-(éthanediyl)bis-) et la tyrosine (diphénol-4,4'-éthane).

Pour les aminoacides soufrés, nous avons détecté des quantités importantes de CS_2 et de H_2S pour la cystine et de CH_3SH pour la méthionine (annexes 26 et 29). Le mécanisme de formation implique une coupure radicalaire et une homolyse (mécanisme (2)).

α α α

6.4. COMPARAISON DES TROIS MODES DE PYROLYSE

Nous exposons les acides aminés qui réagissent aux trois méthodes de pyrolyse. Il s'agit de :

- ✓ L-cystine,
- ✓ L-phénylalanine,
- ✓ L-tryptophane,
- ✓ L-tyrosine,
- ✓ L-méthionine.

La méthode limitante est l'analyse par pyrolyse laser avec la longueur d'onde incidente utilisée (λ =266 nm). En effet, tous les acides aminés n'ont pas le même domaine d'absorption.

Une étude réalisée par spectrométrie U.V. des poudres pastillées indique les domaines d'absorption de chaque acide aminé (tableau 6.4.1). Les spectres d'absorption sont présentés en annexes 48 à 51.

Acides aminés	*domaines d'absorption*	*maximum*
L-A. Aspartique	de 190 à 250 nm	204.8 nm
L-A. Glutamique	de 190 à 240 nm	208.4 nm
L-Arginine	de 190 à 240 nm	208.6 nm
L-Cystine	**de 190 à 370 nm**	**291.9 nm**
L-Glycine	de 190 à 240 nm	208.5 nm
L-Histidine	de 190 à 240 nm	208.6 nm
L-Leucine	de 190 à 240 nm	207.6 nm
L-Lysine	de 190 à 245 nm	196.4 nm
L-Méthionine	**de 190 à 265 nm**	**222.6 nm**
L-Phénylalanine	**de 210 à 280 nm**	**253.3 nm**
L-Proline	de 190 à 240 nm	204.9 nm
L-Thréonine	de 190 à 230 nm	198.6 nm
L-Tryptophane	**de 210 à 370 nm**	**310.5 nm**
L-Tyrosine	**de 190 à 300 nm**	**284.9 nm**

Tableau 6.4.1 Domaine et maximum d'absorptions des principaux aminoacides à l'état solide (mode réflectance).

Ce tableau explique les résultats que nous avons obtenus :

- ✓ les acides aminés tels que la cystine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine absorbent à 266 nm. L'ablation laser conduit à la formation de composés de pyrolyse,
- ✓ la méthionine absorbe faiblement cette longueur d'onde. Elle se vaporise et de ce fait, est détectée intacte,
- ✓ les autres acides aminés sont transparents à la longueur d'onde incidente. Ils ne donnent aucun composé de pyrolyse dans les conditions définies chapitre 6.2.3.

6.4.1. Les mécanismes de pyrolyse de L-cystine

Cet acide aminé est particulièrement sensible à la chaleur. Certains pics ont été interprétés et les résultats sont résumés dans les tableaux annexes 25 à 27.

La pyrolyse par filament à 600°C montre de nombreux pics de dégradation (annexe 26). Cependant, elle présente l'avantage de permettre la détection des molécules très volatiles. Nous pouvons ainsi détecter CO_2, CS_2, H_2S. De plus, la tendance à former des α-lactames (G et H), que nous avions notée en pyrolyse par four, est confirmée (annexe 26).

L'ablation laser apparaît particulièrement adaptée (annexe 27). Le résultat obtenu avec notre protocole conduit à un pyrogramme beaucoup plus simple à interpréter si on le compare à celui obtenu par pyrolyse thermique.

Les molécules formées par l'ablation laser ne subissent apparemment aucune dégradation secondaire. La pyrolyse laser privilégie la formation de CO_2 et de CS_2. Cependant, nous pouvons noter également, comme en pyrolyse thermique, la formation de toute la série d'α-lactames.

Les trois acides aminés comportant un noyau aromatique et absorbant à 266 nm conduisent à des résultats interprétables.

Leur capacité à absorber la longueur d'onde incidente provient de leur groupement aromatique. Ainsi, ils présentent à peu près le même comportement aux trois modes de pyrolyse.

6.4.2. Les mécanismes de pyrolyse de L-phénylalanine

L'acide aminé est peu sensible à la température de pyrolyse. Les pyrogrammes obtenus à 750°C par four et 600°C par filament sont assez similaires.

La pyrolyse par four se caractérise par le peu de molécules formées (annexe 5). La pyrolyse par filament indique des dégradations plus marquées (annexe 6).

Par contre, la pyrolyse par laser induit des phénomènes différents au sein de l'échantillon.

L'ensemble des mécanismes (cf. figure 6.3.3) mis en jeu lors de la pyrolyse thermique et de la pyrolyse laser sont résumés dans le tableau 6.4.2. Les lettres représentent les pics chromatographiques en annexes 5, 6 et 7.

Mécanismes	0	1	2	4	5	6	7	10	11	12	15	16	17
Pyrolyse par four		F H			E		C		A	B	D		G
Pyrolyse par filament		J	B	F		G	H	D			I	C	K
Pyrolyse laser	J		B, C	E								D	F, I

Tableau 6.4.2 Mécanismes de pyrolyse de la L-phénylalanine

La pyrolyse thermique se caractérise principalement par :

- ✓ la décarboxylation,
- ✓ les réactions de dimérisations radicalaires à partir des chaînes latérales.

La pyrolyse par filament induit principalement la formation du éthanamine-4, phénol par décarboxylation. La pyrolyse par four provoque plutôt la formation d'indole.

Pour sa part, la pyrolyse laser se caractérise nettement par la volatilisation de la molécule intacte (H).

De plus, nous notons les mêmes mécanismes que ceux observé en pyrolyse thermique :

- ✓ la décarboxylation qui produit le éthanamine-4, benzène (E),
- ✓ la coupure de la chaîne latérale formant B et C.

Par contre, la présence de diphényl proprène et de diphényl butadiène ne peut s'expliquer que par des réactions radicalaires avec allongement de la chaîne aliphatique.

Elles sont vraisemblablement issues des réactions de décarboxylation et désamination simultanées de l'acide aminé (mécanisme [17]).

D'autres structures de poids moléculaire plus élevé (K, L et M) proviennent peut-être de réactions intermoléculaires. Cependant, nous ne sommes pas en capacité de confirmer leurs structures moléculaires exactes avec le seul usage de notre simple quadripôle.

En résumé, la décarboxylation est une réaction commune selon les trois modes de pyrolyse. Elle induit la formation du benzène, 4-éthanamine et de composés de dimérisations radicalaires.

6.4.3. Les mécanismes de pyrolyse de L-tryptophane

La majorité des pics issus des pyrolyses par four et par filament est identique (annexes 33 et 34). Les molécules se forment selon le mécanisme [2]

Les variations de température de pyrolyse modifient peu les résultats.

Dans le cas du L-tryptophane, la désorption de la molécule intacte n'est pas mise en évidence. Par contre, l'ablation laser provoque une décarboxylation avec formation de 1H indole, 3-éthanamine (mécanisme [4]).

Les coupures radicalaires ont lieu comme pour les pyrolyses thermiques induisant des indoles.

La présence des pics N, O et P (annexe 35), indiquant que des réactions intermoléculaires peuvent avoir lieu semble être une caractéristique de la pyrolyse laser de cet acide aminé.

6.4.4. Les mécanismes de pyrolyse de la L-tyrosine

La L-tyrosine est une molécule assez semblable à la phénylalanine. Elle se comporte de la même façon (annexes 8, 9 et 10).

Le mécanisme majoritaire est la décarboxylation, formant le éthanamine-4, phénol.

Le second mécanisme émergent est la coupure radicalaire de la chaîne latérale. Il explique la formation du phénol, du méthyl-4, phénol, et du diphénol, 4,4'-éthane (par dimérisation radicalaire).

L'ablation laser provoque pour la tyrosine essentiellement deux mécanismes : d'une part la décarboxylation, d'autre part la désorption/vaporisation de la molécule intacte.

6.4.5. Les mécanismes de pyrolyse de la L-méthionine

La méthionine soumise à la pyrolyse thermique (annexes 28 et 29) montre de nombreux mécanismes de dégradation parmi lesquels, nous pouvons citer :

- ✓ la formation de l'α lactame (B, four), mécanisme (7)
- ✓ la formation de l'amine (F, filament), mécanisme (4)
- ✓ la formation de l'imine (M, filament), mécanisme (9)

Par contre l'ablation laser de la méthionine traduit un comportement différent. Lorsque l'irradiance est juste suffisante à 266 nm (3.10^7 W/cm^2), les deux seuls phénomènes décelés sont la vaporisation et la décarboxylation.

Ils se produisent non seulement pour une molécule à cycle aromatique stable comme la phénylalanine et la tyrosine, mais aussi pour une molécule telle que la L-méthionine.

La molécule se volatilise puisqu'elle est détectée intacte. Le chromatogramme en annexe 30 montre les pics mal résolus et de faibles intensités de dioxyde de carbone et de la L-méthionine.

6.5. CONCLUSION

Les pyrolyses thermiques systématiques réalisées par four et par filament des acides aminés contenus dans la kératine de cheveu permettent d'établir une base de données pour l'interprétation des pyrolysats formés pour le cheveu.

La pyrolyse laser permet de montrer des mécanismes équivalents à ceux définis pour les acides organiques.

Lorsque l'acide aminé n'absorbe pas la longueur d'onde du faisceau laser incident, le seul phénomène visible est le changement d'état de surface de la pastille. La surface peut être marquée d'auréoles formées par les impacts laser successifs. La coloration peut dans certains cas changer. Cependant, aucun produit de pyrolyse n'est détecté.

Pour les acides aminés (cystine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine) qui absorbent à 266 nm, les résultats de l'ablation/ pyrolyse laser sont significatifs.

La L-cystine perd une molécule d'eau pour former des α lactames.

Les trois autres acides se décarboxylent de façon préférentielle, les groupements aromatiques pouvant stabiliser les molécules formées.

De plus, l'"effet de souffle" se produit en vaporisant les molécules intactes dans le cas de la phénylalanine, de la tyrosine et de la méthionine.Un dégagement de dioxyde de carbone est toujours détecté.

Une information supplémentaire apparaît, la pyrolyse laser favorise la formation de molécules de poids moléculaire plus important que le poids moléculaire de l'acide.

Les conditions induites par la pyrolyse laser pourraient favoriser des dimérisations radicalaires, soit entre les chaînes latérales, soit après perte d'ammoniaque et de dioxyde de carbone. Des réactions intermoléculaires pourraient aussi avoir lieu. Ceci sera à vérifier plus tard avec un équipement plus performant.

6.6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 G. Chiavari, G.C. Galletti, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1992, **24**, 123-137

2 G.P. Shulman, P.G. Simmonds, *Chemical Communications*, 1968, 1040-1042

3 J.M. Patterson, N.F. Haidar, E.P. Papadopoulos, W.T. Smith, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 4, 663-666

4 Y.C. Lien, W.W. Nawar, *Journal of Food Science*, 1974, **39**, 911-913

5 M.A. Postumus, N.M.M. Nibbering, *Organic Mass Spectrometry*, 1977, **12**, 5, 334-337

6 M. Fujimaki, S. Kato, T. Kurata, *Agr. Biol. Chem.*,1969, 33, 8, 1144-1151

7 S.Y. Choi, M.G. Kim, H. Inoue, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1995, **32**, 127-136

8 T.O. Munson, J. Vick, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1985, **5**, 493-501

9 T.O. Munson, D.D. Fetterolf, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1987, **11**, 15-24

10 F. Ishizawa, S. Misawa, *Journal of Forensic Science Society*, 1990, **30**, 201-209

11 M.M. Cordero, J.J. Houser, C. Wesdemiotis, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1594-1601

12 S.T. Fountain, D.M. Lubman, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1257-1266

13 W. Windig, H.L.C. Meuzelaar, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1979, **1**, 39-52

14 C. Merrit, C. Dipietro, D.H. Robertson, *Journal of Chromatographic Sciences*, 1974, 12, 668-672

15 J. J. Irwin, *Analytical pyrolysis : a comprehensive guide.* Marcel Dekker Publisher (1982)

7. Etude d'un polymère naturel complexe : le cheveu

7.1. INTRODUCTION

Le cheveu est un matériau résistant, imputrescible et facilement prélevé. Il est caractéristique de l'individu qui le sécrète, tant génétiquement que par imprégnation de substances exogènes ou endogènes. Il peut devenir dans les affaires criminelles, un élément intéressant pour la manifestation de la vérité. En effet, un cheveu se caractérise par :

- ✓ ses caractères morphologiques (forme, longueur, diamètre, couleur, transparence, forme des écailles...),
- ✓ les éléments minéraux qu'il contient métabolisés par le sang ou absorbés par la tige pilaire,
- ✓ les substances organiques absorbées ou adsorbées (sueur, stupéfiants, traitements capillaires...),
- ✓ les protéines formant les kératines (plus ou moins riche en soufre par exemple),
- ✓ ses caractères génétiques (ADN mitochondrial pour la tige en particulier).

Les techniques d'analyse utilisées pour caractériser les cheveux, mis à part, peut être, l'analyse de l'ADN mitochondrial, ne sont pas à elles seules assez discriminantes pour individualiser un cheveu parmi d'autres. Il convient d'utiliser les informations de plusieurs techniques pour affiner la caractérisation.

Depuis 1990, nous avons développé au laboratoire, des recherches dans le domaine de la caractérisation de fibres naturelles et synthétiques en relation avec la criminalistique.

Dans un premier temps, nous avons associé deux techniques : la morphologie et la spectrométrie de masse, afin de caractériser les cheveux en cumulant plusieurs critères de comparaison.

Ainsi, les analyses morphologiques permettent de noter les différences et les ressemblances visuelles des cheveux avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Les analyses par ablation/ionisation laser couplée à un spectromètre à temps de vol (LAMMA) effectuées en routine, permettent d'obtenir des informations sur les éléments minéraux contenus dans la fibre capillaire.

Cependant, l'origine organique des pics est difficile à identifier. En effet, l'énergie laser apportée sur le cheveu pour rompre l'agencement très résistant de la tige doit être importante. Elle induit la formation d'agrégats, formés à partir d'éléments minéraux, organiques ou de la combinaison des deux.

La pyrolyse thermique GC/MS est apparue comme une méthode complémentaire pour caractériser le cheveu par ses seuls composants organiques.

L'important nombre d'éléments constitutifs ainsi que la structure même du cheveu permettent d'assimiler le cheveu à un matériau composite, dont l'élément principal est la kératine, protéines formées à partir de 21 acides aminés.

Nous avons suivi deux axes de recherche avec ce polymère naturel (le cheveu) :

- ✓ comprendre les mécanismes de pyrolyses thermique et laser du cheveu, en les comparant avec les principaux acides aminés qui le constituent et de quelques peptides,
- ✓ définir si une discrimination de différents cheveux est possible par pyrolyse thermique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et dans quelles conditions.

7.2. BIBLIOGRAPHIE

7.2.1. Morphologie et histologie des poils et des cheveux

Le poil ou le cheveu est constitué d'une partie apparente émergeant au-dessus de la peau, c'est la tige pilaire proprement dite, et d'une partie profonde qui constitue la racine (figure 7.2.1) (1).

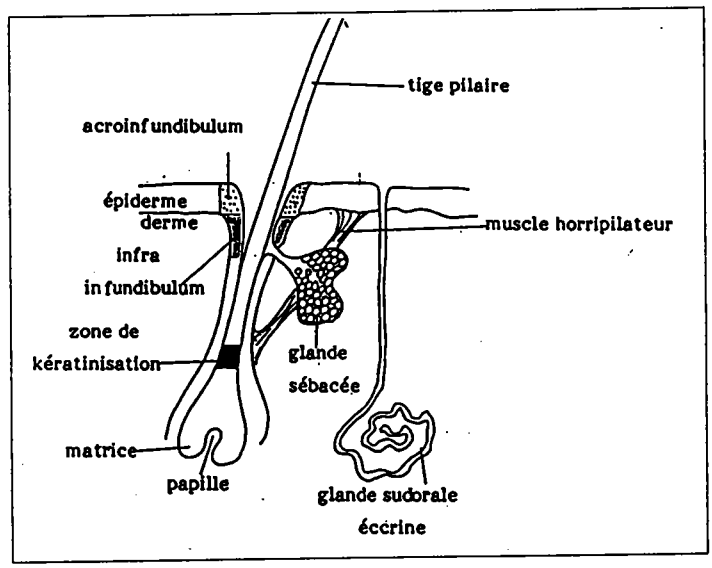


Figure 7.2.1 Le cheveu

La racine ou follicule pileux comprend la partie proximale de la tige pilaire entourée de ses gaines épithéliales à partir desquelles elle est élaborée.

Le poil sort de la peau au niveau du canal pilaire, qui comprend une partie profonde, intradermique, dite l'infra-infundibulum et une partie superficielle intra-épidermique, appelée l'acro-infunbidulum.

A la base de l'infra-infundibulum débouche le canal qui vient de la glande sébacée; celle-ci, située dans l'angle obtus formé par le bulbe pilaire et l'épiderme, secrète le sébum qui se déverse dans le canal sébacé puis dans le canal pilaire.

Un muscle inséré à la fois à la base du poil et sur la glande sébacée, le muscle redresseur ou érecteur, intervient pour provoquer l'érection du poil (phénomène d'horripilation).

7.2.1.1. *Le bulbe pilaire (figure 7.2.2)*

Bien qu'il soit une annexe de la peau, chaque bulbe pilaire est un organe miniature. Sa partie inférieure est renflée en forme de massue. C'est là que se trouve la matrice pilaire, massif cellulaire creusé à sa base par une dépression, la papille, où s'insère le pédicule vasculo-nerveux, entrelac de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de fibres nerveuses.

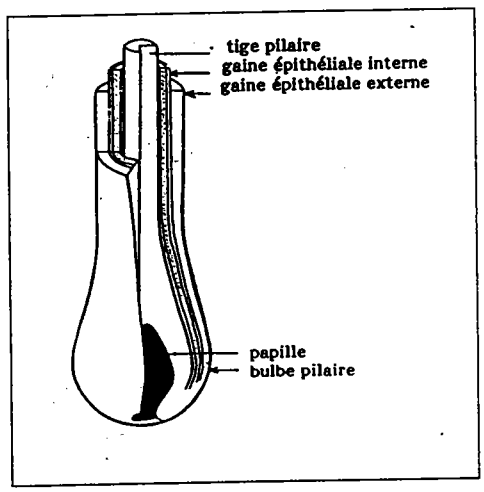


Figure 7.2.2 Le bulbe pilaire

La zone germinative siège autour de la papille, dans la région la plus profonde de la matrice. Les cellules qui la composent possèdent un noyau volumineux et un cytoplasme riche en tonofilaments[1] et en desmosomes[2] dont la présence est le signe d'une activité biologique intense. Elles sont mêlées aux mélanocytes qui élaborent les pigments pilaires, puis les cèdent aux cellules matricielles.

Au cours de leur migration ascensionnelle vers la zone épidermique, les cellules de la matrice s'enrichissent encore en tonofilaments et en desmosomes. Puis elles commencent à se kératiniser. Le phénomène s'accentue au fur et mesure que les cellules s'approchent de la surface de l'épiderme. Elles perdent leur noyau et deviennent les cellules corticales de la tige pilaire.

Deux gaines épithéliales entourent le bulbe pilaire :

✓ la gaine épithéliale externe, issue de l'épiderme et entourée d'une épaisse couche de tissu conjonctif richement vascularisé et innervé,

[1] Les tonofilaments constituent les principales protéïnes structurales de la peau et des cheveux (kératines).

[2] Les desmoses sont des régions épaissies de la membrane plasmique où les cellules sont étroitement liées entre elles.

✓ la gaine épithéliale interne, plus mince, tout en étant constituée de l'extérieur vers l'intérieur, de trois couches cellulaires distinctes qui se forment à partir des cellules matricielles :

✗ une couche monocellulaire (gaine de Henlé) formée de cellules cuboïdes qui se kératinisent précocement,

✗ une couche pluristratifiée (gaine de Huxley) qui se kératinisent plus tardivement,

✗ une cuticule de gaine constituée d'une seule couche de cellules aplaties, qui se recouvrent à la manière des tuiles d'un toit, ce qui leur permet de venir s'articuler avec les cellules de la cuticule de la tige pilaire.

7.2.1.2. *La tige pilaire (figure 7.2.3)*

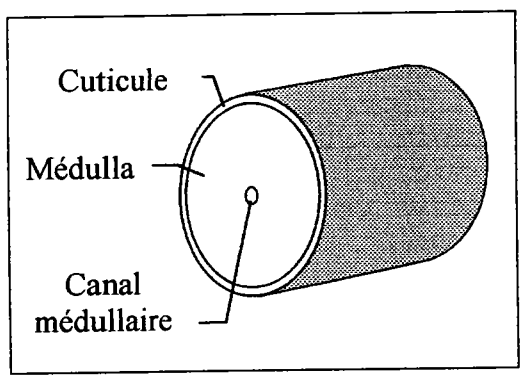


Figure 7.2.3 La tige pilaire(coupe transversale)

La tige pilaire, de 20 à 40 µm de diamètre chez le nouveau né et de 70 à 120 µm chez l'adulte, est constituée de trois zones concentriques :

✓ une zone **médullaire** centrale, composée d'une ou deux rangées de grandes cellules peu pigmentées. A l'intérieur de ces cellules, il se forme des vacuoles qui se dilatent et deviennent coalescentes; progressivement ces cellules perdent leur liquide, qui est remplacé par de l'air, ainsi se créent des cavités qui parsèment la zone médullaire.

✓ une zone **corticale**, disposée autour de l'axe médullaire. Elle est constituée de cellules allongées (de 2 à 5 µm de largeur pour 80 à 185 µm de longueur) qui sont remplies de fibrilles de kératine, mélangées à des grains de pigments mélaniques. Ces cellules kératinisées sont des cellules mortes

qui ne renferment plus aucun organelle. La zone corticale est recouverte par l'épicuticule, mince pellicule dont l'épaisseur ne dépasse pas 0,1 µm.

✓ une **cuticule**, l'épidermicule de la tige pilaire, de 0,5 mm d'épaisseur, constituée de cellules qui se chevauchent comme les tuiles d'un toit, avec un bord libre qui est tourné vers la pointe du poil. Ces cellules s'imbriquent étroitement dans les cellules de la cuticule de la gaine épithéliale interne du bulbe pilaire .

A sa partie inférieure, la tige pilaire est étroitement accolée à la gaine épithéliale interne du bulbe. Elle s'en détache et devient libre au niveau de l'entrée du canal sébacé.

La forme de la section de la tige pilaire varie selon les ethnies. Elle est de forme ovale dans la race noire et circulaire dans la race asiatique. Dans la race eurasienne, elle est circulaire pour les cheveux et ovale pour les poils.

7.2.1.3. La glande sébacée

Tout poil ou tout cheveu est pourvu d'une glande sébacée. Cette règle est sans exception. Mais il existe des glandes sébacées isolées, qui ne sont pas associées à un produit du système pileux et qui débouche directement à la surface de l'épiderme.

A l'intérieur d'une glande sébacée, on observe trois types de cellules (2) :

✓ des cellules indifférenciées formant une couche qui repose sur la membrane basale,

✓ des cellules différenciées, plus proches du centre de la glande et chargées de lipides,

✓ des cellules matures qui se trouvent au niveau de la lumière centrale; elles sont gorgées de lipides; quand leur membrane se rompt, leur contenu (sébum) se déverse dans le canal sébacé qui débouche dans le canal folliculaire.

Le sébum humain contient surtout des lipides (3) :

✓ des **triglycérides**, particulièrement abondants (57,5 %), partiellement hydrolysés sous l'influence de lipases d'origine bactérienne, libérant des acides gras qui peuvent représenter 25 à 30 % des lipides recueillis à la

surface de la peau. Cette hydrolyse est spécifique de l'espèce humaine; il n'existe pas d'acides gras libres sur la peau des animaux,

- ✓ des **cires** (26 %), composées de mono-esters d'acides gras et d'alcools à longues chaînes ainsi que des traces de diesters formés entre les acides gras et un alcanediol à longue chaîne,
- ✓ du **squalène** (12 %), hydrocarbure aliphatique insaturé en C_{30}, synthétisé à partir des radicaux acétates,
- ✓ du **cholestérol** à l'état libre (1,5 %) ou estérifié (3 %), provenant de la cyclisation du squalène en lanostérol qui se transforme ensuite en cholestérol.

Le Taux d'Excrétion Sébacée (TES) varie de 1 à 1,5 $\mu g/cm^2/mn$ chez l'homme et de 0,75 à 1 $\mu g/cm^2/mn$ chez la femme.

7.2.2. Constitution de la tige pilaire

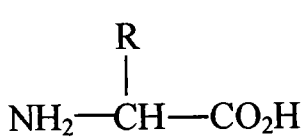
La tige pilaire est essentiellement (85 à 95 %) constituée d'une protéine fibreuse, la kératine (1). Elle se constitue progressivement à l'intérieur des cellules germinales qui au cours de leur ascension se kératinisent complètement. La tige pilaire ne contient presque plus d'acides nucléiques. Cependant elle contient encore de l'acide urique et certaines bases d'origines nucléiques.

Entre les fibres de kératine s'insinue une substance cimentante de nature protéinique : la matrice.

La kératine contient la plupart des acides aminés, mais elle est surtout riche en cystéine. Les acides aminés constitutifs sont disposés en chaînes suivant une séquence propre à chaque espèce (1).

7.2.2.1. Acides aminés constituants la kératine

Les acides aminés comportent une fonction amine et une fonction alcool, donnant le motif de base :



Nous avons groupé les acides aminés selon leur chaîne latérale (R).

R est une chaîne aliphatique

Glycine 1 R : —H

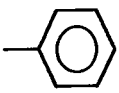
Alanine 2 R : — CH_3

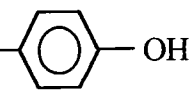
Leucine 5 R : — CH_2— $CH(CH_3)_2$

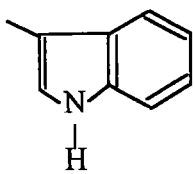
Isoleucine 4 R : CH_3—$\underset{|}{CH}$—C_2H_5

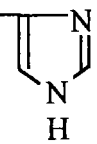
Valine 3 R : — $CH(CH_3)_2$

R comporte un noyau aromatique

Phénylalanine 6 R : — CH_2 

Tyrosine 7 R :— CH_2 

Tryptophane 8 R : —CH_2 

Histidine 9 R : — CH_2 

R comporte une ou plusieurs fonctions amines

Lysine 10 R :—$(CH_2)_4$— NH_2

Arginine 11 R :— $(CH_2)_3NH$——NH_2

Citrulline 12 R : — $(CH_2)_3$—NH——NH_2

R comporte une fonction acide

Acide Aspartique 13 R :—CH_2 CO_2H

Acide Glutamique 14 R :—$(CH_2)_2$ CO_2H

R comporte un hydroxyl :

Thréonine 15 R : —$\underset{|}{CH}$—CH_3 (OH)

Sérine 16 R : — CH_2 OH

R possède un atome de soufre :

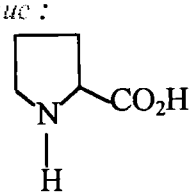
Cystine 17 R : —CH_2 S S CH_2—$\underset{|}{CH}$—NH_2 (CO_2H)

Méthionine 18 R : —$(CH_2)_2$ S CH_3

Cystéine 19 R : —CH_2 SH

Acide cystéique 20 R : — CH_2 SO_3H

R est un hétérocycle aliphatique :

Proline 21 : 

Les quantités des 21 acides aminés trouvées pour des cheveux sains dans différentes sources varient d'une méthode à l'autre (tableau 7.2.1). Nous pouvons ainsi appréhender la difficulté à quantifier la composition en acides aminés.

Acide aminé	Référence 5	Référence 6	Autres références
1. Glycine	463-513[c]	548-560	
2. Alanine	362-384[c]	314	
3. Valine	477-513[c]	470	
4. Isoleucine	244-255[c]	366	
5. Leucine	502-529[c]	489	
6. Phénylalanine	132-149[c]	151-226	
7. Tyrosine	177-195[c]	121-171[d]	
8. Tryptophane	-	20-64	
9. Histidine	64-86[c]	40-77	
10. Lysine	206-222[b]	130-212[d]	
11. Arginine	499-550[c]	511-620	
12. Citrulline	-		11 (8)
13. Acide Aspartique	444-453[b]	292-578[d]	
14. Acide Glutamique	995-1036[b]	930-970	
15. Thréonine	648-673[b]	588-714	
16. Sérine	1013-1091[b]	705-1090	
17. Demi-cystine	1407-1512[d]	1380-1500	784-1534 (7[d])
18. Méthionine	50-56[b]	47-67	
19. Cystéine	-	41-66	17-70 (7[d])
20. Acide Cystéique	22-40[c]	-	
21. Proline	646-708[c]	374-694[d]	

[a] Le cheveu est assuré non altéré cosmétiquement pour les réf. 6, 7 et 8.
[b] Pas de différences significatives parmi les échantillons analysés.
[c] Différences significatives entre les échantillons analysés.
[d] Ces valeurs sont issues d'un essai microbiologique de Lang et Laucas (9²)

Tableau 7.2.1 Acides aminés présents dans un cheveu humain non altéré[a] (micromoles d'acide aminé par gramme de cheveu sec)(4)

(Les couleurs sont attribuées à chaque acide aminé en fonction de son type précédemment défini.)

Dans le tableau 7.2.2, les proportions sont exprimées en pourcentage. Nous pouvons ainsi montrer quelques tendances.

Acide aminé	Réf 5	Réf 6	Réf. 10	Réf. 11
17. Demi-cystine	16.9	17.2	18.6	14-16.5
16. Sérine	12.1	10.7	11.3	9.6-10.8
14. Acide Glutamique	11.7	11.3	18.6	14.3-15.5
21. Proline	7.8	6.4	7.5	7.0-7.8
15. Thréonine	7.6	7.8	5.5	6.5-7.5
5. Leucine	5.9	5.8	6.7	6.4-6.9
11. Arginine	6.0	6.7	4.4	8.8-9.6
3. Valine	5.7	5.6	6.0	5.0-5.8
1. Glycine	5.6	6.6	5.7	/
13. Acide Aspartique	5.2	5.2	5.0	5.6-6.5
2. Alanine	4.3	3.7		2.8-3.5
4. Isoleucine	2.9	4.4	2.3	2.3-2.5
10. Lysine	2.5	2.0	3.9	2.6-3.1
7. Tyrosine	2.1	1.7	2.6	2.1-2.7
6. Phénylalanine	1.6	2.2	0.9	2.2-2.8
9. Histidine	0.9	0.7	0.7	0.8-1.1
18. Méthionine	0.6	0.7	0.5	0.5-0.9
20. Acide Cystéique	0.3	/	/	/
19. Cystéine	/	0.6	0.4	/
8. Tryptophane	/	0.5	/	0.8-1.2
12. Citrulline	/	/	/	/

L'ordre d'importance en pourcentage est donné par la référence 5.

Tableau 7.2.2 Acides aminés présents dans un cheveu humain non altéré (pourcentage)

Deux molécules présentes en proportions notables, aussi bien dans les fibrilles que dans la matrice (4), jouent un rôle au niveau de la résistance et de la forme du cheveu. Il s'agit de :

- ✓ la cystine qui forme les ponts disulfures dans la tige pilaire ; sa fréquence d'un motif pour 4 tours d'hélice, explique sa contribution à la résistance mécanique de la fibre,
- ✓ la proline qui est susceptible de rompre l'enroulement de l'hélice α serait à l'origine de l'ondulation naturelle de certains cheveux.

La sérine et la thréonine sont les deux seuls acides aminés à posséder une fonction hydroxyle dans le cheveu. Leur présence participe aux liaisons hydrogènes, en association avec l'histidine.

L'acide glutamique est présent en quantité remarquable dans le cheveu. Il peut assurer des liaisons ayant un caractère ionique avec les acides aminés possédant une fonction amine libre (lysine et arginine). La fréquence de ces liaisons est double de celle des ponts disulfures, soit une liaison pour deux tours d'hélice.

Les acides aminés comportant un noyau aromatique (tyrosine et phénylalanine) peuvent induire des liaisons de type Van der Waals. Bien que l'énergie de ces liaisons soit faibles, leur nombre fait qu'elles peuvent contribuer à la stabilité de l'édifice.

7.2.2.2. *Les acides aminés N- et C- terminaux de la kératine du cheveu*

L'analyse des peptides contenus dans le cheveu et leur dégradation permet de mettre en évidence les acides aminés présents en tant que N-terminal ou C-terminal (4).

La méthode de dégradation des dinitrophénylamino-acides de Sanger (12), utilisée par Kerr et Godin (13), a permis d'identifier la valine, la thréonine, la glycine, l'alanine, la sérine, l'acide glutamique et l'acide aspartique comme des acides aminés N-terminaux dans le cheveu humain.

Des données quantitatives de Speakman (14) et Hahnel (15) pour les acides aminés N-terminaux, utilisant la même technique, sont résumés dans le tableau 7.2.3.

Acides aminés	micromol/g de cheveu	Ref. 14	Ref. 17
Valine	4,0	8	4
Thréonine	4,0	8	6
Glycine	3,9	8	8
Alanine	1,0	2	2
Sérine	1,0	2	2
Acide Glutamique	1,0	2	2
Acide Aspartique	0,5	1	1
Total	15,4		

Tableau 7.2.3 Les acides aminés N-terminaux dans le cheveu (en pourcentage relatif)

La méthode d'hydrazinolyse de Niu et Freankel-Conrad (16), utilisée par Kerr et Godin (13), a permis de définir les acides aminés C-terminaux contenus dans le cheveu.

Ces acides aminés sont la thréonine, la glycine, l'alanine, la sérine, l'acide glutamique et l'acide aspartique. Ces six acides aminés servent aussi à créer les résidus N-terminaux.

7.2.2.3. *Structure des liaisons peptidiques dans la kératine*

A l'intérieur de la chaîne, seules les liaisons peptidiques C-N sont rigides; les autres liaisons permettent théoriquement tous les arrangements possibles. Toutefois, il existe un arrangement préférentiel qui définit la structure secondaire habituelle de la protéine.

La stabilité de cette structure, ou hélice α, enroulée autour d'un axe rectiligne, est fonction de la présence ou de l'absence de certains acides aminés. En effet, des ponts hydrogènes inter-caténaires s'établissent entre les acides aminés stabilisant l'hélice. L'hélice ainsi constituée présente une unité périodique de 0,50 à 0,55 nanomètres.

La présence de cystéine dans les chaînes polypeptidiques de kératine permet l'établissement de ponts disulfures inter-caténaires : habituellement 3 ou 7 hélices sont ainsi enroulées l'une autour de l'autre. Ces cordages à 3 ou 7 brins constituent les protofilaments. Ils sont groupés par 9 pour former un filament; de nombreux filaments groupés forment une fibrille.

La tige pilaire contient en dehors de la kératine, des lipides et des minéraux en très faible quantité.

7.2.2.4. *Minéraux contenus dans la tige pilaire (4)*

Les constituants minéraux sont faiblement représentés, moins de 1% de la fibre.

Le cheveu contient deux types d'éléments minéraux, ceux présents naturellement et ceux apportés par l'environnement.

La part endogène est constituée, en autre, du phosphore (P), du calcium (Ca), du magnésium (Mg), du sodium (Na), du potassium (K), du zinc (Zn), du cuivre (Cu), du fer (Fe), du bore (B), de l'aluminium (Al), du baryum (Ba), de l'argent (Ag), de l'or (Au), de l'arsenic (As), du titane (Ti), du vanadium (V), de l'iode (I) et du sélenium (Se).

Parmi les éléments exogènes le strontium (Sr), le mercure (Hg), le plomb (Pb), l'antimoine (Sb), le tungstène (W) et le molybdène (Mo), en autre, sont susceptibles d'être présents selon l'environnement des personnes.

L'origine de ces éléments est diverse. Une grande proportion provient de dépositions dues à la sueur. D'autres éléments peuvent provenir de l'eau (Ca, Mn, Fe, Cu), de traitements capillaires (Zn, Se, K, Na, Mg), de pollutions

aériennes (Pb, Hg), de l'alimentation ou d'irrégularités du métabolisme (Cd, Zn).

Le fer a la particularité d'intervenir dans la couleur rousse des cheveux.

7.2.3. Propriétés physiques du cheveu ou du poil (1)

L'élasticité est la propriété essentielle de la tige pilaire. En deçà d'une certaine limite de traction ou de déformation, elle reprend la longueur ou la forme qu'elle possédait avant l'action de l'agent déformant. Ainsi l'allongement des cheveux secs après traction peut être de plus de 30 %; après humidification et traction, l'allongement peut être de plus de 100 %.

La résistance aux agents mécaniques est elle aussi remarquable. La charge de rupture varie de 40 à 60 grammes. La résistance à l'écrasement est également très importante.

La résistance aux agents biologiques est excellente puisqu'une tige pilaire résiste pendant au moins 10 ans à la putréfaction.

La résistance aux agents chimiques est moindre : les alcalis, les oxydants et les réducteurs diminuent la cohésion de la tige pilaire. Celle-ci résiste mieux à l'action des acides.

La résistance à la chaleur est également faible. La dénaturation induite étant, après un certain seuil, irréversible. La déformation obtenue est maximale quand on applique au cheveu ou au poil une chaleur humide.

Normalement, la tige pilaire ne contient pas d'eau : celle-ci disparaît en effet au cours de la kératinisation. Cependant, les capacités d'absorption de l'eau sont très importantes. L'humidification augmente l'élasticité, induit des déformations en longueur et en diamètre de la tige pilaire. Ces déformations seront régressives après séchage.

Les propriétés électriques sont variables avec l'état d'hydratation : les cheveux mouillés sont conducteurs, les cheveux secs ne le sont pas. La friction des cheveux détermine leur charge en électricité statique; le pouvoir d'électrisation est variable selon les individus.

Les déformations induites par la traction ou la torsion s'accompagnent du passage de la forme α de la kératine en forme β : ce phénomène correspond à la rupture des ponts hydrogène intra-caténaires.

Ces modifications sont facilitées par l'état d'hydratation ou l'action des alcalis. Les déformations sont augmentées par la conjonction des deux éléments facilitateurs.

La rupture des ponts disulfures inter-caténaires peut se faire sous l'action d'agents réducteurs conduisant à la création de radicaux thiols. L'application d'un agent oxydant élimine une molécule d'eau et permet la reconstitution de ponts disulfures nouveaux, c'est-à-dire de nouvelles liaisons conduisant à la constitution d'une nouvelle molécule de kératine.

7.2.4. Cycle pilaire

Le follicule pileux peut être considéré comme une glande à sécrétion holocrine qui fabrique un cheveu en quelques années, l'élimine, puis le renouvelle après un certain temps de latence. Cette alternance de phases de croissance ou anagènes, de régression ou catagènes et de repos ou télogènes, est représentée dans presque toutes les espèces possédant un système pileux.

Chez la plupart des animaux, les cycles pilaires de tous les poils sont synchrones. Chez l'homme au contraire, les cycles de chaque cheveu ou poil ne sont pas synchrones.

La durée des cycles pilaires est variable selon les ethnies et selon les zones du corps examinées. On considère que les cheveux se renouvellent entièrement quatre fois au cours de la vie. La phase de croissance dure environ 1000 jours, la phase de repos 100 jours, mais il existe d'importantes variations autour de ces chiffres moyens.

Les autres poils ont des cycles plus courts : par exemple, les sourcils se renouvellent deux fois par an.

Ce cycle pilaire se décompose en trois phases de durées inégales (figure 7.2.4) :

- ✓ **La phase anagène**, période d'activité intense, qui dure environ 900 jours, et pendant laquelle le poil ne cesse de grandir.
- ✓ **La phase catagène**, période de transition variable, en moyenne une trentaine de jours, débute par l'interruption de l'activité de la matrice. La multiplication cellulaire et la mélanogènèse s'arrêtent; les poils deviennent plus fins et plus clairs, la papille se sépare du bulbe pilaire sous la forme d'un petit groupe de cellules indifférenciées.

✓ **La phase télogène**, qui dure de trois à six mois, est une période de repos. La tige pilaire entourée de son sac épithélial est éliminée. Parallèlement, un peu avant la fin de cette phase, un nouveau bourgeon pilaire apparaît au-dessus de la papille. En pénétrant dans la matrice, celui-ci induit les mécanismes de division et de différenciation cellulaires. La mélanogènèse reprend, le nouveau poil en phase anagène coexiste avec l'ancien en phase télogène qui n'est pas encore éliminé.

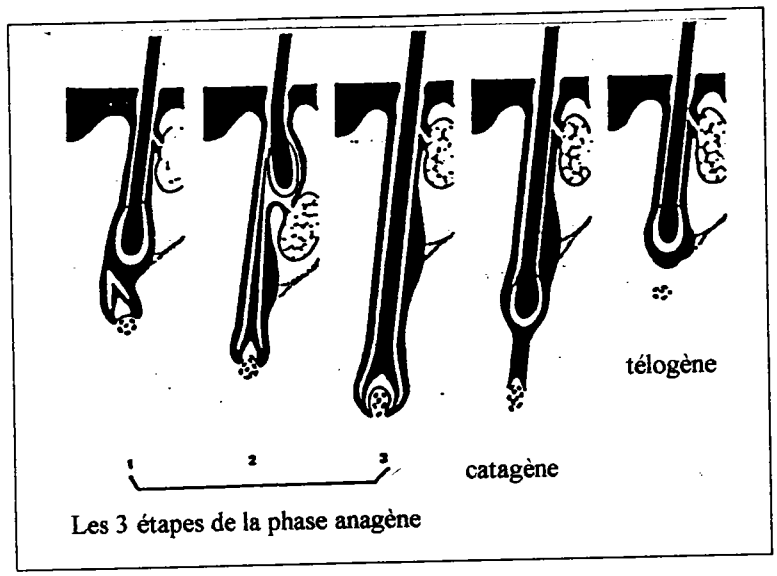


Figure 7.2.4 Le cycle pilaire

Il est possible de préciser le stade du cycle grâce à un examen microscopique du bulbe pilaire arraché en même temps que la tige (18). Cet examen permet d'établir un trichogramme, véritable formule pilaire, qui indique la proportion de poils ou de cheveux se trouvant à chaque stade du cycle. Les trichogrammes donnent chez le sujet normal :

pour l'homme : 83 % anagène, 0 à 1 % catagène et 15 à 16 % télogène;

pour la femme : 88 % anagène, 0 à 1 % catagène et 10 à 11 % télogène.

7.2.5. Croissance des poils et des cheveux

7.2.5.1. Généralités

Dans l'espèce humaine, le système pileux commence à se développer à partir du troisième mois de grossesse. Les premiers poils formés (lanugo) sont très fins. Ils sont remplacés au huitième mois par des poils de plus grand diamètre.

Le nombre total de cheveux est de 100 000 à 150 000. La vitesse de croissance, en phase anagène dépend de leur localisation sur le corps (19).

sur le cuir chevelu :
au niveau du vertex : 0,45 mm/j,
au niveau des tempes : 0,39 mm/j,
sur le corps :
au niveau de la barbe : 0,27 mm/j,
au niveau de la poitrine : 0,40 mm/j.

Les cheveux les plus longs ont une longueur moyenne de 50 cm; ils peuvent atteindre exceptionnellement 1 m.

Considérant leur renouvellement incessant, en raison de l'existence des cycles pilaires asynchrones, on estime à 100 le nombre de cheveux perdus par jour.

7.2.5.2. *Facteurs de croissance*

✓ Les caractères génétiques

La longueur maximale des cheveux est évidemment fonction des caractères ethnique et génétiques, les asiatiques ayant les cheveux les plus longs (20).

✓ Les facteurs alimentaires

La malnutrition par ses effets sur les différents métabolismes, et notamment sur le métabolisme protéique, induit très rapidement une chute, une finesse excessive, une dépigmentation des poils et des cheveux.
Les acides aminés soufrés (cystine, cystéïne et méthionine) et certains acides gras non saturés (acide linoléique, acide linolénique, acide arachidonique) sont indispensables à la croissance des cheveux. Un apport de 10 mg/kg de poids de soufre alimentaire sont nécessaire à la croissance et au maintient de la chevelure (21).
Certains facteurs vitaminiques sont indispensables : les vitamines A, C, B5 (acide pantothénique) et H (biotine). Des carences en ces facteurs peuvent provoquer une atrophie des follicules, ce qui rend les cheveux secs et rares (22-23).

✓ Les facteurs hormonaux

L'ensemble des causes d'ordre physiologique ou pathologique qui peuvent modifier la croissance des poils et des cheveux a fait l'objet d'une revue détaillée de Comaish (24).

7.2.6. Conclusion

Le cheveu a une structure organisée. Il est particulièrement résistant tant aux agressions chimiques qu'aux agressions physiques.

Les protéines qui constituent la kératine sont en partie sous forme d'hélice α. Les acides aminés assurent la cohésion de l'édifice par des liaisons intercaténaires (cystine), des liaisons à caractères ioniques (acide glutamique, acide aspartique, lysine, arginine), des liaisons hydrogènes (groupements CO et NH de la chaîne protéique, sérine et histidine) et des liaisons Van der Waals (tyrosine et phénylalanine).

Le cheveu acquiert ses propriétés de résistance mécanique par la faculté de l'hélice de changer de forme, en passant de la structure α à la structure β.

Le cheveu est susceptible de comporter en plus de la kératine, de l'eau, des éléments minéraux et des lipides. La composition chimique générale peut varier.

Toutes ces caractéristiques rendent les analyses extrêmement délicates. Pour une majorité des techniques d'analyse, il est nécessaire que les cheveux soient minéralisés afin d'obtenir des solutions. De ce fait, il est indispensable de disposer de quantités notables de cheveux (de l'ordre du milligramme).

Une micro caractérisation de la matière organique apparaissait comme complémentaire de ces techniques. C'est la raison pour laquelle, nous avons étudié la faisabilité et les mécanismes de la micropyrolyse flash des cheveux, couplée à la spectrométrie de masse.

7.3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

7.3.1. Recherche des paramètres de température

Une analyse par thermogravimétrie d'une masse de 10 mg de poudre de cheveux d'un même individu a permis de définir la température d'interface évitant de dégrader l'échantillon avant la pyrolyse (figure 7.3.1).

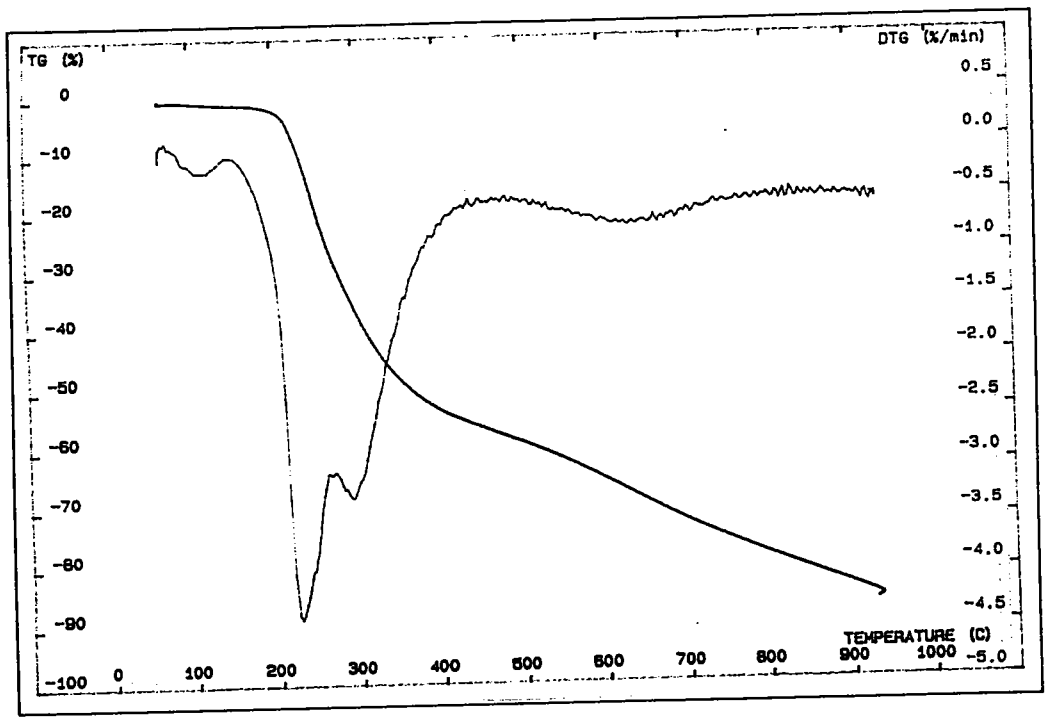


Figure 7.3.1 Analyse thermogravimétrique de cheveux en poudre

La courbe obtenue avec une rampe de température de 10°C/min. et un flux d'argon de 40 ml/min., présente quatre points d'inflexion, correspondant chacun à une perte de poids.

Le premier point se situe vers 100°C, il correspond à la désorption d'eau. Une perturbation importante intervient entre 200 et 400°C, le cheveu subit une forte dégradation. Une troisième zone aux alentours de 650°C montre une dernière transformation du cheveu.

Nous avons fixé la température de pyrolyse à 600°C. Elle est atteinte avec une montée en température du filament de 20°C/ms. et maintenue 5 secondes.

Il apparaît qu'une température d'enceinte de pyrolyse de 175°C est bien adaptée pour déshydrater l'échantillon sans le dégrader.

7.3.2. Echantillonnage des cheveux

Nous avons constitué une petite banque de cheveux de référence. Ces cheveux ont été examinés au binoculaire et au microscope, afin d'établir leurs caractéristiques morphologiques, avant de les soumettre à divers traitements et analyses.

Dans un but de discrimination, les informations apportées par l'examen visuel participent à la caractérisation des différents types de cheveux. Les analyses par pyrolyse ou par microsonde laser LAMMA étant destructives, il est primordial d'effectuer cet examen avant.

Les cheveux sont lavés dans trois bains successifs d'acétone, d'eau et d'acétone de 5 minutes chacun. Le bain permet d'éliminer les éléments organiques exogènes présents sur la surface du cheveu, comme les shampooings, les traitements capillaires ou le sébum.

Pour l'identification des acides gras présents sur la surface du cheveu nous avons lavé les cheveux (1 mg) avec un bain de méthanol (50 ml), que nous avons injecté en GC/MS.

Dans notre travail, les cheveux sont analysés soit réduits en poudre, par broyage sous azote liquide, soit coupés en petits morceaux de tailles proches. Les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients.

La technique du broyage permet de se défaire de l'inhomogénéité de l'échantillon. Le cheveu de référence B à partir duquel nous avons étudié les mécanismes de pyrolyse a été préparé de cette façon.

Par contre, lorsque le cheveu est de taille réduite, cette préparation est impossible. Dans ce cas, il est nécessaire de prendre la totalité du cheveu et de tenir compte d'éventuelles disparités.

Pour notre étude statistique, les cheveux ont été coupés en tronçons réguliers et nous les avons analysés en ordre inverse de la croissance (de la racine à la pointe), le bulbe n'étant pas pris en compte.

Les cheveux sont pesés exactement, le même jour, pour avoir des conditions atmosphériques identiques. Les quantités de cheveux pesées sont d'environ :

- ✓ 500 µg pour la poudre de cheveu de référence,
- ✓ 100 µg pour l'étude de discrimination,

L'échantillon est inséré dans un tube de quartz pour la pyrolyse.

7.3.3. Paramètres instrumentaux

Les analyses par pyrolyse thermique ont été effectuées avec le pyrolyseur Pyroprobe 1000, avec les paramètres que nous avons précédemment commentés.

En ce qui concerne la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse ou au détecteur FID, les paramètres standards sont les suivants :

Paramètres	Valeurs choisies
Flux d'hélium	20 ml/min
Type d'injecteur Température d'injecteur	Split/splitless utilisé en splitless 200°C
Colonne	BPX5 (5% diphényl polysiloxane et silphényl siloxane) l. : 25 m., d.int. : 0,22 mm ép. film : 0,25 µm
Programmation du four	35 °C pendant 2 min chauffé jusqu'à 290°C avec une rampe de 6°C/min
Température d'interface GC/MS	290°C
Température de source d'ionisation	230°C
Mode d'ionisation Gamme de masses	Impact électronique à 70 eV m/z = 30 à 500
Température du four GC/FID	la programmation débute avec une température de 50°C au lieu de 35 °C
Température du détecteur FID	300°C

Nous avons choisi la colonne BPX 5, car elle perd relativement peu de phase, et ceci dans un laps de temps assez long.

Les analyses par GC/MS et GC/FID ont été réalisées avec deux appareils différents. Les fours sont du même constructeur et du même type (HP 5988 A). Cependant, leurs performances ne sont pas identiques. Ainsi, la température de départ et le flux d'hélium sont légèrement différents.

Ceci explique les variations des temps de rétention observées entre les deux appareils pour un même échantillon.

7.4. PYROLYSE THERMIQUE DE QUELQUES PEPTIDES

L'analyse des acides aminés a permis d'appréhender leur réactivité quand ils sont libres. Cependant une partie des mécanismes que nous avons identifiés ne peuvent se produire que lorsque les fonctions, soit acide, soit amine, sont libres d'interagir ensemble.

Les mécanismes de dégradation peuvent être différents une fois les liaisons peptidiques formées. Nous avons appliqué, pour trois peptides de synthèse, une pyrolyse dans des conditions identiques à celles des acides aminés.

7.4.1. Choix des peptides

Nous avons choisi trois peptides qui nous paraissaient intéressants pour étudier les réactions de la chaîne polypeptidique en fonction de différentes chaînes latérales :

- ✓ **poly (Pro-Gly-Pro),** choisi pour la tendance marquée de la proline à former des 2,5 dicétopipérazines,
- ✓ **poly (Leu)**, pour sa chaîne latérale aliphatique ramifiée,
- ✓ **poly (Glu-Ala-Tyr) 6:3:1**, polypeptide qui posséde en chaînes latérales une majorité de fonctions acides et une petite proportion de phénol libres.

Les masses de polymère pyrolysées sont d'environ 100 µg dans les trois cas.

7.4.2. Pyrolyse thermique du peptide Poly (Pro-Gly-Pro)

7.4.2.1. Présentation

La chaîne peptidique ne comporte pas de chaîne latérale proprement dit, puisque la proline est intégrée à la liaison peptidique. Ce peptide est un composé idéal pour montrer le type de coupure de la chaîne peptidique et pour chercher les types de dimérisation effective.

La molécule a une masse moyenne en nombre d'environ 5300 daltons. Elle contient 66% de proline et 33% de glycine.

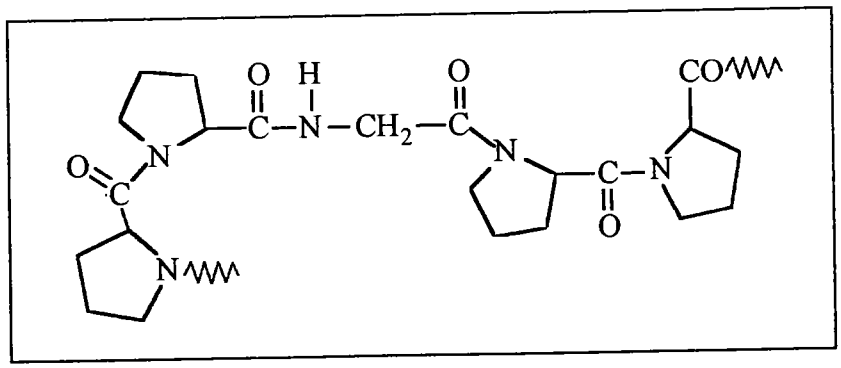


Figure 7.4.1 Schéma de poly(Pro-Gly-Pro)

7.4.2.2. *Résultats et mécanismes de dégradation*

Le résultat de la pyrolyse 'standard', c'est à dire une pyrolyse de 600°C pendant 5 secondes, de ce peptide produit essentiellement de la 3-Pyrroline (C). Les spectres de masse sont reportés annexe 36.

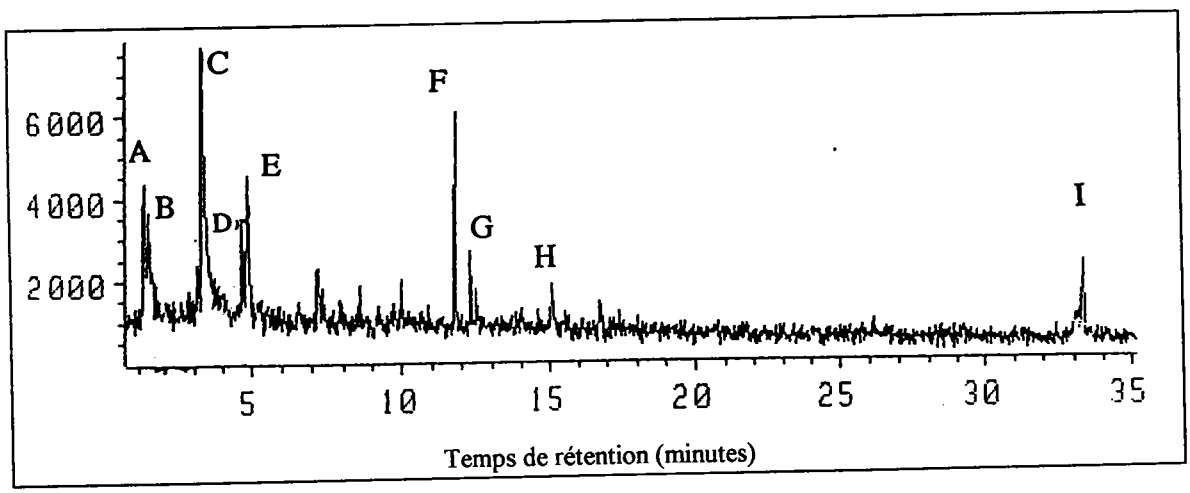


Figure 7.4.2 Pyrogramme de poly(Pro-Gly-Pro)

Pic	m/z	Molécule proposée
A	28, 44	CO_2
B	29, 31, 45, 53, 64, 72, 87	CHO-NH-CH_2-CHO (?)
C	28. 32, 41, 68, 69	3-Pyrroline (ou 2-pyrroline)
D	51, 52, 79	Pyrridine
E	28, 39, 67	Pyrrole
F	67, 82, 97, 110, 125	'Pyrolidine 1,2'-2-pyrrolidinone'($C_6H_9N_2O$)
G	54, 56, 82, 94, 108	
H	68, 69, 111, 141	
I	70, 96, 124, 166, 194	Cycloproproline

Tableau 7.4.1 Spectres de masse du pyrogramme de poly(Pro-Gly-Pro)

L'intensité des pics est assez faible, cependant, nous pouvons noter que le dégagement de CO_2 est devenu minoritaire. La décarboxylation n'est plus possible dans ce cas.

Nous pouvons aussi noter le peu de pics formés. Les mécanismes de dégradation semblent assez restreints. Le pyrogramme présente en fait deux types de molécules formées à partir d'un seul acide aminé ou de deux.

La formation des molécules (B) et (C) est due au premier type de coupure de la liaison peptidique *(1)*, se faisant au niveau de l'hétérocycle.
Le pyrrole (E) peut également être formé à partir de cette coupure.

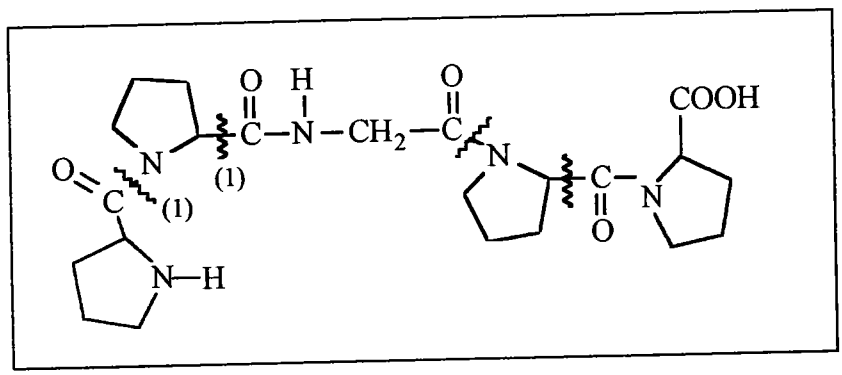


Figure 7.4.3 Les différentes ruptures de la chaîne peptidique

(I) et (F) sont probablement des molécules formées à partir de deux acides aminés adjacents. La liaison peptidique peut se rompre suivant un deuxième type de coupure *(2)*.

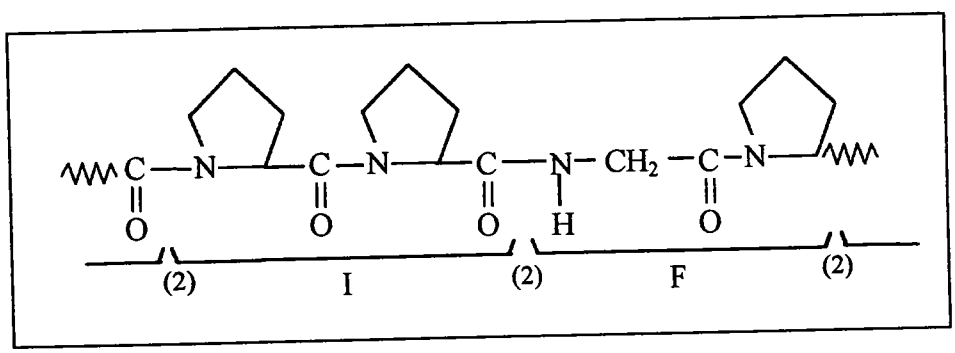
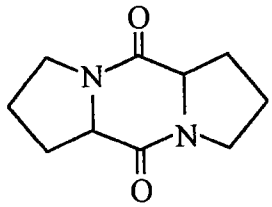
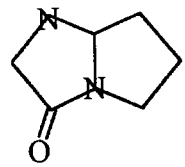


Figure 7.4.4 Mécanisme de fragmentation de la chaîne peptidique

La fragmentation de la liaison peptidique donne deux molécules :



Pro-Pro (I)
Cycloproproline



Gly-Pro (F)

La cycloproproline et la 'pyrolidine 1,2' 2-pyrrolidinone' identifiées par comparaison avec les produits purs, révèlent l'interaction des monomères adjacents. Ces dimères peuvent se former lorsqu'ils sont liés dans la chaîne peptidique.

7.4.2.3. Conclusion

La chaîne peptidique se fragmente au niveau de la liaison peptidique, suivant deux types de coupures :

- ✓ entre l'azote et le groupe acyl,
- ✓ entre l'hétérocycle et le groupe acyl.

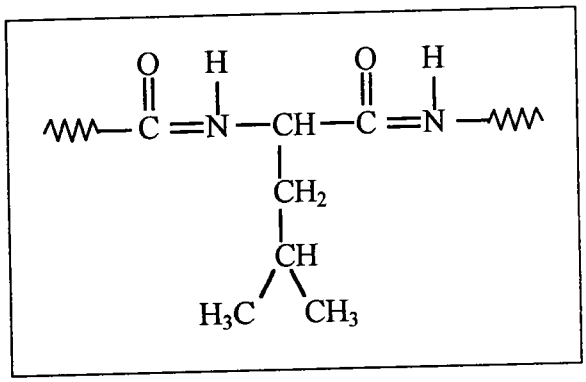
A paritr de ces deux rupture, nous pouvons identifier trois mécanismes de pyrolyse :

- ✓ la dépolymérisation du peptide de type radicalaire, libérant le pyrrole et la pyrroline,
- ✓ le réarrangement de deux monomères adjacents avec formation d'un cycle à cinq,
- ✓ le réarrangement de deux monomères adjacents avec formation d'un cycle à six.

7.4.3. Pyrolyse thermique du peptide Poly(L-Leucine)

Avec la pyrolyse de Poly(L-Leucine), nous pouvons repérer les molécules de recombinaison issues des fragmentations des liaisons peptidiques et des groupements latéraux.

7.4.3.1. Présentation du polymère



Le poids moléculaire varie de 3000 à 15000 daltons.

7.4.3.2. Résultats et mécanismes

Le pyrogramme est beaucoup plus complexe que celui du peptide précédent (figure 7.4.5).

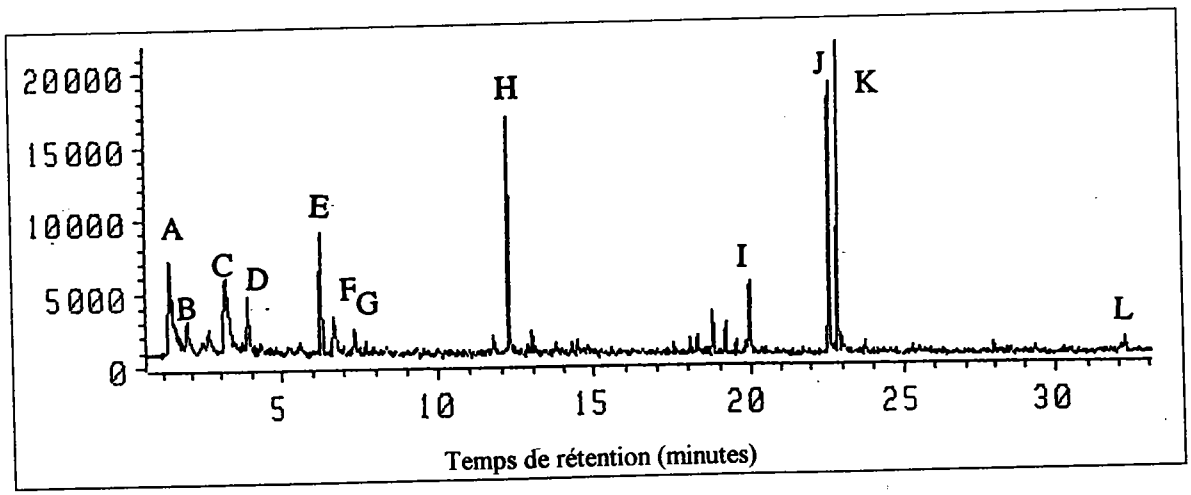


Figure 7.4.5 Pyrogramme de poly(Leu)

Pic	m/z	Molécules possibles
A	28, 39, 41, 44, 56	Propène et CO_2
B	41, 56, 67	
C	28, 91, 92	Toluène
D	39, 41, 43, 68, 81, 82	
E	39, 41, 43, 55, 70, 82, 126	Isobutyl-4, imidazol, 5-one (?)
F	39, 41, 43, 55, 82, 96	Méthyl-3, cyclopentanone (?)
G	78, 93, 103, 104	Styrène
H	**56, 57, 84, 98, 113, 140, 154**	**Isobutyl-5, 3 imidazoline-2,4-dione**
I	69, 112, 114, 142, 154, 156	Isobutyl-5, 3-imidazolidine-2,4-dione
J	**55, 69, 83, 98, 124, 166**	**Isobutyl-3, pyrazine-2,5-dione,**
K	**55, 69, 83, 98, 124, 166**	**Isopropyl-3, méthyl-6, pyrazine-2,5-dione**
L	43, 71, 86, 113, 114, 140, 170	2,5 Dicétopipérazine, 6-isobutyl

Tableau 7.4.2 Inventaire des spectres de masse

Les spectres de masse sont reportés annexe 37.

Les dicétopipérazines (J et K) ainsi que l'imidazole (H), sont deux types de molécules que nous avons déjà rencontrées lors de la pyrolyse de la L-leucine seule. L'intensité des pics est plus intense dans le cas de la poly(Leu).

La proximité dans la chaîne peptidique de deux motifs Leu pourrait expliquer que la formation de cycles à cinq ou de cycles à six soit favorisée.

Le forme du cycle pourrait être donnée par la façon dont le polypeptide se plie. En effet, Munson (25) a montré que de deux types de réactions pouvaient se produire (figure 7.4.6).

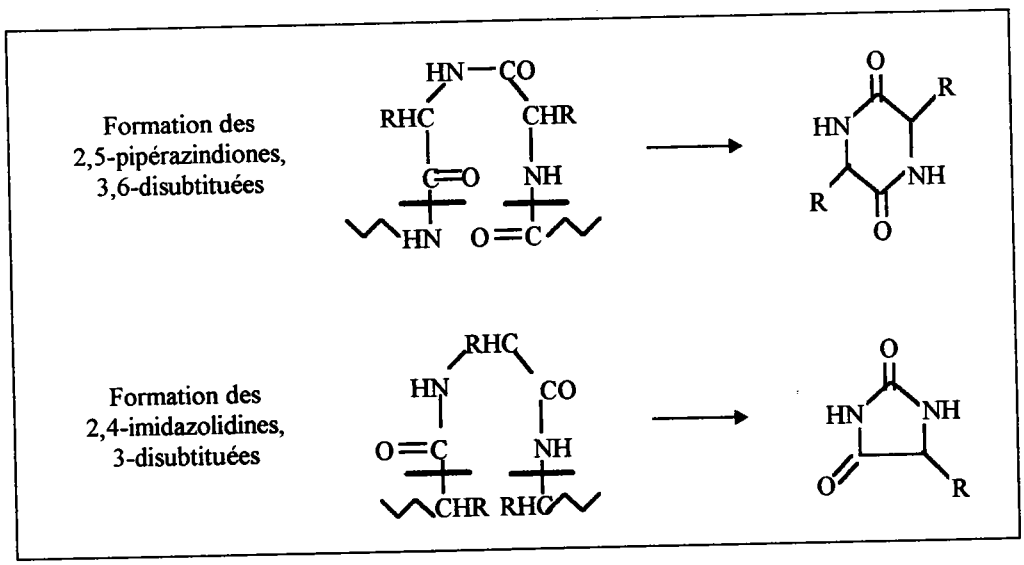
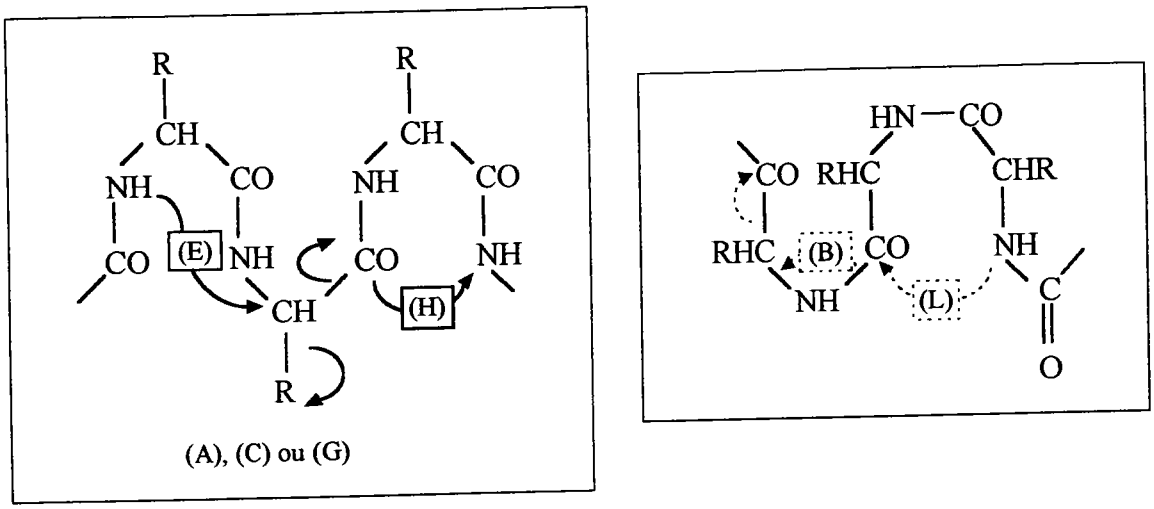


Figure 7.4.6 Proposition de mécanismes pour la formation des deux types de molécules

En se basant sur ces hypothèses de mécanismes, nous pouvons penser que les molécules E, H, J, K et L peuvent se former suivant les mécanismes présentés sur la figure 7.4.7.



A) Formation d'un cycle à cinq *B) Formation d'un cycle à six*

Figure 7.4.7 Proposition de mécanismes de coupure de Poly(Leu)

Nous proposons les mécanismes de fragmentation possibles des molécules (H), (J) et (K) (figures 7.4.8 et 7.4.9).

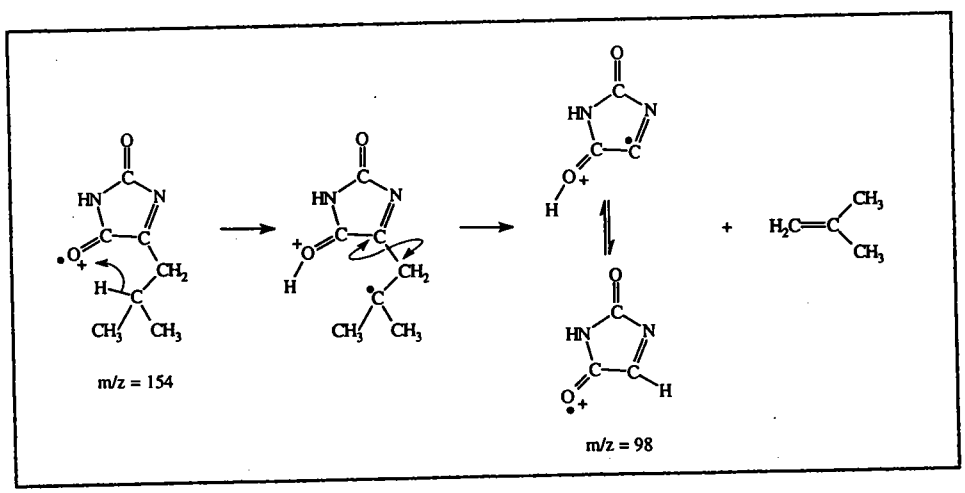


Figure 7.4.8 Propositions de mécanismes de fragmentation de : (H) 5-isobutyl-3-imidazoline-2,4-dione.

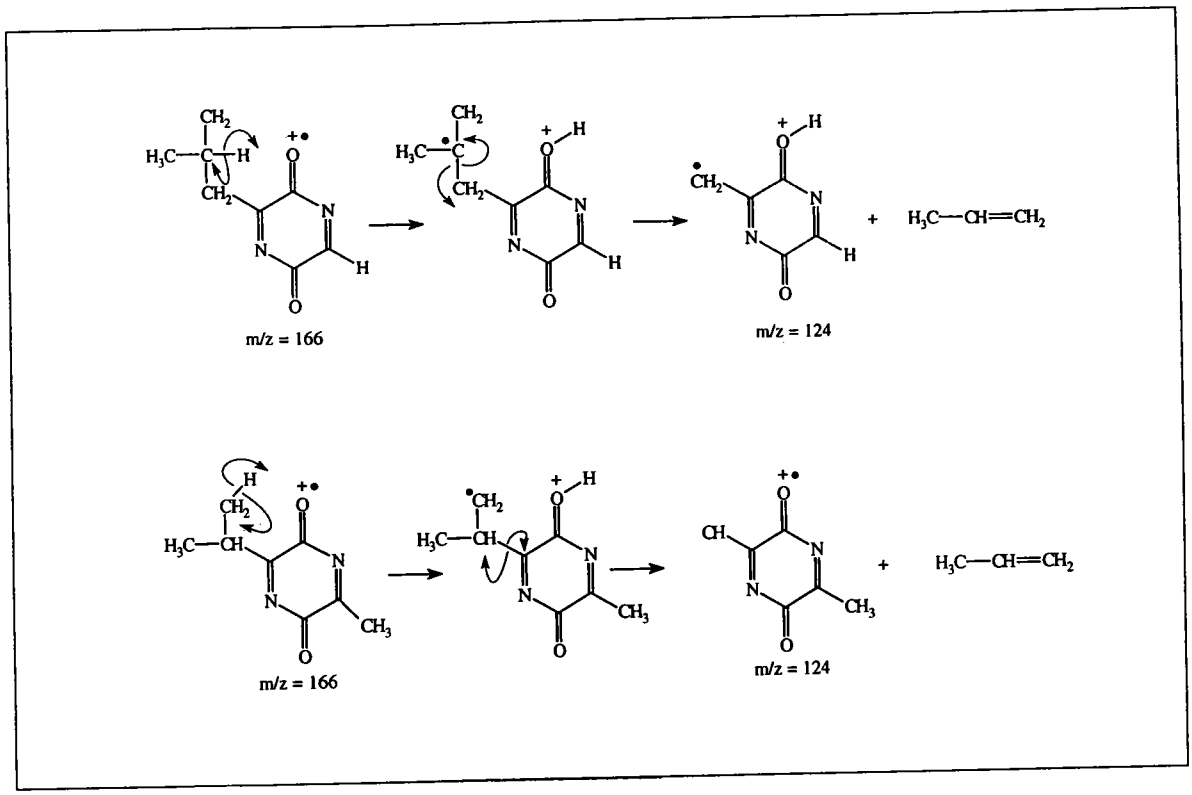


Figure 7.4.9 Propositions de mécanismes de fragmentation
a) de l'isobutyl-3-pyrazine-2,5-dione (J),
b) de l'isopropyl-3, méthyl-6-pyrazine-2,5-dione (K).

Pendant la pyrolyse du polypeptide, quatre mécanismes pourraient apparemment se produire :

- ✓ la coupure de la chaîne latérale formant A (par homolyse) et C (par réarrangement),
- ✓ la coupure de la chaîne peptidique pour former des cycles à 5 (E et H),
- ✓ la coupure de la chaîne peptidique pour former des cycles à 6 (J, K et L).

7.4.3.3. *Conclusion*

La pyrolyse thermique d'un peptide à chaîne latérale aliphatique montre les réactions de la chaîne peptidique :

- ✓ coupure de la chaîne latérale,
- ✓ réarrangement de la chaîne latérale en molécule aromatique,
- ✓ formation de cycles à cinq (3 Imidazoline, 5-isobutyl, 2,4-dione),

✓ formation de cycles à six (2,5-dicétopyrazine, 3-isobutyl et 2,5-dicétopipérazine, 6-isobutyl)

Le mécanisme majoritaire pour ce polypeptide est la formation d'un cycle à six à partir de deux acides aminés. Ce mécanisme a déjà été rencontré lors de la pyrolyse de la L-leucine seule. Dans notre cas, le rendement de formation de ces cycles est plus important. La proximité des deux motifs pourrait être favorisée par la liaison peptidique.

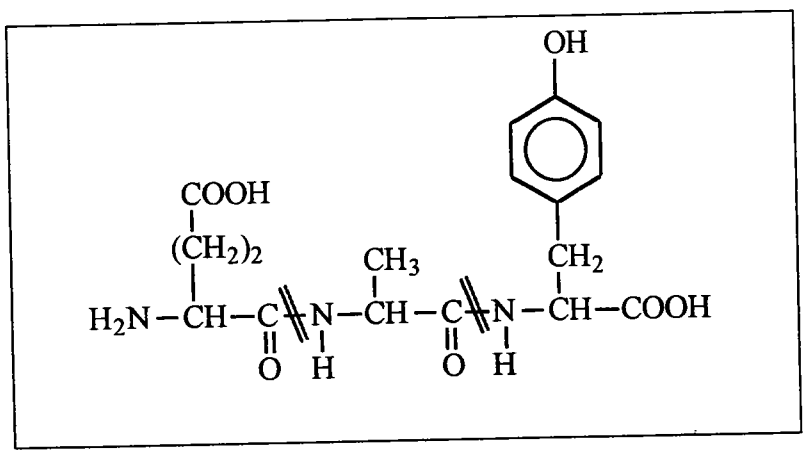
De plus, la coupure des chaînes latérales induit la formation de molécules aromatiques (styrène et toluène). Nous pouvons noter que ces composés aromatiques ne sont pas seulement issus de la phénylalanine.

7.4.4. Pyrolyse thermique du peptide Poly(Glu-Ala-Tyr) 6:3:1

7.4.4.1. Présentation du peptide

Si les chaînes latérales sont plus complexes, les recombinaisons sont plus nombreuses et les mécanismes mis en jeu deviennent nettement plus compliqués.

Les chaînes latérales comportent un phénol, un groupement méthyle et une fonction acide au bout d'une chaîne carbonée.



Le polypeptide contient approximativement 59% d'acide glutamique, 30% d'alanine, 11% de tyrosine. La masse moléculaire moyenne en nombre est de l'ordre de 25000 daltons.

7.4.4.2. *Résultats et mécanismes*

Nous avons ici deux fonctions particulières, la fonction acide susceptible de réagir avec la chaîne peptidique et le phénol groupement très stable par rapport aux mécanismes de pyrolyse.

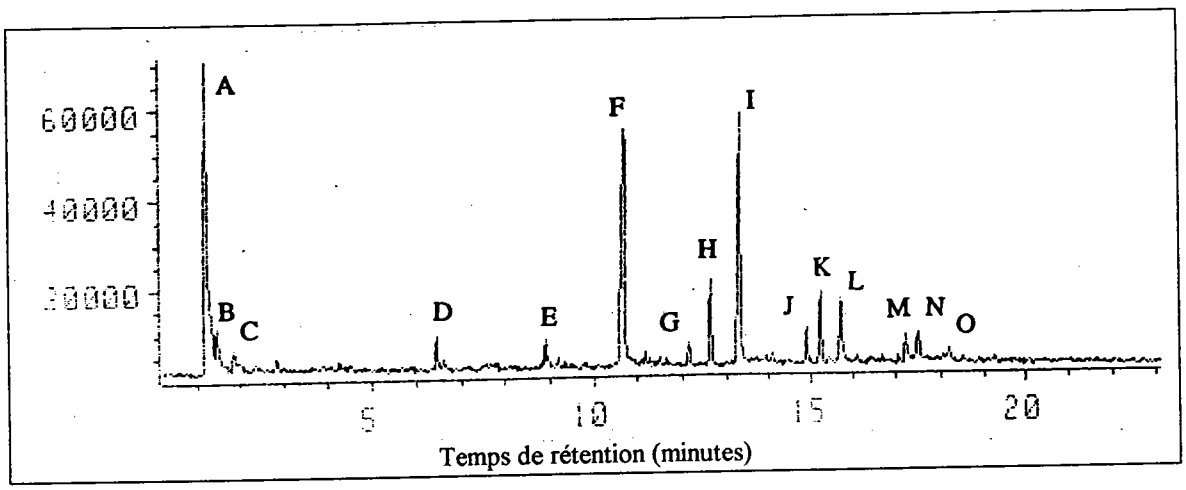


Figure 7.4.10 Pyrogramme de Poly (Glu-Ala-Tyr)

Pic	*m/z*	*Molécule*	*Associations possibles*	
A	**44**	**CO_2**	**chaîne latérale**	**Glu**
B	39, 40, 41, 44, 58			
C	28, 54, 70			
D	53, 80, 81	Méthyl-2, pyrrole		
E	53, 80, 95	Ethyl-2, pyrrole		
F	**65, 66, 94**	**Phénol**	**chaîne latérale**	**Tyr**
G	65, 67, 77, 79, 106, 107	Méthyl-1, pyridine		
H	77, 79, 90, 107, 108	Méthyl-3, phénol		
I	**77, 79, 90, 107, 108**	**Méthyl-4, phénol**	**chaîne latérale**	**Tyr**
J	77, 79, 107, 122	Ethyl-4, Phénol	chaîne latérale	Tyr
K	77, 79, 91, 107, 121, 122			
L	77, 107, 122			
M	77, 91, 121, 136			
N	77, 91, 121, 136			
O	80, 107, 120, 135	? Pyridazine ?		

Tableau 7.4.3 Inventaire des spectres de masse

Le dégagement de CO_2 provient essentiellement de la fonction libre de l'acide glutamique.

Ce peptide permet de mettre en évidence (mécanismes [2] et [16]) le caractère prédominant de la rupture radicalaire de la chaîne latérale de la tyrosine.

La tyrosine représente 11% du mélange, pourtant les pics pouvant lui être associés (**F**, **I** et J) sont les plus importants du pyrogramme.

7.4.5. Conclusion

Ces différents essais ont montré que la chaîne peptidique peut se couper de plusieurs façons :

- ✓ entre l'atome d'azote et le groupement acyl dans le cas du peptide poly (Pro-Gly-Pro),
- ✓ autour de deux acides aminés avec formation d'un hétérocyle à 5 (cas de poly(Pro-Gly-Pro) et de poly(L-Leu)),
- ✓ autour de deux acides aminés avec formation d'un hétérocycle à 6 (cas de poly(Pro-Gly-Pro) et de poly(L-Leu)).

Dans ce cas, la libération de CO_2 (décarboxylation) ou de molécules aromatiques (les phénols, par exemple) provient essentiellement des chaînes latérales.

α α α

7.5. PYROLYSE THERMIQUE GC/MS DE CHEVEUX

7.5.1. Introduction

Après avoir établi une banque spectrale relative à chaque acide aminé, et établi leur mécanisme de pyrolyse, nous pouvons aborder le pyrogramme de cheveu.

L'utilisation du pyrogramme pour différencier des cheveux est délicate et demande quelques réserves. Il est impératif de déterminer la nature de chaque pic. Si l'origine d'un pic est liée à un acide aminé, nous pouvons lui accorder un crédit supérieur qu'à un pic formé par un élément exogène.

Ainsi, nous nous sommes attachés à établir les liens entre les acides aminés et les pyrolysats du cheveu. Dans ce cas, nous avons tenu compte de la totalité des pics et ce qu'elle que fût leur intensité.

7.5.2. Résultats

Le pyrogramme de la Figure 7.5.1 montre le résultat de la pyrolyse de 500 µg de cheveux lavés (méthode décrite § 7.3) et réduits en poudre par broyage dans de l'azote liquide.

La masse de cheveux est assez importante, car nous voulions obtenir des intensités de pics assez grandes pour pouvoir distinguer du bruit de fond le maximum de petits pics.

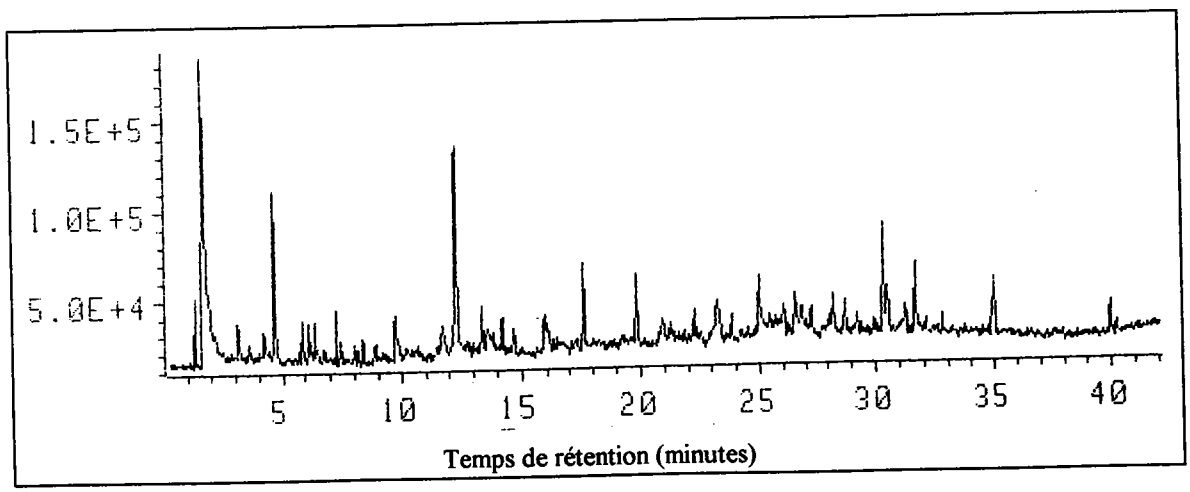


Figure 7.5.1 Pyrogramme de poudre de cheveu de l'individu B

Le pyrogramme découpé par fenêtres de 14 minutes et les spectres de masse de chaque pic sont reportés en annexes 39 à 41.

7.5.3. Mécanismes de dégradation

L'interprétation des résultats obtenus par pyrolyse se fait en tenant compte de la nature protéinique de la kératine, et donc des résultats obtenus pour les acides aminés, mais aussi de la nature des contaminants.

L'origine de certaines des molécules issues de la pyrolyse du cheveu peut être parmi :

- ✓ les acides aminés, directement par comparaison des spectres du pyrogramme (annexes 1 à 35);
- ✓ les recombinaisons dues à la chaîne peptidique et à deux acides aminés,
- ✓ les acides gras contenus dans le sébum.

7.5.3.1. Association à un acide aminé

Nous avons résumé dans le tableau 7.5.1, l'ensemble des molécules formées pour lesquelles nous avons établi une relation avec les pyrolysats des acides aminés. Le type de mécanisme expliquant la formation de chaque molécule, y est aussi noté (cf. chapitre VI, § 6.3).

Dans ce tableau, les acides aminés ont été placé suivant leur abondance dans les kératines des cheveux (cf. § 7.2).

Un certain nombre de mécanismes de pyrolyse restent inchangés :

- ✓ la coupure de la chaîne latérale (Cys, Tyr, Phé, Try),
- ✓ la formation de 2,5 dicétopipérazine (Pro) et de 2,5 dicétopyrazine (Leu),

Pour les autres mécanismes, il faut tenir compte de la liaison peptidique et de sa fragmentation. Nous avons établi les mécanismes suivants :

- ✓ [1] + [14] correspond à la coupure de la chaîne latérale, suivi de la rupture de la liaison peptidique au niveau des groupements acyl autour de la chaîne aliphatique (Cys, Arg, Lys),
- ✓ [15] peut correspondre à la fragmentation de la liaison peptidique suivi du réarrangement avec la chaîne latérale (Asp, Glu, *Ser*),
- ✓ [16] les deux liaisons peptidiques se coupent autour de la chaîne aliphatique (Tyr, Phé),
- ✓ [6] coupure des 2 liaisons acyl autour de l'acide aminé (Phé),
- ✓ [5] même type de rupture que précédement suivi d'un réarrangement (Phé).

Acide aminé	Molécules communes	Mécanismes
Cystine	H_2S, CS_2 Isoxazole Pyridine, 2-méthyl	2 , 1 1 + 14
Sérine	1H pyrrole, 3-méthyl	
Acide Glutamique	1H pyrrole	15
Proline	Cycloproproline	8
Thréonine	M (39.8-40.0)*	
Leucine	2,5 Dicétopyrazine, 3-isobutyl	8
Arginine	Isoxazole	1 + 14
Glycine	/	
Acide Aspartique	Q (11.6-11.7)* 2,5 pyrrolidinedione	15
Lysine	Isoxazole	1 + 14
Tyrosine	Phénol Phénol, 4-méthyl Phénol, 4-éthyl Phénol, 4-éthylène	2 2 16 16
Phénylalanine	Toluène Ethylbenzène Styrène Benzèneacétonitrile 1H Indole	2 16 16 6 5
Histidine	/	
Méthionine	Pyridine, 3-méthyl	
Tryptophane	1H Indole 1H Indole, 3-méthyl	2 2

** : pics des pyrogrammes des annexes 39 et 41*

Tableau 7.5.1 Correspondance entre les pyrolysats des acides aminés et du cheveu B

Dans ces fragmentations, il apparaît que la fonction amine est solidaire de la chaîne aliphatique.

La fonction acyl est apparemment la liaison la plus prompte à se rompre. En effet, les molécules identifiées sont des composés aromatiques substitués ou comportant des hétérocycles.

L'exception est apportée par l'acide aspartique qui comporte deux fonctions cétones. La chaîne latérale possède une fonction acide qui permet le réarrangement.

7.5.3.2. *Recombinaisons dues à la chaîne peptidique*

Il apparaît des familles de molécules comportant des pics caractéristiques. Les 2,5-dicétopipérazines-3,6-disubstituées caractérisées par m/z = 154 et les 2,4-imidazolidinediones-5-substituées par m/z = 100 détectées et identifiées par Munson et Fetterolf (25).

Des familles de molécules de structure commune ont été établies à partir des masses m/z = 100 et 154 (tableaux 7.5.2 et 7.5.3).

R	*Masses*	*Molécules*	*Association*
20.9	41, 68, **100**, 112, 140	?	?
23.2	41, 57, **100**	2,4 imidazolidinedione	Liaison peptidique

Tableau 7.5.2 Pics dont le spectre de masse comporte m/z = 100

R	*m/z*	*Molécules*	*Association*
22.2	41, 56, 70, 84, 96, 111, **154**	?	?
26.8	55, 69, 83, 111, **154**, 192, 228	?	Pro + Met ?
28.2	41, 70, 72, 98, 125, **154**, 182	?	Pro + Ser ?
28.7	41, 70, 100, 125, **154**, 165, 196	?	Pro + (Leu, Arg, Val, Lys)
29.9	60, 73, 129, **154**, 190, 242, 298	?	?
30.0	43, 70, 111, **154**, 193, 243, 267	?	? Pro + ?
30.5	70, 91, **154**, 170	?	?

Tableau 7.5.3 Pics dont le spectre de masse comporte m/z = 154

Nous pouvons remarquer que le pic m/z = 70 est souvent associé à la présence de m/z = 154. Une proposition de mécanisme de fragmentation a été proposé par Munson (25) pouvant associer ces deux fragments (Figure 7.5.2).

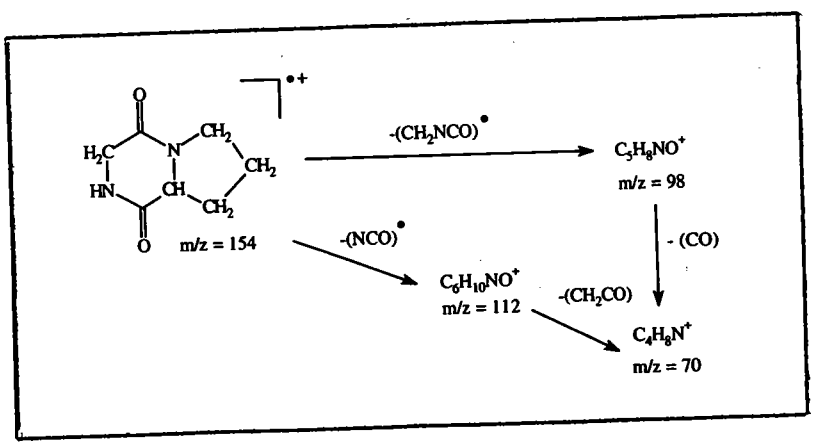


Figure 7.5.2 Structure et mécanismes de fragmentation de m/z 154

Afin de déterminer si ces molécules pouvaient être formées par l'interaction d'une L-proline et d'un autre acide aminé, nous avons effectué des pyrolyses avec des mélanges (mole à mole) d'acides aminés :

- ✓ L-proline - L-méthionine,
- ✓ L-proline - L-cystine,
- ✓ L-proline -L-leucine,

Les acides aminés mis en présence l'un de l'autre peuvent bien former des 2,5-dicétopipérazines disubstituées. Cependant, les spectres enregistrés ne correspondent pas à ceux attendus.

7.5.3.3. *Analyse du sébum de l'individu B*

Le sébum adsorbé sur les cheveux a été extrait dans un bain de méthanol. Ce méthanol a été injecté dans l'injecteur split/splitless employé en mode splitless, et en gardant les autres conditions expérimentales inchangées.

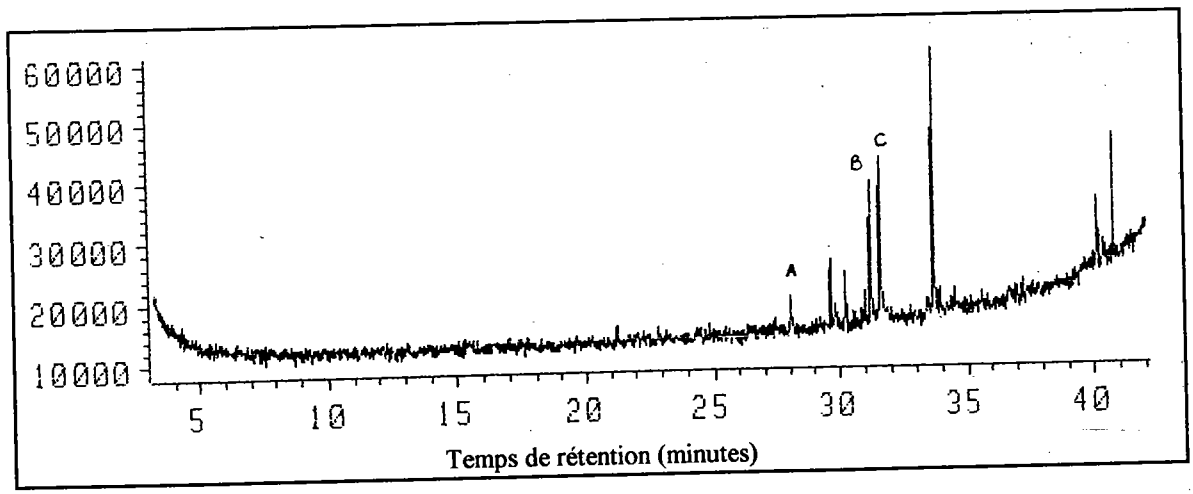


Figure 7.5.3 Chromatogramme GC/MS des molécules extraites

Pic	m/z	Molécule proposée
A (28.1 min)	73, 129, 185, 228	Acide myristique
B (31.3 min)	41, 69, 97, 149, 194, 236	Hexadécénol
C (31.7 min)	73, 129, 213, 256	Acide palmitique

Tableau 7.5.4 Principaux pics du chromatogramme

Nous avons détecté l'acide myristique et l'acide palmitique qui représentent une partie des acides gras contenus dans le sébum (26, 27, 28, 29). Ces deux acides sont présents dans le pyrogramme du cheveu à 31,7 et 32,7 minutes.

7.5.4. Conclusion

La recherche systématique des pyrolysats de chaque acide aminé dans le cheveu a permis de trouver de nombreux pics communs.

Tout d'abord, nous pouvons noter la présence de certaines chaînes latérales :

- ✓ H_2S, CS_2 (cystine),
- ✓ phénol et, méthyl-4, phénol (tyrosine),
- ✓ toluène (phénylalanine),
- ✓ 1H indole et méthyl-3, 1H indole (tryptophane).

Puis les molécules pouvant provenir du mécanisme [16], qui implique un allongement de la chaîne latérale :

- ✓ éthyl-4, phénol, et éthylène-4, phénol, (tyrosine),
- ✓ éthylbenzène et styrène (phénylalanine).

Nous avons aussi identifié des molécules comportant un fragment de liaison peptidique sur la chaîne latérale :

- ✓ benzèneacétonitrile (phénylalanine),
- ✓ isoxazole (cystine, arginine, lysine),
- ✓ 2,5 pyrrolidinedione (acide aspartique),
- ✓ 1H pyrrole (acide glutamique).

La formation de 2,5 dicétopipérazines, substituées et de dicétopyrazines substituées est possible au sein du cheveu. Nous avons trouvé deux représentants :

- ✓ cycloproproline (proline),
- ✓ 2,5 dicétopyrazine, 3-isobutyl (leucine).

La recherche des molécules susceptibles d'être d'autres dicétopipérazines (m/z = 154) a révélé qu'une série de molécules possédaient ce fragment. Il est probable que nous puissions trouver d'autres molécules de recombinaison de deux acides aminés dans cette série.

Cependant, nous sommes actuellement limités pour la détermination des structures de ces molécules avec notre spectromètre à analyseur quadripolaire.

Celui-ci a une sensibilité limitée et ne permet pas de réaliser des spectres de masse MS/MS.

Nous avons pu aussi noter la présence de deux acides gras en relation avec le sébum : l'acide myristique et l'acide palmitique.

Une bonne partie des pics du pyrogramme du cheveu sont maintenant attribués. Certaines zones se sont précisées :

- ✓ Les pics associés aux acides aminés se trouvent majoritairement dans une zone de temps de rétention inférieure à 20 minutes,
- ✓ les pics pouvant être associés à des combinaisons d'acides aminés se situent entre 20 et 30 minutes,
- ✓ certains acides gras contenus dans le sébum se désorbent dans une troisième zone après 20 minutes.

α α α

7.6. *PYROLYSE THERMIQUE CG/FID*

7.6.1. Introduction

Pour réaliser l'étude de discrimination de quelques cheveux, nous avons utilisé le couplage pyrolyse thermique - chromatographie en phase gazeuse - détecteur à ionisation de flamme (FID).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à filtre quadripolaire n'est pas assez sensible pour effectuer une discrimination entre différents cheveux. Les pics chromatographiques ne sortent pas assez du bruit de fond pour pouvoir établir des domaines de variation de leurs aires.

Le détecteur par ionisation de flamme, particulièrement sensible à la présence de molécules carbonées et azotées, est adapté à l'analyse des pyrolysats du cheveu.

Il ne permet évidemment aucune spéciation de molécule, cependant les pics enregistrés sont exaltés et les plus petits d'entre eux se dégagent mieux du bruit de fond. De ce fait, il est possible d'étudier leurs variations avec beaucoup plus de précision.

Les principales molécules du pyrolysat du cheveu ont été identifiées par CG/MS. En faisant correspondre les temps de rétention ou tout au moins l'ordre d'apparition des pics du chromatogramme, il est possible d'établir une correspondance.

L'étude réalisée à l'aide de cette technique se déroule en deux temps :

- ✓ un domaine de variation d'intensité des pics chromatographiques est défini et les pics suffisamment fiables sont sélectionnés pour caractériser chaque cheveu,
- ✓ l'étude de différenciation des cheveux est effectuée, à partir de l'ensemble des pics sélectionnés, pour neuf individus différents.

7.6.2. Présentation des cheveux étudiés par GC/FID

La détermination du domaine de variation et ainsi de l'ensemble des pics chromatographiques susceptibles de permettre une séparation a été faite à

partir des cheveux de type morphologiquement distincts, appartenant aux deux individus AN et SA.

Le premier individu (AN) présente des cheveux non colorés et longs (de 40 cm). L'usure de ses cheveux est donc naturelle et graduelle.

Ces cheveux présentent peu de variations de couleur de la racine à la pointe et les écailles sont peu usées. Le seul traitement cosmétique est l'emploi de démêlants.

Ces cheveux sont susceptibles de montrer l'unique effet du temps, donc, effectivement, l'usure de la surface et l'action du soleil.

Afin, de déterminer si la variation de l'état de surface s'accompagne d'une variation de la composition des pyrogrammes, les morceaux de cheveu ont été pyrolysés selon leur succession chronologique le long de la tige.

Le deuxième individu (SA) présente des cheveux non colorés, mi-longs (20 cm). L'état de surface de ces cheveux présente des usures d'écailles différentes de la racine à la pointe. Ces variations peuvent s'expliquer par :

- ✓ un apport alimentaire en chlrohydrate de cystine et en méthionine a été effectué par l'individu deux mois avant ces analyses,
- ✓ les cheveux n'ont subi aucune agression (permanente, coloration) pendant une année avant ces analyses.
- ✓ les cheveux ont également été pyrolysés selon leur succession chronologique le long de la tige. Les bulbes ne sont pas pris en compte.

Les 8 autres cheveux soumis à l'analyse sont énumérés dans le tableau suivant :

Individu	Type	Couleur	Longueur	Forme	Traitement
CA	femme	châtain clair	40 cm	raide	couleur au henné
ER	homme	châtain	5 cm	ondulée	aucun
FR	homme	châtain	5 cm	raide	aucun
JA	homme	blond	4 cm	raide	aucun
PI	homme	châtain	5 cm	ondulé	aucun
PA	homme	châtain clair	6 cm	frisé	aucun
TI	femme	châtain	6 cm	frisé	permanente
GA	homme	châtain	5 cm	raide	aucun

7.6.3. Résultats préliminaires

Les tronçons de cheveux des individus AN et SA sont pyrolysés de la même façon, après avoir été lavés (procédure décrite § 7.3), pesés et préparés dans les mêmes conditions.

7.6.3.1. Pyrogrammes enregistrés pour les individus AN et SA

Avec le détecteur FID, nous obtenons une sensibilité accrue, en particulier pour les composés peu volatils du mélange. Les cheveux de ces deux individus présentent des chromatogrammes différents.

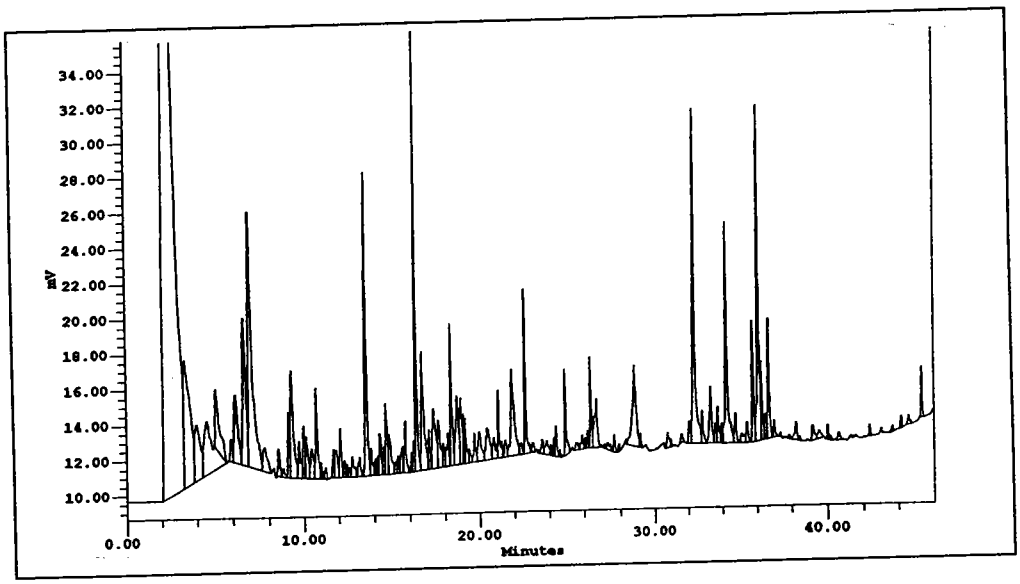


Figure 7.6.1 Pyrogramme FID du cheveu AN

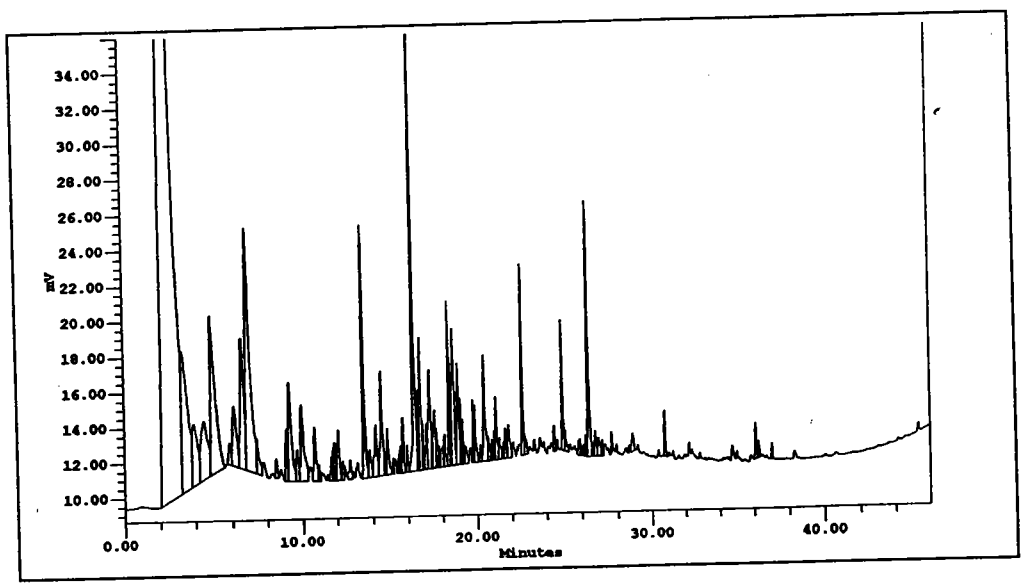


Figure 7.6.2 Pyrogramme FID du cheveu SA

Nous pouvons déjà établir par l'examen des pyrogrammes que ces deux individus ont des cheveux différents.

La première distinction entre les pyrogrammes de SA et de AN se fait au niveau des pics de temps de rétention situés après 30 minutes. L'analyse du cheveu de référence B par pyrolyse GC/MS, a montré que cette zone pouvait correspondre aux molécules de recombinaison entre deux acides aminés, mais aussi aux acides gras.

Cette différence entre les deux individus pourrait provenir d'éléments exogènes, probablement du sébum. La surface abîmée du cheveu de l'individu SA pourrait être un facteur favorable à l'absorption de ces corps gras. Cette absorption serait plus limitée pour l'individu AN, ses cheveux ayant une surface plus nette.

D'autres variations de pics apparaissent à des temps de rétention inférieurs à 30 minutes.

Afin de vérifier, si ces différences sont reproductibles et définir les variations d'intensité de ces pics, six pyrolyses successives ont été appliquées aux cheveux de AN et de SA.

7.6.3.2. Détermination des pics caractéristiques

La pyrolyse thermique a été appliquée à six tronçons de cheveu des deux individus AN et SA.

L'intégration des aires sous pics issus des chromatogrammes des six pyrolyses de cheveux des deux individus, a permi d'établir les intensités des pics et de leur attribuer un domaine de variation.

Les pics dont les aires ont un domaine de variation réduit ont été extraits et sont considérés comme les pics représentatifs des cheveux des deux individus AN et SA (figures 7.6.3 et 7.6.4).

Après cette sélection, seuls les pics caractéristiques de AN et de SA ont été examinés. La comparaison de ces pics a permis de sélectionner :

- ✓ les pics particuliers à chaque individu,
- ✓ les pics communs d'intensités différentes, dont les domaines de variation ne se chevauchent pas.

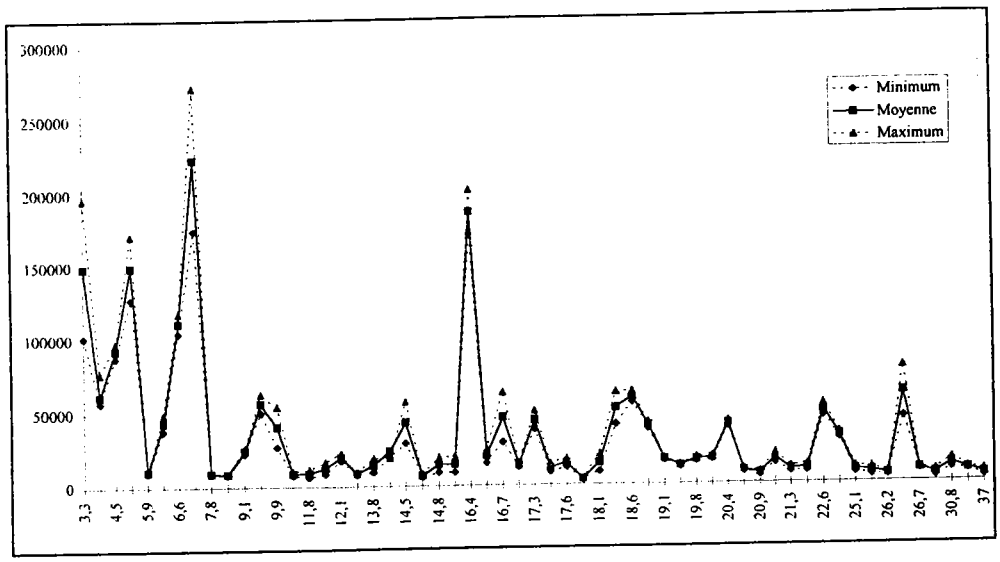


Figure 7.6.3 *Représentation schématique des pics caractéristiques de AN*

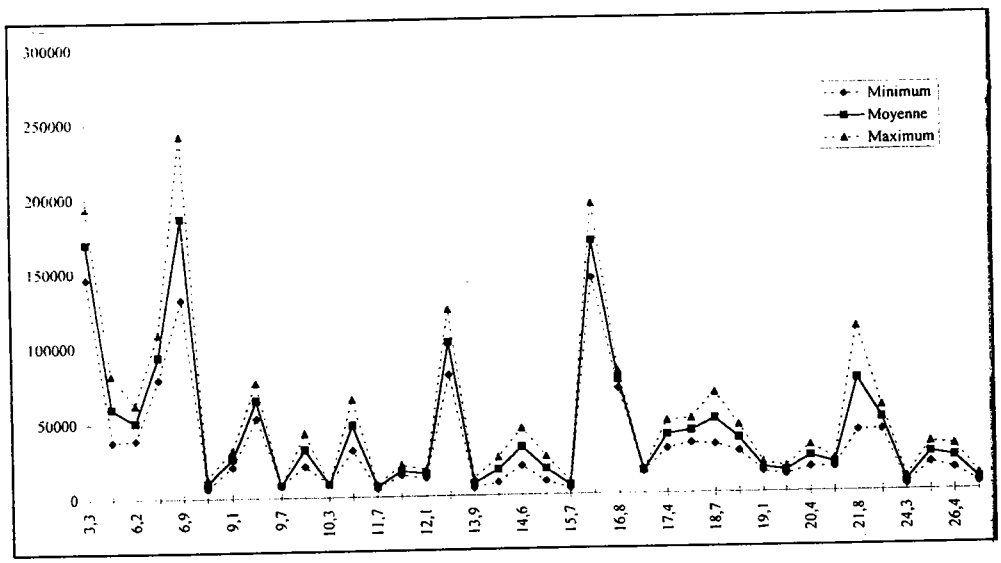


Figure 7.6.4 *Représentation schématique des pics caractéristiques de SA*

Les pics résultant de ce tri permettent de discriminer avec sûreté les deux individus AN et SA. Les pics permettant la discrimination des deux individus se situent sur l'ensemble des zones de temps de rétention.

Nous avons montré que notre démarche donne des résultats probant à partir de deux individus choisis au hasard.

7.6.3.3. Différenciation des 10 individus à partir des pics sélectionnés

Afin de déterminer si l'analyse par pyrolyse CG/FID permet de différencier plus de deux individus, nous avons appliqué la méthode à huit autres individus.

Les cheveux de ces huit individus ont été préparés et analysés dans les mêmes conditions que les cheveux de AN et de SA.

L'intégration des aires des pics issus des chromatogrammes et la recherche des domaines de variation permettent d'identifier les pics représentatifs de chaque individu et de comparer les intensités des pics communs. Les pics sélectionnés sont représentés sous forme d'histogramme sur la figure 7.6.5.

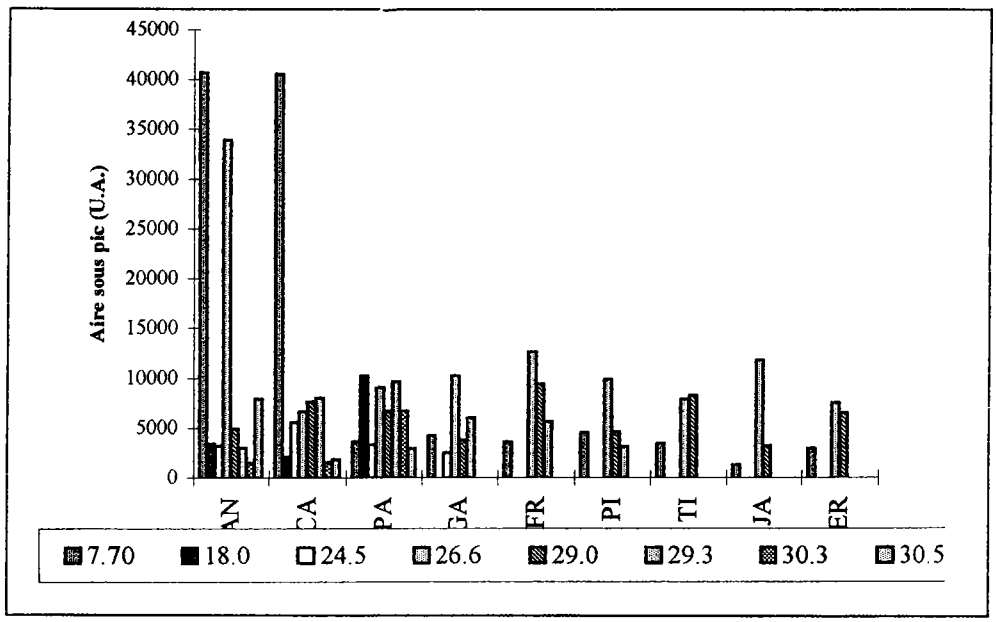


Figure 7.6.5 *Représentation schématique des pics sélectionnés.*

La base des huit pics déterminée à partir des pics caractéristiques de AN, permet distinguer certains cheveux de l'ensemble.

Un pic à lui seul n'est pas suffisant pour faire une distinction correcte. Par contre, l'ensemble des huit pics semble efficace pour séparer les différents types de cheveux.

Trois individus AN, CA et PA présentent l'ensemble des huit pics. Leurs intensités sont suffisamment différentes pour distinguer ces trois types de cheveux.

GA est le seul à avoir 5 pics de l'ensemble.

FR et PI présentent les 4 mêmes pics avec des intensités très proches. Les variations d'intensité étant identiques, nous ne pouvons différencier ces deux individus.

Le même problème se pose pour JA, ER et TI. Ces individus ont uniquement trois pics de l'ensemble de base, dont les variations d'intensité sont suffisamment restreintes pour empêcher toutes conclusions.

Un moyen simple pour différencier JA des deux autres individus est l'examen morphologique. En tenant compte de la couleur des cheveux, ces cheveux étant blond alors que ceux des individus ER et TI sont châtains, JA se démarque aisément du groupe.

ER et TI seront beaucoup plus difficiles à distinguer car ils présentent également beaucoup de correspondances morphologiques.

Dans ce cas, il convient soit de chercher des pics caractéristiques des individus du groupe, soit d'ajouter d'autres pics à la base de départ et d'effectuer la même procédure une nouvelle fois.

L'examen des pyrogrammes indiquait la présence de trois pics dans la zone propre aux acides gras. Malgré l'incertitude sur l'origine de ces pics, nous les avons ajoutés à la base de données. Ainsi, nous avons affiné les séparations (figure 7.6.6).

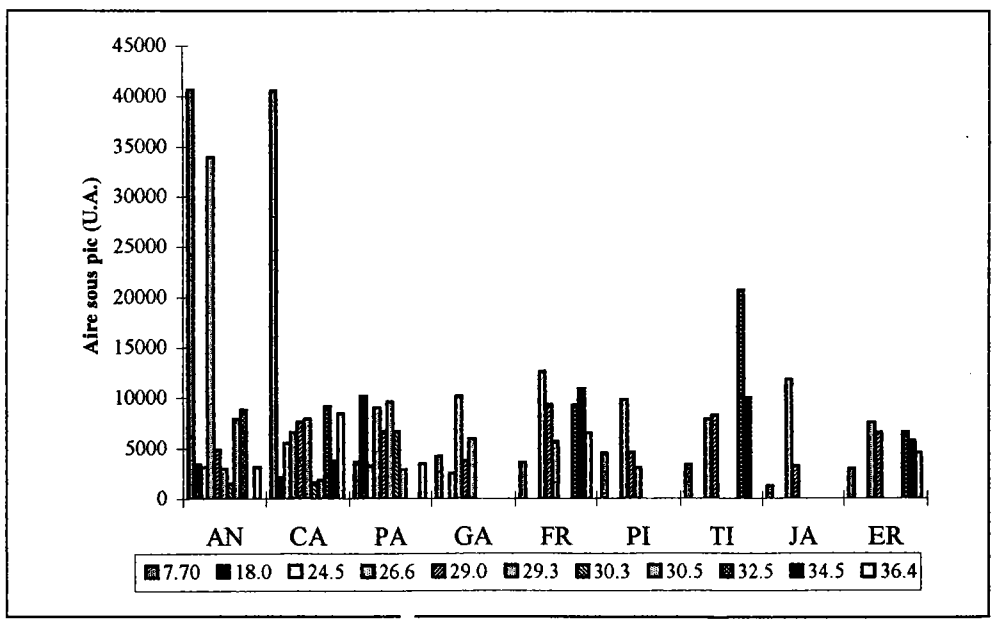


Figure 7.6.6 *Représentation schématique des pics avec la deuxième base de données.*

Les individus FR et PI, ainsi que JA, ER et TI ont des histogrammes assez différents pour pouvoir être séparés.

7.6.4. Conclusion

Un échantillonnage minutieux (nettoyage, découpage et surtout pesée effectuée par microbalance) a permis de sélectionner des pics chromatographiques, qui présentent de faibles taux de variation et qui sont caractéristiques de chaque individu.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'il était possible à partir des pics chromatographiques caractéristiques de deux individus d'effectuer une distinction. Le nombre de pics était de 38 pour l'individu SA et de 59 pour l'individu AN.

Dans un second temps, avec une deuxième série d'analyses, nous avons essayé d'établir la validité de la procédure avec plusieurs individus et un nombre réduit de pics.

En ne prenant en compte que huit pics choisis parmi les pics caractéristiques de AN, nous avons pu classer les neuf individus en quatre groupes.

Chaque groupe est défini par des combinaisons différentes de pics. Puis dans chaque groupe, les cheveux ont été séparés en fonction des intensités de ces pics.

Pour différencier les individus semblables au sein d'un même groupe, il convient de reprendre la procédure avec une base de pics communs à l'ensemble.

Cette étude de séparation de cheveux par pyrolyse GC/FID montre qu'il est possible de distinguer des cheveux parmi un nombre limité.

7.7. PYROLYSE CG/FID D'ACIDES AMINES

Dans ce chapitre, nous avons essayé d'établir une correspondance entre les acides aminés et les pyrolysats des cheveux de l'individu AN. Nous les avons analysé par pyrolyse GC/FID.

Un problème s'est posé au niveau du flux d'hélium du GC/FID, qui n'est pas resté constant lors des deux séries d'analyse.

Ainsi, nous avons pyrolyser par GC/FID :

- ✓ le cheveu de l'individu AN,
- ✓ le cheveu B (référence),
- ✓ les acides aminés.

Une correspondance des pyrogrammes du cheveu AN enregistré lors des deux séries d'analyse a été faite. Puis la correspondance a été établie avec le cheveu B et les pyrogrammes des acides aminés.

Dans un troisième temps, la correspondance a été faite entre les pics chromatographiques GC/FID du cheveu B et des acides aminés, permettant de retrouver les correspondances établies en Py GC/MS.

7.7.1. Conditions expérimentales

Cette série de pyrolyses a été menée dans les mêmes conditions que pour les cheveux précédents. Deux paramètres sont légèrement différents :

- ✓ la masse de produit pyrolysée : de 70 à 90 µg,
- ✓ la programmation du four : 40 °C pendant 2 min., puis jusqu'à 280°C avec une montée en température de 6°C/min.

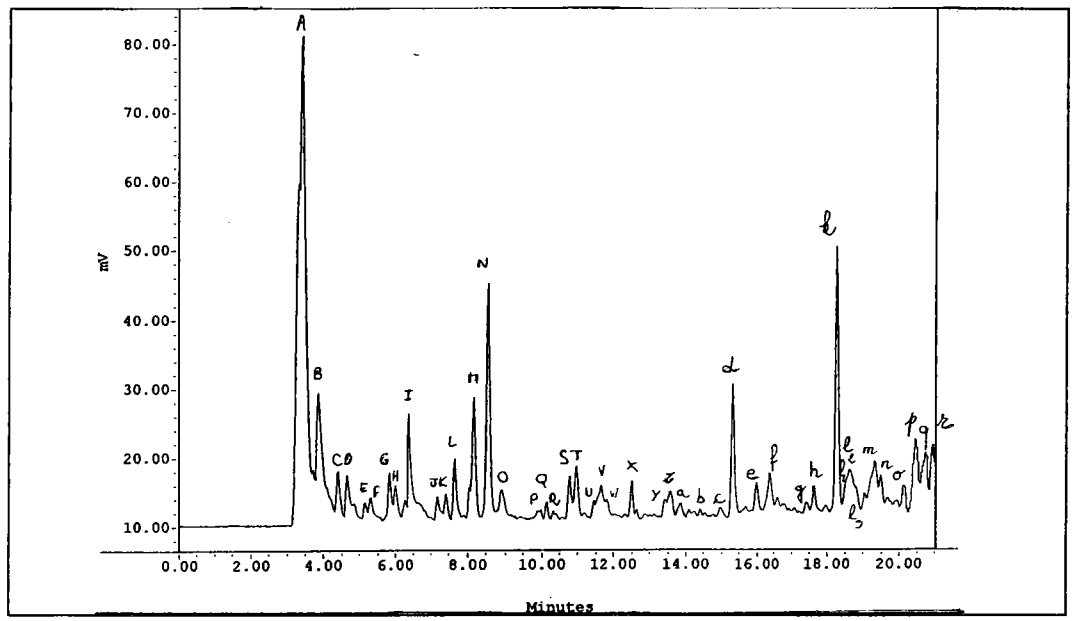
7.7.2. Résultats obtenus pour le cheveu

Nous avons indexé les pics du pyrogramme GC/FID du cheveu B, notre cheveu référence.

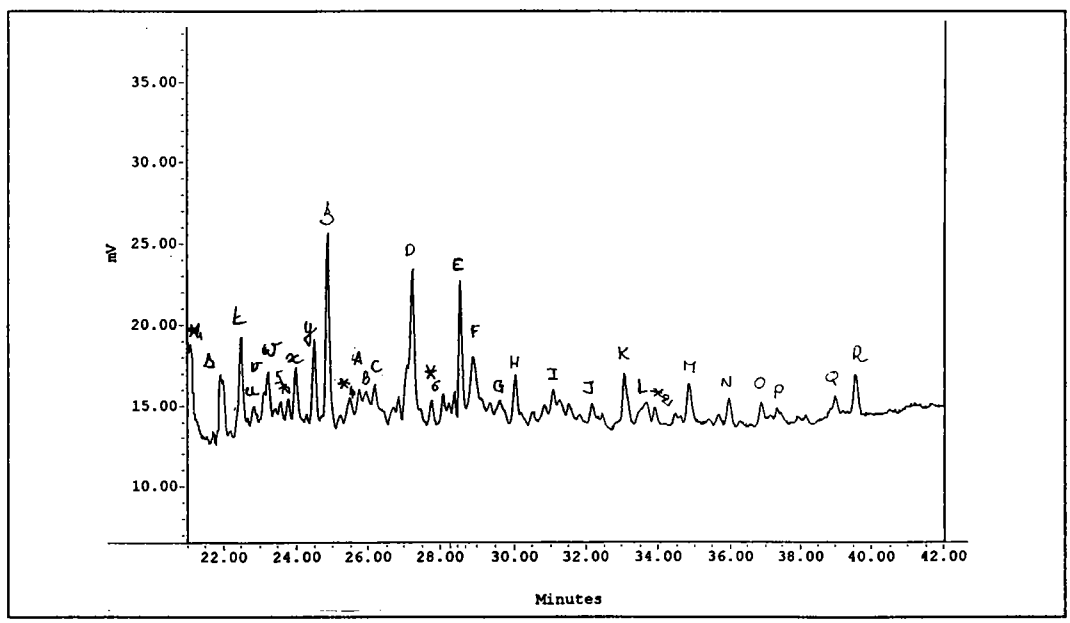
La correspondance des pyrolysats des acides aminés a déjà été établie par GC/MS. Nous avons effectué le même repérage avec les pics des pyrogrammes GC/FID.

Les chromatogrammes FID, ainsi que les tableaux de correspondance entre les temps de rétention des pics GC/MS et GC/FID des pyrolysats des acides aminés sont présentés sur les planches annexes 42 à 44.

Sur le pyrogramme GC/FID (figure 7.7.1), sont notés l'ensemble des pics de chaque acide aminé.



Agrandissement de la zone de temps de rétention de 0 à 21 minutes



Agrandissement de la zone de temps de rétention de 21 à 42 minutes

Figure 7.7.1 *Pyrogramme GC/FID du cheveu B*

Nous obtenons ainsi un pyrogramme comparable à celui de la pyrolyse GC/MS. Nous pouvons rechercher la nature des pics utilisés pour la séparation des neuf cheveux.

7.7.3. Comparaisons avec les résultats obtenus pour les acides aminés

Les correspondances entre les acides aminés et le cheveu B sont résumées dans le tableau 7.7.1.

	Pics de temps de rétention communs	
	de la zone 0 à 21 min.	de la zone 21 à 42 min.
Gly	A, B, D, M, O, S, V, a, l_2, p, r	*[1], s, x, E, F, I, *[2], N, P, Q
Leu	/	/
Phé	N, X m, p	?
Tyr	A, B, X, d, h, k, p, r	t, A, F, O, Q
Arg	A, B, C, I, M, f, l_2	s
His	/	/
Lys	A, B, I, O, R, Z	X, K
Asp	A, J, S, U, f, l_2, p	
Glu	A, B, M, S, X, Y, f, l_1, l_2, m, p, q	u, w, x, z, *[4], F, N, P
Thr	/	/
Ser	A, C, F, H, L, M, O, P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, e, k, p, q	
Mét	A, A', B', K, Q, W, c, g, o	
Cys	A, A', B', C, P, Q, V, a	
Try		z, D, G, *[5]
Pro	A, B, I, M, N, P, S, X, g	K, O, R

Tableau 7.7.1 Pics de temps de rétention identiques

Les pics du cheveu B ont été associés à des pics présents dans les pyrogrammes d'acides aminés. A présent, nous pouvons associer les pics chromatographiques aux spectres de masse des pics obtenus par GC/MS.

7.7.4. Correspondance entre les pics obtenus par GC/FID et GC/MS

La correspondance entre les pics a été établie selon la méthode :

- ✓ les pics majoritaires de chaque pyrogramme ont permis d'établir les premières corrélations,
- ✓ ces premières corrélations ont permis de découper le pyrogramme GC/FID du cheveu en zones de temps de rétention étalonnées,
- ✓ la correspondance entre les temps de rétention de la Py GC/FID et de la Py GC/MS des acides aminés a été faite en établissant des abaques,
- ✓ nous avons rassemblé les acides aminés dont les pics ont des temps de rétention susceptibles de correspondre à ceux du cheveu AN.

Cette démarche est longue et comporte beaucoup d'étapes de correspondance. Nous sommes conscients que des erreurs soient possibles liées notament à des superpositions de pics chromatographiques. Cependant, il était important d'établir les grandes lignes de correspondances pour définir les différentes classes de cheveux (annexes 42 à 44).

Nous avons établi une courbe moyenne de correspondance entre les temps de rétention des pyrolyses GC/FID et GC/MS à partir de 128 points de comparaisons, pour vérifier la validité de la procédure (figure 7.7.2).

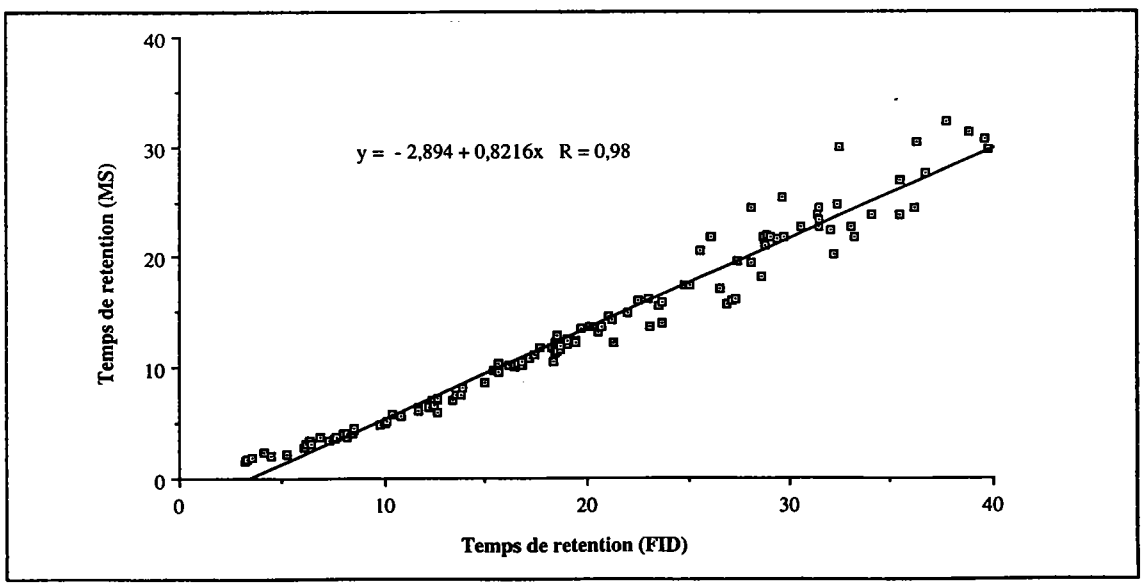


Figure 7.7.2 Courbe moyenne de correspondances des temps de rétention entre Py GC/MS et Py GC/FID

7.7.5. Association des pics discriminants avec les acides aminés

Nous avons repéré les huit pics (de la première base de données) caractéristiques de AN dans le pyrogramme de l'individu B. La recherche de ses temps de rétention dans les pyrogrammes de B et des différents acides aminés a permis d'associer chacun des huit pics à un acide aminé (tableau 7.7.2).

Temps de rétention (AN)	Temps de rétention (B)	Acides aminés associés	Nature de la molécule
7.7 min.	9.5 min.	Cys (4.9) Glu (5.0) Pro (5.8)	α lactame, CS 1H Pyrrole
17.9 min.	m ou n	Gly (m) Phé (m) Ser (m) Glu (m) Gly (n) Arg (n)	Dicétopipérazine Phénol, 4-éthanamine AA- H_2O Dicétopipérazine
24.5 min.	*4 (25.4 min.)	Gly (17.9) Glu (17.9)	
26.6 min.	D (27.2 min.)	Gly (20.5) Try	Indole, 3-méthyle
29.0 min.	E (28.7 min.)	Gly (21.8)	
29.3 min.	F (29.0 min.)	Gly (22.1) Tyr Glu (21.8)	
30.3 min.	G (29.7 min.)	Gly (22.8) Try ()	Indole, 3 éthylène
30.5 min.	H (30.0 min.)	Gly (23.2) Phé (22.0)	Diphényl 1,1' éthane

Tableau 7.7.2 Association des pics discriminants avec ceux des acides aminés

7.7.6. Conclusion

La recherche des origines des pics caractéristiques de l'individu B est délicate avec l'appareillage que nous possédons.

Les détecteurs FID et filtre quadripolaire ne sont pas installés sur le même four de chromatographie en phase gazeuse. De ce fait, les pics obtenus par FID ne peuvent pas, avec certitude, être identifiés par spectrométrie de masse étant donné les dérives observées.

L'installation des deux détecteurs sur le même four de chromatographie serait nécessaire pour améliorer ce genre d'investigation.

La sensibilité atteinte par le détecteur à ionisation de flamme est plus élevée que celle de notre spectromètre de masse. Son utilisation est donc nécessaire dans notre cas. Cependant, un spectromètre de masse de type trappe à ions (ion trap) devrait permettre d'atteindre une sensibilité équivalente de celle du détecteur FID. Il pourrait permettre d'enregistrer des spectres de masse à partir de petites quantités de cheveux pyrolysés.

La possibilité de ce détecteur d'enregistrer des spectres de masse MS/MS, permettrait de lever les nombreuses indéterminations de structure de nombreux pyrolysats rencontrées lors de la pyrolyse du cheveu, des polypeptides et des acides aminés.

α α α

7.8. PYROLYSE LASER GC/MS D'UN CHEVEU

La réalisation de l'enceinte laser avait pour finalité de permettre la pyrolyse laser CG/MS d'un cheveu. Nous avons montré dans le chapitre V, la faisabilité de l'expérience avec des molécules relativement simples comme les acides organiques et les acides aminés.

Nous avons pu noter que des aménagements techniques étaient à apporter au montage. Néanmoins, il nous a paru intéressant de tester la pyrolyse laser GC/MS de cheveux.

Le pyrogramme que nous obtenons doit être amélioré, mais ces premiers essais, nous ont permis de dégager quelques enseignements.

7.8.1. Paramètres instrumentaux

L'échantillon est dans ce cas une pastille de poudre de cheveux. La pastille est fabriquée suivant la méthode du chapitre V. La poudre est assez fine pour former une pastille compacte et non friable.

Pour l'irradiation laser, nous avons gardé la longueur d'onde de 266 nm. L'irradiation est réalisée à travers une lentille de focalisation, afin de réduire le point d'impact sur l'échantillon (diamètre de 2 mm) et d'augmenter l'irradiance ($I = 2.10^8$ W/ cm^2).

Les paramètres instrumentaux sont résumés dans le tableau 7.8.1.

Paramètres	Choix
Temps d'irradiation Fréquence Irradiance déposée	50 secondes 10 Hz 2.10^8 W/cm^2
Injecteur On column cryogénique	0°C pendant 4 min., montée en température jusqu'à 300°C
Colonne HP1	identique à celle du chapitre V
Programmation du four	0°C pendant 4 min., 10°C/min. jusqu'à 300°C
Température d'interface GC/MS	300°C
Température de la source MS	240°C
Mode d'ionisation	Impact électronique 70 eV
Domaine de masse	m/z = 33 à 250

Tableau 7.8.1 Paramètres instrumentaux

7.8.2. Pyrogramme de la pastille de cheveux

Le pyrogramme obtenu par pyrolyse laser GC/MS de la pastille de cheveux correspond à une irradiation de la pastille pendant 50 secondes à une fréquence de 10 Hz (figure 7.8.1).

La matière désorbée est largement suffisante pour pouvoir être détectée. Il sera possible de réduire le temps d'irradiation de l'échantillon dans l'avenir.

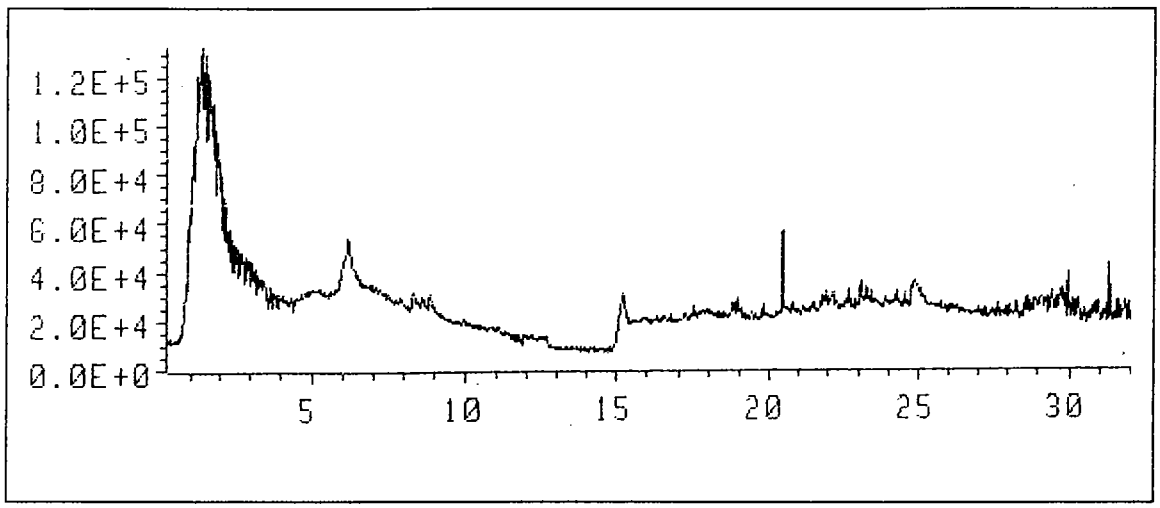


Figure 7.8.1 Pyrogramme laser GC/MS de cheveux

L'examen du chromatogramme indique que pour les temps de rétention :

- ✓ compris entre 0 et 5 minutes, il y a formation continue de molécules volatiles à O°C (H_2S, CO_2),
- ✓ compris entre 5 et 10 minutes, la montée en température de l'injecteur de 0°C à 300°C induit une vaporisation constante des pyrolysats adsorbés dans l'injecteur on-column réfrigéré,
- ✓ supérieurs à 15 minutes, les molécules se désorbent de la phase de la colonne pour des températures supérieures à 100°C.

Des modifications importantes sont à apporter au système de concentration et d'injection des pyrolysats.

La montée en température de l'injecteur doit se faire moins rapidement et peut être ajustée en parallèle à la montée en température du four.

Malgré les problèmes liés à la désorption et au mauvais rapport signal/bruit, nous avons néanmoins trouvé quelques composés déjà rencontrés lors de la pyrolyse thermique du cheveu.

Ainsi, la recherche des masses comprises entre m/z = 153 et 155 permet de redessiner le chromatogramme de départ pour donner le chromatogramme suivant (figure 7.8.2).

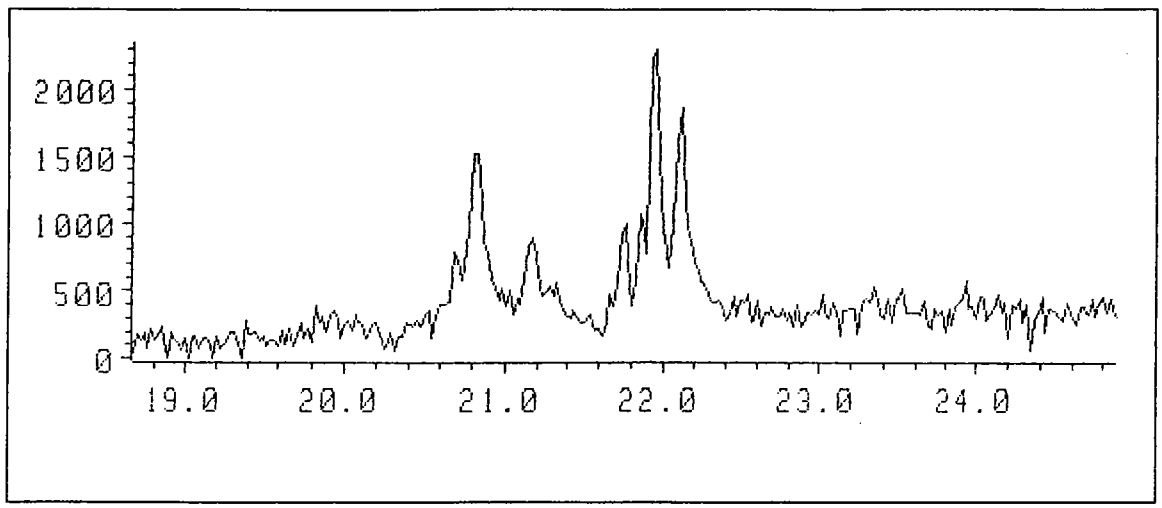


Figure 7.8.2 Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 153 à 155

Ce pyrogramme reconstitué à partir de la masse m/z = 154 montre un massif de pics émergeant du bruit de fond. Ces pics correspondent à la série de pics également enregistrée lors de la pyrolyse thermique GC/MS du cheveu B (annexe 41).

En procédant de la même manière pour toutes les masses, nous avons pu extraire les spectres de masses présentés en annexes de 45 à 47 et trouver les molécules présentées dans le tableau 7.8.2 suivant.

Les molécules communes à celles trouvées pour le cheveu lors de la pyrolyse thermique (annexes 39 à 41) sont notées avec leur nom et leur temps de rétention.

masses cherchées	Temps de rétention	Molécules possibles
33 à 39	6,18 min.	H_2S,
		CO_2,
		CSO,
		Benzène méthyl
70 à 80	1.4 min.	CS_2
90 à 100	6.2 min.	Toluène
	8.3 min.	Phénol, 4-éthylène
	17.2 min.	K (22.2 min., PyGC/MS)*
100 à 120	8.9 min.	Styrène
120 à 150	24.9 min.	L (34.9 min., PyGC/MS)*
153 à 155	20.8 min.	C (28.6 min., PyGC/MS)*
	21.9 min.	Cycloproproline
	22.0 min.	I (30.4 min., PyGC/MS)*

** : pics des pyrogrammes en annexes 39 à 41*

Tableau 7.8.1 Molécules communes à la pyrolyse thermique et à la pyrolyse laser du cheveu de référence B

7.8.3. Conclusion

Nous avons montré que la pyrolyse laser GC/MS d'une poudre de cheveux est possible. Cependant, l'instrumentation, notamment au niveau de l'injecteur on-column cryogénique, et le protocole doivent être améliorés.

Néanmoins, un certain nombre de molécules communes à la pyrolyse thermique et à la pyrolyse laser a été repéré.

Cette première expérience montre que nous pouvons espérer analyser des polymères complexes comme le cheveu avec l'enceinte d'ablation laser que nous avons conçue.

Celle-ci reliée à un injecteur cryogénique plus performant et un ensemble GC/MS/MS (type trappe à ions) devrait conduire à des résultats parfaitement interprétables et ceci sur de très petites quantités de cheveux ou de fibres polymériques, ce qui est l'objectif recherché.

7.9. CONCLUSION

L'identification des pyrolysats du cheveu a été faite par l'intermédiaire des pyrolysats d'acides aminés, de polypeptides et d'acides gras extraits de la fibre.

Nous avons pu établir des correspondances entre les mécanismes de pyrolyse du cheveu et des acides aminés. La dégradation du cheveu comporte quatre mécanismes identifiés :

- ✓ la libération par coupure radicalaire des chaînes latérales ; les radicaux libres étant susceptibles de se dimériser,
- ✓ la rupture de la liaison peptidique pouvant être initiée par la coupure des liaisons amides,
- ✓ la libération d'amines, susceptibles de former un hétérocycle,
- ✓ la formation de cycles à 6 (cycloproproline et 2,5 dicétopyrazine, 3-isobutyl) et de cycles à 5 (imidazole) à partir de deux acides aminés.

Nous avons également noté la présence systématique de deux acides gras dans le pyrogramme de cheveux lavés : l'acide myristique et l'acide palmitique.

En prenant des précautions lors de l'échantillonnage (nettoyage, découpage et surtout pesée effectuée par microbalance), nous avons éliminé les effets des pollutions exogènes, sources de nombreuses erreurs et de variations notables au niveau des pyrogrammes.

En sélectionnant les pics dont les aires varient peu, nous avons pu établir trois groupes de cheveux. L'un d'entre eux correspond à quatre individus que l'on peut discriminer.

Au sein des deux autres groupes de cheveux, il est nécessaire, pour les distinguer au niveau de chacun de ces groupes de faire appel soit à une analyse plus appronfondie des pyrogrammes GC/MS, soit à des études morphologiques, soit encore par des analyses par microsonde LAMMA (LAser Microprobe Mass Analysis).

Enfin, le couplage de l'enceinte d'ablation laser avec la GC/MS a montré qu'il était possible d'enregistrer des pyrogrammes interprétables. Certes, pour parvenir à des réponses d'aussi bonne quantité que celles de la GC/FID, il convient d'améliorer l'injecteur cryogénique (On-column) et d'utiliser comme détecteur une trappe à ions de deuxième génération dotée des logiciels d'analyse MS/MS.

7.10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. J.L. Bonafé, A. Dupré, *Précis de Physiologie Cutanée*, Edition de la Porte Verte, Paris, (1980).
2. D. Saint Léger, La glande sébacée, *Encycl. Méd. Chir.*, Paris, Dermatologie, 1985,12223 A10, **10**.
3. R.E. Kellum, *Arch. Dermatol.*, 1958, **95**, 218-220.
4. C.R. Robbins, *Chemical and Physical Behaviour of Human Hair*, 2nd ed., Springer Verlag, New York, 39-68, (1988).
5 C.R. Robbins, C.H. Kelly, *Textile Res. J.*, 1969, **59**, 62.
6 W.H. Ward, H.P. Lundfren, *Advances in Protein Chemistry*, Vol. **9**, Academic Press, New York, (1955).
7 R.C. Clay, K. Cook, J.I.J. Routh, *Am. Chem. Soc.*, **62**, 2709, (1940).
8 J.H. Bradbury, *Nature*, 1966, **210**, 1333.
9 J. Lang, C. Lucas, *Biochem. J.*, 1945, **52**, 84.
10 C. Zviak, *Science des traitements capillaires*, Masson, 40, (1987).
11 M. Spei, R. Holzem, *Colloid and Polymer Science*, 1989, **267**, 648-650.
12 F. Sanger, *Biochem. J.*, 1945, **39**, 507.
13 M.F. Kerr, C. Godin, *Can. J. Chem.*, 1959, **37**, 11.
14 J.B. Speakman, *Meilland Textile Ber.*, 1952, **33**, 823.
15 R. Hahnel, *Arcj. Klin. U. Exp. Dermatol.*, 1959, **209**, 97.
16 C. Niu, H.J. Freankel-Conrad, *Am. Chem. Soc.*, 1955, 11, 5882.
17 H. Moore, *Anal. Chem.*, 1958, **30**, 1185.
18 M. Hincky, *Encyl. Méd. Chir.*, Paris, Dermatologie, 1981, **12855 A10**, 2-1981.
19 M. Saitoh, M. Uzuka, M. Sakamoto, T. Kobori, *Advances in Biology of skin .V. IX. Hair Growth.*, W. Montagna, R.L. Dobson Eds, Pergamon Press, New-York, (1967), 183-202.
20 W.Montagna, *Biology and desease of the hair, growth and development of hair in man*, Univ. Park. Press, Ed. Baltimore, (1976), 31
21 A. Boutelier, *Anatomie de la chevelure et du cuir chevelu, et physiologie de l'appareil pilo sébacé. Affection de la chevelure et du cuir chevelu*, Masson Edit., Paris, (1953), 43-104.
22 J. Leboulanger, *Les vitamines*, Hoffmann, La Roche Edit., Paris, (1975).
23 R.A. Jacob, H.H. Stanstead, N.W. Solomons, C. Rieger, R. Rothberg, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1978, **31**, 638-644.
24 S. Comaish, *Brit. J. Derm.*, 1971, **84**, 83-86.

25 T.O. Munson, D.D. Fetterolf, *J. Anal. Applied Pyrolysis*, 1987, 11, 15-24.

26 H.J.O'Neill, L.L. Gershbein, *J. of Chromatographic Science*, 1976, **14**, 28-36.

27 F.B. Shorland, *Comparative Biochemistry : a Comparative Teatise*, vol. 3, 74-80, Ed. M. Florkins, H.S. Mason, Academic Press, New York-London, (1962).

28 P.W. Wertz, D.T. Downing, *Lipids*, vol. 23, 9, (1988).

29 N. Goetz, G. Kaba, D. Good. G. Hussler, P. Bore, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 39, 1-13, 1988.

Conclusion

A l'issue de ce travail, nous avons atteint l'objectif principal que nous nous étions fixé : améliorer la compréhension des mécanismes de la pyrolyse qu'elle soit thermique ou induite par laser. Ceci nous a permis notamment de montrer que la pyrolyse GC/MS est un outil adapté pour la caractérisation et la discrimination des cheveux.

En effet, dans ce cadre, plusieurs résultats significatifs ont été enregistrés. En premier lieu, la distribution en monomères de deux copolymères acryliques de synthèse a été obtenue. Ce travail préparatoire, nous a permis de définir avec précision l'influence des différents paramètres de la pyrolyse flash GC/MS.

Afin de comprendre l'origine des différents pics des pyrogrammes de cheveux, nous avons étudié la pyrolyse des acides aminés constitutifs de la kératine ainsi que celle de quelques peptides modèles. Les principaux mécanismes de ces pyrolyses ont été dégagés avec notamment : la décarboxylation, la formation d'amine et d'α lactames, la rupture radicalaire des chaînes latérales dont plus particulièrement celles comportant un motif aromatique ou hétéroaromatique. D'autres mécanismes plus complexes ont été identifiés mais ils ne concernent, en général, qu'une très faible part de la matière volatilisée.

La discrimination de quelques cheveux a été réalisée à l'aide de la pyrolyse flash GC associé à un détecteur à ionisation de flamme plus sensible que le filtre quadripolaire. Il est possible de caractériser chaque individu avec l'ensemble des pics dont les intensités varient peu d'un pyrogramme à l'autre. Nous avons montré que la discrimination de deux individus est aisée. La séparation d'un plus grand nombre d'individus avec un minimum de pics peut être plus délicate à établir.

Compte tenu de la nécessité de travailler dans des conditions expérimentales parfaitement reproductibles, il apparaît que les critères de distinction ainsi définis doivent s'ajouter à d'autres tels que l'aspect morphologique, l'empreinte spectrale en microsonde laser LAMMA, etc...

Nous avons également atteint le second objectif que nous nous étions fixé : associer l'ablation/pyrolyse laser à la chromatographie en phase gazeuse, dans l'optique de réaliser une pyrolyse d'échantillons de tailles réduites et de déposer sur la surface une énergie qui soit indépendante de sa capacité calorifique. Pour cela, nous avons conçu un montage comportant une enceinte d'ablation laser, compatible avec les paramètres de la chromatographie en phase gazeuse équipée d'un piège cryogénique.

Ce montage a été utilisé pour caractériser les molécules neutres et volatiles produites par l'ablation/pyrolyse laser. Celle-ci se caractérise par deux phénomènes prépondérants : la décarboxylation et la vaporisation de la molécule intacte. Ainsi, les acides organiques utilisés comme matrice en désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) se décarboxylent plus ou moins bien selon leur structure. Il s'avère que ce sont les matrices qui produisent le plus de dioxyde de carbone qui sont reconnues comme les meilleures matrices. En réalité, l'éjection de CO_2 induit la formation d'un microjet supersonique stabilisant les ions formés par protonation ou par cationisation.

L'ablation/pyrolyse laser appliquée aux acides aminés montre que seules les molécules absorbant les photons du faisceau laser à la longueur d'onde choisie réagissent. L'irradiation laser accentue certains mécanismes rencontrés lors de leur pyrolyse thermique. Ainsi, la cystine produit exclusivement des a lactames, tandis que les acides aminés à chaîne latérale avec un noyau aromatique (Tyr, Phé et Try) se décarboxylent préférentiellement.

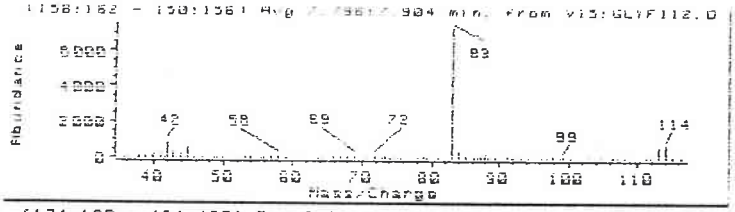
La pyrolyse laser appliquée sur des cheveux réduits en poudre montre la production de petites molécules soufrées volatiles (disulfure de carbone, sulfoxyde de carbone et sulfure d'hydrogène). Cette information permettra peut être d'expliquer la formation de certains agrégats ionisés des spectres de masse obtenus par microsonde laser à temps de vol (LAMMA). De plus, nous avons montré qu'un certain nombre de composés identifiés par pyrolyse flash GC/MS étaient également présents dans le pyrogramme laser du cheveu.

L'ensemble de ce travail montre que la pyrolyse GC/MS est un outil analytique adapté pour la caractérisation des polymères offrant des indications structurales complémentaires à celles des autres techniques en particulier toutes les analyses par ionisation directe (laser, SIMS, etc...) en spectrométrie de masse. Elle permet d'obtenir des informations sur les mécanismes de pyrolyse tant thermique que laser à partir des molécules neutres volatiles formées.

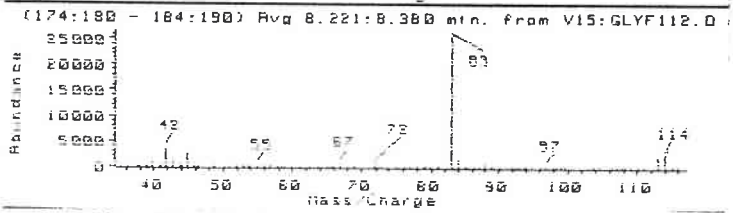
Après quelques modifications du montage, nous devrions pouvoir appliquer la pyrolyse ablation laser à de très petites quantités d'échantillons comme par exemple, des fibres de polymères synthétiques et naturels.

Annexes

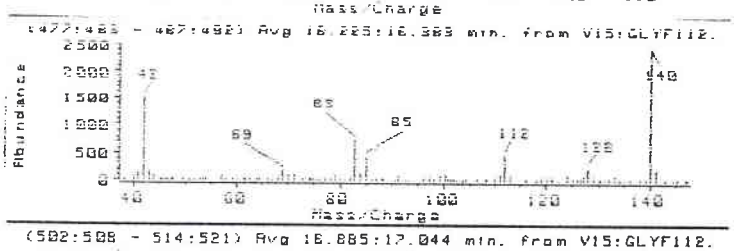
A


Abundance
Mass/Charge
83
42
56
69
72
99
114

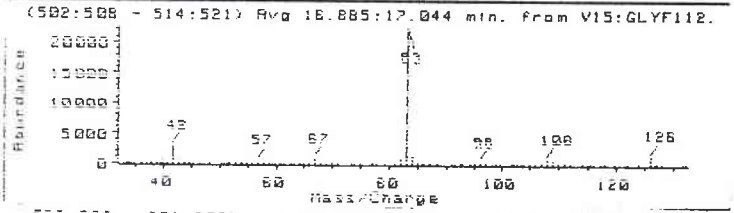
A'


(174:180 - 184:190) Avg 8.221:8.380 min. from V15:GLYF112.D
Abundance
Mass/Charge
83
42
55
57
72
97
114

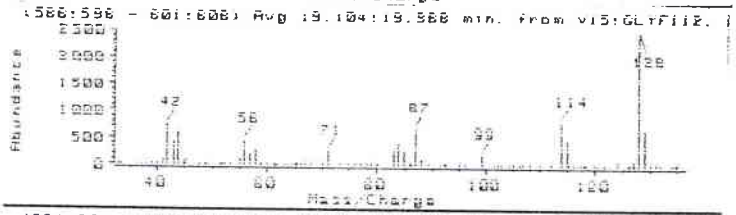
B


Abundance
Mass/Charge
43
69
83
85
112
126
140

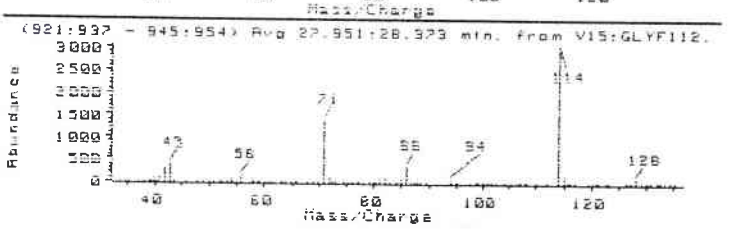
C

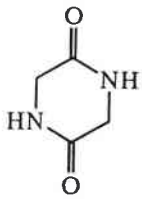

(502:508 - 514:521) Avg 16.885:17.044 min. from V15:GLYF112.
Abundance
Mass/Charge
42
57
67
83
98
100
126

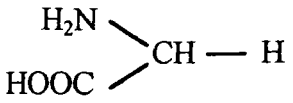
D


Abundance
Mass/Charge
42
56
71
87
99
114
128

E

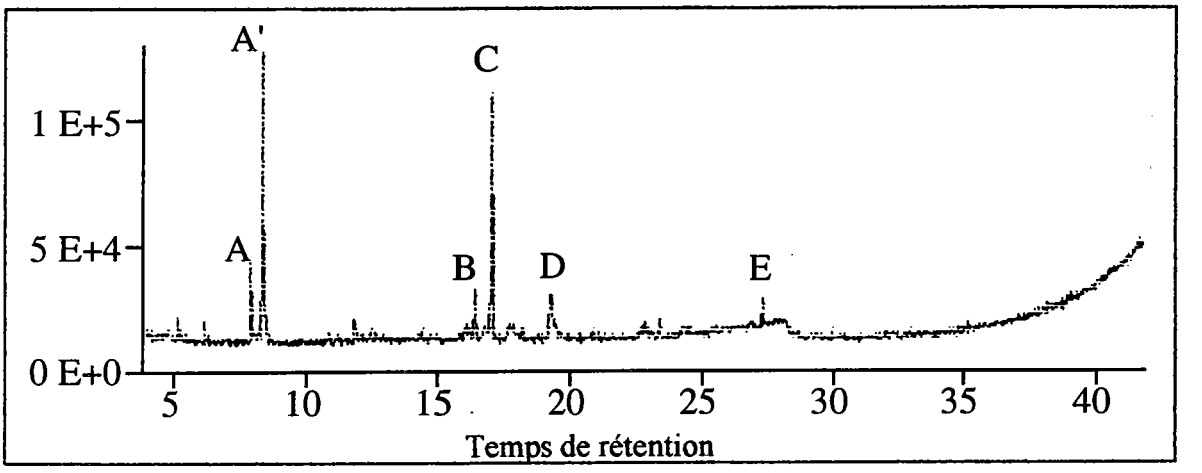

Abundance
Mass/Charge
42
56
71
85
94
114
128


O
NH
HN
O



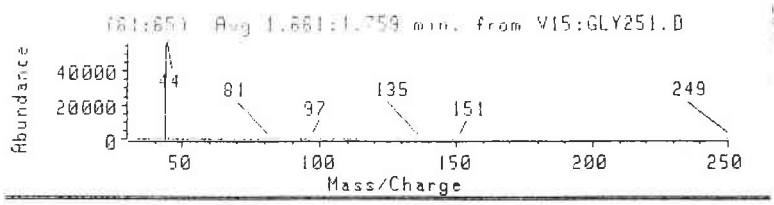
L-GLYCINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

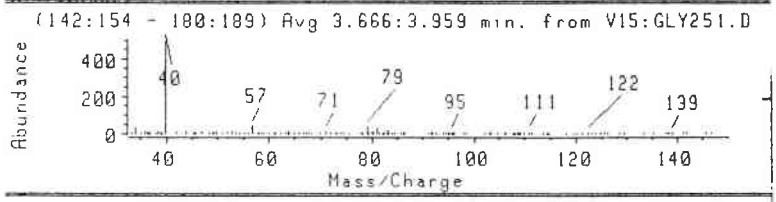


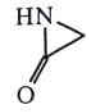
Pics	m/z	molécules proposées
A (7.8 min)	83, 114	
A' (8.3 min)	**83, 114**	
B (16.3 min)	83, 85, 112, 128, 140	1,3,5,7 tétraazatricyclo[3.3.1.13,7] décane
C (16.9 min)	**42, 83, 126**	
D (19.1 min)	71, 87, 99, 114, 128, 129	Dihydro-uracil,1-N-méthyl (?)
E (27.9 min)	71, 114	2,5 Dicétopipérazine

A

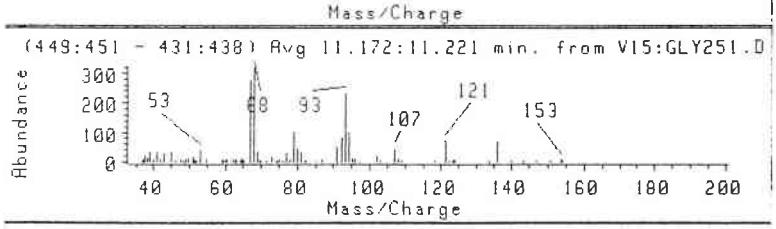

(61:65) Avg 1.661:1.759 min. from V15:GLY251.D
Abundance
40000
20000
0
44
81
97
135
151
249
50
100
150
200
250
Mass/Charge

B

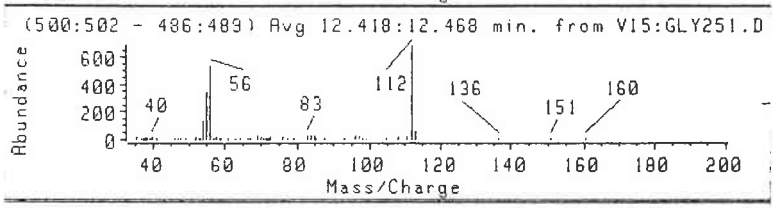

(142:154 - 180:189) Avg 3.666:3.959 min. from V15:GLY251.D
Abundance
400
200
0
40
57
71
79
95
111
122
139
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

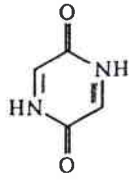

HN
O

C

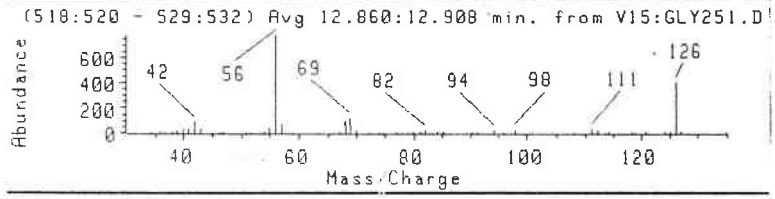

(449:451 - 431:438) Avg 11.172:11.221 min. from V15:GLY251.D
Abundance
300
200
100
0
53
68
93
107
121
153
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

D

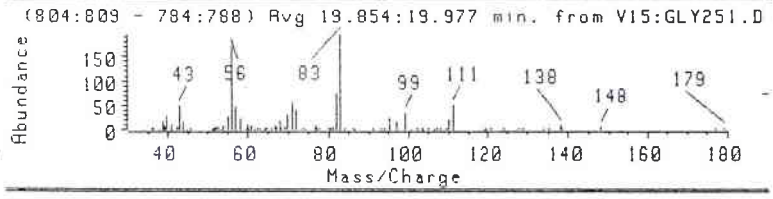

(500:502 - 486:489) Avg 12.418:12.468 min. from V15:GLY251.D
Abundance
600
400
200
0
40
56
83
112
136
151
160
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge


O
NH
HN
O

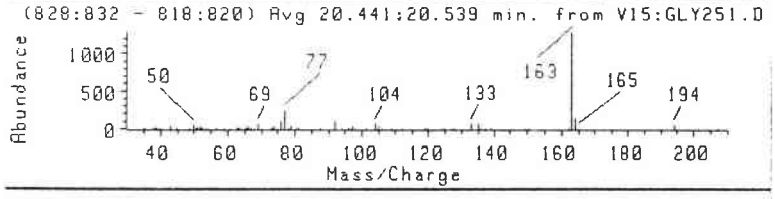
E


(518:520 - 529:532) Avg 12.860:12.908 min. from V15:GLY251.D
Abundance
600
400
200
0
42
56
69
82
94
98
111
126
40
60
80
100
120
Mass/Charge

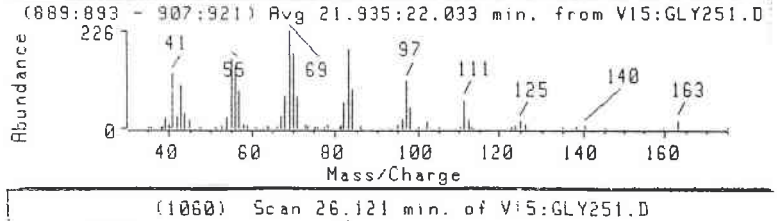
F


(804:809 - 784:788) Avg 19.854:19.977 min. from V15:GLY251.D
Abundance
150
100
50
0
43
56
83
99
111
138
148
179
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge

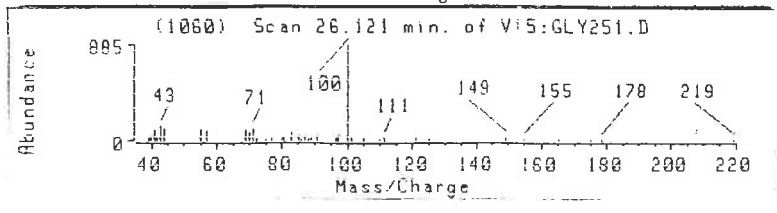
F'

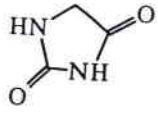

(828:832 - 818:820) Avg 20.441:20.539 min. from V15:GLY251.D
Abundance
1000
500
0
50
69
77
104
133
163
165
194
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

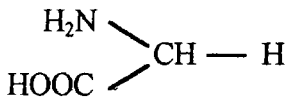
G


(889:893 - 907:921) Avg 21.935:22.033 min. from V15:GLY251.D
Abundance
226
0
41
55
69
97
111
125
140
163
40
60
80
100
120
140
160
Mass/Charge

H

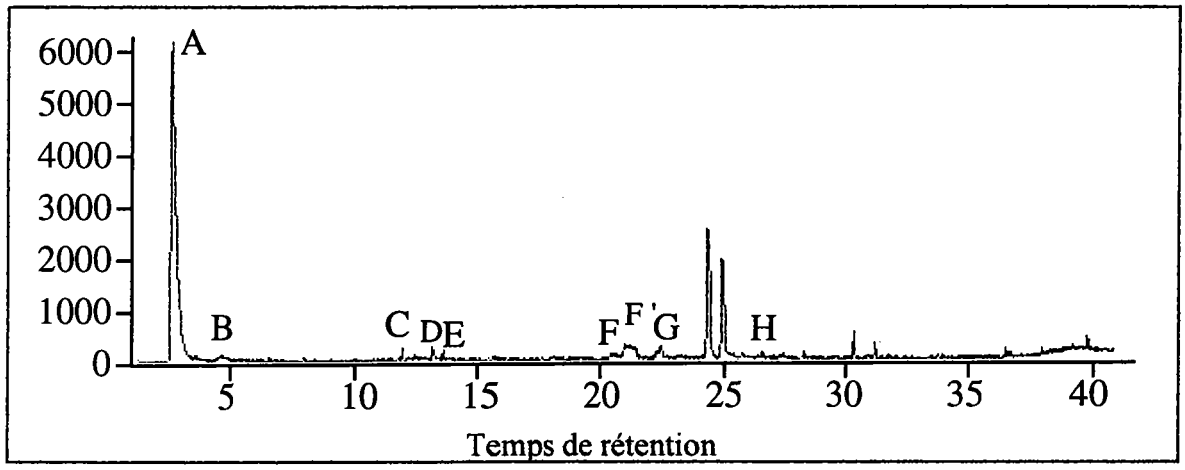

(1060) Scan 26.121 min. of V15:GLY251.D
Abundance
885
0
43
71
100
111
149
155
178
219
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Mass/Charge


HN
O
NH
O



L-GLYCINE

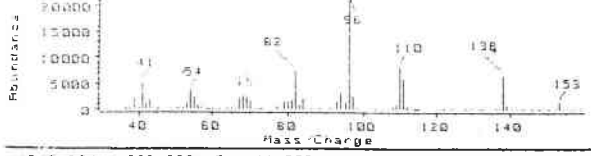
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



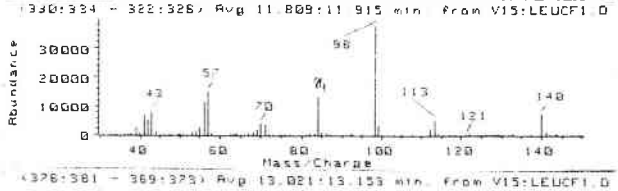
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (3.8 min)	40, **57**	α lactame
C (11.2 min)	53, 67, 68, 93, 94, 107, 121, **136**	
D (12.4 min)	54, 55, 56, **112**	2,5 Dicétopyrazine
E (12.8 min)	56, 69, **126**	
F (19.8 min)	43, 56, 83, 99, 111, 138, 148, 179	
F' (20.5 min)	50, 69, 77, 104, 133, 163, 194	
G (22.0 min)	41, 55, 69, 83, 97, 111, 125, 140, 163	
H (26.1 min)	41, 71, **100**	2,4 imidazolidinedione

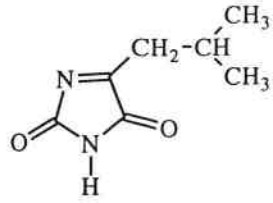
Remarque : les pics à 23,8 et 24,4 minutes se retrouvent systématiquement dans les tous les spectres. Ils correspondent à des pics issus de la dégradation de la phase.

A

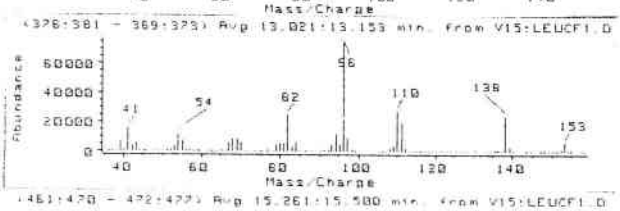


B

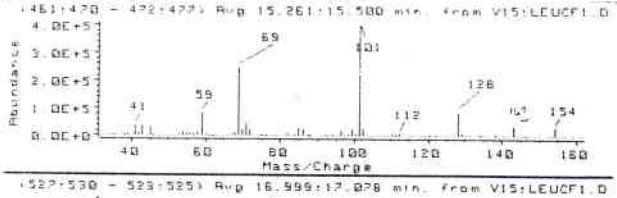




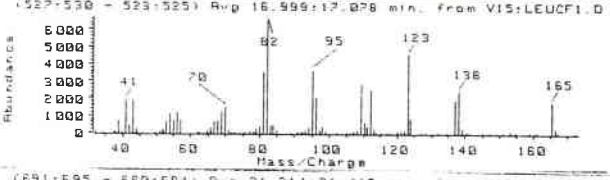
C



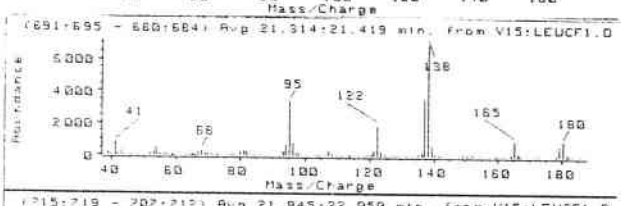
D



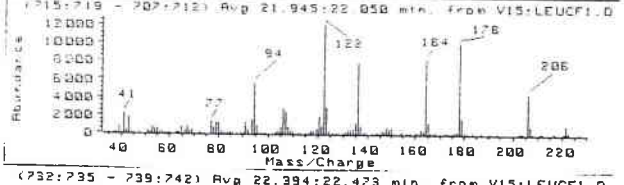
E

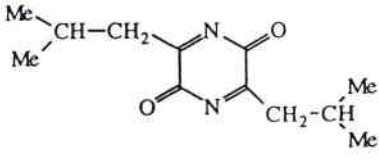


F

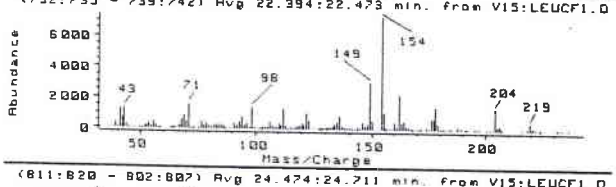


G

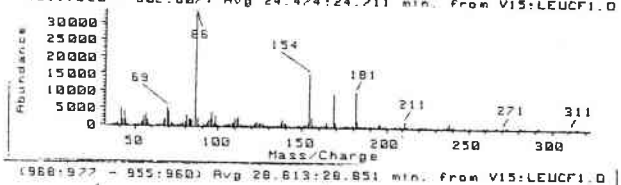




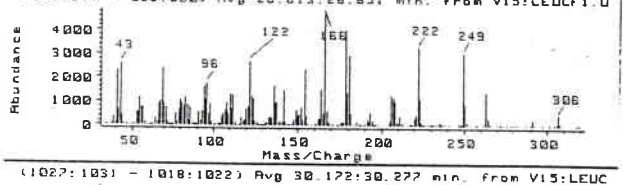
H



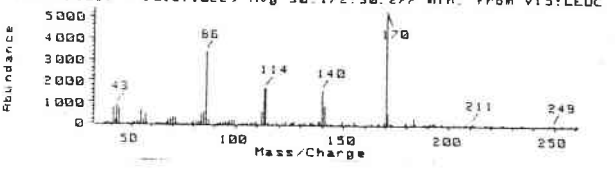
I

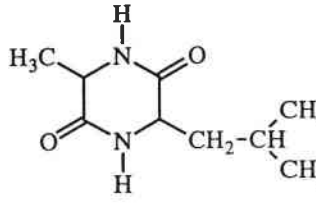


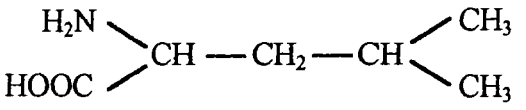
J



K

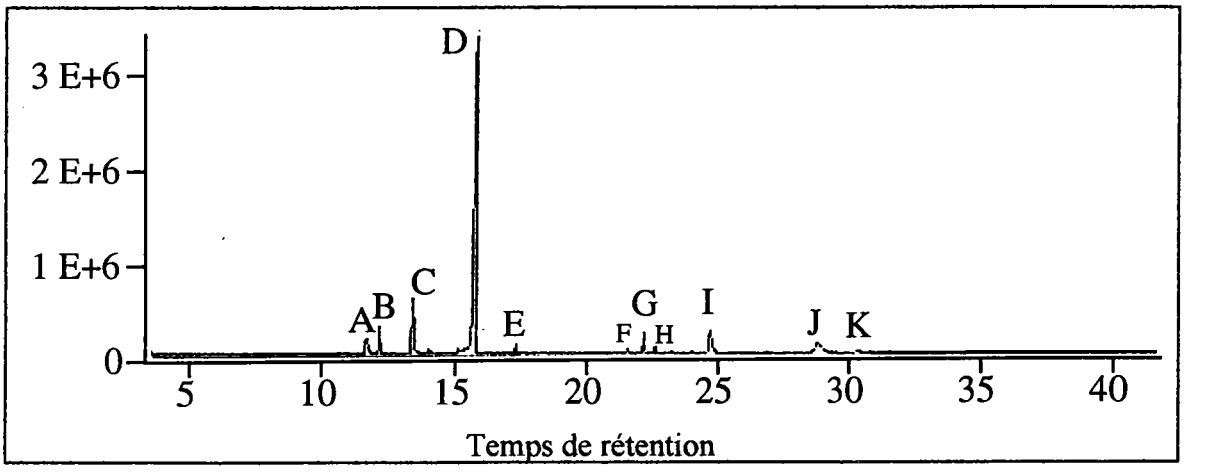






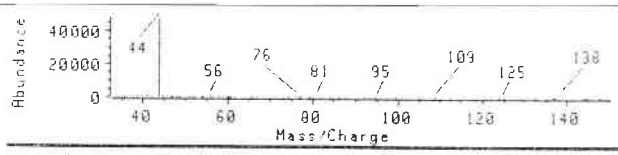
L-LEUCINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

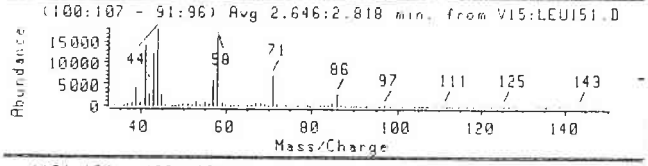


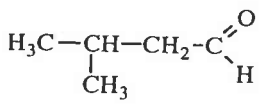
Pics	m/z	molécules proposées
A (11.3 min)	41, 54, 82, 96, 110, 111, 138, 153	
B (11.8 min)	43, 56, 70, 82, 95, 112, 113, 140	3 Imidazole, 2,4-dione, 5-isobutyl
C (13.1 min)	41, 54, 82, 96, 110, 111, 138, 153	
D (15.3 min)	**41, 43, 59, 69, 101, 112, 128, 143, 154**	
E (17.0 min)	70, 81, 82, 95, 96, 123, 137, 138, 165	
F (21.3 min)	41, 95, 122, 137, 138, 165, 179, 180	
G (21.9 min)	41, 43, 94, 122, 136, 164, 178, 206, 222	Pyrazine-2,5 dione-3,6 diisobutyl
H (22.4 min)	43, 71, 98, 149, 154, 162, 204, 219	
I (24.6 min)	86, 154, 168, 181	
J (28.7 min)	122, 166, 179, 222, 249, 262	
K (30.2 min)	43, 86, 114, 140, 170	2,5 dicétopipérazine, 3-isobutyl

A

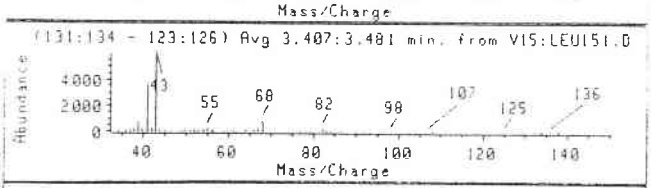


B

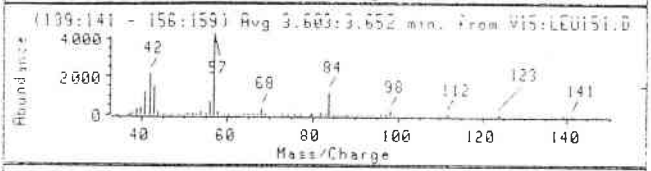




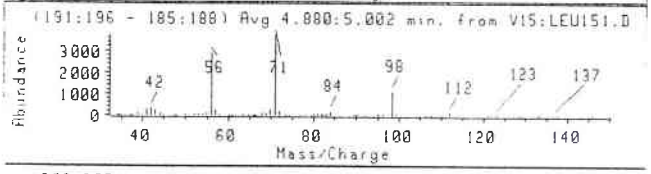
C



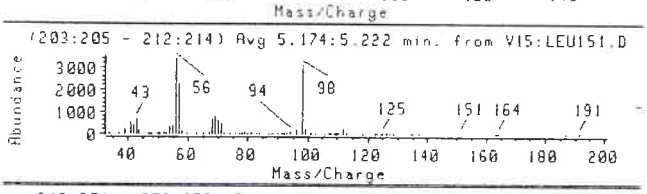
C′

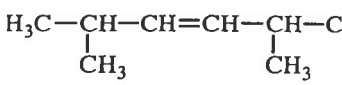


D

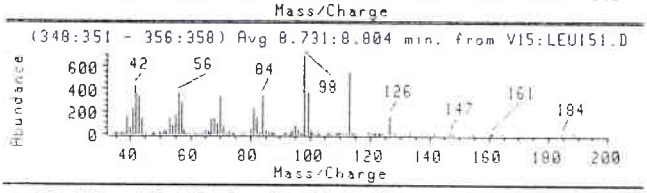


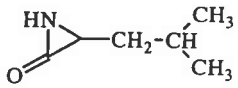
D′



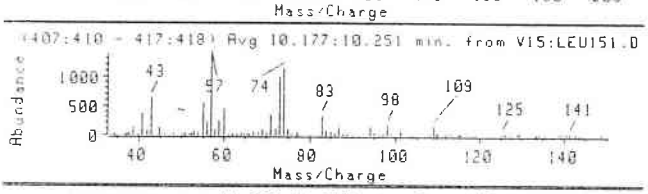


E

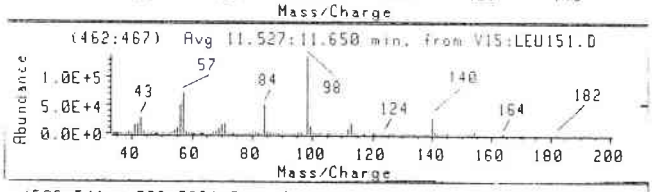


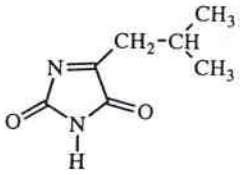


F

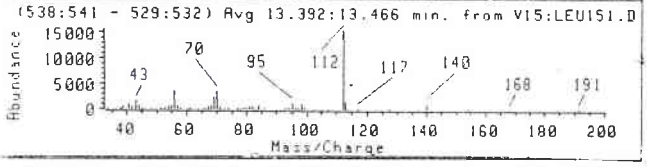


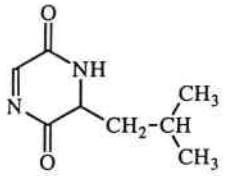
G



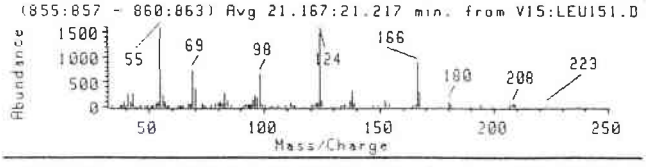


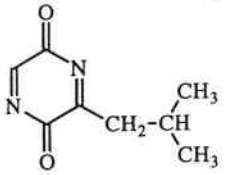
H



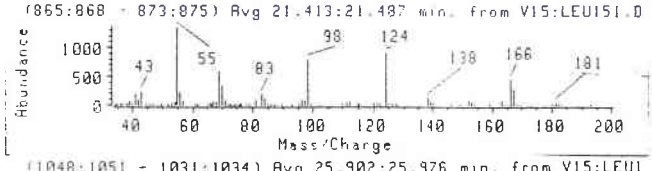


I

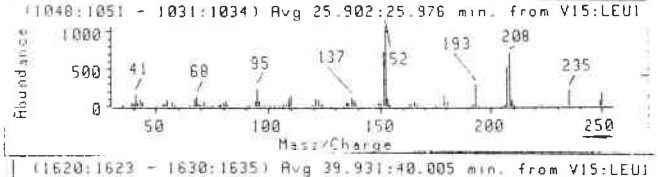




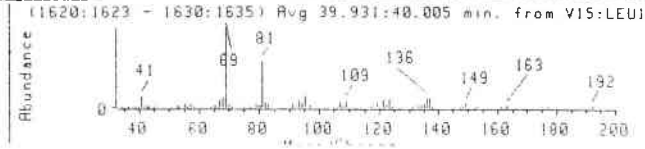
I′

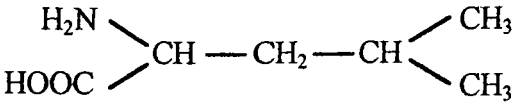


J



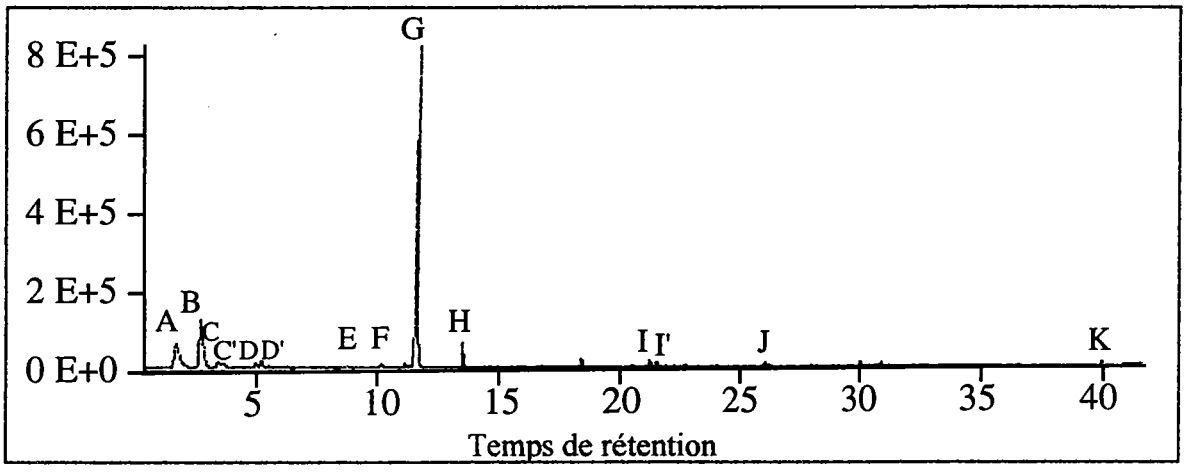
K





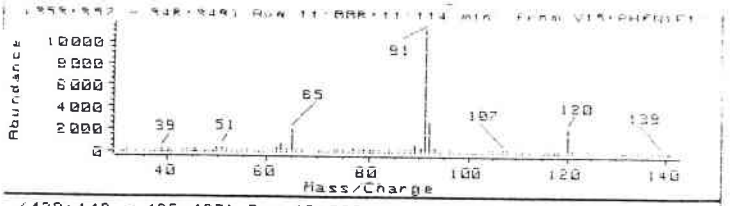
L-LEUCINE

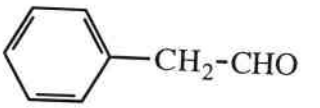
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



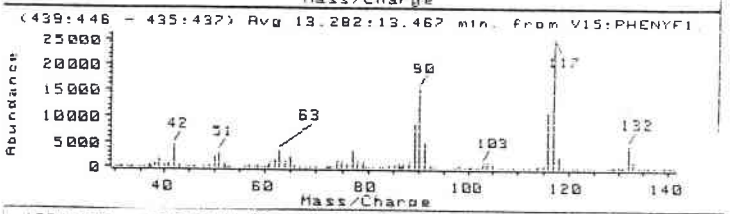
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (2.7 min)	41, 42, 43, 44, 57, 58, 71, **86**	Butanal, 3-méthyl
C (3.4 min)	41, 43, 55, 68	
C' (3.6 min)	41, 42, 43, 56, 57, 68, 84, **98**	Pentanal, 4-méthyl
D (4.9 min)	42, 56, 71, 84, **98**, ***112***	
D' (5.2 min)	56, 57, 69, 96, **98**, ***112***	3-Hexène, 2,5 diméthyl
E (8.8 min)	42, 56, 70, 84, 86, 98, 99, **113**	α lactame
F (10.2 min)	43, 57, 60, 73, 74, 83, 87, 94, 98	
G (11.6 min)	**43, 57, 84, 98, 112, 113, *140*, 154**	**3-imidazole, 2,4-dione, 5-isobutyl**
H (13.4 min)	56, 70, 84, 95, 98, 112, **140**, ***168***	4H Pyrazine, 2,5 dione, 3-isobutyl
I (21.2 min)	55, 69, 98, 124, 138, 166	2,5 Dicétopyrazine, 3-isobutyl
I' (21.4 min)	identique	
J (25.9 min)	151, 179, 193, 207, 208, 235, **250**	
K (39.9 min)	41, 69, 81, 109, 136	

A

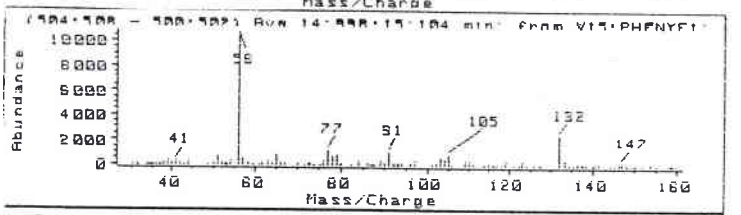

Abundance
Mass/Charge
91
65
39
51
107
120
139

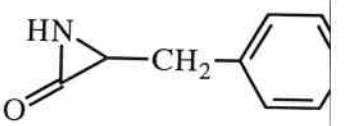

CH2-CHO

B

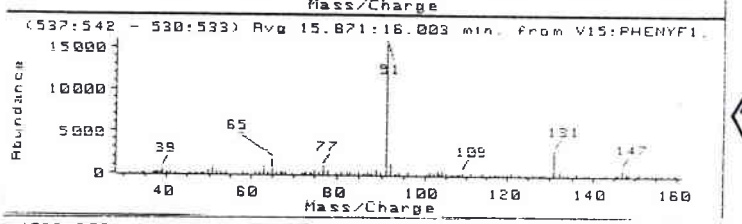

(439:446 - 435:437) Avg 13.282:13.462 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
90
117
63
42
51
103
132

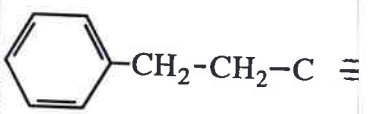
C


Abundance
Mass/Charge
91
41
77
51
105
132
147

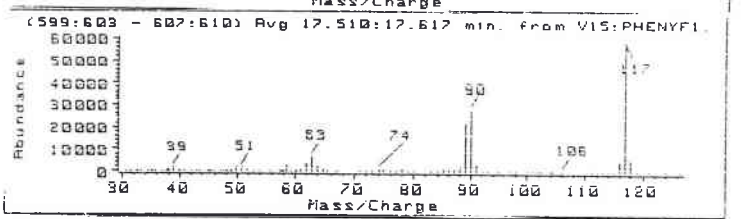

HN
CH2
O

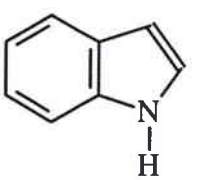
D


(537:542 - 530:533) Avg 15.871:16.003 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
91
65
39
77
105
131
147

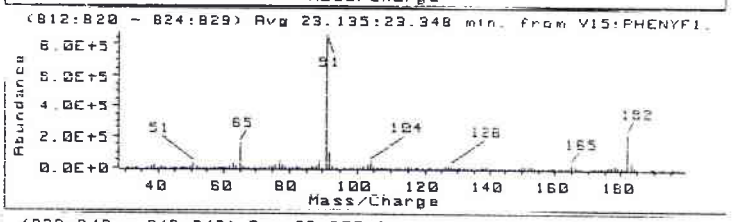

CH2-CH2-C

E

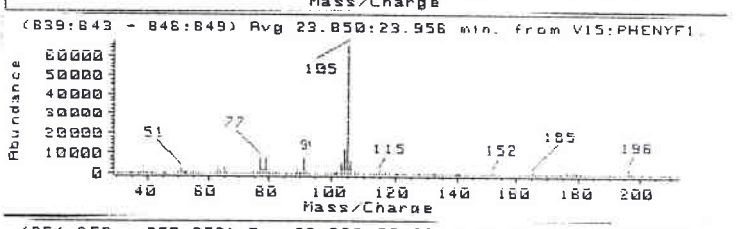

(599:603 - 602:610) Avg 17.510:17.617 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
90
117
39
51
63
74
106


N
H

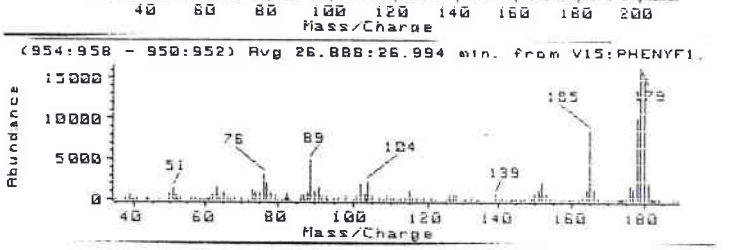
F

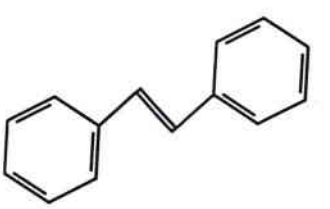

(812:820 - 824:829) Avg 23.135:23.348 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
91
51
65
104
128
165
182

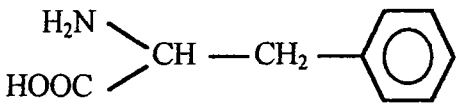
G


(839:843 - 848:849) Avg 23.850:23.956 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
105
51
77
91
115
152
185
196

H

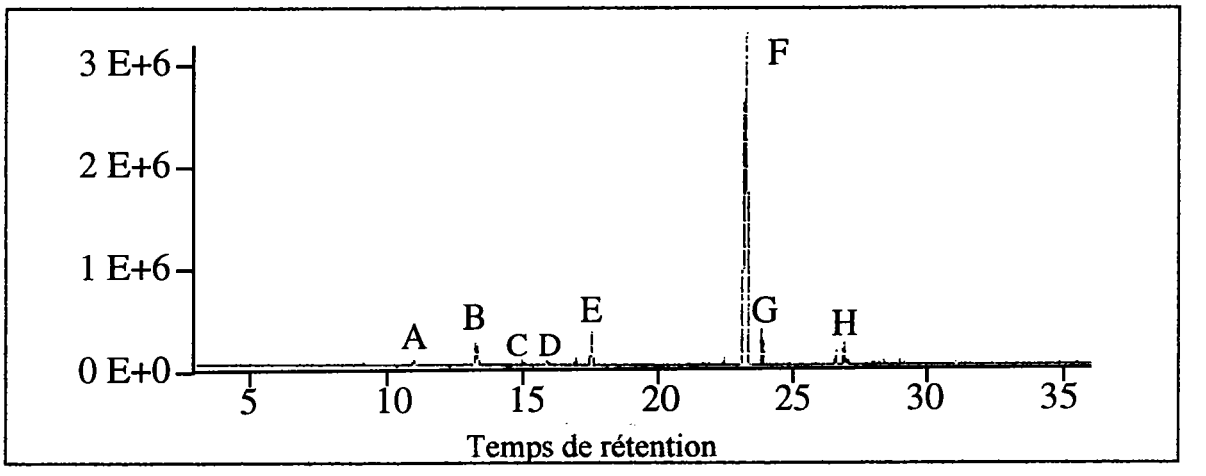

(954:958 - 950:952) Avg 26.888:26.994 min. from V15:PHENYF1
Abundance
Mass/Charge
185
179
78
89
104
51
139





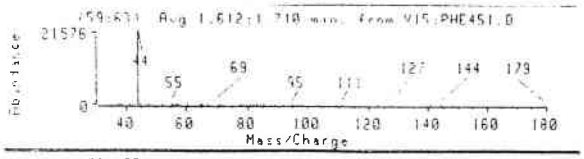
L-PHENYLALANINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

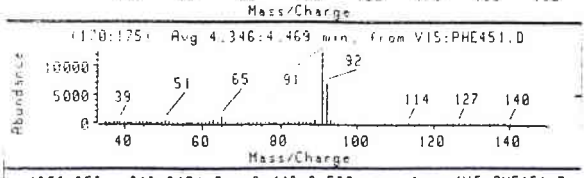


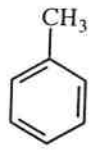
Pics	m/z	molécules proposées
A (11.1 min)	91, 92, 120	Benzèneacétaldéhyde
B (13.3 min)	89, 90, 116, 117, 132	φCH_2CHCO (3 Phénylprop-2-ènone)
C (15.0 min)	56, 77, 91, 105, 132, 147	α lactame
D (16.0 min)	91, 131	Benzènepropanenitrile
E (17.6 min)	89, 90, 117	Indole
F (23.2 min)	**51, 65, 91, 182**	**Benzène,1,1'-(1,2 éthanediyl)bis-**
G (23.9 min)	51, 77, 105, 152, 185, 196	Benzène, 1,1'(1,3 propanediyl)bis-
H (26.9 min)	51, 76, 102, 104, 178, 179, 180	Transtilbène

A

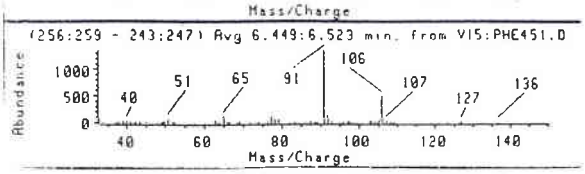


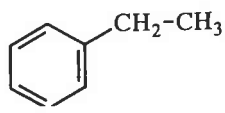
B



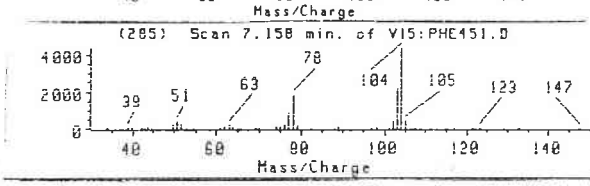


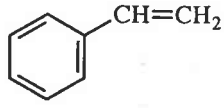
C



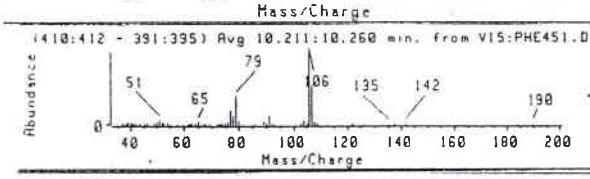


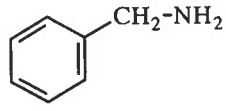
D



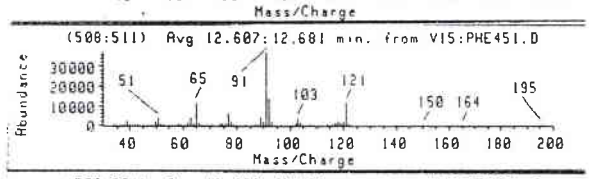


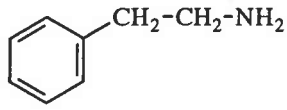
E



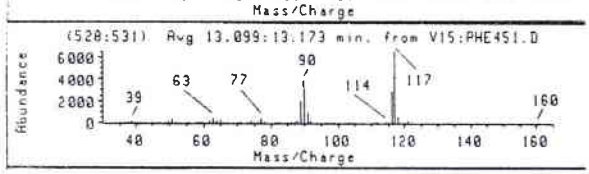


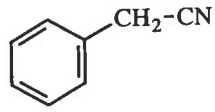
F



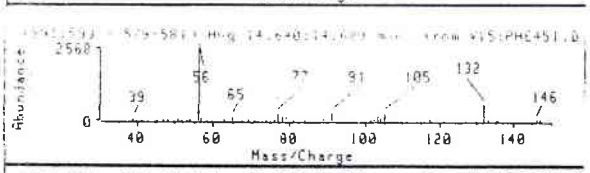


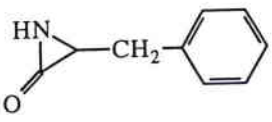
G



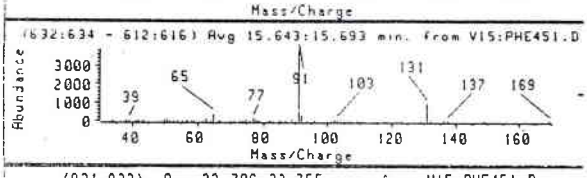


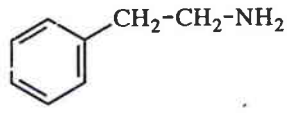
H



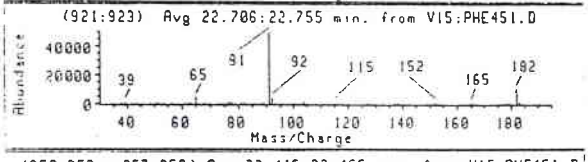


I

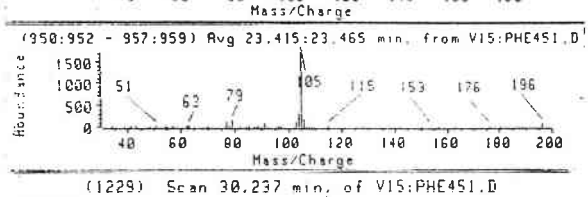




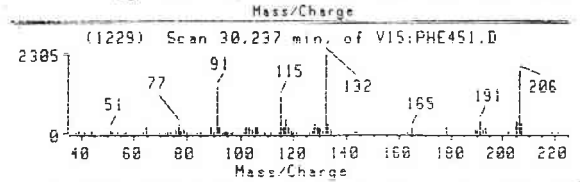
J



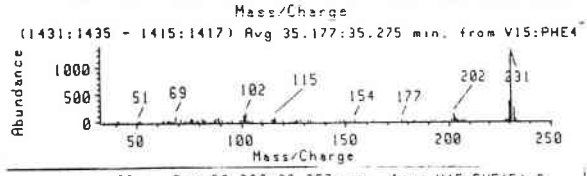
K



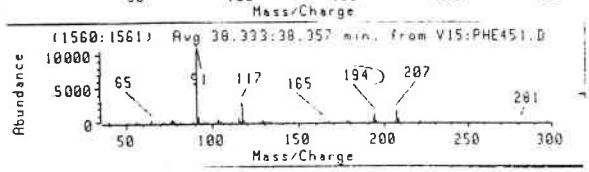
L

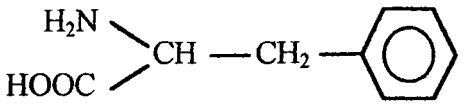


M



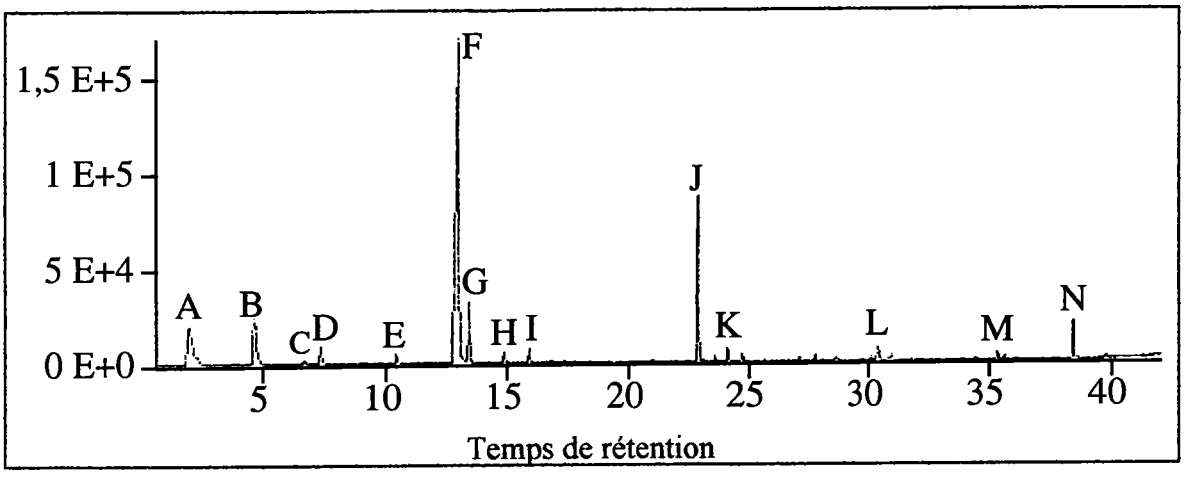
N



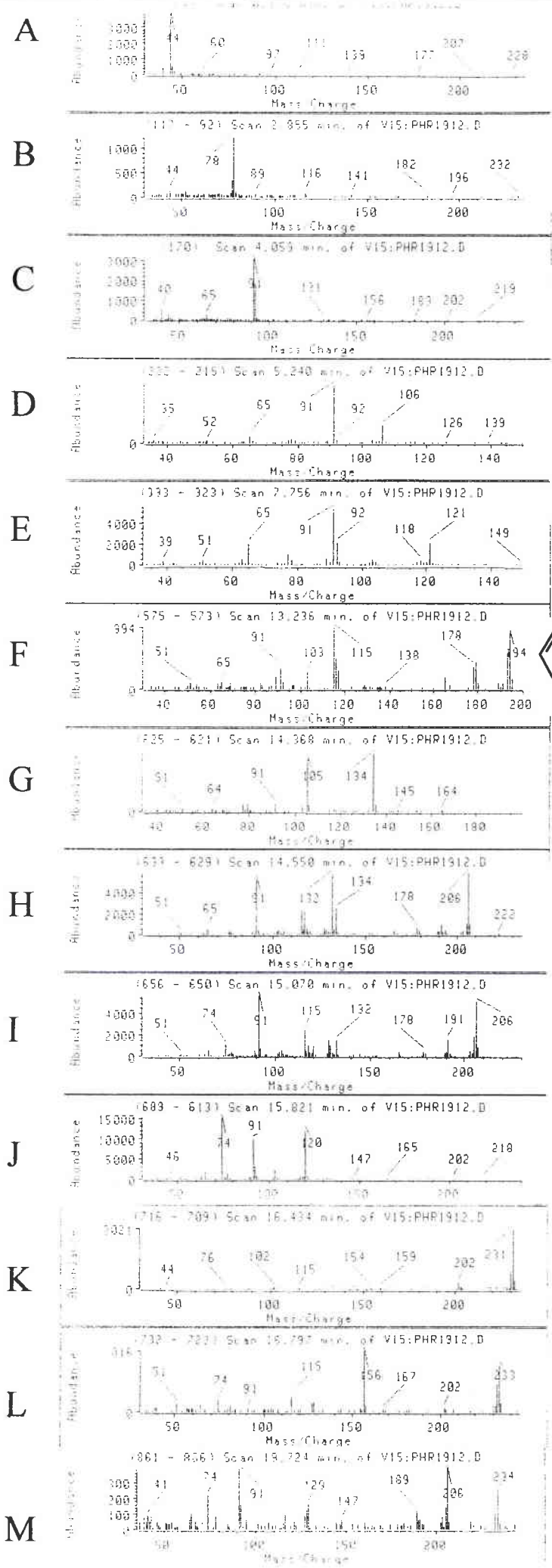


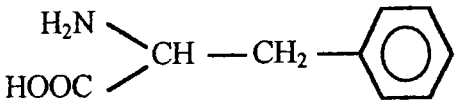
L-PHENYLALANINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



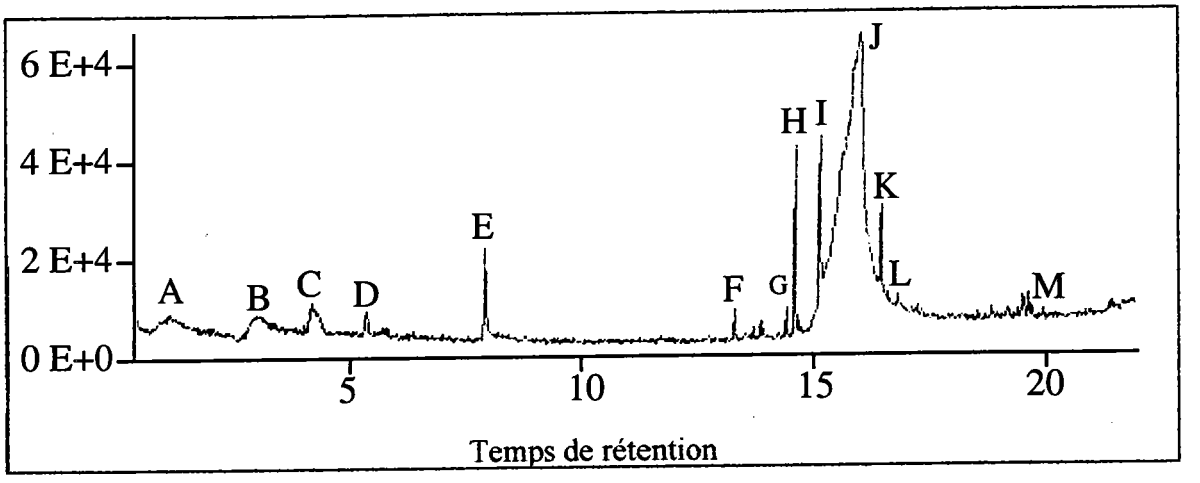
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (4.6 min)	91, **92**	Toluéne
C (6.4 min)	69, 91, **106**	Ethylbenzéne
D (7.1 min)	51, 78, 103, **104**	Styréne
E (10.2 min)	79, 106, **107**	Benzène, méthanamine
F (12.6 min)	**51, 65, 91, 121**	**Benzène, éthanamine**
G (13.1 min)	89, 90,116, **117**	Benzène, acétonitrile
H (14.6 min)	56, 77, 91, 105, 132, 146, **147**	α lactame (!)
I (15.6 min)	65, 91, **131**	Benzène, propanenitrile
J (22.7 min)	**91, *182***	**Benzène (1,1') (1,2 éthanediyl)bis**
K (23.4 min)	51, 77, 105, **196**	Benzène (1,1') (1,3 propanediyl)bis
L (30.2 min)	77, 91, 115, **132**, 165, 191	
M (35.2 min)	154, 177, 202, 230, 231, 232	
N (38.3 min)	65, 91, 117, 194	


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
Abundance
Mass/Charge
CH3
CH2-CH3
CH2-CH2-NH2
CH2-CH=CH



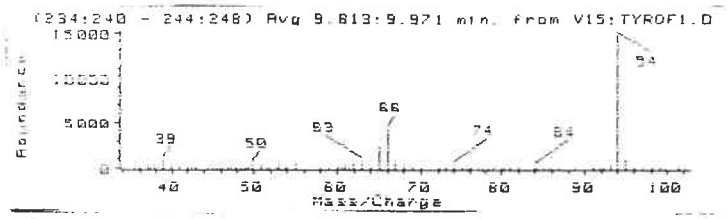
L-PHENYLALANINE

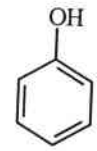
PYROLYSE LASER GC/MS



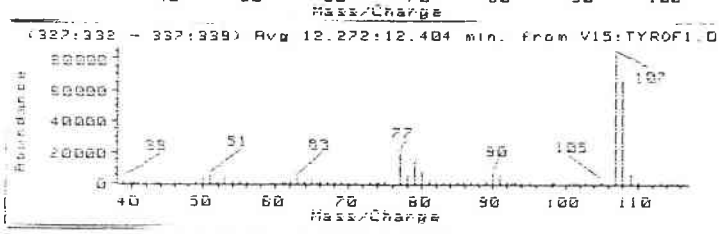
Pics	m/z	molécules proposées
A (0.9 min)	44	CO_2
B (2.8 min)	77, 78	Benzène
C (4.1 min)	91, 92	Toluène
D (5.2 min)	91, 106	Benzène, éthyle
E (7.7 min)	65, 91, 92, 121	Benzène éthanamine
F (13.2 min)	91, 103, 115, 116, 178, 194	1,1 diphénylpropène
G (14.3 min)	91, 105, 134	
H (14.5 min)	91, 132, 134, 178, 206	$C_{11}H_{14}N_2O_2$ (?)
I (15.1 min)	74, 91, 115, 132, 191, 206	Tran-trans (1,4)diphényl-1,3-butadiène
J (15.8 min)	**74, 91, 120, 147, 165**	**Phénylalanine**
K (16.4 min)	102, 115, 154, 202, 231, 232	$C_{13}H_{14}N_2O_2$ (?)
L (16.7 min)	74, 115, 156, 232, 233, 234	$C_{12}H_{14}N_2O_3$ (?)
M (19.7 min)	91, 92, 129, 147, 189, 206, 234	$C_{12}H_{14}N_2O_3$ (?)

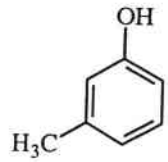
A


(234:240 - 244:248) Avg 9.813:9.971 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

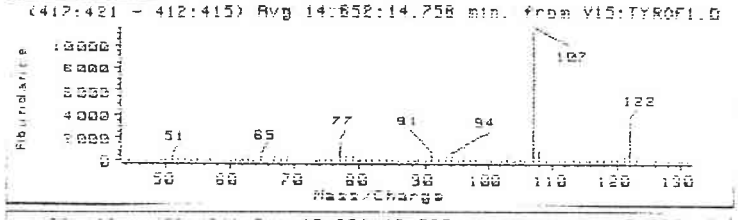

OH

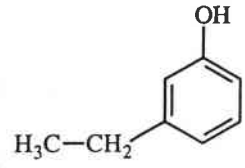
B


(327:332 - 337:339) Avg 12.272:12.404 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

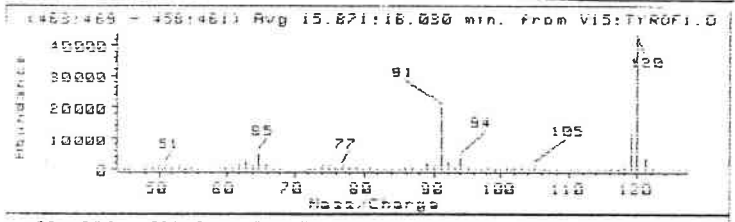

OH
H3C

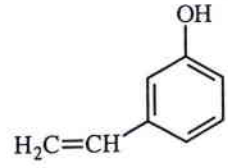
C


(417:421 - 412:415) Avg 14.652:14.758 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

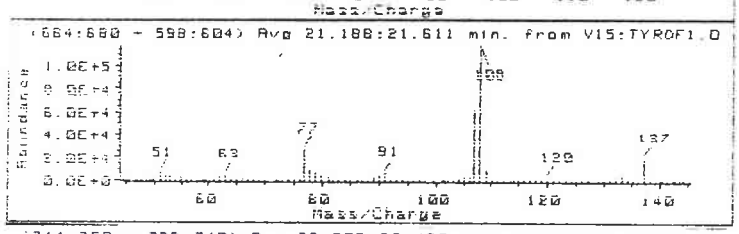

OH
H3C—CH2

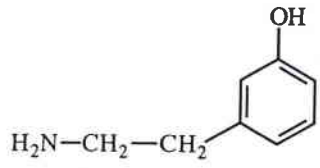
D


(463:469 - 456:461) Avg 15.871:16.030 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

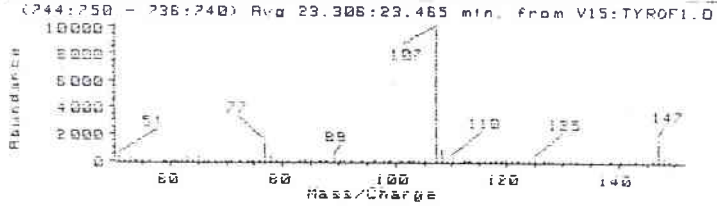

OH
H2C=CH

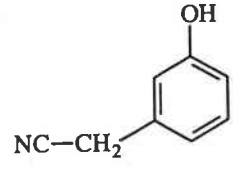
E


(664:680 - 598:604) Avg 21.188:21.611 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

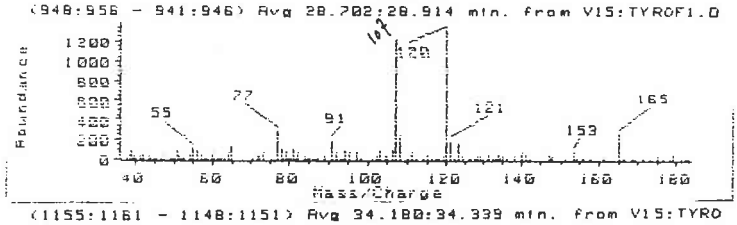

OH
H2N—CH2—CH2

F

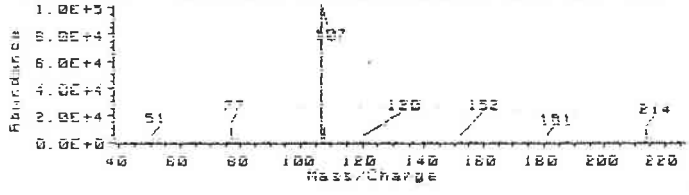

(744:750 - 736:740) Avg 23.306:23.465 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

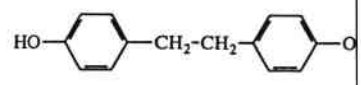

OH
NC—CH2

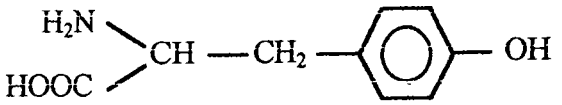
G


(948:956 - 941:946) Avg 28.702:28.914 min. from V15:TYROF1.D
Abundance
Mass/Charge

H

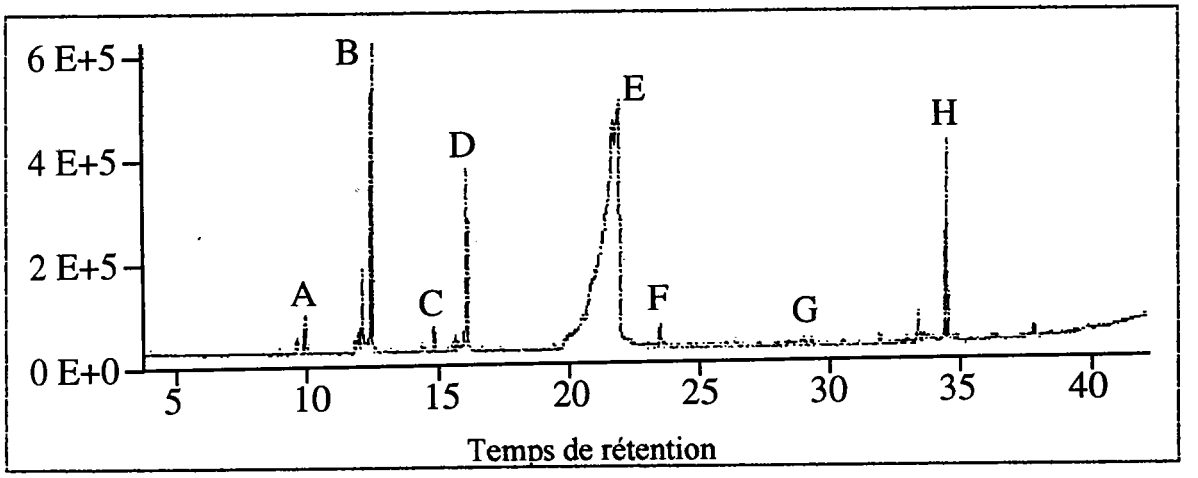

(1155:1161 - 1148:1151) Avg 34.180:34.339 min. from V15:TYRO
Abundance
Mass/Charge


HO
CH2-CH2
O



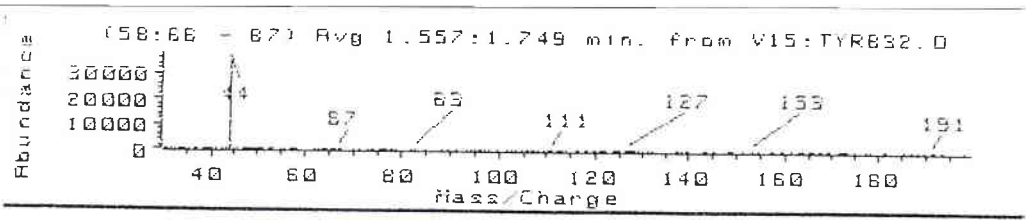
L-TYROSINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

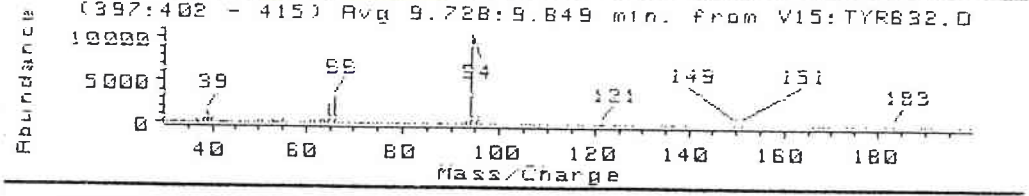


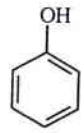
Pics	m/z	molécules proposées
A (9.9 min)	66, 94	Phénol
B (12.4 min)	77, 79, 107, 108	Phénol, 4-méthyl
C (14.8 min)	77, 107, 122	Phénol, 4-éthyl
D (15.9 min)	65, 91, 119, 120	Phénol, 4-éthylène
E (21.2 min)	**77, 91, 107, 108, 137**	**Phénol, 4- éthanamine**
F (23.4 min)	77, 107, 147	Phénol, 4 acétonitrile
G(28.7 min)	77, 107, 120, 153, 165	
H (34.1 min)	77, 107, 214	Diphénol, 4,4'-éthane

A

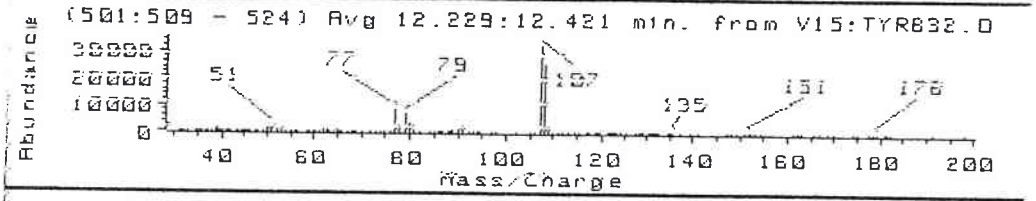

(58:66 - 67) Avg 1.557:1.749 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
30000
20000
10000
0
44
87
65
111
127
155
191
40 60 80 100 120 140 160 180
Mass/Charge

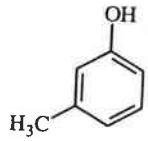
B


(397:402 - 415) Avg 9.728:9.849 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
10000
5000
0
39
55
94
121
149
151
183
40 60 80 100 120 140 160 180
Mass/Charge

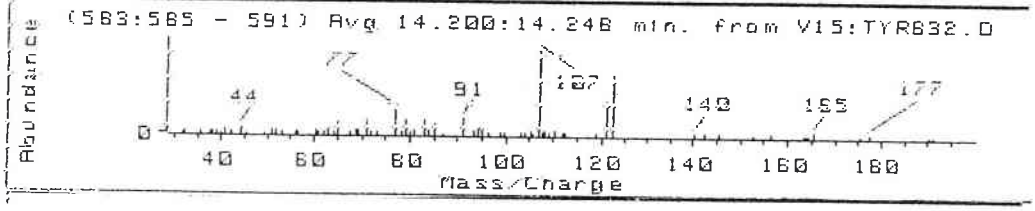

OH

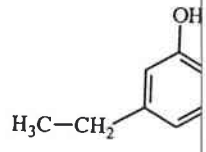
C


(501:509 - 524) Avg 12.229:12.421 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
30000
20000
10000
0
51
77
79
107
135
151
178
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge

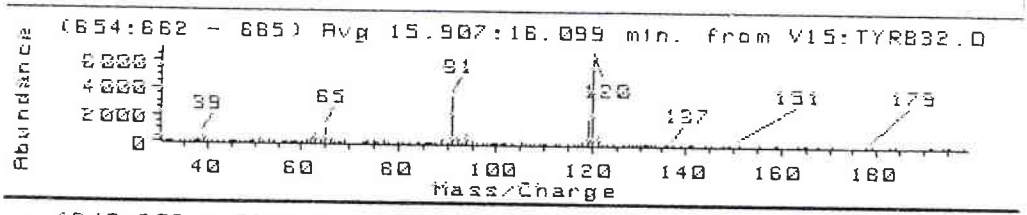

OH
H3C

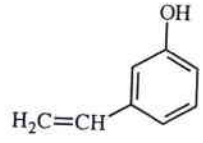
D


(583:585 - 591) Avg 14.200:14.248 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
0
44
77
91
107
140
155
177
40 60 80 100 120 140 160 180
Mass/Charge

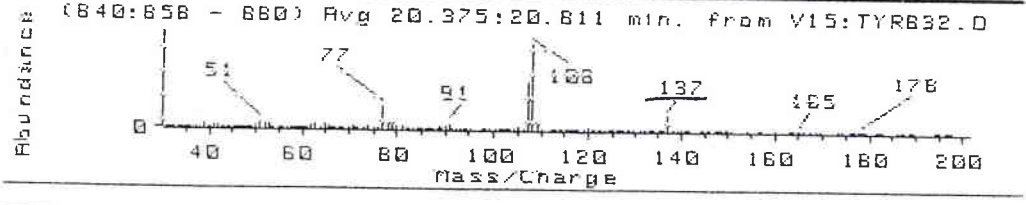

OH
H3C—CH2

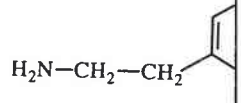
E


(654:662 - 685) Avg 15.907:16.099 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
6000
4000
2000
0
39
65
91
120
137
151
179
40 60 80 100 120 140 160 180
Mass/Charge

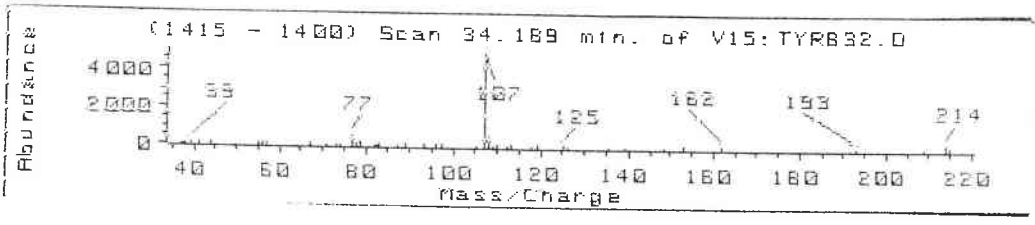

OH
H2C=CH

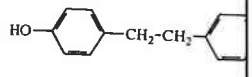
F

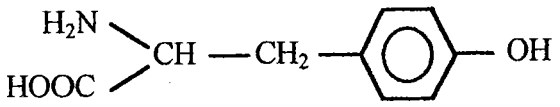

(840:858 - 880) Avg 20.375:20.811 min. from V15:TYRB32.D
Abundance
0
51
77
91
108
137
165
178
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge


H2N—CH2—CH2

G

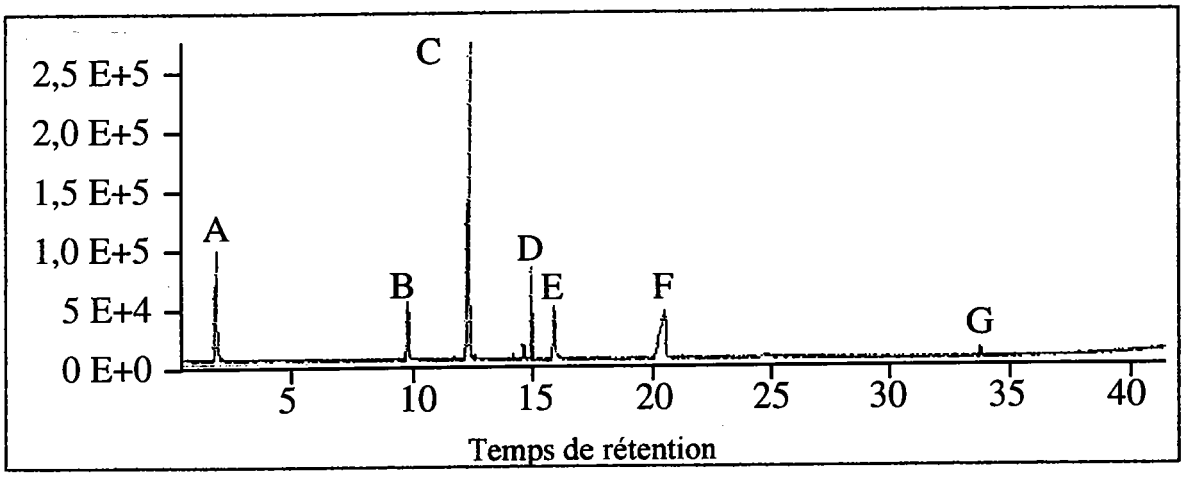

(1415 - 1400) Scan 34.189 min. of V15:TYRB32.D
Abundance
4000
2000
0
55
77
107
125
162
193
214
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220
Mass/Charge


HO
CH2-CH2



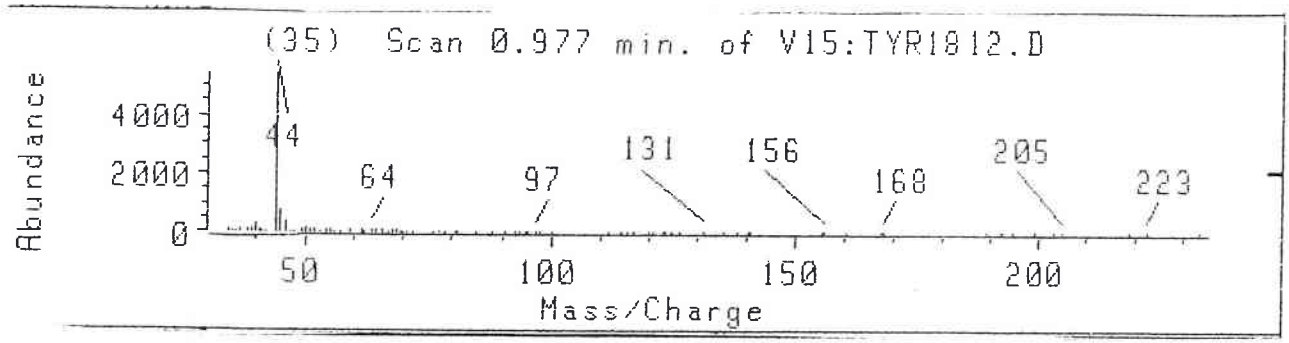
L-TYROSINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

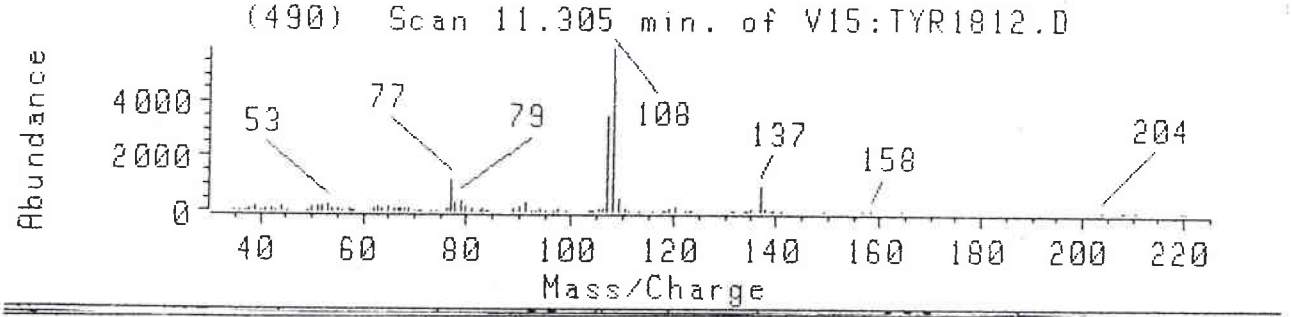


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (9.8 min)	66, **94**	Phénol
C (12.3 min)	**77, 79, 107, *108***	**Phénol, 4-méthyl**
D (14.2 min)	77, 107, **122**	Phénol, 4-éthyl
E (16.0 min)	65, 91, **120**	Phénol, 4-éthyléne
F (20.5 min)	77, 107, 108, **137**	Phénol, 4-éthanamine
G (34.2 min)	77, 107, 214	Diphénol, 4,4'-éthane

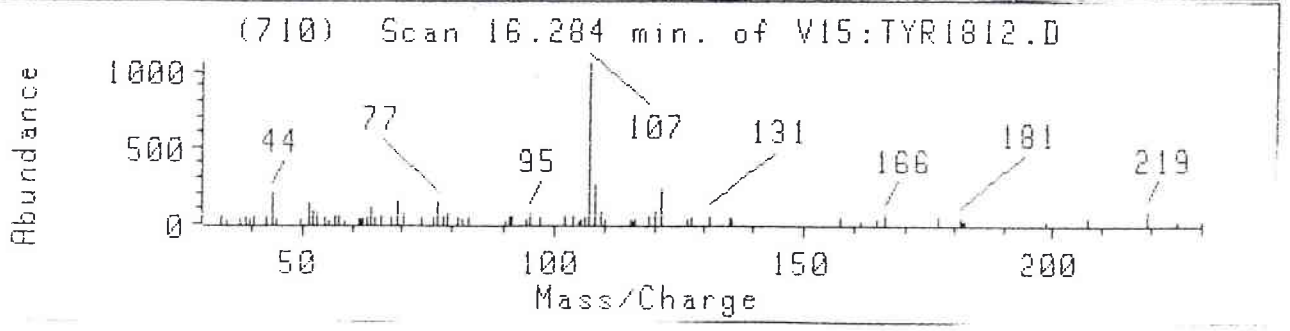
A

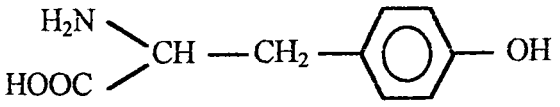

(35) Scan 0.977 min. of V15:TYR1812.D
Abundance
4000
2000
0
44
64
97
131
156
168
205
223
50
100
150
200
Mass/Charge

B


(490) Scan 11.305 min. of V15:TYR1812.D
Abundance
4000
2000
0
53
77
79
108
137
158
204
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Mass/Charge

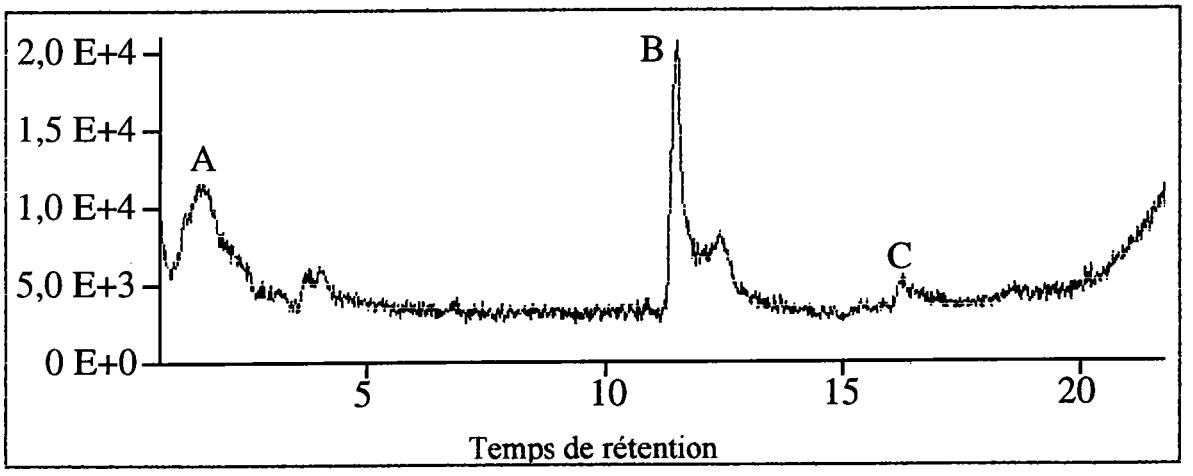
C


(710) Scan 16.284 min. of V15:TYR1812.D
Abundance
1000
500
0
44
77
95
107
131
166
181
219
50
100
150
200
Mass/Charge



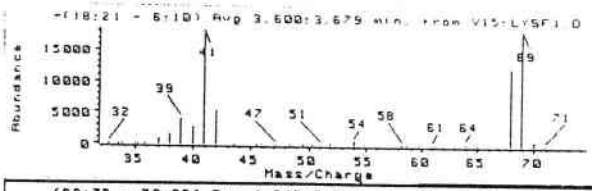
L-TYROSINE

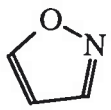
PYROLYSE LASER GC/MS



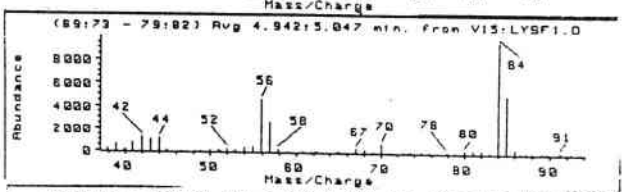
Pics	m/z	molécules proposées
A (0.9 min)	44	CO_2
B (11.3 min)	**77, 107, 108, 137**	**Phénol, 4-éthanamine**
C (16.3 min)	44, 77, 107, 166, 181	L-tyrosine

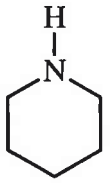
A



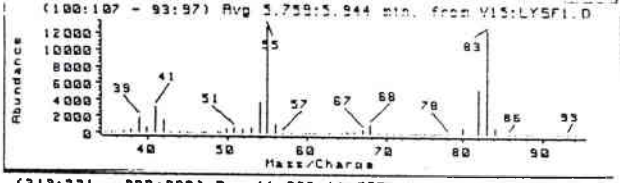


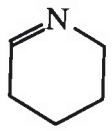
B



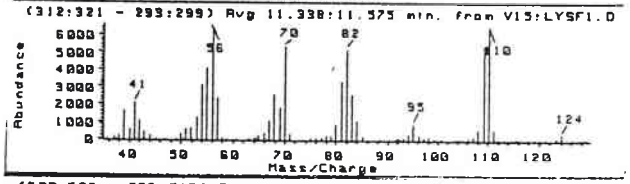


C

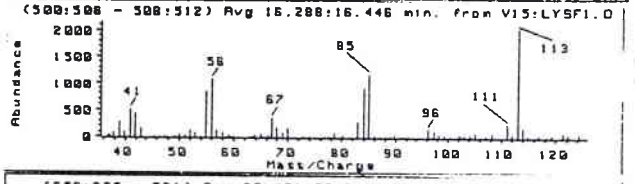




D

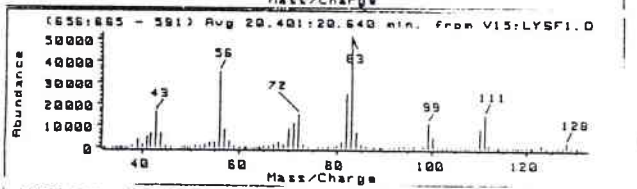


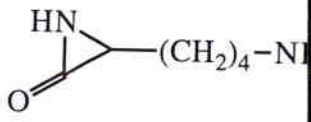
E



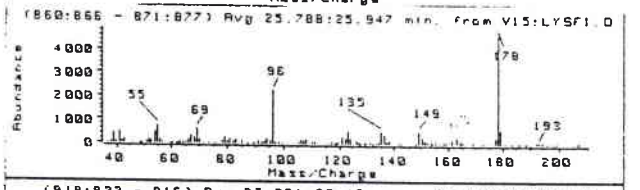
$H_2N-(CH_2)_4-CH=$

F

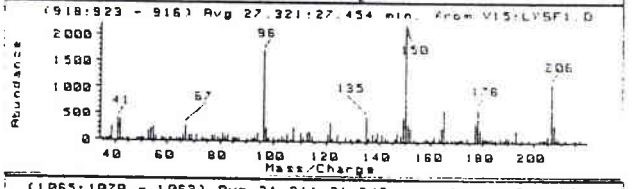




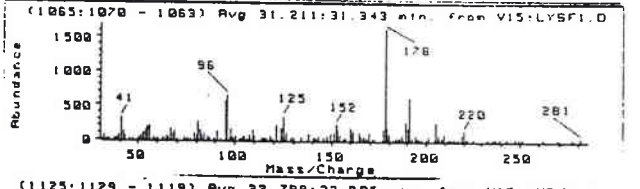
G



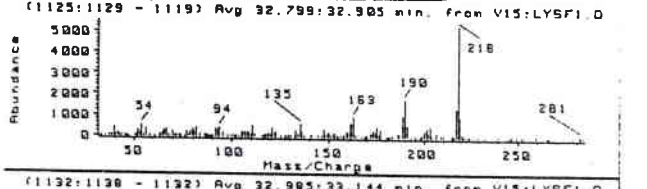
H



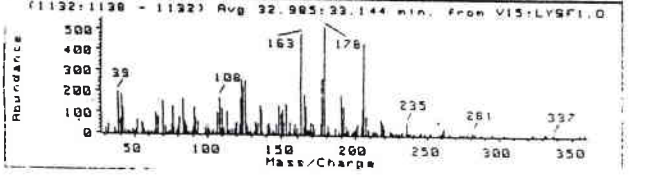
I

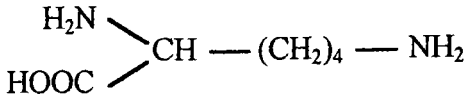


J



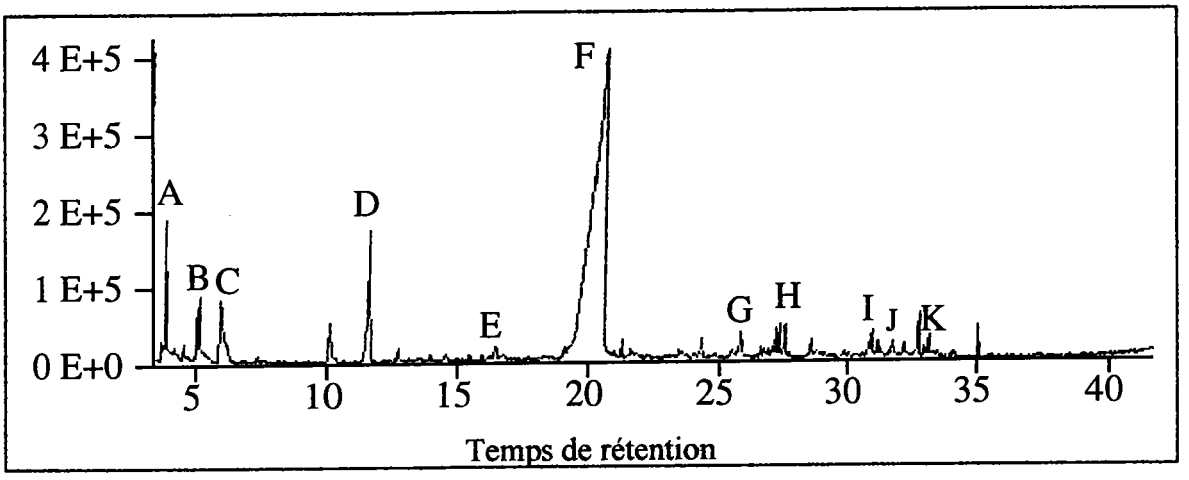
K





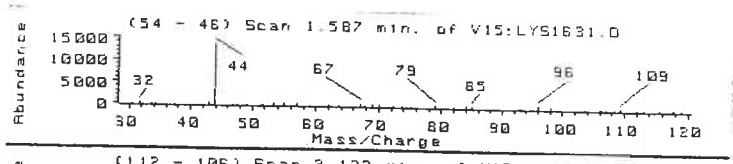
L-LYSINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

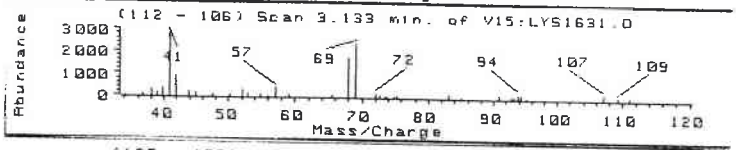


Pics	m/z	molécules proposées
A (3.6 min)	41, 68, 69	Isoxazole
B (4.9 min)	42, 56, 84, 85	Pipéridine
C (5.8 min)	41, 55, 83	Pyridine 2,3,4,5 tétrahydro
D (11.3 min)	41, 56, 70, 82, 95, 109, 110	
E (16.3 min)	41, 55, 56, 67, 85, 96, 111, 113	Lys - NH_2OH
F (20.4 min)	**43, 56, 72, 83, 99, 111, 128**	**α lactame $(CH_2)_4NH_2$**
G (25.8 min)	55, 69, 96, 178	
H (27.3min)	41, 67, 96, 121, 135, 150, 165, 178, 206	
I (31.2 min)	95, 96, 125, 152, 178, 192, 206, 220, 281	
J (32.7 min)	54, 94, 135, 163, 190, 217, 218, 219, 281	
K (33.2 min)	96, 124, 151, 165, 178, 192, 235, 281	

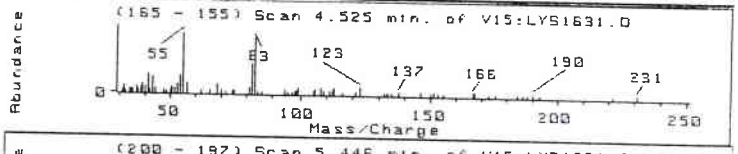
A

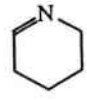

(54 - 46) Scan 1.587 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

B

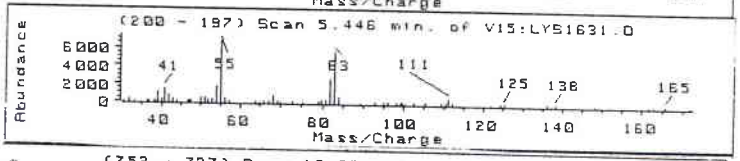

(112 - 106) Scan 3.133 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

C

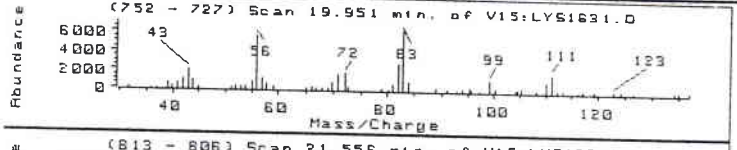

(165 - 155) Scan 4.525 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

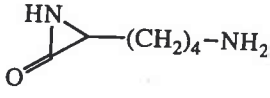


D

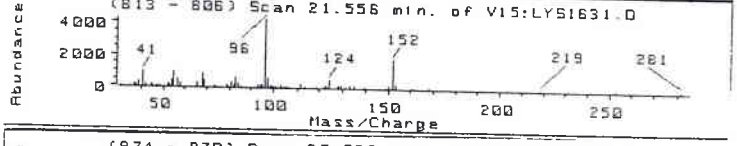

(200 - 197) Scan 5.446 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

E

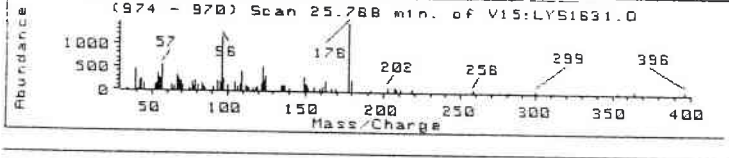

(752 - 727) Scan 19.951 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge


HN
(CH2)4–NH2
O

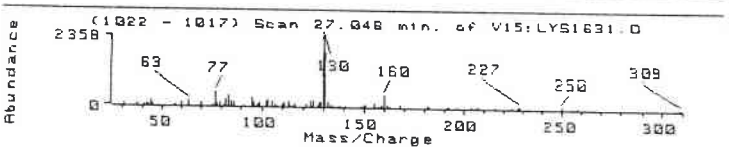
F

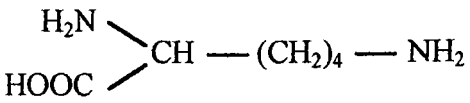

(813 - 806) Scan 21.556 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

G


(974 - 970) Scan 25.788 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge

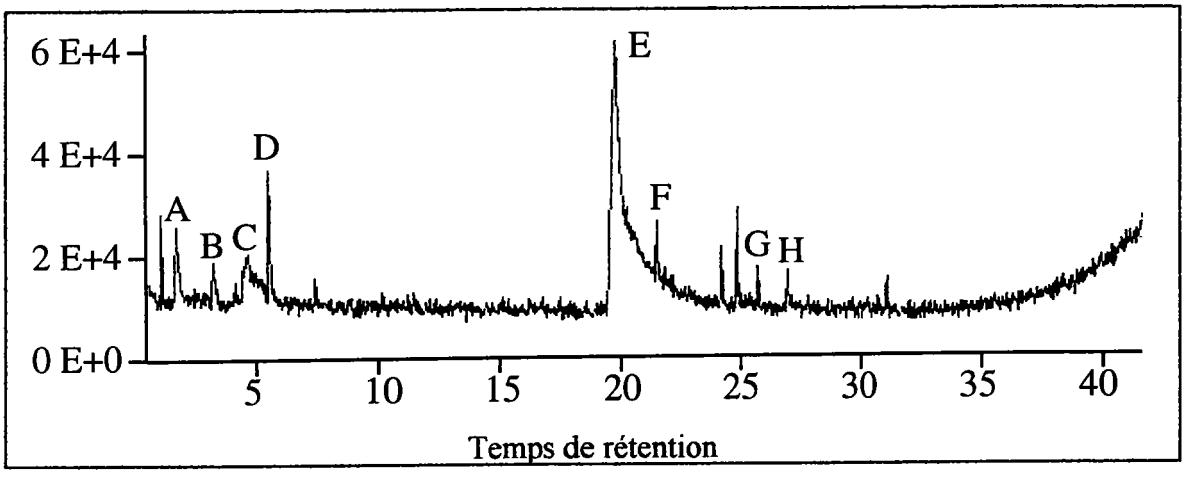
H


(1022 - 1017) Scan 27.048 min. of V15:LYS1631.D
Abundance
Mass/Charge



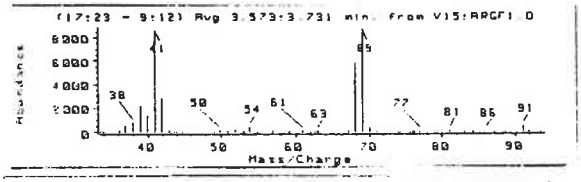
L-LYSINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

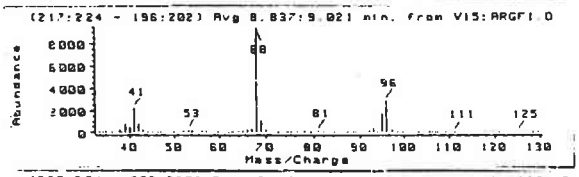


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (3.1 min)	41, 42, 68, **69**	Isoxazole
C (4.5 min)	55, 82, **83**	tétrahydro Pyridine
D (5.4 min)	55, 82, **83**	
E (19.9 min)	**56, 70, 83, 99, 111,** ***128***	**α lactame $(CH_2)_4NH_2$**
F (21.5 min)	58, 81, 96, 124, **152**	
G (25.8 min)	34, 83, 111, **178**	
H (27.0 min)	77, 130, 160	

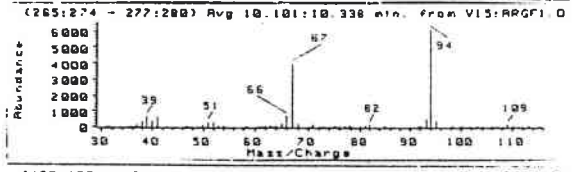
A

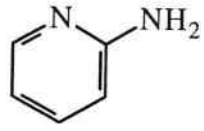


B

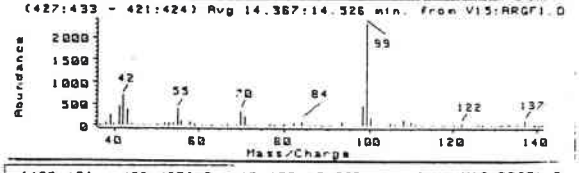


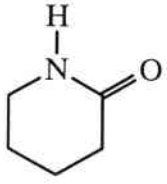
C



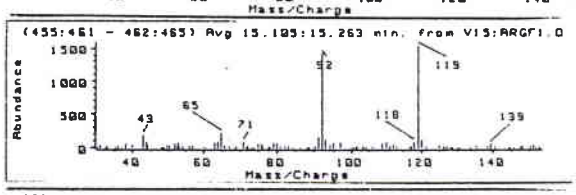


D

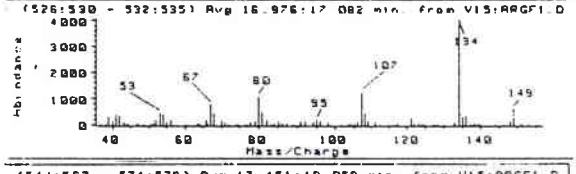




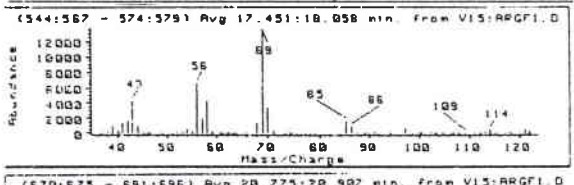
E

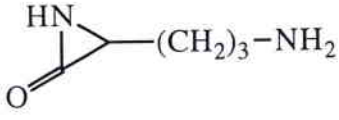


F

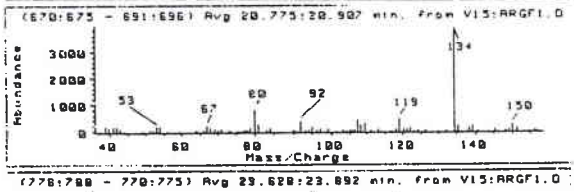


G

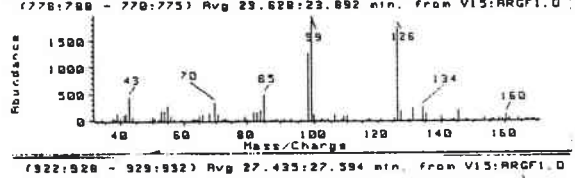




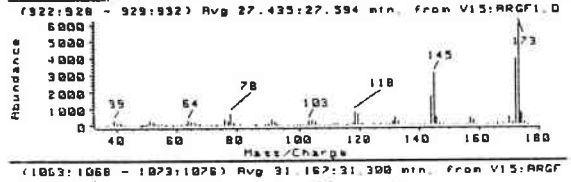
H



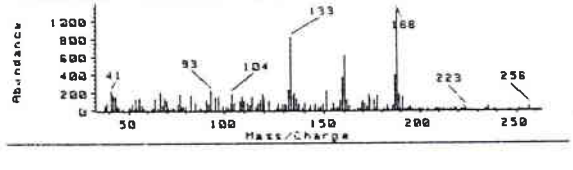
I

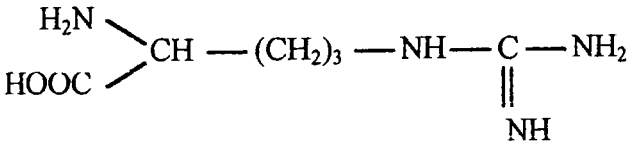


J



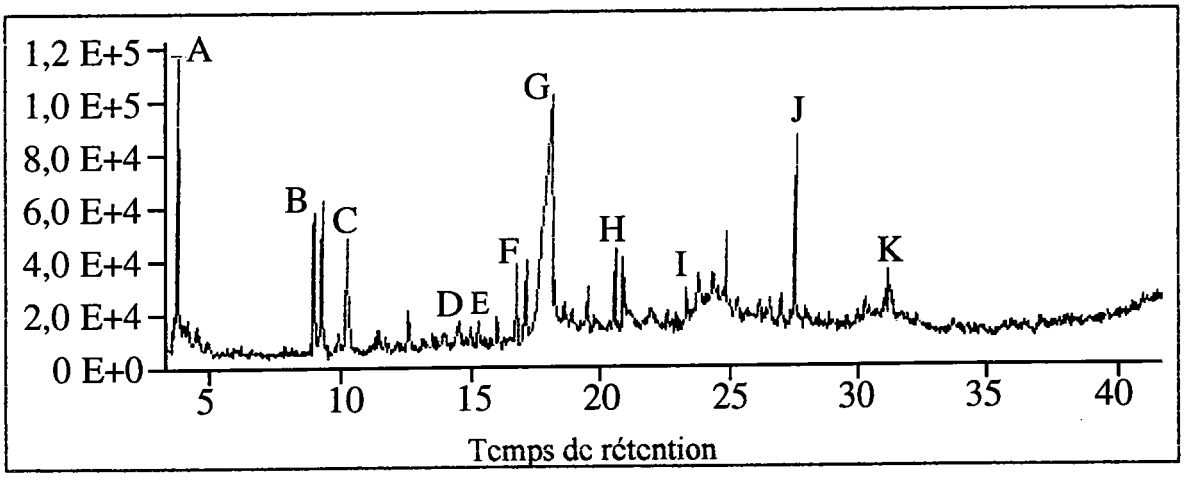
K





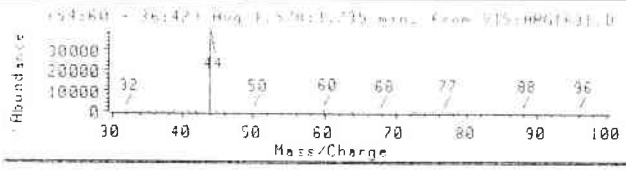
L-ARGININE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

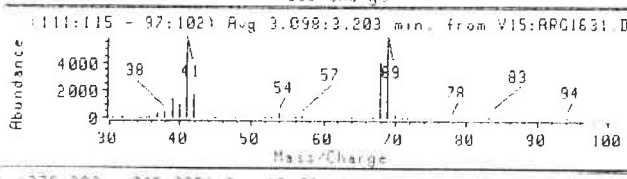


Pics	m/z	molécules proposées
A (3.5 min)	41, 42, 68, 69	Isoxazole
B (8.9 min)	41, 53, 68, 81, 95, 96	
C (10.2 min)	66, 67, 94	2-Pyridinamine
D (14.4 min)	42, 55, 70, 98, 99	2-Pipéridinone
E (15.1 min)	43, 65, 92, 119	
F (16.9 min)	53, 67, 80, 107, 134, 149	
G (17.8 min)	**43, 56, 69, 85, 114**	**α lactame ....**
H (20.8 min)	53, 67, 80, 92, 119, 134, 150	
I (23.6 min)	43, 70, 85, 98, 99, 126	
J (27.4 min)	39, 64, 78, 103, 118, 144, 145, 172, 173	Arginine
K (31.2 min)	133, 155, 168, 223, 256	

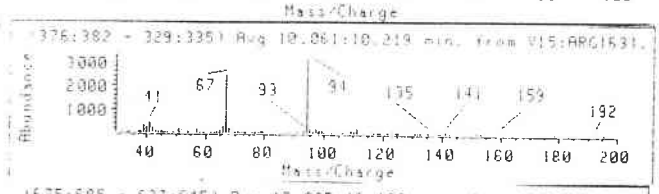
A



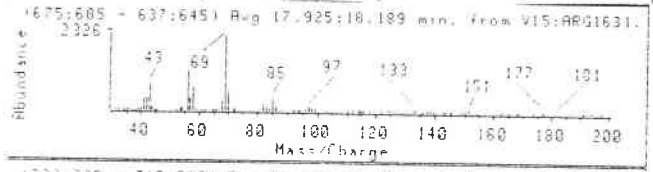
B



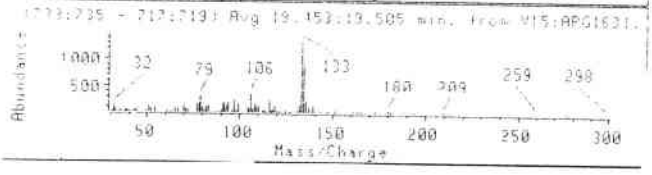
C



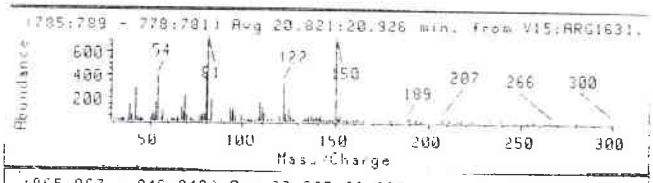
D



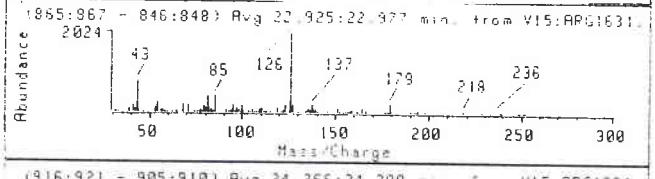
E



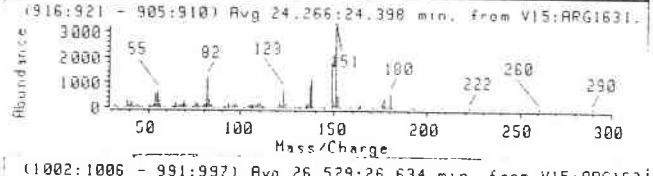
F



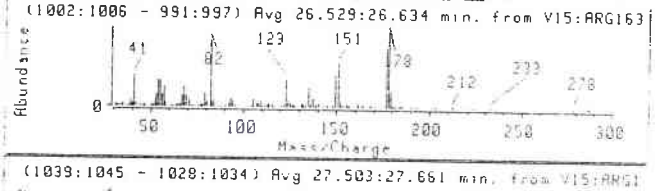
G



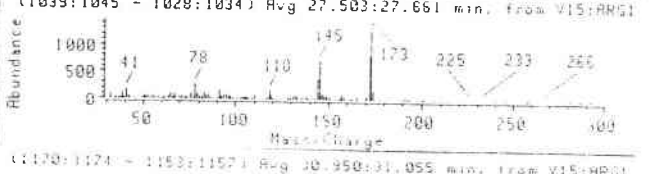
H



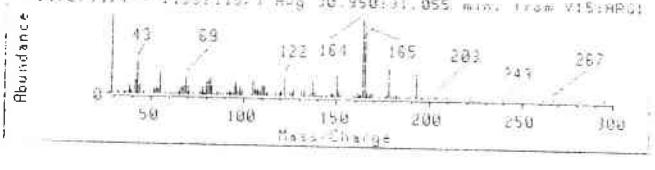
I

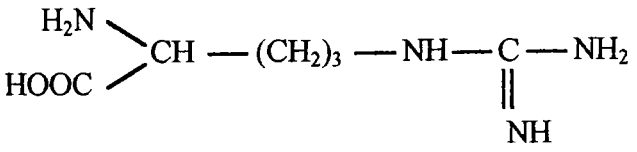


J



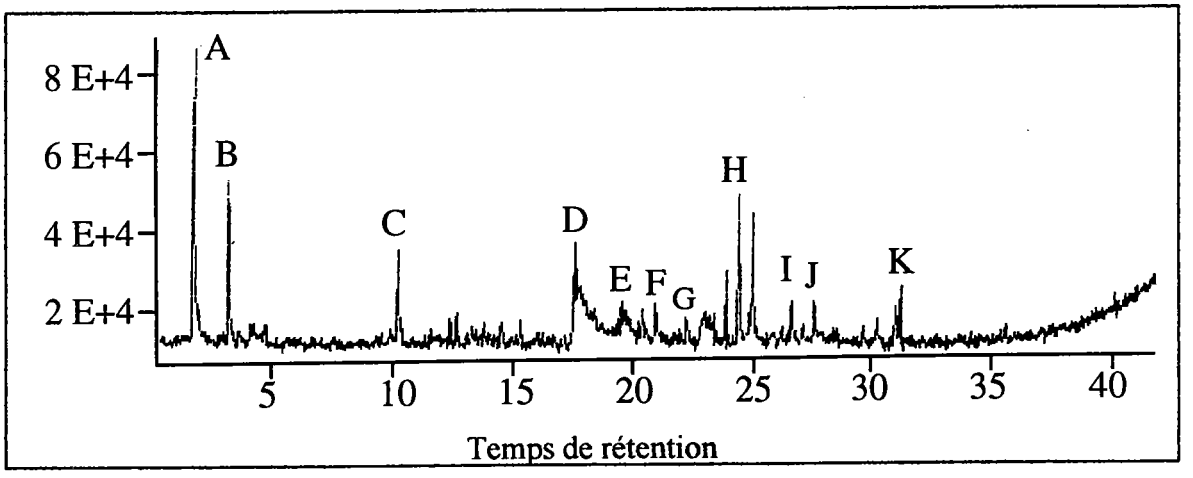
K





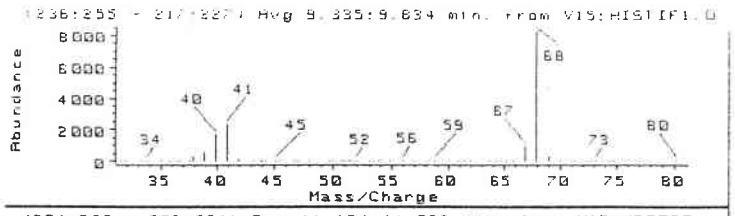
L-ARGININE

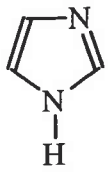
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



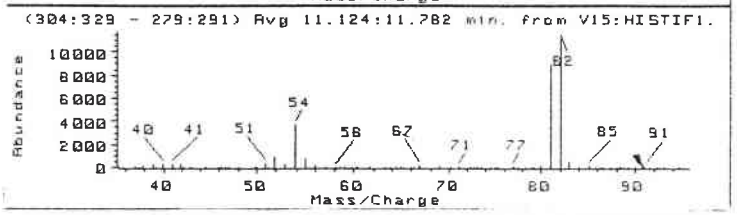
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (3.1 min)	41, 42, 68, *69*	Isoxazole
C (10.0 min)	41, 67, **94**	Pyridine
D (17.9 min)	43, 56, 69, 97, 114	α lactame
E (19.5 min)	79, 106, 133, 134, 180	
F (20.9 min)	54, 81, 122, 150	
G (22.9 min)	43, 85, 126, 179	
H (24.3 min)	55, 82, 123, 149, 151, 180	
I (26.6 min)	41, 82, 123, 151, 177, **178**	
J (27.5 min)	41, 78, 118, 145, 173	L-arginine
K (30.9 min)	43, 164, 165, 178, 193	

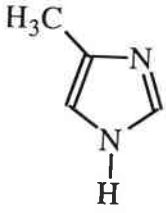
A


Abundance
Mass/Charge
34
40
41
45
52
56
59
67
68
73
80

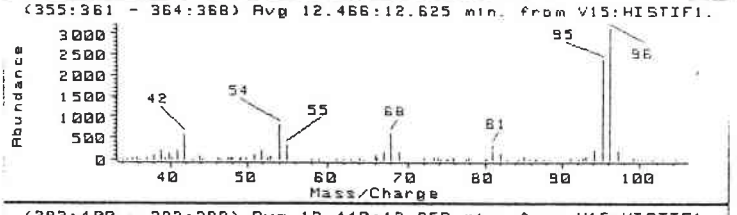


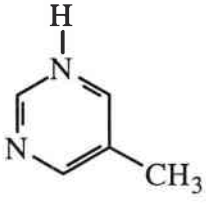
B


(304:329 - 279:291) Avg 11.124:11.782 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
40
41
51
54
56
67
71
77
82
85
91

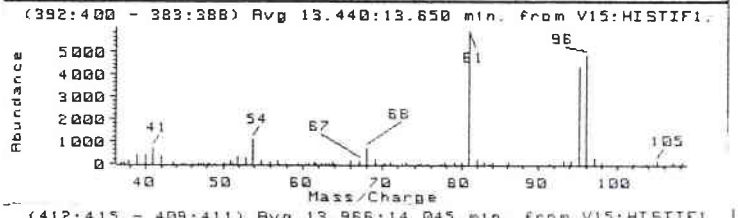


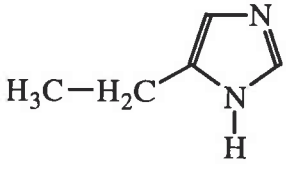
C


(355:361 - 364:368) Avg 12.466:12.625 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
42
54
55
68
81
95
96

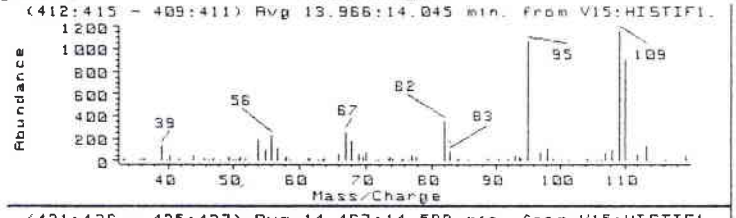


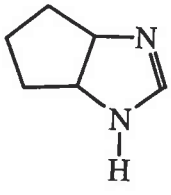
D


(392:400 - 383:388) Avg 13.440:13.650 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
41
54
67
68
81
96
105

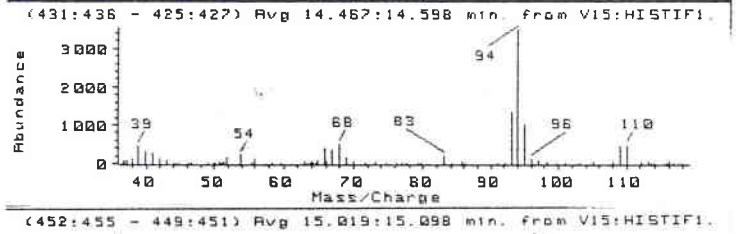


E

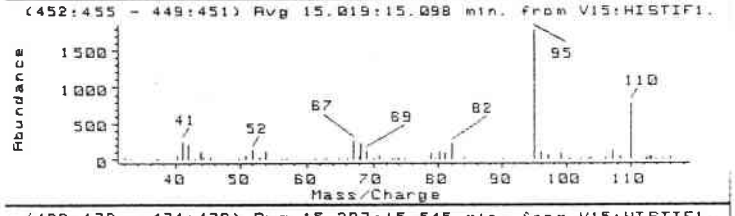

(412:415 - 409:411) Avg 13.966:14.045 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
39
56
67
82
83
95
109



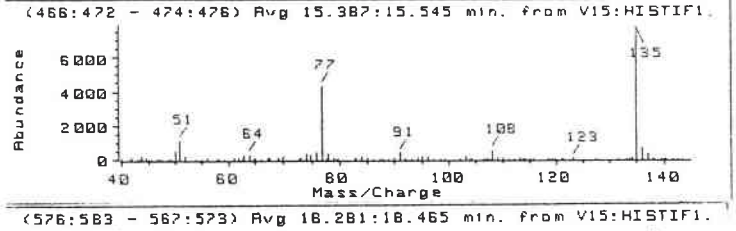
F


(431:436 - 425:427) Avg 14.467:14.598 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
39
54
68
83
94
96
110

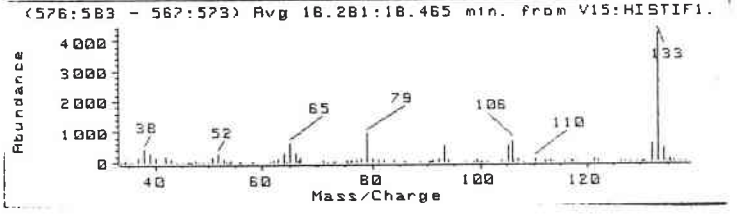
G

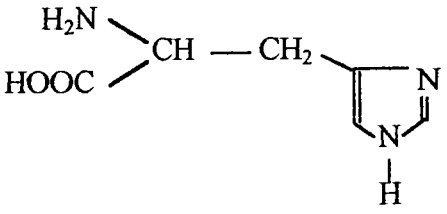

(452:455 - 449:451) Avg 15.019:15.098 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
41
52
67
69
82
95
110

H


(466:472 - 474:476) Avg 15.387:15.545 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
51
64
77
91
108
123
135

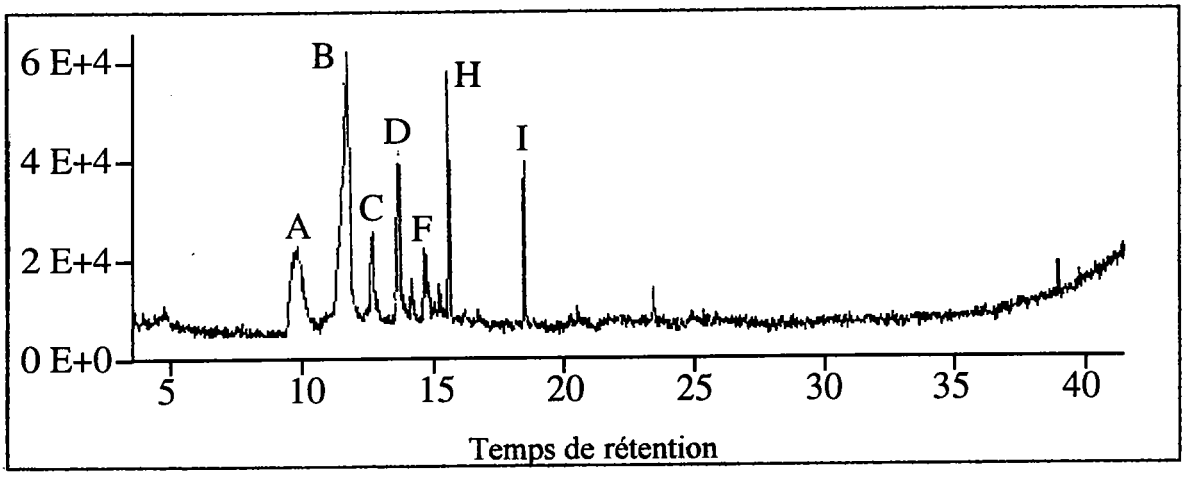
I


(576:583 - 567:573) Avg 18.281:18.465 min. from V15:HISTIF1.
Abundance
Mass/Charge
38
52
65
79
106
110
133



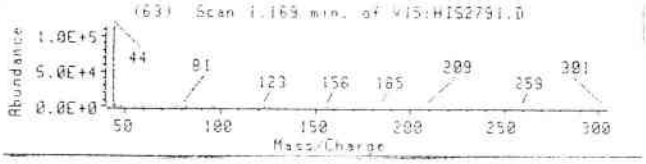
L-HISTIDINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

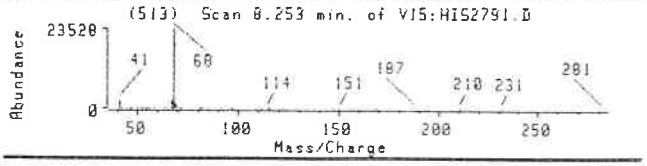


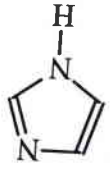
Pics	m/z	molécules proposées
A (9.4 min)	**40, 41, 68**	**Imidazole**
B (11.5 min)	**54, 81, 82**	**Imidazole, 4-méthyl**
C (12.5 min)	42, 54, 55, 68, 81, 95, 96	1H pyrimidine, 5-méthyl
D (13.5 min)	41, 54, 67, 68, 81, 95, 96	Imidazole, 5-éthyl
E (14.0 min)	39, 56, 67, 82, 95, 109, 110	1H Imidazole, 4,5-cyclopropane (?)
F (14.5 min)	54, 68, 83, 93, 94, 95, 109, 110	Imidazole, 5-propène (?)
G (15.0 min)	41, 43, 52, 67, 68, 82, 95, 110	Imidazole, 1,4-cyclopropane (?)
H (15.3 min)	50, 51, 64, 77, 91, 108, 123, 135	
I (18.3 min)	52, 65, 79, 105, 106, 133	

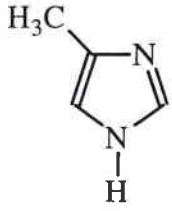
A



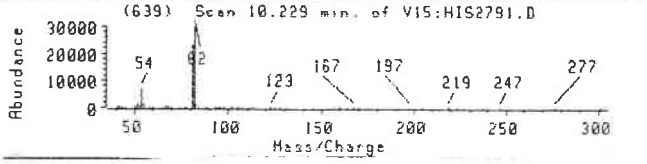
B



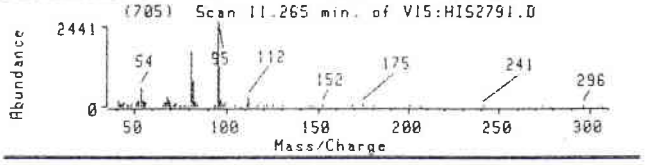


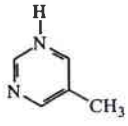


C

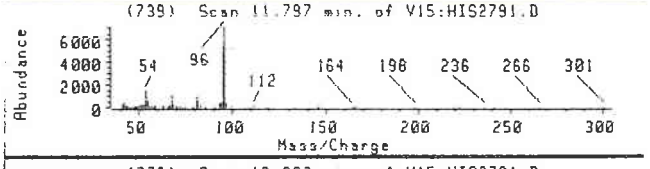


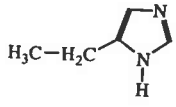
D



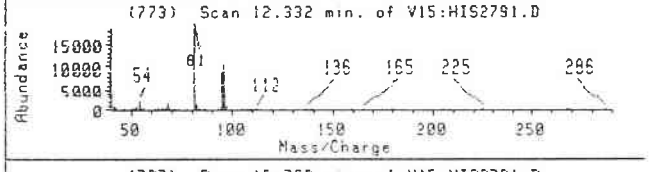


E

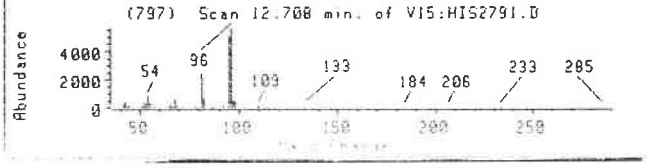




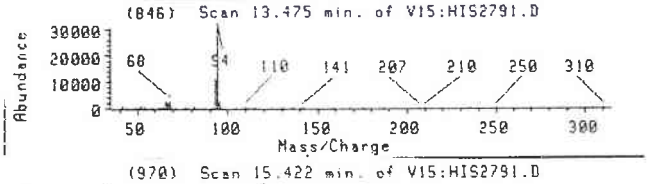
F



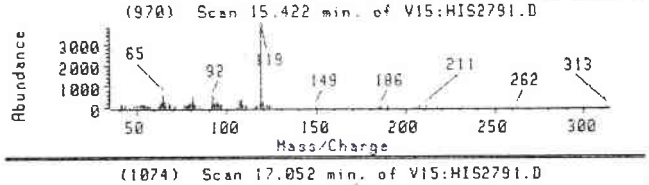
G

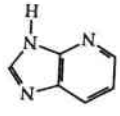


H

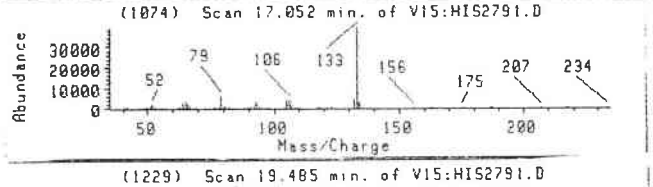


I

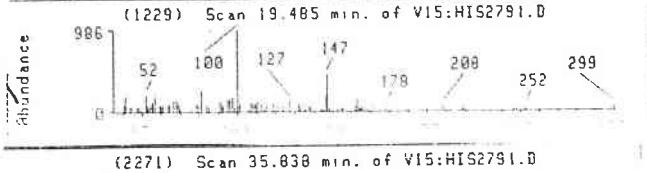




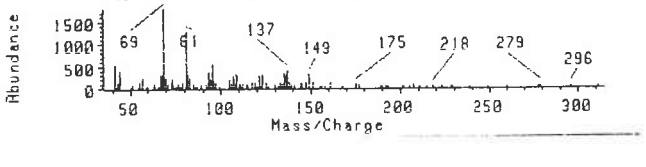
J

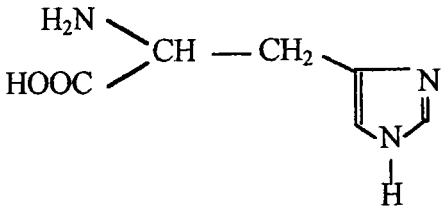


K



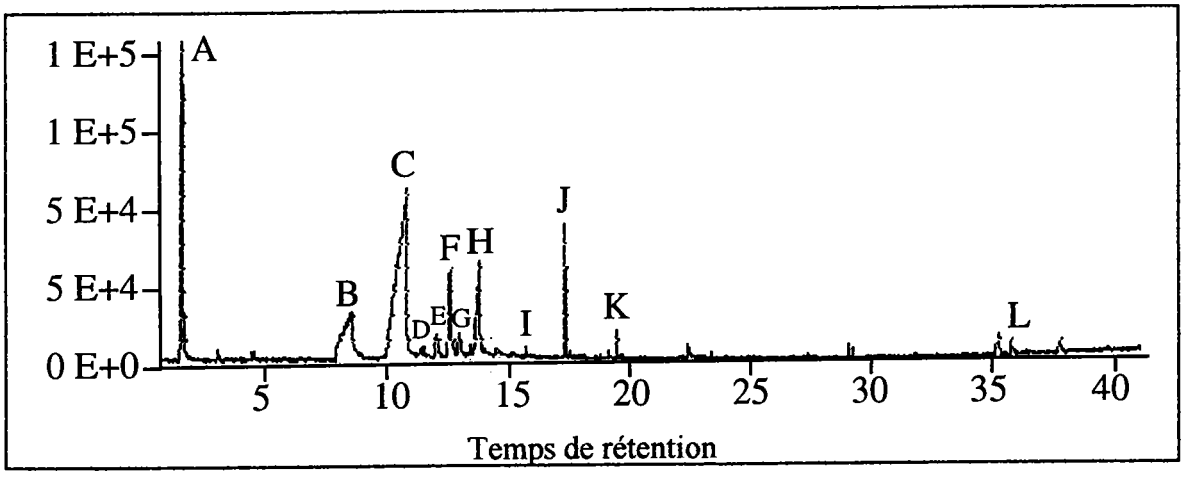
L





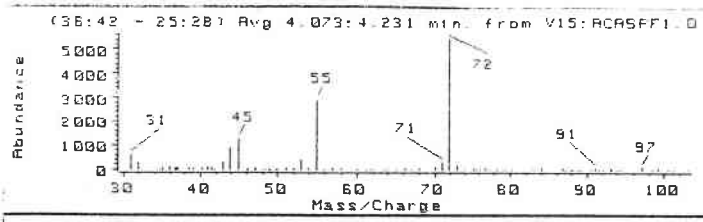
L-HISTIDINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

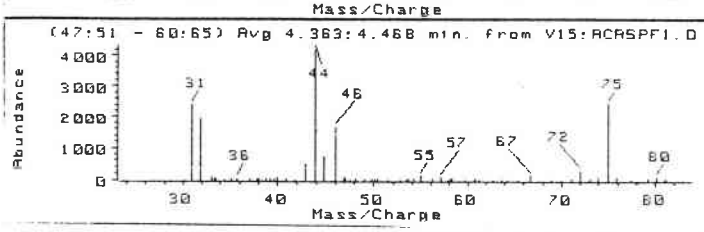


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.1 min)	44	CO_2
B (8.2 min)	**41, *68***	**Imidazole**
C (10.2 min)	**54, 81, *82***	**Imidazole, 4-méthyl**
D (11.3 min)	54, 81, 95, **96**	1H pyrimidine, 5-méthyl
E (11.8 min)	54, 81, 95, **96**	Imidazole, 5-éthyl
F (12.3 min)	54, 81, 95, 96	
G (12.7 min)	54, 81, 95, 96, 109	
H (13.5 min)	68, 93, 94	Imidazole, 5-propène (?)
I (15.4 min)	65, 92, 119	7 Azabenzimidazole
J (17.0 min)	52, 79, 106, 133	
K (19.5 min)	52, 100, 147	
L (35.8 min)	69, 81, 137, 149, 175, 296	

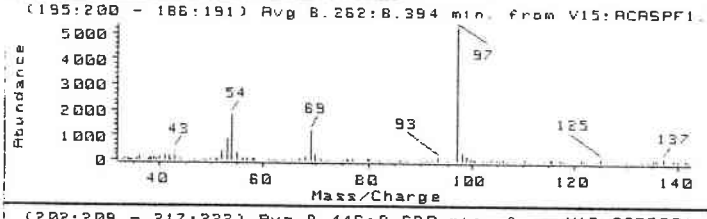
A


(38:42 - 25:28) Avg 4.073:4.231 min. from V15:RCASPF1.D
Abundance
Mass/Charge
31
45
55
71
72
91
97

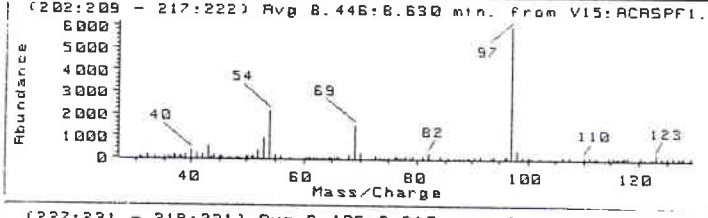
B


(47:51 - 60:65) Avg 4.363:4.468 min. from V15:RCASPF1.D
Abundance
Mass/Charge
31
36
44
46
55
57
67
72
75
80

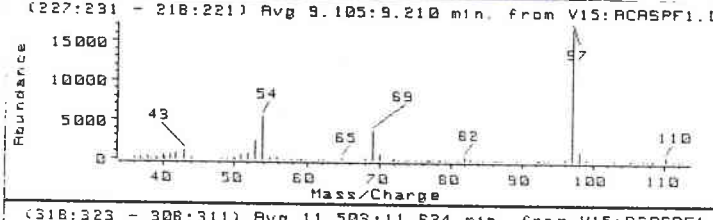
C

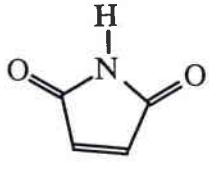

(195:200 - 186:191) Avg 8.262:8.394 min. from V15:RCASPF1.D
Abundance
Mass/Charge
43
54
69
93
97
125
137

D

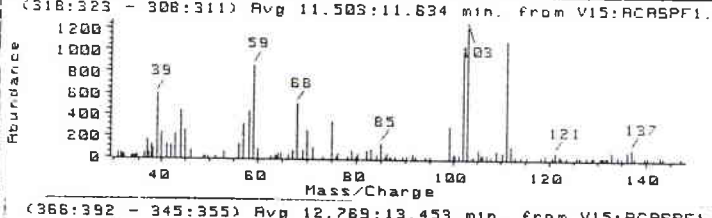

(202:209 - 217:222) Avg 8.446:8.630 min. from V15:RCASPF1.D
Abundance
Mass/Charge
40
54
69
82
97
110
123

E

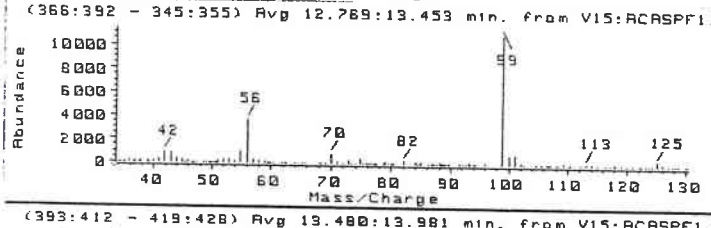

(227:231 - 218:221) Avg 9.105:9.210 min. from V15:RCASPF1.D
Abundance
Mass/Charge
43
54
65
69
82
97
110

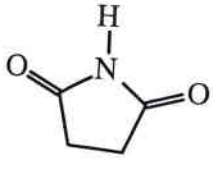

H
N
O
O

F

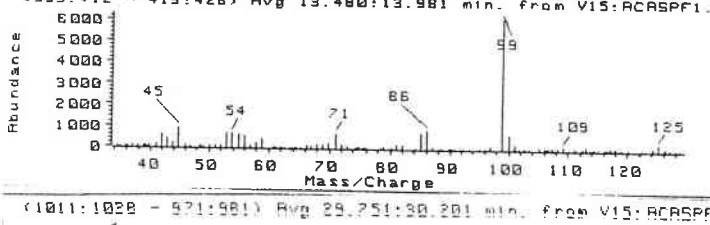

(318:323 - 308:311) Avg 11.503:11.634 min. from V15:RCASPF1.
Abundance
Mass/Charge
39
59
68
85
103
121
137

G

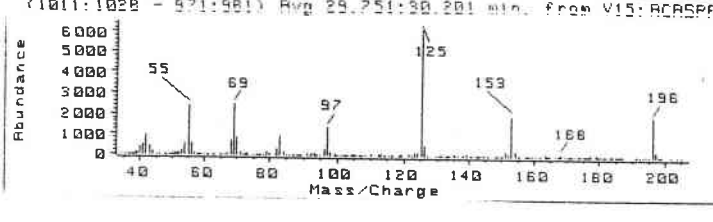

(366:392 - 345:355) Avg 12.789:13.453 min. from V15:RCASPF1.
Abundance
Mass/Charge
42
56
70
82
99
113
125

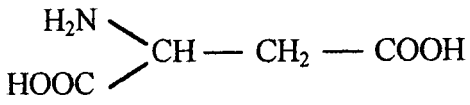

H
N
O
O

H


(393:412 - 419:428) Avg 13.480:13.981 min. from V15:RCASPF1.
Abundance
Mass/Charge
45
54
71
86
99
109
125

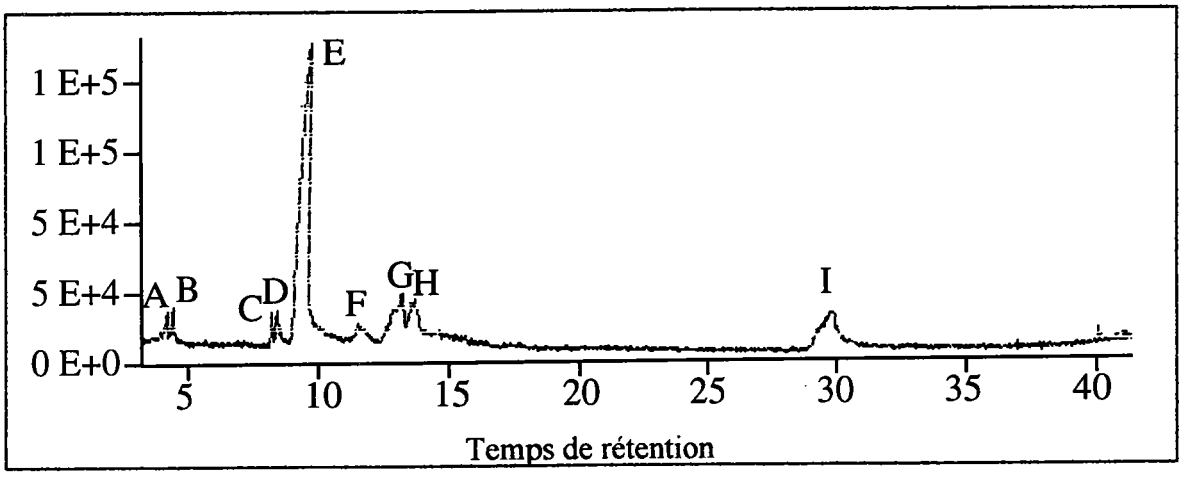
I


(1011:1028 - 971:981) Avg 29.751:30.201 min. from V15:RCASPF
Abundance
Mass/Charge
55
69
97
125
153
168
196



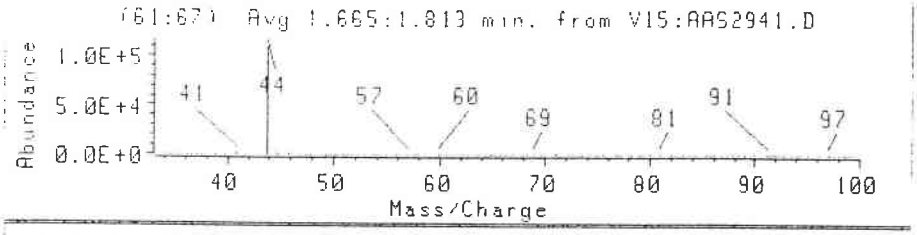
ACIDE ASPARTIQUE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

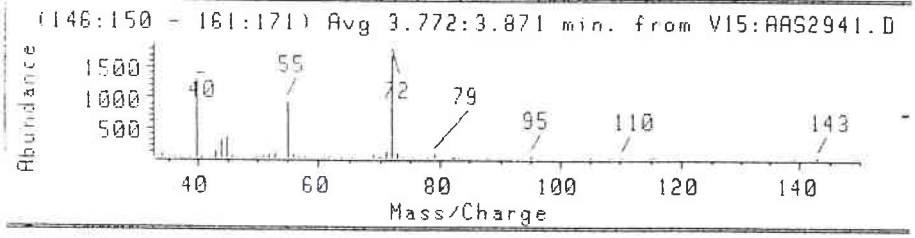


Pics	m/z	molécules proposées
A (4.1 min)	31, 45, 55, 72	Acide 2-propénoïque
B (4.4 min)	31, 32, 44, 46, 75	Glycolamide
C (8.3 min)	43, 54, 69, 97, 125, 137	
D (8.6 min)	40, 54, 69, 82, 97, 110, 123	
E (9.2 min)	**43, 54, 69, 97**	**1H Pyrrole 2,5 dione**
F (11.6 min)	59, 68, 102, 103, 111	
G (13.0 min)	56, 70, 82, 99	2,5 Pyrrolidinedione
H (13.6 min)	45, 54, 71, 86, 99	
I (30.0 min)	55, 69, 97, 125, 153, 196	

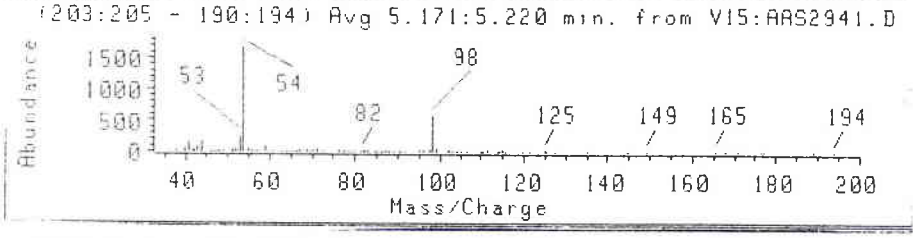
A

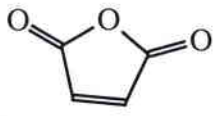

(61:67) Avg 1.665:1.813 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
1.0E+5
5.0E+4
0.0E+0
41
44
57
60
69
81
91
97
40
50
60
70
80
90
100
Mass/Charge

B

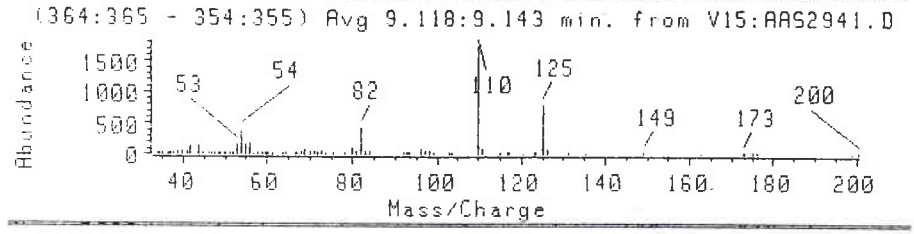

(146:150 - 161:171) Avg 3.772:3.871 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
1500
1000
500
40
55
72
79
95
110
143
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

C

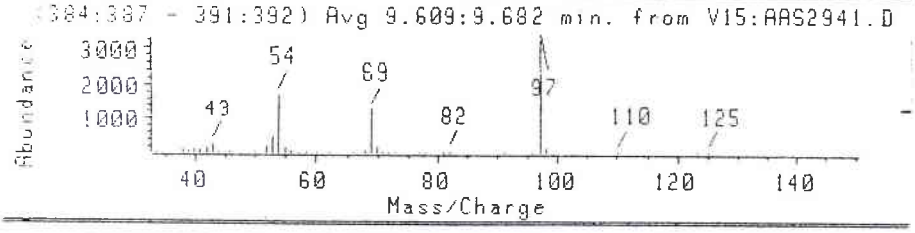

(203:205 - 190:194) Avg 5.171:5.220 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
1500
1000
500
0
53
54
82
98
125
149
165
194
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

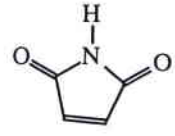


D

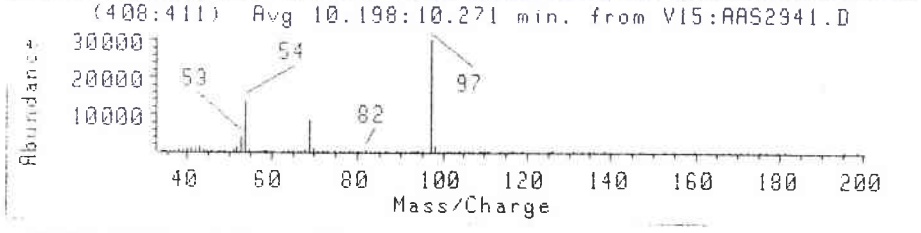

(364:365 - 354:355) Avg 9.118:9.143 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
1500
1000
500
0
53
54
82
110
125
149
173
200
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

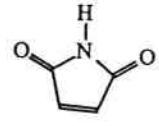
E


(384:387 - 391:392) Avg 9.609:9.682 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
3000
2000
1000
43
54
69
82
97
110
125
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

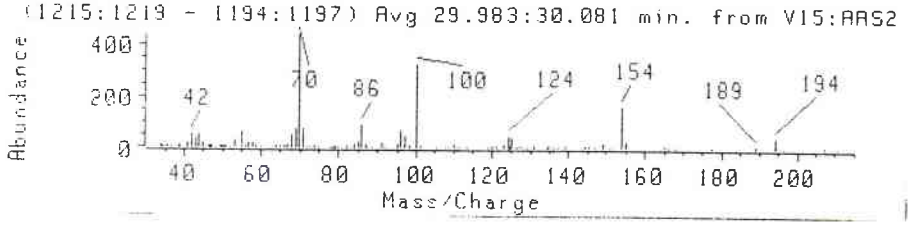


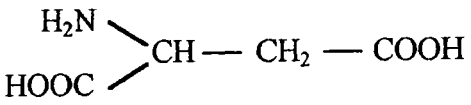
F


(408:411) Avg 10.198:10.271 min. from V15:AAS2941.D
Abundance
30000
20000
10000
53
54
82
97
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge



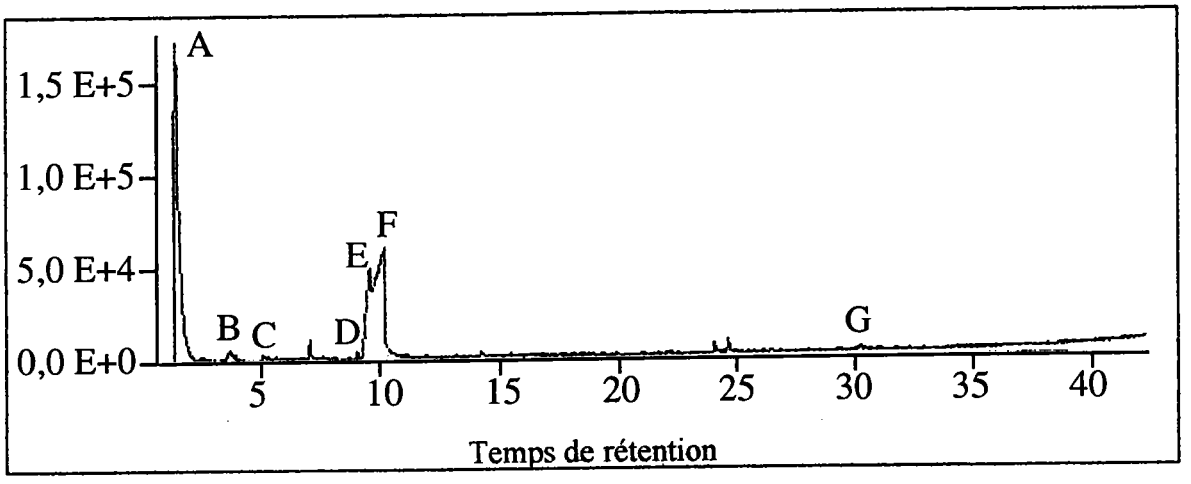
G


(1215:1219 - 1194:1197) Avg 29.983:30.081 min. from V15:AAS2
Abundance
400
200
0
42
70
86
100
124
154
189
194
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge



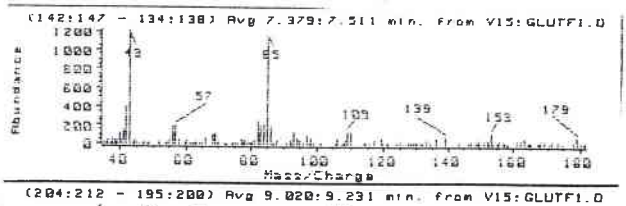
ACIDE ASPARTIQUE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

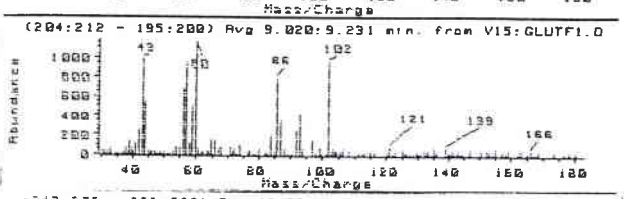


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.7 min)	44	CO_2
B (3.8 min)	40, 55, **72**	Acide 2-propènoïque
C (5.2 min)	54, 98	2,5 furanedione
D (9.1 min)	54, 82, 110, 125	
E (9.6 min)	43, 54, 69, **97**	1H pyrrole-2,5-dione
F (10.2 min)	**54, 69, *97***	**1H pyrrole-2,5-dione**
G (29.9 min)	42, 70, 86, 100, 124, 154, 194	

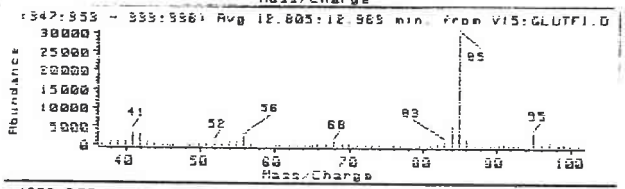
A

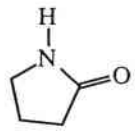


B

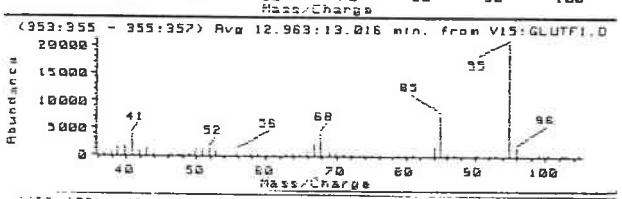


C

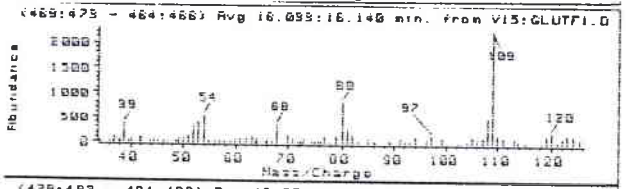




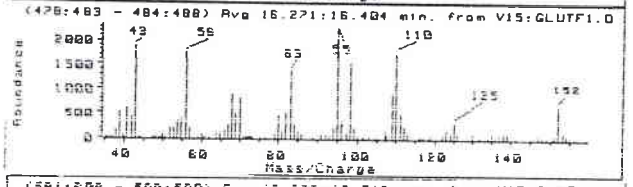
D



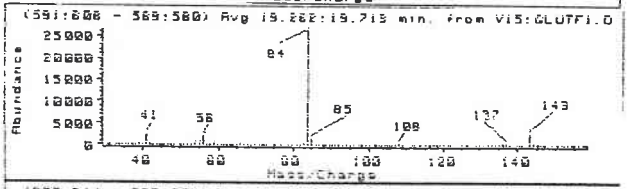
E



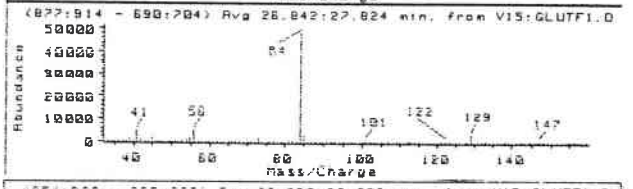
F



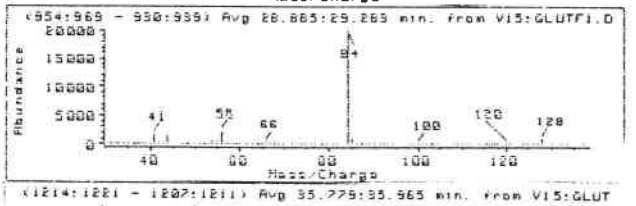
G



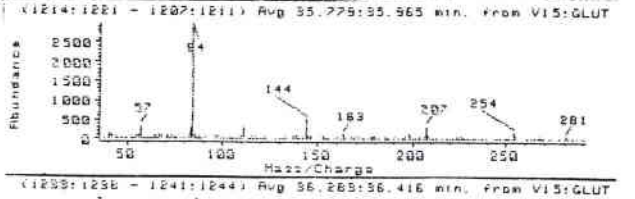
H



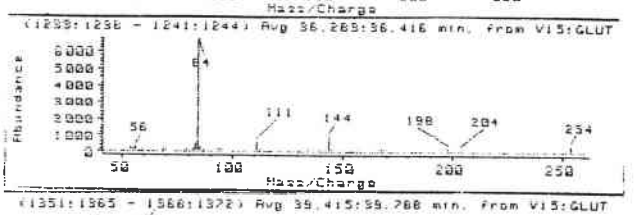
I



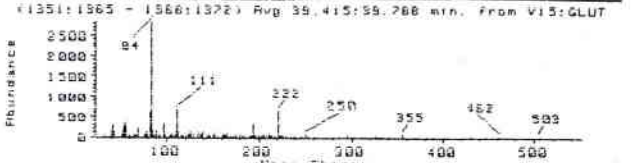
J

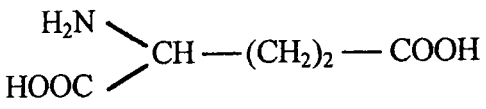


K



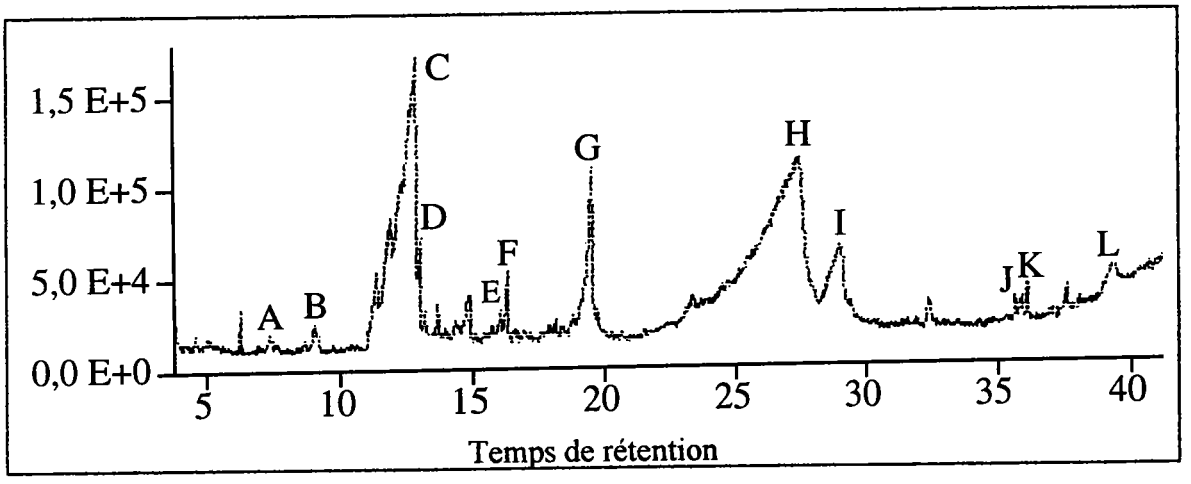
L





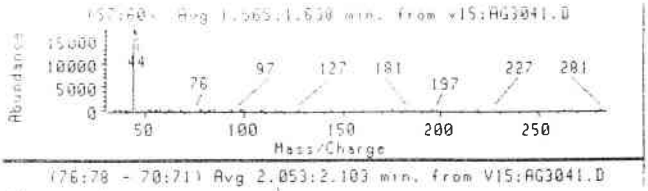
ACIDE GLUTAMIQUE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

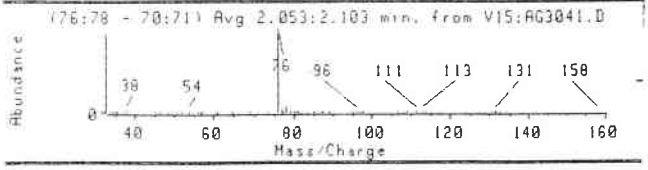


Pics	m/z	molécules proposées
A (7.4 min)	43, 57, 85	
B (9.1 min)	43, 56, 57, 60, 86, 102	
C (12.8 min)	**41, 56, 68, 85, 95**	**2 Pyrrolidinone**
D (12.9 min)	41, 56, 68, 85, 95, 96	
E (16.1 min)	39, 52, 53, 54, 68, 97, 108, 109, 120	
F (16.3 min)	43, 56, 68, 70, 83, 98, 109, 110, 125, 152	
G (19.5 min)	41, 56, 84, 85, 143	
H (27.0 min)	**41, 56, 84, 101, 129, 147**	**Acide glutamique**
I (29.0 min)	41, 56, 84, 100, 128	
J (35.7 min)	57, 84, 111, 144, 163	
K (36.3 min)	56, 84, 111, 144, 198	
L (39.6 min)	84, 111, 198, 222, 250	

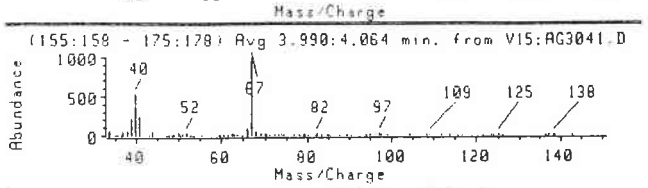
A

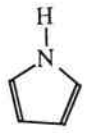

Abundance
15000
10000
5000
0
44
76
97
127
181
197
227
281
50
100
150
200
250
Mass/Charge

B

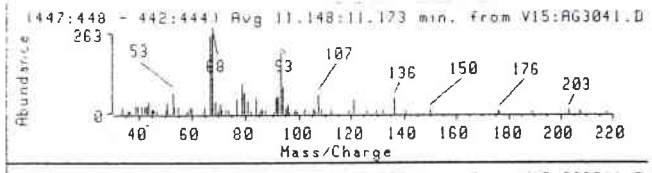

(76:78 - 70:71) Avg 2.053:2.103 min. from V15:AG3041.D
Abundance
38
54
76
96
111
113
131
158
0
40
60
80
100
120
140
160
Mass/Charge

C

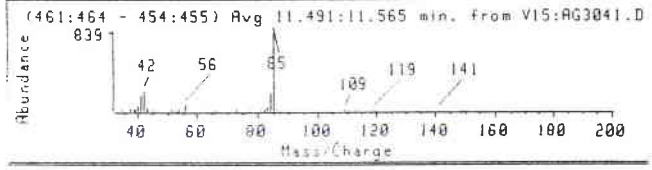

(155:158 - 175:178) Avg 3.990:4.064 min. from V15:AG3041.D
Abundance
1000
500
0
40
52
67
82
97
109
125
138
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

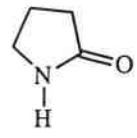


D

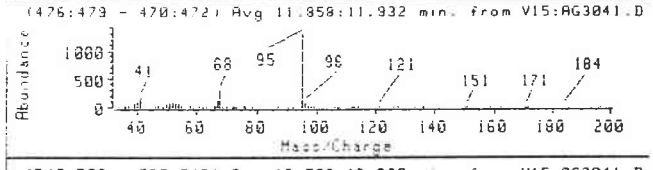

(447:448 - 442:444) Avg 11.148:11.173 min. from V15:AG3041.D
Abundance
263
53
68
93
107
136
150
176
203
0
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Mass/Charge

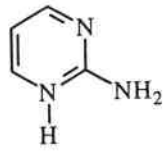
E


(461:464 - 454:455) Avg 11.491:11.565 min. from V15:AG3041.D
Abundance
839
42
56
85
109
119
141
0
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

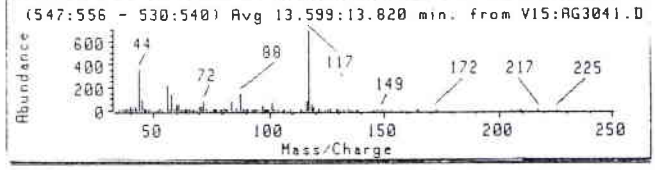


F

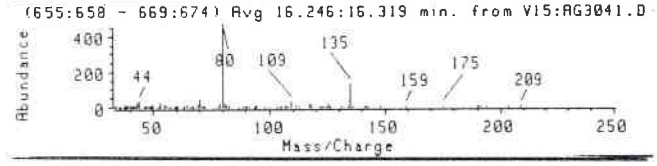

(476:479 - 470:472) Avg 11.858:11.932 min. from V15:AG3041.D
Abundance
1000
500
0
41
68
95
98
121
151
171
184
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge



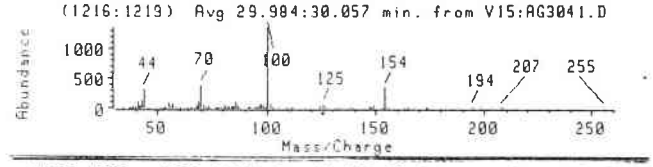
G


(547:556 - 530:540) Avg 13.599:13.820 min. from V15:AG3041.D
Abundance
600
400
200
0
44
72
88
117
149
172
217
225
50
100
150
200
250
Mass/Charge

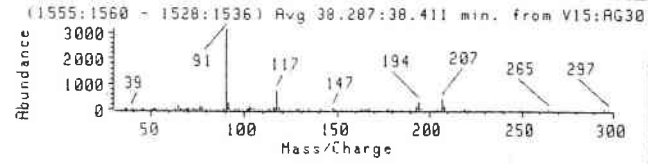
H

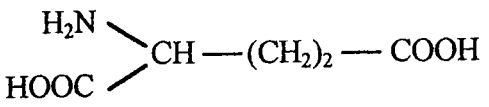

(655:658 - 669:674) Avg 16.246:16.319 min. from V15:AG3041.D
Abundance
400
200
0
44
80
109
135
159
175
209
50
100
150
200
250
Mass/Charge

I


(1216:1219) Avg 29.984:30.057 min. from V15:AG3041.D
Abundance
1000
500
0
44
70
100
125
154
194
207
255
50
100
150
200
250
Mass/Charge

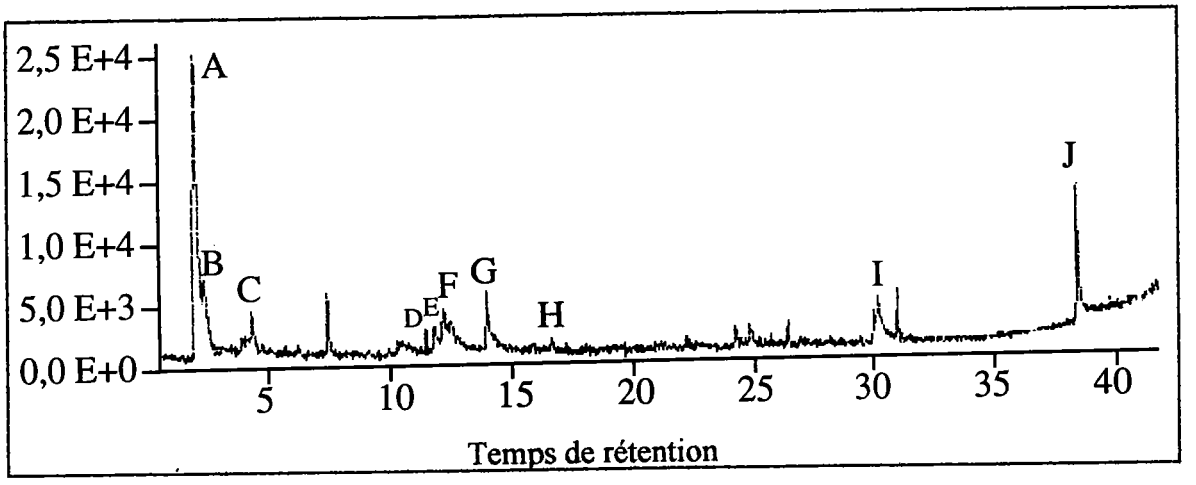
J


(1555:1560 - 1528:1536) Avg 38.287:38.411 min. from V15:AG30
Abundance
3000
2000
1000
0
39
91
117
147
194
207
265
297
50
100
150
200
250
300
Mass/Charge



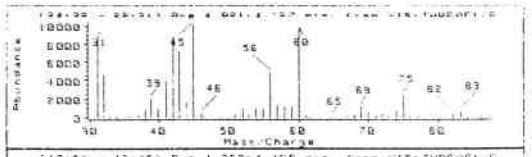
ACIDE GLUTAMIQUE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

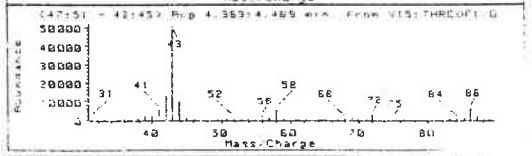


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	44	CO_2
B (2.1 min)	38, 54, **76**	
C (4.0 min)	39, 40, 41, **67**	1H Pyrrole
D (11.1 min)	53, 67, 68, 93, 107, 121, 136	
E (11.5 min)	42, 56, 84, **85**	2 Pyrrolidinone
F (11.9 min)	41, 68, **95**	2-Pyrimidinamine
G (13.6 min)	44, 56, 72, 88, **117**	
H (16.3 min)	80, 109, **135**	
I (30.0 min)	44, 70, 100, 125, **154**	
J (38.3 min)	91, 117, 147, 194, 207	

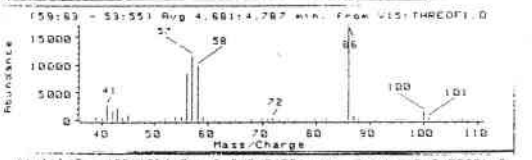
A



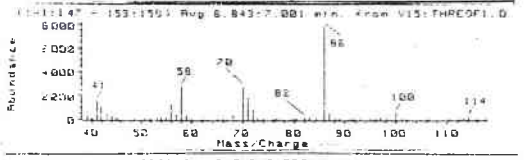
B



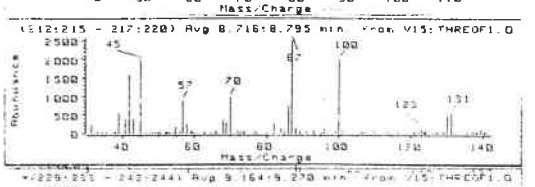
C



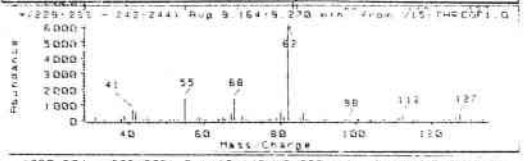
D



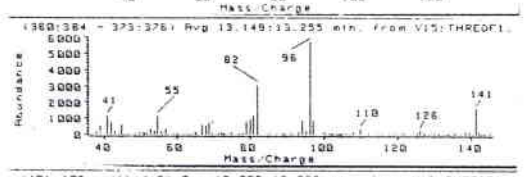
E



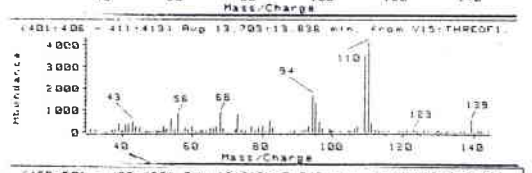
F



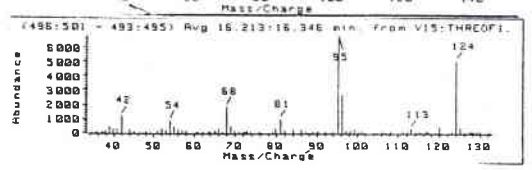
G



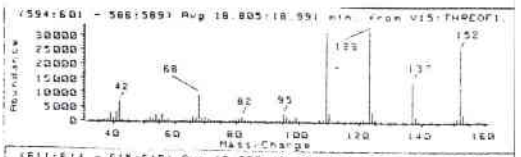
H



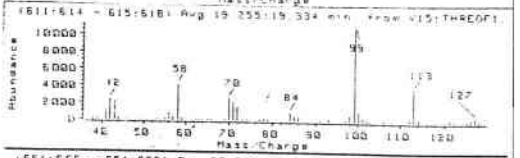
I



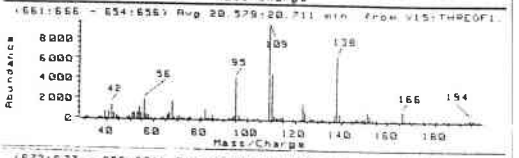
J



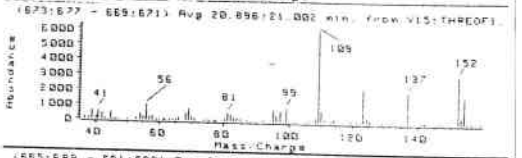
K



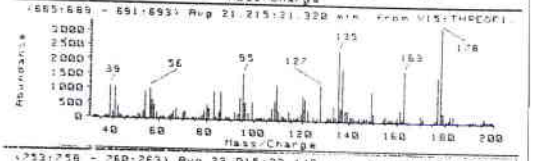
L



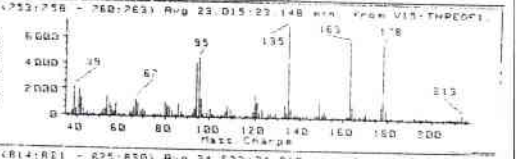
L′



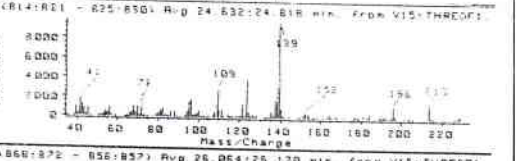
M



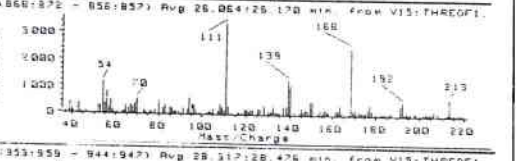
N



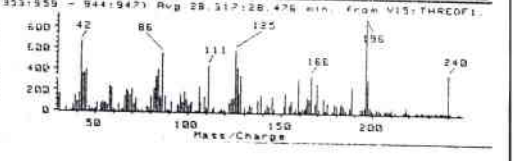
O

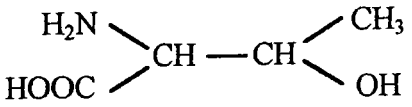


P



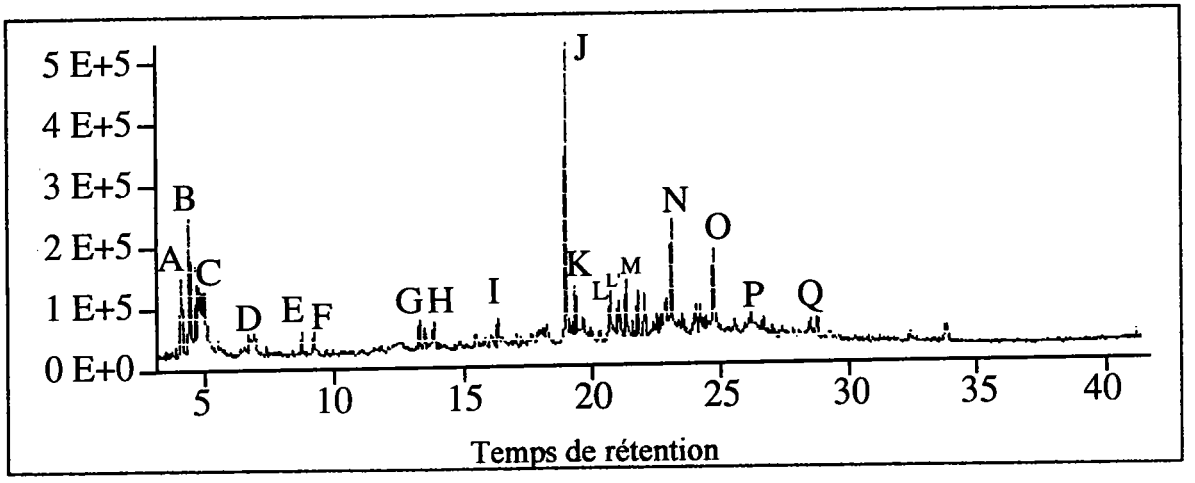
Q





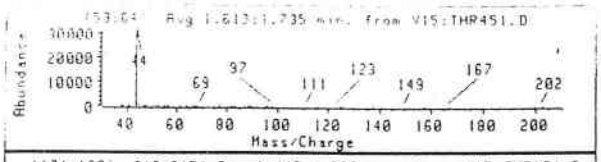
L-THREONINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

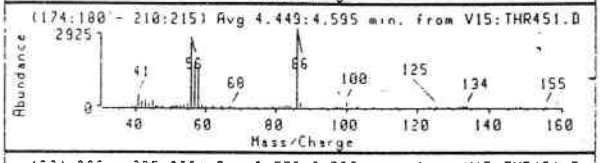


Pics	m/z	molécules proposées
A (4.1 min)	31, 45, 60, 75	
B (4.4 min)	43, 58, 72, 86	
C (4.7 min)	43, 57, 58, 86, 100	
D (6.9 min)	41, 58, 70, 86, 100, 114	
E (8.7 min)	45, 57, 70, 87, 100, 130, 131	
F (9.1 min)	41, 55, 68, 82, 96, 112, 127	
G (13.2 min)	41, 55, 82, 96, 110, 126, 141	
H (13.8 min)	43, 56, 68, 94, 109, 110, 139	
I (16.3 min)	42, 54, 68, 81, 95, 96, 124	
J (18.9 min)	**42, 68, 109, 123, 137, 152**	
K (19.2 min)	42, 58, 70, 84, 99, 113, 127	
L (20.6 min)	42, 56, 95, 109, 138, 166, 194	
L' (20.9 min)	41, 56, 109, 137, 152, 154	
M (21.2 min)	39, 56, 95, 127, 135, 163, 178	
N (23.1 min)	39, 95, 135, 163, 178	
O (24.7 min)	41, 72, 109, 139, 152, 196	
P (26.1 min)	54, 70, 111, 139, 168, 192	
Q (28.4 min)	42, 86, 111, 125, 166, 196, 240	

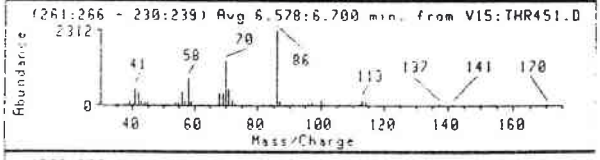
A



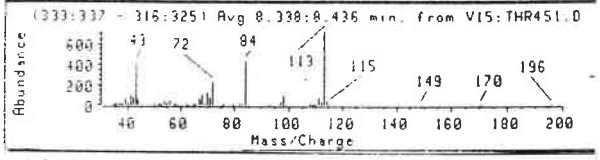
B



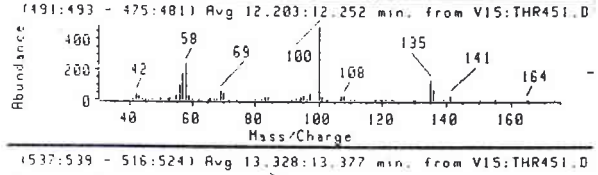
C



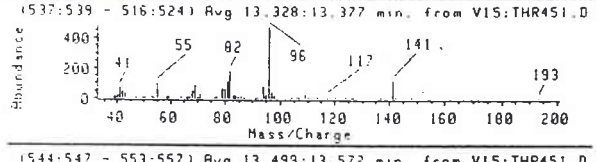
D



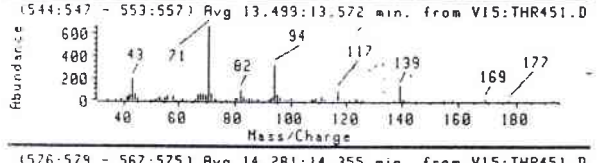
E



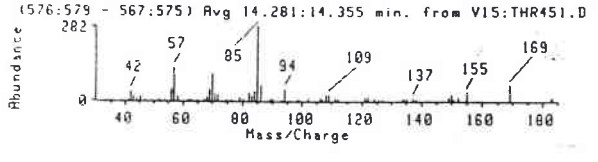
F



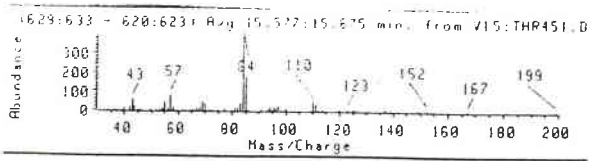
G



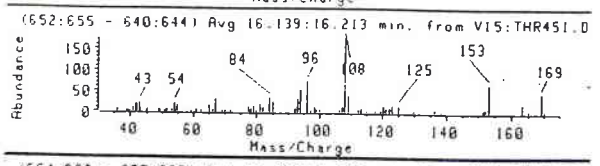
H



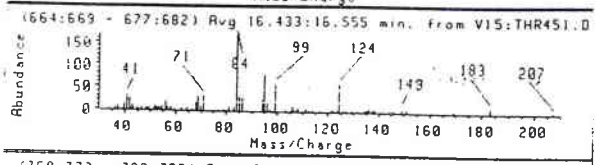
I



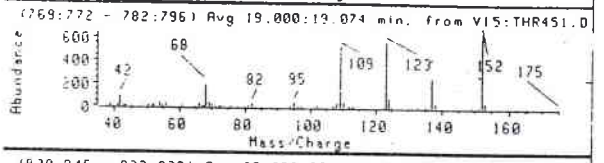
J



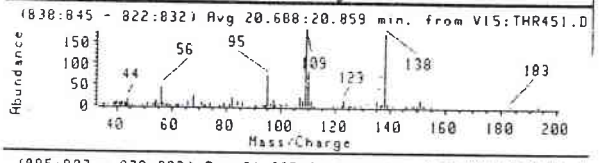
K



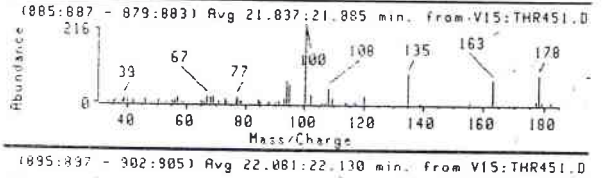
L



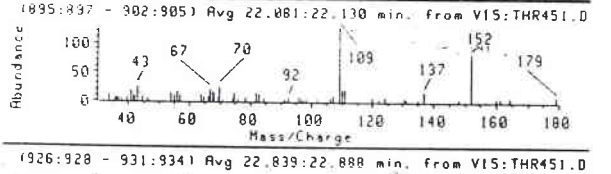
M



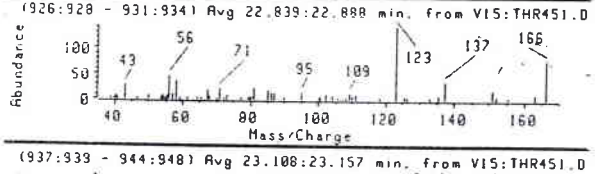
N



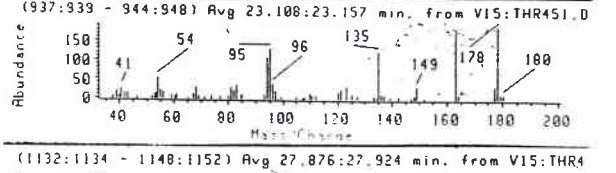
O



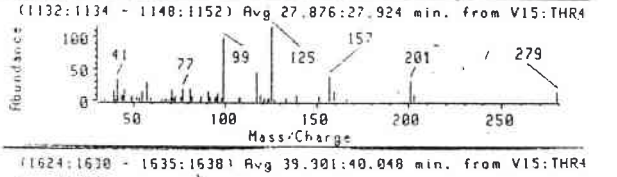
P



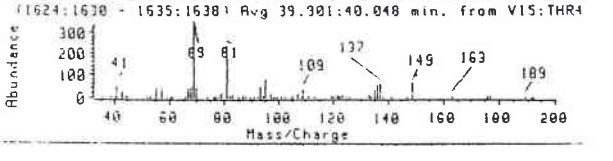
Q

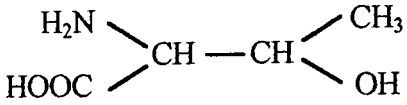


R



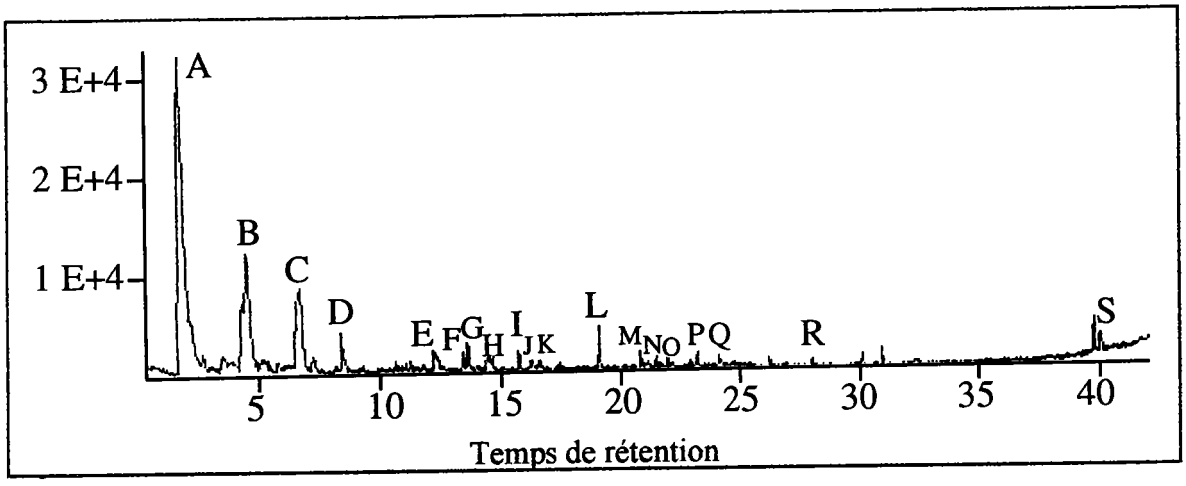
S



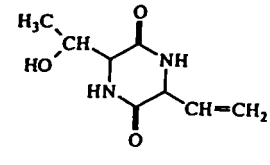


L-THREONINE

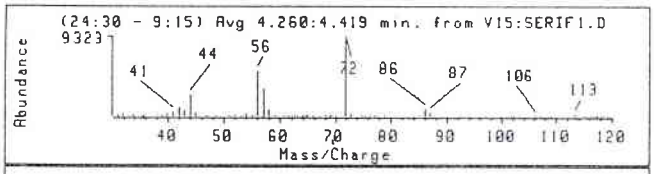
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



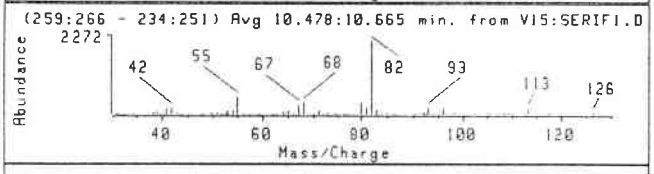
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.7 min)	44	CO_2
B (4.5 min)	**41, 56, 57, 58, 86, *100***	**α lactame**
C (6.6 min)	**41, 42, 58, 70, 71, 86, 100, *113***	
D (8.4 min)	43, 72, 84, 98, 113, 114	
E (12.2 min)	42, 57, 58, 69, 70, 100, 135, **136**, 155	
F (13.3 min)	41, 55, 70, 82, 96, 117, 126, **141**, 193	
G (13.5 min)	43, 71, 82, 94, 117, **139, 154**, 169, 177	
H (14.3 min)	42, 57, 70, 85, 94, 109, 124, 155, **169**	
I (15.6 min)	43, 57, 84, 85, 110, **135, 152**	
J (16.2 min)	43, 54, 84, 96, 108, **153, 169**	
K (16.5 min)	41, 71, 84, 99, 124, **183**	
L (19.0 min)	42, 68, 82, 95, 109, 123, 137, **152**	
M (20.7 min)	44, 56, 95, 109, 110, 138, **152, 166**, 183	
N (21.8 min)	67, 77, 100, 108, 120, 135, 163, **178**	
O (22.1 min)	43, 70, 109, 120, 124, 137, **152**, 179	Dicétopipérazine - H_2O
P (22.8 min)	43, 56, 58, 123, 137, 151, **166**	
Q (23.1 min)	54, 94, 95, 135, 163, **178**	
R (27.9 min)	41, 99, 125, 157, 201, 279	
S (40.0 min)	41, 69, 81, 95, 109, 137, 149, 163 ,189	



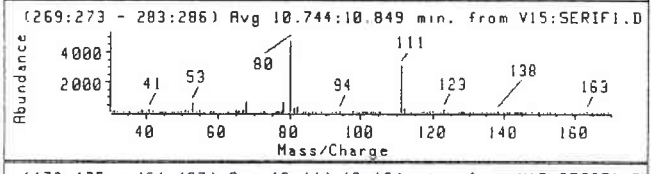
A


(24:30 - 9:15) Avg 4.260:4.419 min. from V15:SERIF1.D
9323
Abundance
41
44
56
72
86
87
106
113
40 50 60 70 80 90 100 110 120
Mass/Charge

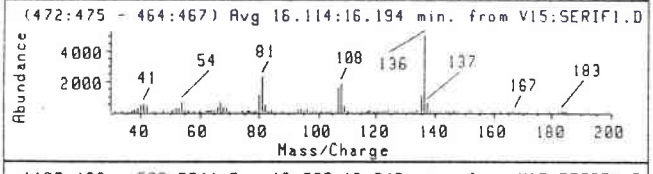
B


(259:266 - 234:251) Avg 10.478:10.665 min. from V15:SERIF1.D
2272
Abundance
42
55
67
68
82
93
113
126
40 60 80 100 120
Mass/Charge

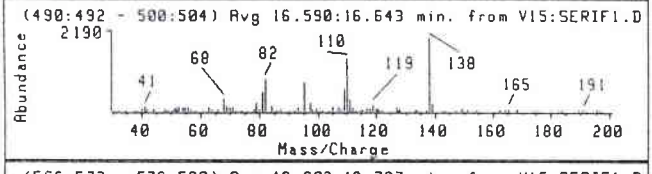
C


(269:273 - 283:286) Avg 10.744:10.849 min. from V15:SERIF1.D
4000
2000
Abundance
41
53
80
94
111
123
138
163
40 60 80 100 120 140 160
Mass/Charge

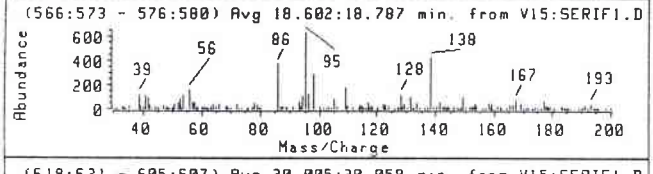
D


(472:475 - 464:467) Avg 16.114:16.194 min. from V15:SERIF1.D
4000
2000
Abundance
41
54
81
108
136
137
167
183
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge

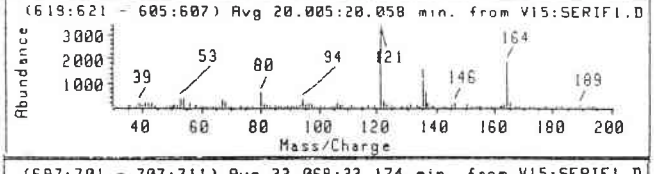
E


(490:492 - 500:504) Avg 16.590:16.643 min. from V15:SERIF1.D
2190
Abundance
41
68
82
110
119
138
165
191
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge

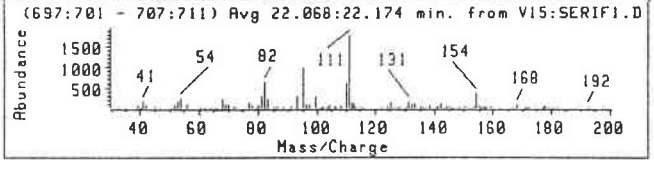
F

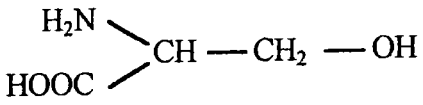

(566:573 - 576:580) Avg 18.602:18.707 min. from V15:SERIF1.D
600
400
200
0
Abundance
39
56
86
95
128
138
167
193
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge

G


(619:621 - 605:607) Avg 20.005:20.058 min. from V15:SERIF1.D
3000
2000
1000
Abundance
39
53
80
94
121
146
164
189
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge

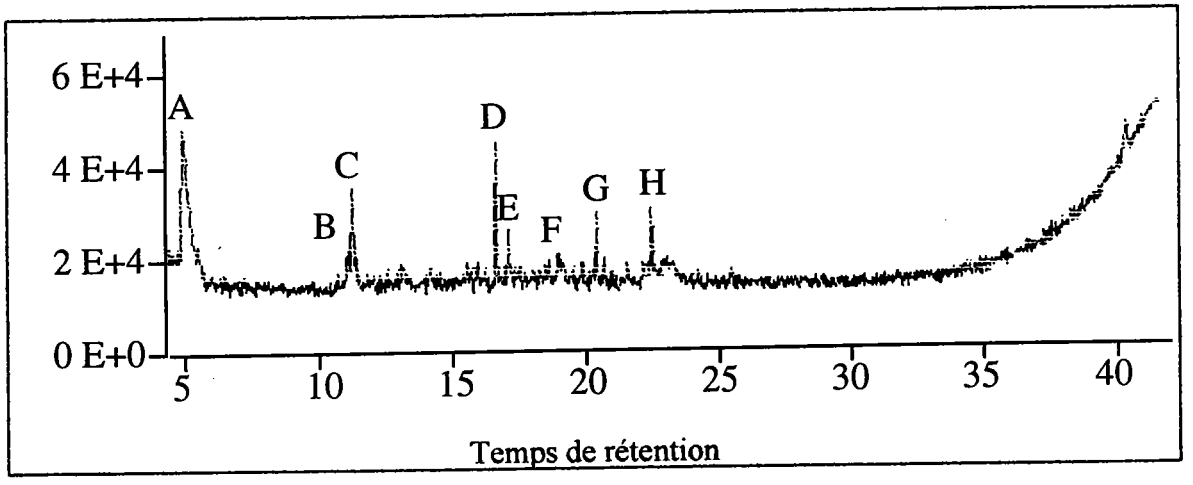
H


(697:701 - 707:711) Avg 22.068:22.174 min. from V15:SERIF1.D
1500
1000
500
Abundance
41
54
82
111
131
154
168
192
40 60 80 100 120 140 160 180 200
Mass/Charge



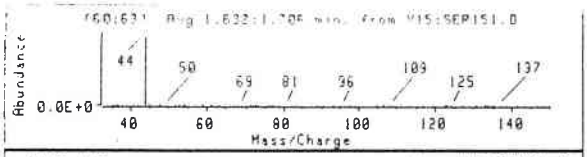
L-SERINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

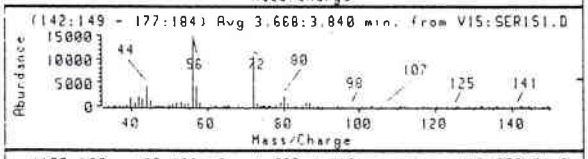


Pics	m/z	molécules proposées
A (4.4 min)	32, 44, 58, 72, 85	AA -H_2NOH
B (10.5 min)	41, 55, 68, 80, 82, 96, 113	
C (10.7 min)	41, 53, 68, 78, 80, 94, 111	
D (16.1 min)	54, 81, 108, 136	
E (16.5 min)	68, 81, 94, 110, 121, 138	
F (18.6 min)	56, 86, 95, 97, 138, 167, 193	
G (20.0 min)	54, 80, 121, 135, 164	
H (22.1 min)	54, 68, 95, 111, 125, 154, 168	

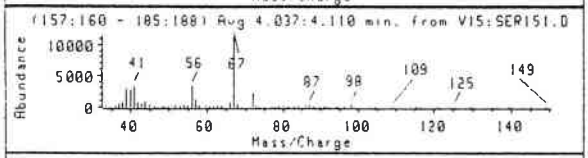
A



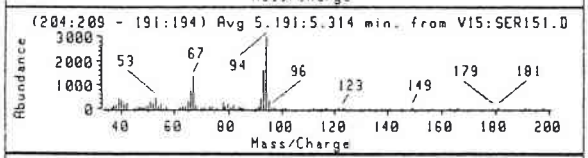
B



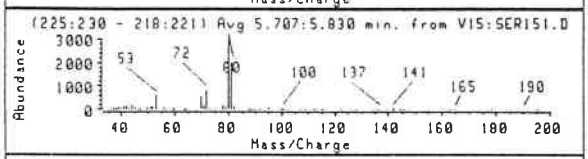
C

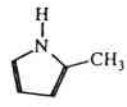


D

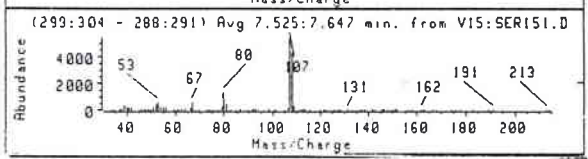


E

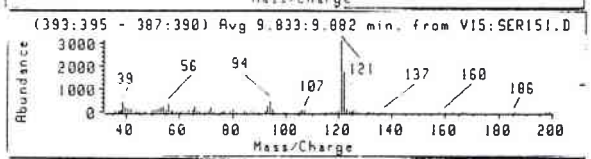


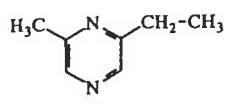


F

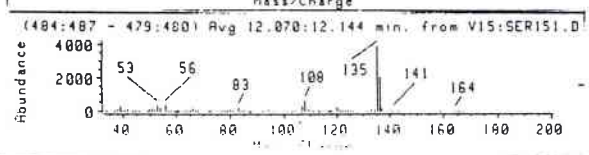


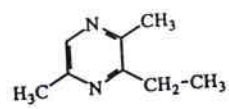
G



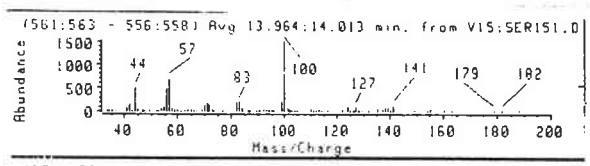


H

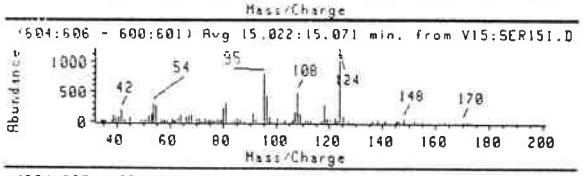




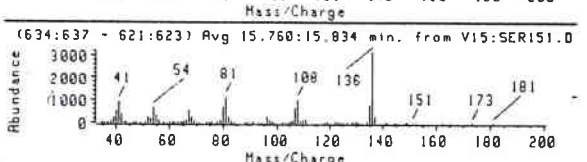
I

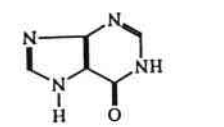


J

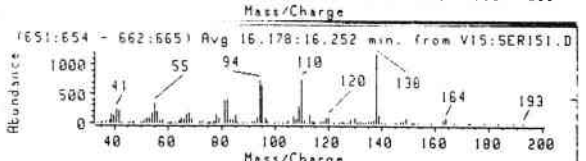


K

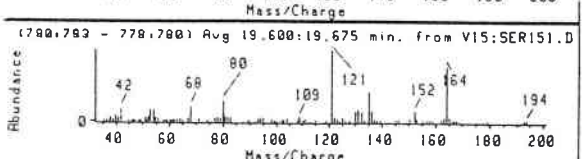




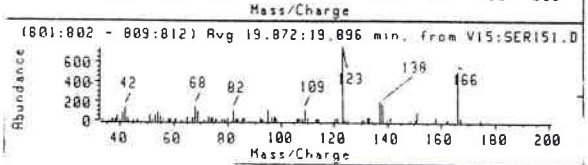
L

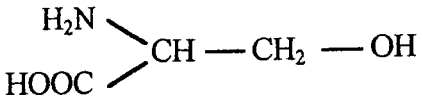


M



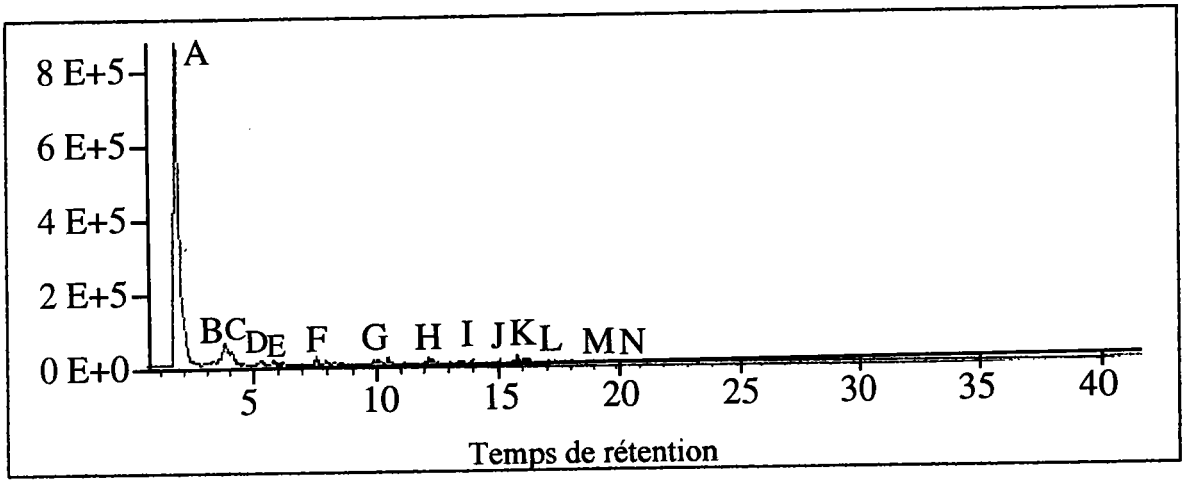
N



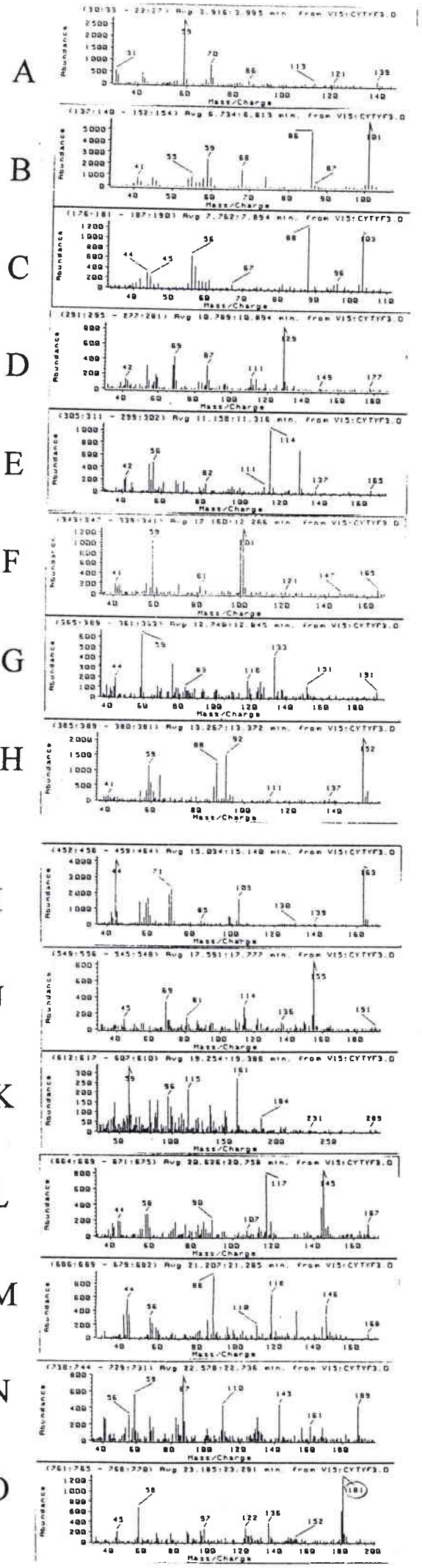


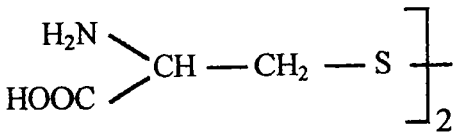
L-SERINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



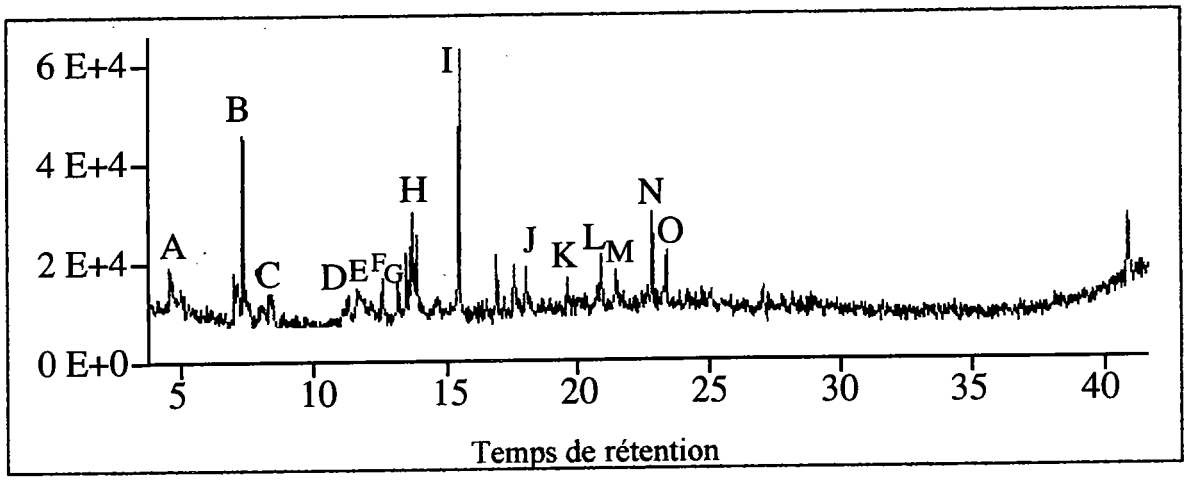
Pics	m/z	molécules proposées	
A (1.6 min)	44	CO_2	
B (3.7 min)	44, 56, 57, 72, 80, 85, **86**	AA - H_2NOH	
C (4.1 min)	41, 56, 67, 72, **86**, 87	α lactame	
D (5.2 min)	53, 67, 93, **94**, 95	Pyrazine méthyl ou 3-Pyridinamine	
E (5.7 min)	53, 70, 72, 80, **81**, 95	1H Pyrrole, 2-méthyl	(?)
F (7.5 min)	53, 67, 80, 107, **108**	Pyrazine éthyl	(?)
G (9.8 min)	39, 56, 94, 121, **122**	Pyrazine, 2-éthyl, 6-méthyl	(?)
H (12.1 min)	53, 56, 83, 108, 135, **136**	Pyrazine, 3-éthyl, 2,5-diméthyl	(?)
I (14.0 min)	44, 57, 83, **100**, 127, 137, 141		
J (15.0 min)	42, 54, 81, 96, 107, 108, 118, 124		
K (15.7 min)	41, 54, 67, 81, 97, 108, 135, **136**	6H Purin-6-one, 1,7-dihydro	(?)
L (16.2 min)	82, 94, 95, 110, 120, 138, 154, **164**	2,5 Dicétopyrazine, 2-méthyl	(?)
M (19.6 min)	42, 68, 80, 109, 121, 135, 152, **164**		
N (19.8 min)	42, 68, 82, 109, 123, 138, 139, **166**	2,5 Dicétopipérazine-3,6(CH_2)	


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
Abundance
Mass/Charge



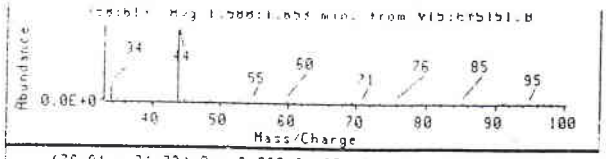
L-CYSTINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

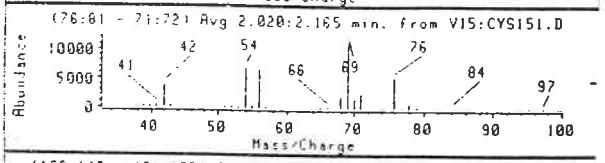


Pics	m/z	molécules proposées
A (3.9 min)	59, 70, 86	
B (6.8 min)	**59, 86, 101**	**α lactame, CHS**
C (7.8 min)	56, 86, 103	α lactame, CH_2SH
D (10.8 min)	69, 87, 111, 129	
E (11.3 min)	56, 114, 129, 165	
F (12.1 min)	59, 100, 101	
G (12.7 min)	59, 116, 133, 151, 191	
H (13.3 min)	58, 88, 92, 152	
I (15.0 min)	**44, 71, 103, 163**	**AA - CO_2 - H_2NOH**
J (17.6 min)	69, 81, 114, 136, 155	
K (19.3 min)	59, 96, 115, 161, 184, 231, 289	
L (20.7 min)	90, 117, 145, 167	
M (21.2 min)	88, 110, 118, 131, 146, 168	
N (22.7 min)	59, 67, 110, 143, 161, 189	
O (23.2 min)	58, 122, 136, 180, 181	

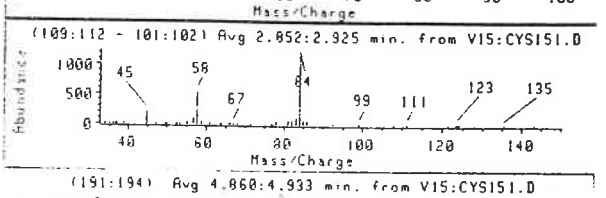
A



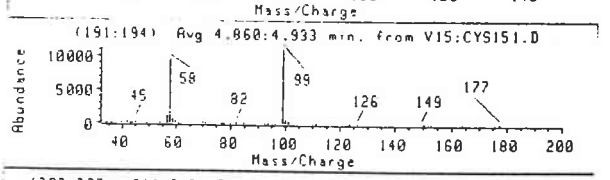
B



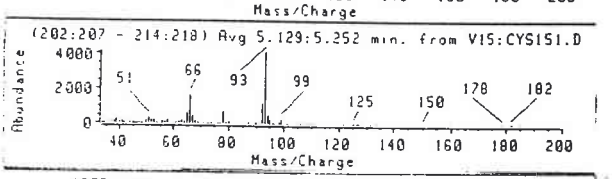
C



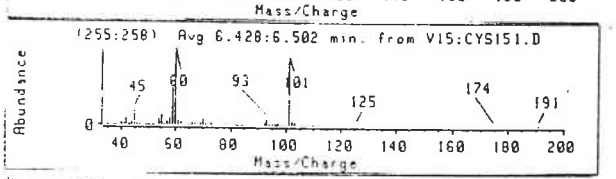
D



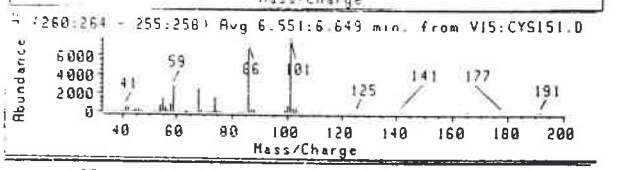
E



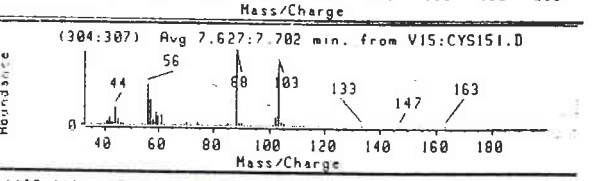
F



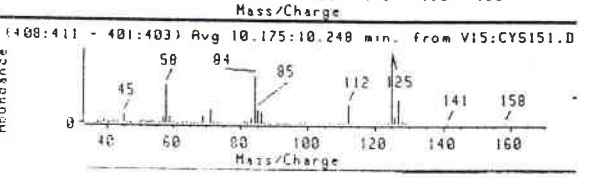
G



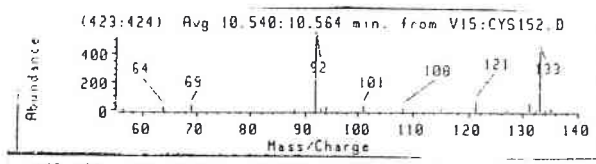
H



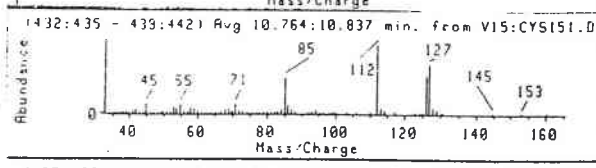
I



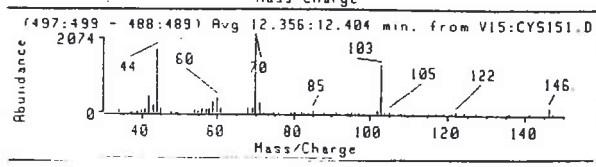
J



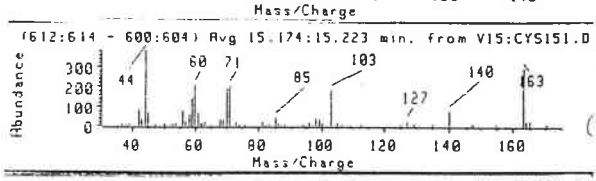
K



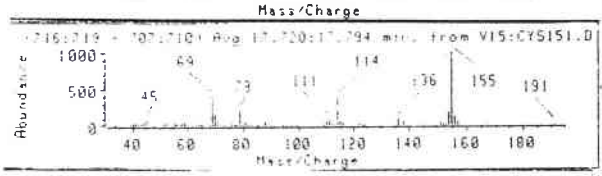
L



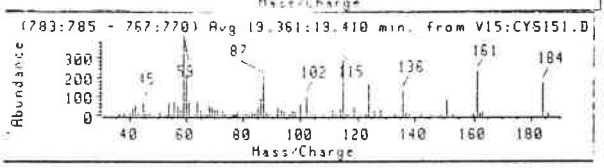
M



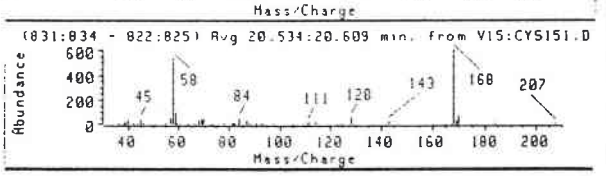
N



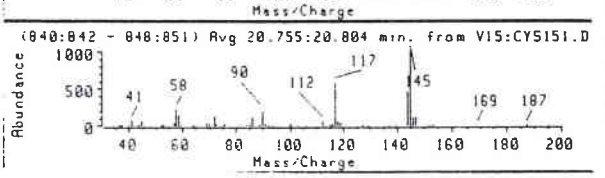
O

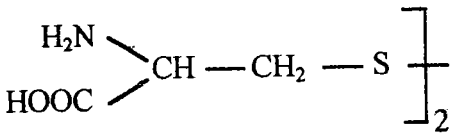


P



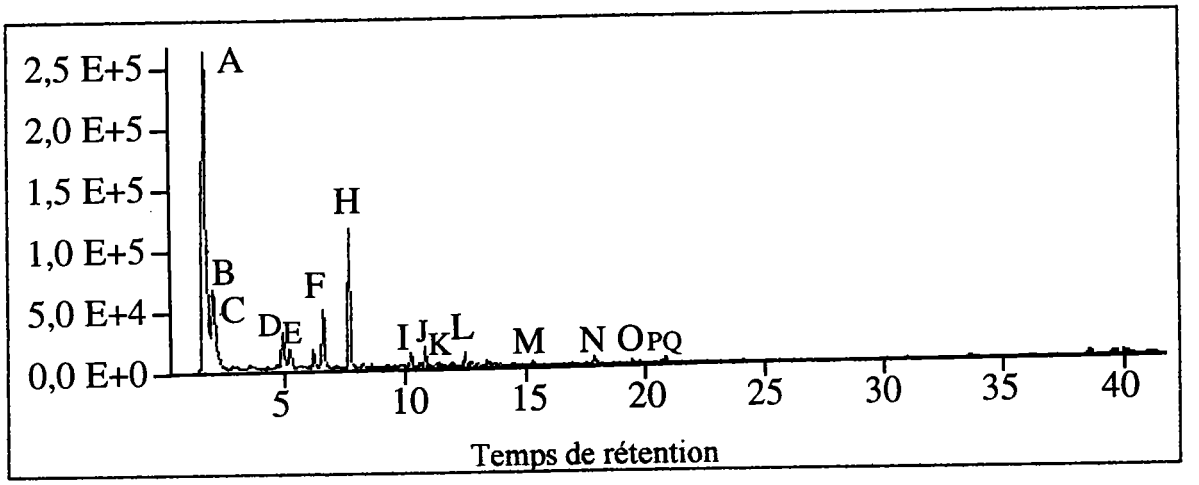
Q

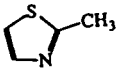
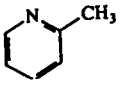
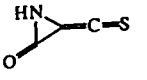




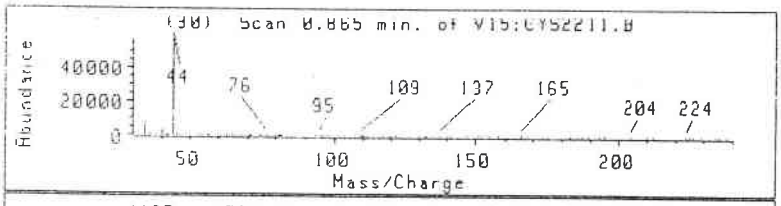
L-CYSTINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

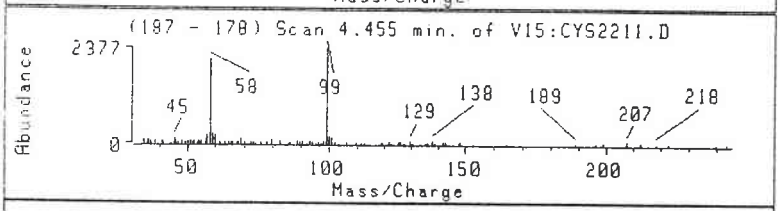


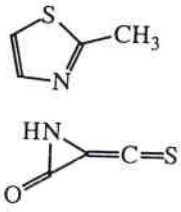
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.6 min)	34, 44	CO_2 et H_2S
B (2.1 min)	54, 56, 69, **76**	CS_2
C (2.8 min)	45, 58, **84**	Thiophène 
D (4.9 min)	45, 58, **99**	2-méthylthiazole ou lactameCS
E (5.2 min)	51, 66, **93**	Pyridine, 2-méthyl  
F (6.5 min)	45, 60, 101	
G (6.6 min)	59, 86, **101**	α lactame, CHS
H (7.6 min)	**56, 88, *103***	**α lactame, CH_2SH**
I (10.2 min)	45, 58, 84, 112, **125**, 127	2,5 Dicétopipérazine-3méthyl
J (10.5 min)	64, 69, 92, 108, 121, 133	$CH_2CHS_2CH_2CH{=}NH$
K (10.8 min)	45, 72, 80, 112, **127**	
L (12.3 min)	44, 60, 70, 103, 122, **146**	
M (15.1 min)	44, 60, 71, 103, 140, **163**	AA $-CO_2$ $-H_2NOH$
N (17.8 min)	69, 79, 114, 136, **155**	
O (19.4 min)	45, 67, 85, 115, 136, 161, **184**	
P (20.5 min)	58, 70, 111, 128, **168**	
Q (20.8 min)	58, 90, 117, 145, 169, 187	

A

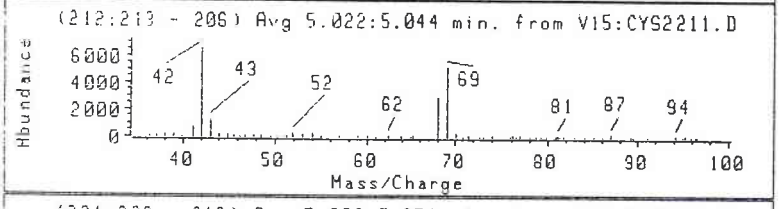

(30) Scan 0.865 min. of V15:CYS2211.D
Abundance
40000
20000
0
44
76
95
109
137
165
204
224
50
100
150
200
Mass/Charge

B

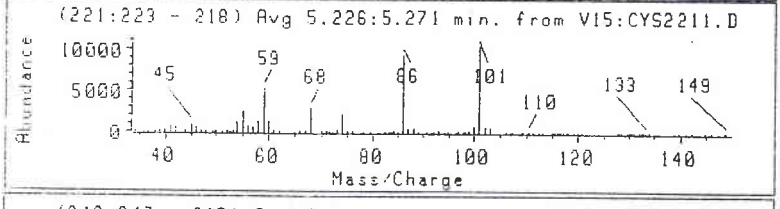

(187 - 178) Scan 4.455 min. of V15:CYS2211.D
Abundance
2377
0
45
58
99
129
138
189
207
218
50
100
150
200
Mass/Charge


S
CH3
N
HN
C=S
O

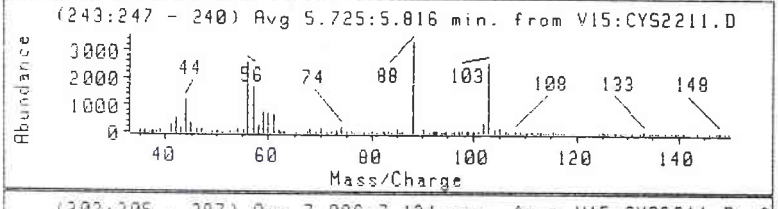
C


(212:213 - 206) Avg 5.022:5.044 min. from V15:CYS2211.D
Abundance
6000
4000
2000
0
42
43
52
62
69
81
87
94
40
50
60
70
80
90
100
Mass/Charge

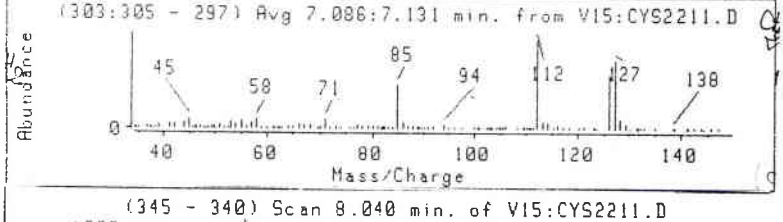
D


(221:223 - 218) Avg 5.226:5.271 min. from V15:CYS2211.D
Abundance
10000
5000
0
45
59
68
86
101
110
133
149
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

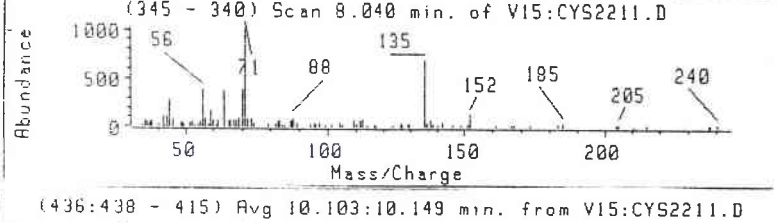
E


(243:247 - 240) Avg 5.725:5.816 min. from V15:CYS2211.D
Abundance
3000
2000
1000
0
44
56
74
88
103
108
133
148
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

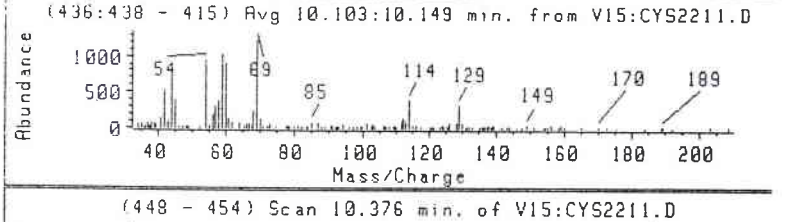
F


(303:305 - 297) Avg 7.086:7.131 min. from V15:CYS2211.D
Abundance
0
45
58
71
85
94
112
127
138
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

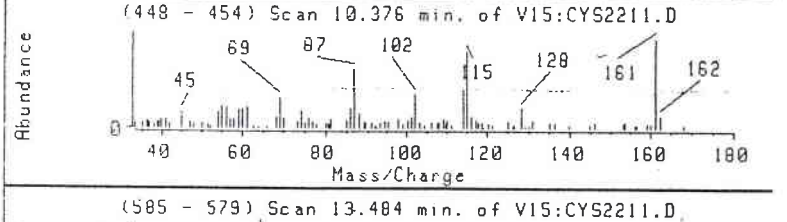
G


(345 - 340) Scan 8.040 min. of V15:CYS2211.D
Abundance
1000
500
0
56
71
88
135
152
185
205
240
50
100
150
200
Mass/Charge

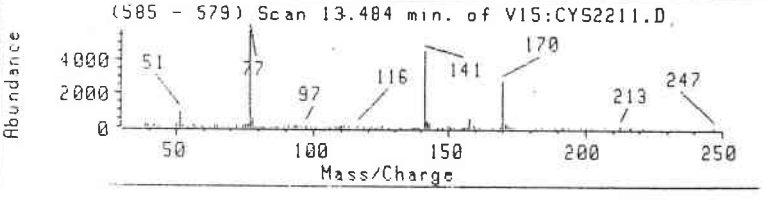
H

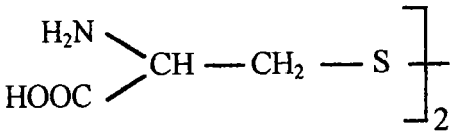

(436:438 - 415) Avg 10.103:10.149 min. from V15:CYS2211.D
Abundance
1000
500
0
54
69
85
114
129
149
170
189
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

I


(448 - 454) Scan 10.376 min. of V15:CYS2211.D
Abundance
0
45
69
87
102
115
128
161
162
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge

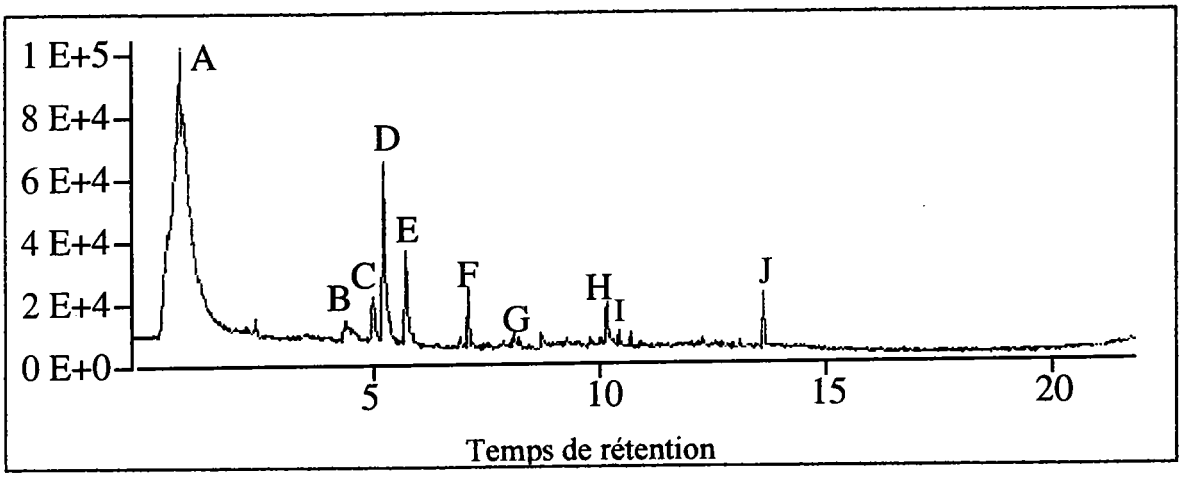
J


(585 - 579) Scan 13.484 min. of V15:CYS2211.D
Abundance
4000
2000
0
51
77
97
116
141
170
213
247
50
100
150
200
250
Mass/Charge

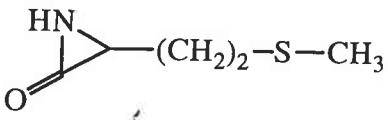


L-CYSTINE

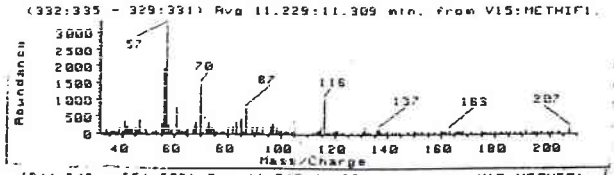
PYROLYSE LASER GC/MS



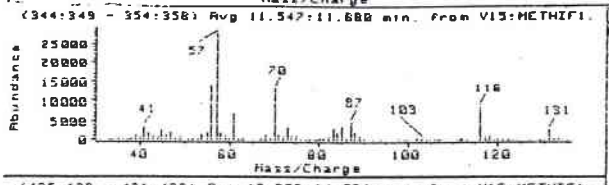
Pics	m/z	molécules proposées
A (0.8 min)	34, 44, 76	CO_2, CS_2 et H_2S
B (4.4 min)	58, 99	α lactame, CS ou Méthylthiazole
C (5.0 min)	42, 68, 69	α lactame, CH_2
D (5.3 min)	**45, 59, 86, 101**	**α lactame, CHS**
E (5.7 min)	44, 56, 57, 88, 103	α lactame, CH_2SH
F (7.1 min)	85, 112, 126, 127	$CH_2CHSSCH_2CH{=}NH$
G (8.0 min)	56, 71, 135, 152, 185, 240	Cystine
H (10.1 min)	54, 69, 86, 114, 129, 142	C_5H_7NOS
I (10.3 min)	69, 87, 102, 114, 115, 128, 161	
J (13.4 min)	51, 77, 141, 170, 213, 247	Benzènesulfonamide, N-butyl (?)



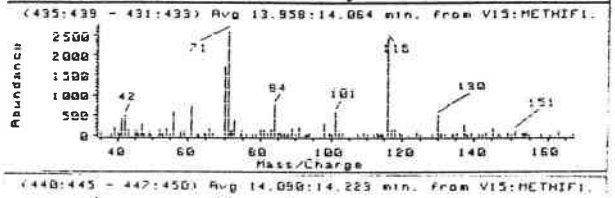
A



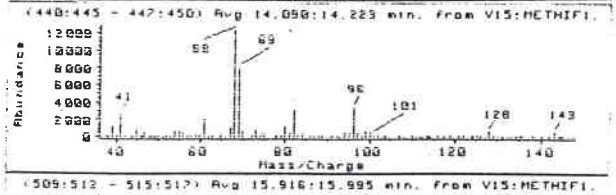
B



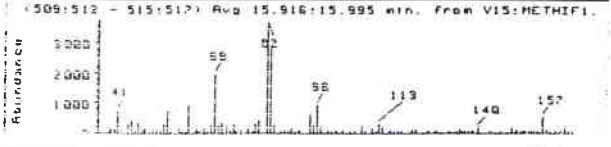
C



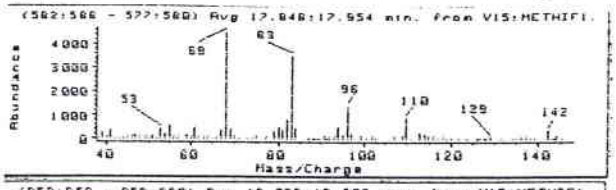
D



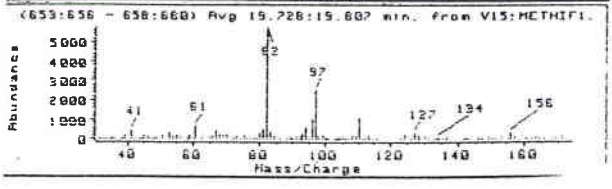
E



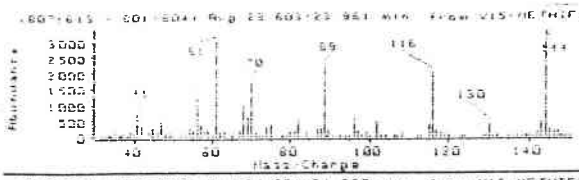
F



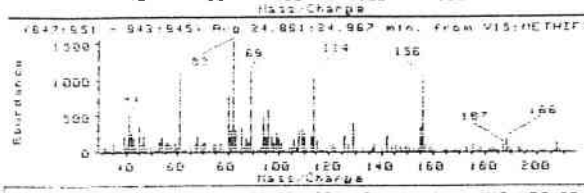
G



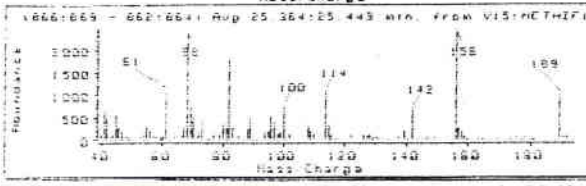
H



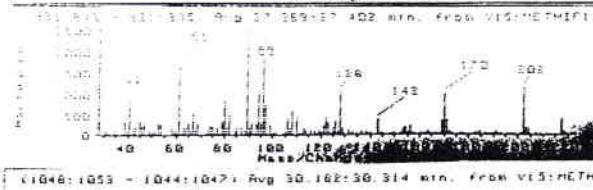
I



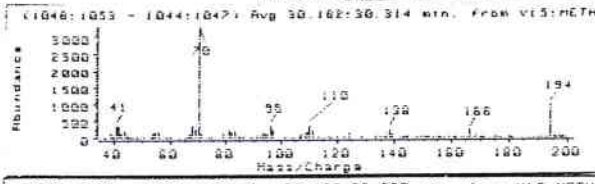
J



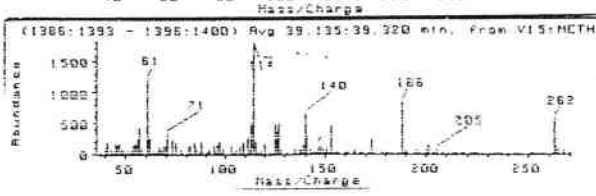
K

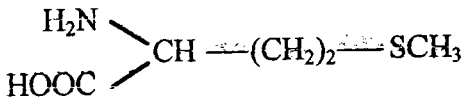


L



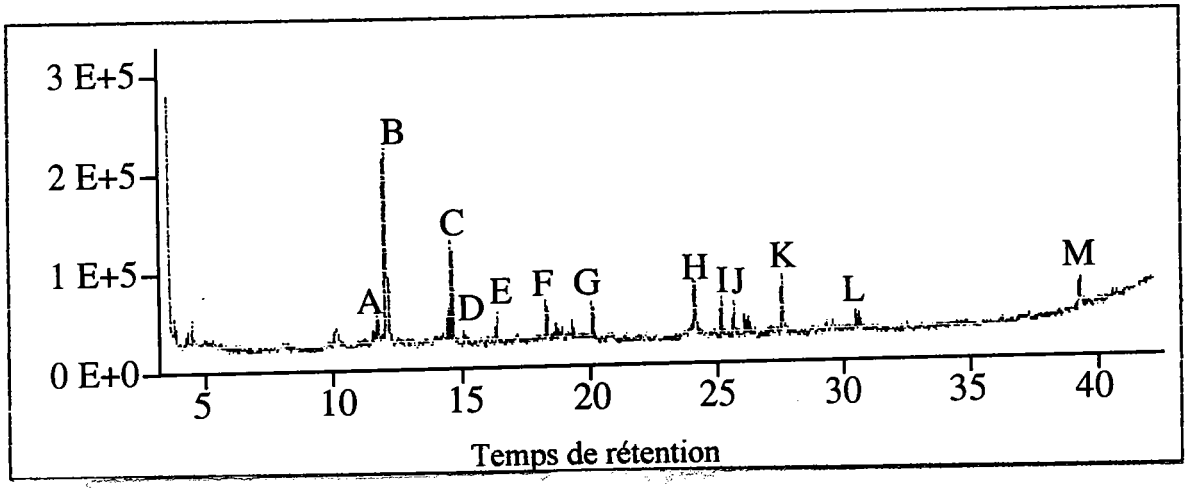
M



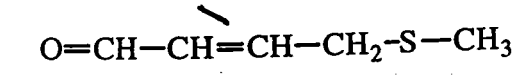


L-METHIONINE

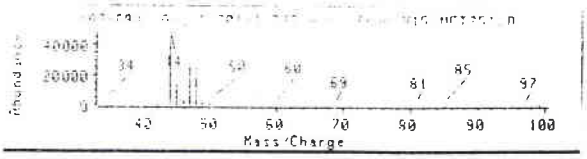
PYROLYSE PAR FOUR GC/MS



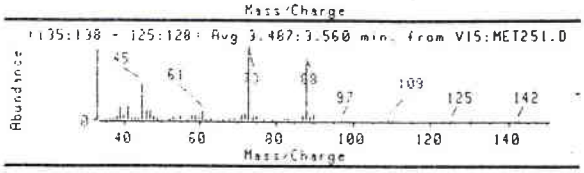
Pics	m/z	molécules proposées
A (11.3 min)	57, 70, 87, 116	R-CHCO
B (11.5 min)	**57, 70, 87, 116, 131**	**α lactame, éthyl-2-méthylthio**
C (14.0 min)	**70, 71, 84, 101, 116**	**2-Butènal, 3-(méthylthio)**
D (14.2 min)	41, 68, 69, 81, 96, 101, 128, 143	
E (15.9 min)	69, 82, 83, 94, 96, 113, 140, 157	
F (17.9 min)	41, 53, 68, 83, 96, 110, 129, 142	
G (19.7 min)	41, 61, 82, 97, 110, 127, 156	
H (23.8 min)	41, 61, 70, 89, 116, 130, 114	
I (24.8 min)	61, 82, 89, 114, 155, 156, 167, 168	
J (25.4 min)	61, 68, 82, 100, 114, 142, 158, 189	
K (27.3 min)	41, 61, 89, 96, 128, 143, 170, 202	
L (30.2 min)	70, 96, 110, 138, 166, 194	
M (39.2 min)	61, 114, 140, 154, 188, 203, 262	Dicétopipérazine $(R)_2$



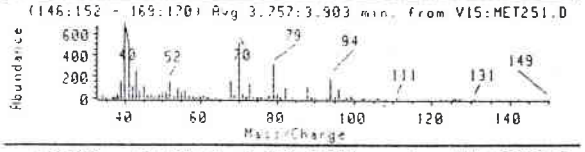
A



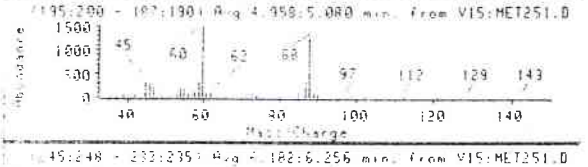
B



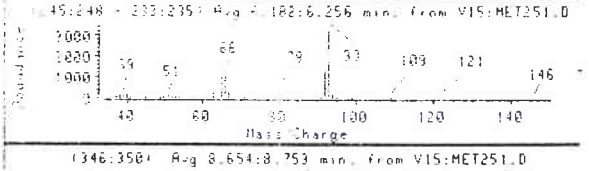
C



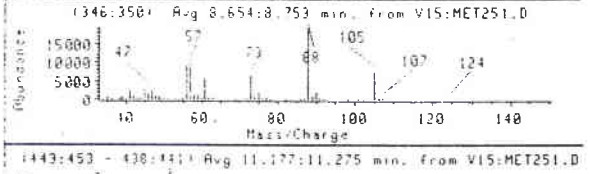
D



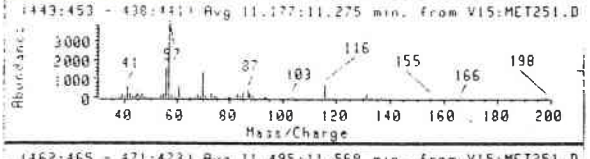
E



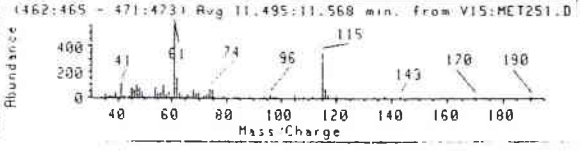
F



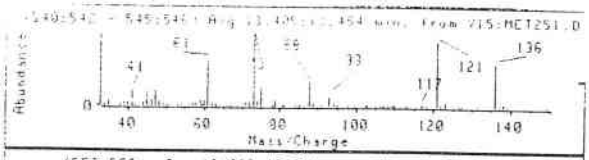
G



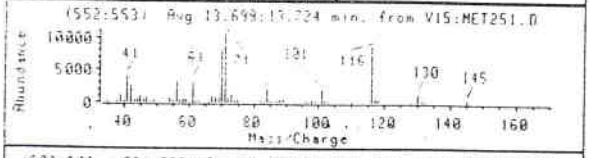
H



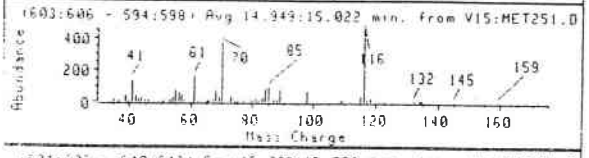
I



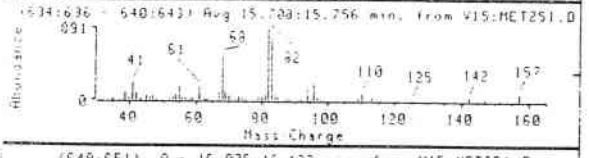
J



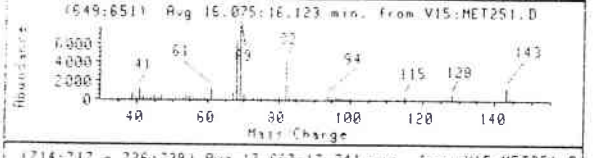
K



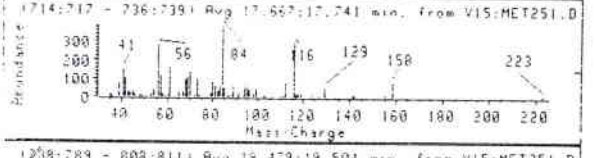
L



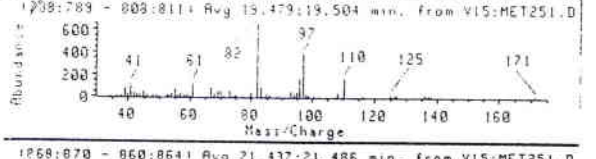
M



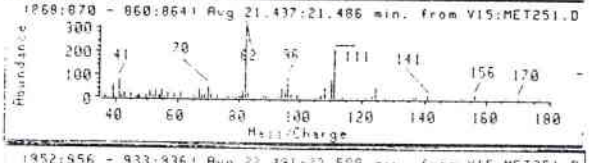
N



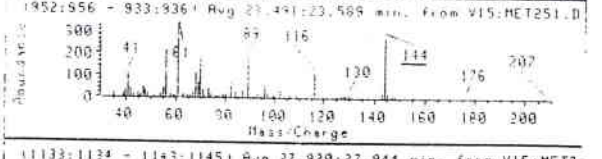
O



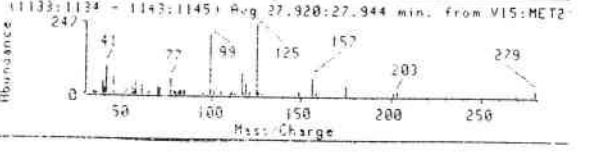
P

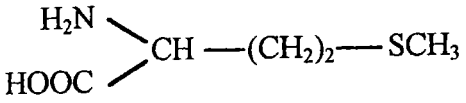


Q



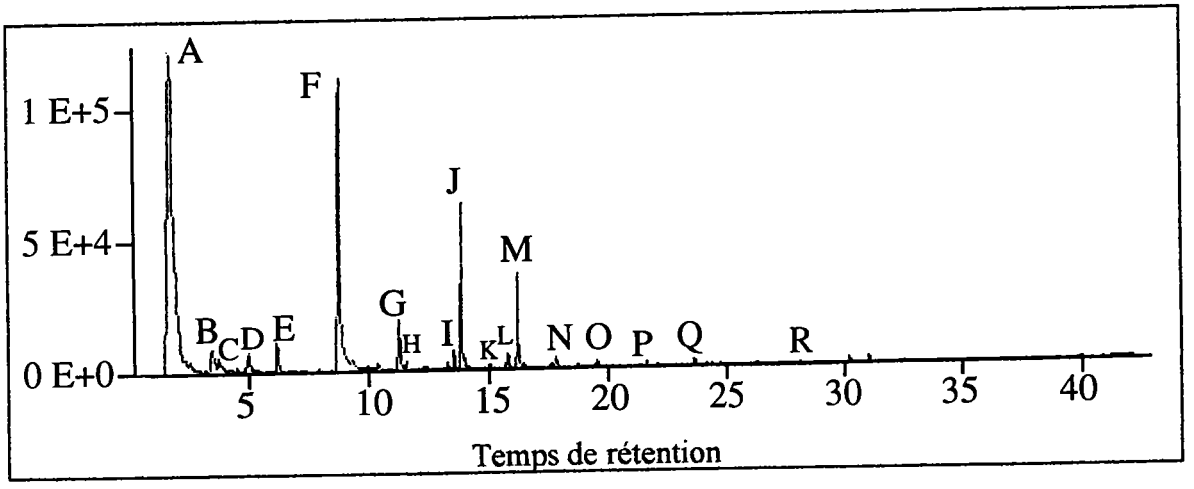
R





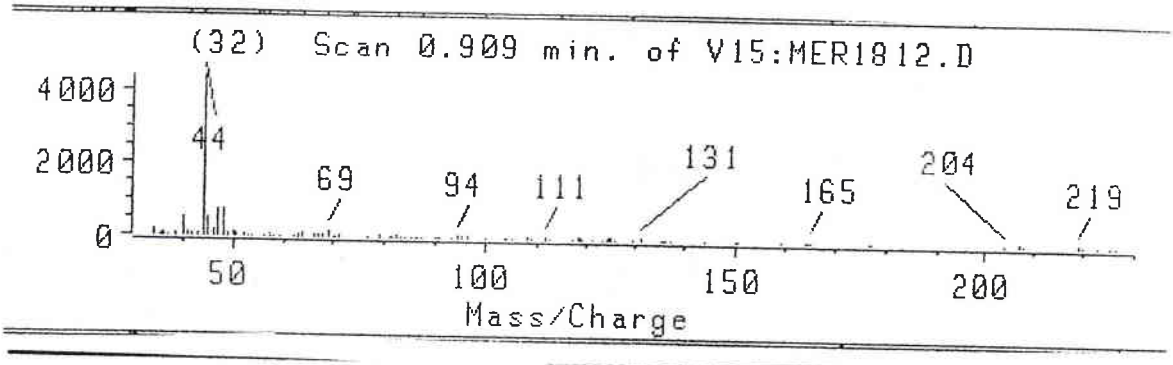
L-METHIONINE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

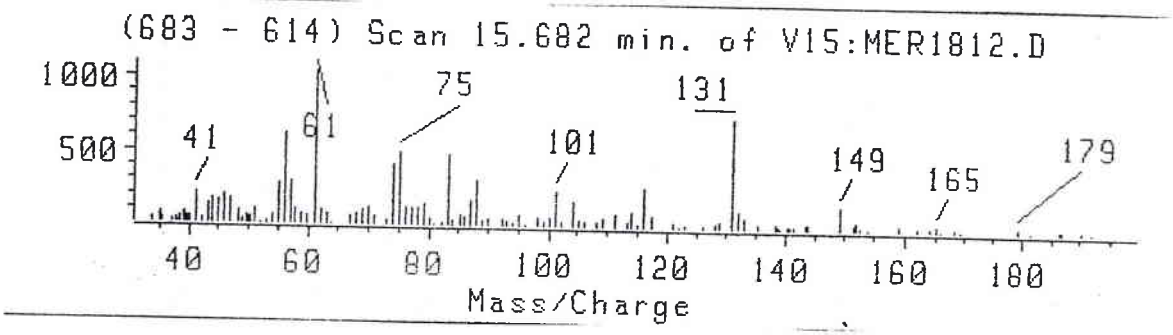


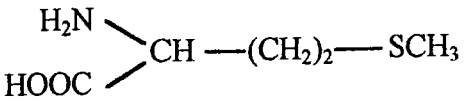
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.8 min)	44, 45, 46, 47, **48**	CO_2 et $HSCH_3$
B (3.5min)	45, 61, 73, **88**	3-Propène, 1-(méthylthio)
C (3.8 min)	40, 41, 52, 70, 73, 79, 88, **94**	HSCH=CHSH
D (5.0 min)	45, 60, 88	Thiophène, tétrahydro
E (6.2 min)	48, 65, 66, 78, 92, **93**	Pyridine, 3-méthyl
F (8.7 min)	**47, 56, 57, 61, 73, 88, *105***	**1-Propanamine, 3-(méthylyhio)**
G (11.2 min)	56, 57, 70, 85, 87, 116, **131**	α lactame, éthyl-2-(méthylthio)
H (11.5 min)	61, 74, 96, **116**	Ethane, 1,2-bis(méthylthio)
I (13.4 min)	48, 61, 73, 75, 88, 93, 117, 121, 136	Propane, 1,3-bis(méthylthio)
J (13.7 min)	**43, 56, 61, 70, 71, 84, 101, 116**	**2-Butènal, 3-(méthylthio)**
K (15.0 min)	61, 70, 85, 98, 116, **133**, 145, 159	$C_6H_9NS_2$
L (15.7 min)	55, 68, 81, 82, 94, 96, 110, 125, 142	Dicétopipérazine $(CH_3)_2$
M (16.1 min)	**61, 68, 69, 82, 94, 115, 128, *143***	**$RCH=NCH_2R$ ($-HSCH_3$)**
N (17.7 min)	56, 60, 84, 116, 129, 158, 223	
O (19.5 min)	61, 82, 97, 110, 125, **156**, 171	Dicétopipérazine
P (21.4 min)	82, 96, 111, 124, 141, 156, 170, **185**	
Q (23.5 min)	56, 61, 69, 89, 116, 130, **144**, 176	$RCH=NCH_2R$ ($-CH_3$)
R (27.9 min)	77, 99, 125, 157, 203, 279	

A


(32) Scan 0.909 min. of V15:MER1812.D
4000
2000
0
44
69
94
111
131
165
204
219
50
100
150
200
Mass/Charge

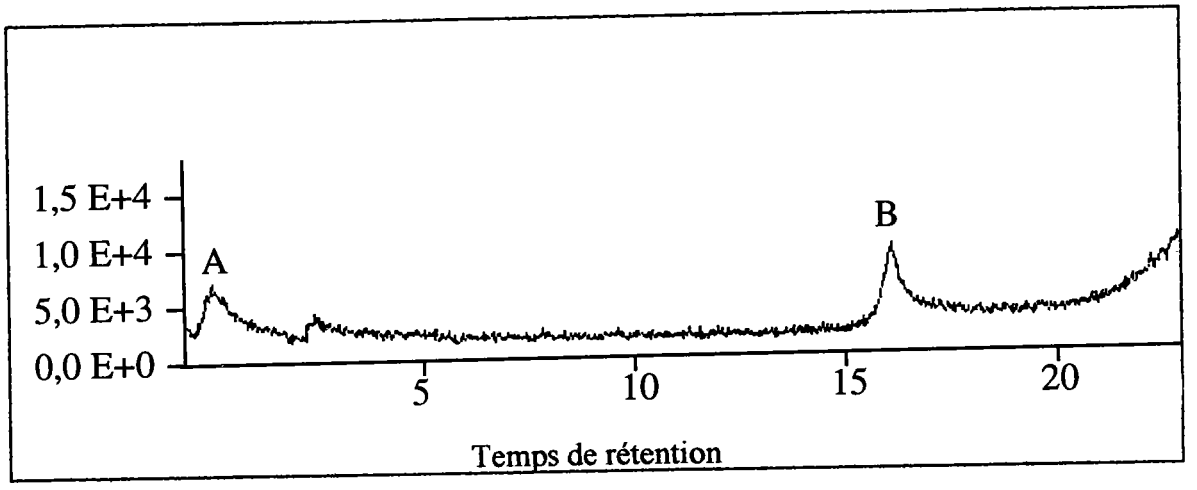
B


(683 - 614) Scan 15.682 min. of V15:MER1812.D
1000
500
41
61
75
101
131
149
165
179
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge



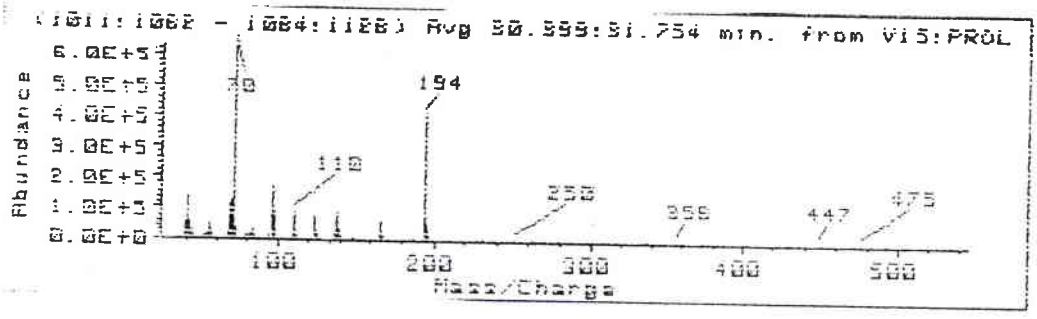
L-METHIONINE

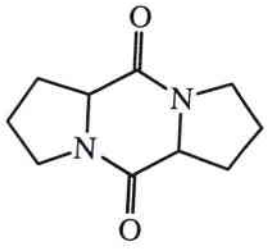
PYROLYSE LASER GC/MS

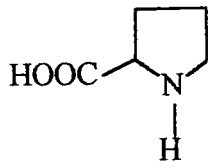


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.0 min)	44	CO_2
B (15.7 min.)	41, 61, 75, 101, 131, 149	Méthionine

A

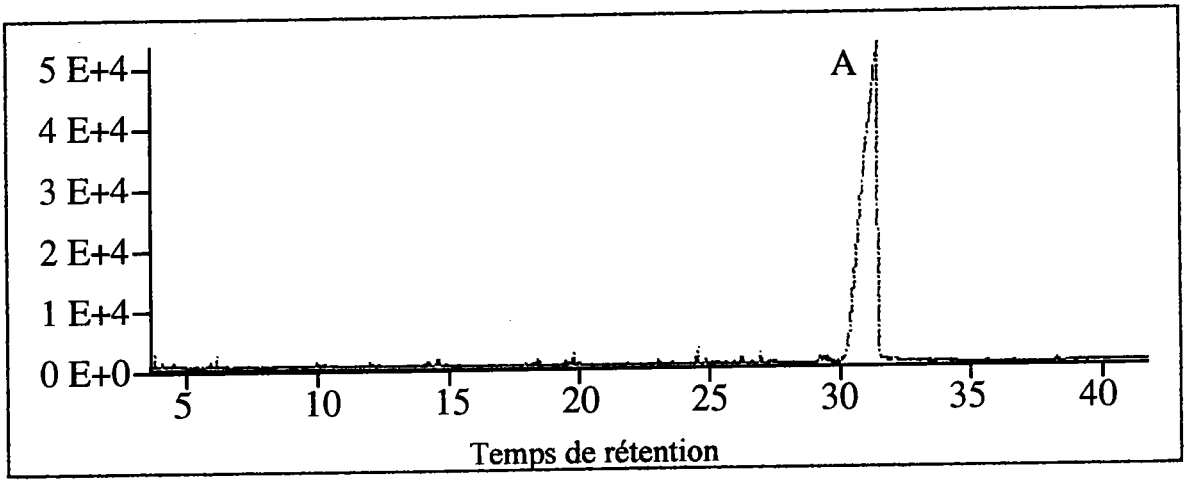

Abundance
6.0E+5
5.0E+5
4.0E+5
3.0E+5
2.0E+5
1.0E+5
0.0E+0
70
110
194
258
355
447
475
100
200
300
400
500
Mass/Charge


O
N
N
O



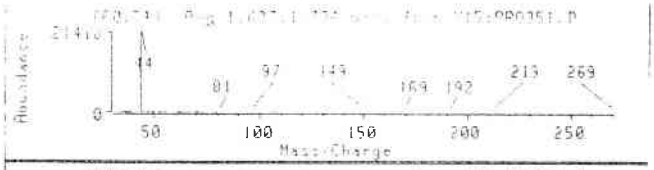
L-PROLINE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

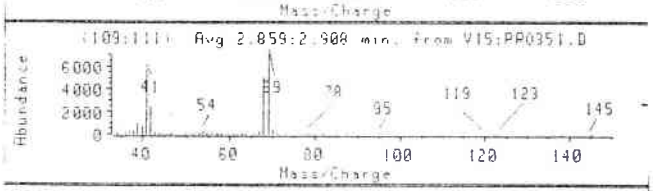


Pics	m/z	molécule proposée
A (31.0 min)	**70, 96, 110, 124, 138, 166, 194**	**Cycloproproline**

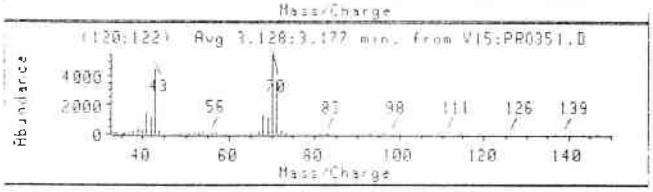
A

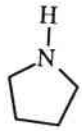

Abundance
Mass/Charge

B

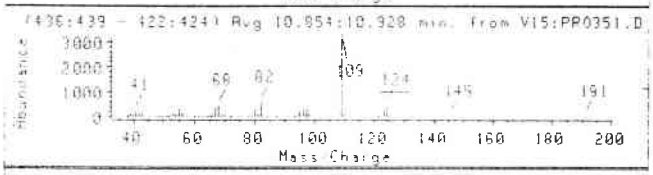

(109:111) Avg 2.859:2.908 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

C

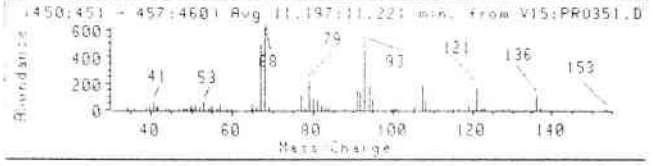

(120:122) Avg 3.128:3.177 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge



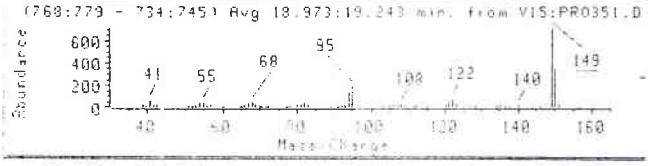
D


(436:439 - 422:424) Avg 10.854:10.928 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

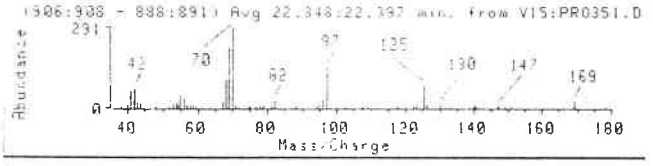
E


(450:451 - 457:460) Avg 11.197:11.221 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

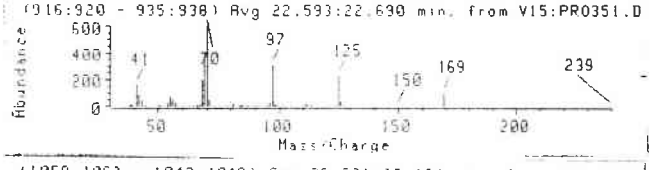
F


(768:779 - 734:745) Avg 18.973:19.243 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

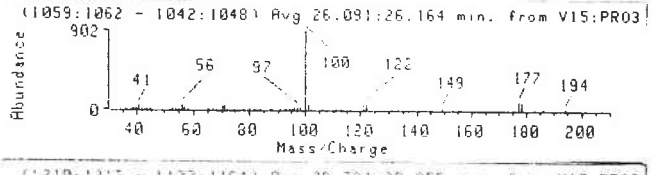
G


(906:908 - 888:891) Avg 22.348:22.397 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

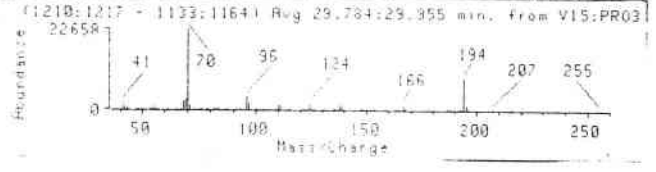
H

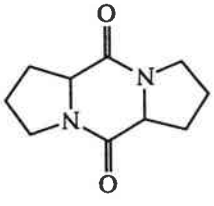

(916:920 - 935:938) Avg 22.593:22.690 min. from V15:PR0351.D
Abundance
Mass/Charge

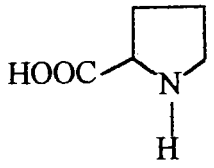
I


(1059:1062 - 1042:1048) Avg 26.091:26.164 min. from V15:PR03
Abundance
Mass/Charge

J

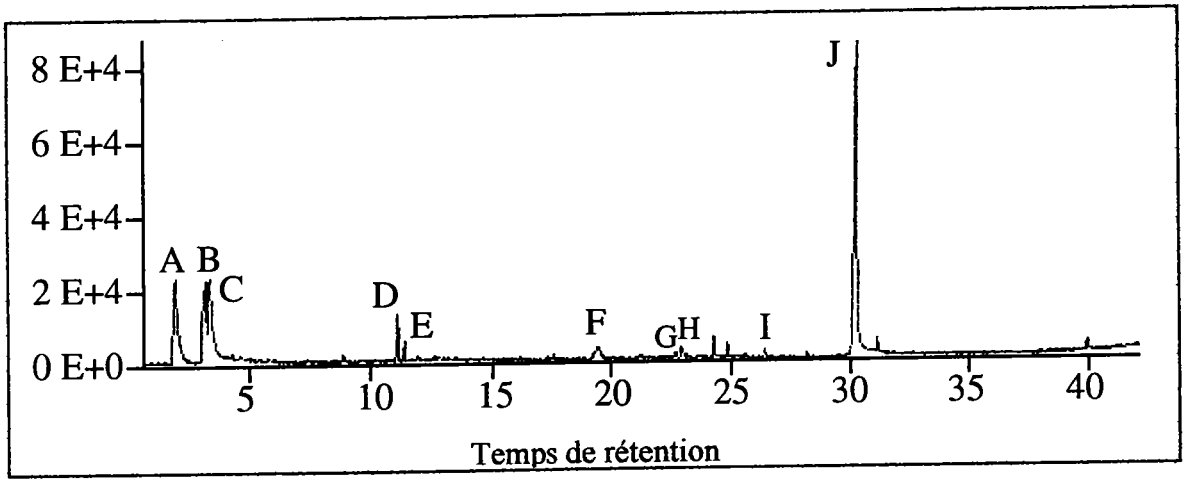

(1210:1217 - 1133:1164) Avg 29.784:29.955 min. from V15:PR03
Abundance
Mass/Charge





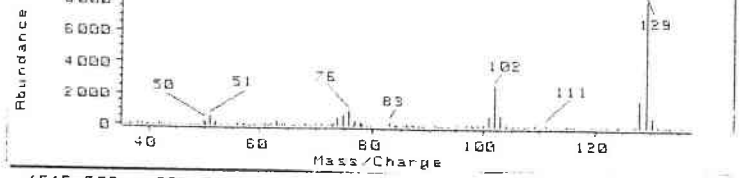
L-PROLINE

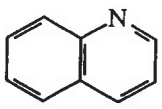
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS



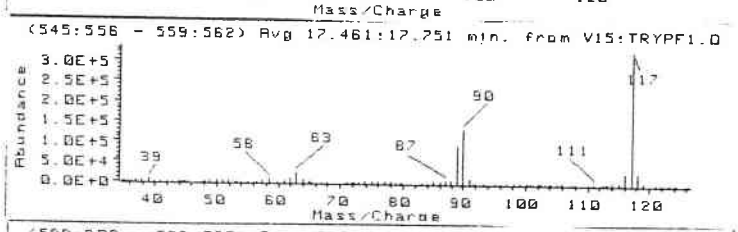
Pics	m/z	molécules proposées
A (1.7 min)	44	CO_2
B (2.8 min)	41, 42, 68, 69	3-Pyrroline
C (3.1min)	41, 42, 43, 68, 69, 70, **71, 98**	Pyrrolidine
D (10.8 min)	41, 68, 82, 97, 109, **124**	
E (11.2 min)	41, 53, 67, 68, 79, 93, 107, 121, 136	
F (19.1 min)	41, 55, 68, 94, 95, 108, 122, 149, 150, 194	
G (22.4 min)	42, 69, 70, 82, 97, 125, 169	
H (22.6 min)	41, 69, 70, 97, 125, 150, 169, **187**	
I (26.1 min)	41, 56, 100, 122, 177, **178**, 194	
J (29.8 min)	**41, 70, 96, 124, 138, 166, 194**	**Cycloproproline**

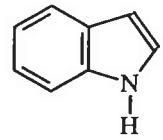
A



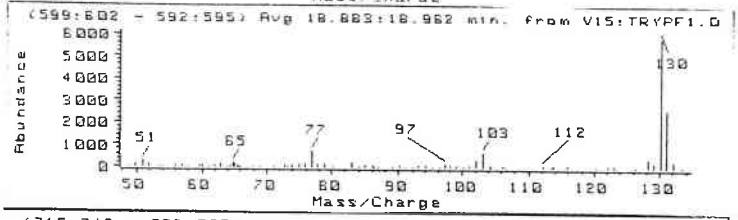


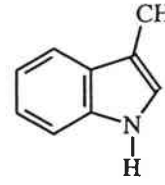
B



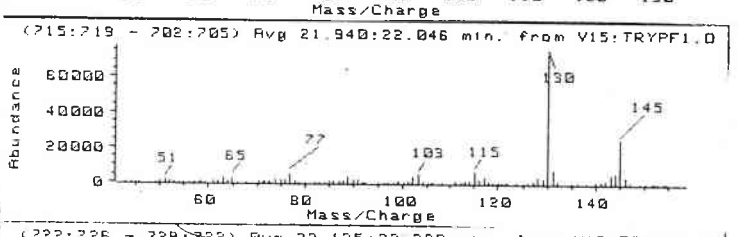


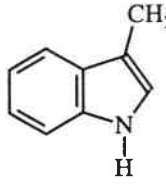
C



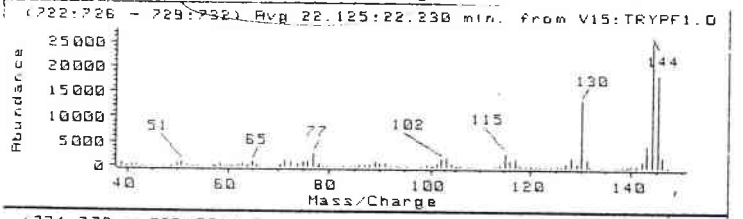


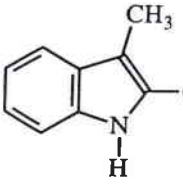
D



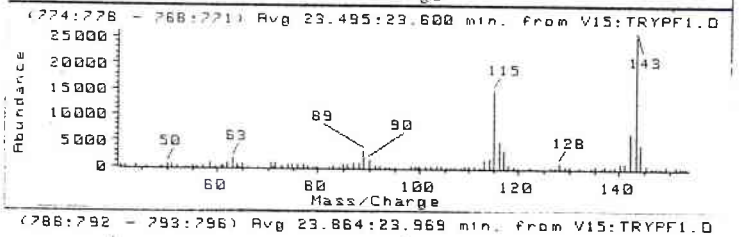


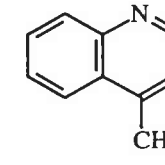
E



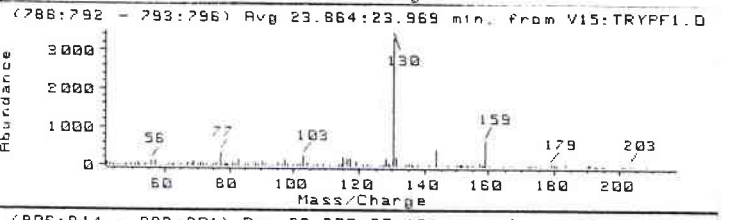


F

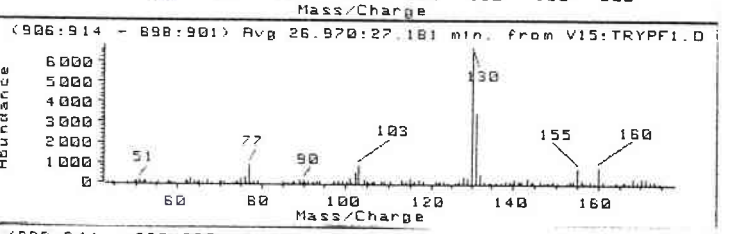


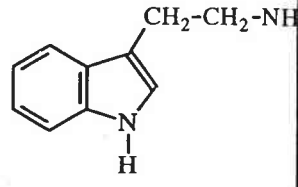


G

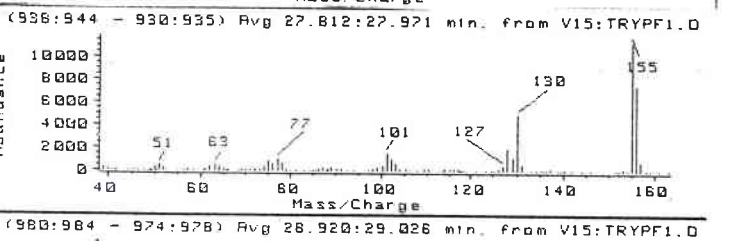


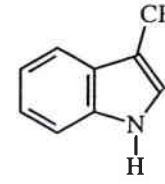
H



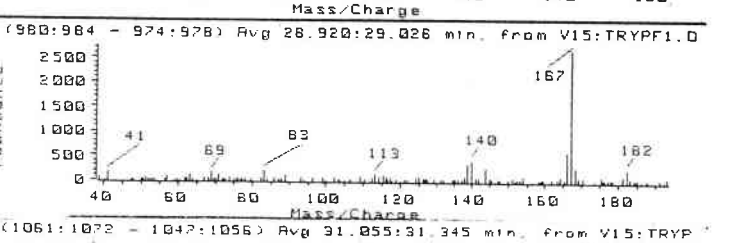


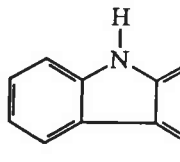
I



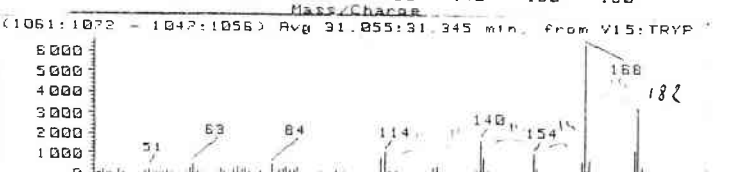


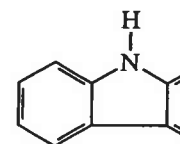
J

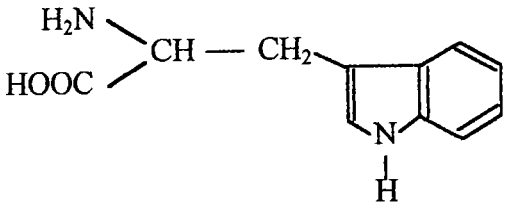




K

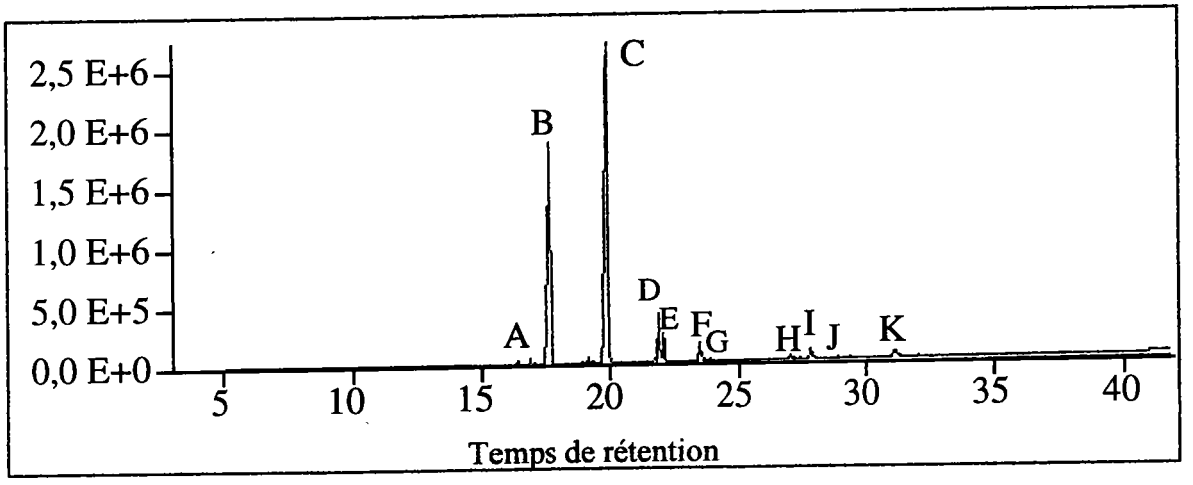






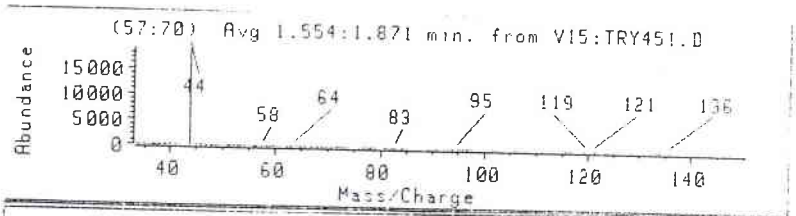
L-TRYPTOPHANE

PYROLYSE PAR FOUR GC/MS

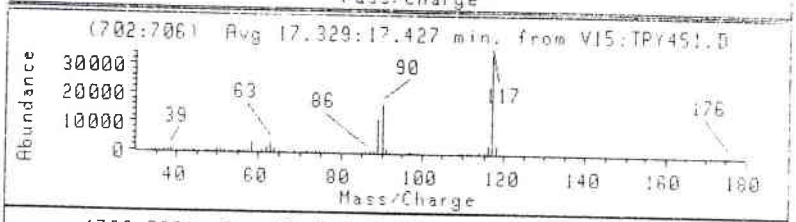


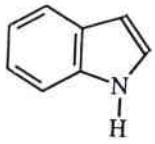
Pics	m/z	molécules proposées
A (16.2 min)	76, 102,128, 129	Quinoline
B (17.5 min)	**89, 90, 117**	**1H Indole**
C (19.9 min)	**77, 103, 130, 131**	**1H Indole, 3-méthyl**
D (21.9 min)	77, 103, 130, 145	1H Indole, 3-éthyl
E (22.2 min)	77, 102, 115, 130, 144, 145	1H Indole, 2,3-diméthyl (?)
F (23.5 min)	89, 115, 128, 143	Quinoline, 4-méthyl
G (23.8 min)	77, 103, 130, 143, 159	1H Indole, 3-éthanal
H (27.0 min)	102, 103, 130, 131, 155, 160	1H Indole, éthanamine
I (27.8 min)	77, 101, 130, 155, 156	1H Indole, acétonitrile
J (28.9 min)	83, 113, 140, 167	9H Carbazole
K (31.2 min)	114, 140, 154, 168, 182	(1-aza, 3-méthyl) Carbazole

A

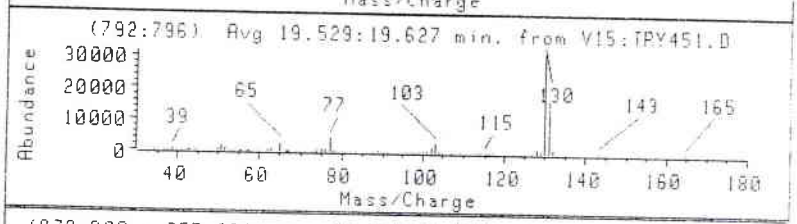

(57:70) Avg 1.554:1.871 min. from V15:TRY451.D
Abundance
15000
10000
5000
0
44
58
64
83
95
119
121
136
40
60
80
100
120
140
Mass/Charge

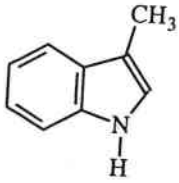
B


(702:706) Avg 17.329:17.427 min. from V15:TRY451.D
Abundance
30000
20000
10000
0
39
63
86
90
117
176
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge

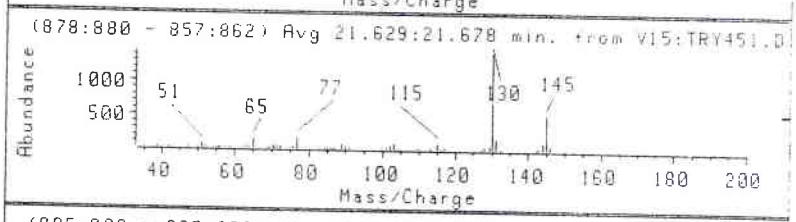


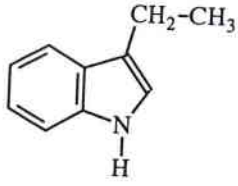
C


(792:796) Avg 19.529:19.627 min. from V15:TRY451.D
Abundance
30000
20000
10000
0
39
65
77
103
115
130
143
165
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge

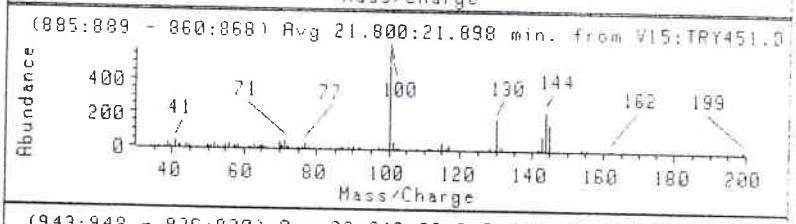


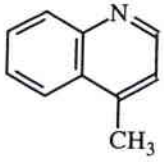
D


(878:880 - 857:862) Avg 21.629:21.678 min. from V15:TRY451.D
Abundance
1000
500
51
65
77
115
130
145
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge

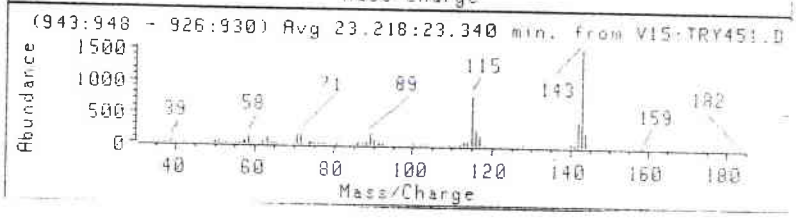


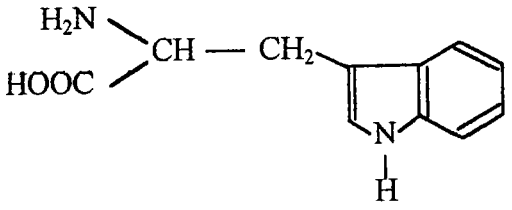
E


(885:889 - 860:868) Avg 21.800:21.898 min. from V15:TRY451.D
Abundance
400
200
0
41
71
77
100
130
144
162
199
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Mass/Charge



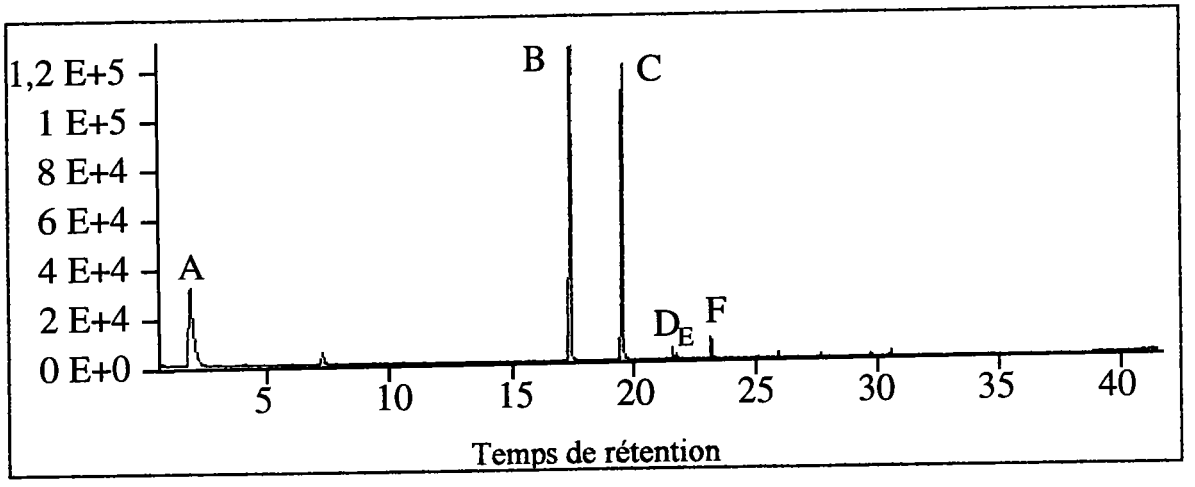
F


(943:948 - 926:930) Avg 23.218:23.340 min. from V15:TRY451.D
Abundance
1500
1000
500
0
39
58
71
89
115
143
159
182
40
60
80
100
120
140
160
180
Mass/Charge



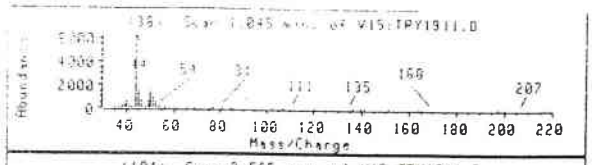
L-TRYPTOPHANE

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

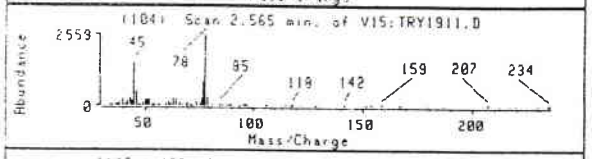


Pics	m/z	molécules proposées	
A (1.6 min)	44	CO_2	
B (17.3 min)	**63, 89, 90, *117***	**1H Indole**	
C (19.7 min)	**77, 103, 130, *131***	**1H Indole, 3-méthyl**	
D (21.6 min)	77, 103, 130, **145**	1H Indole, 3-éthyl	
E (21.8 min)	100, 130, 144, 145	1H Indole, 2,3-diméthyl	(?)
F (23.3 min)	89, 115, **143**	Quinoline, 4-méthyl	

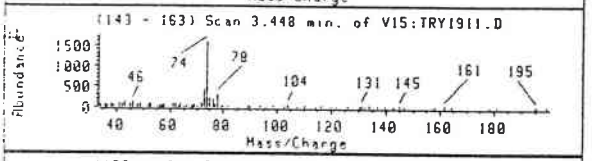
A



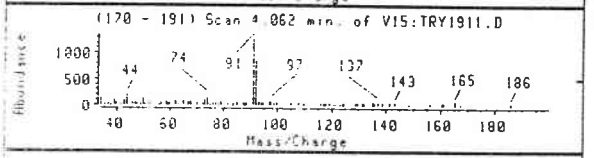
B



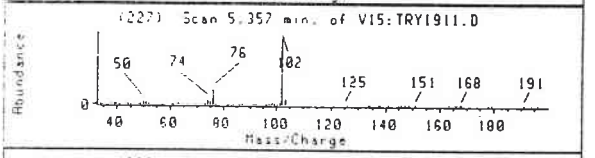
C



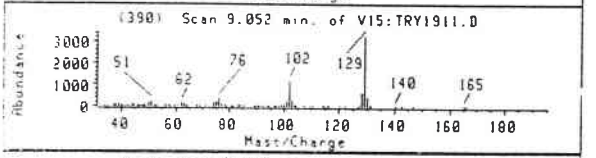
D



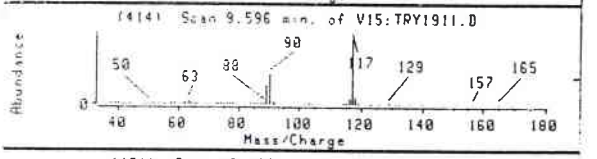
E



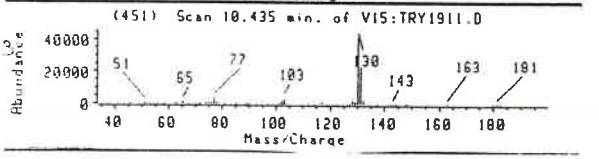
F



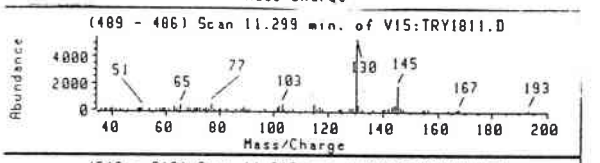
G



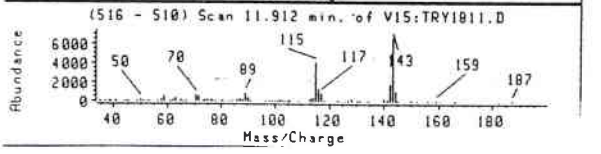
H



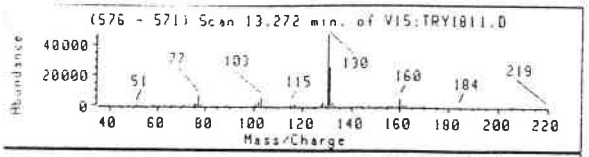
I



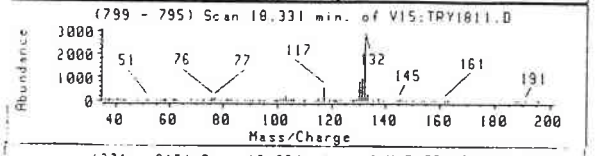
J



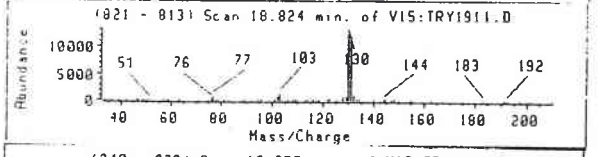
K



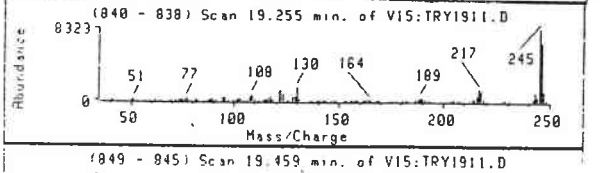
L



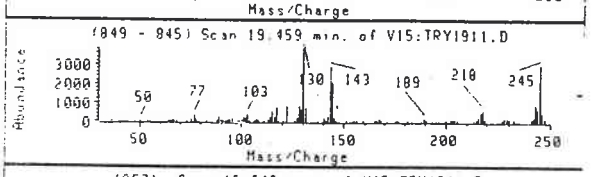
M



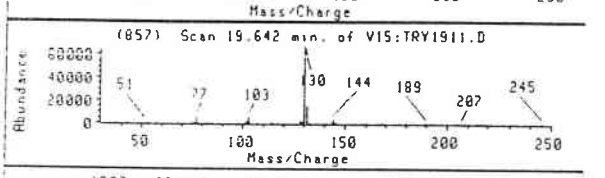
N



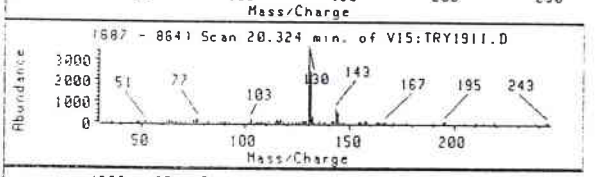
O



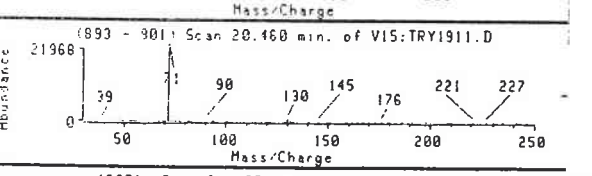
P



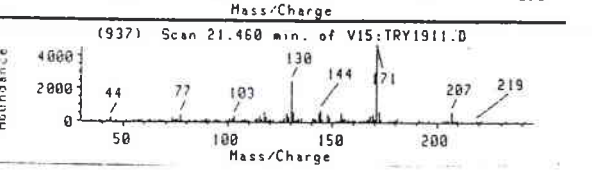
Q

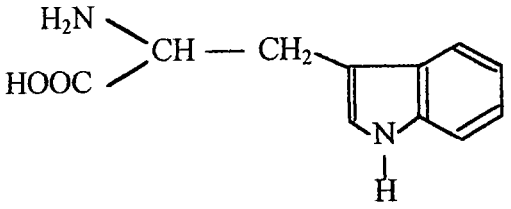


R



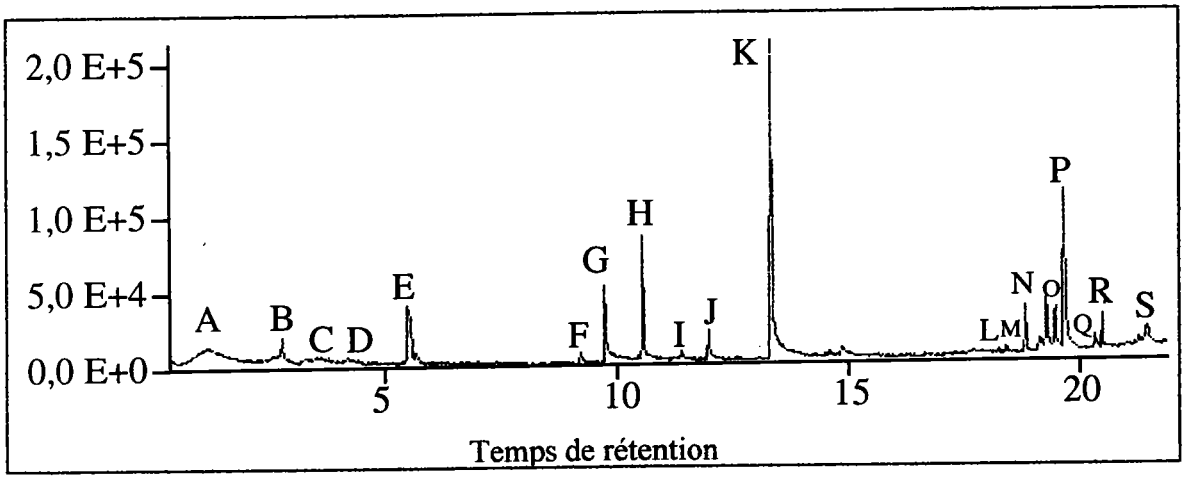
S





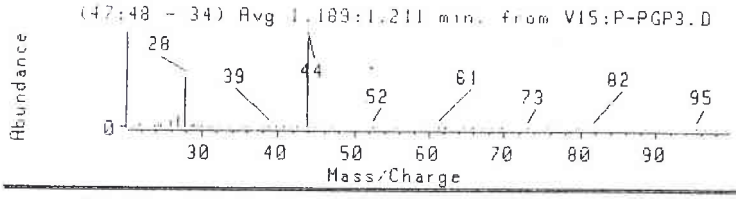
L-TRYPTOPHANE

PYROLYSE LASER GC/MS

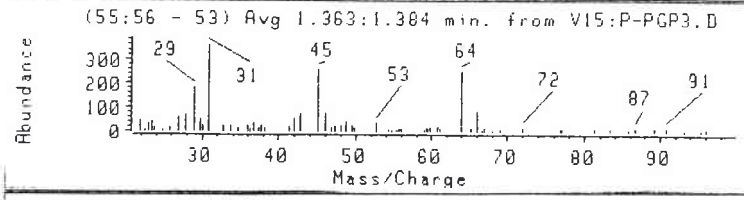


Pics	m/z	molécules proposées
A (1.0 min)	44	CO_2
B (2.6 min)	45, 77, 78	Benzène
C (3.4 min)	74, 78	Acide éthanoïque
D (4.0 min)	91, 92	Toluène
E (5.4 min)	74, 76, 102	Benzène éthényl
F (9.0 min)	51, 76, 102, 129	Quinoline
G (9.6 min)	89, 90, 117	1H Indole
H (10.4 min)	77, 103, 130, 131	1H Indole, 3-méthyl
I (11.4 min)	77, 103, 130, 145	1H Indole, 2,3-diméthyl
J (11.9min)	70, 89, 115, 143	Quinoline, 4-méthyl
K (13.2 min)	**77, 103, 130, 131, 160**	**1H Indole, 3 éthanamine**
L (18.3 min)	77, 117, 130, 131, 132	
M (18.8 min)	77, 103, 130, 131, 144	1H Indole, 5-méthyl
N (19.2 min)	108, 130, 217, 245, 246	Di-Indole-3yl méthane
O (19.5 min)	103, 130, 143, 144, 245	Dipeptide $C_{13}H_{15}N_3O_2$
P (19.6 min)	77, 103, 130, 131, 144, 245	
Q (20.3 min)	77, 103, 130, 131, 143, 144	1H Indole, 3 éthéne
R (20.5 min)	71, 130	α lactame méthyle
S (21.5 min)	77, 103, 130, 144, 171	1H indole, 3 buténone

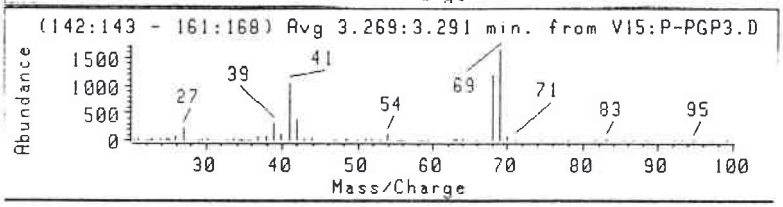
A


(47:48 - 34) Avg 1.189:1.211 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
28
39
44
52
61
73
82
95
Mass/Charge

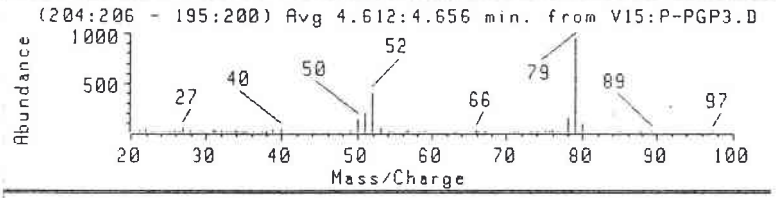
B


(55:56 - 53) Avg 1.363:1.384 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
29
31
45
53
64
72
87
91
Mass/Charge

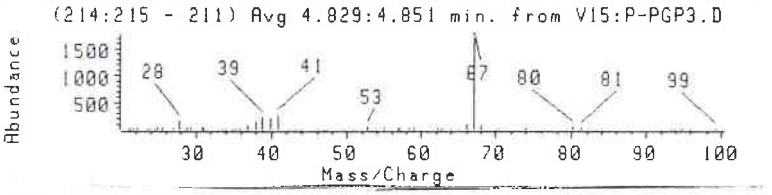
C


(142:143 - 161:168) Avg 3.269:3.291 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
27
39
41
54
69
71
83
95
Mass/Charge

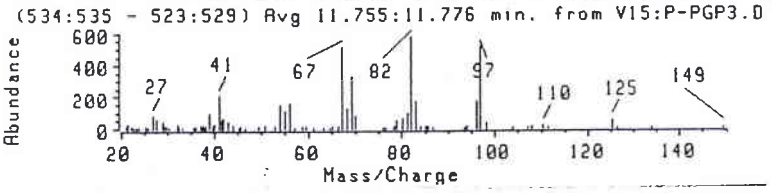
D


(204:206 - 195:200) Avg 4.612:4.656 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
27
40
50
52
66
79
89
97
Mass/Charge

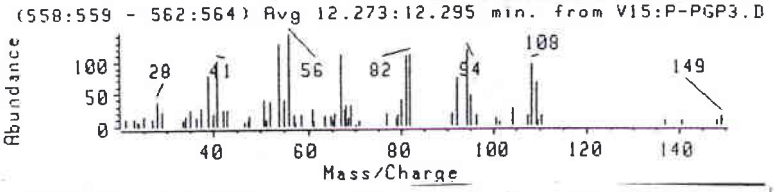
E


(214:215 - 211) Avg 4.829:4.851 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
28
39
41
53
67
80
81
99
Mass/Charge

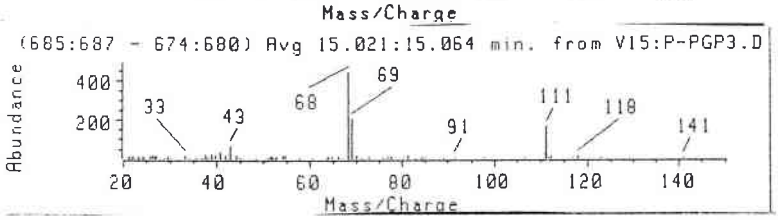
F


(534:535 - 523:529) Avg 11.755:11.776 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
27
41
67
82
97
110
125
149
Mass/Charge

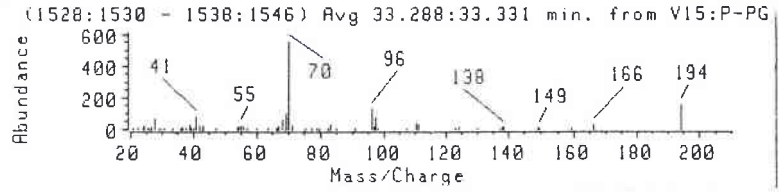
G


(558:559 - 562:564) Avg 12.273:12.295 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
28
41
56
82
94
108
149
Mass/Charge

H

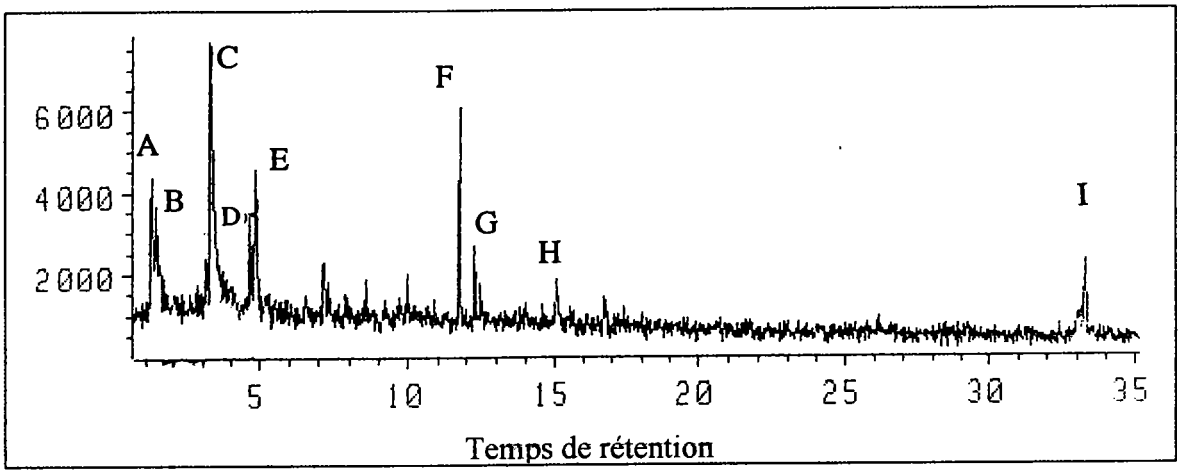

(685:687 - 674:680) Avg 15.021:15.064 min. from V15:P-PGP3.D
Abundance
33
43
68
69
91
111
118
141
Mass/Charge

I


(1528:1530 - 1538:1546) Avg 33.288:33.331 min. from V15:P-PG
Abundance
41
55
70
96
138
149
166
194
Mass/Charge

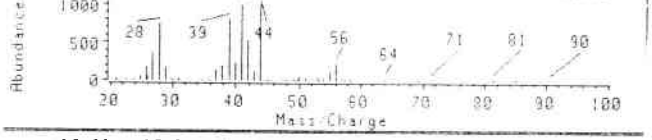
POLY(PRO-GLY-PRO)

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

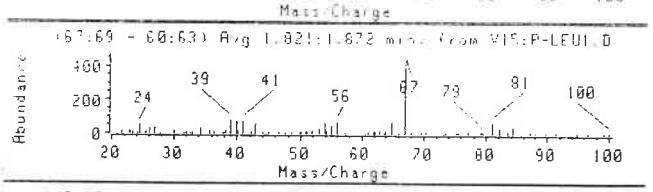


Pic	m/z	Molécule proposée
A	28, 44	CO_2
B	29, 31, 45, 53, 64, 72, 87	? CHO-NH-CH_2-CHO ?
C	28. 32, 41, 68, 69	3-Pyrroline
D	51, 52, 79	Pyrridine
E	28, 39, 67	Pyrrole
F	67, 82, 97, 110, 125	'Pyrolidine 1,2'-2-pyrrolidinone'($C_6H_9N_2O$)
G	54, 56, 82, 94, 108	
H	68, 69, 111, *154*	$C_7H_{10}N_2O_2$
I	70, 96, 124, 138, 166, 194	Cycloproproline

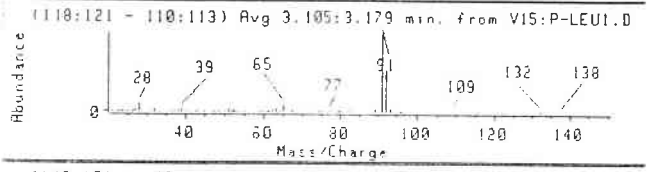
A



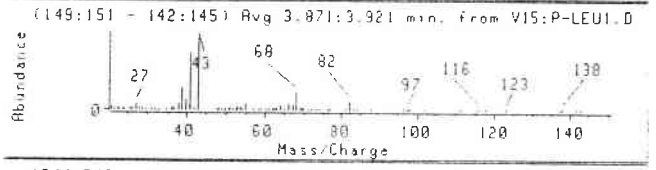
B



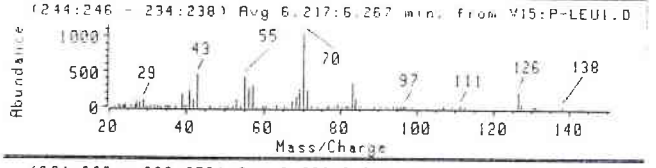
C



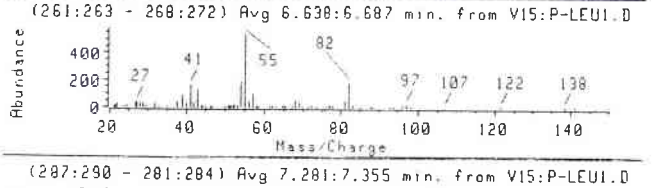
D



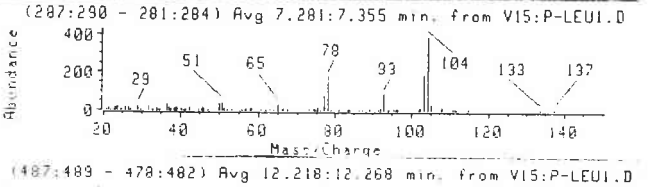
E



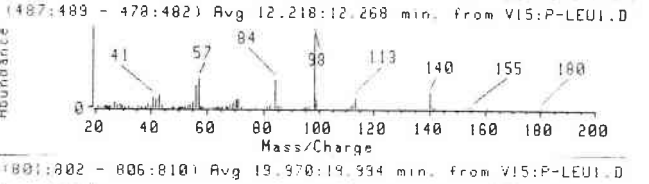
F



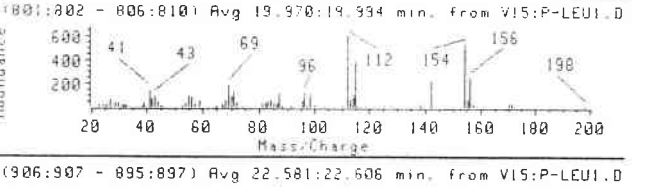
G



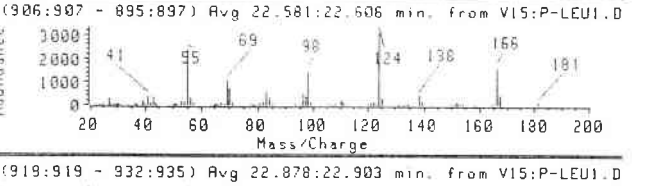
H



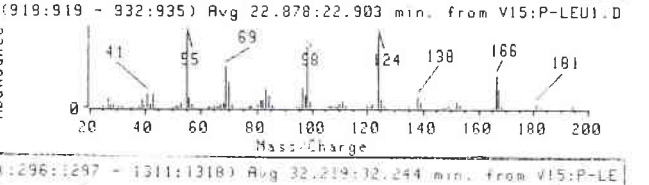
I



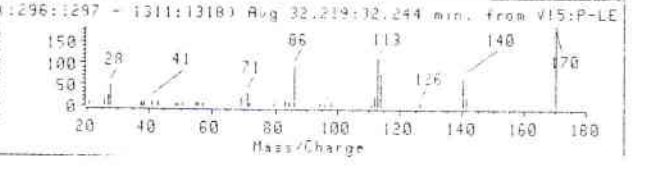
J



K

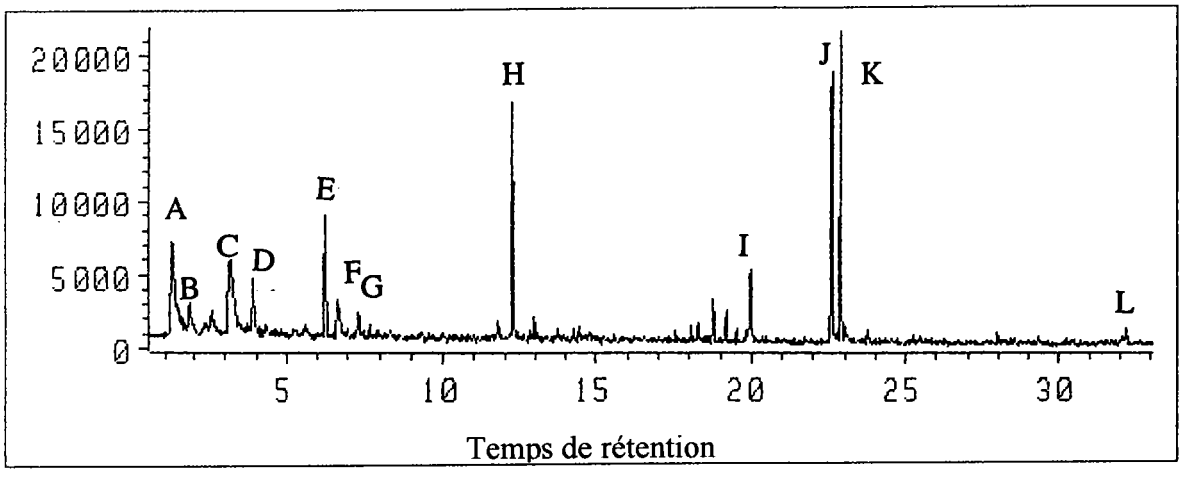


L



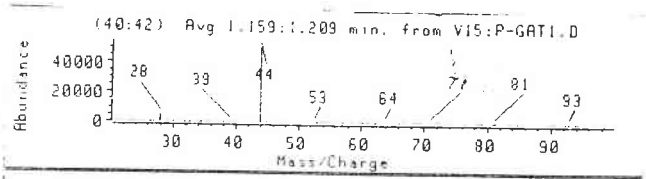
POLY(LEU)

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

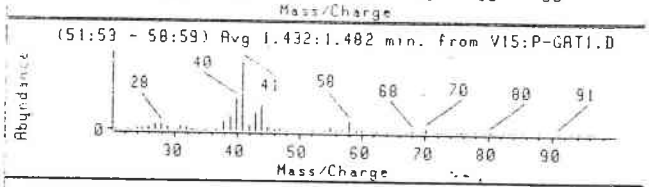


Pic	*m/z*	*Molécules possibles*
A	28, 39, 41, 44, 56	Propène et CO_2
B	41, 56, 67	
C	28, 91, 92	Toluène
D	39, 41, 43, 68, 81, 82	
E	39, 41, 43, 55, 70, 82, 126	Isobutyl-4, imidazol, 5-one (?)
F	39, 41, 43, 55, 82, 96	Méthyl-3, cyclopentanone (?)
G	78, 93, 103, 104	Styrène
H	**56, 57, 84, 98, 113, 140, 154**	**3 Imidazoline, 5-isobutyl, 2,4-dione**
I	69, 112, 114, 142, 154, 156	
J	**55, 69, 83, 98, 124, 166**	**2,5 Dicétopyrazine, 3-isobutyl**
K	**55, 69, 83, 98, 124, 166**	**2,5 Dicétopyrazine, 3-isobutyl**
L	43, 71, 86, 113, 114, 140, 170	2,5 Dicétopipérazine, 6-isobutyl

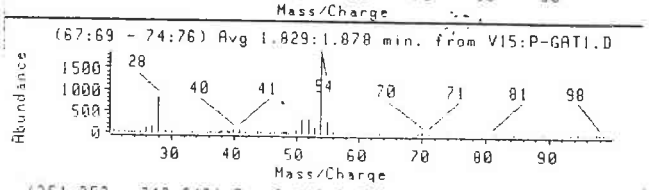
A



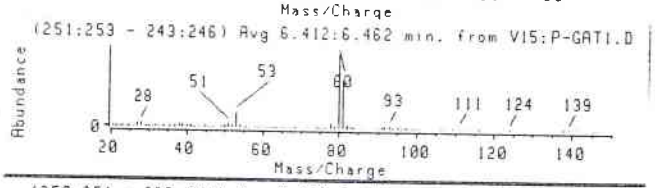
B



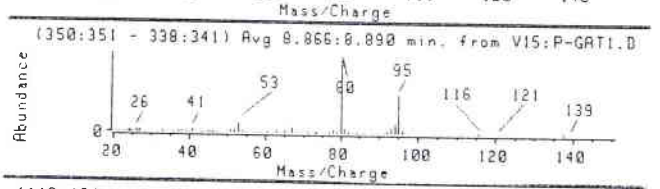
C



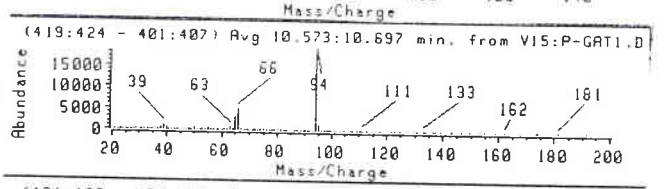
D



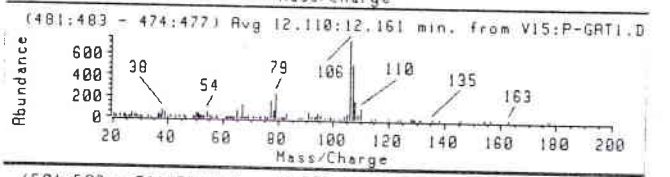
E



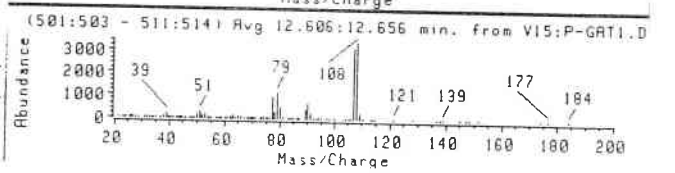
F



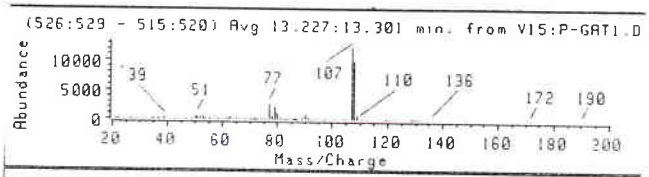
G



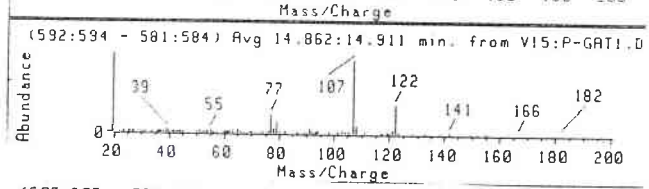
H



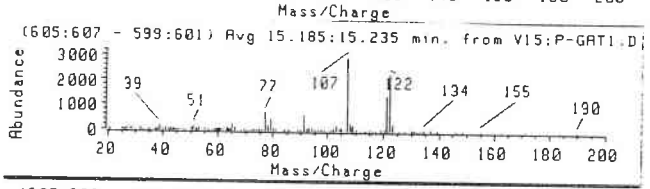
I



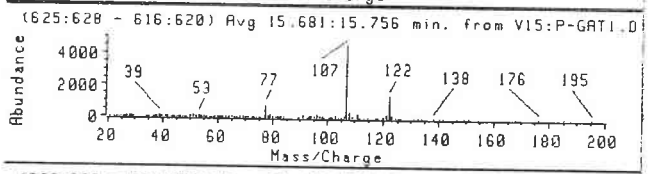
J



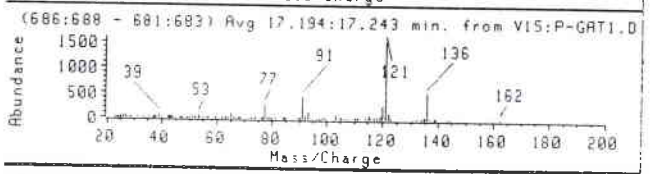
K



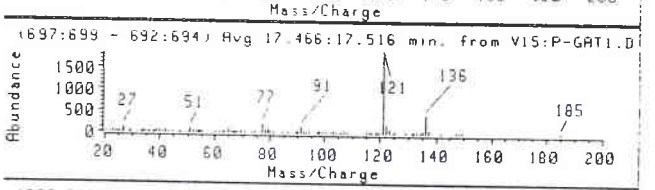
L



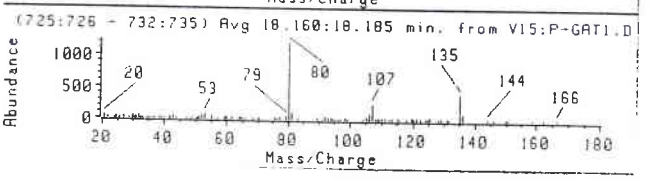
M



N

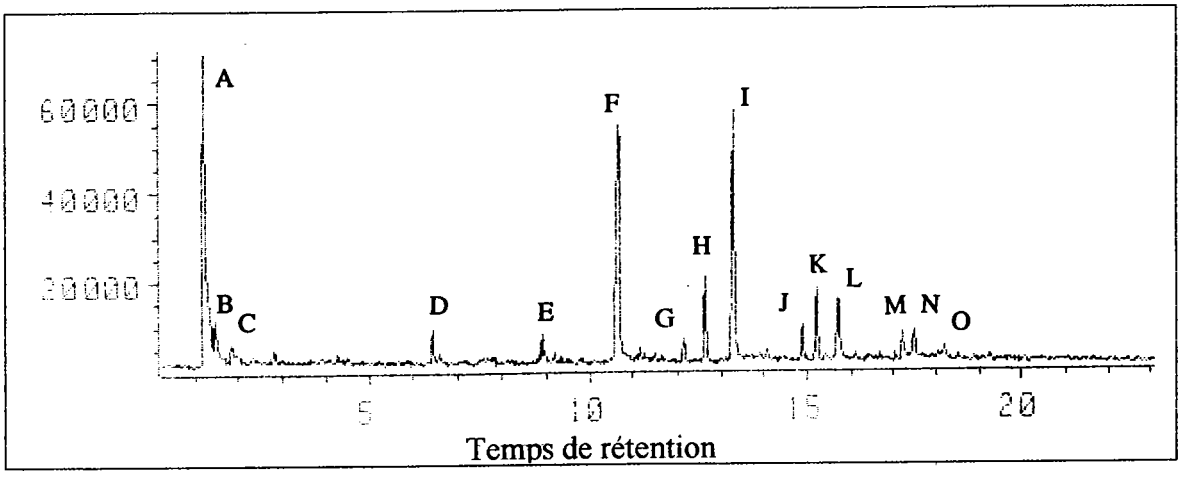


O



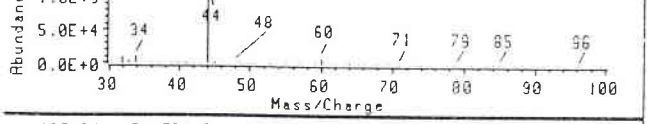
POLY(GLU-ALA-TYR)

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

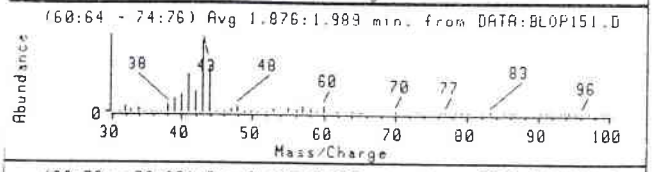


Pic	*m/z*	*Molécule possible*
A	**44**	**CO_2**
B	39, 40, 41, 44, 58	
C	28, 54, 70	
D	53, 80, 81	Méthyl-2, pyrrole
E	53, 80, 95	Ethyl-2, pyrrole
F	**65, 66, 94**	**Phénol**
G	65, 67, 77, 79, 106, 107	Méthyl-1, pyridine
H	77, 79, 90, 107, 108	Méthyl-3, phénol
I	**77, 79, 90, 107, 108**	**Méthyl-4, phénol**
J	77, 79, 107, 122	Ethyl-4, Phénol
K	77, 79, 91, 107, 121, 122	
L	77, 107, 122	
M	77, 91, 121, 136	
N	77, 91, 121, 136	
O	80, 107, 120, 135	? Pyridazine ?

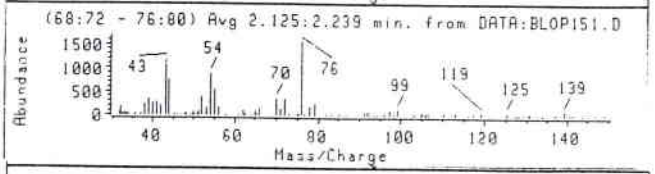
A



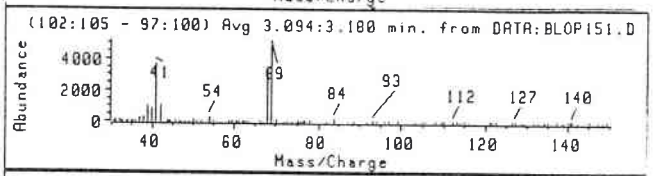
B



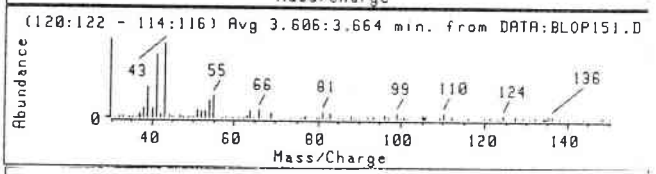
C



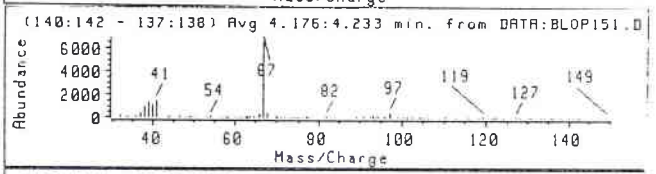
D



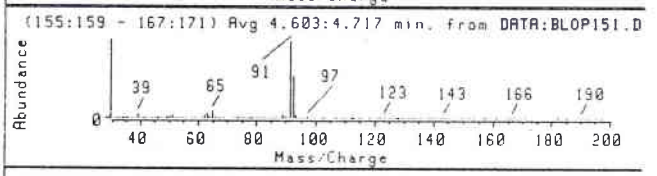
E



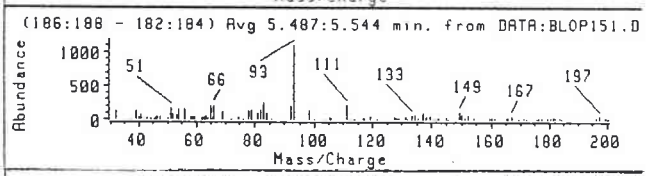
F



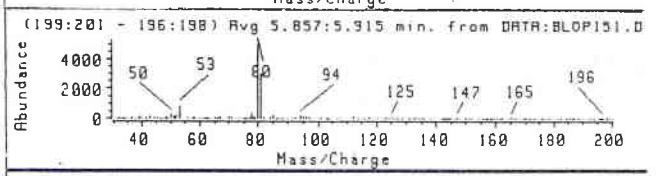
G



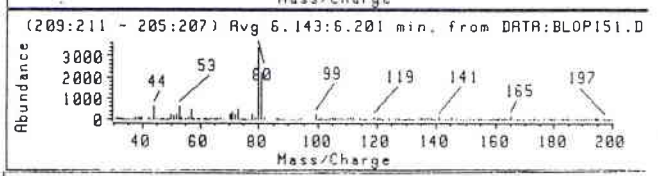
H



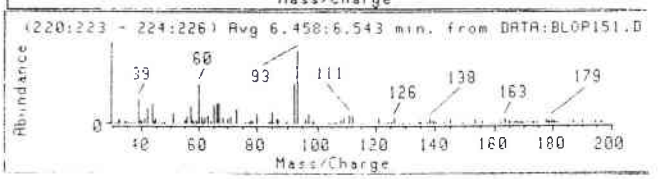
I



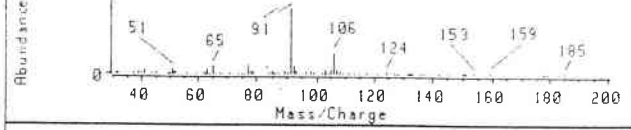
J



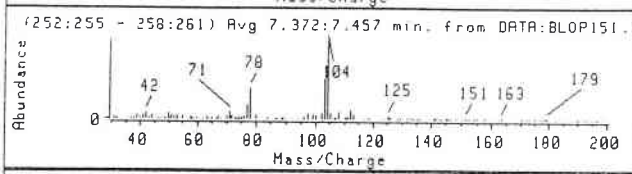
K



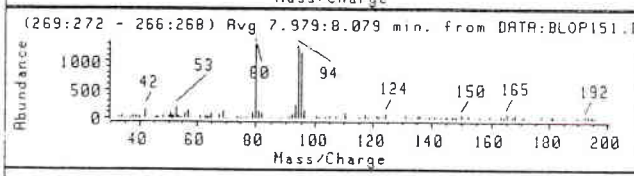
L



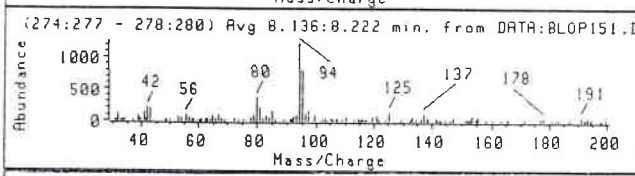
M



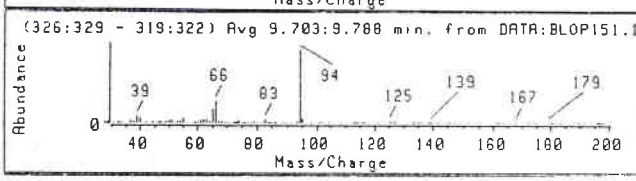
N



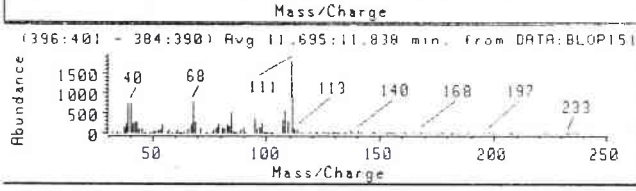
O



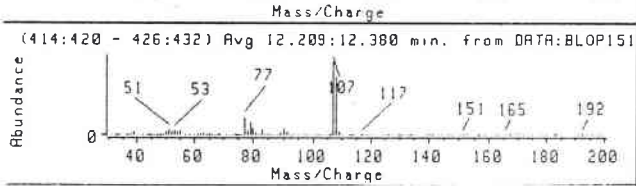
P



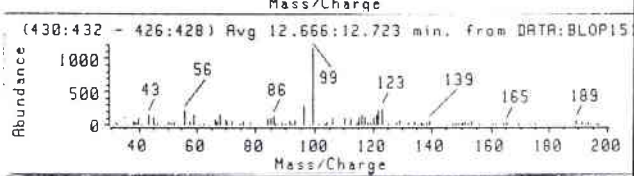
Q



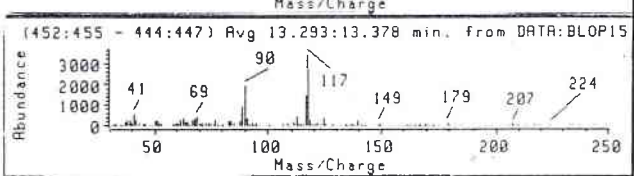
R



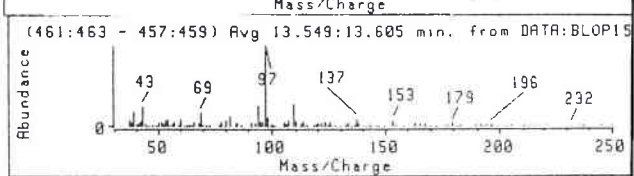
S



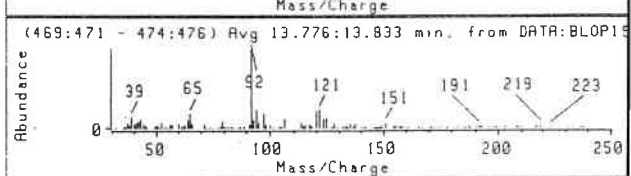
T



U



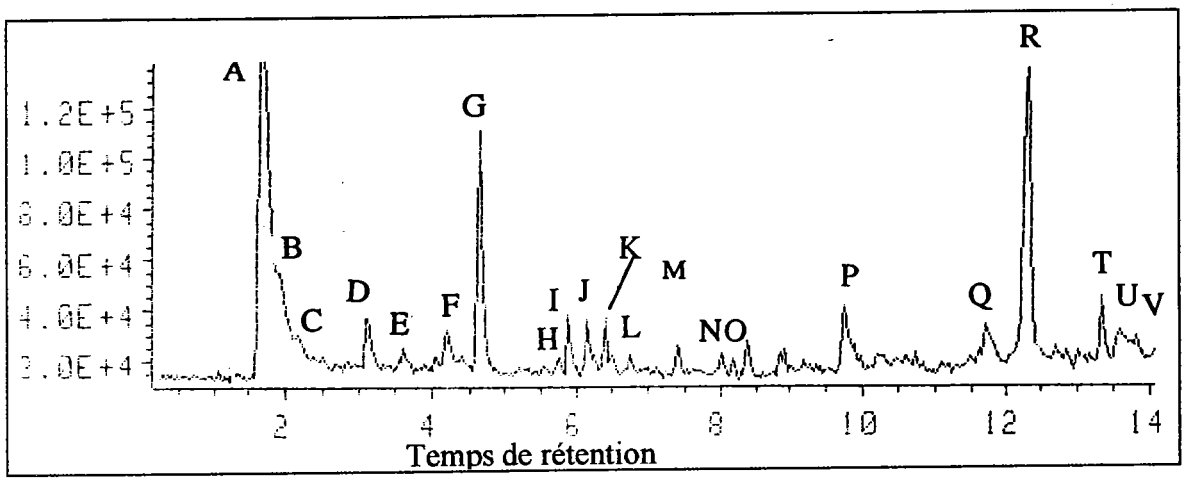
V



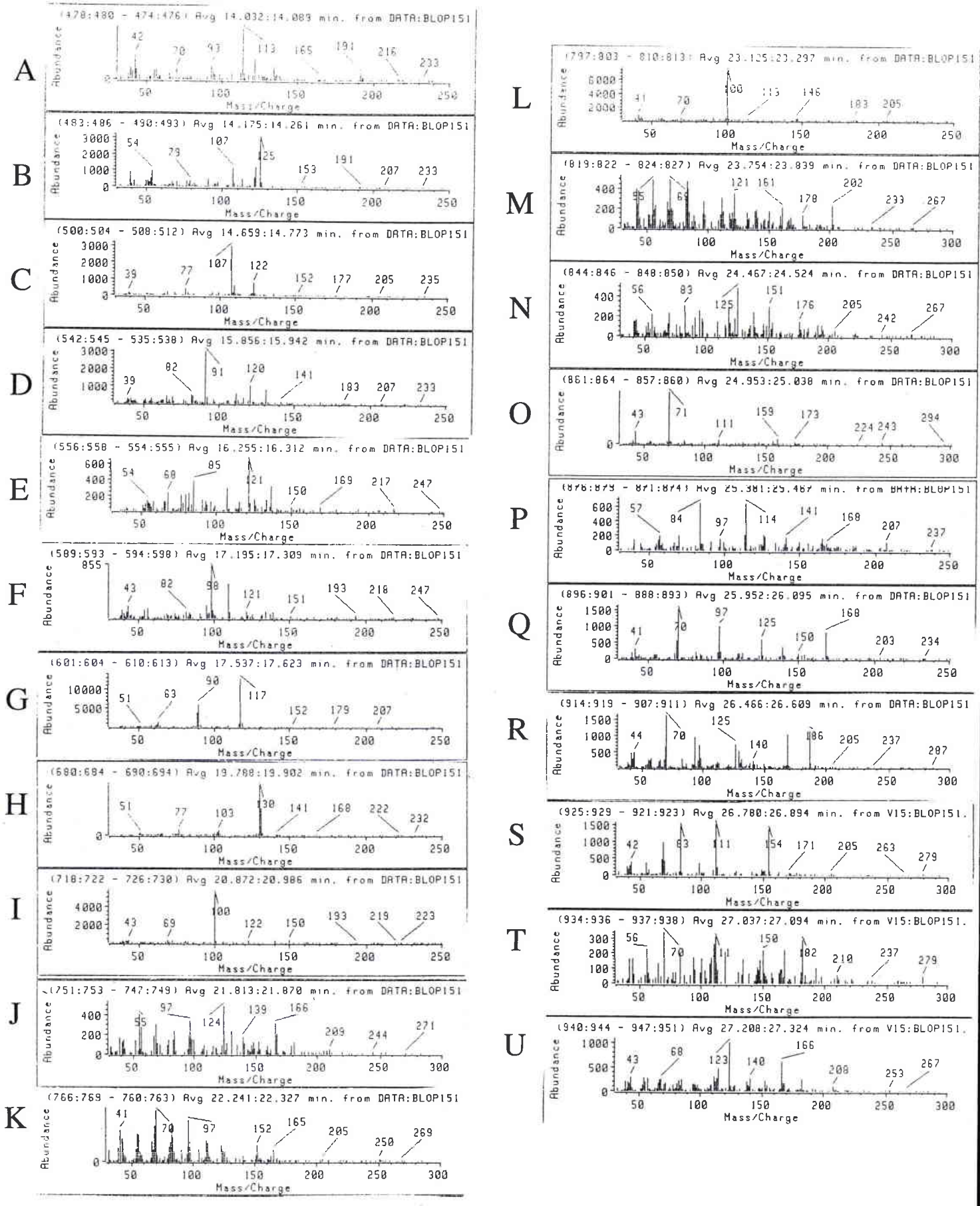
CHEVEU B

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

Agrandissement de la zone de 0 à 14 minutes du pyrogramme



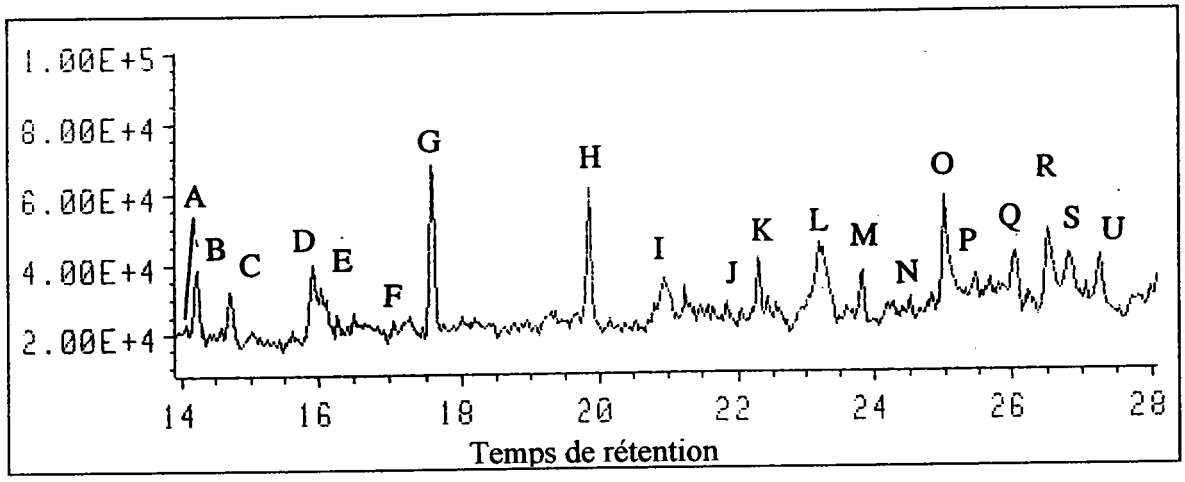
Pic	*R*	*Masses*	*Molécules proposées*	*Corrélation*
A	1.6-1.7	34, 44, 60	H_2S, CO_2 et CSO	Cys
B	1.8-2.0	42, 43		
C	2.1-2.2	43, 76	CS_2	Cys
D	3.0-3.2	41, 68, 69	Isoxazole (C_3H_3NO)	Cys, Arg, Lys
E	3.5-3.6	39, 41, 43, 55	? Propionitrile (C_3H_5N) ?	
F	4.1-4.2	41, 67	1H Pyrrole (C_4H_7N)	Glu
G	4.6-4.7	65, 91, 92	Toluène (C_7H_8)	Phé
H	5.4-5.6	66, 93	Pyridine, 2 méthyle (C_6H_7N)	Cys
I	5.8-5.9	53, 80, 81	1H Pyrrole, 3 méthyle (C_5H_7N)	Ser
J	6.1-6.2	44, 73, 80, 81	1H Pyrrole, 2 méthyle (C_5H_7N)	
K	6.4-6.5	57, 92, 93	Pyridine, 3 méthyle (C_6H_7N)	Mét
L	6.7-6.8	91, 106	Ethyle benzène (C_8H_{10})	Phé
M	7.4-7.5	77, 78, 103, 104	Styrène (C_8H_8)	Phé
N	7.9-8.0	80, 94, 95	Pyridine, 3 éthyle (C_6H_9N)	
O	8.1-8.2	94, 95, 125	? 1H Pyrrole, 2,4 diméthyle (C_6H_9N) ?	
P	9.6-9.7	65, 66, 94	Phénol (C_6H_6)	Tyr
Q	11.6-11.7	85, 111	? Cyclopropanedicarboximide (C_8H_7N) ?	
R	12.2-12.4	77, 79, 107, 108	Crésol (C_7H_8O)	Tyr
S	12.6-12.7	99, 122	2,5 Pyrrolidinedione ($C_4H_5NO_2$)	Asp
T	13.3-13.4	90, 116, 117	Benzéneacétonitrile (C_8H_7N)	Phé
U	13.5-13.6	97, 109		
V	13.7-13.8	65, 92, 120		


A
(470:480 - 474:476) Avg 14.032:14.083 min. from DATA:BLOP151
B
(483:486 - 490:493) Avg 14.175:14.261 min. from DATA:BLOP151
C
(500:504 - 508:512) Avg 14.659:14.773 min. from DATA:BLOP151
D
(542:545 - 535:538) Avg 15.856:15.942 min. from DATA:BLOP151
E
(556:558 - 554:555) Avg 16.255:16.312 min. from DATA:BLOP151
F
(589:593 - 594:598) Avg 17.195:17.309 min. from DATA:BLOP151
G
(601:604 - 610:613) Avg 17.537:17.623 min. from DATA:BLOP151
H
(680:684 - 690:694) Avg 19.788:19.902 min. from DATA:BLOP151
I
(718:722 - 726:730) Avg 20.872:20.986 min. from DATA:BLOP151
J
(751:753 - 747:749) Avg 21.813:21.870 min. from DATA:BLOP151
K
(766:769 - 760:763) Avg 22.241:22.327 min. from DATA:BLOP151
L
(797:803 - 810:813) Avg 23.125:23.297 min. from DATA:BLOP151
M
(819:822 - 824:827) Avg 23.754:23.839 min. from DATA:BLOP151
N
(844:846 - 848:850) Avg 24.467:24.524 min. from DATA:BLOP151
O
(861:864 - 857:860) Avg 24.953:25.038 min. from DATA:BLOP151
P
(876:879 - 871:874) Avg 25.381:25.467 min. from DATA:BLOP151
Q
(896:901 - 888:893) Avg 25.952:26.095 min. from DATA:BLOP151
R
(914:919 - 907:911) Avg 26.466:26.609 min. from DATA:BLOP151
S
(925:929 - 921:923) Avg 26.780:26.894 min. from V15:BLOP151.
T
(934:936 - 937:938) Avg 27.037:27.094 min. from V15:BLOP151.
U
(940:944 - 947:951) Avg 27.208:27.324 min. from V15:BLOP151.
Abundance
Mass/Charge

CHEVEU B

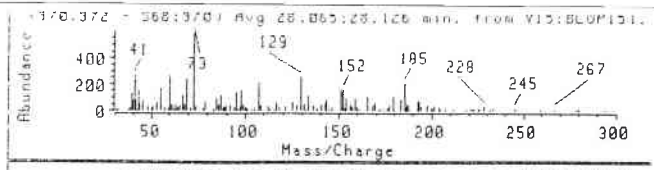
PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

Agrandissement de la zone de 14 à 28 minutes du pyrogramme

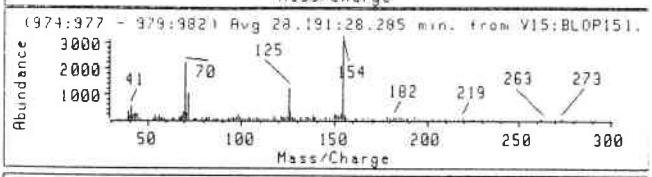


Pic	*R*	*Masses*	*Molécules proposées*	*Corrélation*
A	14.0-14.0	55, 79, 121		
B	14.1-14.3	54, 70, 91, 125		
C	14.6-14.8	77, 81, 107, 122	Phénol, 4-éthyle ($C_8H_{11}O$)	Tyr
D	15.8-15.9	91, 120	Phénol, 4-éthyléne (C_8H_8O)	Tyr
E	16.2-16.3	68, 85, 121, 136		
F	17.2-17.3	98, 109		
G	17.5-17.6	89, 90, 117	1H Indole (C_8H_7N)	Phé, Try
H	19.7-19.9	77, 103, 130, 131	1H Indole, 3-méthyle (C_9H_9N)	Try
I	20.9-20.9	68, 69, 100, 112, 140	2H Imidazole, 2 thione, 1,3 hydro ?	
J	21.8	55, 69, 98, 124, 166	2,5 Dicétopyrazine, 3-isobutyl	Leu
K	22.2-22.2	56, 70, 98, 111, 154		
L	23.1-23.3	57, 100	2,4 Imidazolidinedione ($C_3H_4N_2O_2$) ?	
M	23.7-23.8	55, 69, 121, 161, 202		
N	24.4-24.5	70, 125, 151, 194		
O	24.9-25.0	43, 71, 130, 159, 243		
P	25.4-25.4	57, 84, 114, 165		
Q	25.9-26.0	41, 70, 97, 125, 140, 168		
R	26.5-26.6	70, 93, 98, 125, 168, 186		
S	26.8-26.9	55, 83, 111, 154, 192, 228		
T	27.0-27.1	53, 70, 111, 182	1 Phényléthynylcyclohexène ($C_{14}H_{14}$)?	
U	27.2-27.3	57, 71, 123, 166		

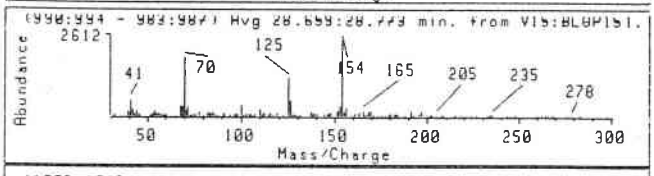
A



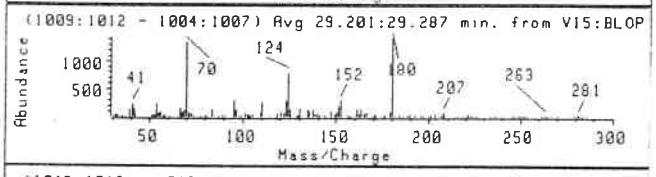
B



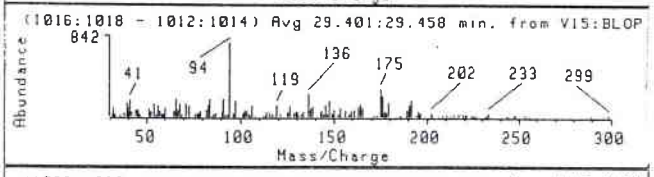
C



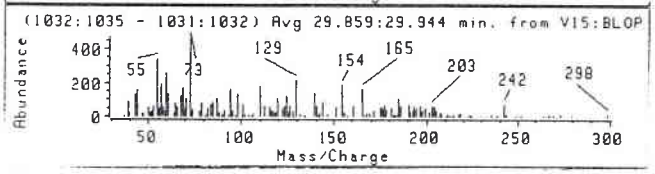
D



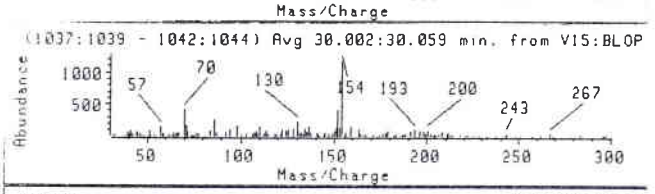
E



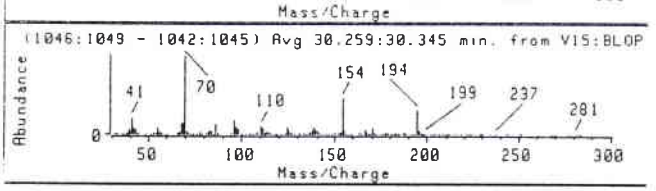
F



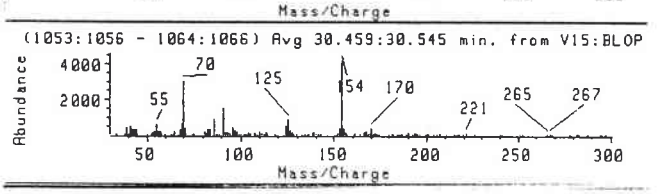
G



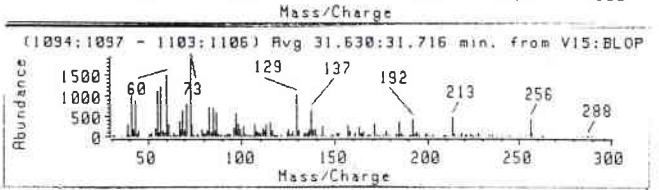
H



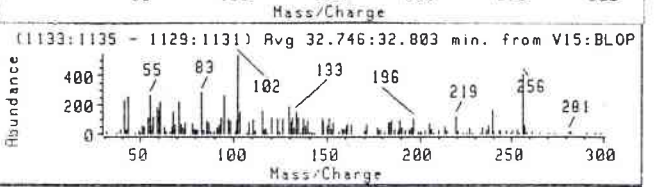
I



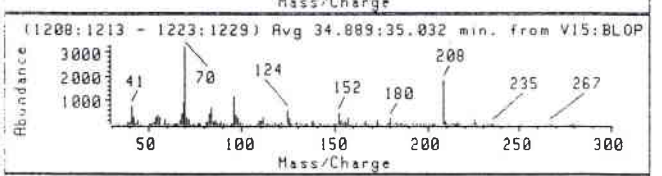
J



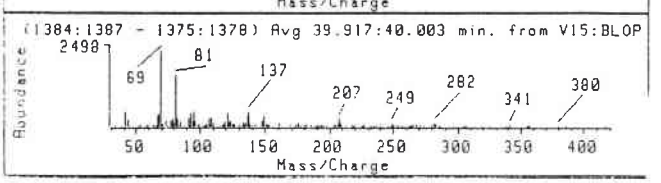
K



L



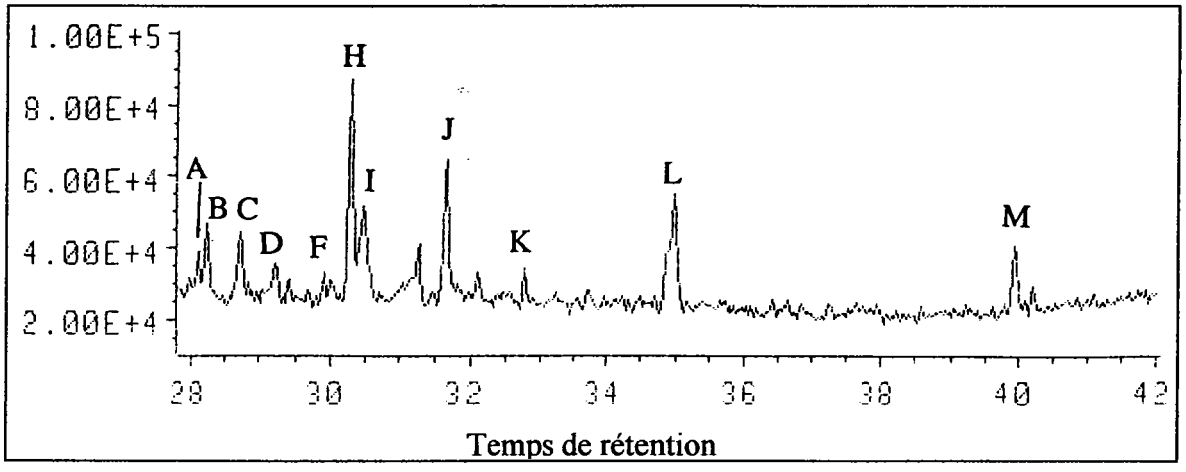
M



CHEVEU B

PYROLYSE PAR FILAMENT GC/MS

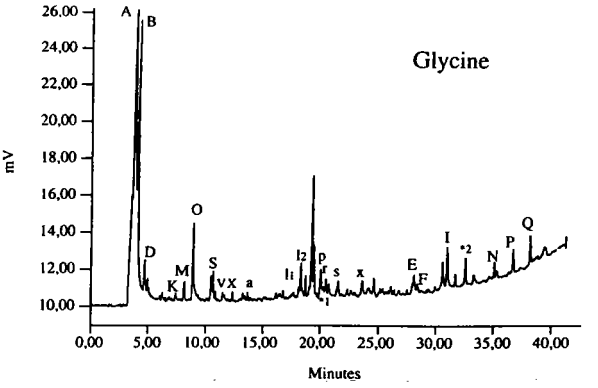
Agrandissement de la zone de 28 à 42 minutes du pyrogramme

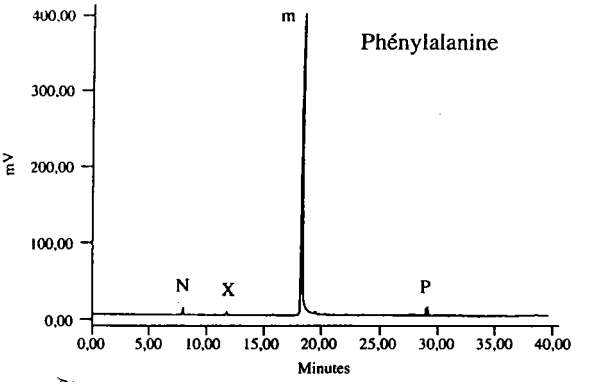


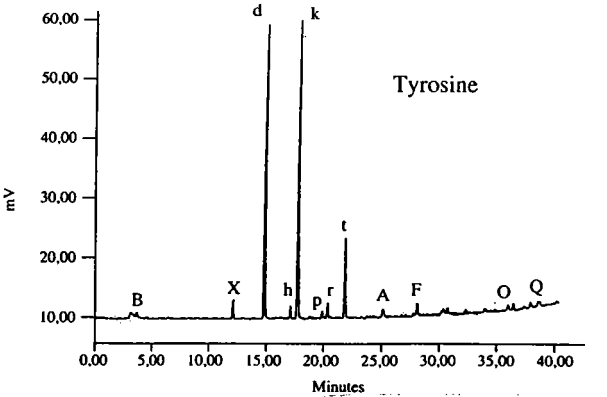
Pic	*R*	*Masses*	*Molécules proposées*	*Corrélation*
A	28.0-28.1	60, 73, 129, 152, 185	Acide myristique ($C_{14}H_{28}O_2$)	
B	28.2-28.3	70, 72, 98, 125, 154		
C	28.6-28.8	70, 100, 125, 154		
D	29.2-29.3	41, 70, 124, 180		
E	29.4-29.4	84, 94, 129, 159, 190		
F	29.8-29.9	60, 73, 129, 154, 242		
G	29.9-30.0	43, 70, 111, 154, 193, 243		
H	30.2-30.4	41, 70, 154, 194	Cycloproproline ($C_{10}H_{12}N_2O_2$)	Pro
I	30.4-30.5	70, 91, 125, 154, 170		
J	31.6-31.7	60, 73, 129, 171, 213, 256	Acide hexadécanoique ($C_{16}H_{32}O_2$)	
K	32.7-32.8	57, 102, 137, 196, 256		
L	34.9-35.0	70, 96, 152, 157, 208, 225		
M	39.8-40.0	41, 69, 80, 137, 149		

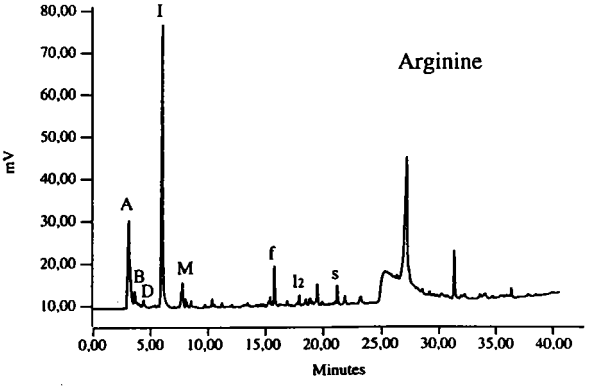
CORRESPONDANCES DES TEMPS DE RETENTION ENTRE PyGC/FID et PyGC/MS DES ACIDES AMINES

		CG/FID	CG/SM	Molécule possible
Gly	K	7.6	3.6	AA - CO_2
	M	8.2	4.0	? Pyrrole ?
	X	12.4	7.1	Styrène
	a	13.9	8.2	
	l_1	18.4	11.4	
	l_2	18.6	11.6	
		19.0	12.1	
		19.4	12.4	Dicétopyrazine
	p	20.3	13.6	
	r	20.7	13.7	
	s	22.0	14.9	
	z	25.0	17.4	
	E	28.6	21.8	
	F	28.8	22.0	
		31.4	24.5	Phase ?
	N	36.2	30.4	
	P	37.6	32.3	
Phé	N	8.5	4.4	Toluène
	U	11.7	6.5	Ethylbenzéne
	X	12.6	7.1	Styrène
		16.8	10.2	Benzène, méthanamine
	m	19.0	12.6	Benzène, éthanamine
	p	20.5	13.1	Benzène, acétonitrile
		23.5	15.6	Benzène, propanitrile
		30.5	22.8	Diphényl 1,1' éthane
Tyr	X	12.6	7.2	Styrène
	d	15.4	9.8	Phénol
	h	17.6	11.8	
	k	18.4	12.2	Phénol, 4-méthyl
	p	20.4	13.7	
	r	21.0	14.6	Phénol, 4-éthyl
	t	22.5	16.0	Phénol, 4-éthylène
	F	28.7	21.0	Phénol, 4-éthanamine
		28.9	21.8	
Arg	A	3.2	1.6	CO_2
	I	6.5	3.1	Isoxazole
		8.2	3.7	
	M	8.4	4.0	
	f	16.4	10.0	Pyridine
	l_2	18.5	12.8	
		26.0	21.8	
		28.0	24.5	
		32.4	29.9	



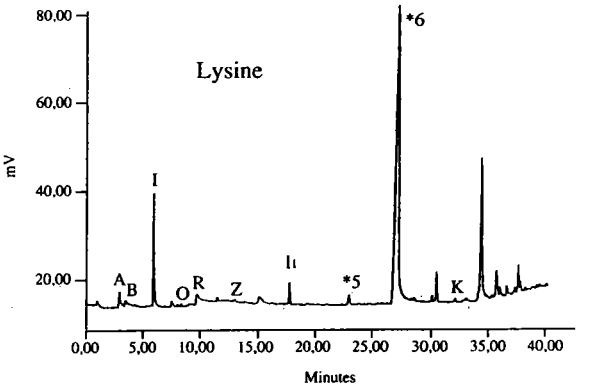


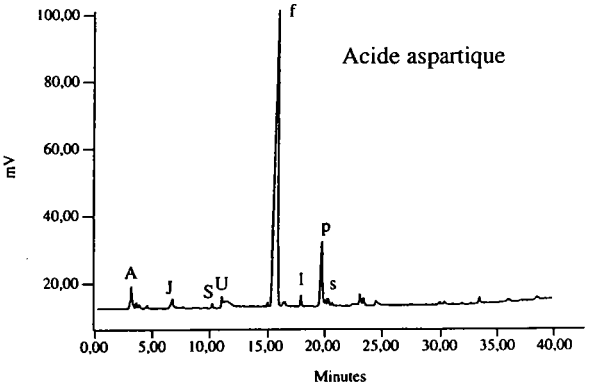


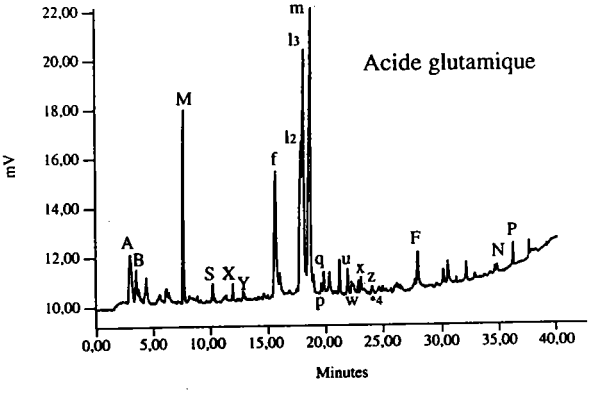


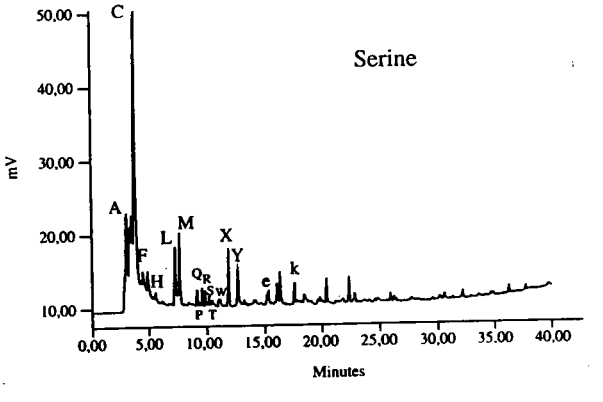
CORRESPONDANCES DES TEMPS DE RETENTION ENTRE PyGC/FID et PyGC/MS DES ACIDES AMINES

		CG/FID	CG/SM	Molécule possible
Lys	I	6.4	3.4	
	R	10.4	5.8	
	Z	13.5	7.6	
		15.7	10.4	
	l_1	18.4	11.3	
	*5	23.7	15.8	
	*6	28.0	19.5	
		31.4	22.8	
		35.4	27.0	
		36.6	27.6	
		38.7	31.4	
Ac. Asp	J	6.9	3.8	Acide propénoïque
	S	10.8	5.7	
		15.7	9.6	1H pyrrole 2,5 dione
	f	16.2	10.2	1H pyrrole 2,5 dione
	p	20.6	13.7	
	s	21.2	14.2	
		31.3	23.9	Phtalates
		32.3	24.8	
Ac. Glu	M	8.2	4.0	1H pyrrole
	f	16.4	10.0	
		16.8	10.5	
	l_2	18.5	11.5	2 pyrrolidinone
	l_3	18.6	11.9	2-Pyrimidinamine
	m	19.4	12.2	
Sér	C	4.5	2.0	
		5.3	2.2	
	H	6.2	3.2	
	L	7.7	3.7	AA - H_2NOH
	M	8.4	4.1	α lactame
	X	12.6	6.0	
	Y	13.4	7.1	Styrène
	k	18.3	10.5	
		21.3	12.3	
		23.1	13.6	
		23.7	14.0	
		26.8	15.7	
		27.1	16.0	
		27.2	16.2	
		28.5	18.2	
		32.2	20.3	
		33.2	21.8	
		35.4	23.9	
		36.1	24.5	



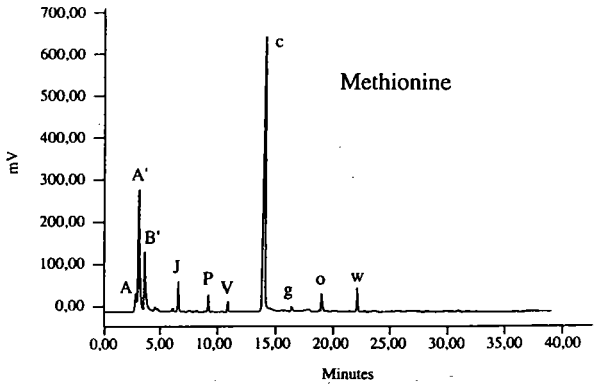


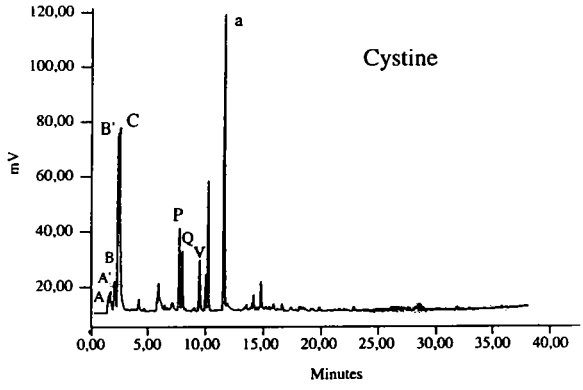


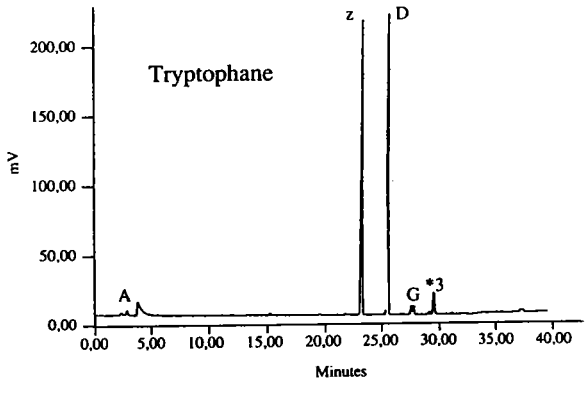


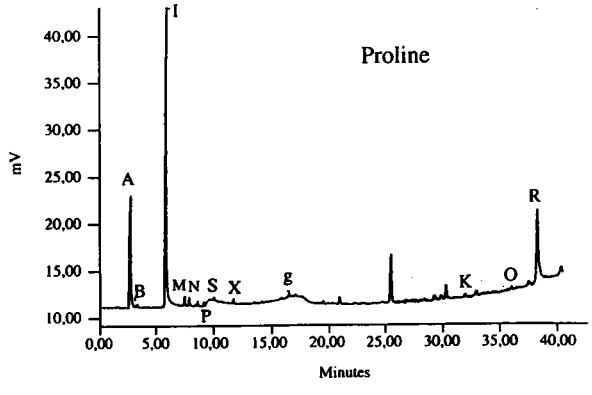
CORRESPONDANCES DES TEMPS DE RETENTION ENTRE PyGC/FID et PyGC/MS DES ACIDES AMINES

		CG/FID	CG/SM	Molécule possible
Mét	A	3.3	1.8	CO_2
	A'	3.6	1.9	$HSCH_3$
	B'	4.2	2.3	$CH_3CH_2SCH_3$
	J	7.3	3.5	Propène, 3-méthylthio
	P	10.0	5.0	Thiophène, tétrahydro
	V	11.7	6.2	Pyridine, 3-méthyl
	c	15.0	8.7	Propanamine, 3-méthylyhio
	g	17.4	11.2	α lactame, éthyl-2-méthylthio
	o	20.1	13.7	Buténal, 3-méthylthio
	w	23.	16.1	$RCHNHCH_2R$
Cys	C	4.5	2.1	CS_2
		6.1	2.8	Thiophène
	P	9.8	4.9	α lactame CS
	Q	10.1	5.1	Pyridine, 2-méthyl
	V	11.7	6.1	
		12.2	6.5	
		12.4	6.6	α lactame CHS
	a	13.8	7.6	α lactame CH_2SH
		16.4	10.2	2,5 Dicétopipérazine, 3-méthyl
		16.6	10.4	$CH_2CHSSCH_2CHNH$
		17.1	10.8	?
		18.2	11.8	?
		19.0	12.4	Phtalates
		19.7	13.5	
		25.5	20.5	
		29.5	25.4	
Try	z	24.8	17.4	Indole
	D	27.3	19.6	Indole, 3-méthyl
		29.3	21.6	Indole, 3-éthyl
	G	29.6	21.8	Quinoline, 4-méthyl
	*3	31.4	23.3	Indole, 3-éthylène
		39.5	30.8	Phtalates
Pro	I	6.5	3.1	Pyrrolidine
	M	8.0	4.1	
	N	8.5	4.5	
	X	12.3	7.1	Styrène
		26.5	17.1	
		32.0	22.4	
	k	33.0	22.7	
		34.0	23.9	
	R	39.7	29.8	Cycloproproline

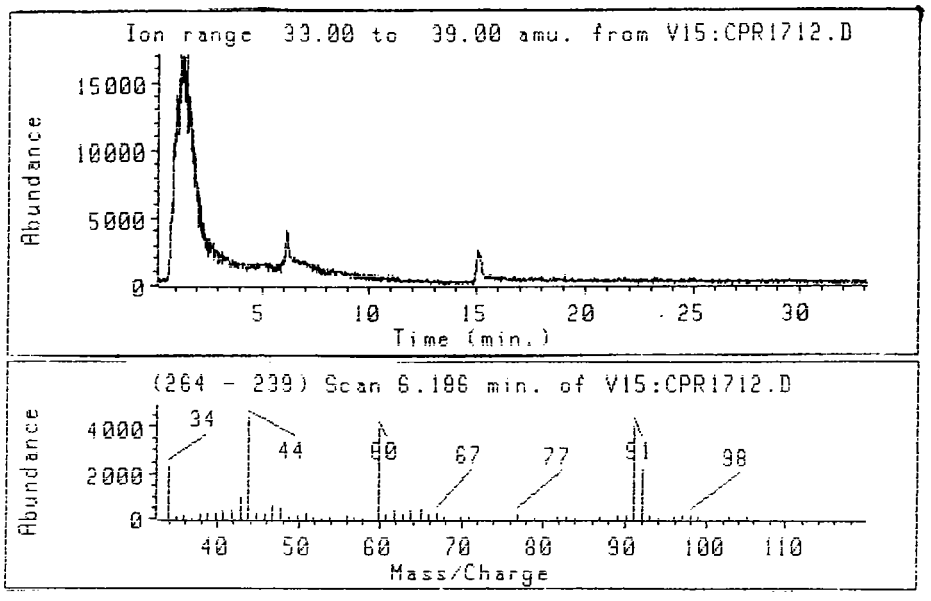




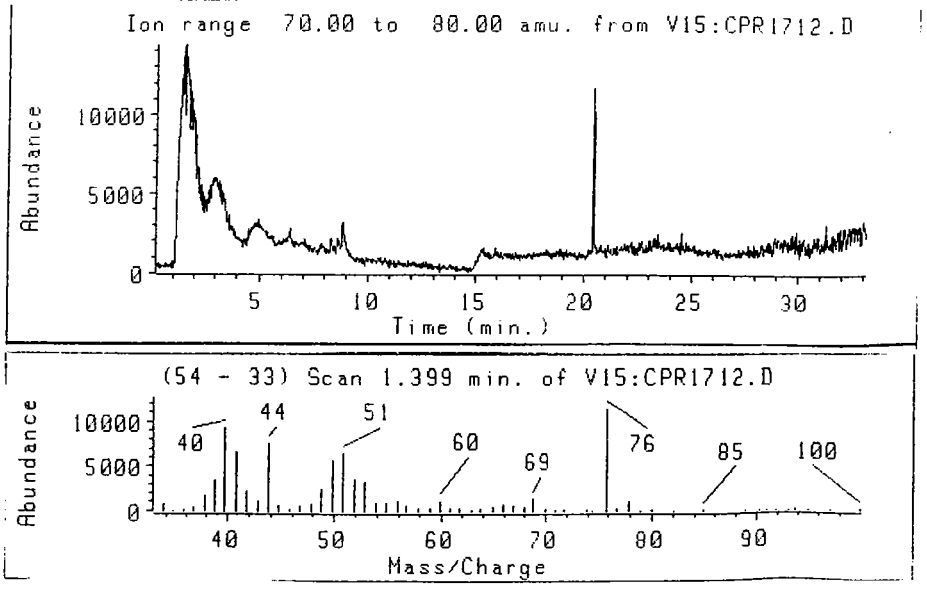




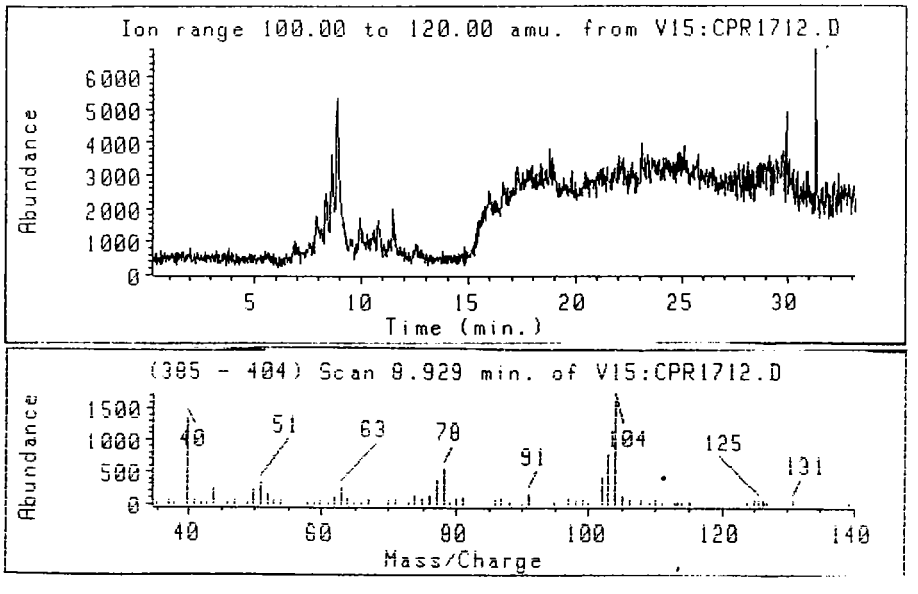
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 33 à 39



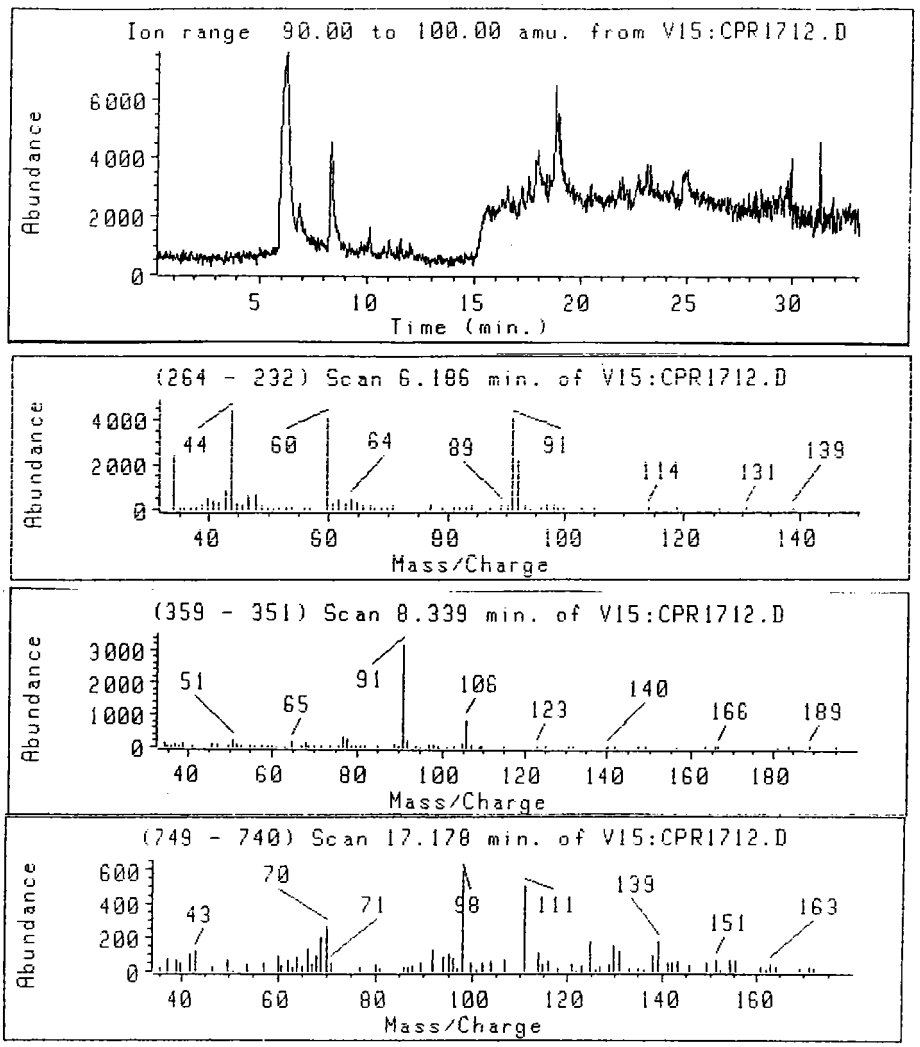
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 70 à 80



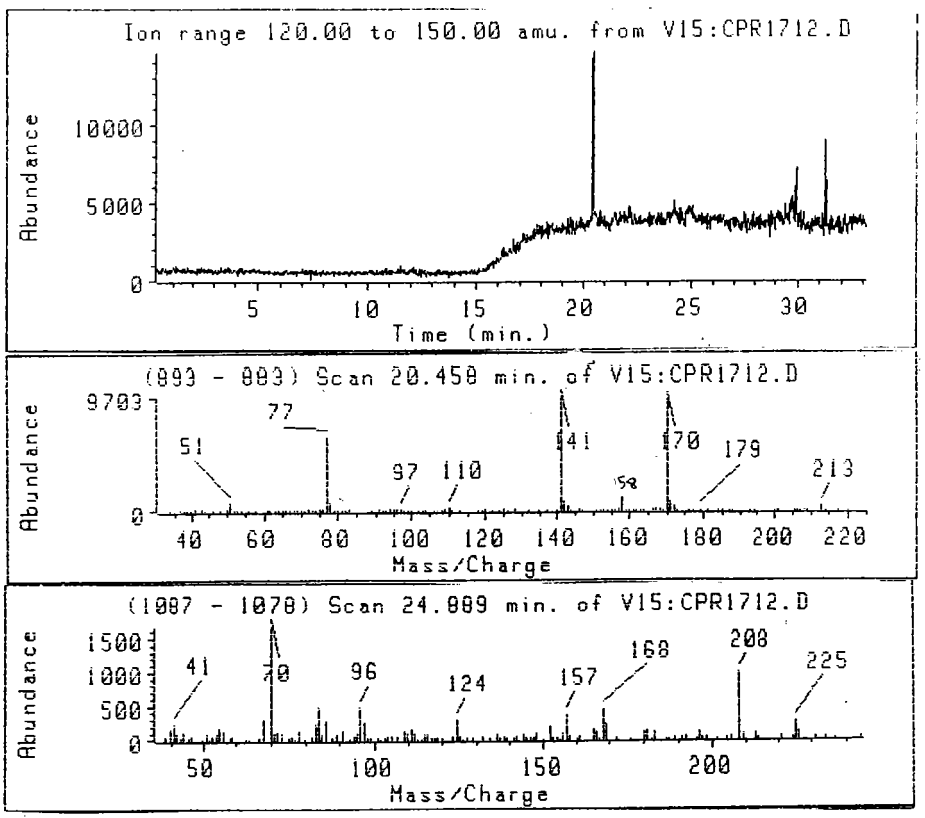
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 100 à 120



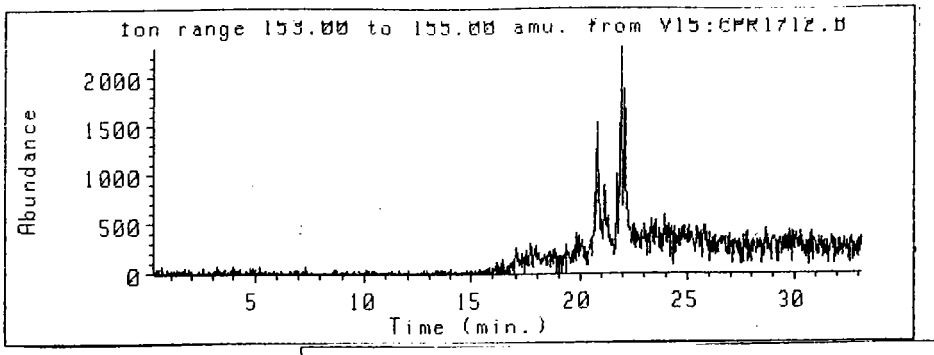
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 90 à 100

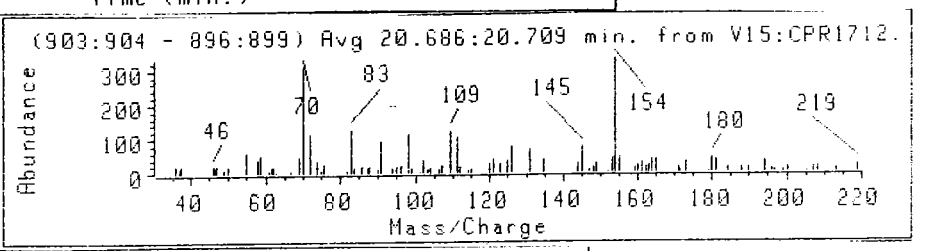


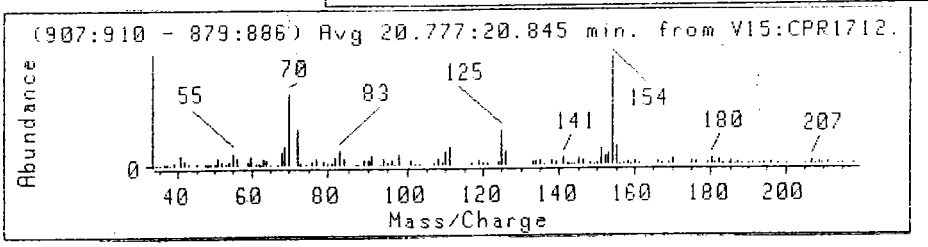
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 120 à 150

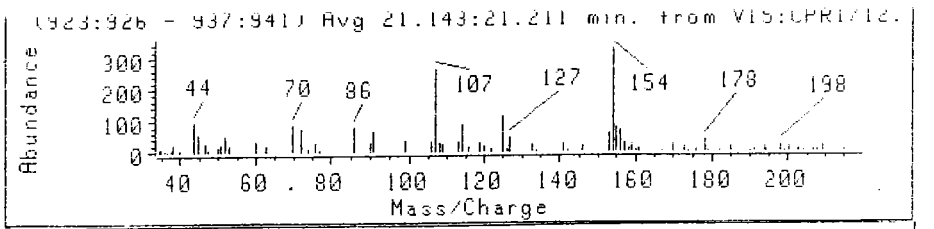


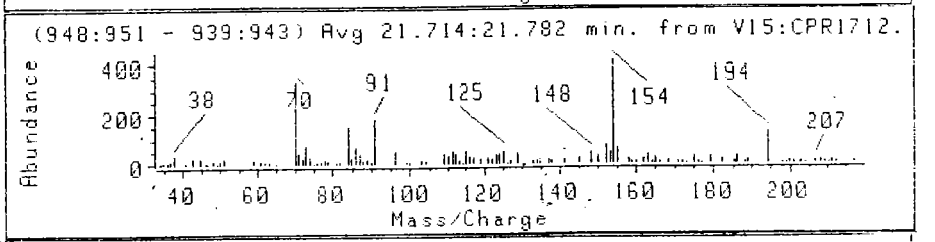
Chromatogramme redessiné pour la gamme de masses m/z = 153 à 155

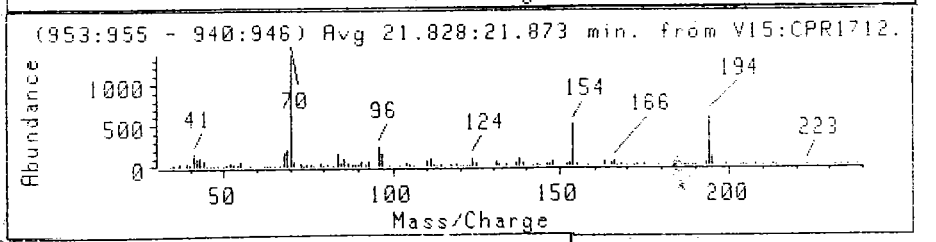


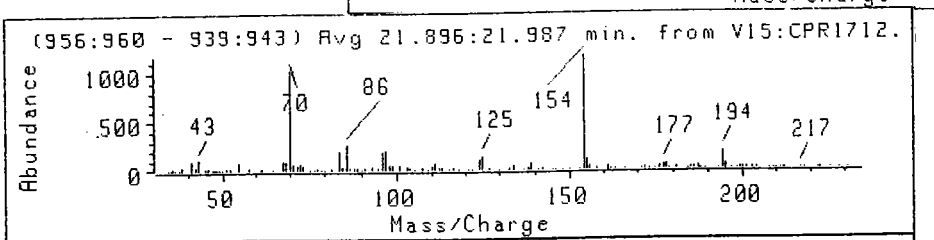


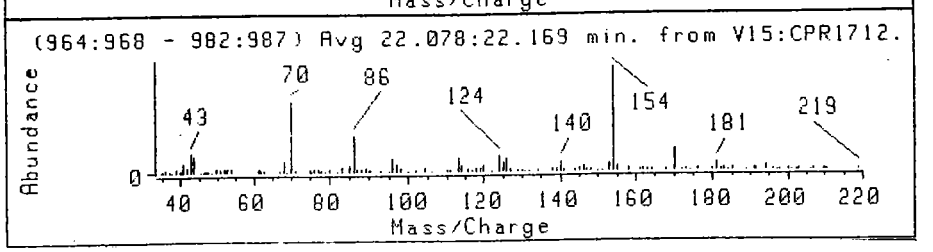




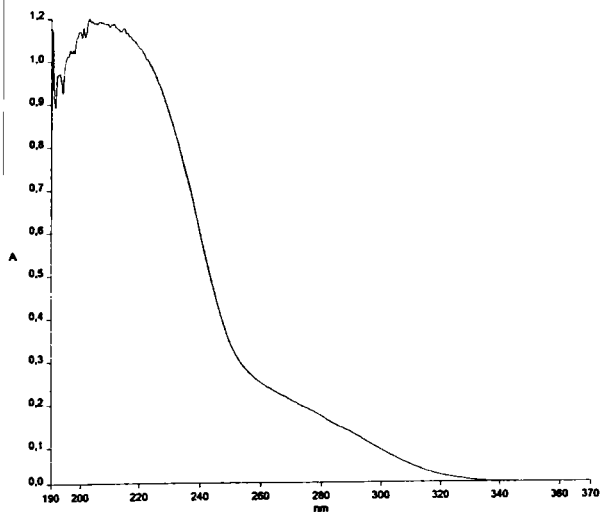




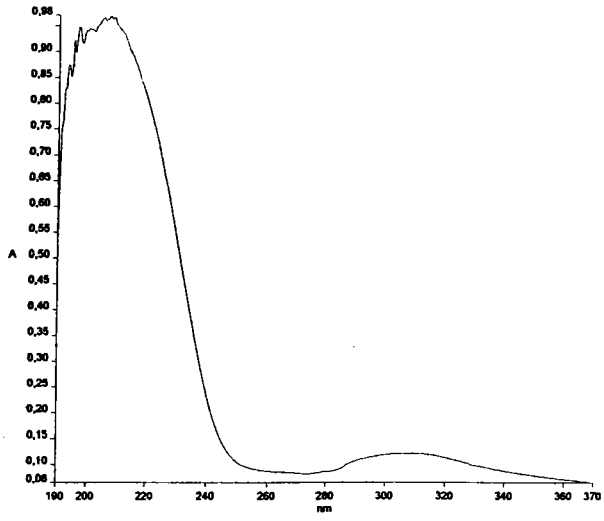




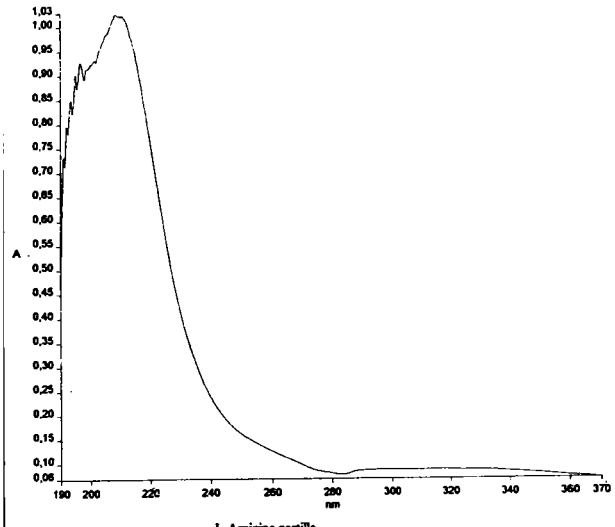
Spectres d'absorption U.V. des poudres d'acides aminés pressées en pastilles



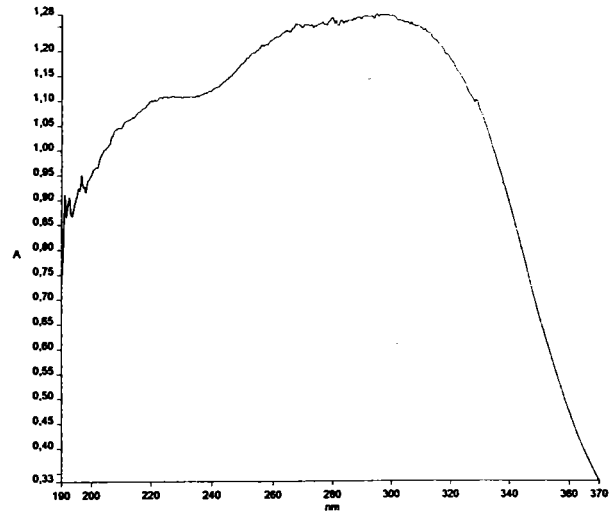
L-Acide Aspartique pastille



L-Acide Glutamique pastille

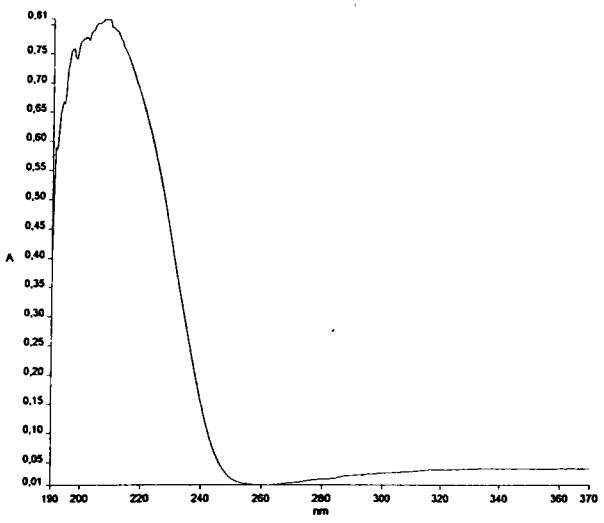


L-Arginine pastille

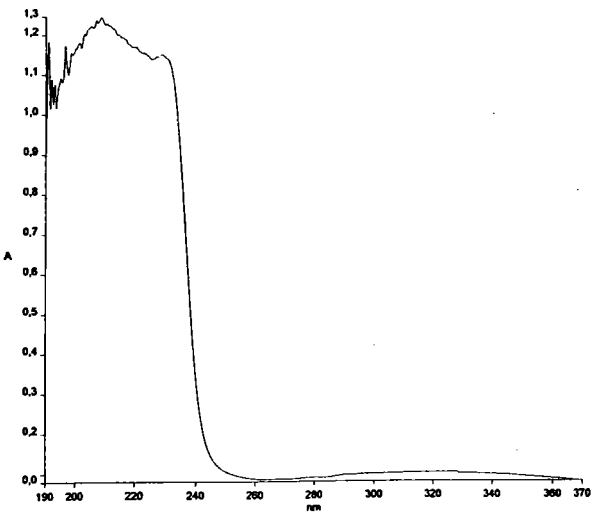


L-Cystine pastille

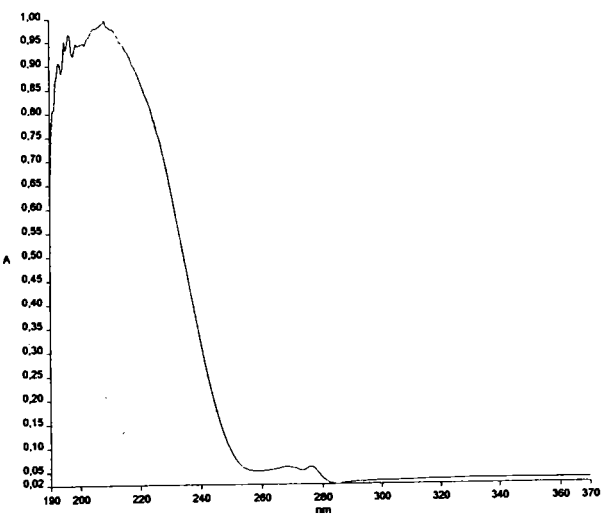
Spectres d'absorption U.V. des poudres d'acides aminés pressées en pastilles



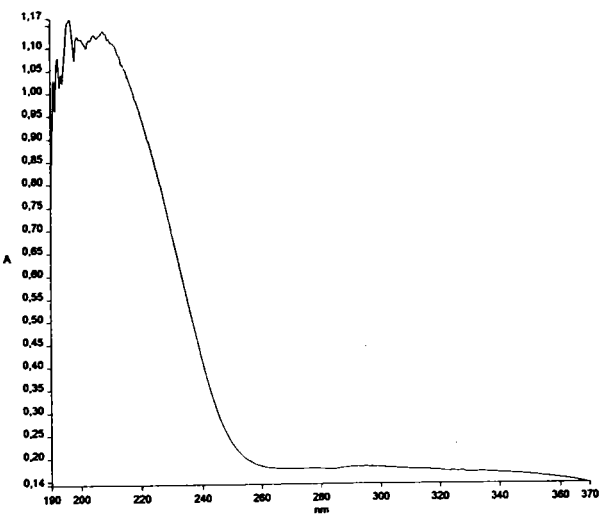
L-Glycine en pastille



L-Hitidine pastille

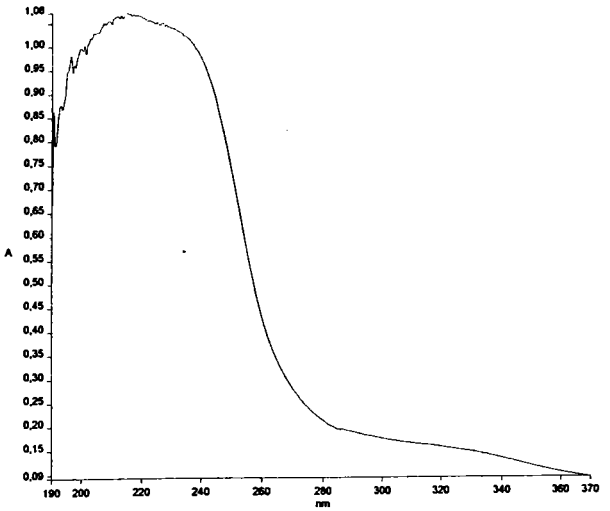


L-Leucine pastille

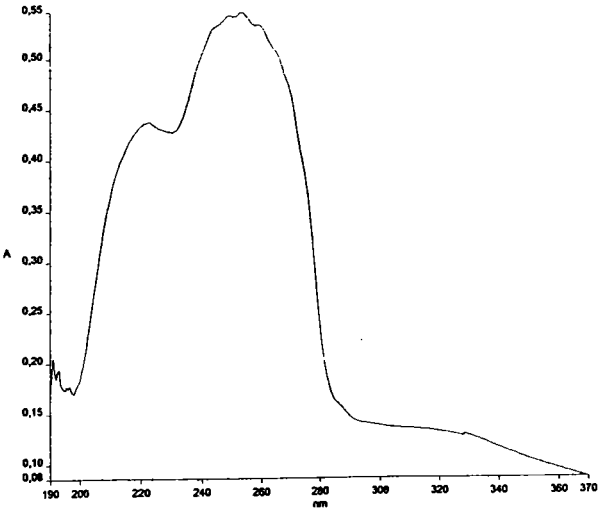


L-Lysine en pastille

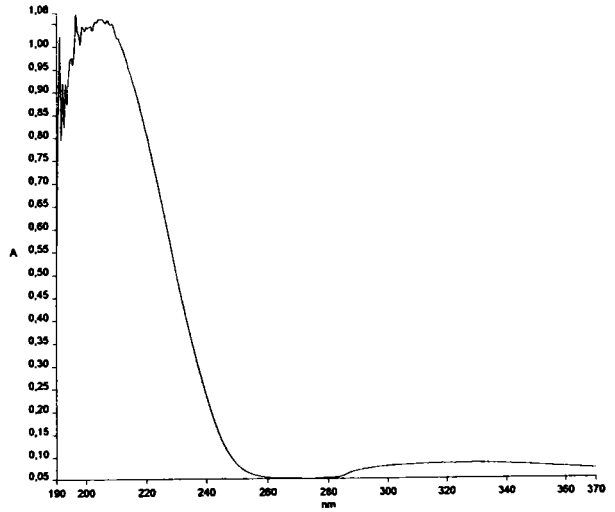
Spectres d'absorption U.V. des poudres d'acides aminés pressées en pastilles



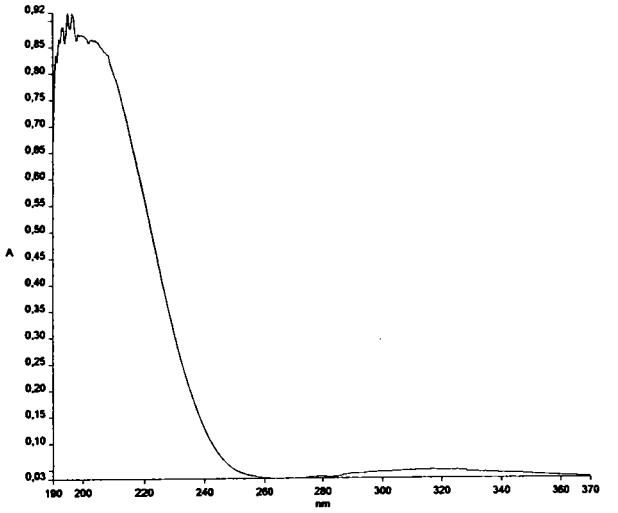
L-Methionine pastille



L-Phenylalanine pastille

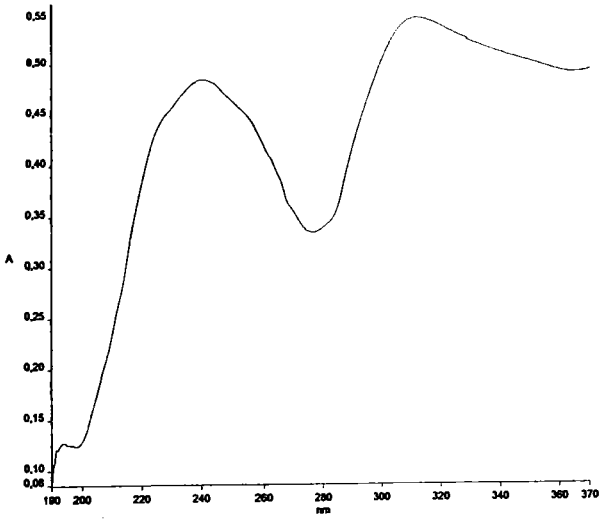


L-Proline pastille

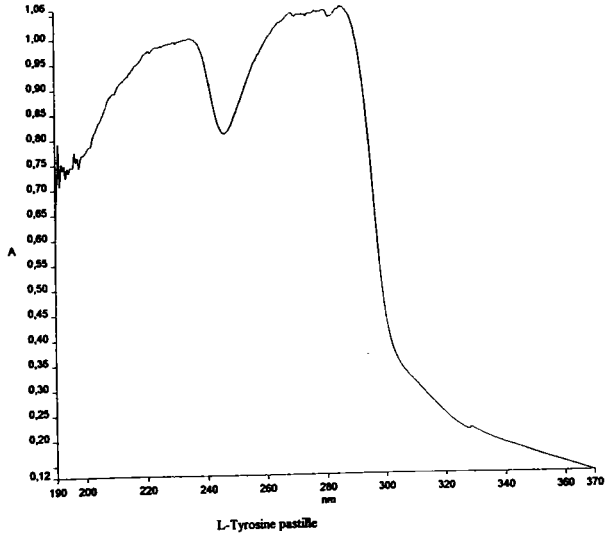


L-Threonine pastille

Spectres d'absorption U.V. des poudres d'acides aminés pressées en pastilles



L-Tryptophane en pastille



L-Tyrosine pastille