

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDES DE COMPLEXES PEPTIDIQUES
DU CUIVRE(II) COMME MODELES
DE LA DISPONIBILITE BIOLOGIQUE
ET DU TRANSPORT DU CUIVRE
DANS LES EAUX NATURELLES

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES PAR

DANIELE PIEMONTESE
INGÉNIEUR CHIMISTE DIPLÔMÉ
DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

NOVEMBRE 1982

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etudes de complexes peptidiques du cuivre(II)
comme modèles de la disponibilité biologique
et du transport du cuivre dans les eaux
naturelles

de Mademoiselle Danièle Piemontesi

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs les Professeurs P. Baccini,

K. Bernauer et W. Schneider (EPF-Zurich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 27 janvier 1983

Le doyen:



A. Aeschlimann

A ceux que j'aime...

Au bout de mon âge
Qu'aurais-je trouvé
Vivre est un village
où j'ai mal rêvé

Il m'a fallu naître
Et mourir s'ensuit
J'étais fait pour n'être
Que ce que je suis
Une saison d'homme
Entre deux marées
Quelque chose comme
Un chant égaré

ARAGON

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué d'octobre 1978 à mars 1982 dans les laboratoires de chimie inorganique de l'Université de Neuchâtel et dans ceux de l'EAWAG à Kastanienbaum.

L'EAWAG à Dubendorf m'a accordé une bourse de 1978 à 1982, je tiens à l'en remercier.

J'exprime tout d'abord ma reconnaissance à mon directeur de thèse, M. le Professeur P. Baccini, non pas seulement pour ses conseils judicieux et son constant soutien, mais également pour la gentillesse, la confiance et la patience dont il a toujours fait preuve à mon égard, tout au long de ce travail.

Je remercie également M. le Professeur K. Bernauer pour son intérêt constant, ainsi que pour m'avoir donné la possibilité de travailler en tant qu'assistante dans son département.

Mes remerciements vont à MM. les Professeurs Bernauer et Schneider pour avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Je dis un très grand merci à tous mes collègues de travail pour leur amitié et leur gentillesse, à Daniel Perret et Gérard Vuille pour la transcription et l'élaboration des programmes de calcul et de dessin par ordinateur, à ma laborantine Tania Madorn pour son aide et sa constante bonne humeur, aux étudiants pour l'enrichissement humain que je leur dois, à Stéphanos Sikiaridis pour sa participation à mes recherches dans le cadre de son travail de laboratoire de chimie inorganique avancée, à Pierre-Alain Marioni

pour ses talents de photographe, à ma sœur Christiane pour son travail dactylographique, ainsi qu'à tous ceux qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Abréviations	
1. Introduction	1
1.1. Transport et disponibilité biologique du cuivre dans les systèmes naturels	1
1.2. Rôle de la matière organique sur le transport du cuivre dans les eaux naturelles	4
1.3. Problèmes étudiés	5
2. Buts du travail	8
2.1. Systèmes choisis	8
Première Partie	
3. Description du système cuivre - peptide	12
3.1. Introduction	12
3.2. Résultats	15
3.2.1. Etudes potentiométriques	15
3.2.2. Etudes spectroscopiques	19
3.3. Interprétation des résultats	36
3.3.1. Influence de la longueur de la chaîne peptidique sur la stabilité des complexes formés (Gly _n ,Ala _n)	36
3.3.1.1. Mesures potentiométriques	36
3.3.1.1.1. Formation de liaisons hydrogènes intramo- léculaires	38
3.3.1.1.2. Formation d'un cycle de chélation supplémentaire en position axiale du métal	42
3.3.1.2. Mesures spectroscopiques	44
3.3.2. Influence des substituants latéraux des peptides sur la stabilité des complexes formés	47
3.3.2.1. Influence des substituants des acides aminés participant à la complexation du métal (systèmes Gly _n ,L-Ala _n)	

3.3.2.2. Influence du substituant du 5ème acide aminé	49
3.3.2.2.1. Mesures potentiométriques	49
3.3.2.2.2. Mesures spectroscopiques	50
3.3.2.2.3. Discussion	54
3.3.4. Cas de L-Ala ₃ AV	59
3.3.5. Atome responsable de la coordination en position axiale	61
3.3.6. Hypothèse de structure du complexe [Cu(H ₃ L)] pour un peptide de plus de quatre acides aminés	63
3.3.7. Conclusions	66
4. Partie expérimentale	69
4.1. Synthèse de L-Ala ₃ AV	69
4.1.1. Organigramme	69
4.1.2. Z-L-Ala ₂ NHNH ₂	70
4.1.3. Z-L-Ala ₃ OMe	70
4.1.4. Z-Ala ₃ NHNH ₂	70
4.1.5. L-AVOET.HCl	70
4.1.6. Z-L-Ala ₃ AVOET	70
4.1.7. L-Ala ₃ AVOET.HBr	71
4.1.8. L-Ala ₃ AV	71
4.1.9. Purification de L-Ala ₃ AV	71
4.1.10. Analyse de L-Ala ₃ AV	71
4.2. Méthodes analytiques	72
4.2.1. Titrages potentiométriques	72
4.2.2. Calculs par ordinateur	73
4.2.3. Spectres visibles	73
4.2.4. Spectres CO	74
Seconde Partie	75
5. Introduction	75
6. Détermination des constantes conditionnelles de formation des complexes peptidiques du cuivre (II)	78

6.1. Hypothèse	78
6.2. Détermination de K_M^* à partir des constantes d'équilibre globale β_{mhl} .	80
6.2.1. Introduction	80
6.2.2. Résultats	81
6.3. Détermination de K_M^* par polarographie et spectroscopie d'absorption atomique à pH 9.0	82
6.3.1. Introduction	82
6.3.2. Détermination de la capacité complexante des peptides par polarographie	83
6.3.3. Détermination de K_M^* des complexes peptidiques du cuivre par absorption atomique	85
6.3.4. Interprétation des résultats	87
6.3.5. Détermination de K_M^* d'un mélange cuivre - concentrat d'eau naturelle - pentaglycine par spectroscopie d'absorption atomique	88
6.4. Conclusions	90
7. Partie expérimentale	92
7.1. Mesures polarographiques	92
7.2. Mesures d'absorption atomique	93
8. Résumé général	95
Annexes	98
9. Bibliographie	100

ABREVIATIONS

M	: ion métallique (Cu^{2+})
L	: peptide
C_M, C_L	: concentration totale en métal, peptide
Gly ₄	: glycylglycylglycylglycine
Gly ₅	: glycylglycylglycylglycylglycine
Gly ₆	: glycylglycylglycylglycylglycylglycine
L-Ala ₄	: alanylalanylalanylalanine
L-Ala ₆	: alanylalanylalanylalanylalanylalanine
L-Ala ₄ -L-Glu L-Ala ₄ -D-Glu	} : acide alanylalanylalanylalanylglutamique
L-Ala ₄ -L-Glu ₃	: acide alanylalanylalanylalanylglutamylglutamylglutamique
Gly ₅ NM ₂	: glycylglycylglycylglycylglycineamide
Gly ₄ -L-AlaOME	: ester méthylique de la glycylglycylglycylglycylalanine
L-Ala ₃ AV	: acide alanylalanylalanylaminovalérianique
β_{mhl}	: constante globale de formation du complexe $M_m M_n L_l$
CD	: spectre de dichroïsme circulaire
VIS	: spectre d'absorption dans le visible
EPR	: spectre de résonance paramagnétique de l'électron
ϵ	: coefficient d'absorption molaire [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
$\Delta \epsilon$: $\epsilon_L - \epsilon_D$ [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
Gly	: glycine
Glu	: acide glutamique

Asp	:	acide aspartique
Ala	:	alanine
Ser	:	serine
Thr	:	thréonine
Leu	:	leucine
Pro	:	proline
K_i^*	:	constante conditionnelle de l'espèce i
NTA	:	acide nitrilotriacétique
DON	:	azote organique dissous
DOC	:	carbone organique dissous
POC	:	carbone organique particulaire
FC	:	facteur de concentration

Remarque : l'ordonnée des diagrammes de distribution des espèces en fonction du pH indique toujours $[espèce] / C_M$

1. INTRODUCTION

1.1. Transport et disponibilité biologique du cuivre dans les systèmes naturels. [1-8]

Les organismes vivants, systèmes chimiques organisés fort complexes, se propagent, grandissent, se métabolisent, utilisent leur environnement tout en se protégeant contre lui et évoluent en réponse aux changements à long terme de la nature.

Nulle vie ne peut apparaître et survivre sans la participation d'ions métalliques. En effet, plus de la moitié des quelques trente éléments du tableau périodique essentiels pour la croissance et le développement des organismes biologiques sont des métaux. Au delà d'une certaine concentration, ces éléments peuvent devenir toxiques, bien qu'il devienne de plus en plus évident que l'effet toxique d'un élément sur un organisme dépend moins de sa concentration totale que de sa spéciation.

Depuis quelques décennies, on porte un très grand intérêt à la compréhension du rôle spécifique et de l'influence des métaux sur les systèmes biologiques.^[1]

Pour cela, il est intéressant de distinguer plusieurs niveaux d'organisation dont chacun nous apporte des renseignements permettant de mieux comprendre l'ensemble.

- le niveau moléculaire : renseignements sur la première sphère de coordination des métaux et sur la structure des espèces
- le niveau cellulaire : indications sur le transport et la spéciation des métaux
- l'écosystème : indications sur le transport et la disponibilité biologique des métaux

Le cuivre est largement distribué dans la nature ($7 \cdot 10^{-3}\%$ de la lithosphère).^[3] Cet élément se trouve sous forme de métal, sels ou complexes avec des ligands organiques ou inorganiques. Le cuivre est un élément essentiel avec, chez l'homme, une teneur d'environ 150 mg.

Dans les eaux, la concentration de cuivre est d'environ 10^{-8} - 10^{-7} M (1-5 µg/L). Dans le sol, elle varie de 2-100 mg/kg matière sèche alors que dans l'air, elle est comprise entre 10-570 ng/m³ selon le degré d'industrialisation de l'endroit.^[4]

Du point de vue chimique, le cuivre a une grande affinité pour les groupements fonctionnels des amines, acides aminés peptides et protéines, et de ce fait, son action biologique s'effectue principalement en association avec certaines protéines nommées cuproprotéines. Il est coutumier de classifier le cuivre dans les protéines en quatre types principaux, trois faisant intervenir le cuivre à l'état d'oxydation + II et un avec le cuivre à l'état d'oxydation + I. Les complexes protéiniques du cuivre interviennent dans des processus métaboliques tels que la catalyse oxydative, le transport d'oxygène et le transfert d'électrons.^{[5][8]}

Chez les êtres vivants, le cuivre est apporté par la nourriture et l'eau (1-3 mg par jour chez l'homme). Bien que présent dans tout l'organisme, il est surtout concentré au niveau du foie, du cerveau, du cœur, des reins et des muscles.^[4]

C'est le plasma sanguin qui joue le rôle de voie de transport du cuivre entre les différents organes. Dans le plasma (concentration en cuivre ≈ 1 mg/L)^[4] la majeure partie du cuivre ($\approx 90-95\%$) est liée à la céruloplasmine et n'est pas échangeable "in vivo".

Le cuivre restant est lié par l'intermédiaire de complexes binaires et ternaires à l'albumine, à des tripeptides tel le glycylylhistidyllysine et à des acides aminés tel l'histidine.

Le passage du cuivre du plasma sanguin aux tissus s'effectue vraisemblablement par l'intermédiaire de complexes de faible poids

moléculaire tel cuivre-acide aminé ou cuivre-tripeptide.^[7]
L'élimination du cuivre s'effectue principalement par la bile
mais peut également se produire par les reins et la peau.^[4]

Les voies d'accès du cuivre dans les eaux sont illustrées par
la figure 1. ^[48]

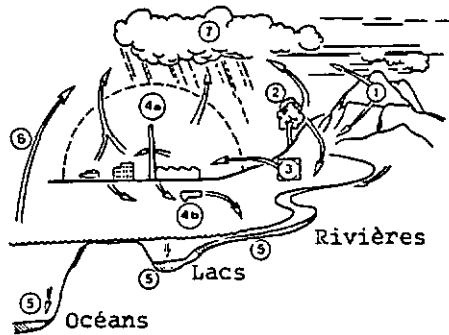


Figure 1 : Cycles globaux: transport des métaux lourds.

1 érosion - 2 végétation - 3 extractions de
minerais - 4 consommation par l'homme - 5 sédi-
mentation dans les eaux courantes et lacustres-
6 recirculation sous forme d'aérosol - 7 préci-
pitation

Dans l'environnement aquatique, le cuivre peut exister sous
formes dissoutes ou particulaires. Parmi les formes dissoutes
du cuivre, nous voyons l'ion libre hydraté, les complexes avec
des ligands inorganiques tels l'hydroxyde ou le carbonate et
des complexes avec des ligands organiques tels des amines,
protéines, acides fulviques ou humiques.

A l'état particulaire, le cuivre peut exister sous forme
d'agrégats ou de complexes colloïdaux, être absorbés sur dif-
férents types de particules, être incorporés dans des particules
organiques tel le plancton ou à l'intérieur de composés minéraux.^[4]

Les formes physiques et chimiques du cuivre dans l'environnement aquatique sont contrôlées par des facteurs tels le pH, le potentiel redox, la présence de matière particulaire et organique et l'activité biologique.

Le transport des métaux par les organismes vivants joue un très grand rôle dans le transport total.

La disponibilité biologique d'un élément et par là, la réaction biologique d'un système vivant dépendent très fortement de la forme chimique de cet élément. Par exemple le cuivre complexé à des peptides n'est pas disponible pour le plancton. [22]

1.2. Rôle de la matière organique sur le transport du cuivre dans les eaux naturelles [1.9-11]

L'affinité des métaux lourds envers diverses substances organiques revêt une très grande importance pour le comportement de ces éléments dans les systèmes aquatiques.

La concentration de la matière organique dissoute dans les eaux naturelles est d'environ 0.1-10 mg C par litre.

Dans les eaux intersticielles, elle varie entre 10-100 mgC/L alors qu'elle est de 30-100 mg/g matière sèche dans les sédiments. [9]

La quantité de matière organique présente dans les eaux est donc très petite par rapport à celle présente dans les sédiments. [9] Ces derniers sont les principaux dépositaires des débris organiques morts accumulés au cours de l'histoire d'un lac ou d'un océan. Cette substance organique est composée d'une très grande variété de produits dont une partie est le résultat de la biosynthèse et de la biodégradation.

Excepté un mélange d'acides aminés, sucres et hydrocarbures, cette matière organique encore mal définie, se compose vraisemblablement d'un mélange d'acides fulviques et humiques, de protéines, de peptides et de cellulose.

La majeure partie du cuivre présent dans les eaux est liée à la matière organique. [1] Celle-ci contient donc des substances chélatantes pouvant modifier la distribution du cuivre entre les

phases dissoute et particulaire, changer la répartition entre les formes réduites et oxydées de ce métal ainsi qu'altérer son assimilation par la vie aquatique.

Seuls des ligands organiques pluridentés sont capables d'entrer en compétition avec les ligands inorganiques (CO_3^{2-} , OH^-) présents dans les eaux pour la formation de complexes stables avec le cuivre aux conditions de pH et de concentrations existantes dans les systèmes naturels. Pour qu'un ligand puisse complexer de façon importante le cuivre, la constante conditionnelle du complexe doit être supérieure à 10^{10} à un pH d'environ 8.0 [10]

1.3. Problèmes étudiés

Afin de mieux comprendre les mécanismes de transport et d'assimilation du cuivre contrôlant les systèmes naturels, il est important de développer et d'étudier des modèles chimiques simples. Sans avoir la grande spécificité ni la capacité catalytique des systèmes naturels, ces modèles chimiques permettent l'étude séparée de divers paramètres.

Comme nous l'avons mentionné sous 1.1., le cuivre a une très grande affinité pour les protéines et des associations cuivre-peptide ou cuivre-protéine sont fréquentes dans des systèmes comme les êtres vivants. Il nous a semblé intéressant d'examiner si de telles associations existent dans les eaux naturelles. Jusqu'à présent, les recherches ont porté sur une meilleure connaissance de la sphère de coordination de l'ion métallique dans les cuproprotéines. En effet, les propriétés catalytiques de ces composés dépendent fortement de la nature des acides aminés fonctionnant comme sites de liaison avec le métal et c'est essentiellement la région du NH_2 terminal de la chaîne protéinique qui interagit avec le métal. C'est pourquoi, les peptides, de plus faibles poids moléculaires que les protéines, permettent l'établissement de bons modèles chimiques pour l'étude des propriétés des cuproprotéines. Jusqu'à ce jour, ce sont surtout des complexes

binaires du cuivre (II) avec des dipeptides, tripeptides, tétrapeptides et polypeptides [12-14] et des complexes ternaires du cuivre avec des dipeptides et tripeptides comme ligands principaux et des acides aminés comme ligands secondaires [5.7.15,16] qui ont été étudiés, essentiellement dans le but de mieux comprendre le transport du cuivre dans le sang et son acheminement dans les principaux tissus du corps. Des complexes du cuivre (II) avec des peptides de longueur intermédiaire n'ont pas ou fort peu été étudiés.

Du point de vue de la chimie de coordination, le site préférentiel du peptide pour la coordination du ion métallique est la fonction amine terminale du peptide. Les atomes d'azote des premières fonctions peptidiques peuvent, après déprotonation, participer à la complexation du métal. [17] Une chélation supplémentaire en axial du métal avec les groupements latéraux de certains acides aminés composant le peptide tel l'acide aspartique entraîne une augmentation importante de la stabilité des complexes formés. [5] Une telle stabilisation du système survient également avec des pentapeptides tel le pentaglycine, alanyltriglycylglycine, valylleucylsérylglutamylglycine. [18] Cela est vraisemblablement dû à une coordination en axial du cuivre par la fonction carboxylique terminale du pentapeptide ou à la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires. [19]

Les études concernant la compréhension et l'importance du rôle des peptides pour le transport du cuivre dans les eaux naturelles comportent certaines lacunes que nous désirons combler en répondant aux questions suivantes :

1. Quelle est l'influence de la longueur de la chaîne peptidique sur la stabilité des divers complexes possibles avec le cuivre (II).
2. Quelle est l'influence des substituants des acides aminés composant le peptide sur la stabilité des divers complexes possibles avec le cuivre (II).
3. Les complexes peptidiques peuvent-ils exister dans les condi-

tions de pH et de concentrations existantes dans les eaux naturelles et dans ces conditions, quelles sont les formes les plus représentées.

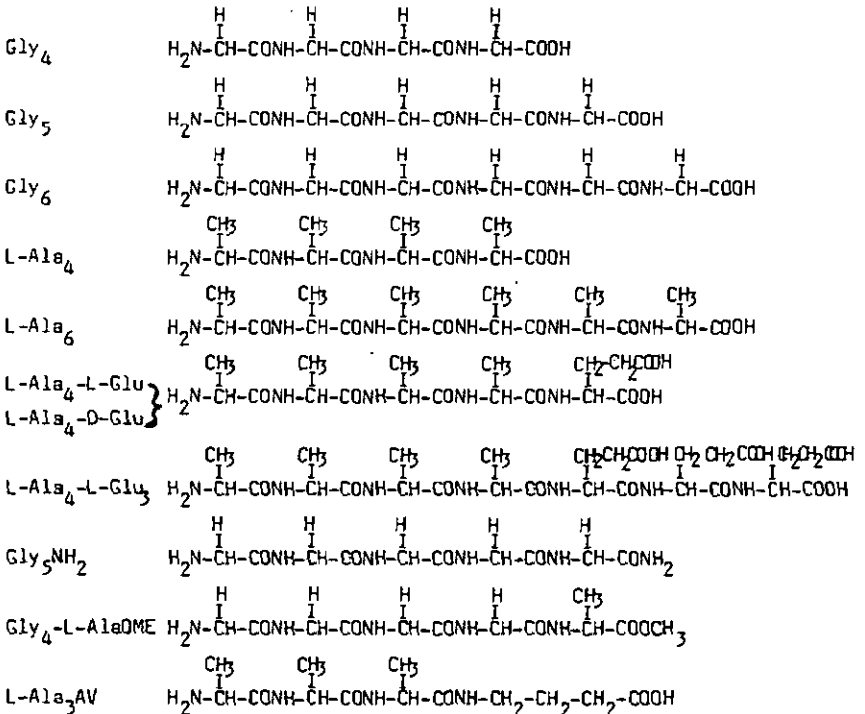
Dans la nature, les peptides existants sont de longueurs de chaîne et d'enchaînements d'acides aminés extrêmement variables. Les réponses aux deux premières questions vont nous apporter des renseignements sur la structure et la stabilité des complexes peptidiques du cuivre (II) tandis que la réponse à la troisième question nous apportera des précisions sur la stabilité et la spéciation du cuivre dans les eaux naturelles.

2. BUTS DU TRAVAIL

2.1. Systèmes choisis

Afin de répondre aux problèmes posés sous 1.3., nous avons divisé notre travail en deux parties. La première partie est consacrée à l'étude des propriétés thermodynamiques des systèmes cuivre (II)-peptide et à la connaissance la plus approfondie possible de l'influence de la longueur de la chaîne peptidique d'une part et des substituants des peptides, d'autre part sur la stabilité et la structure des différents complexes possibles. La seconde partie est consacrée à l'étude de la capacité des peptides à complexer de façon préférentielle le cuivre (II) en présence de ligands inorganiques tel le carbonate ou l'hydroxyde, aux conditions de pH et de concentrations existantes dans les eaux naturelles.

Au vu des questions posées mais également à cause de la disponibilité momentanée du marché en peptides et des problèmes de synthèse, nous avons choisi les peptides suivants :



Tetrapeptide	Pentapeptide	Hexapeptide	Heptapeptide	Divers
Gly ₄ L-Ala ₄	Gly ₅ L-Ala ₄ -L-Glu L-Ala ₄ -D-Glu Gly ₅ NH ₂ Gly ₄ -L-AlaOCH ₃	Gly ₆ L-Ala ₆	L-Ala ₄ -L-Glu ₃	L-Ala ₃ AV

Tableau 1 : ligands choisis

Une évolution s'est faite dans le choix des peptides. Au début de notre travail, nous avons étudié les complexes du cuivre (II) avec les polymères de la glycine et de l'alanine et au vu des observations faites et des résultats obtenus, nous nous sommes surtout intéressés à des pentapeptides ou des dérivés de longueur analogue et à l'étude de l'influence de la nature et du volume des substituants des peptides sur la complexation du cuivre (II) en milieu faiblement basique (domaine de pH existant dans les eaux). Pour des raisons de limite de solubilité, mais également pour des raisons économiques, nous nous sommes bornés, pour les quatre premiers acides aminés à partir de l'extrémité N du peptide à -H et -CH₃.

Tous les peptides étudiés possèdent au moins quatre atomes d'azote susceptibles de se coordonner au cuivre soit la fonction amine terminale et trois fonctions peptidiques. (fig. 2)

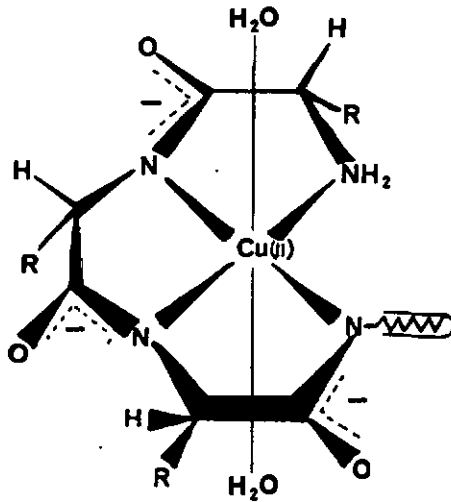


Figure 2 : Complexe peptidique du cuivre avec 4 atomes d'azote coordonnés

Les mesures potentiométriques liées au traitement des données par ordinateur nous donnent des informations sur la stabilité et la distribution, en fonction du pH, des différentes espèces possibles. Les mesures spectrophotométriques (visible, dichroïsme circulaire) complètent la connaissance des systèmes en apportant des renseignements sur la structure des espèces.

Pour des raisons de limites de sensibilité des méthodes analytiques utilisées, les mesures potentiométriques et spectrophotométriques ont été faites avec des concentrations de métal et de ligande environ 1000 fois plus concentrées que dans les eaux naturelles.

Les analyses par polarographie et spectroscopie d'absorption atomique ainsi que des simulations par ordinateur nous permettent de déterminer la faculté des peptides à complexer la cuivre de façon préférentielle en présence d'autres ligands tels le carbonate, l'hydroxyde ou les ligands naturels.

Les mesures par polarographie et spectroscopie d'absorption sont faites avec des solutions très diluées $10^{-5} M < Cu^{2+} < 10^{-4} M$

pour la polarographie et $10^{-7}M < Cu^{2+} < 10^{-6}M$ pour l'absorption atomique. Ce qui n'est pas sans poser des problèmes expérimentaux pour une détection précise de telles concentrations.

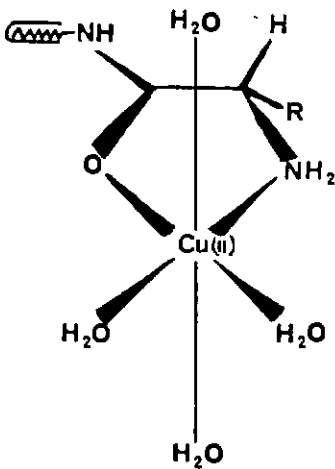
P R E M I E R E P A R T I E
* * * * *

3. DESCRIPTION DU SYSTEME CUIVRE-PEPTIDE

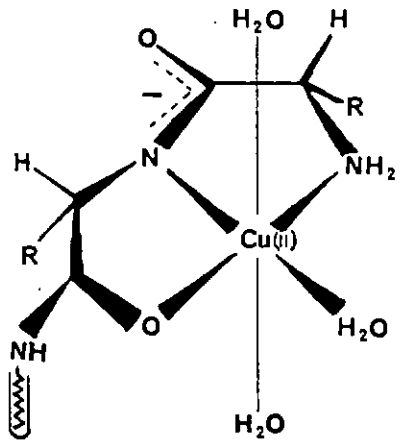
3.1. Introduction

Le but de ce chapitre est la description du système cuivre (II)-peptide, l'influence de la longueur de la chaîne peptidique ainsi que celle des substituants latéraux des peptides sur la stabilité et la structure des différents complexes formés.

Soit un peptide HL composé de plus de 3 acides aminés et ne possédant pas de restes coordonnables dans les quatre premières unités d'acides aminés à partir du NH₂ terminal, les complexes possibles avec le cuivre sont les suivants (fig. 3 [20] [21]).



[CuL]



[Cu (H₂L)]

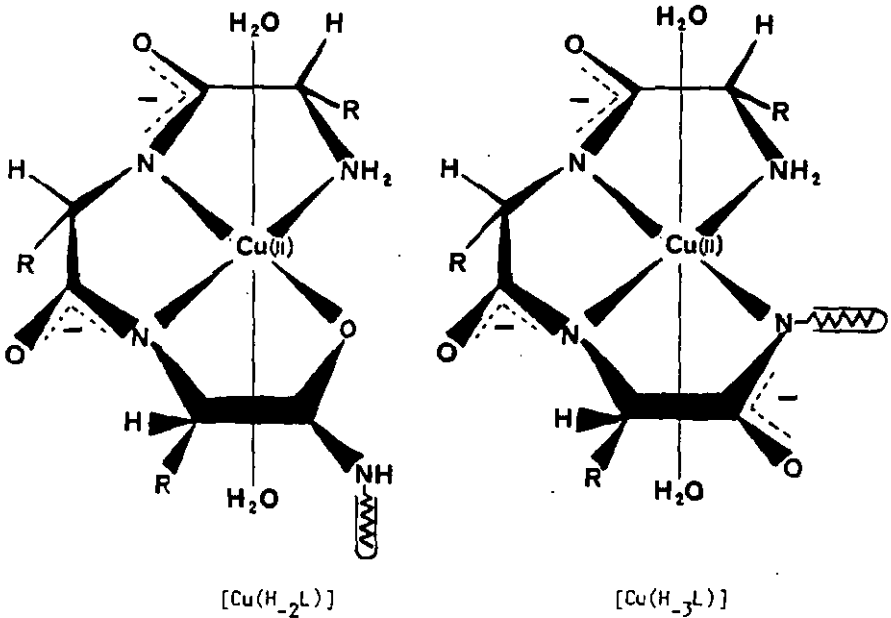


Figure 3 : Système cuivre(II)-peptide

Les quatre premiers acides aminés à partir de l'extrémité N participent directement à la complexation du ion métallique et sauf certaines exceptions provenant de combinaisons particulières d'acides aminés, la chaîne peptidique ne possède pas d'autre site permettant une complexation stable du métal. La nature des substituants des premiers acides aminés peut influencer la stabilité des divers complexes formés^[5].

La figure 4 montre la distribution des différents complexes du système Cu(II)-tétraglycine en fonction du pH.^[12]

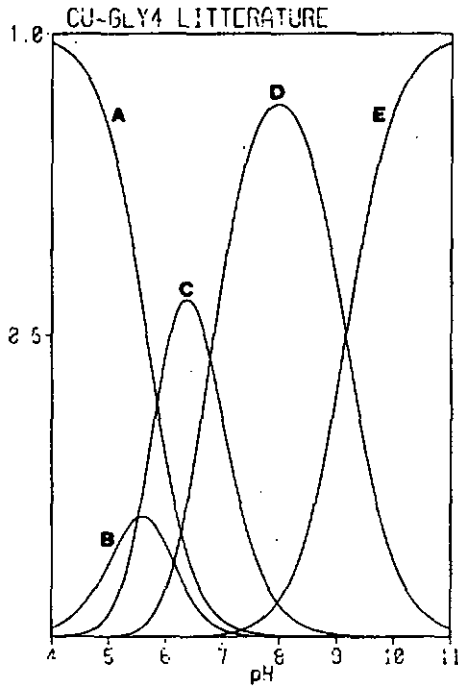


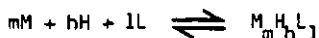
Figure 4 : Système cuivre - tétraglycine
A : $[Cu^{2+}]$, B : $[CuL]$, C : $[Cu(H_{-1}L)]$,
D : $[Cu(H_{-2}L)]$, E : $[Cu(H_{-3}L)]$

Dans les eaux naturelles, le pH varie entre 7 et 9. C'est pourquoi nos recherches sont principalement dirigées vers une meilleure connaissance des facteurs influençant la formation du complexe $[Cu(H_{-3}L)]$ à partir de $[Cu(H_{-2}L)]$, sa stabilité et sa structure.

3.2. Résultats

3.2.1. Etudes potentiométriques

Soit l'équilibre général



Les constantes de stabilité des différentes espèces sont définies par l'expression mathématique

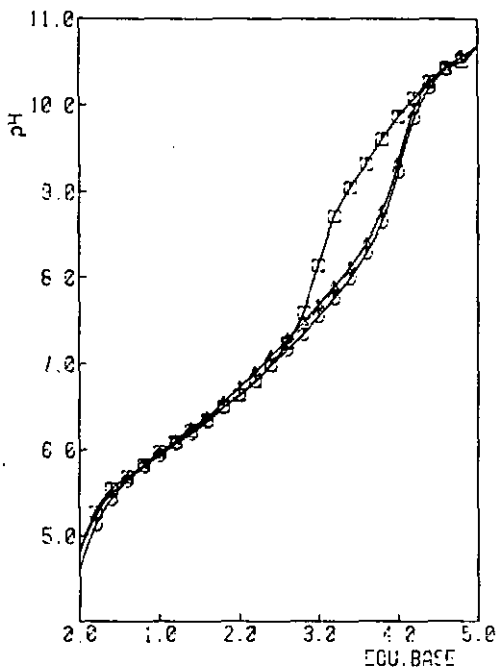
$$\beta_{mhl} = \frac{[M_m H_h L_l]}{[M]^m \cdot [H]^h \cdot [L]^l}$$

Les constantes d'acidité des peptides, ainsi que les constantes de formation des complexes peptidiques du cuivre (II) ont été calculées avec le programme Scogs [23] modifié [25]. Lors de l'interprétation des résultats, des constantes d'acidité des complexes nous seront plus utiles que les valeurs $\log \beta_{mhl}$ dont les valeurs sont très sensibles à leurs erreurs.

Les valeurs de pK_a sont déterminées à partir des différences entre les constantes $\log \beta_{mhl}$.

Les courbes de distributions des espèces en fonction du pH pour des conditions de $C_M = C_L = 7.5 \cdot 10^{-4} M$ (fig. 7 à 10) ont été déterminées à partir des constantes de formations des complexes (Tableaux 2 - 5) à l'aide du programme COMICS [24] modifié [25].

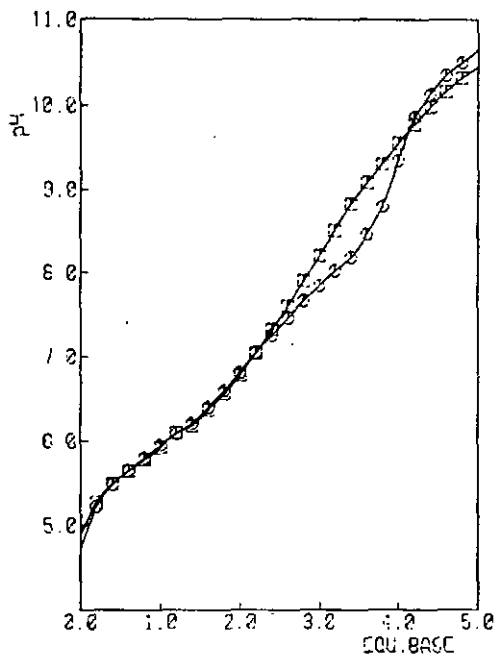
Les figures 5 et 6 montrent les courbes de titrages des complexes du cuivre (II) avec les polymères de la glycine et de l'alanine. Dans les deux cas, nous remarquons une nette différence entre les courbes de titrages du tétrapeptide et celles du penta- ou de l'hexapeptide.



- : Gly₄
- : Gly₅
- ▲ : Gly₆

Figure 5 :

Courbes de titrages des systèmes Cu (II) - polyglycine dans les conditions $C_M=C_L=7.2 \cdot 10^{-4}M$, $\mu=0.1 M KNO_3$, $T=25^\circ$



- : L-Ala₄
- : L-Ala₆

Figure 6 :

Courbes de titrages des systèmes Cu (II) - polyalanine dans les conditions $C_M=C_L=7.2 \cdot 10^{-4}M$, $\mu=0.1 M KNO_3$, $T=25^\circ$

Alors que dans un premier domaine allant de 0 - 2 éq. de base ajoutés et correspondant à la neutralisation de l'amine terminale et de la première fonction peptidique, les courbes de titrages des différents complexes peptidiques sont totalement superposables, dans un second domaine allant de 2 - 4 éq. de base, nous observons dans le cas du tétrapeptide un point d'équivalence après 3 éq. de base tandis que pour le penta- ou l'exapeptide, le point d'équivalence n'apparaît qu'après adjonction de 4 éq. de base ce qui correspond à la neutralisation de l'amine terminale et de trois fonctions peptidiques.

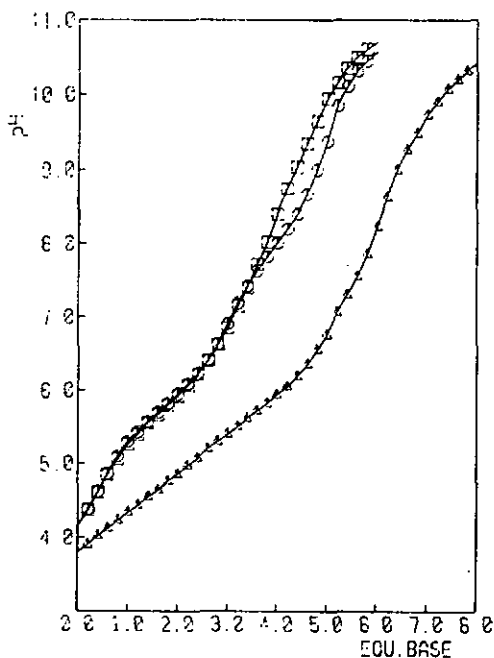


Figure 7 : courbes de titrages des systèmes Cu (II)-L-Ala₄-L-Glu, Cu (II)-L-Ala₄-O-Glu, Cu (II)-L-Ala₄-L-Glu₃ dans les conditions C_M = C_L = 7.2 10⁻⁴M, μ = 0.1M KNO₃, T = 25°
■ : L-Ala₄-L-Glu, ○ : L-Ala₄-O-Glu, ▲ : L-Ala₄-L-Glu₃

Les courbes de titrages des systèmes Cu (II)-L-Ala₄-L-Glu et Cu(II)-L-Ala₄-D-Glu (fig. 7) sont superposables dans le domaine allant de 0 - 3 éq. de base ajoutés, correspondant à la neutralisation de la fonction carboxylique de l'amine terminale et de la première fonction peptidique et différent dans le domaine allant de 3-5 éq. de base. Le système Cu (II)-L-Ala₄-L-Glu montre un point d'équivalence après l'adjonction de 4 éq. de base alors que le système Cu (II)-L-Ala₄-D-Glu présente deux points d'équivalences, un à 3 éq. de base et l'autre à 5 éq. Pour le ligand L-Ala₄-L-Glu₃, le système présente un point d'équivalence après neutralisation des fonctions carboxyliques (3 éq.), de l'amine terminale et de deux fonctions peptidiques (6 éq. au total) comme dans le cas de L-Ala₄-L-Glu.

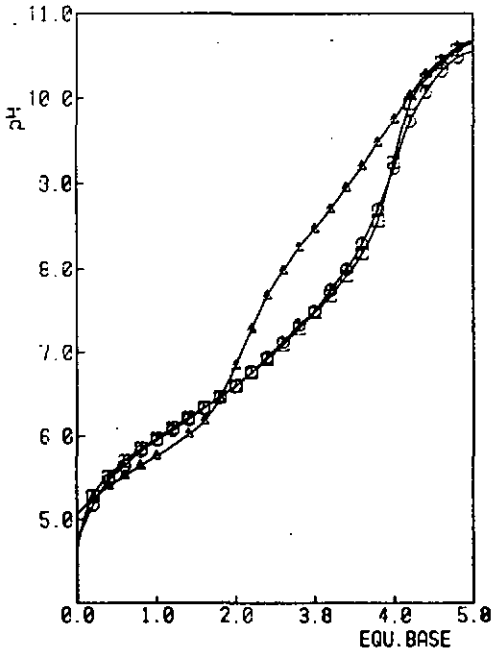


Figure 8 : Courbes de titrage des systèmes Cu (II)-Gly₅NH₂, Cu(II)-Gly₄-L-Ala₃OMe et Cu(II)-L-Ala₃AV dans les conditions C_M = C_L = 7.2 · 10⁻⁴M, μ = 0.1 KNO₃, T = 25°
 ○ : Gly₅NH₂, □ : Gly₄-L-Ala₃OMe, △ : L-Ala₃AV

Les systèmes $\text{Cu(II)-Gly}_5\text{NH}_2$ et $\text{Cu(II)-Gly}_4\text{-L-AlaOMe}$ montrent comme le pentaglycine un point d'équivalence après adjonction de 4 éq. de base ce qui correspond à la neutralisation de l'amine terminale et de 3 fonctions peptidiques.

Le ligand $\text{L-Ala}_3\text{AV}$ montre en présence de cuivre (II) une courbe de titrage comprenant deux points d'équivalence, un premier après 2 éq. de base ajoutés, correspondant à la neutralisation de la fonction amine terminale et d'une fonction peptidique et un second après 4 éq. (fig. 8) ce qui correspond à la neutralisation de deux nouvelles fonctions peptidiques.

Les tableaux 2 - 5 donnent les valeurs $\log \beta_{\text{mhl}}$ ainsi que parfois $\text{p}K_a$ de toutes les espèces trouvées. Un tableau général des résultats se trouve en annexe.

Dans nos systèmes, nous n'avons pas détecté de complexes $[\text{CuHL}]$ excepté pour $\text{L-Ala}_4\text{-L-Glu}_3$ et de complexe $[\text{CuL}_2]$ en assez grande quantité pour déterminer précisément la valeur des constantes de ces espèces.

3.2.2. Études spectroscopiques

Par spectroscopie dans le visible, nous avons effectué des titrages des systèmes Cu(II)-Gly_4 et Cu(II)-Gly_5 . Les figures 13 A' et 14 A montrent les spectres mesurés et calculés en ϵ apparents et les figures 13 B et 14 B la variation de ϵ apparent en fonction des équivalents de base ajoutés à $\lambda = 515 \text{ nm}$ (Cu-Gly_4) et $\lambda = 513 \text{ nm}$ (Cu-Gly_5). Le complexe $[\text{Cu(H}_3\text{L)}]$ a le pouvoir absorbant le plus grand de toutes les espèces existantes. L'addition de 3 - 4 équivalents de base transforme le complexe $[\text{Cu(H}_2\text{L)}]$ en $[\text{Cu(H}_3\text{L)}]$. Entre pH 8.5 et pH 11.0, la présence de deux espèces ($[\text{Cu(H}_2\text{L)}]$ et $[\text{Cu(H}_3\text{L)}]$) se traduit par l'apparition d'un point isosbétique à 565 nm.

Espèces m h l	Formule	Gly ₄			Litt[12-18] pka			Gly ₅			Gly ₆			
		Logβmhl (s)	pka	logβmhl	[12] [18]	[12] [18]	logβmhl (s)	pka	logβmhl pks	Litt[08] pks	logβmhl (s)	pka	logβmhl (s)	pka
0 2 1	H ₂ L	11.16	3.18	11.07; 11.23	[12] [18]	3.28 3.25	11.21	3.25	11.49	3.51	11.22	3.25		
0 1 1	H L	7.98	7.98	7.79; 7.98		7.79 7.98	7.96	7.96	7.98	7.98	7.97	7.97		
1 0 1	[CuL]	5.00 (0.04)	5.50	5.16; 5.04		5.52 5.85	5.25 (0.02)	5.66	5.32	6.10	5.14 (0.05)	5.59		
1 -1 1	[Cu(H ₂ L)]	-0.50 (0.04)	6.91	-0.36; -0.81		6.78 6.95	-0.41 (0.02)	7.02	-0.78	7.00	-0.45 (0.03)	7.17		
1 -2 1	[Cu(H ₂ L)]	-7.41 (0.02)	9.22	-7.14; -7.76		9.16 9.30	-7.43 (0.03)	8.02	-7.78	8.14	-7.65 (0.04)	8.10		
1 -3 1	[Cu(H ₃ L)]	-16.63 (0.04)	-	-16.30; -17.06		-	-15.45 (0.02)	-	-15.92	-	-15.73 (0.03)	-		

Tableau 2 : Systèmes Cu(II) -polyglycine mM + hH + 1L \rightleftharpoons M_mH_hL_l

s = déviation standard μ = 0.1M KNO₃ T = 25°

Les charges des complexes ne sont pas indiquées

Espèces		Formule	L-Ala ₄		L-Ala ₆	
m	h l		log mhl (s)	pka	log mhl (s)	pka
0	2 1	H ₂ L	11.45	3.42	11.50	3.50
0	1 1	HL	8.03	8.03	8.00	8.00
1	0 1	[Cu L]	4.80 (0.06)	5.10	5.03 (0.05)	5.46
1	-1 1	[Cu(H ₂ L ⁻)]	-0.30 (0.07)	7.46	-0.43 (0.04)	7.56
1	-2 1	[Cu(HL ⁻)]	-7.76 (0.01)	8.99	-8.00 (0.04)	8.13
1	-3 1	[Cu(L ⁻)]	-16.75(0.04)	-	-16.13(0.02)	-

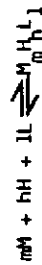
Tableau 3 : Systèmes Cu(II) -polyalanine mM + hH + lL \rightleftharpoons M_mH_hL_l

σ = déviation standard μ = 0.1 M KNO₃ T = 25°

Les charges des complexes ne sont pas indiquées

Espèces m h l	Formule	L-Ala ₄ -L-Glu		L-Ala ₄ -D-Glu		L-Ala ₄ -L-Glu ₃	
		log mhl (s)	pka	log mhl (s)	pka	log mhl (s)	pka
0 4 1	H ₄ L					22.39	4.20
0 3 1	H ₃ L	15.95	3.17	16.03	3.12	18.19	4.61
0 2 1	H ₂ L	12.78	4.70	12.91	4.83	13.58	5.40
0 1 1	H L	8.08	8.08	8.08	8.08	8.18	8.18
1 1 1	[CuHL]					11.18 (0.02)	5.16
1 0 1	[Cu L]	5.10 (0.04)	5.29	5.12 (0.03)	5.38	6.02 (0.01)	5.86
1 -1 1	[Cu(H ₋₁ L)]	-0.19 (0.05)	7.47	-0.26 (0.02)	7.65	0.16 (0.02)	7.41
1 -2 1	[Cu(H ₋₂ L)]	-7.68 (0.03)	9.09	-7.91 (0.01)	8.37	-7.25 (0.02)	9.01
1 -3 1	[Cu(H ₋₃ L)]	-16.77(0.02)	-	-16.28 (0.01)	-	-16.24 (0.03)	-

Tableau 4 : Systèmes Cu(II)-L-Ala₄-L-Glu, Cu(II)-L-Ala₄-D-Glu, Cu(II)-L-Ala₄-L-Glu₃

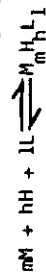


a = déviation standard, $\mu = 0.1M KNO_3$, $T = 25^\circ$

Les charges des complexes ne sont pas indiquées

Espèces m h l	Formule	Gly ₅ NH ₂ logβ _{mhl} (s) pka	Gly ₄ -L-AlaOMe logβ _{mhl} (s) pka	L-Ala ₃ AV logβ _{mhl} (s) pka
0 2 1	H ₂ L			12.66 4.65
0 1 1	HL	7.86 7.86	7.84 7.84	8.01 8.01
1 0 1	[Cu L]	4.77 (0.01) 5.46	5.14 (0.06) 5.70	5.37 (0.01) 5.16
1 -1 1	[Cu (H ₋₁ L)]	-0.69 (0.01) 6.92	-0.56 (0.03) 6.91	0.21 (0.01) 7.82
1 -2 1	[Cu (H ₋₂ L)]	-7.61 (0.02) 7.87	-7.47 (0.06) 7.95	-7.61 (0.02) 9.01
1 -3 1	[Cu (H ₋₃ L)]	-15.48 (0.04) -	-15.42 (0.07) -	-16.62 (0.03) -

Tableau 5 : Systèmes Cu (II)-Gly₅NH₂, Cu(II)-Gly₄-L-AlaOMe, Cu(II)-L-Ala₃AV



s = déviation atandard, $\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3$, $T = 25^\circ$

les charges des complexa ne sont pas indiquées.

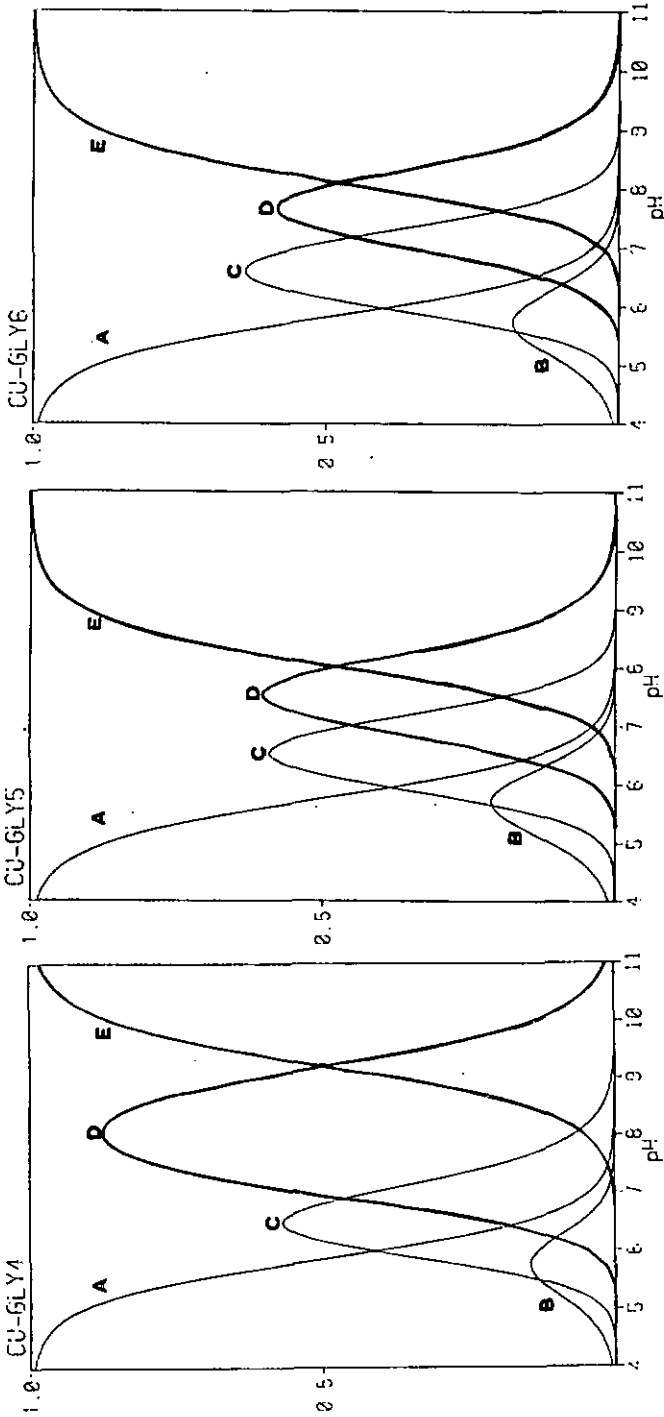


Figure 9 : Systèmes Cu(II)-polyglycine ($C_M=C_L = 7.5 \cdot 10^{-4} M$, $\mu = 0.1 M$ KNO_3 , $T = 25^\circ$)
A : $[Cu^{2+}]$, B : $[CuL]$, C : $[Cu(H_2L)]$, D : $[Cu(H_2L)]$, E : $[Cu(H_3L)]$

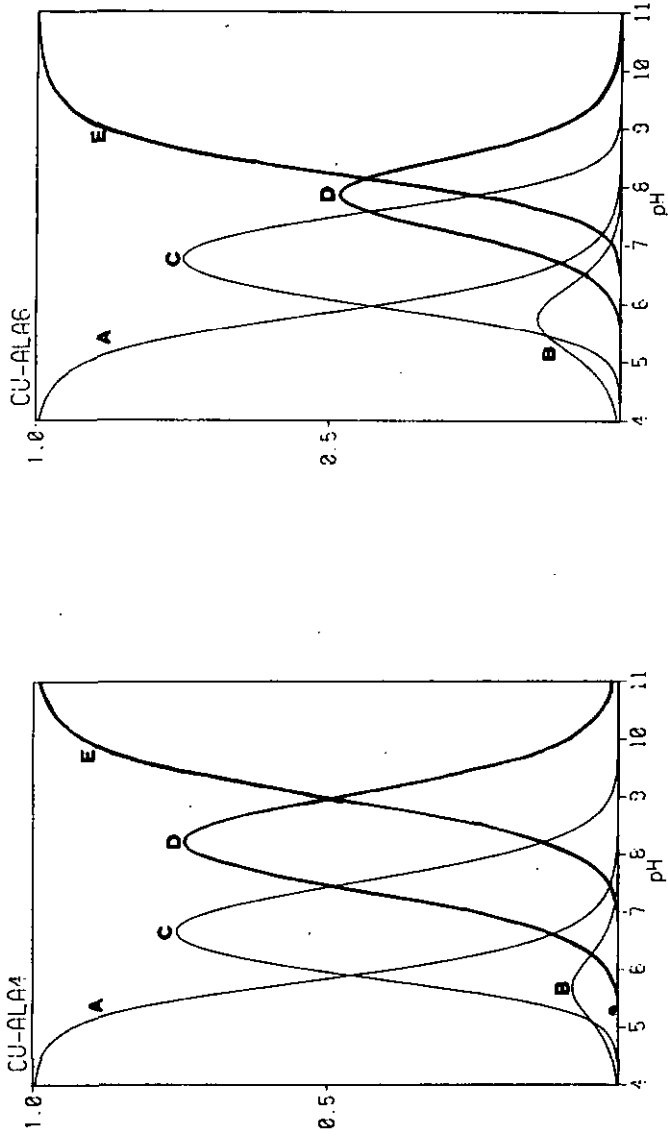


Figure 10 : Systèmes Cu(II)-polyalene ($C_M = C_L = 7.510^{-4}M$, $\mu = 0.1 M KNO_3$, $T = 25^\circ$)
A : $[Cu^{2+}]$, B : $[Cu L]$, C : $[Cu(H_2L)]$, D : $[Cu(H_2L)]$, E : $[Cu(H_3L)]$

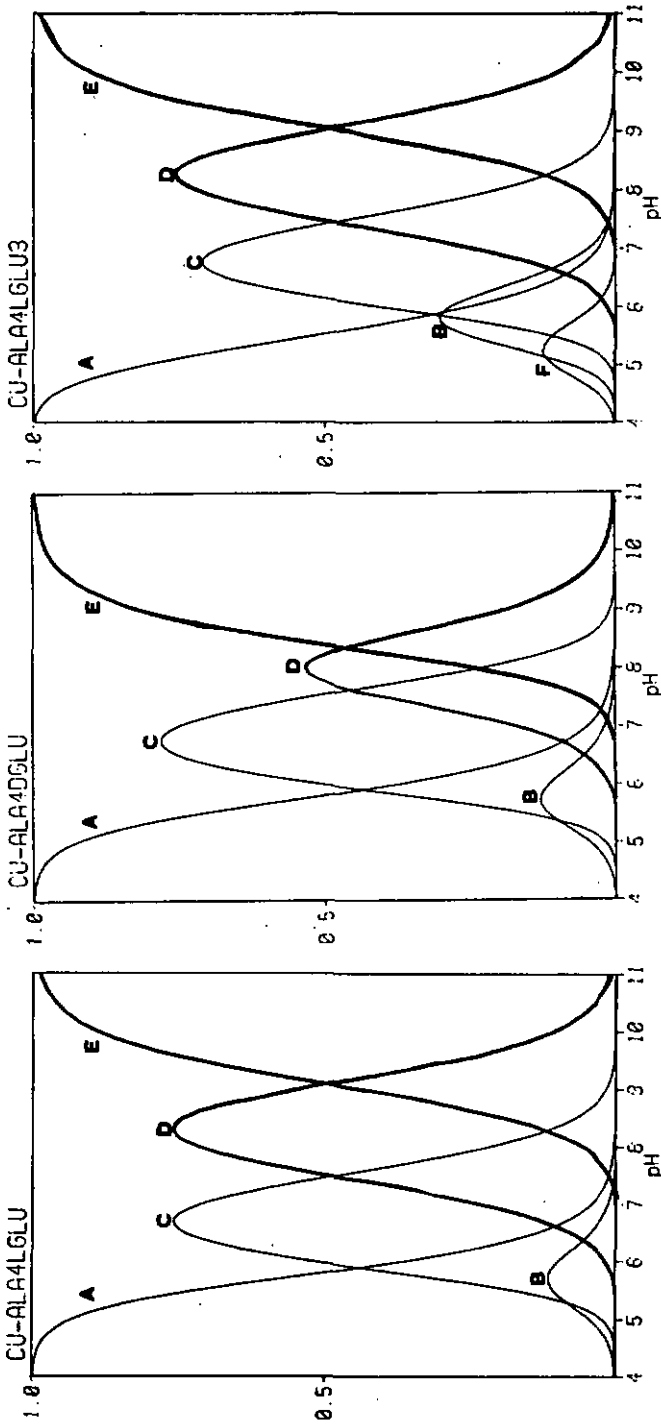


Figure 11 : Système Cu-L-Ala₄-L-Glu, Cu-L-Ala₄-D-Glu, Cu-L-Ala₄-L-Glu₃ ($C_M = C_L = 7.510^{-4} M$, $\mu = 0.1 M KNO_3$, $T = 25^\circ$) A : [Cu²⁺], B : [Cu L], C : [Cu(H₂L)], D : [Cu(H₃L)], E : [Cu(H₂L)] F : [CuHL]

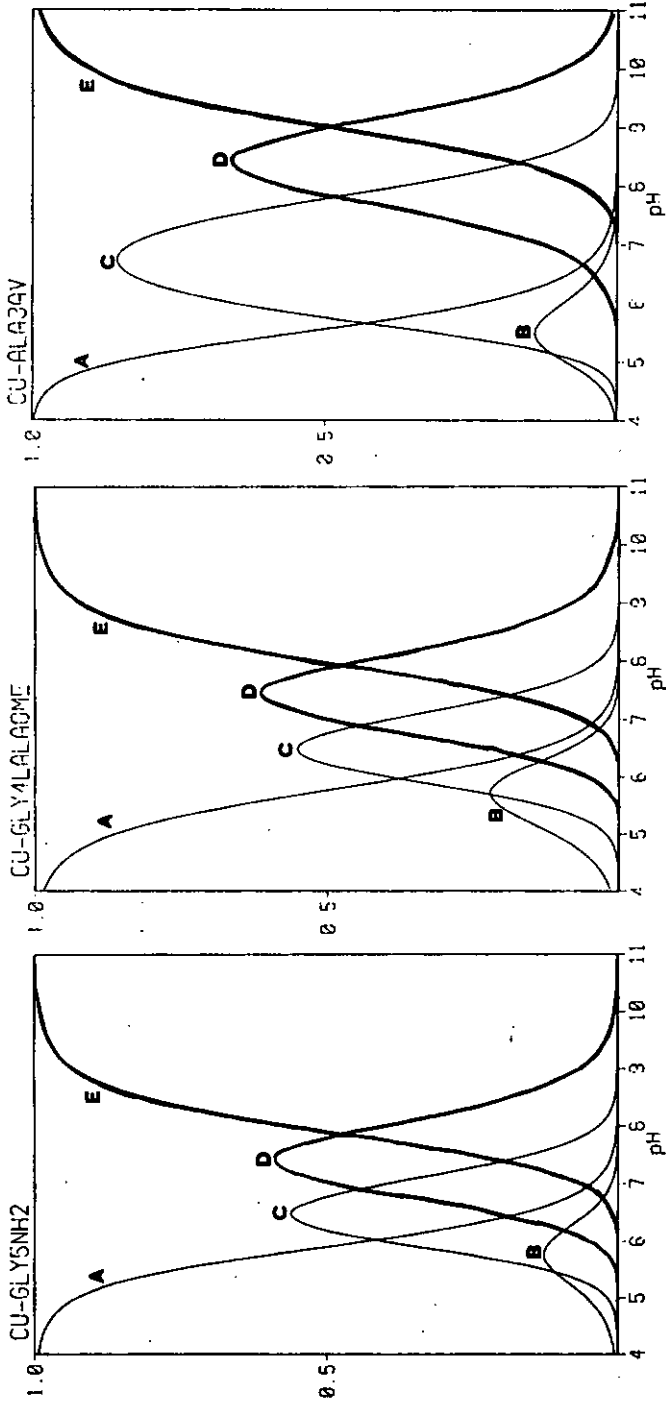


Figure 12 : Systèmes Cu-Gly₅NH₂, Cu-Gly₄-L-AlaOMe, Cu-L-Ala₃AV ($C_M = C_L = 7.510^{-4} M$, $\mu = 0.1M$ KNO₃, $T = 25^\circ$) A : [Cu L], B : [Cu L], C : [Cu(H₂L)], D : [Cu(H₂L)], E : [Cu(H₃L)]

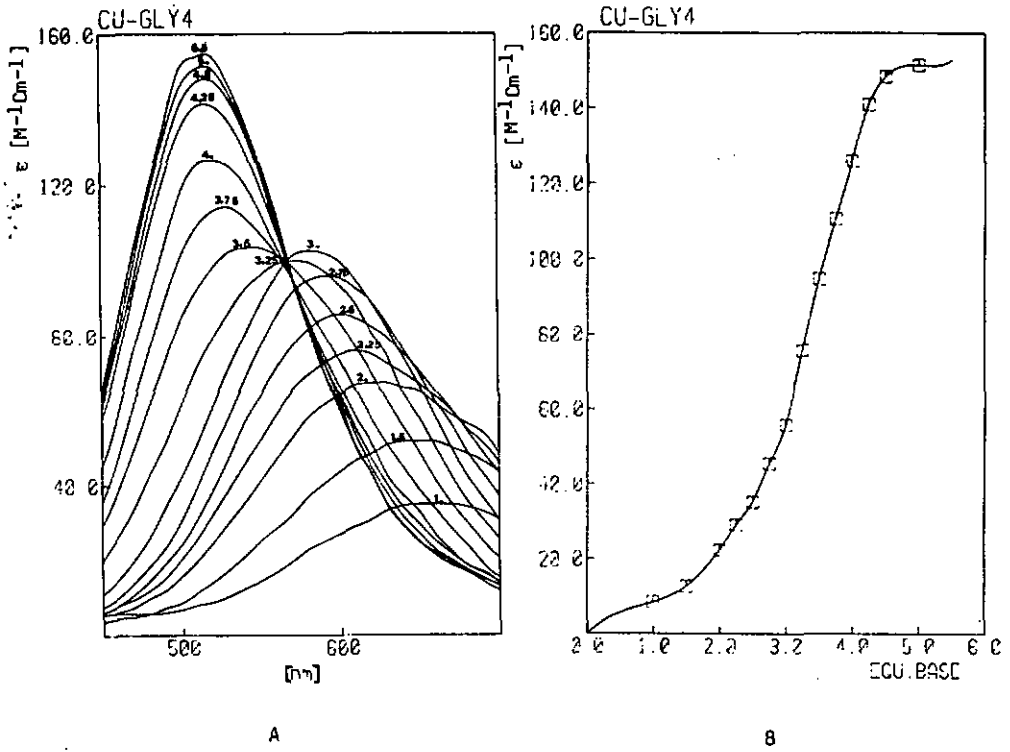


Figure 13 : Titrage spectrophotométrique de Cu(II)-Gly₄ 1 : 1

éq.	pH	abondance des espèces principales (%) (cf fig 9)
2	6.6	[Cu(H ₂ L)]57, [Cu(H ₂ L)]26, [Cu ²⁺]13, [CuL] 5
2.5	7.1	[Cu(H ₂ L)]58, [Cu(H ₂ L)]38
3	8.2	[Cu(H ₂ L)]88, [Cu(H ₃ L)] 8
3.5	9.2	[Cu(H ₂ L)]50, [Cu(H ₃ L)]50
4	9.9	[Cu(H ₃ L)]83, [Cu(H ₂ L)]17
4.5	10.4	[Cu(H ₃ L)]94, [Cu(H ₂ L)] 6
5	10.7	[Cu(H ₃ L)]97, [Cu(H ₂ L)] 3

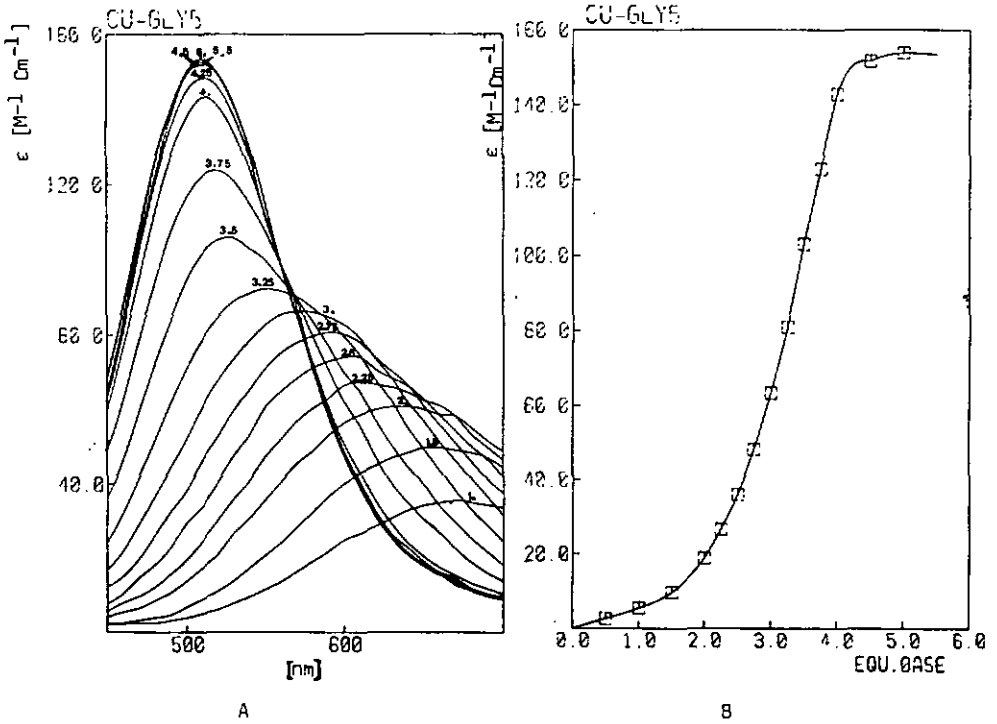


Figure 14 : Titrage spectrophotométrique de Cu(II)-Gly₅ 1 : 1

éq.	pH	abondance des espèces principales (%) cf fig 9)
2	6.7	[Cu(H ₋₁ L)] 57, [Cu(H ₋₂ L)] 29, [Cu ²⁺] 8, [Cu L] 5
2.5	7.1	[Cu(H ₋₂ L)] 49, [Cu(H ₋₁ L)] 41, [Cu(H ₋₃ L)] 6
3	7.6	[Cu(H ₋₂ L)] 60, [Cu(H ₋₃ L)] 22, [Cu(H ₋₁ L)] 16
3.5	8.2	[Cu(H ₋₃ L)] 60, [Cu(H ₋₂ L)] 39
5	9.2	[Cu(H ₋₃ L)] 94, [Cu(H ₋₂ L)] 6
4.5	10.3	[Cu(H ₋₃ L)] 100
5	10.7	[Cu(H ₋₃ L)] 100

Les spectres mesurés représentent la somme des contributions des spectres de différentes espèces, à l'exception de la région de pH située au-dessus de 10.5 où seul existe le complexe [Cu(H₃L)].

La nature des peptides influence les propriétés spectroscopiques (Vis, CD, EPR) des complexes du cuivre (II).

Le tableau 6 montre les ϵ_{\max} et λ_{\max} du complexe [Cu(H₃L)] pour les différents ligands considérés.

Ligand	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [M ⁻¹ .cm ⁻¹]
Gly ₄	515	151
Gly ₅	513	152
Gly ₆	516	154
L-Ala ₄	518	171
L-Ala ₆	518	166
L-Ala ₄ -L-Glu	517	167
L-Ala ₄ -D-Glu	515	164
L-Ala ₄ -L-Glu ₃	520	159
Gly ₅ NH ₂	520	157
Gly ₄ -L-AlaOME	515	146
L-Ala ₃ AV	508	163

Tableau 6 : Longueur d'onde des maxima d'absorption des complexes [Cu(H₃L)]

Les spectres CD et visible du complexe $[Cu(H_3L)]$ pour les ligands L-Ala₄, L-Ala₆, L-Ala₄-L-Glu, L-Ala₄-D-Glu, L-Ala₄-L-Glu₃, Gly₄-L-AlaOME, L-Ala₃AV sont représentés dans les figures 15 et 16.

Ligand	λ_{\max} [nm]	$\Delta \epsilon$ [$M^{-1}cm^{-1}$]
L-Ala ₄	531	- 1.13
L-Ala ₆	532	- 0.99
L-Ala ₄ -L-Glu	529	- 1.05
L-Ala ₄ -D-Glu	514	- 0.97
L-Ala ₄ -L-Glu ₃	529	- 0.93
Gly ₄ -L-AlaOME	542	- 0.12
L-Ala ₄ AV	515	- 1.31

Tableau 7 : Longueur d'onde des maxima d'effet Cotton des complexes $[Cu(H_3L)]$

Les spectres EPR des complexes $[Cu(H_3-L-Ala_4-L-Glu)]$ et $[Cu(H_3-L-Ala_4-D-Glu)]$ sont identiques (fig. 17) mais légèrement différents de ceux du complexe $[Cu(H_3-L-Ala_4)]$ (fig. 18).

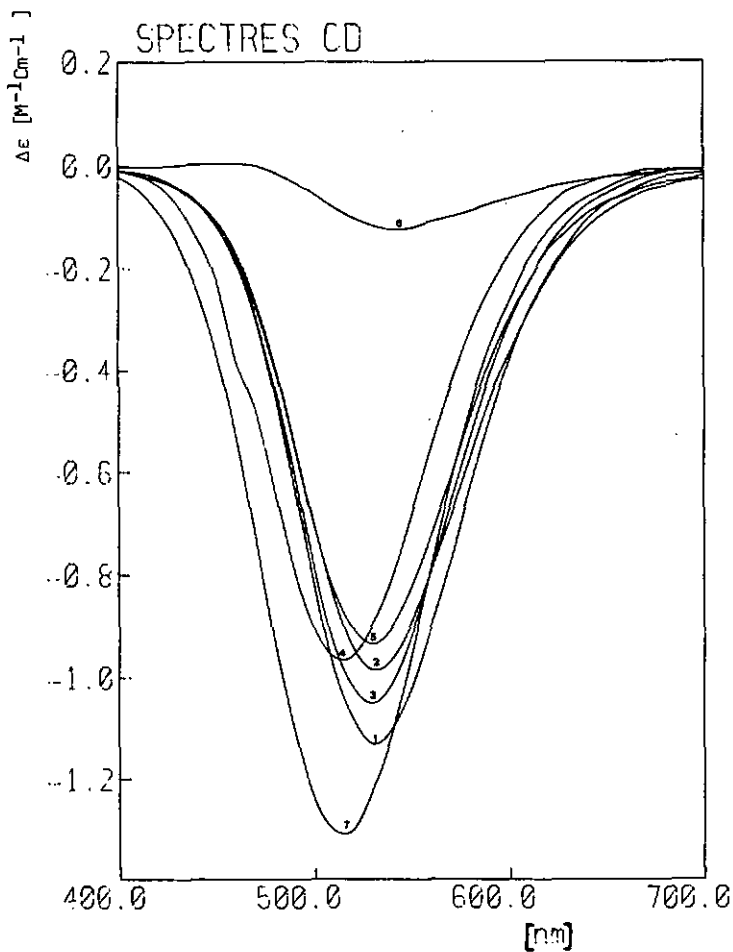


Figure 15 : Spectres CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$

1, 3, 5, 7 pH 11.0; 2, 4, 6 pH 10.8

1 : L-Ala₄; 2 : L-Ala₆; 3 : L-Ala₄-L-Glu

4 : L-Ala₄-D-Glu; 5 : L-Ala₄-L-Glu₃;

6 : Gly₄-L-AlaOME; 7 : L-Ala₃AV

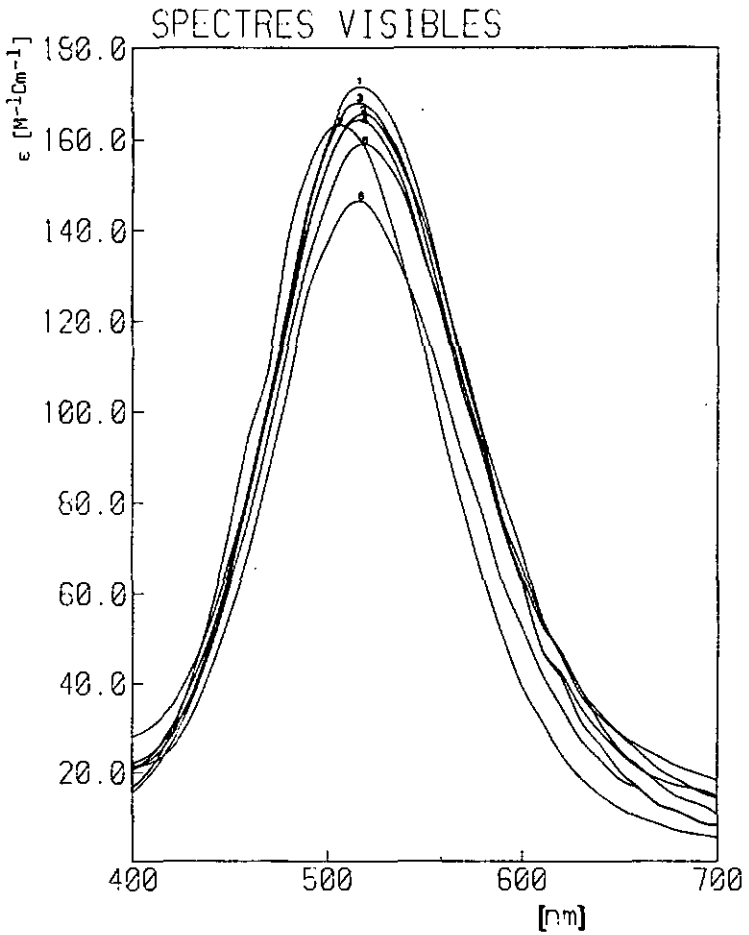


Figure 16 : Spectres Visibles des complexes $[Cu(H_3L)]$

1, 3, 5, 7 pH 11.0; 2, 4, 6 pH 10.8

1 : L-Ala₄; 2 : L-Ala₆; 3 : L-Ala₄-L-Glu

4 : L-Ala₄-D-Glu; 5 : L-Ala₄-L-Glu₃;

6 : Gly₄-L-AlaOME; 7 : L-Ala₃AV

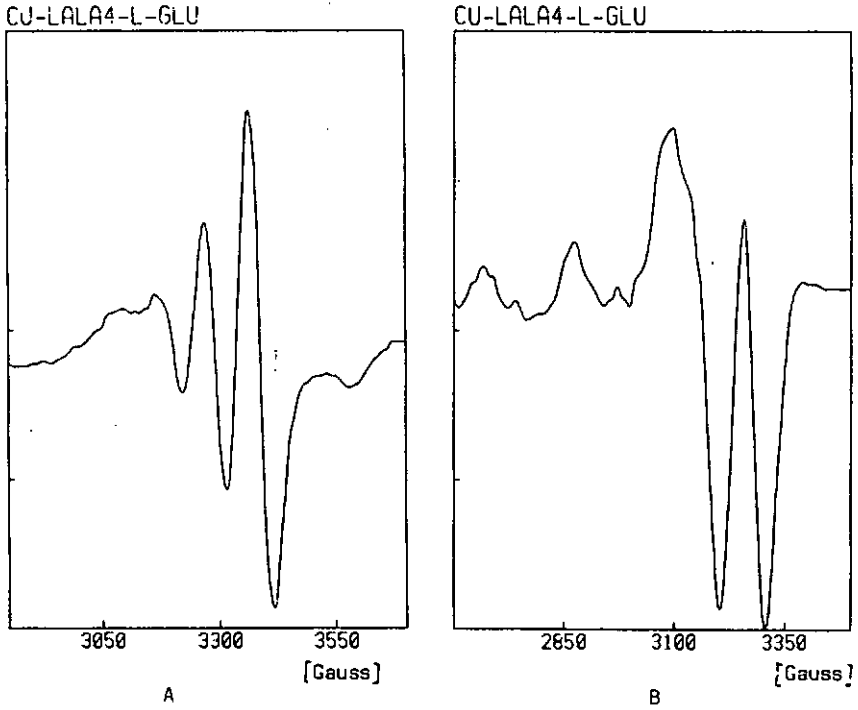


Figure 17 : spectres EPR de $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_4\text{-L-Glu})]$ (identiques à ceux de $[\text{CuH}_3\text{-L-Ala}_4\text{-D-Glu}]$)

A : $\nu = 9.53 \text{ GHz}$ $T = 20^\circ\text{C}$

B : $\nu = 9.115 \text{ GHz}$ $T = -170^\circ\text{C}$

$G_{\parallel} = 2.18$

$A_{\parallel} = 213.8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

$G_{\perp} = 2.06$

$A_{\perp} = 29.9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

$G_0 = 2.10$

$A_0 = 91.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

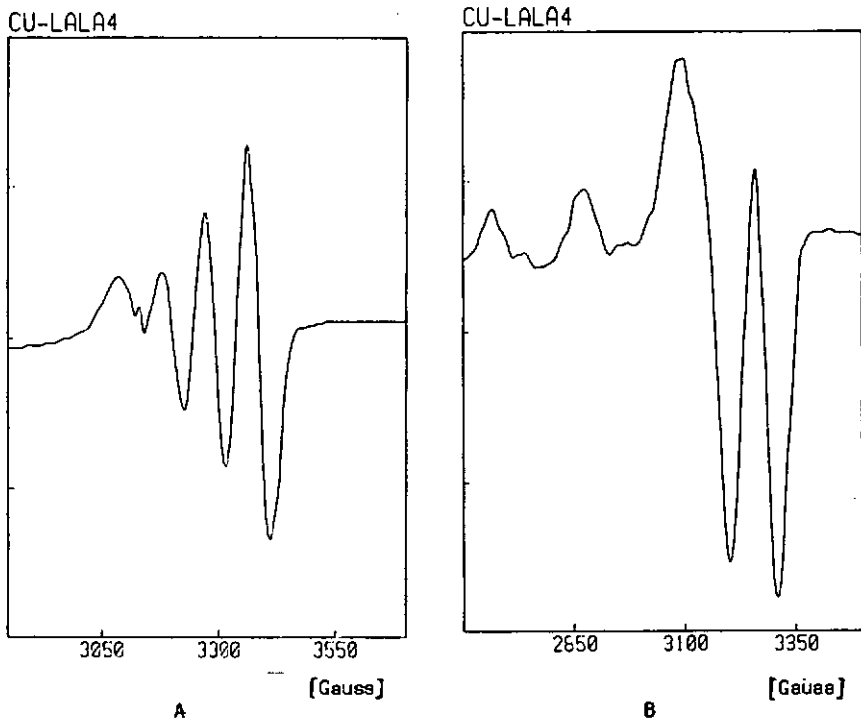


Figure 18 : Spectres EPR du complexe $[Cu(H_3L-Ala_4)]$

A : $\nu = 9.53$ GHz T = 20°C

B : $\nu = 9.115$ GHz T = -170°C

$$G_{\parallel} = 2.19$$

$$A_{\parallel} = 209.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

$$G_{\perp} = 2.06$$

$$A_{\perp} = 27.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

$$G_0 = 2.10$$

$$A_0 = 88.3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

3.3. Interprétation des résultats

3.3.1. Influence de la longueur de la chaîne peptidique sur la stabilité des complexes formés (Gly_n, L-Ala_n)

3.3.1.1. Mesures potentiométriques

En étudiant les complexes du cuivre (II) avec les polymères de la glycine et de la L-alanine, nous nous sommes demandés qu'elle était l'influence de la longueur de la chaîne peptidique sur la stabilité des espèces formées.

Comme le montrent les figures 5, 6, 9 et 10 ainsi que les tableaux 2 et 3, la variation de la longueur de la chaîne peptidique n'a que peu d'influence sur la stabilité des complexes [Cu L], [Cu(H₁L)] et [Cu(H₂L)]. Les valeurs de $\log\beta_{101}$, $\log\beta_{1-11}$, $\log\beta_{1-21}$ ainsi que pka_{101} et pka_{1-11} sont égales à $\pm 0,25$ unité log. De même, l'abondance des complexes [Cu L], [Cu(H₂L)] ainsi que celle du cuivre libre sont comparables.

Par contre, l'augmentation de la chaîne peptidique stabilise fortement l'espèce [Cu(H₃L)] autant dans le cas des polymères de la glycine que dans celui des polymères de la L-alanine. Le passage de tétrapeptide à pentapeptide et hexapeptide provoque un abaissement du pka de l'espèce [Cu(H₂L)] d'environ 1.1 unité log pour les polymères de la glycine et de 0.85 unité log pour les polymères de la L-alanine, ce qui correspond à une différence d'énergie de -6.3 KJ/mole(Gly_n) et -4.85 KJ/mole(L-Ala_n). Cela se traduit dans les courbes de répartitions (fig. 9 et 10) par une très nette diminution de l'abondance du complexe [Cu(H₂L)] et par une très nette augmentation de celle du complexe [Cu(H₃L)]. Ainsi à pH 8.0, l'abondance de [Cu(H₂L)] est de 87 % pour Gly₄, 47 % pour Gly₅ et 51 % pour Gly₆ alors que celle du complexe [Cu(H₃L)] est de 5 % pour Gly₄, 48 % pour Gly₅ et 41 % pour Gly₆. Une constatation identique peut être faite pour les polymères de la L-alanine.

Une augmentation supplémentaire de la longueur de la chaîne peptidique ne doit vraisemblablement pas avoir d'influence nouvelle sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$ sauf dans des cas d'enchaînements d'acides aminés particuliers.

La différence de stabilité d'environ 1 unité log. (6 kJ/mole observée pour le complexe $[Cu(H_3L)]$ en passant d'un tétra-peptide à un peptide plus long est comparable à la différence de stabilité observée par D. Perret [5] pour le complexe $[Cu L]$ en passant d'un tripeptide simple à un tripeptide ramifié (acide aspartique en première position du peptide (cf tableau 8).

Ligand	$\log K_{[Cu L]}$
Gly ₃	5.10 [5]
Gly ₄	5.00
Gly ₅	5.25
Gly ₆	5.14
L-AspGlyGly	6.18 [5]

Tableau 8 : Stabilité du complexe $[Cu L]$

Lors de la formation du complexe $[Cu L]$, la chaîne latérale de l'unité aspartyl du tripeptide L-AspGlyGly s'oriente obligatoirement vers l'une des positions axiales du centre métallique. L'augmentation de la stabilité de ce complexe par rapport au complexe avec les polymères de la glycine ne peut s'expliquer que par la formation d'un cycle de chélation supplémentaire de 6 membres entre un oxygène de la fonction β -carboxylate du reste aspartyl et le centre métallique. (fig 19)

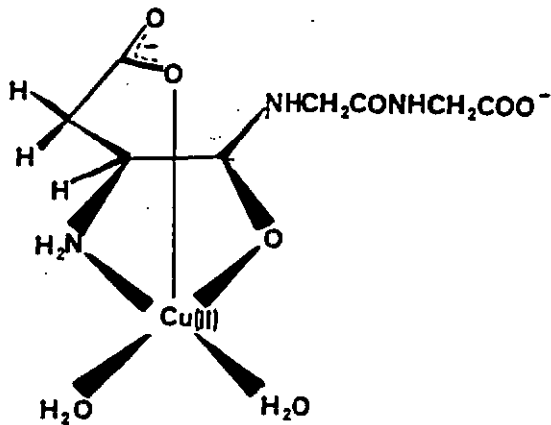


Figure 19 : Complexe [Cu-L-AspGlyGly]

Les peptides que nous avons étudiés ne possèdent pas de restes latéraux coordonnables dans les premières unités d'acides aminés. Nous pensons pouvoir envisager deux facteurs de stabilisation de l'espèce [Cu(H₃L)] pour un peptide de plus de quatre acides aminés.

1. Stabilisation par formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires.
2. Stabilisation par formation d'un cycle de chélation supplémentaire en position axiale du cuivre.

3.3.1.1.1. Formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires

Les possibilités de stabilisation du complexe [Cu(H₃L)] par formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires sont plus restreintes dans le cas de térapeptides que dans le cas de peptides de plus grandes longueurs.

En ce qui concerne les térapeptides, une formation de liaison hydrogène intramoléculaire est envisageable entre la fonction carboxylique terminale et la fonction amine terminale. (fig 20)

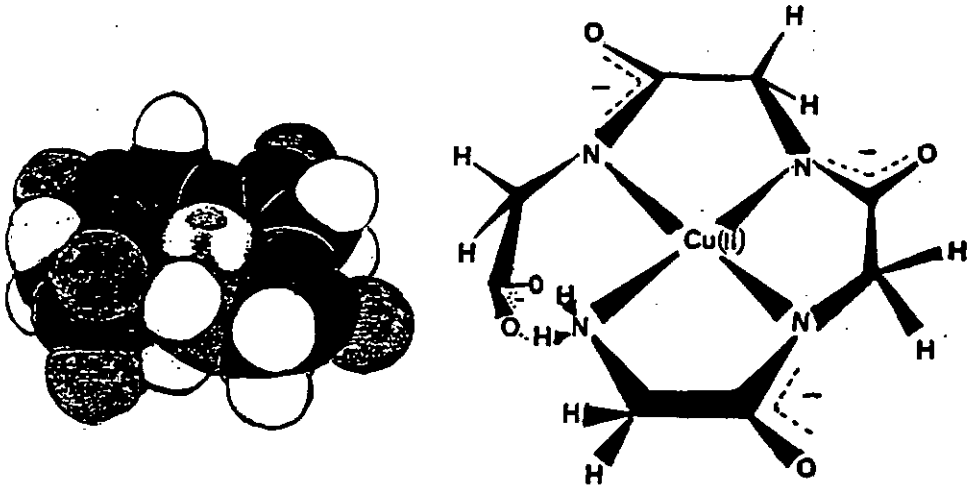
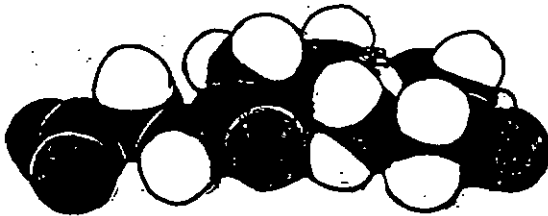


Figure 20 : Formation d'un pont hydrogène intramoléculaire

Pour des peptides de plus grande longueur, les possibilités de formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires sont, comme nous l'avons déjà mentionné, plus nombreuses. Les interactions les plus importantes nous semblent être celles entre un proton de la fonction amine terminale et l'oxygène de la 4ème fonction peptidique (fig. 21) et celle entre l'hydrogène de la 4ème fonction peptidique et l'oxygène de la 3ème fonction peptidique (fig 22).



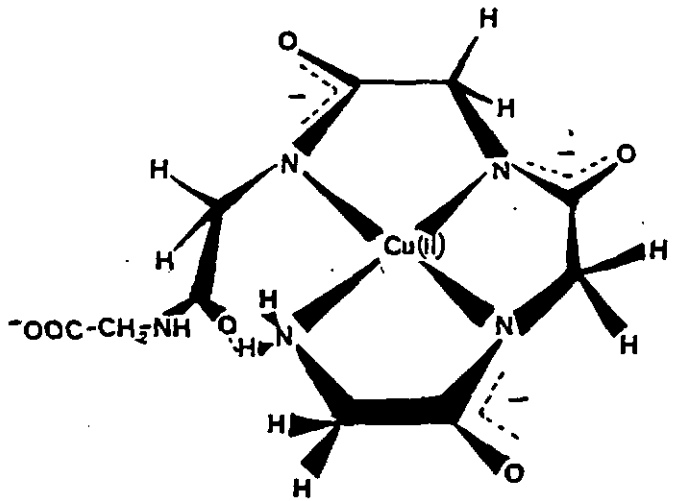


Figure 21 : Formation d'un pont hydrogène intramoléculaire

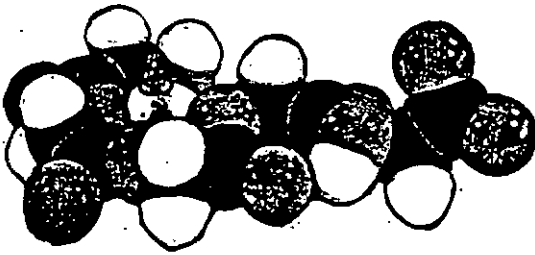
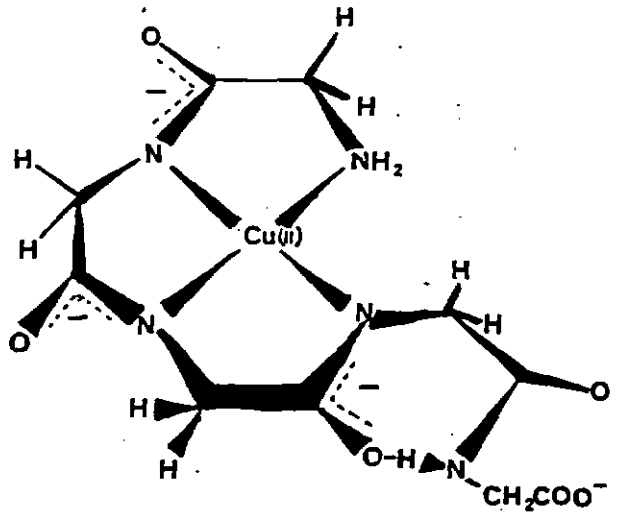


Figure 22 : Formation d'un pont hydrogène intramoléculaire



Une troisième interaction peut être envisagée, similaire à celle trouvée par rayons X dans le cas des cristaux de $\text{Na}_2 [\text{Cu}(\text{H}_3\text{Gly})] \cdot 4.5 \text{H}_2\text{O}$... [26]. A l'état solide, la chaîne peptidique non coordonnée se situe au-dessus du plan du complexe et un oxygène de la fonction carboxylique terminale est lié par pont hydrogène à la fonction amine terminale (fig. 23).

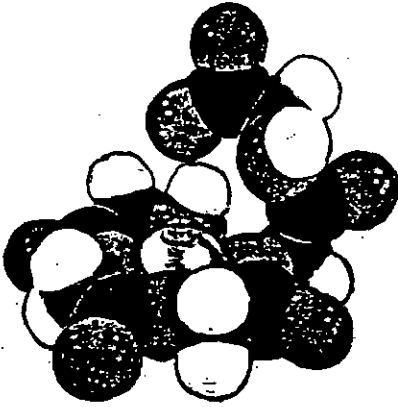
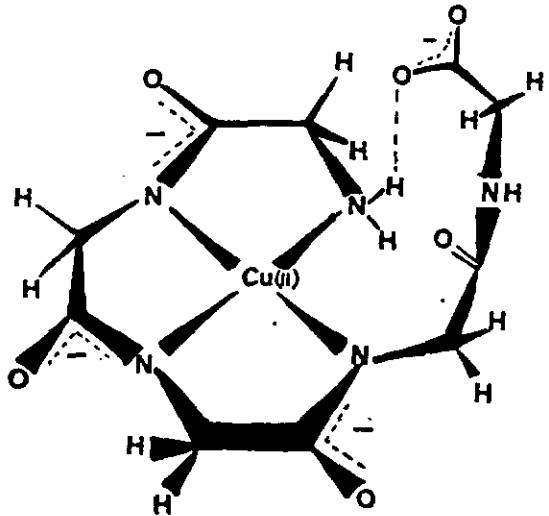


Figure 23 : Formation d'un pont hydrogène intramoléculaire

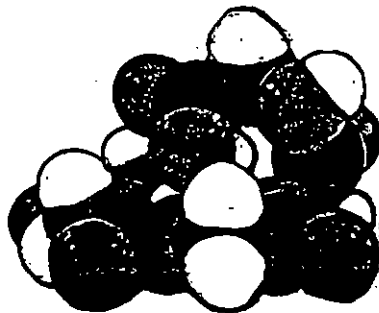


La plupart des ponts hydrogènes ont une énergie comprise entre 15 et 40 KJ/mole et une longueur d'environ 2.5 à 3.0 Å. Dans les protéines fibreuses, les liaisons hydrogènes existantes entre les différentes chaînes ont une énergie de l'ordre de 25 KJ/mole.

3.3.1.1.2. Formation d'un cycle de chélation supplémentaire en position axiale du métal

Dans le cas d'un complexe $[Cu(H_3 \text{ tétrapeptide})]$, la formation d'une chélation supplémentaire en position axiale du cuivre (cycle de 5 membres) n'est pas possible à cause de la planarité des atomes d'azotes coordinateurs dans le plan du complexe. L'absence de coordination axiale est d'ailleurs confirmée par les études par rayons X effectuées sur le complexe $Ns_2 [Cu(H_3 \text{ Gly}_4)] \cdot 10 H_2O$ en phase solide. [27]

Par contre, dans le cas de complexes avec des peptides de plus grande longueur, l'impossibilité de coordination axiale n'existe plus et nous pouvons postuler, pour le complexe $[Cu(H_3 L)]$, la formation d'un cycle de chélation de 8 membres en position axiale du cuivre. Les atomes coordonneurs du métal sont un oxygène de la fonction carboxylique terminale dans le cas des pentapeptides et l'oxygène de la 5ème fonction peptidique dans le cas de peptides plus longs (fig. 24).



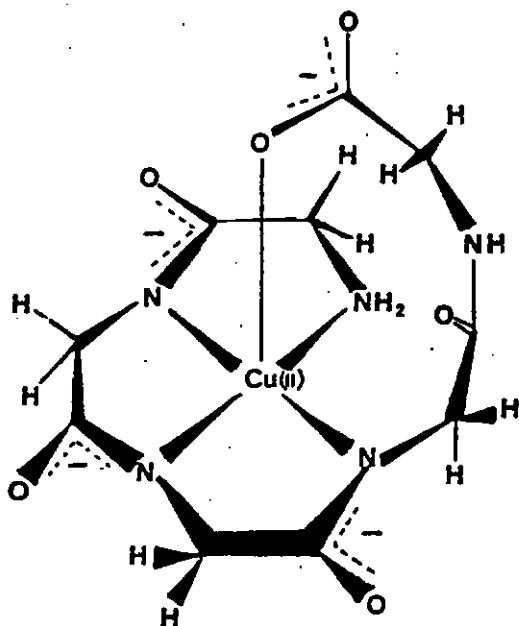


Figure 24 : Complexe $\text{Cu}(\text{H}_3\text{Gly})_2$

Un cycle de chélation avec un nombre de membres plus élevé, par exemple 11, est très peu probable.

La formation d'un cycle de chélation supplémentaire a pour conséquence de stabiliser l'espèce considérée. Cette stabilisation doit être un peu plus grande si le nouveau cycle formé est un cycle à 6 membres plutôt qu'un cycle à 8 membres. Si nous obtenons la même stabilisation de nos systèmes que celle obtenue par D. Perret lors de la formation d'un cycle de chélation supplémentaire de 6 membres en position axiale du cuivre [5] (voir figure 19 et tableau 8) nous pouvons vraisemblablement postuler que la stabilisation observée dans nos systèmes provient presque exclusivement de l'apparition d'une chélation supplémentaire en position axiale du cuivre (II).

Il est intéressant d'observer que les structures des figures 23 et 24 ont une grande similitude en ce qui concerne la position de

la chaîne peptidique par rapport au plan des complexes aussi bien qu'en ce qui concerne la grandeur du cycle de liaison supplémentaire formé. Le type d'interaction est toutefois dans les deux cas fort différent.

Les deux hypothèses de stabilisation du complexe $[CuH_3L]$ soit la formation d'une nouvelle liaison cuivre-ligand et la formation de liaisons hydrogènes impliquent aussi un effet d'entropie. Cet effet d'entropie (gain d'énergie) est provoqué par la libération de molécules d'eau, liées aux groupements hydrophiles de la chaîne peptidique ou/et à la position axiale du métal, lors de la complexation de l'ion métallique. La libération de molécules d'eau est d'autant plus importante que la chaîne peptidique est proche du centre métallique du complexe.

3.3.1.2. Mesures spectroscopiques

Du point de vue spectroscopique, les divers complexes peptidiques du cuivre (II) sont tous caractérisés par un ϵ_{max} et un λ_{max} différents [28, 29]

Excepté pour une valeur de pH supérieure à 11.0 où seule l'espèce $[Cu(H_3L)]$ existe, les spectres visibles (fig. 16) enregistrés sont la somme des contributions de plusieurs espèces.

La déprotonation des fonctions peptidiques entraînant le passage de $[CuL]$ à $[Cu(H_3L)]$ se fait par étapes. La coordination progressive des atomes d'azote entraîne une augmentation de la force du champ des ligands. La couleur de ces complexes passe du bleu au rose au fur et à mesure de la coordination des atomes d'azote sur le cuivre (II). Ce comportement est caractéristique des molécules donnant la réaction du biuret. [28, 30]

Des études faites sur les spectres CD des complexes peptidiques du cuivre (II), il ressort que les contributions CD des restes optiquement actifs des trois premiers acides aminés [30] ainsi que

celle du cinquième acide aminé [19] sont négatives alors que le signal CD du reste du quatrième acide aminé est positif, s'il s'agit d'acides aminés de configuration L.

Comme dans le cas du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_5)]$ [19] le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_6)]$ montre un spectre CD d'intensité plus faible que celui du complexe avec le tétraalanine ce qui est à priori surprenant (voir fig. 25 et tableau 9).

Complexes	$\Delta \epsilon$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
$[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4)]$	-1.13 (531 nm)
$[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_5)]$	-1.01 (523 nm)
$[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_6)]$	-0.99 (532 nm)

Tableau 9 : Caractéristiques du système $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_n)]$

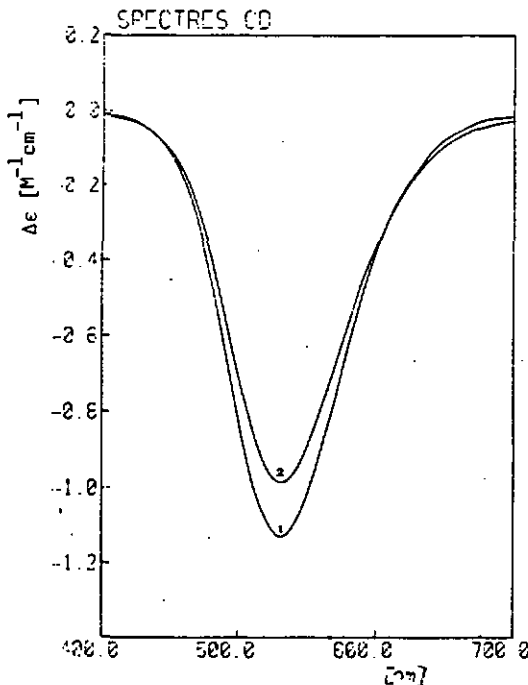


Figure 25 : Spectre CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4)]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_6)]$ à pH 11.0 pour L-Ala₄ (1) et 10.8 pour L-Ala₆ (2)

La raison de cette baisse d'intensité du signal CD est vraisemblablement due à une augmentation de l'effet CD positif du reste du quatrième acide aminé, provoquée par une augmentation de la rigidité du complexe et par un rapprochement de la position du reste du quatrième acide aminé par rapport au centre métallique.

C'est certainement une des raisons pour lesquelles le principe d'additivité des spectres CD ne se vérifie pas dans le cas de nos complexes.

Par exemple, le spectre du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_6)]$ devrait être environ la somme des spectres des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4)]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{Gly}_4\text{L}-\text{AlaOME})]$ ce qui n'est pas du tout le cas (voir fig. 15).

Il est intéressant de voir que les spectres CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_5)]$ [19] et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_6)]$ ont approché la même intensité (voir tableau 9). Cela signifie que le reste optiquement actif du sixième acide aminé n'a pas d'influence significative sur le spectre CD du complexe.

Il est en effet connu que pour qu'un reste optiquement actif d'un acide aminé influence le spectre CD d'un complexe, il n'est pas absolument nécessaire que cet acide aminé soit coordonné au métal mais il faut que sa position dans l'espace soit relativement proche de celle du centre métallique. [18]

En conclusion, nous pouvons dire que du point de vue phénoménologique, la longueur de la chaîne peptidique a une importance manifeste sur la stabilité du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$.

Le passage de tétrapeptide à pentapeptide ou hexapeptide provoque une stabilisation de l'espèce $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ d'environ 6KJ/mols.

Pour expliquer cette stabilisation, nous postulons la formation de ponts hydrogènes intramoléculaires ou l'apparition d'une coordination supplémentaire en position axiale du métal.

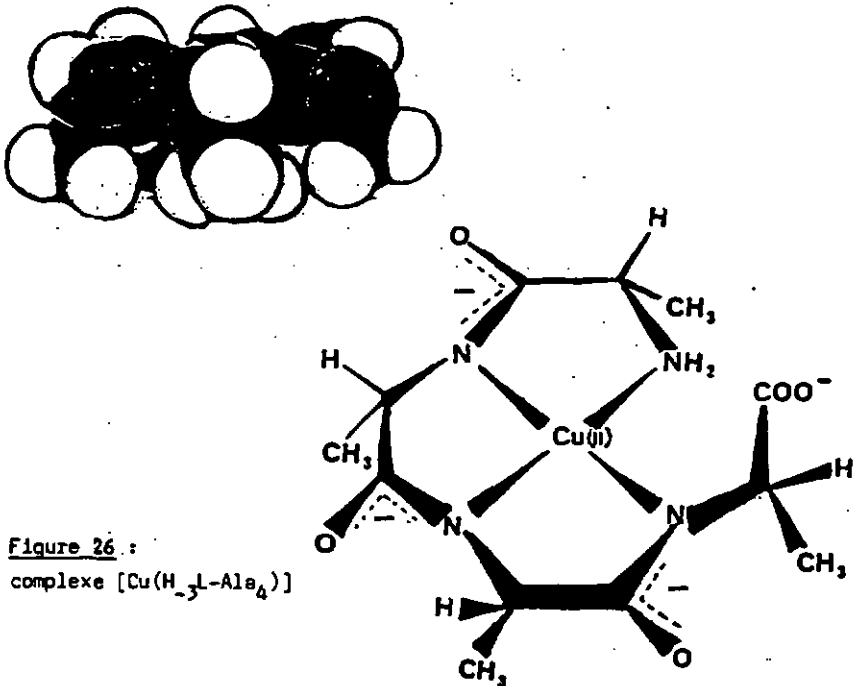
Ces deux facteurs de stabilisation de l'espèce $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ peuvent être combinés.

3.3.2. Influence des substituants latéraux des peptides sur la stabilité des complexes formés.

3.3.2.1. Influence des substituants des acides aminés participant à la complexation du métal (systèmes Gly_n,L-Ala_n)

En comparaison avec les polymères de la glycine, les groupements méthyles des polymères de l'alanine semblent stabiliser le complexe [Cu H₁L] au détriment des complexes [Cu L] et [Cu(H₂L)] ceci aussi bien pour le térapeptide que pour l'hexapeptide (voir fig. 10).

Lors de la complexation du cuivre (II), le peptide s'enroule autour du métal et les groupements méthyles des 4 premiers acides aminés à partir de l'extrémité N se placent tous du même côté du plan de la molécule en bloquant ainsi partiellement une des positions axiales du métal comme la montre la figure 26, ceci s'ils ont la même configuration.



Si nous postulons une coordination axiale de la chaîne peptidique pour le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_6)]$, pour expliquer l'augmentation de la stabilité de ce complexe par rapport à celui avec le tétraalanine, la structure du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_6)]$ doit être la suivante (fig. 27)

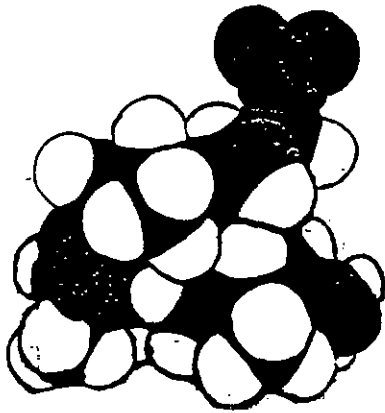
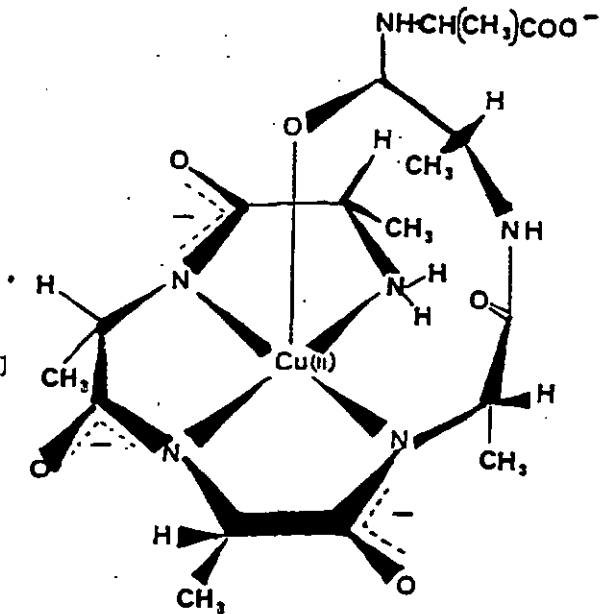


Figure 27 : Complexe
 $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_6)]$



Cette hypothèse de structure fait apparaître une interaction stérique possible entre le groupement latéral du 5ème acide aminé de configuration L et la fonction amine terminale. Cette interaction stérique n'apparaît pas dans les autres hypothèses de structure avec stabilisation du complexe $[Cu(H_3L)]$ par formation de ponts hydrogènes intramoléculaires. Il est à remarquer que la formation du cycle de chélation en position axiale du métal permet la formation simultanée d'une liaison hydrogène entre la fonction amine terminale et l'oxygène de la 4ème fonction peptidique.

3.3.2.2. Influence du substituant du 5ème acide aminé

3.3.2.2.1. Mesures potentiométriques

La variation de la grandeur du substituant en position 5 du peptide n'a pas d'influence importante sur la stabilité du complexe $[CuL]$, $[Cu(H_1L)]$ et $[Cu(H_2L)]$ (voir tableau 3 et 4), mais uniquement sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$. La valeur du pKa du complexe $[Cu(H_2L)]$ est de 8.13 pour L-Ala₆ ($R_5 = -CH_3$), 9.09 pour L-Ala₄-L-Glu ($R_5 = -CH_2CH_2COO^- (L)$), 8.37 pour L-Ala₄-D-Glu ($R_5 = -CH_2CH_2COO^- (D)$) alors qu'elle est de 8.99 pour le complexe avec le tétraalanine. En ce qui concerne le peptide L-Ala₄-L-Glu, l'absence de stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$ indique très vraisemblablement que la structure de ce complexe est très semblable à celle du complexe avec le tétraalanine. Le complexe $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ doit par contre avoir une structure proche de celle du complexe avec l'hexaalanine.

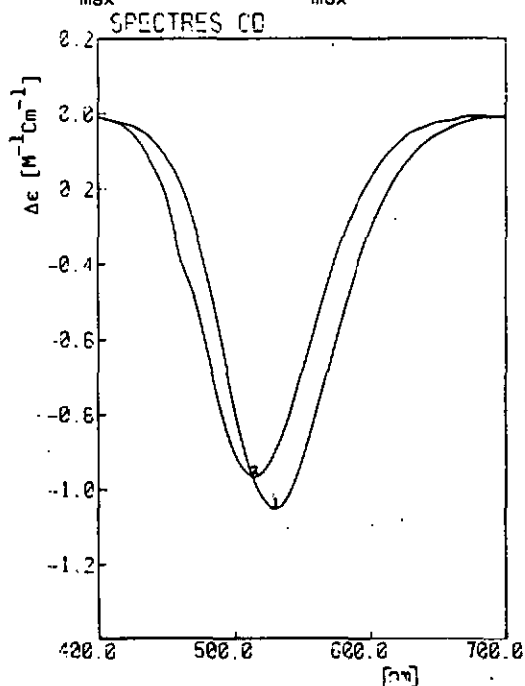
Les peptides L-Ala₄-L-Glu et L-Ala₄-D-Glu ne diffèrent que par la configuration de l'acide glutamique ce qui implique que la différence de stabilité des complexes $[Cu(H_3L-Ala_4-L-Glu)]$ et $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ est due à l'influence du reste du 5ème acide aminé (fig. 11).

3.3.2.2.2. Mesures spectroscopiques

Les spectres EPR de ces deux complexes sont identiques entre eux mais légèrement différents de celui du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4)]$ (Fig. 17 et 18).

Visiblement, les complexes avec les pentseptides présentent une plus grande rigidité que ceux avec les tétrapeptides. D. Perret^[5] n'a pas observé de différence dans les spectres EPR pour les complexes $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L-AspGlyGly})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L-Gly}_3)]$ malgré la coordination axiale du reste β -carboxylate dans le premier complexe. Cela provient du fait que la différence entre la coordination axiale d'une molécule d'eau ou d'un oxygène d'une fonction carboxylique ou peptidique n'est vraisemblablement pas détectable par EPR surtout lors de la présence de plusieurs atomes d'azote dans les positions équatoriales du complexe de cuivre. La similitude entre les spectres EPR des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-L-Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-D-Glu})]$ ne signifie donc pas que les deux complexes ont la même structure.

Les spectres CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-L-Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-D-Glu})]$ diffèrent aussi bien par leurs valeurs de λ_{max} que par leurs $\Delta\epsilon_{\text{max}}$ (voir fig. 28 et tableau 7).



Figures 28 :

Spectres CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-L-Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L-Ala}_4\text{-D-Glu})]$
 pH 11.0 pour L-Ala₄-L-Glu(1)
 et 10.8 pour L-Ala₄-D-Glu(2)

Etant donné que dans ces deux complexes, les acides aminés responsables de la coordination du métal dans le plan carré ont la même configuration, la différence des spectres CD des deux espèces doit provenir de l'influence du reste optiquement actif du cinquième acide aminé sur le centre métallique. Une différence dans la structure des deux complexes peut également influencer le spectre CD par exemple l'apparition dans un des cas, d'un cycle de chélation supplémentaire. Nous rappelons que les restes méthyles des quatre premiers acides aminés diminuent fortement la possibilité d'accès à l'une des positions axiales du cuivre (voir fig. 26).

Du point de vue phénoménologique, nous pouvons dire que le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4\text{-D-Glu})]$, plus stable que le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4\text{-L-Glu})]$ (voir tableau 4), possède un spectre CD d'intensité plus faible que celui de l'espèce $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4\text{-L-Glu})]$ tout comme le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_6)]$, plus stable que le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4)]$ possède un spectre CD d'intensité plus faible que celui du complexe avec la tétrahydroalanyl-L-alanine (voir fig. 25). Cette diminution de l'intensité des spectres CD est imputable à une augmentation de la rigidité du complexe ce qui se traduit par une augmentation de l'effet CD positif du quatrième acide aminé comme l'a fait remarquer D.W. Margerum [19].

Mais ce qui nous semble le plus important de remarquer, c'est la différence dans la position des maxima des spectres CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4\text{-L-Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4\text{-D-Glu})]$ (voir fig. 29).

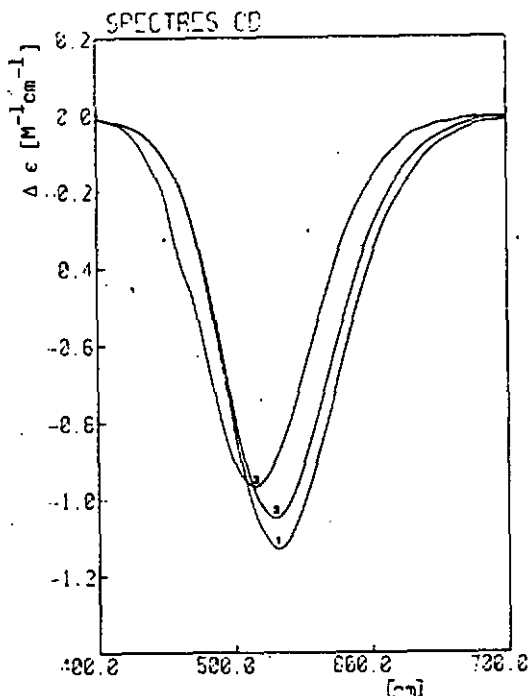


Figure 29 : spectres CD des complexes $[Cu(H_3L-Als_4)]$
 $[Cu(H_3L-Als_4-L-Glu)]$ et $[Cu(H_3L-Als_4-D-Glu)]$
 pH 11.0 pour $L-Als_4$ (1) et $L-Als_4-L-Glu$ (2) et
 10.8 pour $L-Als_4-D-Glu$ (3)

Le spectre CD du complexe $[Cu(H_3L-Als_4-L-Glu)]$ a son maximum à la même longueur d'onde que le complexe $[Cu(H_3L-Als_4)]$, ce qui n'est pas le cas du spectre CD de l'espèce $[Cu(H_3L-Als_4-D-Glu)]$. En nous basant sur ces dernières observations, nous pouvons affirmer que l'influence du reste optiquement actif du 5ème acide aminé sur le spectre CD du complexe est beaucoup plus important pour le complexe $[Cu(H_3L-Als_4-D-Glu)]$ que pour le complexe $[Cu(H_3L-Als_4-L-Glu)]$. Cela signifie que le substituant de l'acide glutamique est plus proche du centre métallique s'il est de configuration D plutôt que de configuration L.

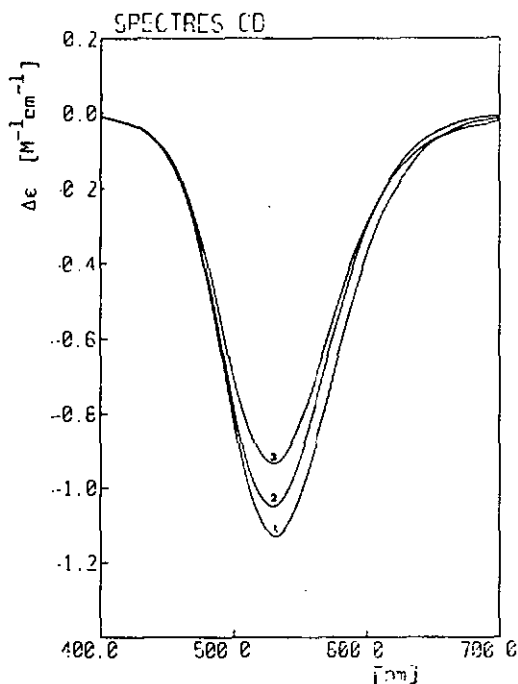


Figure 30 :

Spectres CD des complexes
 $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4)]$ (1)
 $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu})]$ (2) et
 $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu}_3)]$ (3),
 pH = 11.0

Le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu})]$ a un spectre CD d'intensité plus faible que celui du complexe avec la tétraalanine malgré que leurs stabilités soient équivalentes. Nous pensons que cela peut être dû à un effet de charge ce qui est confirmé par le fait que le complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu}_3)]$, de stabilité comparable à celle des deux autres complexes, mais de charge plus élevée, possède un spectre CD d'intensité encore plus faible que celle du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu})]$.

Comme nous venons de le mentionner, l'heptapeptide $\text{L}-\text{Ala}_4\text{L}-\text{Glu}_3$ forme avec le cuivre(II) des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ de stabilités comparables à ceux avec le pentapeptide $\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu}$ (voir tableau 4 et fig. 11).

L'influence du reste du 5ème acide aminé sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$ se vérifie une nouvelle fois. Par contre, le complexe $[CuL]$ avec l'heptapeptide possède une stabilité beaucoup plus grande (environ un ordre de grandeur) que tous les autres complexes $[CuL]$ que nous avons étudiés. Ce fait peut être attribué à un effet de charge ou à une structure différente de ce complexe.

3.3.2.2.3. Discussion

D'après les informations apportées par les titrations potentiométriques et le dichroïsme circulaire, nous pouvons dire que le substituant en position 5 du peptide a une très grande importance pour la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$. Un reste R volumineux, chargé de configuration L réduit la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$ à une valeur similaire à celle des complexes avec les tétrapeptides alors que le même reste R, mais cette fois de configuration D amène la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$ à une valeur proche de celle du complexe avec les hexapeptides (augmentation de la stabilité d'environ 6 KJ/mole). Cela signifie donc que la structure des deux complexes $[Cu(H_3L)]$ n'est pas la même.

La structure de l'espèce $[Cu(H_3L-Ala_4-L-Glu)]$ doit être semblable à celle du complexe $[Cu(H_3L-Ala_4)]$ et la structure de l'espèce $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ proche de celle du complexe avec l'hexalanine, car la différence de longueur d'onde du maximum du spectre CD des complexes $\{[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]\}$ et $[Cu(H_3L-Ala_6)]$ provient très vraisemblablement du changement de configuration de l'acide aminé en 5ème position et non d'une différence de la structure du complexe.

Si, pour expliquer cette stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$ pour le ligand L-Ala₄-D-Glu, nous postulons une coordination de

la chaîne peptidique en position axiale du métal, comme nous l'avons fait pour le complexe avec l'hexaalanine (voir fig. 27) nous obtenons la structure suivante.

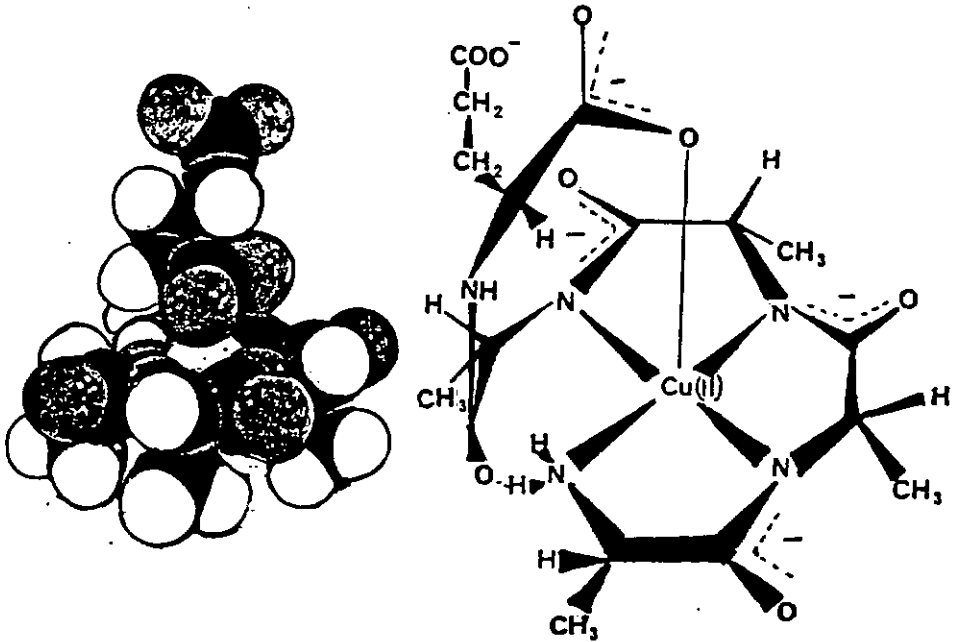


Figure 31 : complexe $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$

Cette structure nous permet d'apprécier l'importance que peut avoir le substituant en position 5 du peptide sur la stabilité de l'espèce $[Cu(H_3L)]$.

La substituant d'un acide aminé de configuration D n'empêche pas la cyclisation en position axiale du métal, même s'il est volumineux, alors que le substituant volumineux d'un acide aminé de configuration L a des interactions stériques importantes avec la fonction amine terminale coordonnée au cuivre.

L'encombrement stérique est alors manifeste et la cyclisation en position axiale peu probable.

Les autres hypothèses de stabilisation de l'espèce $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ proposée sous 3.3.1., soit la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires, ne peuvent pas expliquer la différence de stabilité des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{D}-\text{Glu})]$. (Voir fig. 32 - 34)

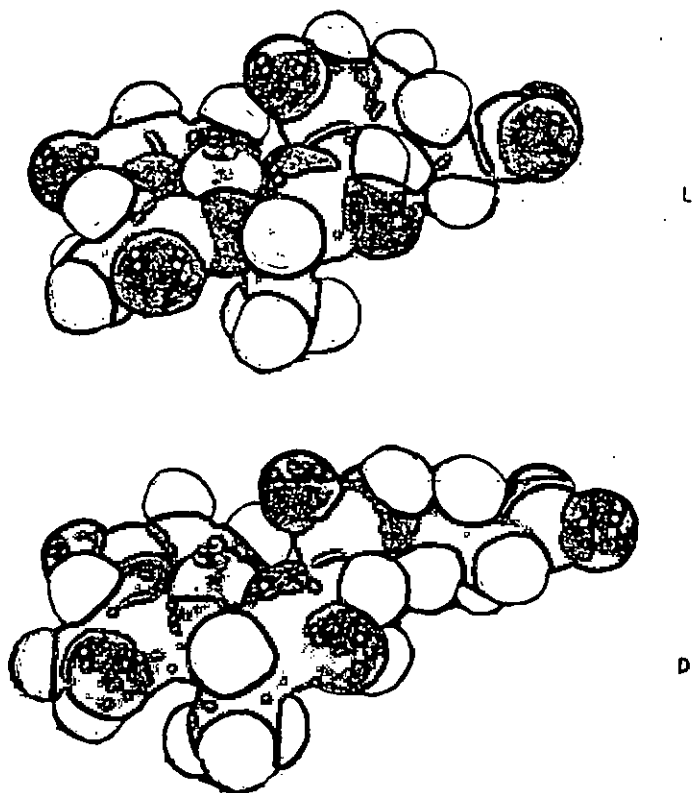


Figure 32 : Liaison hydrogène intramoléculaire dans les complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{L}-\text{Glu})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L}-\text{Ala}_4-\text{D}-\text{Glu})]$

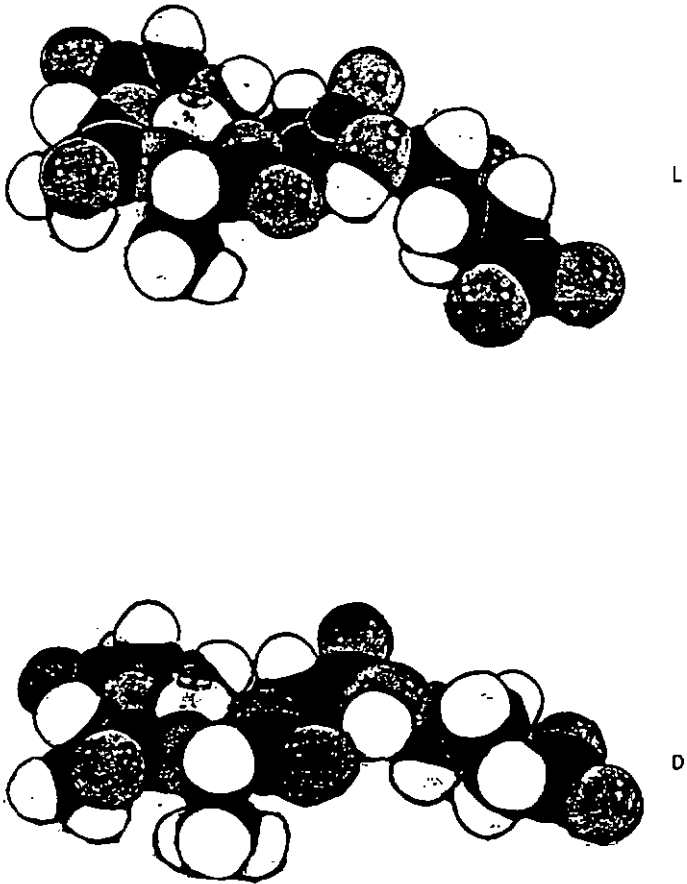


Figure 33 : Liaison hydrogène intramoléculaire dans les complexes
[Cu(H₃L-Ala₄-L-Glu)] et [Cu(H₃L-Ala₄-D-Glu)]

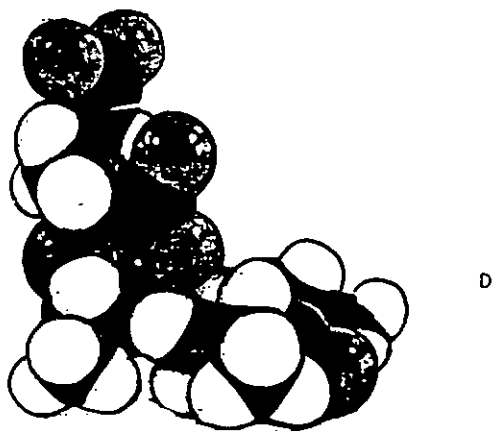
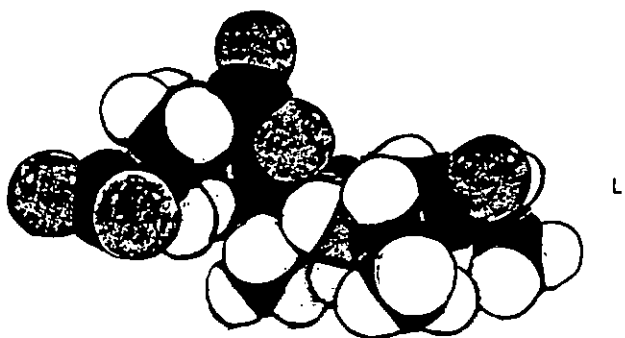


Figure 34 : Liaison hydrogène intramoléculaire dans les complexes
[Cu(H₃L-Ala₄-L-Glu)] et [Cu(H₃L-Ala₄-D-Glu)]

Nous n'observons pas de différences notoires dans l'influence que peut avoir l'acide glutamique de configuration L ou D sur la stabilité des complexes formés.

En première conclusion, nous pouvons dire que les substituants des acides aminés formant les peptides et tout particulièrement celui du 5ème acide aminé ont une très grande influence sur la stabilité de l'espèce $[Cu(H_3L)]$. Cette influence du substituant de l'acide aminé placé en 5ème position dépend de sa configuration, de sa charge et de son volume.

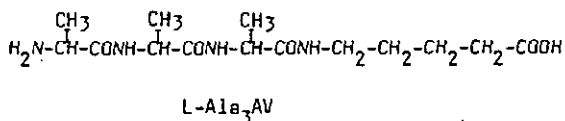
3.3.4. Cas du ligand L-Ala₃AV

Pour expliquer la différence de stabilité existant entre les complexes $[Cu(H_3\text{tétrapeptide})]$ et $[Cu(H_3\text{pentapeptide})]$ ou $[Cu(H_3\text{hexapeptide})]$, nous postulons la formation d'un cycle de chélation supplémentaire de 8 membres en position axiale du cuivre.

Cette cyclisation en position axiale du métal semble pouvoir s'accompagner de la formation d'une liaison hydrogène entre la fonction amine terminale et l'oxygène de la quatrième fonction peptidique.

Afin de mieux voir l'importance relative de la coordination axiale et du pont hydrogène intramoléculaire sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$ nous avons imaginé de travailler avec un ligand, dérivé d'un peptide, qui posséderait la particularité de pouvoir former la liaison en axiale du cuivre (cycle à 8 membres avec un oxygène d'une fonction carboxylique ou peptidique), mais non celle de former des ponts hydrogènes intramoléculaires (suppression de la 4ème fonction peptidique). Pour cela, nous

avons synthétisé le ligand suivant :



En plus des particularités citées plus haut, L-Ala₃AV ne possède pas de substituant pouvant provoquer un encombrement stérique lors d'une coordination en axiale du métal.

La stabilité observée pour le complexe [Cu(H₃L-Ala₃AV)] montre que la structure du complexe est similaire à celle des complexes avec les tétrapeptides (voir tableau 5), donc qu'il n'y a pas dans ce cas de formation d'une chélation supplémentaire en position axiale du métal.

Cette constatation nous porte à penser que pour que le cycle de 8 membres en axial du cuivre (II) se forme, il est nécessaire de le stabiliser par formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction amine terminale et la quatrième fonction peptidique.

Le complexe [Cu(H₃L-Ala₃AV)] a un spectre CD d'intensité plus grande que celui du complexe [Cu(H₃L-Ala₄)]. Cela prouve une fois de plus que l'acide aminé en 4ème position du peptide a un signal CD positif comparé à ceux des 3 premiers acides aminés qui sont négatifs [19,30]. (Voir fig. 35)

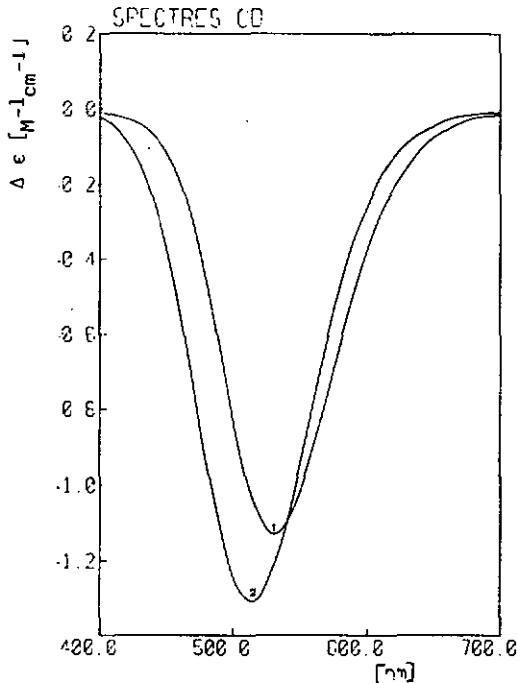


Figure 35 : spectre CD des complexes $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_3\text{AV})](2)$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{-L-Ala}_4)](1)$

3.3.5. Atome responsable de la coordination en position axiale

L'absence de changement notable dans les propriétés spectrales et dans la stabilité du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ lors de la variation à la position 5 du peptide d'une fonction peptidique ou amide primaire à une fonction acide ou ester (tableaux 2, 3, 5) indique que c'est un atome d'oxygène qui est responsable de la coordination en position axiale du cuivre (II) dans ces différents cas. Lors de l'étude de la réaction d'hydrolyse de la fonction ester des composés $\text{Gly}_4\text{-L-AlaOME}$ et $\text{Gly}_3\text{-L-AlaOME}$, D.W. Margerum^[19] a observé que le cuivre catalysait la réaction d'hydrolyse dans le cas du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{Gly}_4\text{-L-AlaOME})]$ mais non dans celui du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{Gly}_3\text{-L-AlaOME})]$. La vitesse d'hydrolyse de la

fonction ester du complexe $[Cu(H_3Gly_3-L-Ala_4OEt)]$ est similaire à celle de la fonction ester du peptide libre alors que la vitesse d'hydrolyse de la fonction ester du complexe $[Cu(H_3Gly_4-L-AlaOEt)]$ est environ 13 fois plus élevée que celle du ligand libre.

Ces résultats suggèrent dans le cas du complexe avec le dérivé du pentapeptide une interaction coordinative du ligand avec une position axiale du métal et une augmentation du caractère électrophile du carbone de la fonction ester.

La figure 36 montre le spectre CD du complexe $[Cu(H_3Gly_4-L-AlaOEt)]$. L'apparition d'un signal CD pour ce complexe indique que le centre optiquement actif du 5ème acide aminé se trouve positionné dans l'espace assez près du centre métallique pour pouvoir l'influencer.

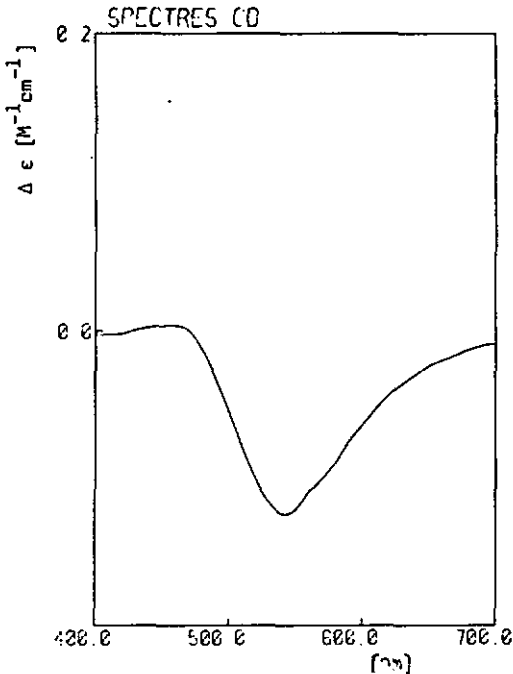


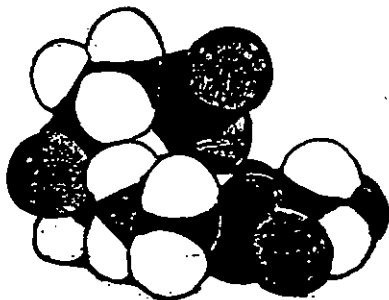
Figure 36 : Spectre CD du complexe $[Cu(H_3Gly_4-L-AlaOEt)]$

D'après les résultats obtenus par le pKa du complexe $[Cu(H_{-2}L)]$ (voir fig. 9-12), il semblerait que le remplacement d'une fonction carboxylique ou peptidique à la 5ème position du peptide par une fonction amide primaire ou ester stabilise sensiblement l'espèce $[Cu(H_{-3}L)]$.

Cela doit être dû à un effet de charge (diminution de la charge négative du complexe).

3.3.6. Hypothèse de structure du complexe $[Cu(H_{-3}L)]$ pour un peptide de plus de quatre acides aminés

Parmi les hypothèses de structure du complexe $[Cu(H_{-3}L)]$ proposées précédemment, celle qui nous semble le mieux corroborer les résultats et observations discutées dans les paragraphes précédents est l'hypothèse de la coordination, en position axiale du cuivre, d'un oxygène de la fonction carboxylique terminale (pentapeptide) ou de l'oxygène de la 5ème fonction peptidique (cas de peptides > pentapeptides). Le cycle à 8 membres ainsi formé est stabilisé par formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire comme le montre la figure 37.



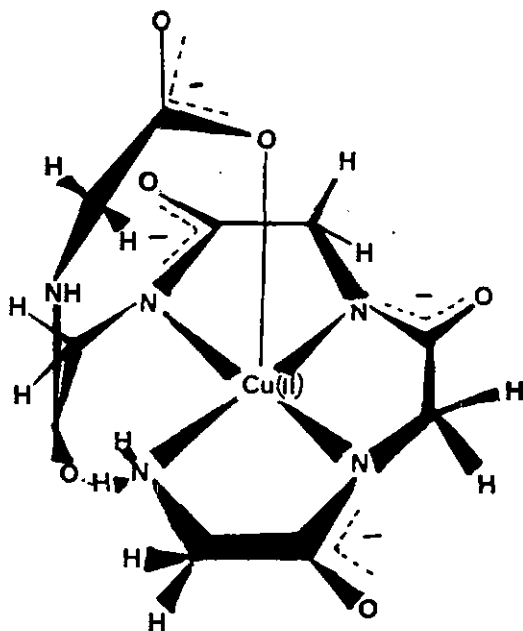


Figure 37 : Structure postulée du complexe $[Cu(H_3Gly)_5]$

D'après les observations faites pour le complexe $[Cu(H_3L-Ala_3AV)]$ (voir 3.3.4.), nous pouvons dire que la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire entre la quatrième fonction peptidique et l'amine terminale est indispensable pour la formation du cycle de chélation de 8 membres en position axiale du cuivre(II). (voir fig. 37).

C'est à nos yeux la seule structure du complexe $[Cu(H_3L)]$ qui peut expliquer la différence de stabilité entre les complexes $[Cu(H_3L-Ala_4-L-Glu)]$ et $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ (voir fig. 32-35 et tableau 4) car cette structure est possible dans le cas du complexe $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ mais pas dans le cas du complexe $[Cu(H_3L-Ala-L-Glu)]$ à cause de raisons stériques.

Le tableau 10 résume les facteurs de stabilisation et de déstabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$.

facteurs de stabilisation	facteurs de déstabilisation
- augmentation de la chaîne peptidique de 4-5 (6) unités d'acide aminé	- influence du substituant en position 5 par - sa chiralité (L) - son volume (augmentation) - sa charge (négative) *

Tableau 10 : Facteurs de stabilisation et de déstabilisation du complexe $[Cu(H_3L)]$

* Une augmentation de la charge négative du complexe $[Cu(H_3L)]$ doit entraîner une diminution de la stabilité du complexe au même titre qu'une diminution de la charge du complexe entraîne une stabilisation de l'espèce (voir 3.3.5.)

La différence de stabilité des complexes $[Cu(H_3L-Ala_6)]$ et $[Cu(H_3L-Ala_4-D-Glu)]$ (voir Tableaux 3 et 4) peut également être attribué à un effet de charge.

Il nous semble intéressant de discuter les enchaînements d'acides aminés naturels possibles, dans les eaux naturelles, permettant la stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$.

Dans les eaux, la concentration en DON (dissolved organic nitrogen) varie entre 100 et 300 $\mu g/l$ selon le degré d'eutrophication^[33]. Le DON est presque exclusivement composé d'azote provenant des acides aminés libres ou liés dans les peptides. Les 90-95 % des acides aminés présents dans les eaux existent sous formes de peptides dont les 50 % ont un poids moléculaire moyen d'environ 1000 daltons ce qui correspond à une chaîne peptidique d'environ 10 acides aminés.^[33,47]

Les acides aminés les plus abondants dans les eaux naturelles sont Gly, Glu, Asp, Ala, Ser suivis par Thr, Leu, Pro.^[32,33]

Tous ces acides aminés sont de configuration absolue L, sauf Gly. Ils peuvent être classés en trois groupes (tableau 11).

Acides aminés avec substituants peu volumineux	Acides aminés avec substituants volumineux	Acides aminés avec substituants volumineux et polaires
Gly Ala	Leu Pro Ser Thr	Asp Glu

Tableau 11 : Acides aminés les plus représentés dans les eaux naturelles

Pour que la stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$ ait lieu, il est nécessaire que

1. L'acide aminé en 5ème position possède un substituant peu volumineux \Rightarrow Gly ou Ala
2. Si l'acide aminé en 5ème position possède un substituant encombrant ou chargé, les quatre premiers acides aminés ou du moins deux ou trois des quatre premiers acides aminés soient la glycine.

Nous rappelons que les substituants des quatre premiers acides aminés bloquent l'accès à l'une des positions axiales du métal (voir fig. 26).

3.3.7. Conclusion

Dans le domaine de pH entre 7-9, les complexes peptidiques du cuivre (II) les plus abondants sont les espèces $[Cu(H_2L)]$ et $[Cu(H_3L)]$.

L'augmentation de la longueur de la chaîne peptidique (passage de tétrapeptide à pentapeptide et hexapeptide) stabilise fortement l'espèce $[Cu(H_3L)]$. L'augmentation de la stabilité de cette espèce est d'environ 1 unité log. soit $\Delta G = 6$ KJ/mole.

Vraisemblablement une augmentation supplémentaire de la longueur de la chaîne peptidique n'a pas d'effet nouveau sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$.

La nature et le volume des substituants des acides aminés composent les peptides ont une grande influence sur la stabilité des complexes peptidiques et particulièrement le substituant du 5ème acide aminé à partir de l'extrémité "N" du peptide. Ce substituant déstabilise l'espèce $[Cu(H_3L)]$ s'il est volumineux, chargé et de configuration L.

Les substituants des quatre premiers acides aminés n'ont que peu d'influence sur la stabilité des complexes $[Cu(H_3L)]$ si ce n'est que de vraisemblablement bloquer l'accès à une des positions axiales du cuivre.

D'après les connaissances en chimie de coordination et des observations faites par potentiométrie et spectroscopie, nous pouvons expliquer la stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$ dans le cas de peptide plus grand que des tétrapeptides, par la coordination dans une des positions axiales du cuivre d'un oxygène de la fonction carboxylique terminale (pentapeptide) ou de la 5ème fonction peptidique (hexapeptide).

Le cycle à 8 membres, stabilisé par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction amine terminale et la quatrième fonction peptidique. La formation du pont hydrogène intramoléculaire est indispensable pour l'apparition de la chélation axiale. (fig. 38)

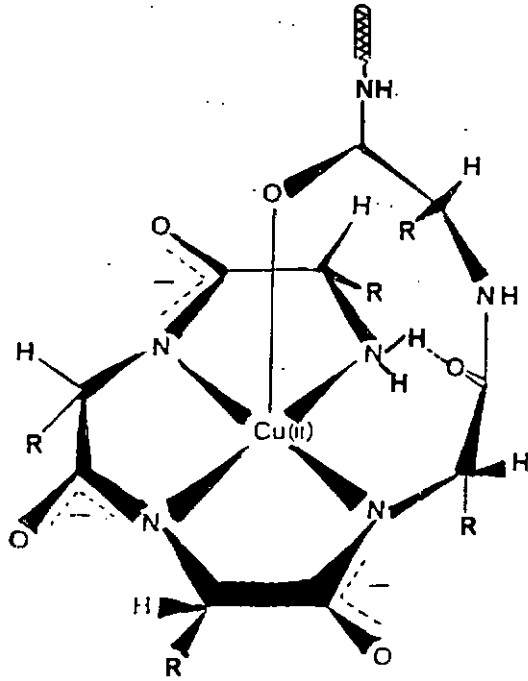


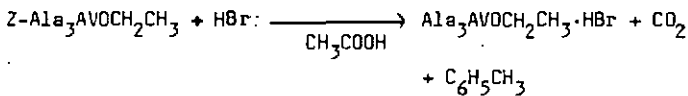
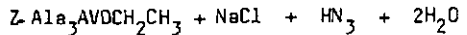
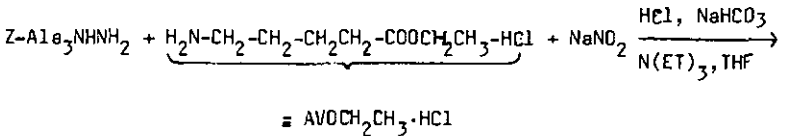
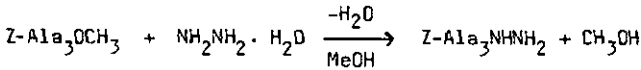
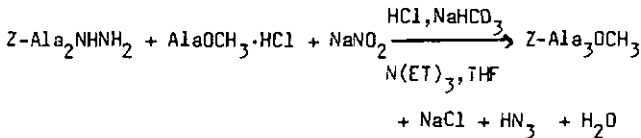
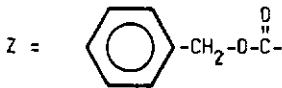
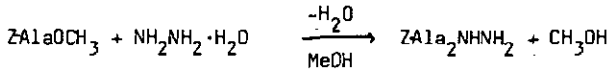
Figure 38 : structure du complexe $[Cu(H_3L)]$ pour un peptide de plus de quatre acides aminés

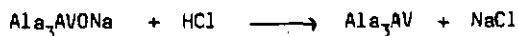
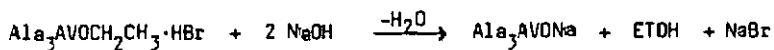
4. PARTIE EXPERIMENTALE

4.1. Synthèse de L-Ala₃AV

Ce produit a été préparé par analogie avec la synthèse d'autres peptides selon la méthode de H. Kessler et al. [45]

4.1.1. Organigramme





4.1.2. Z-Ala₂NHNH₂

Une quantité de ZAla₂NHNH₂ a été synthétisée selon la méthode de H. Keaaler et al [45] à partir de 30 mmole de Z-Ala₂OMe.

4.1.3. Z-Ala₃OMe

Une quantité de Z-Ala₃OMe a été préparée à partir de 25 mmole de Z-Ala₂NHNH₂ et de 20 mmole de AlaOMe.HCl selon [45].

4.1.4. Z-Ala₃NHNH₂

A partir de 17 mmole de Z-Ala₃OMe, nous avons préparé 14 mmole de Z-Ala₃NHNH₂ [45].

4.1.5. AVOET.HCl

Une quantité du chlorhydrate de l'ester éthylique de l'acide N-aminopentanoïque a été synthétisée à partir de 40 mmole de l'acide correspondant par analogie avec la méthode de R.A. Boissonas et al [46].

4.1.6. Z-Ala₃AVOET

Une quantité de Z-Ala₃AVOET a été préparée comme sous 4.1.3. à partir de 14 mmole de Z-Ala₃NHNH₂ et 15 mmole de AVOET.HCl.

4.1.7. Ala₃AVOET.HBr

La déprotection de l'amine terminale a été effectuée à partir de 10 mmole de Z-Ala₃AVOET selon la méthode de H. Kessler et al^[45].

4.1.8. Ala₃AV

La saponification de 8 mmole de Ala₃AVOET .HBr conduit à la formation de Ala₃AV très facilement cristallisable dans un mélange eau-éthanol.

4.1.9. Purification de Ala₃AV

La purification du produit s'effectue par recristallisations successives dans un mélange eau-éthanol. Pour cela, le produit est dissous dans le minimum d'eau à température ambiante puis de l'éthanol est ajoutée jusqu'à formation d'un léger trouble. Par refroidissement à 0°C, le produit cristallise. Nous testons la pureté du produit à l'aide de la chromatographie sur couche mince. Le système de solvants choisi est un mélange N-butanol-acide acétique-eau 3:1:1 . La révélation du dérivé peptidique se fait avec une solution de ninhydrine 0.3 % dans un mélange n-butanol-acide acétique 95 : 5 à une température de 80 - 100°C, le support étant des plaques de cellulose F₂₅₄ (Merck).

L-Ala₃AV a un Rf de 0.42.

4.1.10. Analyse de L-Ala₃AV

L'analyse élémentaire C.H.N. révèle la formation L-Ala₃AV. $\frac{1}{2}$ H₂O

trouvé	C	49.56	H	7.84	N	16.52
--------	---	-------	---	------	---	-------

calculé	C	49.50	H	7.96	N	16.50
---------	---	-------	---	------	---	-------

Point de fusion : 228⁰C

$[\alpha]_D = - 81.2$ (C = 2, H₂O)

Constantes d'acidité ($\mu = 0.1$ M KNO₃, T = 25⁰)

pka₁ 4.65

pka₂ 8.01

4.2. Méthodes analytiques

4.2.1. Titrages potentiométriques

Pour nos mesures, nous avons utilisés les substances suivantes :

Métal : CuSO₄ · 5H₂O p.a. (Merck)

Peptides : Gly₄ (Fluka)

Gly₆, L-Ala₆ (Sigma)

Gly₅, L-Ala₄, L-Ala₄-L-Glu, L-Ala₄-D-Glu, L-Ala₄-L-Glu₃,

Gly₅NH₂ · HBr, Gly₄-L-AlaOMe . acétate (Bachem)

L-Ala₃AV (voir 4.1)

Force ionique: KNO₃ très pur (Merck) solution 0.1 M

Solvant : eau bidistillée dégazée

La solution titrante de NaOH ~ 0.03 M, contenant KNO₃ 0.1 M, est préparée avec des pastilles de NaOH lavées, le titre de la solution est déterminé par titration avec de l'hydrogénéophthalate de potassium. Toutes les solutions sont préparées juste avant emploi. Les titrages sont effectués de la manière suivante :

Titrage des peptides

Pipettage de 25 ml de la solution de peptide ~ 7.5 10⁻⁴M, dans une cellule Metrohm, barbotage d'azote pendant 15 minutes et titrage sous azote à l'aide d'une burette Metrohm E 645.

Titration des complexes cuivre (II) - peptide

Pipettage de 25 ml de solution de peptide $\sim 7.5 \cdot 10^{-4}$ M et de 1 ml de solution de CuSO_4 $1.875 \cdot 10^{-2}$ M dans une cellule Metrohm, barbotage d'azote durant 15 minutes et titrage sous azote avec une burette Metrohm E 645. Le pH-mètre utilisé est un pH-mètre Metrohm E 605 muni d'une électrode de verre combinée Metrohm EA 125 ou Ross 81-02 (Orion).

L'étalonnage du pH mètre se fait à l'aide de deux solutions de tampons hydrogénophthalate de potassium 0.05 M (pH 4.008 à 25°C), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.01 M (pH 9.183 à 25°C) préparées à partir de produits pour étalons de pH DIN 19266.

De nouveaux tampons sont préparés pour chaque série de mesures.

4.2.2. Calculs par ordinateur

Les calculs des constantes β_{mhl} et des courbes de répartition des espèces en fonction du pH ont été fait à l'aide des programmes SCOGS et COMICS modifiés [25] sur un ordinateur VAX/VMS de Digital Equipment corporation (Institut de mathématique de l'Université de Neuchâtel).

Les courbes de répartition des espèces en fonction du pH ainsi que les spectres visibles et CD ont été dessinés à l'aide de programmes [25].

4.2.3. Spectres visibles

Les spectres d'absorption des solutions de complexes peptidiques sont mesurés par un spectrophotomètre Uvikon 820 (810) dans des cuves de 2 cm thermostatisées. Les solutions sont préparées comme sous 4.2.1.

La relation

$$\epsilon = \frac{L \text{ [cm]} \times S}{25 \text{ [cm]} \cdot C \text{ [M]} \times 2 \text{ [cm]}}$$

permet de calculer les coefficients ϵ à partir des spectres d'amplitude L à une sensibilité correspondant à 25 cm pour des cuves de 2 cm.

4.2.4. Spectres CD

Les spectres de dichroïsme circulaire des solutions de complexes peptidiques sont mesurés par un spectropolarimètre Jasco J-500C dans une cuve de 5 cm à température ambiante. Les solutions sont préparées comme sous 4.2.1.

La relation

$$\Delta \epsilon = \frac{L \text{ [cm]} \times S \text{ [m}^0\text{/cm]}}{3.3 \cdot 10^4 \times C \text{ [M]} \cdot 5 \text{ [cm]}}$$

permet de calculer les coefficients $\Delta \epsilon$ à partir des spectres d'amplitude L à une sensibilité S correspondant à 25 cm pour une cuve de 5 cm.

D E U X I E M E P A R T I E

* * * * *

5. INTRODUCTION

Il est connu que des métaux tels, Cu, Zn, Cd, Co, Cr, Ni et Mo jouent un rôle significatif dans les réactions biologiques intervenant dans l'environnement aquatique. A l'état de traces, certains d'entre eux sont des "micronutriments" pour les transformations enzymatiques mais à des concentrations plus élevées, ils peuvent devenir des agents toxiques et inhibiteurs pour les systèmes biologiques. [34]

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre 1, la matière organique présente dans les eaux et les sédiments joue dans la dynamique des métaux lourds un rôle particulièrement important. En effet, la disponibilité des métaux en traces par la vie aquatique dépend plus de la concentration des métaux libres que de la concentration totale. [11][35]

La matière organique présente dans les eaux est en partie encore mal définie. Elle se compose de substances telles des acides aminés, polysaccharides, sucres, acides gras, composés organophosphorés, composés aliphatiques ou aromatiques contenant les groupements fonctionnels -OH et -COOH, et des porphyrines. Tous ces composés contiennent des atomes coordonneurs pouvant entraîner la formation de complexes.

Le produit final de la biodégradation de cette matière organique semble être la matière humique. [9]

Les substances humiques représentent environ 60-80 % du DOC (dissolved organic carbon) et du POC (particulate organic carbon). [36]

Il s'agit des polymères très hétérogènes de poids moléculaire variant entre 700 et 2.000.000 [1], formés d'un squelette aromatique sur lequel sont liées chimiquement ou physiquement, des protéines, polysaccharides, phénols, porphyrines et métaux [37-39].

Selon leurs masses moléculaires et leurs solubilités, les substances humiques sont réparties en^[40]

1. Humines
2. Acides humiques
3. Acides fulviques

Parmi les ligands inorganiques présents dans les eaux, seuls le carbonate et l'hydroxyde prennent part à la complexation du cuivre (II).

Les composés organiques présents dans les eaux entrent en compétition avec les ligands inorganiques tels le carbonate et l'hydroxyde pour la complexation des métaux lourds et particulièrement du cuivre.

La présence, dans les eaux, d'autres cations métalliques que le cuivre (Ca^{2+} , Fe^{3+} ...) ne provoque aucune perturbation de la complexation du cuivre par les ligands organiques naturels, donc dans les eaux, il n'y a pas de métaux compétitifs pour le cuivre.^[10]

Seuls des ligands organiques pluridentés peuvent complexer de façon préférentielle le cuivre dans les conditions de pH et de concentration existantes dans les eaux naturelles, car la constante conditionnelle des complexes formés doit être supérieure à 10^{10} à pH 8.0.^[10]

La majeure partie de l'azote organique dissous (DON) dans les eaux est constituée d'acides aminés.

Les acides aminés peuvent exister sous formes libres ou être liés dans les peptides et les protéines. Il peut arriver que ces composés soient combinés avec d'autres substances ou absorbés sur des polymères organiques.

Le but de la deuxième partie de ce travail est de tenter de répondre aux questions suivantes :

- Les complexes peptidiques du cuivre peuvent-ils exister dans les conditions de pH et de concentrations existantes dans les systèmes naturels ?
- Les peptides sont-ils capables d'entrer en compétition avec les ligands inorganiques présents habituellement dans les eaux (CO_3^{2-} , OH^-) pour la formation de complexes stables avec le cuivre aux conditions existantes dans les eaux ?
- Quelle est la valeur de la constante conditionnelle des complexes peptidiques à un pH 8.0 (concentration proche de celles des systèmes naturels) ? Cette constante est-elle du même ordre de grandeur que celle obtenue avec les ligands naturels ^[10] ?
- Quelle est la variation de la constante conditionnelle des complexes peptidiques du cuivre en fonction du pH ? Cette variation est-elle comparable à celle des complexes du cuivre avec les ligands naturels ^[10] ?
- Lors du mélange de peptides avec des ligands naturels, que ce passe-t-il au niveau de la constante conditionnelle ?

6. DETERMINATION DES CONSTANTES CONDITIONNELLES DE FORMATION DES COMPLEXES PEPTIDIQUES DU CUIVRE (II)

6.1. Hypothèse

Si nous postulons que des peptides peuvent peut-être être des modèles de ligands organiques naturels présents dans les eaux, nous pouvons admettre de manière simplifiée qu'une eau synthétique doit être formée de cuivre, de peptides et des ligands inorganiques CO_3^{2-} et OH^- . La comparaison des propriétés de cette eau synthétique avec l'eau naturelle nous permettra de voir si les peptides sont de bons ou de mauvais modèles des ligands naturels organiques du cuivre.

Dans la région de pH existant dans les eaux (7-9) les formes peptidiques du cuivre (II) les plus représentées sont les complexes $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ et $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{L})]$ (voir chapitre 3). Les figures 39 et 40 présentent les courbes de répartition des complexes Cu-Gly_6 en fonction du pH, en présence des ligands inorganiques CO_3^{2-} et OH^- aux conditions de concentration existantes dans les eaux.

Pour que les complexes peptidiques du cuivre se forment préférentiellement aux complexes inorganiques du cuivre, il est nécessaire d'avoir une concentration en peptide plus élevée que la concentration en cuivre et d'être dans un domaine de pH supérieur à 8.5. Dans les eaux, la concentration en peptide est plus élevée que celle en cuivre. La concentration moyenne de sites pour lier le cuivre varie entre $0.3-1.10^{-6}$ M. Alors que la concentration en cuivre varie entre $10^{-8}-10^{-7}$ M.

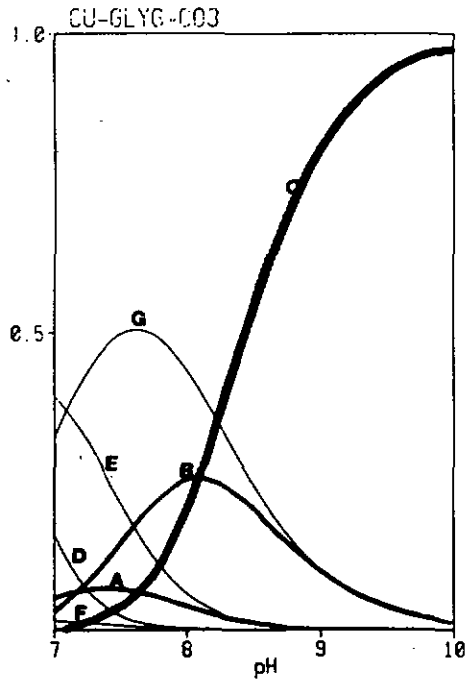
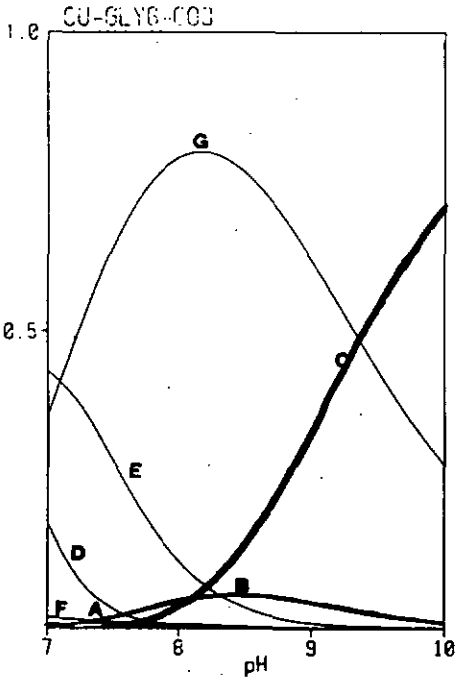


Figure 39 : Système Cu-Gly₆-CO₃²⁻

Cu²⁺ = 10⁻⁷M

Gly₆ = 10⁻⁷M

CO₃²⁻ = 10⁻³M

Figure 40 : Système Cu-Gly₆-CO₃²⁻

Cu²⁺ = 10⁻⁷M

Gly₆ = 10⁻⁶M

CO₃²⁻ = 10⁻³M

A : [Cu(H₁L)] B : [Cu(H₂L)] C : [Cu(H₃L)] D : [Cu²⁺] E = [CuCO₃]

F : [Cu(OH)] G : [Cu(OH₂)]

6.2. Détermination de K_M^* à partir des constantes d'équilibres globales β_{mH}

6.2.1. Introduction

Pour un système contenant un mélange de complexes labiles, une constante conditionnelle d'équilibre du mélange peut être définie, comme étant la somme des contributions des constantes conditionnelles de chaque espèce, ceci à des conditions bien définies (pH...).

Soit un mélange de cuivre (II) et de peptide (► tétrapeptide) les espèces pouvant se former sont les complexes $[CuL]$, $[Cu(H_1L)]$, $[Cu(H_2L)]$ et $[Cu(H_3L)]$. (voir chap. 3). Les constantes conditionnelles K_i^* de ces différentes espèces sont définies à partir des constantes globales d'équilibres β_i que nous avons calculées, par ordinateur à l'aide du programme Scogs [23][25], d'après les mesures potentiométriques (voir chap. 3).

$$[CuL] : \beta_{101} = \frac{[CuL]}{[Cu^{2+}][L]} \Rightarrow K_1^* = \beta_{101}$$

$$[Cu(H_1L)] : \beta_{1-11} = \frac{[Cu(H_1L)]}{[Cu^{2+}][H]^{-1}[L]} \Rightarrow K_2^* = \frac{\beta_{1-11}}{[H^+]}$$

$$[Cu(H_2L)] : \beta_{1-21} = \frac{[Cu(H_2L)]}{[Cu^{2+}][H^+]^{-2}[L]} \Rightarrow K_3^* = \frac{\beta_{1-21}}{[H^+]^2}$$

$$[Cu(H_3L)] : \beta_{1-31} = \frac{[Cu(H_3L)]}{[Cu^{2+}][H^+]^{-3}[L]} \Rightarrow K_4^* = \frac{\beta_{1-31}}{[H^+]^3}$$

La constante conditionnelle d'équilibre totale K_M^* est définie comme suit :

$$K_M^* = A_{[CuL]} \cdot K_1^* + A_{[Cu(-_1L)]} \cdot K_2^* + A_{[Cu(H_{-2}L)]} \cdot K_3^* + A_{[Cu(H_{-3}L)]} \cdot K_4^*$$

$A_{C_nH_nL_1}$ est l'abondance du complexe $Cu_mH_nL_1$ au pH considéré $\sum A_i = 1$

Elle est calculée par ordinateur à l'aide du programme Comics [24][25] (voir chap. 3)

6.2.2. Résultats

La figure 41 représente la variation du logarithme de la constante conditionnelle d'équilibre K_M^* des systèmes cuivre (II) - polyglycine pour des valeurs de pH allant de 7.0 à 10.0.

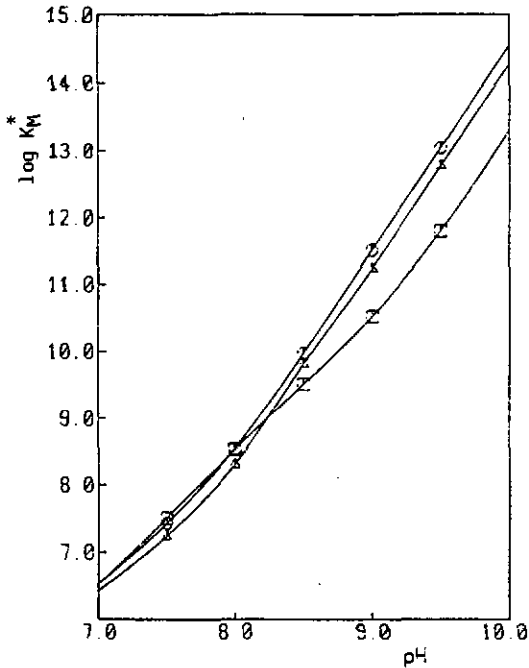


Figure 41 : $K_M^* = f(\text{pH})$ pour le système Cu(II)-polyglycine

□ = Gly₄, ○ = Gly₅, ▲ = Gly₆

Nous pouvons remarquer que la variation de la constante conditionnelle de formation des complexes peptidiques du cuivre en fonction du pH est d'autant plus grande que le pH est élevé. En dessous de pH 8.5, la valeur de la constante conditionnelle ne dépend que très peu de la longueur de la chaîne peptidique.

6.3. Détermination de K_M^* par polarographie et spectroscopie d'absorption atomique à pH 9.0

6.3.1. Introduction

Les méthodes expérimentales, développées durant ces dernières années pour la détermination des constantes de stabilité des complexes du cuivre avec les ligands naturels présents dans les eaux, sont de plusieurs types.

Les plus importantes sont :

1. Electrode spécifique du cuivre [11][41]
2. Rétention par gel [42]
3. Adsorption sur résines [10]
4. Adsorption sur l'oxyde de manganèse [43]

La comparaison des résultats obtenus avec ces différentes techniques n'est pas simple. En effet, les constantes de stabilité déterminées sont des constantes conditionnelles. Elles dépendent donc beaucoup du contexte expérimental choisi soit [44]

1. La nature de l'échantillon de matière organique étudié.
2. Les conditions expérimentales utilisées (pH, facteur de concentration, rapport métal/ligand, durée des mesures, force ionique).
3. Mode de traitement mathématique des données en vue de l'obtention des constantes conditionnelles.

Afin de pouvoir comparer les résultats, que nous obtenons pour les K_M^* des complexes peptidiques du cuivre, avec ceux obtenus par P. Baccini^[10] avec les ligands naturels, nous utilisons les mêmes techniques analytiques et les mêmes ordres de grandeur des concentrations de ligands. Pour ces mesures, nous nous restreignons à l'étude des complexes du cuivre avec les polymères de la glycine.

La procédure de détermination de la constante conditionnelle de formation du système cuivre - polyglycine est la suivante.

1. Détermination de la concentration en ligand ou plus précisément de la capacité complexante des peptides par titration ampérométrique en présence de carbonate à pH ~ 9.0 .
2. Détermination de la constante conditionnelle de formation des complexes Cu-peptide par une méthode de distribution du cuivre entre un échangeur d'ion et une phase aqueuse, en présence de carbonate à pH ~ 9.0 . La concentration en cuivre de la solution est mesurée par spectroscopie d'absorption atomique.

6.3.2. Détermination de la capacité complexante des peptides par polarographie

La figure 42 (a, b et c) montre les courbes de répartition des espèces en fonction du pH pour les systèmes $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_4/\text{CO}_3^{2-}$, $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_5/\text{CO}_3^{2-}$ et $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_6/\text{CO}_3^{2-}$ aux conditions de concentrations des mesures polarographiques (voir partie expérimentale chap. 7).

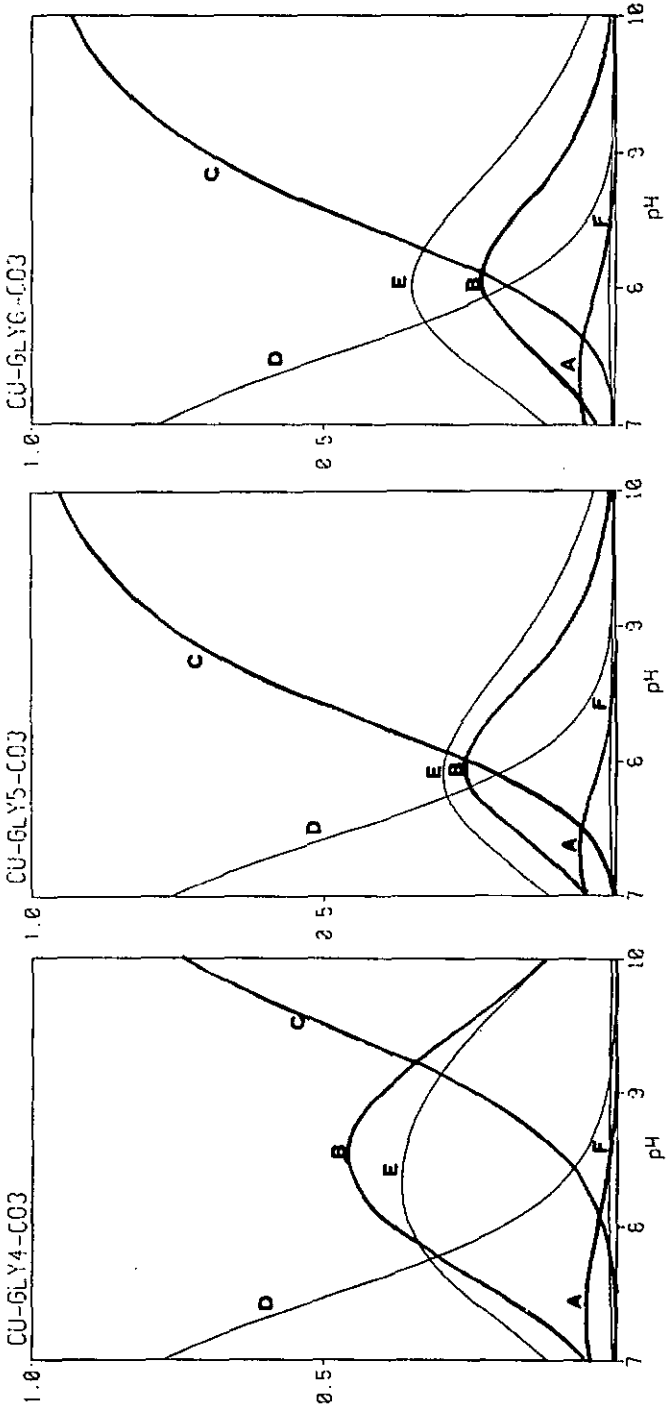


Figure 42 : Systèmes $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_4/\text{CO}_3^{2-}$, $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_5/\text{CO}_3^{2-}$ et $\text{Cu}^{2+}/\text{Gly}_6/\text{CO}_3^{2-}$
 $C_M = C_{\text{peptide}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $C_{\text{CO}_3^{2-}} = 10^{-1} \text{M}$

A = $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ B = $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ C = $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})]$ D = $[\text{Cu}(\text{CO}_3)_2]$ E = $[\text{Cu}(\text{CO}_3)_2]$ F = $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$

Le tableau 12 contient les valeurs des pourcentages des complexes peptidiques du cuivre à pH 9.0 pour les polymères de la glycine. Ces valeurs ont été obtenues par calcul par ordinateur d'après les constantes de formation globales β_{mhl} des complexes et par titrations ampérométriques.

	% des complexes Cu-peptide (calcul par ordinateur)	% des complexes Cu-peptide (titration ampérométrique)
Gly ₄	64	70
Gly ₅	84	80
Gly ₆	79	76

Tableau 12 : Pourcentages des complexes peptidiques du cuivre à pH 9.0 en présence de $\text{NaHCO}_3 = 0.1 \text{ M}$

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont en bon accord. Dans un milieu NaHCO_3 0.1M à pH 9.0, les complexes peptidiques du cuivre ne représentent donc que les 70 à 80 % des espèces existantes selon les peptides (concentration de peptide 5.10^{-5}M).

Il est important de constater que dans le domaine de pH aux alentours de 8.0, la répartition cuivre organique/ cuivre inorganique n'est guère influencée par la longueur de la chaîne peptidique (voir fig. 42).

6.3.3. Détermination de K_M^* des complexes peptidiques du cuivre par absorption atomique

Le tableau 13 contient les valeurs des constantes conditionnelles K_M^* des complexes cuivre - polyglycine à pH 9.0. Ces valeurs ont été d'une part calculées à partir des constantes globales β_{mhl} par

l'équation du paragraphe 6.1.1. (voir fig. 39) et d'autre part déterminées à partir des mesures de distribution du cuivre entre un échangeur d'ion et une phase aqueuse en présence de carbonate.

La concentration en cuivre est mesurée par spectroscopie d'absorption atomique (pour les conditions expérimentales, voir chap. 7).

	$\log K_M^*$ (pH 9.0) calculé à partir des constantes β_{mhl}	$\log K_M^*$ (pH 9.0) déterminé à partir des mesures de distribution du cuivre entre deux phases *
Gly ₄	10.52 ± 0.03	10.6 ± 0.2
Gly ₅	11.51 ± 0.03	10.8 ± 0.2
Gly ₆	11.23 ± 0.03	10.8 ± 0.2

Tableau 13 : valeurs de $\log K_M^*$ (pH 9.0) pour les systèmes cuivre - polyglycine

* les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes (3 - 4 mesures).

Nous constatons une similitude dans les ordres de grandeur des constantes conditionnelles obtenues par les deux méthodes. Il est évident que les résultats obtenus à partir de mesures d'absorption atomique sont entachés d'une erreur assez importante (~15 - 20 %) due aux conditions expérimentales choisies (faibles concentrations) et aux techniques de mesures utilisées.

En ce qui concerne les penta- et hexapeptides, la différence des résultats obtenus par les différentes méthodes peut peut-être être attribuable à une réaction d'hydrolyse qui entraînerait la formation de tétraglycine ou à une réaction d'adsorption du peptide sur la

résine ce qui entrainerait une diminution de la concentration.

6.3.4. Interprétation des résultats

O'après les mesures faites par P. Baccini et U. Suter [10], les ligands organiques présents dans les eaux ont une constante conditionnelle de formation de complexes avec le cuivre d'environ $10^{11.8}$ à pH 9.0. Nous pouvons donc dire que la stabilité des complexes peptidiques du cuivre est plus faible que celle des complexes avec les ligands naturels, dans le domaine de pH existant dans les eaux naturelles. (Tableau 13).

Comme le montre la figure 43, la variation de la constante conditionnelle K_M^* en fonction du pH est différente pour les complexes avec les ligands naturels et les complexes peptidiques du cuivre.

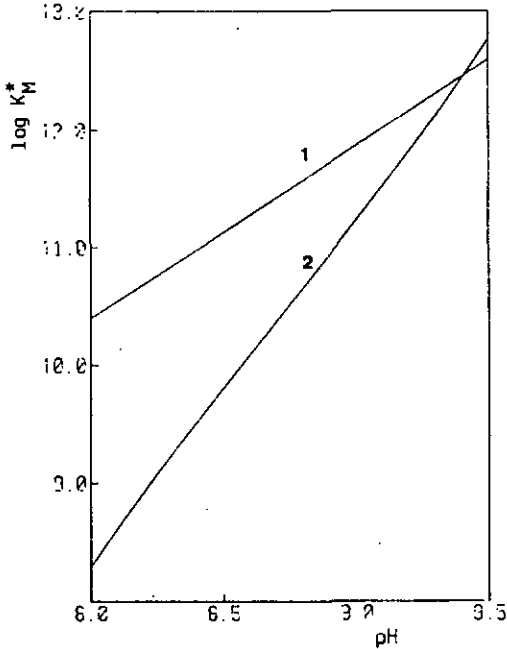


Figure 43 : Variation du $\log K_M^*$ en fonction du pH pour les systèmes cuivre-ligands naturels et cuivre - hexaglycine. Ligands naturels (1), Gly₆ (2).

En première conclusion, nous pouvons postuler que les peptides ne sont pas à priori capables d'entrer en compétition avec les ligands inorganiques présents dans les eaux (CO_3^{2-} , OH^-) pour complexer le cuivre de façon prédominante à des pH inférieurs à 9.0, dans les conditions de concentrations existantes dans les eaux. Cette observation nous pousse à croire que, très vraisemblablement, ce ne sont pas des peptides ou du moins pas des peptides à l'état pur, qui sont responsables de la complexation du cuivre dans les eaux. Il nous semble néanmoins intéressant de vérifier cette hypothèse en observant l'effet de l'addition de peptide à un concentrat d'eau lacustre sur la valeur de K_M^* mesurée.

6.3.5. Détermination de K_M^* d'un mélange cuivre - concentrat d'eau naturelle - penta glycine par spectroscopie d'absorption atomique

Le tableau 14 contient les valeurs des constantes conditionnelles des systèmes cuivre - ligands naturels et cuivre - ligands naturels - peptide à pH 9.0. Les concentrations des ligands ont été déterminées par titrations ampérométriques en présence de NaHCO_3 0.1 M (voir partie expérimentale, chap. 7).

	$\log K_M^*(\text{pH } 9.0)$
concentrat d'eau lacustre	12.0 ± 0.2
concentrat d'eau lacustre + Gly ₅	11.7 ± 0.2

Tableau 14 : $\log K_M^*$ à pH 9.0 pour les systèmes cuivre - ligands naturels et cuivre - ligands naturels - Gly₅

Pour les complexes du cuivre avec les ligands naturels, nous obtenons une valeur de $\log K_M^*$ (12.0) à pH 9.0 très proche de celle obtenue par P. Saccini et U. Suter¹⁰ (11.8).

Par rapport aux complexes du cuivre avec les ligands naturels dont la constante conditionnelle de formation à pH 9.0 est de $10^{12.0}$ (tableau 14), la stabilité des complexes peptidiques du cuivre est plus faible (tableau 13). Cela signifie que les peptides sont moins en mesure que les ligands naturels de concurrencer les ligands inorganiques présents dans les eaux pour complexer le cuivre.

Cela se vérifie parfaitement lors de l'adjonction de peptide aux ligands naturels. La constante conditionnelle mesurée pour le mélange de substances synthétiques et naturelles est nettement plus proche de la valeur de la constante conditionnelle des complexes cuivre - ligand naturel que de celle des complexes cuivre - peptide et cela malgré que la concentration du peptide soit deux fois plus élevée que celle des ligands naturels.

($10^{-5}M$ pour le peptide et $5.34 \cdot 10^{-6}$ pour les ligands naturels, la concentration en métal varie de $1-7 \cdot 10^{-7} M$, (voir chap. 7)).

Cela signifie qu'en présence des peptides et des ligands naturels, le cuivre se lie surtout aux ligands naturels, mais une quantification de cet effet est assez délicate à établir.

6.4. Conclusions

Dans la région de pH existant dans les eaux naturelles soit de 7 à 9, les formes peptidiques du cuivre les plus représentées sont les complexes $[Cu(H_2L)]$ et $[Cu(H_3L)]$.

Pour qu'un ligand organique puisse entrer en compétition de manière importante avec les ligands inorganiques présents dans les eaux, il doit nécessairement avoir une constante conditionnelle de formation des complexes avec le cuivre supérieure à 10^{10} à pH 8.0 [10]. Les mesures de constantes conditionnelles de formation des complexes du cuivre avec les polymères de la glycine indiquent que les peptides ne commencent à être des ligands compétiteurs valables vis-à-vis des ligands inorganiques (CO_3^{2-} , OH^-) qu'à des valeurs de pH supérieures à 9.0, ceci dans les conditions des concentrations existantes dans les systèmes naturels.

Par rapport aux complexes avec les ligands naturels présents dans les eaux, les complexes peptidiques du cuivre sont moins stables. (tableaux 13 et 14). Cela signifie qu'en présence simultanée de peptides et de ligands organiques naturels, le cuivre est surtout lié aux ligands naturels (tableau 14).

La variation de la constante conditionnelle de formation des complexes cuivre - peptide en fonction du pH n'est pas comparable à celle des complexes avec les ligands naturels (fig. 43). Une modification de la valeur du pH entraîne une plus grande variation de la constante K_M^* pour les peptides que pour les substances naturelles.

Nous pouvons donc postuler que les peptides ne sont pas a priori capables de complexer le cuivre de manière importante dans les conditions de pH et de concentrations existantes dans les eaux naturelles.

Les molécules organiques, responsables de la complexation du cuivre dans les milieux aquatiques, doivent vraisemblablement appartenir à d'autres groupes de substances, à moins que les peptides naturels ne :

- participent à la formation de complexes mixtes.
- possèdent des acides aminés ayant des groupements latéraux coordonnables (Asp, His).
- provoquent une variation de la constante diélectrique autour du site de fixation de par leur volume important.

Les peptides sont des ligands très spécifiques du cuivre et de nombreux complexes binaires cuivre - peptide ou complexes ternaires cuivre - peptide - ligand secondaire (exemple : acide aminé) existent dans les systèmes biologiques (voir chap. 1).

Etant donné que la matière humique se compose de polymères hétérogènes formés d'un squelette aromatique sur lequel sont fixés chimiquement ou physiquement des composés organiques comme des peptides, protéines, phénols, porphyrines ou polysaccharides, il n'est pas exclu d'imaginer la possibilité de formation de complexes mixtes entre le cuivre, des peptides ou protéines et des polymères organiques dérivés d'acides phénoliques, salicyliques ou phtaliques. Ces dernières substances sont souvent considérées comme modèles des acides humiques et fulviques.

Des recherches futures, développées dans ce courant d'idées pourront peut-être nous apporter des renseignements plus précis sur la nature des ligands organiques naturels responsables de la coordination du cuivre dans les milieux aquatiques.

7. PARTIE EXPERIMENTALE

7.1. Measures polarographiques

Les solutions suivantes ont été utilisées :

métal : $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-2}\text{M}$

ligands : $\text{Gly}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ dans $\text{NaHCO}_3 \cdot 10^{-1}\text{M}$

$\text{Gly}_5 \cdot 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ dans $\text{NaHCO}_3 \cdot 10^{-1}\text{M}$

$\text{Gly}_6 \cdot 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ dans $\text{NaHCO}_3 \cdot 10^{-1}\text{M}$

$\text{NTA} \cdot 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ dans $\text{NaHCO}_3 \cdot 10^{-1}\text{M}$

Concentrat d'eau lacustre (FC 100)

(cet échantillon a été mis à notre disposition par P. Baccini et a subi les traitements préliminaires cités dans [10])

2 ml de la solution de peptides ou de NTA ou 5 ml de de concentrat d'eau lacustre sont dilués à 20 ml avec du $\text{NaHCO}_3 \cdot 10^{-1}\text{M}$. Le pH de la solution est fixé à 9.0.

Cette solution de ligand contenue dans une cuve Metrohm thermostatée à 25°C est titrée par adjonction de portions de 10 - 100 μl de la solution de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ contenue dans une burette Mettler OV 201. Dans un milieu de $\text{NaHCO}_3 \cdot 0.1\text{M}$ à pH 9.0, les particules électroactives du cuivre présentes sont $\text{Cu}(\text{CO}_3)_n$ ($n = 1, 2$). Le potentiel de demi-vague des carbonato-complexes est d'environ -0.11 V.

La cellule électrochimique est équipée d'une électrode de mercure à gouttes tombantes, d'une électrode de platine et d'une électrode de référence au calomel.

Le tout est relié à un polarographe Par Model 174 (Princeton Applied Research Corp.) combiné avec un Omnigraphic 2000 Recorder

(Houston Instrument Corp.). La technique de mesure appliquée est la polarographie différentielle à impulsions.

7.2. Mesures d'absorption atomique

Les solutions suivantes sont utilisées :

métal	:	CuSO_4	10^{-5}M	
ligands	:	Gly_4	10^{-3}M	dans NaHCO_3 0.1M
		Gly_5	10^{-3}M	dans NaHCO_3 0.1M
		Gly_6	10^{-3}M	dans NaHCO_3 0.1M
		NTA	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$	dans NaHCO_3 0.1M

concentrat d'eau lacustre (FC 100)

4 séries différentes d'échantillons sont préparées. Chaque série comporte 7 tubes à essai rodés de 12 ml contenant 10 ml de NaHCO_3 0.1 M à pH 9.0 et une concentration de cuivre variant de $1 - 7 \cdot 10^{-7}\text{M}$. En plus, selon les cas, certaines séries contiennent un échangeur d'ion (Dowex 50 WX8, 100 - 200 mesh) et un ligand organique.

1. Série de calibration C : NaHCO_3 0.1 M + Cu^{2+} $1-7 \cdot 10^{-7}\text{M}$
2. Série inorganique D : C + résine (0.15 g)
3. Série de référence A : C + Résine (0.15 g) + $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$ NTA
4. Série organique X : C + Résine (0.15 g) + 10^{-5}M peptide
ou $5.34 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ligands naturels
ou le mélange des deux.

Les échantillons sont agités durant une nuit à 25°C . Après aédimentation de la résine, la concentration de cuivre de la phase liquide est mesurée par spectroscopie d'absorption atomique à

l'aide d'un appareil Perkin Elmer AAS 400 muni d'un four de graphite HGA 74. La mesure s'effectue à 325 nm.

Les pentes des droites obtenues en reportant l'absorption en fonction de la concentration en cuivre permettent de calculer les constantes conditionnelles. (voir [10]).

8. RESUME GENERAL

Dans les systèmes vivants tel l'homme, les associations cuivre - peptide et cuivre - protéine sont fréquentes. Il nous a semblé intéressant de voir si de telles associations existaient dans les eaux naturelles.

Dans la première partie de ce travail (chap. 3 et 4), nous étudions les propriétés thermodynamiques de complexes peptidiques du cuivre (II) dans le but de mieux comprendre l'influence d'une part de la longueur de la chaîne peptidique et d'autre part des substituants des peptides sur la stabilité des divers complexes formés. Des peptides de longueur de chaîne de 4 à 7 éléments ont été étudiés.

Dans les eaux naturelles, le pH varie entre 7 et 9. Dans ce domaine de pH, se sont surtout les espèces $[Cu(H_2L)]$ et $[Cu(H_3L)]$ qui existent. C'est pourquoi nos recherches se sont surtout portées sur une meilleure compréhension des facteurs influençant la formation du complexe $[Cu(H_3L)]$ à partir de $[Cu(H_2L)]$, sa stabilité et sa structure.

L'augmentation de la chaîne peptidique (passage de tétrapeptide à pentapeptide) stabilise fortement l'espèce $[Cu(H_3L)]$ (~ 1 unité log) une augmentation supplémentaire de la longueur de la chaîne peptidique ne paraît pas stabiliser d'avantage l'espèce $[Cu(H_3L)]$

La nature, le volume et la charge des substituants des peptides, essentiellement celui du 5ème acide aminé, ont une grande influence sur la stabilité du complexe $[Cu(H_3L)]$.

Le substituant de l'acide aminé en 5ème position déstabilise l'espèce $[Cu(H_3L)]$, s'il est de la configuration L, chargé et volumineux, ceci en présence de substituants $\neq H$ pour les quatre premiers acides aminés.

Pour expliquer la stabilisation de l'espèce $[Cu(H_3L)]$ pour des peptides > tétrapeptides, nous postulons la formation d'un cycle de chélation de 8 membres en position axiale du cuivre par coordination de la fonction carboxylique terminale (pentapeptide) ou de la 5ème fonction peptidique (hexapeptide). Le cycle de 8 membres est stabilisé par formation d'un pont hydrogène intramoléculaire entre les fonctions amine terminale et 4ème fonction peptidique. La formation de cette liaison hydrogène intramoléculaire est indispensable à la formation du cycle de chélation supplémentaire.

Dans la seconde partie de ce travail (chap. 6) nous étudions la capacité des peptides de complexer le cuivre en présence de ligands inorganiques, tels CO_3^{2-} et OH^- , aux conditions de pH et de concentrations existantes dans les eaux naturelles.

Les mesures effectuées montrent que les complexes peptidiques du cuivre ne peuvent entrer en compétition, de façon importante, avec les formes inorganiques du cuivre qu'à des pH supérieurs à 9.0. C'est alors la forme $[CuH_3L]$ qui est l'espèce prédominante.

Aux environs de pH 8.0, le fait de l'augmentation de la chaîne peptidique de 4 → 5 acides aminés (fig. 42) n'influence guère la répartition cuivre - organique / cuivre inorganique.

Dans le domaine de pH entre 7.0 et 9.0, la stabilité des complexes peptidiques du cuivre est plus faible que celle des complexes avec les ligands naturels^[10].

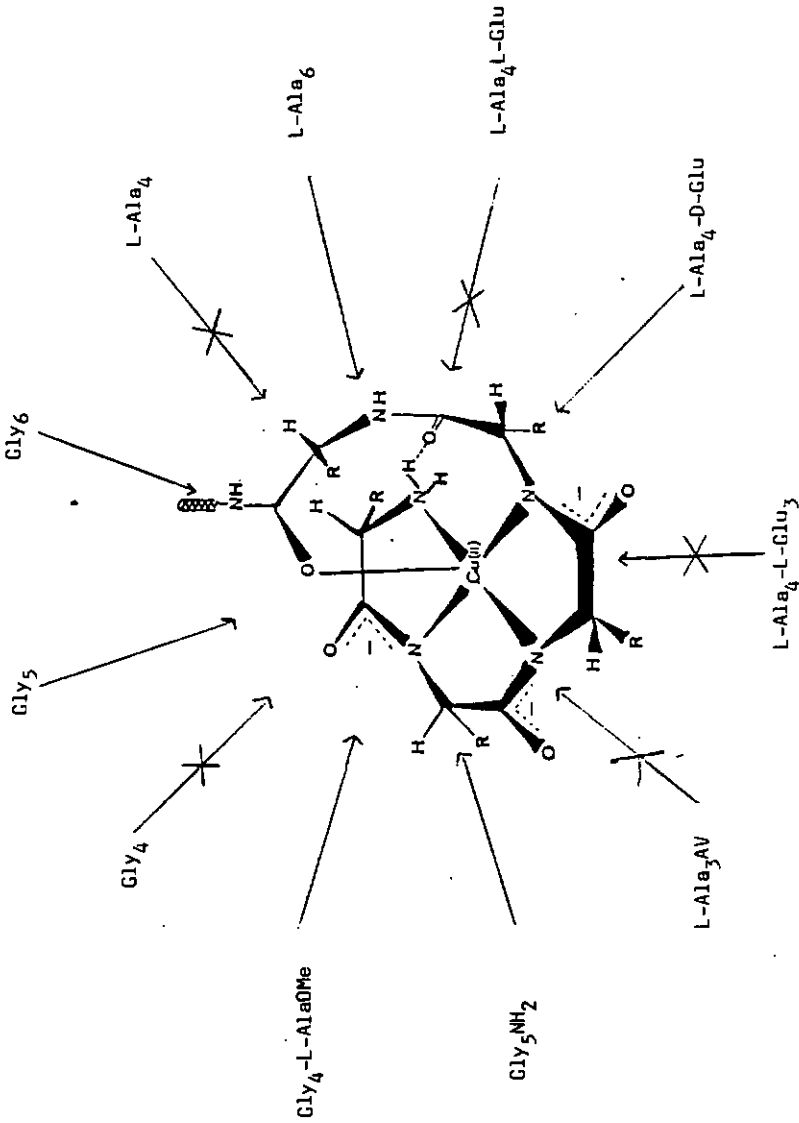
La variation de la constante conditionnelle de formation des complexes peptidiques du cuivre en fonction du pH n'est pas comparable à celle des complexes avec les ligands naturels.

Nous postulons que dans les conditions de pH et de concentrations existantes dans les eaux naturelles, les peptides ou du moins les

peptides à l'état pur, ne sont pas à priori capables de complexer le cuivre de façon prédominante.

Espèce	Form.	Gly ₄	Gly ₅	Gly ₆	L-Ala ₄	L-Ala ₆	L-Ala ₇	L-Ala ₈	L-Ala ₉	L-Ala ₁₀	L-Ala ₁₁	L-Ala ₁₂	L-Ala ₁₃	L-Ala ₁₄	L-Ala ₁₅	L-Ala ₁₆	L-Ala ₁₇	L-Ala ₁₈	L-Ala ₁₉	L-Ala ₂₀	
m h l		logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	logβmhl pka	
0 4 1	H ₄ L																				
0 3 1	H ₃ L																				
0 2 1	H ₂ L	11.16 3.18	11.21 3.25	11.22 3.25	11.45 3.42	11.50 3.50	12.78 4.70	15.95 3.17	16.03 3.12	18.19 4.61	22.39 4.20										
0 1 1	H L	7.98 7.98	7.96 7.96	7.97 7.97	8.03 8.03	8.00 8.00	8.08 8.08	8.08 8.08	8.08 8.08	8.18 8.18	8.18 8.18	7.86 7.86	7.84 7.84								
1 1 1	[CuHL]																				
1 0 1	[Cu L]	5.00 5.50	5.25 5.66	5.14 5.59	4.80 5.10	5.03 5.46	5.10 5.29	5.12 5.38	6.02 5.86	4.77 5.46	5.14 5.70	5.14 5.70									
1 -1 1	[CuHL]	-0.50 6.91	-0.41 7.02	-0.45 7.17	-0.30 7.46	-0.43 7.56	-0.19 7.47	-0.26 7.65	-0.16 7.41	-0.69 6.92	-0.56 6.91	-0.56 6.91									
1 -2 1	[CuHL]	-7.41 9.22	-7.43 8.02	-7.63 8.10	-7.76 8.99	-8.00 8.13	-7.68 9.09	-7.91 8.37	-7.25 9.01	-7.61 7.87	-7.47 7.97	-7.47 7.97									
1 -3 1	[CuHL]	-16.63	-15.45	-15.73	-16.75	-16.13	-16.77	-16.28	-16.24	-15.48	-15.42	-15.42									

Annexe 1 : Tableau général des constantes de stabilité des complexes peptidiques du Cu(II)



Annexe 2 Schéma récapitulatif des ligands permettant ou interdisant la formation d'un quatrième cycle de chélation en position axiale du métal pour le complexe [Cu(H₃L)]

BIBLIOGRAPHIE

- [1] U. Förstner, G.T.W. Wittmann, Metal Pollution in the Aquatic Environment, Springer-Verlag, 1979.
- [2] R. E. Rickerson, I. Geis, Chemistry, Matter and the Universe, W. A. Benjamin Inc., 1976.
- [3] R. B. Heald, P.L. Robinson, Chimie Inorganique, 3ème éd., Flammarion Sciences, 1973.
- [4] Handbook on the Toxicology of Metals, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979.
- [5] D. Perret, Thèse, Neuchâtel, (1980).
- [6] E. Frieden in Metal Ions in Biological Systems, Vol. 13, Ed. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y., 1981.
- [7] B. Sarkar in Metal Ions in Biological Systems, Vol 12., Ed. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y., 1981.
- [8] R.F. Jameson in Metal Ions in Biological Systems, Vol. 12, Ed. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y., 1981.
- [9] W. Stumm, J.J. Morgan, Aquatic Chemistry, 2ème éd., Wiley-Interscience, 1980.
- [10] P. Baccini, U. Suter, Schweiz. Z. Hydrol. 41/2, 291, (1979).
- [11] W. G. Sunda, P.J. Manna, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser, 93 147, (1979).
- [12] A. Kaneda, A.E. Martell, J. Coord. Chem., 4, 137, (1975).
- [13] A. Garnier, L. Tosi, Bioinorganic Chem., B, 493, (1978).
- [14] S. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, J. Biol. Chem., 249, 5878, (1974).
- [15] T.P.A. Kruck, S. Lau, B. Sarkar, Can. J. Chem., 54 1300, (1976).

- [16] S. Lau, B. Sarker, *Can. J. Chem.*, 53, 710, (1975).
- [17] D. W. Margerum, G.R. Dukes in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 1, Ed. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y., 1974.
- [18] C.R. Hartzell, F.R.N. Gurd, *J. of Biol. Chem.*, 244, 147, (1969).
- [19] J.J. Czarnecki, D.W. Margerum, *Inorg. Chem.*, 16, 1997, (1977).
- [20] A.E. Martell, M.D. Lim, *J.Coord. Chem.*, 4, 9, (1974).
- [21] M.R. Youngblood, K.L. Chellappa, C.E. Bannister, D.W. Margerum, *Inorg. Chem.*, 20, 1742, (1981).
- [22] Th. Bundi, Thèse, ETH Zürich, N° 6553, (1980).
- [23] I. Sayce, *Talanta*, 15, 1397, (1968).
- [24] D.D. Perrin, I.G. Sayce, *Talanta*, 14, 833, (1967).
- [25] D. Perret, G. Vuille, *Collection de programmes non publiés. Université de Neuchâtel*, (1981).
- [26] J.F. Blount, H.C. Freemann, R.V. Holland, G.J.W. Milbarn, *J. of Biol. Chem.*, 245, 5177, (1970).
- [27] H.C. Freeman, M.R. Taylor, *Acta Cryst.*, 18, 939, (1965).
- [28] E.J. Billo, *Inorg. Nucl. Chem. Lettera*, 10, 613, (1974).
- [29] K.W. Nickerson, N.F. Phelan, *Bioinorg. Chem.*, 4, 79, (1974).
- [30] M.M. Rising, *J. Biol. Chem.*, 92, 755, (1933).
- [31] G.F. Bryce, E.R.W. Gurd, *J. of Biol. Chem.*, 24, 1439, (1966).
- [32] C. Steinberg, *Arch. Hydrobiol./suppl.*, 53, 48, (1977).
- [33] P. Baccini, *Résultats non publiés*, (1982).
- [34] M.E. Allen, W.R. Matson et K.M. Nancy, *J. Wat. Pollut. Control. Fad.*, 42, 573 (1970).
- [35] J. Dalas, *Ann. Agron.*, 18, 17, (1967).

- [36] J.H. Reuter, E.M. Perdue, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 41, 325, (1977).
- [37] R.D. Haworth, *Soil Science*, 111, 71, (1971).
- [38] B.A. Goodmann, M.V. Cheshire, *J. of Soil Science*, 27, 377, (1976).
- [39] A.L. Abdul-Halim, J.C. Evans, C.C. Rowlands, J.H. Thomas, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 481, (1981).
- [40] I.R. Jonasson in the *Fluvial Transport of Sediment - Associated Nutrients and Contaminants*, I.J.C./PLUARG. H. Shear, A.E.P. Watson (eds.), Windsor/ont, 1977.
- [41] J. Buffle, P. Oeladoey, F.L. Greter, W. Hardi, *Anal. Chim. Acta*, 116, 255, (1980).
- [42] R.F.C. Mantoura, J.P. Riley, *Anal. Chim. Acta*, 78, 193, (1975).
- [43] C.M.G. Van den Berg, J.R. Kramer, *Anal. Chim. Acta*, 106, 113, (1979).
- [44] J. Buffle, *Anal. Chim. Acta*, 118, 29, (1980).
- [45] H. Kessler, et al, *Chem. Ber*, 111, 1029, (1978).
- [46] R.A. Boisaonaa, S.I. Guttman, P.A. Jaquenoud, J.P. Waller, *Helv. Chim. Acta*, 39, 1421, (1956).
- [47] J.R. Tuschall, Jr, P.L. Brezonik, *Limnol. Oceanogr.* 25, 495, (1980).
- [48] P. Baccini, Colloque "Protection des eaux", 1978.