

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**STEREOCHIMIE ET STABILITE DE COMPLEXES
MIXTES DU CUIVRE (II) AVEC L'ACIDE
N-(2-HYDROXY, 3-METHOXYBENZYL)-(S)-ASPARTIQUE
ET DIFFERENTS LIGANDS UNI- ET BIDENTES
REACTIVITE DU SYSTEME
EN PRESENCE D'OXYGENE MOLECULAIRE**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

Anne Ecabert-Brandt
biochimiste diplômée
de l'université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Stéréochimie et stabilité de complexes mixtes du cuivre(II)
avec l'acide N-(2-hydroxy,3-methoxy-benzyl)-(s)-aspartique
et différents ligands uni- et bidentés. Réactivité du
système en présence d'oxygène moléculaire.

de M^{me} Anne Ecabert-Brandt

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

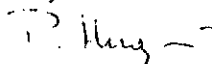
Messieurs les professeurs K. Bernauer,

P. Baccini et S. Fallab (Bâle)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 4 juillet 1977

Le doyen :



P. Huguenin

A mon mari

à mes parents

Remerciements

Ce travail a été effectué de novembre 1972 à mai 1977 dans les laboratoires de chimie inorganique de l'Université de Neuchâtel.

La maison CIBA-GEIGY m'a accordé une bourse de 1972 à 1975, je tiens à l'en remercier.

J'exprime d'abord ma reconnaissance à mon directeur de thèse, M. le prof. BERNAUER, pour la confiance et la patience dont il a toujours fait preuve à mon égard. Je le remercie également pour son constant soutien et pour les judicieux conseils qu'il m'a donné tout au long de ce travail.

Ma gratitude va aussi à M. le prof. BACCINI. Son intérêt et sa participation active, spécialement dans le domaine des calculs à l'ordinateur, m'ont été précieux.

Je remercie MM. les prof. FALLAB et BACCINI d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Je dis un très grand merci à tous mes collègues du département pour leur amitié et leur galanterie, à tous les étudiants et apprentis -en particulier à M. H. PIQUEREZ-, à Chloé Jeanneret pour son travail dactylographique, à mon mari pour son entrain et sa bonne humeur jamais démentis ainsi que pour sa précieuse collaboration artistique, enfin à tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES

	page
Abréviations	-
1. Introduction	1
1.1. La chimie de coordination du cuivre	1
1.2. Le rôle du cuivre dans les systèmes naturels	3
1.2.1. Le transport du cuivre	4
1.2.2. Le cuivre et l'oxygène	5
1.2.3. Les modèles et leurs limites	7
1.3. But du travail	7
2. L'acide N-(o-hydroxybenzyl)aspartique et ses dérivés	9
2.1. Synthèses	10
2.2. Calcul des constantes de dissociation de (S)-Vasp	13
3. Stabilité et structure du complexe [Cu(S)-Vasp] ⁻	19
3.1. Détermination de la constante K_{ML}^{MHL} à l'aide de mesures spectrophotométriques	22
3.2. Détermination de la constante K_{MHL}^M à l'aide de la courbe de titration acidimétrique et de K_{ML}^{MHL}	24
3.3. Calcul de la constante K_{ML}^M	25
3.4. Les hydroxycomplexes [CuLOH] ²⁻ et [CuL(OH) ₂] ³⁻	25
3.4.1. Détermination de la constante K_{MLOH}^{ML}	27

3.5. Structure de $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$	28
3.5.1. $S_N, R_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ et $[\text{CuHBIDA}]^-$	29
3.5.2. Discussion	31
4. Stéréosélectivité et structure des complexes mixtes $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$	35
4.1. Stéréosélectivité et complexes mixtes	35
4.2. Détermination des constantes de formation K_{MLL}^{ML} des complexes mixtes	36
4.2.1. $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{imidazole})]^-$	37
4.2.2. $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{S})\text{-histidine}]^{2-}$, $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{histamine})]^-$, $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{N}\alpha\text{ac}\acute{\text{e}}\text{t}\text{y}\text{l}(\text{S})\text{-histidine})]^{2-}$	41
4.2.3. $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{S})\text{-phénylalanine}]^{2-}$, $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{S})\text{-valine}]^{2-}$	51
4.2.4. Conclusions	52
4.3. Composition du système $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$	52
4.3.1. Discussion	52
4.4. Stéréosélectivité de $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$	
4.4.1. Discussion	57
4.5. Structures des complexes mixtes $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$	60
4.5.1. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspIm}]^-$	61
4.5.2. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{S})\text{-His}]^{2-}$	61
4.5.3. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{R})\text{-His}]^{2-}$	65
4.5.4. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspHist}]^-$	66
4.5.5. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{N}\alpha\text{ac}(\text{S})\text{-Nis})]^{2-}$	66
4.5.6. $S_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{S})\text{-}, (\text{R})\text{-L}']^{2-}$	67
4.6. Tableau récapitulatif : constantes de stabilité de $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ et $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$	68

5. Réactivité du système $[\text{CuLL}']^{n-}$ en présence d'oxygène moléculaire	69
5.1. Introduction	69
5.1.1. La molécule d'oxygène	69
5.1.2. Réactions d'oxydation non-enzymatiques catalysées par le Cu(II)	70
5.2. Observations générales	74
5.3. Cinétiques au spectrophotomètre	75
5.3.1. Essais d'orientation	75
5.3.2. Influence du ligand secondaire	77
5.3.3. Réactivité du système avec l'histidine	81
5.3.4. Bilan	85
5.4. La période d'induction	87
5.4.1. Rôle de H_2O_2	88
5.4.2. Rôle de l'oxygène	88
5.4.3. Rôle du ligand secondaire	89
5.5. Mécanisme réactionnel	92
5.5.1. Discussion	92
5.6. Conclusions	95
6. Partie expérimentale	97
Résumé	99
Bibliographie	101

Abréviations

Les abréviations utilisées pour nos ligands sont données au chapitre 2. page 9.

Autres ligands :

HBIDA	acide N-(o-hydroxybenzyl)iminodiacétique
IDA	acide iminodiacétique
AMA	acide aspartique-N-monoacétique
NTA	acide nitrilotriacétique
Asp	acide aspartique
Phe	phénylalanine
Val	valine
His	histidine
N α ac-His	N α acétylhistidine
Hist	histamine
Im	imidazole
aa	acide aminé

Complexes :

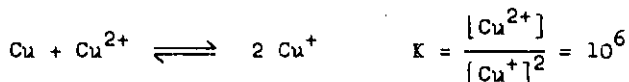
$[CuL'L']^{n-}$	complexe mixte, L représente le ligand principal, L' le ligand secondaire
$[Cu(HL)L']^{n-}$	complexe mixte dans lequel le groupe phénol n'est pas coordonné

1. INTRODUCTION

=====

1.1. La chimie de coordination du cuivre [1],[2]

La stabilité relative des complexes du Cu(I) et du Cu(II) dépend fortement de la nature des ligands présents et du solvant. En solution aqueuse le Cu(I) est très instable:



Cette instabilité du Cu(I) dans l'eau est due principalement à la grande énergie d'hydratation du Cu(II). Le Cu(I) peut être stabilisé en solution aqueuse par des ligands tels que CN^- , I^- , R_2S ou par formation de composés insolubles (CuCl , CuCN). La chimie aqueuse du cuivre traite donc surtout les composés du Cu(II).

Le Cu(II) a une configuration électronique $3d^9$ et subit une distorsion (effet Jahn-Teller) lorsqu'il est placé dans un environnement de symétrie cubique (c'est-à-dire dans un octaèdre ou un tétraèdre), ce qui a une grande influence sur la stéréochimie de cet élément.

Lorsque le Cu(II) est hexacoordonné, la structure octaédrique est fortement déformée ; une elongation le long d'un axe C_4 aboutit à un plan équatorial contenant 4 liaisons courtes CuL_4 et à 2 liaisons longues, axiales.

A la limite on arrive à des structures pyramidale planaire ou planaire. Une autre structure fréquente dans les complexes de Cu(II) est le tétraèdre déformé.

Selon la classification de Pearson, le Cu(II) ne peut être considéré ni comme un métal dur, formant des

liaisons essentiellement électrostatiques, ni comme un métal mou formant des liaisons de type covalent. Il possède un caractère intermédiaire et son affinité croît dans le sens $\text{RNH}_2 > \text{RON} > \text{RCOO}^-$.

Dans un complexe de Cu(II), à cause de la déformation de la structure octaédrique, les différentes positions autour de l'atome central ne sont pas équivalentes. Les groupes chélatants contenant un atome d'azote (N-amino, N-imidazole, N-peptidique) seront de préférence contenus dans le plan formant les liaisons courtes avec le métal. Les positions axiales, si le Cu(II) est penta- ou hexacoordonné sont occupées par des atomes d'oxygène (carboxylate, H_2O).

Un intéressant article de revue de J. Gazo et al [3] traite de la "plasticité" (c'est-à-dire de la non-rigidité) de la sphère de coordination du Cu(II) à l'état solide.

En comparant les valeurs de R_S (liaisons dans le plan équatorial) et de R_L (liaisons axiales) de nombreux complexes du type CuO_6 , CuN_6 et CuN_4O_2 dont les structures ont été déterminées par rayons X, les auteurs ont pu montrer qu'il existe une corrélation entre les variations des distances interatomiques équatoriales et axiales dans les complexes de Cu(II): une élongation des liaisons R_S produit une diminution des liaisons R_L .

On vérifie aussi que dans les complexes du type CuN_4O_2 l'oxygène est toujours le coordinaat le plus éloigné.

La "plasticité" de la sphère de coordination du Cu(II) est mise en évidence par la découverte d'isomères de distorsion qui diffèrent essentiellement par la longueur des liaisons interatomiques Cu(II)-ligand.

La structure détaillée de plusieurs isomères de distorsion est indiquée, par exemple: α - et β - $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2\text{X}_2]$ où $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, -\text{NCS}$; α - et β - $[\text{Cu}(\text{NH}_2\text{NCONH}_2)_2\text{Cl}_2]$; α - et β - $[\text{CuL}_2\text{Cl}_2]$ où $\text{L} = 3$ - (ou 4-) picoline-N-oxyde,

2,6-lutidine-N-oxyde.

L'interconversion de ces isomères dépend de la température et de la pression ; α - et β -[Cu(NH₃)₂(NCS)₂] évoluent spontanément au cours du temps, aboutissant à une espèce de structure intermédiaire.

La "plasticité" de la sphère de coordination du cuivre lui donne la possibilité de s'adapter aux ligands qui l'entourent en passant de façon continue de la structure octaédrique à des structures tétragonale bipyramidale, pyramidale planaire ou planaire.

1.2. Le rôle du cuivre dans les systèmes naturels [2],[4],[7]

Le cuivre, de même que le fer, est à la fois indispensable et toxique pour de nombreux systèmes biologiques, y compris l'homme. L'action biologique du cuivre s'effectue généralement en association avec certaines protéines spécifiques: les "cuproprotéines". Elles prennent part à plusieurs processus métaboliques tels que hydroxylation, transport d'oxygène, transfert d'électrons, catalyse oxydative. Les réactions de transfert d'électrons des "cuproprotéines" sont favorisées par le bas potentiel redox du Cu(I) ; pour les réactions avec l'oxygène, le couple Cu(I)-Cu(II) est beaucoup plus favorable que tout autre couple redox de la série des métaux de transition.

La "cuproprotéine" la plus abondante dans le plasma sanguin est la céruloplasmine, sa véritable fonction est encore inconnue. Elle permet de stocker le cuivre et a une faible activité oxydative.

Certaines "cuproprotéines" (céruloplasmine, laccase) contiennent plusieurs atomes de cuivre par molécule, on y distingue 3 types de cuivre :

- type 1 le Cu(II) bleu, caractérisé par une absorption intense à 600 nm (10 à 100 fois plus grande que dans un complexe de faible PM) qui serait due à l'environnement particulier du Cu(II) (structure tétraédrique déformée).
- type 2 le Cu(II) non bleu aux propriétés spectroscopiques comparables à celles des complexes de faibles PM.
- type 3 le cuivre "non détectable par epr" : couple $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^{+}$ non paramagnétique fonctionnant comme système redox donneur-accepteur de 2 électrons.

Parmi les protéines possédant un seul atome de cuivre par molécule, certaines contiennent le Cu(II) bleu du type 1 (azurine stellacyanine) d'autres un Cu(II) non bleu n'ayant pas toujours les mêmes propriétés chimiques que le Cu(II) de type 2 ("non blue oxidases"). Plusieurs articles de revue ont été consacrés à ce sujet, les plus récents sont ceux de R. Malkin [4] et J.A. Fee [8].

1.2.1. Le transport du cuivre [2]

La biosynthèse des "cuproprotéines" et le transport du Cu(II) jusqu'à l'intérieur des cellules sont encore mal connus.

Le cuivre absorbé est lié par l'albumine dans un rapport 1:1. In vivo la vitesse d'échange du Cu(II) lié à l'albumine est assez grande. On pense actuellement que le cuivre est transféré de l'albumine aux apoprotéines via des complexes Cu(II) acides aminés par formation d'un complexe ternaire Cu(II)albumine-acide aminé.

Le Cu(II) forme avec les acides aminés des complexes beaucoup plus stables que les autres ions métalliques présents dans le milieu physiologique. En milieu neu-

tre, les complexes mixtes du type Cu(A)B avec des acides aminés prédominent les plus stables étant formés avec l'histidine et un autre acide aminé. Le rôle important joué par l'histidine dans le métabolisme du cuivre a suscité de nombreux travaux. (Nous en parlerons de façon plus détaillée au chapitre 4).

1.2.2. Le cuivre et l'oxygène

Les réactions avec l'oxygène catalysées par des métalloenzymes sont nombreuses et variées dans les systèmes naturels. On peut les diviser en 2 classes principales: [5],[6]

- A O₂ entre dans le substrat: réaction d'insertion
- B O₂ sert d'agent oxydant et est réduit en H₂O₂ ou H₂O selon la nature du substrat et les conditions de la réaction: "non insertion reaction"

On peut encore partager A et B en 2 sous-classes:

- A₁ insertion totale: les 2 atomes d'oxygène sont liés au substrat (dioxigenases)
- A₂ insertion partielle: rupture de la liaison O=O, un atome d'oxygène entre dans le substrat pour former un groupe hydroxyle, l'autre est réduit en H₂O (mono oxygénases ou hydroxylases et "MFO": "mixed function oxidase")
- B₁ O₂ est réduit en H₂O₂ (oxydases)
- B₂ O₂ est réduit en H₂O (oxydases)

Dans le tableau 1.2.2. nous donnons une liste de quelques "cuproprotéines" pouvant réagir avec l'oxygène, classées selon leur mode d'interaction avec ce dernier, nous indiquons le rôle joué par le métal lorsqu'il est connu [5],[6].

Tableau 1.2.2

Type de réaction avec O ₂	Cuproprotéines	Activité et fonction, rôle du cuivre
A ₂	Phénol oxydases	Hydroxylation de monophénol en position ortho
	Tyrosinase	Hydroxylation de la tyrosine
B ₁	Uricase	Acide urique → allantofine Cu(II) ne change pas de valence
	Amino-acides oxydases	Acide aminé → cétoacide + NH ₃ Cu(II) ne change pas de valence (coenzyme pyridoxalphosphate)
	Acide ascorbique oxydase	Ac. ascorbique → acide déhydroascorbique Cu(I) ⇌ Cu(II) oxydation de diphénol en quinone
B ₂	Laccase	Cu(I) ⇌ Cu(II)
	Céruloplasmine	

Pour tenter de comprendre les mécanismes réactionnels des différents types de réactions de l'oxygène avec les métalloenzymes de nombreux modèles ont été élaborés.

1.2.3. Les modèles et leurs limites

Les protéines en solution se présentent sous l'aspect d'une sphère plus ou moins déformée, ayant un volume intérieur hydrophobe nécessaire à l'activité catalytique de la molécule et une couche externe occupée par les résidus polaires en contact avec le solvant. Un modèle de faible poids moléculaire, même s'il a une structure analogue à celle du centre actif de l'enzyme n'aura qu'une faible activité catalytique. Il indiquera de façon générale comment la protéine interagit avec le métal, il ne nous donne pas de renseignements sur la dynamique de la réaction enzymatique. Cependant, l'interprétation des résultats est moins ambiguë que pour une macromolécule et on retrouve dans les modèles de faible PM toutes les propriétés des ions métalliques dans les systèmes biologiques.

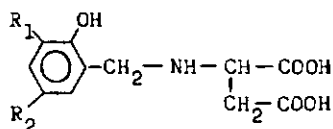
1.3. But du travail

Le but initial était l'étude de la stabilité et de la stéréosélectivité de complexes mixtes comprenant un ligand tétradenté présentant un groupe phénolate et un acide aminé.

Lors de mesures effectuées sur ces complexes avec le cuivre comme métal, nous avons observé qu'une réaction d'oxydation avec O_2 se déroulait en milieu basique. Il nous a paru intéressant d'étudier cette réaction plus en détail, en relation avec l'activité biologique du ion Cu^{2+} .

2. L'ACIDE N-(o-HYDROXYBENZYL)ASPARTIQUE ET SES DERIVES
 =====

Nous avons choisi une série de ligands tétradentés comportant un groupe phénol dont les positions ortho et para sont diversement substituées:



$R_1=R_2=H$; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$; $R_1=R_2=Br$

Ces ligands sont obtenus par condensation de la salicylaldéhyde, ou de l'un de ses dérivés, avec l'acide aspartique (Asp) puis réduction de la base de Schiff formée.

Nous emploierons les abbréviations suivantes:

$R_1=R_2=H$ Sasp (de salicylald-asp)

$R_1=OCH_3, R_2=H$ Vasp (de o-vanilline-asp)

$R_1=R_2=Br$ 3,5 diBrSasp

Parmi les ligands tétradentés on distingue 4 types structuraux selon l'arrangement des atomes coordonneurs [9] :



A

linéaire



B

bifurqués



C



D

(macro)cyclique

Le Vasp est du type structural C :

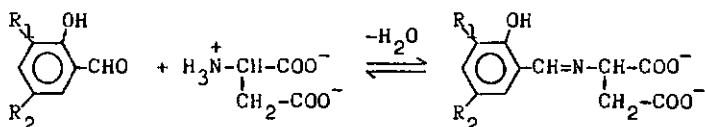
- la configuration absolue du carbone asymétrique au point de bifurcation est S. ((S)-Vasp) lorsqu'il est coordonné avec un métal
- les 3 atomes coordinateurs voisins de la bifurcation ne peuvent être arrangés que de manière faciale
- l'atome d'azote devient un centre de chiralité et peut être de configuration R ou S

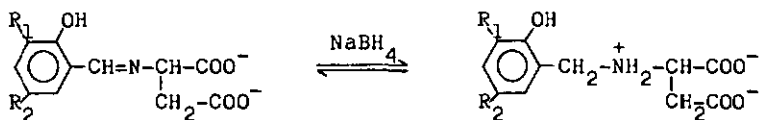
W.A. Harris et al. [10] ont synthétisé et étudié les propriétés de ligand de l'acide N-(o-hydroxybenzyl) iminodiacétique (HBIDA). Ce ligand tétradenté possède les mêmes atomes coordinateurs que le (S)-Vasp, mais il est du type structural B. Le mode de coordination de (S)-Vasp et HBIDA est identique avec des métaux tels que Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} mais diffère pour le Cu^{2+} . La fixation du groupe phénol sur ce métal est favorisée dans le cas de (S)-Vasp.

Nous discuterons au chapitre 3 de cette différence d'affinité du Cu(II) pour le phénol selon les positions de coordination possible de ce dernier, en relation avec l'arrangement autour du métal des unités iminodiacétique (IDA) ou Asp.

2.1. Synthèses

2.1.1. Equations





2.1.2. Modes opératoires : Sasp et Vasp

Nous procédons par analogie d'après P. Quitt et al [11]. Dissoudre 0,1 mol d'acide aspartique dans 100 ml de NaOH 2 N, ajouter 0,1 mol de salicylaldéhyde (Sasp) ou d'o-vanilline (Vasp). Agiter jusqu'à ce que la solution soit homogène (30-60 min). Refroidir le mélange réactionnel à environ 10°C avec un mélange glace/eau. Ajouter par petites portions 0,030 mol de NaBH₄ en maintenant la solution entre 10 et 15°C. Après l'addition agiter pendant 30 minutes. Répéter le procédé avec une nouvelle portion de 0,030 mol de NaBH₄. Agiter encore pendant 2 à 3 heures. Laver à l'éther pour éliminer la salicylaldéhyde qui n'aurait pas réagi. Amener à pH 2 avec HCl conc. pour précipiter le Sasp (ou le Vasp). Laver le précipité à l'eau froide, sécher.

Rendement

80-90% (Sasp) ; 70% (Vasp)

Purification

Recristallisation des produits dans un mélange H₂O-éthanol environ 2:1, amené à pH 2 avec HCl conc. Pour dissoudre 5 g de Sasp, il faut environ 120 ml de solvant, pour 5 g de Vasp environ 540 ml, à 40-50°C.

Laisser cristalliser plusieurs jours au frigo. Après 3 à 4 recristallisations on obtient des produits de pureté > 99% (titration)

Analyses C,H,N

	C [%]	H [%]	N [%]
(S)-Sasp trouvé	55,03	5,63	5,70
calculé	55,20	5,54	5,80
(S)-Vasp trouvé	53,76	5,49	5,50
calculé	53,60	5,57	5,22

3,5 diBrSasp

La 3,5 dibromosalicylaldéhyde n'étant pas soluble dans l'eau, nous avons dû modifier légèrement la méthode de synthèse.

Dissoudre $7,5 \cdot 10^{-3}$ mol de 3,5 dibromosalicylaldéhyde dans 50-60 ml d'éthanol en chauffant si nécessaire. Préparer une solution de $7,5 \cdot 10^{-3}$ mol d'acide aspartique dissous dans 15 ml de NaOH 0,5 N, l'introduire au moyen d'une ampoule à brome, goutte à goutte, dans le mélange réactionnel (éviter la formation de précipité). Continuer la synthèse d'après le mode opératoire de Sasp et Vasp.

Rendement

40%

Purification

Recristallisation dans l'éthanol, le produit étant très peu soluble dans l'eau. Après une recristallisation on obtient un produit de pureté $\geq 99\%$ (titration)

Remarque

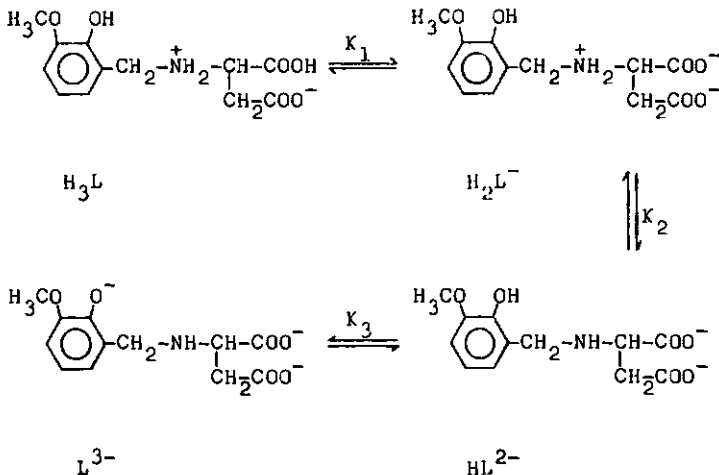
La base de Schiff obtenue n'est pas stable et ne peut être isolée. Dans notre cas on obtient de meilleurs

rendements en réduisant la double liaison C=N- par NaBH₄ plutôt que par hydrogénation catalytique. Pour les mesures concernant le système [CuLL']ⁿ⁻ à l'équilibre (titrations acidimétriques et spectrophotométriques) nous avons travaillé uniquement avec le Vasp synthétisé à partir de l'acide (S)-aspartique, soit le (S)-Vasp.

Pour les cinétiques se rapportant à la réactivité du système en présence d'oxygène nous avons utilisé aussi le 3,5 diBr(S)-Sasp.

2.2. Calcul des constantes de dissociation de (S)-Vasp

Dans l'eau le (S)-Vasp forme un "zwitterion" et peut libérer 3 protons selon les équilibres suivants :



La courbe de titration du (S)-Vasp (cf. fig.1) présente bien 2 sauts après adjonction du premier puis du deuxième équivalent de base (la dissociation du troisième

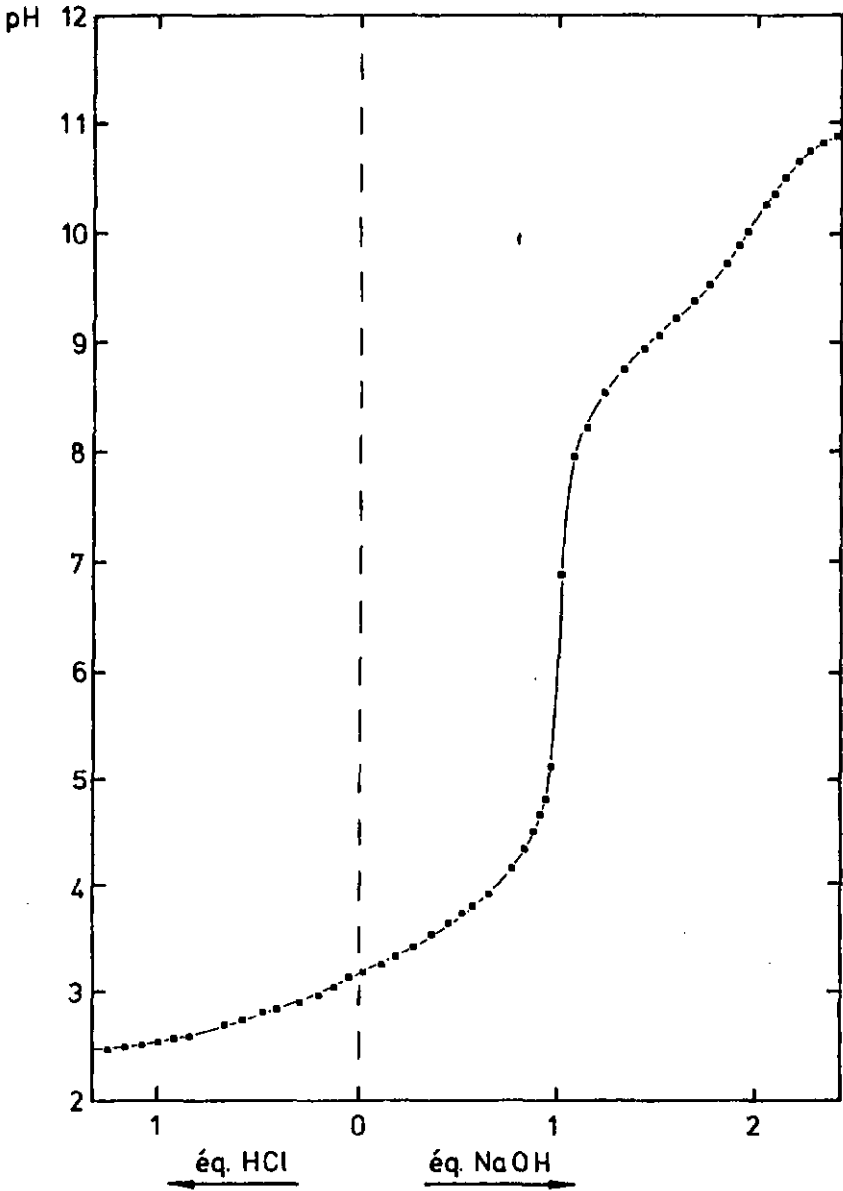


Fig.1 Titration acidimétrique de (S)-Vasp

proton a lieu à pH trop élevé pour être visible).

2.2.1. Conditions de mesures

Toutes les titrations acidimétriques de ce travail ont été effectuées dans une cuve Metrohm thermostatée à $25,0 \pm 0,1$ °C, sous atmosphère d'azote et à force ionique constante ($\text{KNO}_3 \approx 0,15$ M).

Nous avons utilisé un pH mètre Radiometer PHM64 et une électrode de verre combinée Radiometer GK 2301 C.

Le calibrage de l'électrode est effectué à l'aide d'une solution 0,05 M de biphtalate de potassium p.a. Merck, pH = 4,005 à 25°C et d'une solution tampon phosphate 0,025 M, pH = 6,865 à 25°C (3,388 g KH_2PO_4 et 3,533 g Na_2HPO_4 p.a. Merck dissous dans 1 litre d'eau distillée, dégazée).

2.2.2. Préparations des solutions

Les solutions ont toujours été préparées par pesée exacte de la quantité de produit désirée et dissolution à un volume connu dans un ballon jaugé.

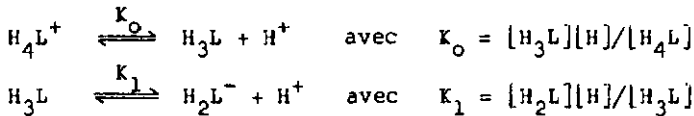
2.2.3. Mesures

(S)-Vasp	$3,750 \cdot 10^{-3}$ M	20 ml	détermination
KNO_3	2 M	2 ml	de
H_2O		5 ml	K_2 et K_3
titré par NaOH 0,0841 N			

(S)-Vasp	$3,750 \cdot 10^{-3}$ M	40 ml	détermination
KNO_3	4 M	2 ml	de
H_2O		5 ml	K_0 et K_1
titré par HCl 0,189 N puis par NaOH 0,100 N			

2.2.4. Détermination de K_1

En milieu acide il faut encore tenir compte de la formation de H_4L^+ par protonation du deuxième groupe carboxylate du ligand. Nous avons donc les équilibres suivants :



Par souci de simplification d'écriture nous omettons les charges dans les équations mathématiques.

K_0 et K_1 étant relativement proches, nous avons employé la méthode graphique de G. Schwarzenbach [12] pour calculer les constantes de dissociation d'un diacide ayant des pK voisins.

Nous obtenons :

$$\underline{K_0 = 1,82 \cdot 10^{-2}}$$

$$\underline{K_1 = 2,61 \cdot 10^{-4}}$$

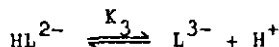
2.2.5. Détermination de K_2

$$K_2 = \frac{[HL][H]}{[H_2L]} = \frac{[H] \cdot a}{1-a} \quad \text{où } a = \text{degré de neutralisation}$$

Nous obtenons :

$$\underline{K_2 = 1,12 \cdot 10^{-9}}$$

Remarque: on constate une augmentation des valeurs à partir de $a > 0,6$ due au fait que HL est un ampholyte. Les valeurs de pH avant le deuxième point d'équivalence sont donc abaissées par le début de la dissociation :



2.2.6. Détermination de K_3

$K_3 = [H][L]/[HL]$ il faut tenir compte ici :

- de l'hydrolyse de [L]

- de la dissociation du deuxième proton

ce qui nous donne pour le calcul de K_3 les relations suivantes :

$$K_2 = [HL][H]/[H_2L]$$

$$c = [H_2L] + [HL] + [L]$$

$$[Na] = [L] - [H_2L] + [OH] = c.a$$

où c = concentration totale en ligand

et a = degré de neutralisation

d'où l'on tire :

$$K_3 = \frac{[H] \cdot ([H]/K_2(c(a+1) - [OH]) + c.a - [OH])}{c(1-a) + [OH]}$$

Nous obtenons :

$$\underline{K_3 = 4,60 \cdot 10^{-12}}$$

Le tableau 2.2 donne un résumé des valeurs obtenues pour les constantes de dissociation de (S)-Vasp. A titre de comparaison nous indiquons, entre parenthèses, les valeurs des constantes de dissociation correspondantes de l'acide aspartique tirées de [15].

Il faut remarquer l'abaissement du pK_2 (groupe amino) de (S)-Vasp par rapport à celui de Asp. Un effet identique a été constaté entre les pK des groupes amino de HBIDA et IDA par [10].

Tableau 2.2

(S)-Vasp	Ac. aspartique [15]
$K_0 = 1,82 \cdot 10^{-2}$	$(1,15 \cdot 10^{-2})$
$K_1 = 2,61 \cdot 10^{-4}$	$(1,95 \cdot 10^{-4})$
$K_2 = 1,12 \cdot 10^{-9}$	$(2,34 \cdot 10^{-10})$
$K_3 = 4,60 \cdot 10^{-12}$.

Il semble que la possibilité de formation d'une liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle du phénol et le groupe amino stabilise la forme déprotonée de celui-ci.

3. STABILITE ET STRUCTURE DU COMPLEXE [Cu(S)-vasp]⁻ =====

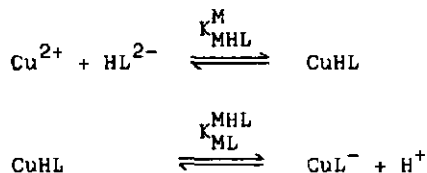
La courbe de titration acidimétrique d'un mélange Cu²⁺/(s)-Vasp 1:1 présente un seul saut après adjonction de trois équivalents de base indiquant que le groupe phénol est fortement coordonné au métal (cf. fig.2).

Une détermination directe de la constante de formation globale du complexe : $K_{ML}^M = [CuL]/[Cu][L]$

correspondant à l'équilibre : $Cu^{2+} + L^{3-} \rightleftharpoons CuL^-$ selon la méthode employée par G. Colomb [13], n'est pas possible ; les valeurs obtenues ainsi pour K_{ML}^M ne sont pas constantes.

Une titration spectrophotométrique du complexe 1:1 permet d'estimer l'ordre de grandeur de la constante de dissociation $K_{ML}^{MHL} = [CuL][H]/[CuHL]$, à partir de laquelle on peut calculer $K_{MHL}^M = [CuHL]/[Cu][HL]$ soit la fixation de l'unité Asp sur le métal, et enfin K_{ML}^M .

La détermination de K_{ML}^M s'effectue donc en plusieurs étapes en considérant les équilibres successifs :



où [CuHL] représente le complexe avec le groupe phénol protoné, non coordonné au métal,
 et [CuL]⁻ le complexe avec le groupe phénol coordonné.

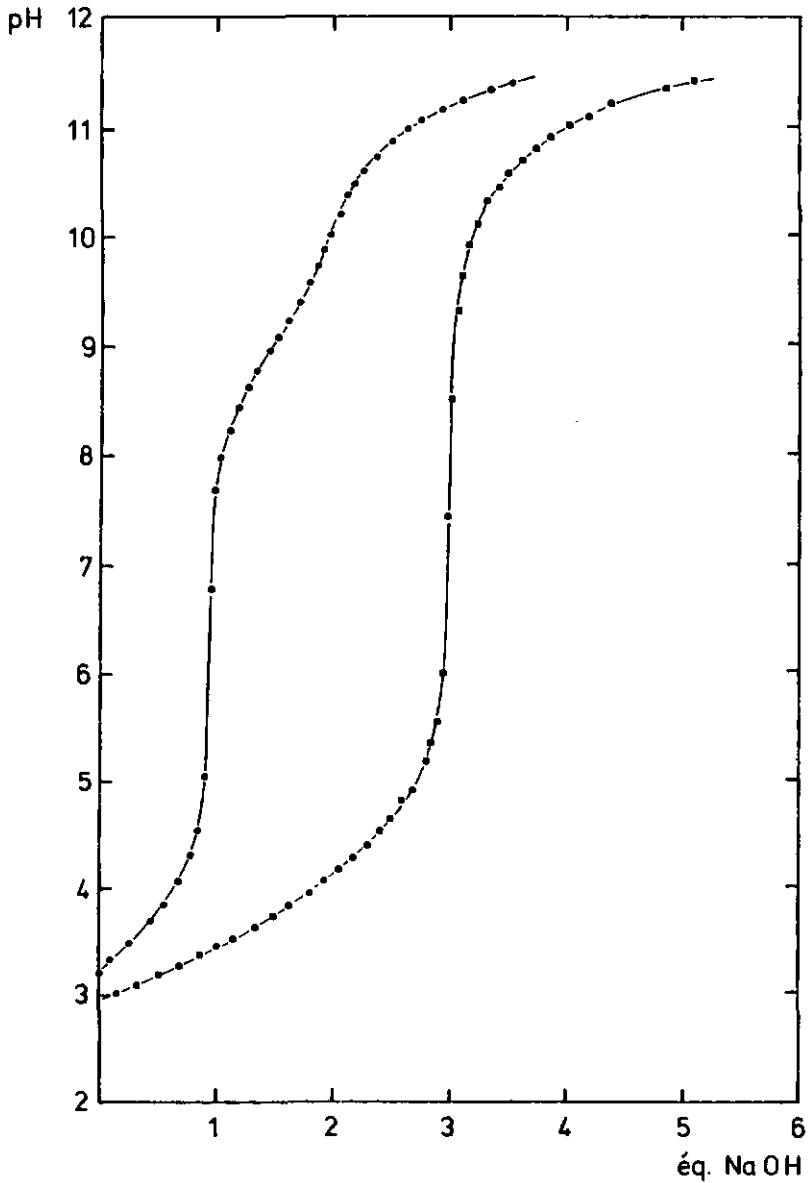


Fig.2 Titrations acidimétriques

• (S)-Vasp • Cu²⁺, (S)-Vasp

Conditions de mesures cf. 2.2.1

Solutions

(S)-Vasp		$3,75 \cdot 10^{-3}$ M	
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	(p.a. Merck)	$7,50 \cdot 10^{-2}$ M	(titration acidimétrique)
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	(p.a. Merck)	$1,25 \cdot 10^{-2}$ M	(titration spec- trophotométrique)

Mesures

(S)-Vasp	20 ml	$3,75 \cdot 10^{-3}$ M	
Cu ²⁺	1 ml	$7,50 \cdot 10^{-2}$ M	(titration acidimétrique)
KHO ₃	2 ml	2 M	
H ₂ O	5 ml		

titré par NaOH 0,0841 N

(S)-Vasp	30 ml	$3,75 \cdot 10^{-3}$ M	
Cu ²⁺	9 ml	$1,25 \cdot 10^{-2}$ M	(titration spec- trophotométrique)
KNO ₃	3 ml	2 M	

titré par NaOH 0,0846 N

Après ajustage du mélange au pH désiré, on prélève une prise de 2 ml dont on prend le spectre visible. On répète le processus pour différentes valeurs de pH (pH 2,5 à 11,5).

3.1. Détermination de la constante K_{ML}^{MHL} à l'aide de mesures spectrophotométriques

Le complexe $[CuL]^-$ présente un maximum d'absorption à 416 nm dû à la coordination du groupe phénol, $[CuHL]$ n'absorbe pas à cette longueur d'onde. Le graphe $E_{\max} = f(pH)$ (cf. fig.3a), obtenu à partir des mesures spectrophotométriques, permet de déterminer la concentration de $[CuL]^-$ en fonction du pH ce qui correspond à l'équilibre :

$$CuHL \rightleftharpoons CuL^- + H^+ \quad \text{pour lequel la constante de dissociation est } K_{ML}^{MHL} = \frac{[CuL][H]}{[CuHL]}.$$
 En portant alors $\log([CuL]/[CuHL])$ en fonction du pH, on obtient une droite (cf. fig.3b) dont l'intersection avec l'axe horizontal donne :

$$pK_{ML}^{MHL} = 4,17$$

$$\text{soit } K_{ML}^{MHL} = 6,75 \cdot 10^{-5}$$

Cette valeur de K_{ML}^{MHL} doit être considérée comme approximative car à pH 4, le ligand n'est pas totalement coordonné, il reste encore environ 20% de ligand libre dans la solution.

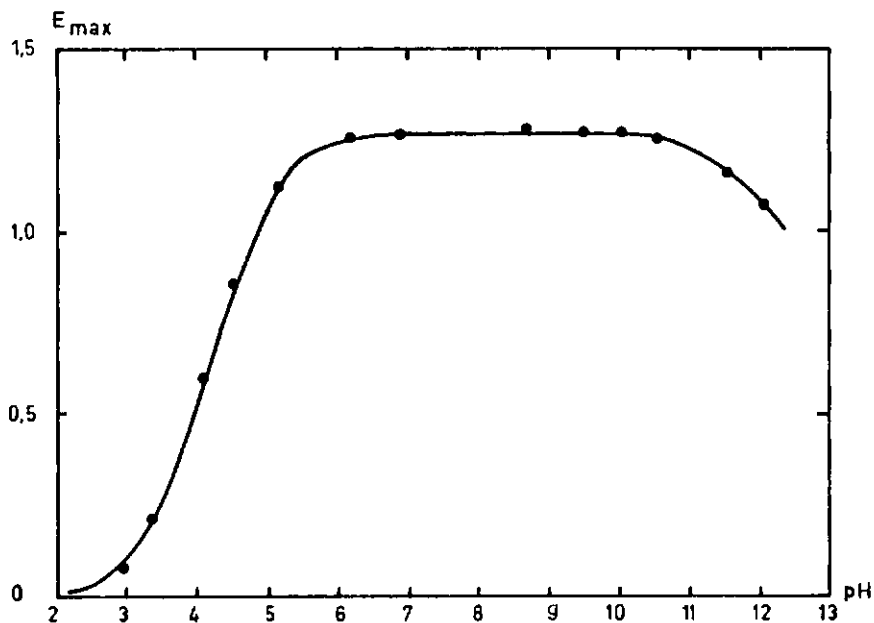


Fig. 3a Titration spectrophotométrique de Cu^{2+} , (S)-Vasp

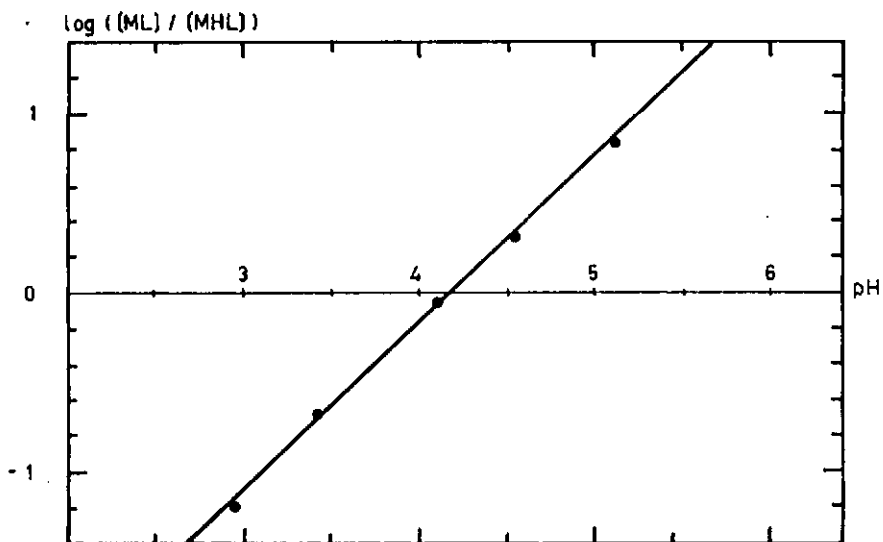


Fig.3b Détermination graphique de $\text{pK}_{\text{ML}}^{\text{MHL}}$

3.2. Détermination de la constante K_{MHL}^M à l'aide de la courbe
de titration acidimétrique et de K_{ML}^{MHL}

Nous procéderons par approximations successives en variant la valeur de K_{ML}^{MHL} estimée sous 3.1. jusqu'à obtention d'une valeur constante pour K_{MHL}^M .

Le système d'équations est le suivant :

- 1) $K_0 = [H][H_3L]/[H_4L^+]$; 2) $K_1 = [H][H_2L]/[H_3L]$
- 3) $K_2 = [H][HL]/[H_2L]$; 4) $K_{ML}^{MHL} = [CuL][H]/[CuHL]$
- 5) $C_M = [Cu] + [CuHL] + [CuL]$
- 6) $C_L = [H_4L] + [H_3L] + [H_2L] + [CuHL] + [CuL]$, ($[HL]$ et $[L]$ sont négligeables aux pH considérés $3,5 \leq pH \leq 5,5$)
- 7) $[Na] + [H] + [H_4L] = [H_2L] + 2 [CuHL] + 3 [CuL]$
bilan de masse
- 8) $K_{MHL}^M = [CuHL]/[Cu][HL]$

$C = C_M = C_L =$ concentration tot. en métal et en (S)-Vasp

inconnues :

$[H_4L], [H_3L], [H_2L], [HL], [Cu], [CuHL], [CuL], K_{MHL}^M$

$[Na], [H], C_M = C_L$ variables, connues

K_0, K_1, K_2 constantes, connues

K_{ML}^{MHL} "constante" pour une série de mesures

En résolvant le système on obtient :

$$\begin{aligned}
 & a = 1 + K_{ML}^{MHL}/[H] \\
 [H_3L] &= \frac{[Na] + [H] - C.y/a}{x - b.y/a} & b &= 1 + [H]/K_0 + K_1/[H] \\
 & x &= & K_1[H] - [H]/K_0 \\
 K_{MHL}^M &= \frac{(C - [H_3L]b)[H]^2}{[H_3L]^2 a \cdot b \cdot K_1 \cdot K_2} & y &= 2 + 3 K_{ML}^{MHL}/[H]
 \end{aligned}$$

Le tableau 3.2 montre les valeurs de K_{MHL}^M obtenues en variant K_{ML}^{MHL} de $8,00 \cdot 10^{-5}$ à $4,50 \cdot 10^{-5}$

Pour $K_{ML}^{MHL} > 5,00 \cdot 10^{-5}$ K_{MHL}^M décroît régulièrement quand le pH augmente.

Pour $K_{ML}^{MHL} \leq 4,50 \cdot 10^{-5}$ K_{MHL}^M croît avec le pH.

La valeur de K_{ML}^{MHL} doit donc être comprise entre $4,50 \cdot 10^{-5}$ et $5,00 \cdot 10^{-5}$

Pour $K_{ML}^{MHL} = 4,80 \cdot 10^{-5}$ l'écart observé entre les valeurs maximales et minimales de K_{MHL}^M est le plus faible, alors

$$K_{MHL}^M = (4,00 \pm 0,08) \cdot 10^8$$

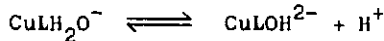
=====

3.3. Calcul de la constante K_{ML}^M

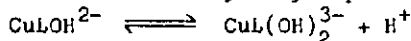
$$K_{ML}^M = [CuL]/[Cu][L] = K_{MHL}^M \cdot K_{ML}^{MHL} / K_3 = 4,17 \cdot 10^{15}$$

3.4. Les hydroxycomplexes $[CuLOH]^{2-}$ et $[CuL(OH)_2]^{3-}$

L'abaissement de la courbe de titration acidimétrique après le troisième équivalent de base indique qu'il y a formation au moins d'un monohydroxycomplexe :



et éventuellement d'un dihydroxycomplexe :



ou d'un dimère :

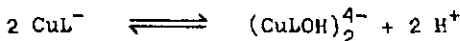


Tableau 3.2 Détermination de K_{MHL}^M en variant la valeur de K_{ML}^{MHL}

K_{ML}^{MHL} [m/l]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]	K_{MHL}^M [l/m]
pH \pm 0,005	$6,75 \cdot 10^{-5}$	$8,00 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,50 \cdot 10^{-5}$	$4,75 \cdot 10^{-5}$	$4,80 \cdot 10^{-5}$	$4,85 \cdot 10^{-5}$	$4,90 \cdot 10^{-5}$	
3,520									
3,630									
3,730	$3,13 \cdot 10^8$	$2,75 \cdot 10^8$	$3,85 \cdot 10^8$	$4,05 \cdot 10^8$	$3,94 \cdot 10^8$	$4,04 \cdot 10^8$	$4,03 \cdot 10^8$	$4,01 \cdot 10^8$	
3,825									
3,945									
4,055	$2,42 \cdot 10^8$	$1,92 \cdot 10^8$	$3,70 \cdot 10^8$	$4,30 \cdot 10^8$	$3,95 \cdot 10^8$	$3,91 \cdot 10^8$	$3,86 \cdot 10^8$	$3,82 \cdot 10^8$	
4,170									
4,285									
4,385	$1,86 \cdot 10^8$	$1,34 \cdot 10^8$	$3,73 \cdot 10^8$	$4,55 \cdot 10^8$	$4,11 \cdot 10^8$	$4,03 \cdot 10^8$	$3,95 \cdot 10^8$	$3,88 \cdot 10^8$	
4,510									
4,635									
4,775									
4,900	$1,33 \cdot 10^8$	$8,94 \cdot 10^7$	$3,34 \cdot 10^8$	$5,15 \cdot 10^8$	$4,09 \cdot 10^8$	$4,08 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^8$	$3,73 \cdot 10^8$	

$K_{MHL}^{ML} = 4,80 \cdot 10^{-5}$

$K_{MHL}^M = (4,00 \pm 0,08) 10^8$ (en écartant la valeur $4,16 \cdot 10^8$)

Nous avons envisagé les 3 possibilités et cherché à l'aide des méthodes graphiques de G. Schwarzenbach [12] et R.L. Gustafson et A.E. Martell [14] à déterminer respectivement les constantes de formation d'un dihydroxycomplexe ou d'un dimère. Les résultats obtenus infirment la présence de l'un et de l'autre.

3.4.1. Détermination de la constante K_{MLOH}^{ML}

K_{MLOH}^{ML} est calculée à partir de la courbe de titration acidimétrique en prenant les valeurs de pH situées entre 3 et 4,2 équivalents de base ajoutée (l'électrode utilisée n'est plus fiable à des $pH > 11,2$). La formation de $[CuL]^-$ est alors quantitative et le système d'équations est le suivant :

$$K_{MLOH}^{ML} = [CuLOH] / [CuL][OH] \quad ; \quad C = [CuL] + [CuLOH]$$

$$[Na] = [OH] + 3 [CuL] + 4 [CuLOH]$$

d'où l'on tire :

$$[CuL] = 4 C + [OH] - [Na]$$

$$K_{MLOH}^{ML} = \frac{[Na] - 3 C - [OH]}{(4 C + [OH] - [Na])[OH]}$$

Nous obtenons :

$$K_{MLOH}^{ML} = (1,59 \pm 0,10) 10^3$$

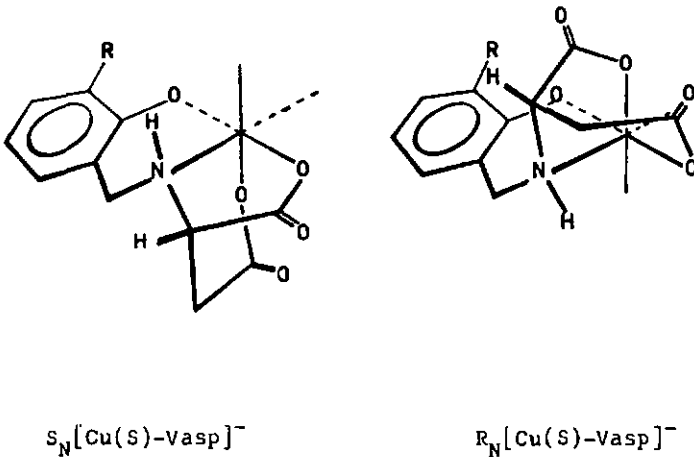
=====

Les valeurs de K_{MLOH}^{ML} restent constantes jusqu'à adjonction de 4,2 équivalents de base ce qui montre bien qu'il ne se forme pratiquement pas de dihydroxycomplexe dans le domaine de pH étudié.

3.5. Structure de [Cu(S)-Vasp]⁻

(S)-Vasp est un ligand tétradenté. Les courbes de titration acidimétrique et spectrophotométrique montrent que le groupe phénol est déjà fixé au métal en milieu relativement acide. Une ouverture d'un bras carboxylate au moment où le phénol se coordonne est peu probable.

Lors de la formation du complexe, l'atome d'azote tétraédrique devient un nouveau centre de chiralité, ainsi la formation de deux diastéréoisomères est possible :



-Fig.4-

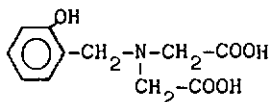
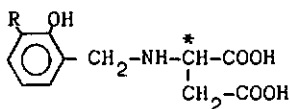
A l'aide des modèles de Stuart (modèles à calottes) on peut construire les deux isomères sans déceler de tension plus grande pour l'un que pour l'autre.

Il est impossible sur la base des faits expérimentaux de savoir si la formation de l'un des deux isomères est plus probable que celle de l'autre.

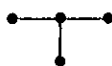
La coordination d'un groupe carboxylate en position axiale nous paraît plus favorable pour un cycle à 6 membres que pour un cycle à 5, $S_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$ devrait être plus stable que $R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$ (cf.fig.4).

3.5.1. $S_N, R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$ et $[CuHBIDA]^-$

Il est intéressant de comparer les complexes formés par (S)-Vasp et HBIDA avec le Cu(II). Les deux ligands ne diffèrent que par leur type structural :



(S)-Vasp



HBIDA

Ils se coordonnent à un métal de structure octaédrique avec trois atomes donneurs dans le plan équatorial et un atome en position axiale ; pourtant les groupes phénolates de (S)-Vasp et HBIDA n'ont pas la même affinité pour le Cu(II). (cf. tableau 3.5.1.2.). Le complexe du Cu(II) avec HBIDA se forme d'abord par fixation du groupe IDA, puis, lorsque le pH est augmenté, le groupe phénol est déprotoné et coordonné sur le métal [10].

Le comportement du Cu(II) avec des ligands tétradentés bifurqués diffère assez nettement de celui des autres ions métalliques (cf. tableau 3.5.1.1).

Tableau 3.5.1.1 Stabilités relatives des complexes formés par IDA et NTA*, Asp et (S)-AMA*, avec différents ions métalliques

$\log K_{ML}^M$	IDA ^{a)}	Asp ^{a)}	NTA ^{a)}	(S)-AMA ^{b)}	$\Delta \log K_{ML}^M$	
					IDA-NTA	Asp-(S)-AMA
Cu ²⁺	10,57	8,40	13,10	13,85	2,53	5,45
Co ²⁺	6,94	5,96	10,60	9,82	3,66	3,86
Ni ²⁺	8,13	7,14	11,30	10,89	3,17	3,65
Zn ²⁺	7,24	5,80	10,45	9,90	3,21	4,10

* NTA : acide nitrilotriacétique
 (S)-AMA : acide (S)-aspartique-N-monoacétique
 a) [15] ; b) [13]

Tableau 3.5.1.2 Comparaison entre les complexes formés par le Cu(II) avec HBIDA et (S)-Vasp

Cu ²⁺	HBIDA ^{c)}	(S)-Vasp
$\log K_{MHL}^M$	10,91	8,60
$-\log K_{ML}^{MHL}$	6,51	4,32
$\log K_{ML}^M$	16,11	15,62
$\log K_{ML}^M - \log K_{MHL}^M$	5,20	7,02

c) [10]

Lors de la coordination de tels ligands sur le cuivre, trois facteurs entrent en considération : la taille des cycles de chélation, la nature et la position de l'atome coordinateur.

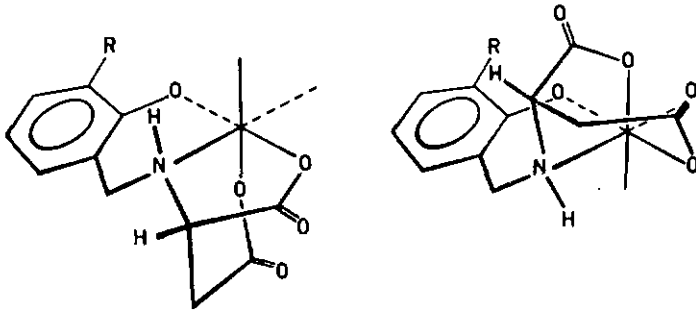
3.5.2. Discussion

On considérera d'abord le cas où le complexe du Cu(II) avec HBIDA a une structure octaédrique. La formation de deux isomères géométriques est théoriquement possible selon que l'arrangement de IDA autour du métal est équatorial [CuHBIDAéq]⁻ ou facial [CuHBIDAFac]⁻. On peut comparer chacun de ces deux isomères avec ceux formés par le Cu(II) avec (S)-Vasp (cf. fig.5).

Dans [CuHBIDAéq]⁻ le groupe phénolate est coordonné en position axiale alors que dans S_N et R_N[Cu(S)-Vasp]⁻ il est équatorial, un groupe carboxylate se trouvant en position axiale. Or le phénol est un ligand plus mou que -COO⁻, il formera donc plus volontiers des liaisons courtes avec le cuivre (position équatoriale), d'autre part J, Gazo et al [3] ont démontré que dans les complexes du type CuN₂O₄, ce sont toujours les groupes carboxylates qui occupent les positions axiales. La position du groupe phénolate est donc moins favorable dans [CuHBIDAéq]⁻ que dans R_N et S_N[Cu(S)-Vasp]⁻.

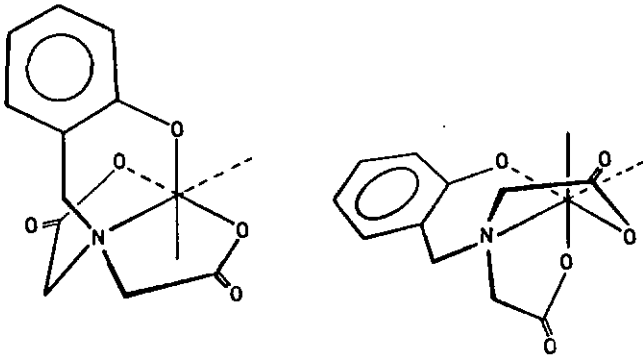
[CuHBIDAFac]⁻ doit avoir une stabilité comparable à celle de R_N[Cu(S)-Vasp]⁻. Pour ces deux isomères le groupe phénolate est en position équatoriale mais le groupe carboxylate coordonné en position axiale appartient à un cycle à 5 membres ce qui est un facteur peu favorable étant donné l'allongement de la liaison axiale généralement observé dans les complexes octaédriques du Cu(II). Le gain de stabilité acquis lors de la coordination du phénol signifierait que S_N[Cu(S)-Vasp]⁻, dans lequel le groupe carboxylate fixé en

position axiale fait partie d'un cycle à 6 membres, est plus stable que $R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$ (cf. tableau 3.5.1.1, $\Delta \log K_{ML}^M$).



$S_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$

$R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$



$[CuHBIDA\acute{e}q]^-$

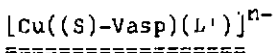
$[CuHBIDafac]^-$

Le cuivre II préfère souvent une structure planaire à une structure octaédrique [10],[2]. Lors de la coordination de HBIDA sur le cuivre, la formation d'un complexe de structure planaire est possible par ouverture d'un bras carboxylate au moment de la fixation du groupe phénolate. Le complexe obtenu peut-être alors comparé à $[\text{CuHBIDAfac}]^-$ avec le bras carboxylate en position axiale non coordonné. HBIDA devient un ligand tridenté. La force de la coordination du phénol de (S)-Vasp serait due à un effet chélate ce qui confirme que (S)-Vasp est un ligand tétradenté. Si cette hypothèse est correcte, elle implique également que $S_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$ est plus stable que $R_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$ selon ce qui a été dit au paragraphe précédent concernant les stabilités relatives des isomères $[\text{CuHBIDAfac}]^-$ et $R_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$.

En conclusion, l'étude comparative des isomères formés par (S)-Vasp et HBIDA avec le cuivre montre que (S)-Vasp est un ligand tétradenté et que le groupe phénolate préfère une position équatoriale à une position axiale dans un complexe de cuivre II de structure octaédrique. Elle fournit des arguments nous permettant de postuler que $S_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$ est plus stable que $R_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$.

Dans le complexe $S_N[\text{Cu(S)-Vasp}]^-$, les deux positions de coordination libres peuvent être occupées par une molécule de solvant. Le monohydroxycomplexe correspondrait à la dissociation de la molécule d'eau en position équatoriale. La molécule d'eau axiale étant plus éloignée du métal, la formation du dihydroxycomplexe est très faible à un $\text{pH} > 11,2$.

4. STEREOSELECTIVITE ET STRUCTURE DES COMPLEXES MIXTES



Ce chapitre traite de la stabilité, de la stéréosélectivité et de la structure des complexes mixtes $[\text{Cu}((\text{S})\text{-Vasp})(\text{L}')]^{n-}$ ($\text{L}' =$ imidazole (Im), histamine (Hist), histidine (His), N α acétylhistidine (N α ac-His), phénylalanine (Phe) et valine (Val)). La variation de la concentration des espèces présentes dans la solution en fonction du pH sera aussi examinée, une bonne connaissance de l'état du système à l'équilibre étant nécessaire avant d'entreprendre l'étude de sa réactivité en présence d'oxygène.

4.1. Stéréosélectivité et complexes mixtes

Un système stéréosélectif est capable de faire un choix parmi deux éléments de chiralité opposée et de réagir de préférence avec l'un plutôt qu'avec l'autre.

Dans les systèmes naturels, la complémentarité entre l'enzyme et le substrat est souvent si étroite que la stéréosélectivité de la réaction est absolue. L'étape stéréosélective pouvant être au niveau de la formation du complexe enzyme-substrat ou de la réaction conduisant à un produit de chiralité définie.

Les complexes mixtes sont des modèles simplifiés permettant de mettre en évidence le phénomène de la stéréosélectivité. Afin de pouvoir observer une stéréosélectivité dans un complexe mixte, on choisit souvent des ligands pluridentés laissant un certain nombre de positions de coordination libres sur le métal ce qui permet la fixation d'un ligand secondaire. Dans un système labile le ligand pluridenté doit être

optiquement actif et présenter une structure imposant une chiralité déterminée à l'ensemble de coordination. On essaie en fait de reproduire le modèle de la "ser- rure et de la clef", concept utilisé souvent pour don- ner une image de la stéréosélectivité [23].

4.2. Détermination des constantes de formation K_{MLL}^{ML}
des complexes mixtes

Les constantes K_{MLL}^{ML} , ont été calculées à partir des titrations acidimétriques et spectrophotométriques en fonction du pH de solutions de Cu^{2+} , (S)-Vasp , L' contenant les trois constituants dans un rapport 1:1:1.

Conditions de mesures cf.2.2.1

Solutions

(S)-Vasp	$3,75 \cdot 10^{-3}$ M
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$7,50 \cdot 10^{-2}$ M
L'	$1,50 \cdot 10^{-2}$ M

Mesures

(S)-Vasp	$3,75 \cdot 10^{-3}$ M	20 ml	
Cu^{2+}	$7,50 \cdot 10^{-2}$ M	1 ml	titrations
L'	$1,50 \cdot 10^{-2}$ M	5 ml	acidimétriques
KNO_3	2 M	2 ml	
(S)-Vasp	$3,75 \cdot 10^{-3}$ M	40 ml	
Cu^{2+}	$7,50 \cdot 10^{-2}$ M	2 ml	titrations spectro-
L'	$1,50 \cdot 10^{-2}$ M	10 ml	photométriques
KNO_3	2 M	4 ml	

où L' = imidazole Fluka purum recristallisée
 (S)-, (R)-histidine Fluka p.a.

(S)-,(R)-phénylalanine	Fluka p.a.
(S)-,(R)-valine	Fluka p.a.
(S)-N α acétylhistidine	Aldrich 99+%
histamine.2HCl	Siegfried Ph H VI

Tous les ligands L' ont été titrés exactement dans les mêmes conditions que les complexes mixtes (titrations acidimétriques où l'on a remplacé (S)-Vasp par 20 ml H₂O). Les constantes d'acidités de ces ligands, déterminées à partir des courbes de titrations, seront utilisées lors des calculs des constantes de stabilité des complexes mixtes.

4.2.1. [Cu((S)-Vasp)(imidazole)]⁻

4.2.1.1. Introduction

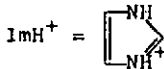
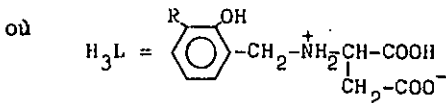
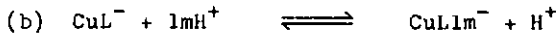
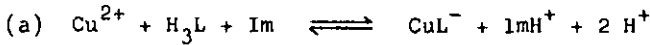
Dans les métalloprotéines qui ont été analysées par rayons X, on a trouvé que les ions métalliques étaient généralement coordonnés aux chaînes latérales des acides aminés. Les complexes mixtes du type [CuLim]ⁿ⁻ ont été souvent étudiés pour savoir quel était le rôle joué par le groupe imidazole, chaîne latérale de l'histidine dans les métalloenzymes. En particulier les structures de [Cu(Gly-Gly)(ImH)₂]ClO₄, [Cu(Gly-Gly)(ImH)(H₂O)].1,5H₂O et [Cu(Gly-Gly-GlyH)(ImH)(H₂O)].H₂O ont été déterminées par rayons X [16]. Dans les trois complexes on a une structure octaédrique déformée avec tous les atomes d'azote coordonnés dans le plan équatorial formant des liaisons courtes avec le métal, les positions axiales sont occupées par des atomes d'oxygène provenant d'un groupe carboxylate, d'une molécule d'eau ou d'un ion perchlorate. Le cycle imidazole est de préférence coplanaire au plan équatorial CuN₄ sauf en cas d'empêchement stérique ou de formation de liaison hydrogène.

4.2.1.2. Titration et calculs

La courbe de titration acidimétrique d'un mélange équimolaire de Cu^{2+} , (S)-Vasp, Im présente : (cf.fig.6)

- un effet tampon dû à la protonation de l'imidazole par un des protons libérés lors de la coordination de (S)-Vasp (a)
- un point d'inflexion après adjonction de deux équivalents de base (a)
- un saut après adjonction du troisième équivalent de base (b)

ce qui correspond aux équilibres suivants :



La courbe de titration spectrophotométrique (cf.fig.7) permet de vérifier quantitativement, que la formation de $[\text{CuL}]^-$ a lieu avant celle du complexe mixte, soit que la séquence des réactions (a) et (b) est correcte.

Le calcul de la constante de stabilité du complexe mixte : $K_{MLIm}^{ML} = [\text{CuLIm}^-]/[\text{CuL}^-][\text{Im}]$ est effectué à partir du système d'équations : (cf. page 39)

- 1) $K_1 = [H][H_2L]/[H_3L]$; 2) $K_2 = [H][HL]/[H_2L]$
 3) $K_{MHL}^M = [CuHL]/[Cu][HL]$; 4) $K_{ML}^{MHL} = [CuL][H]/[CuHL]$
 5) $K_{Im} = [H][Im]/[ImH]$; 6) $K_{MLIm}^{ML} = [CuLIm]/[CuL][Im]$
 7) $C_M = [Cu] + [CuHL] + [CuL] + [CuLIm]$
 8) $C_L = [H_3L] + [H_2L] + [CuHL] + [CuL] + [CuLIm]$

([HL] et [L] sont négligeables aux pH considérés
 $5 \ll pH \ll 6,7$)

- 9) $C_{Im} = [HIm] + [Im] + [MLIm]$
 10) $[Na] + [H] + [HIm] = [H_2L] + 2[CuHL] + 3[CuL] + 3[CuLIm] + [OH]$

$C = C_M = C_L = C_{Im}$ = concentration totale en métal (C_M),
 (S)-Vasp (C_L) et imidazole (C_{Im})

en résolvant le système on obtient :

$$[H_3L]^2(b.z.p + b.a.z(p-1)) + [H_3L](b(4p-1) - p(b-1)) + p([Na] + [H] - 3C) = 0$$

avec $a = 1 + K_{ML}^{MHL}/[H]$; $b = 1 + K_1/[H]$
 $p = 1 + [H]/K'_{1m}$; $z = K_{MHL}^M \cdot K_1 K_2/[H]^2$

d'où l'on tire :

$$[Cu] = [H_3L] \cdot b \quad [Im] = \frac{[H_3L]b + z.a.b[H_3L]^2}{p}$$

$$[CuHL] = z.b[H_3L]^2$$

$$[CuL] = z.b[H_3L]^2(a-1) \quad [CuLIm] = c - b([H_3L] - za[H_3L]^2)$$

et

$$K_{MLIm}^{ML} = \frac{(c - b([H_3L] - z.a[H_3L]^2))p}{(zb(a-1)[H_3L]^2)([H_3L] \cdot b + z.a.b[H_3L]^2)}$$

=====

Les valeurs de K_{MLIm}^{ML} calculées dans l'intervalle de pH correspondant au domaine de formation du complexe mixte selon l'équilibre (b) sont réunies dans le tableau 4.2.1.2

Tableau 4.2.1.2 Calcul de K_{MLIm}^{ML}

pH	[CuHL]	[CuL] ⁻	[CuLIm] ⁻	K_{MLIm}^{ML} [l/m]
5,135	$3,12 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$6,40 \cdot 10^{-5}$	$1,35 \cdot 10^3$
5,235	$2,54 \cdot 10^{-4}$	$2,09 \cdot 10^{-3}$	$8,16 \cdot 10^{-5}$	$1,35 \cdot 10^3$
5,370	$1,90 \cdot 10^{-4}$	$2,14 \cdot 10^{-3}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^3$
5,490	$1,45 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-3}$	$1,48 \cdot 10^{-4}$	$1,38 \cdot 10^3$
5,610	$1,10 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-3}$	$1,93 \cdot 10^{-4}$	$1,41 \cdot 10^3$
5,790	$7,13 \cdot 10^{-5}$	$2,11 \cdot 10^{-3}$	$2,75 \cdot 10^{-4}$	$1,42 \cdot 10^3$
5,905	$5,36 \cdot 10^{-5}$	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$3,37 \cdot 10^{-4}$	$1,42 \cdot 10^3$
6,070	$3,52 \cdot 10^{-5}$	$1,99 \cdot 10^{-3}$	$4,34 \cdot 10^{-4}$	$1,40 \cdot 10^3$
6,220	$2,38 \cdot 10^{-5}$	$1,89 \cdot 10^{-3}$	$5,34 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^3$
6,360	$1,63 \cdot 10^{-5}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$6,36 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^3$
6,500	$1,12 \cdot 10^{-5}$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	$7,31 \cdot 10^{-4}$	$1,36 \cdot 10^3$
6,655	$7,35 \cdot 10^{-6}$	$1,59 \cdot 10^{-3}$	$8,41 \cdot 10^{-4}$	$1,36 \cdot 10^3$

$$\bar{K}_{MLIm}^{ML} = (1,38 \pm 0,04) \cdot 10^3$$

=====

4.2.1.3. Discussion

L'abaissement de la courbe de titration acidimétrique en milieu basique, bien qu'il soit moins prononcé que pour $[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$, indique qu'il y a formation d'hydroxycomplexe.

Les constantes de formation du complexe mixte et du monohydroxycomplexe sont du même ordre de grandeur :

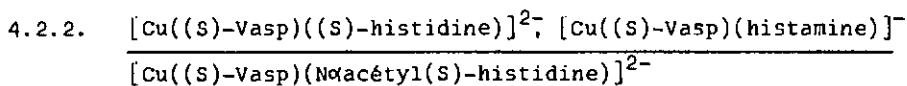
$$K_{MLIm}^{ML} = 1,38 \cdot 10^3 \quad ; \quad K_{MLOH}^{ML} = 1,59 \cdot 10^3$$

A partir de $\text{pH} \gg 10$ la concentration de $[\text{CuLOH}]^{2-}$ n'est donc pas négligeable, la formation d'un hydroxycomplexe ternaire selon la réaction :



est aussi possible.

H. Aiba et al [18] mentionne dans les complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Hist})_2]$ une dissociation du groupe imino de l'imidazole en milieu basique qui serait caractérisée par un déplacement hypsochrome du spectre d'absorption dans le visible. Nous observons un effet semblable mais il existe aussi dans le complexe $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ et dans les autres complexes mixtes y compris ceux formés avec Phe et Val. Le déplacement du spectre d'absorption en milieu basique semble lié à la formation du monohydroxycomplexe plutôt qu'à celle d'un complexe mixte où le groupe imino de l'imidazole serait déprotoné. La présence d'une telle particule ou celle d'un hydroxycomplexe ternaire n'est d'ailleurs pas vérifiée par le calcul dans le domaine de pH étudié.



4.2.2.1. Introduction

Les complexes entre le Cu(II) et l'histidine ou entre le Cu(II) et des di- ou tripeptides contenant de l'histidine ont été étudiés, en solution aqueuse, par de nombreux groupes de chercheurs [17],[18],[19],[21],[22] à cause du rôle important joué par le résidu histidyl comme "site coordinateur" dans les systèmes biologiques. Le résidu histidyl dans les peptides a une influence lors de la formation de complexe, sa position peut provoquer de nettes différences dans le mode de coordina-

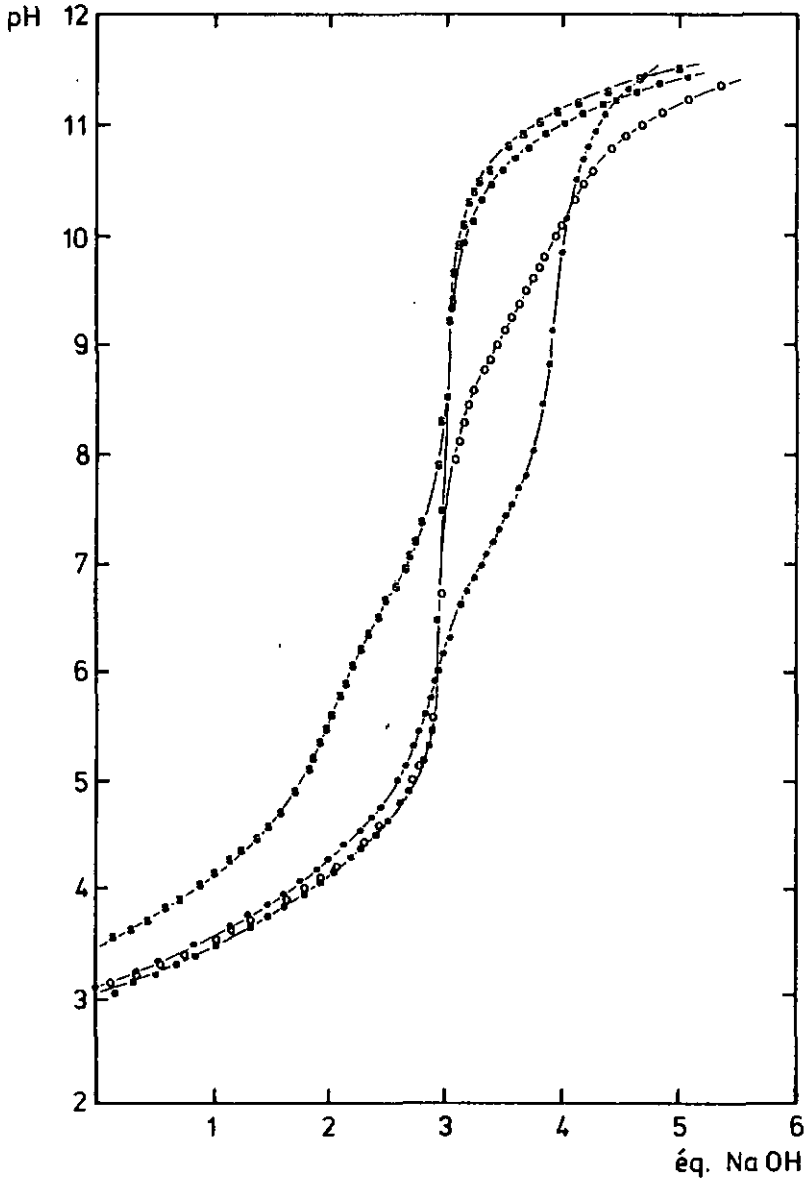


Fig.6 Titrations acidimétriques

- Cu^{2+} , (S)-Vasp
- Cu^{2+} , (S)-Vasp, Im
- Cu^{2+} , (S)-Vasp, Naac(S)-His
- Cu^{2+} , (S)-Vasp, (S)-Val

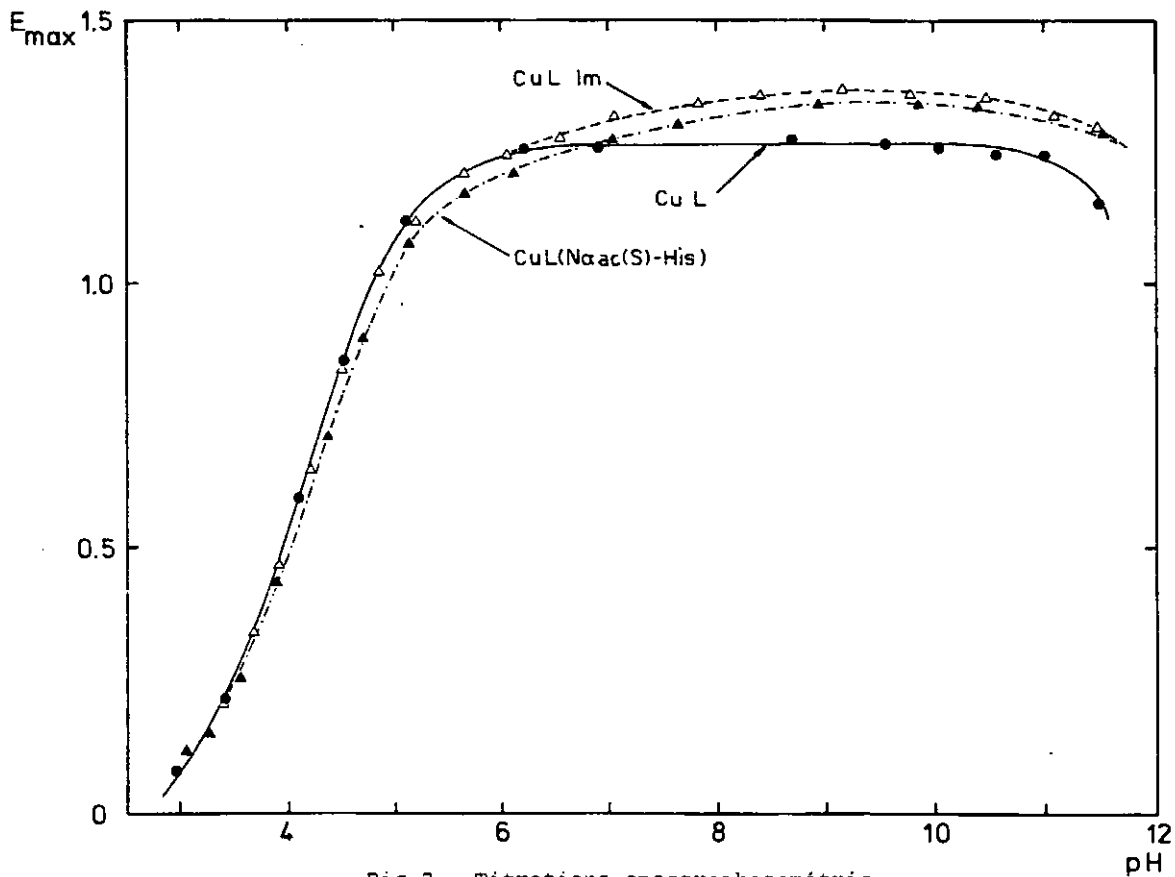


Fig.7 Titrations spectrophotométriques

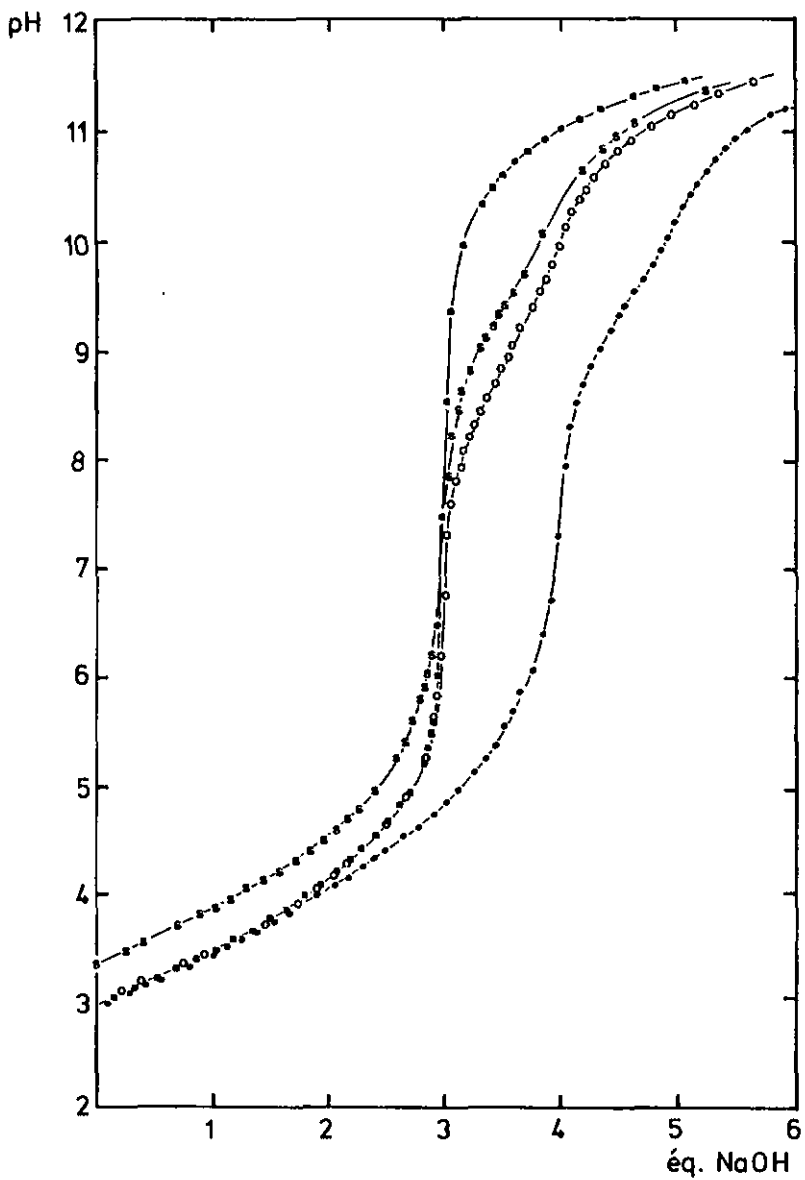


Fig.8 Titrations acidimétriques

- \bullet $\text{Cu}^{2+}, (\text{s})\text{-Vasp}$
- \circ $\text{Cu}^{2+}, (\text{s})\text{-Vasp}, (\text{s})\text{-Phe}$
- \square $\text{Cu}^{2+}, (\text{s})\text{-Vasp}, (\text{s})\text{-His}$
- \cdot $\text{Cu}^{2+}, (\text{s})\text{-Vasp}, \text{Hist.} \cdot 2\text{HCl}$

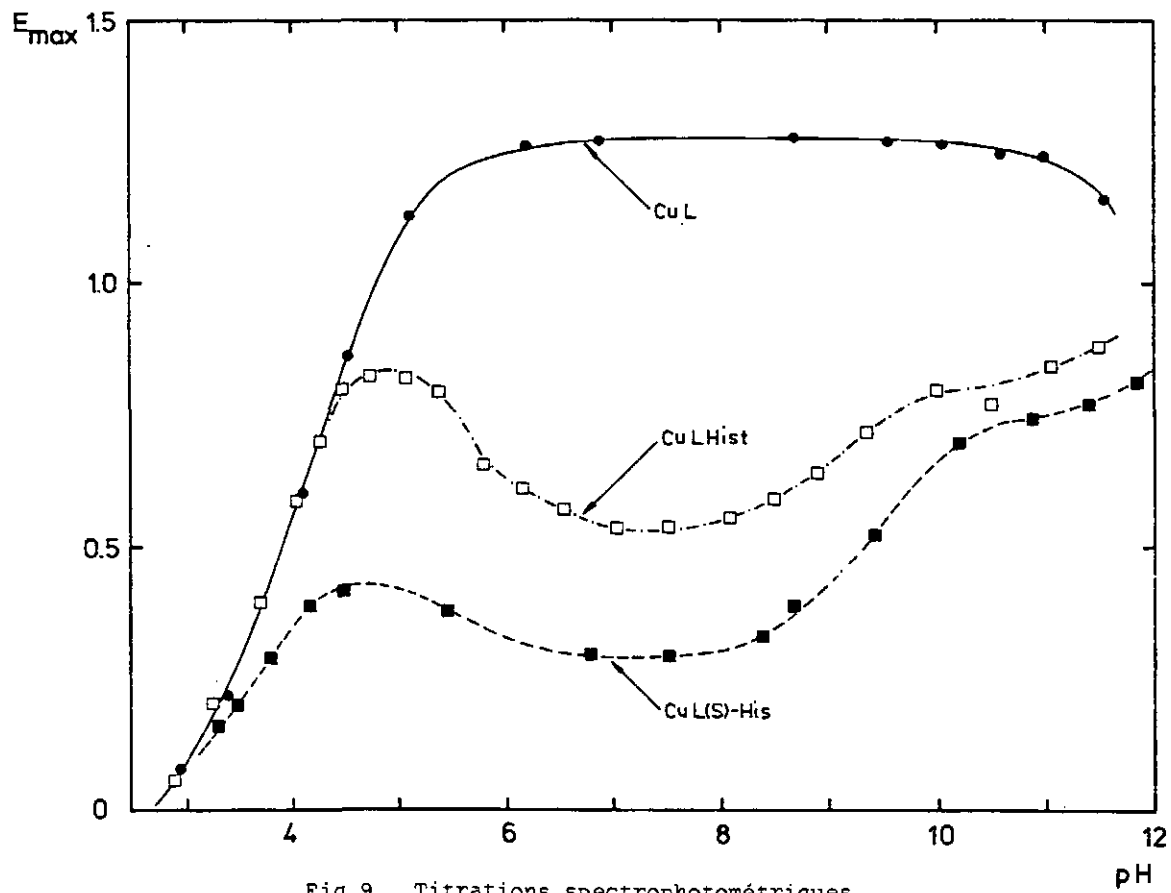


Fig.9 Titrations spectrophotométriques

tion des peptides. L'histidine peut agir comme ligand tridenté ou bidenté ; dans ce dernier cas, on distingue la coordination du type glycine (par les groupes amino et carboxylate) et la coordination du type histamine (par les groupes amino et imidazole).

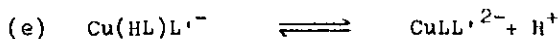
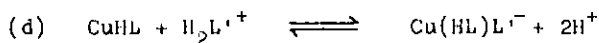
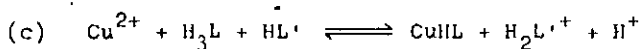
D'après H. Sigel et D.B.Mc Cormick [20], dans le complexe $[Cu(His)_2]$ en solution aqueuse, à pH 8,1, une molécule d'histidine est coordonnée au métal selon le type glycine, l'autre selon le type histamine. La structure du complexe mixte $[Cu((S)-His)((S)-Thr)]$, (Thr = thréonine), déterminée par rayons X montre que l'histidine est tridentée et que tous les atomes d'azote sont coordonnés dans le plan équatorial CuN_3 [22].

4.2.2.2. Titration et calculs pour L'=(S)-His et Hist

Le système devient plus compliqué qu'avec l'imidazole et ne peut être expliqué que si l'on considère ensemble les renseignements fournis par les courbes de titration acidimétriques et spectrophotométriques de mélanges équimolaires de Cu^{2+} , (S)-Vasp, L' (cf. fig. 8 et 9). Nous pouvons en déduire la succession des réactions en fonction du pH. Pour L'=(S)-His :

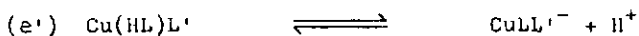
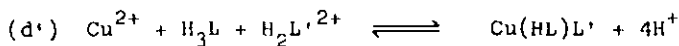
- le groupe imidazole de l'histidine fixe un des protons libérés lors de la coordination de (S)-Vasp (c).
- le groupe amino ou le groupe imidazole de l'histidine et le groupe phénolate du ligand principal sont en compétition pour un même site de coordination sur le métal et il se forme d'abord un complexe mixte $[Cu(HL)L']^-$ dans lequel le phénol n'est pas coordonné (d).
- le deuxième saut de la courbe de titration acidimétrique correspond alors à la déprotonation et à la fixation du phénol dans le complexe mixte (e).

En conséquence le système peut être décrit à l'aide des équations :



où H_3L = (S)-Vasp sous forme de zwitterion
 cf. 4.2.1.2.
 HL^{2-} = (S)-Vasp avec le groupe phénol
 protoné
 HL' = His sous forme de zwitterion
 $\text{H}_2\text{L}'^+$ = His avec les groupes amino et imi-
 dazole protonés
 $\text{Cu}(\text{HL})\text{L}'^-$ = complexe mixte dans lequel le bras
 phénolique est ouvert

Les mêmes considérations sont valables pour le complexe mixte formé avec l'histamine (cf. Fig.8 et 9) mais il faut tenir compte du fait que l'histamine est sous forme de dichlorhydrate et que le groupe imidazole est déjà protoné :



où $\text{H}_2\text{L}'^{2+}$ = Hist.2HCl
 L' = Hist, neutre

Un calcul détaillé ne sera effectué que pour le système où le ligand secondaire est l'histidine, la démarche à suivre étant analogue avec l'histamine.

Les deux sauts de la courbe de titration acidimétrique étant bien séparés, il est possible de déterminer dans une première étape les constantes :

$$K_{M(\text{HL})\text{L}'}^{\text{MHL}} = [\text{Cu}(\text{HL})\text{L}'] / [\text{CuHL}][\text{L}']$$

Calcul de $K_{M(HL)His}^{MHL}$

Le système d'équations est le suivant :

- 1) $K_1 = [H_2L][H]/[H_3L]$; 2) $K_2 = [HL][L]/[H_2L]$
- 3) $K_{MHL}^N = [CuHL]/[Cu][HL]$; 4) $K_{ML}^{MHL} = [CuL][H]/[CuHL]$
- 5) $K_{L'} = [HL'][H]/[H_2L']$; 6) $K_{2L'} = [L'][H]/[HL']$
- 7) $K_{M(HL)L'}^{MHL} = [Cu(HL)L']/[CuHL][L']$
- 8) $C_L = [H_3L] + [H_2L] + [CuHL] + [CuL] + [Cu(HL)L']$
- 9) $C_M = [Cu] + [CuHL] + [CuL] + [Cu(HL)L']$
- 10) $C_{L'} = [H_2L'] + [HL'] + [Cu(HL)L']$
- 11) $[Na] = [H_2L] + 2[CuHL] + 3[CuL] + 3[Cu(HL)L'] - [H_2L'] - [H^+]$

$C = C_M = C_L = C_{L'}$ = concentration totale en métal (C_M), (S)-Vasp (C_L) et His ($C_{L'}$)

en résolvant le système on obtient :

$$[H_3L]^2(z.b.p + z.a.b(p-1)) + [H_3L](b(4p-1) - p(b-1)) + p([Na] + [H] - 3C) = 0$$

où

$$a = 1 + K_{ML}^{MHL} / [H] ; \quad p = [H]^2 / K_{1L'} \cdot K_{2L'} + [H] / K_{1L'}$$

$$b = 1 + K_1 / [H] ; \quad z = K_1 \cdot K_2 \cdot K_{MHL}^M / [H]^2$$

d'où l'on tire :

$$K_{M(HL)L'}^{MHL} = \frac{(C - b([H_3L] - z.a.[H_3L]^2)) \cdot p}{(z.b.[H_3L]^2)([H_3L] \cdot b + z.a.b.[H_3L]^2)}$$

=====

Il faut remarquer que nous avons négligé la formation des complexes $[CuHis]^{4+}$ ou $[CuHis]^{2+}$ car en introdui-

sant cette donnée supplémentaire le système devenait trop difficile à résoudre (équation du quatrième degré). Les valeurs de $K_{M(HL)His}^{MHL}$ ou de $K_{M(HL)Hist}^{MHL}$ obtenues ne sont constantes que dans un domaine de pH restreint (entre pH 4,5 et 5,5 pour l'histidine, entre pH 4,0 et 5,0 pour l'histamine), au delà de ces limites elles croissent ou décroissent régulièrement.

L'ordre de grandeur de ces constantes est cependant correct. Il était possible de les introduire, avec toutes les autres constantes se rapportant aux systèmes $Cu^{2+}, (S)-Vasp, His$ ou $Hist$ (y compris : $K_{MHis}^M = [CuHis]/[Cu][His]$ et $K_{MHist}^M = [CuHist]/[Cu][Hist]$ [15]), dans le programme COMIC [52] calculant les concentrations de toutes les particules composant un système à partir des constantes appropriées. Les valeurs de $K_{M(HL)L'}^{MHL}$, sont alors déterminées à partir des concentrations de $[CuHL], [Cu(HL)L']$ et $[L']$ fournies par le programme pour différentes valeurs de pH.

Tableau 4.2.2.2 Calcul des constantes $K_{M(HL)L'}^{MHL}$ pour les complexes $[Cu(S)-Vaspl']^n-$ avec $L' = (S)-His$ et $Hist$

pH	$K_{M(HL)L'}^{MHL}$ [1/m] L' = (S)-His	$K_{M(HL)L'}^{MHL}$ [1/m] L' = Hist
5,0	1,61 .10 ⁹	2,69 .10 ⁹
6,0	1,60 .10 ⁹	2,67 .10 ⁹
7,0	1,57 .10 ⁹	2,68 .10 ⁹
8,0	1,57 .10 ⁹	2,72 .10 ⁹
9,0	1,58 .10 ⁹	2,66 .10 ⁹
10,0	1,59 .10 ⁹	2,72 .10 ⁹

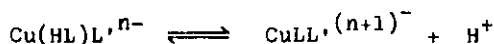
$$\bar{K}_{M(HL)(S)-His}^{MHL} = (1,59 \pm 0,02) \cdot 10^9$$

$$\bar{K}_{M(HL)Hist}^{MHL} = (2,69 \pm 0,03) \cdot 10^9$$

=====

=====

La détermination de la constante de formation $K_{MLL'}^{ML}$, des complexes mixtes dans lequel le groupe phénol est coordonné s'effectue en calculant d'abord à partir des courbes de titrations acidimétriques les constantes de dissociation $K_{MLL'}^{M(HL)L'}$ qui correspondent à l'équilibre :



d'où l'on tire :

$$K_{MLL'}^{ML} = [CuLL'] / [CuL][L'] = K_{M(HL)L'}^{MHL} \cdot K_{MLL'}^{M(HL)L'} / K_{ML}^{MHL}$$

soit

$$K_{ML(S)-His}^{ML} = 1,45 \cdot 10^4 \quad ; \quad K_{MLHist}^{ML} = 3,71 \cdot 10^4$$

=====

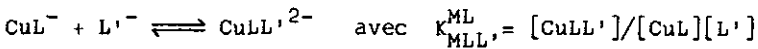
Afin de déterminer lequel du groupe amino ou du groupe imidazole de l'histidine empêche la coordination du groupe phénolate de (S)-Vasp lors de la formation du complexe $[Cu(HL)L']^-$, des titrations acidimétriques et spectrophotométriques ont été effectuées en prenant comme ligand secondaire : N-acétyl(S)-histidine dans lequel le N-peptidique ne se coordonne pas au métal. Les courbes de titrations sont analogues à celles obtenues avec l'imidazole (cf.6 et 7) indiquant qu'il ne se forme pas de complexe de type $[Cu(HL)L']^-$.

C'est donc le groupe amino de (S)-His qui se coordonne dans le complexe $[Cu(HL)(S)-His]^-$ à la place du groupe phénol de (S)-Vasp.

4.2.3. [Cu((S)-Vasp)((S)-phénylalanine)]²⁻, [Cu((S)-Vasp)((S)-valine)]²⁻

4.2.3.1. Titration et calculs

Les courbes de titrations acidimétriques de solutions équimolaires de Cu²⁺, (S)-Vasp, L', montrent un abaissement de pK du groupe amino pour ces deux acides aminés (cf. fig.6 et 8). Le complexe mixte se forme selon l'équation :



Le calcul détaillé de la constante $K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$, pour un système analogue a été donné par G. Colomb [13]. Les valeurs de $K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$, (tableau 4.2.3.1) ne sont plus constantes pour des pH > 9,4 à cause de la présence du monohydroxycomplexe [CuLOH]²⁻. L'existence d'un hydroxycomplexe ternaire n'a pas été déterminée par le calcul dans le domaine étudié.

Tableau 4.2.3.1 Constantes de formation des complexes mixtes pour L'=(S)-Phe et (S)-Val

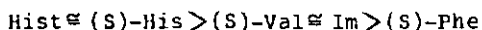
pH	$K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$ [l/m] L' = (S)-Phe	pH	$K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$ [l/m] L' = (S)-Val
8,300	8,75 . 10 ²	8,240	1,56 . 10 ³
8,435	8,50 . 10 ²	8,390	1,53 . 10 ³
8,555	8,40 . 10 ²	8,545	1,52 . 10 ³
8,685	8,45 . 10 ²	8,655	1,51 . 10 ³
8,820	8,20 . 10 ²	8,730	1,52 . 10 ³
8,925	8,30 . 10 ²	8,835	1,47 . 10 ³
9,030	8,50 . 10 ²	8,950	1,48 . 10 ³
9,165	8,70 . 10 ²	9,105	1,48 . 10 ³
		9,230	1,54 . 10 ³
		9,340	1,56 . 10 ³

$$\bar{K}_{\text{ML}(\text{S})-\text{Phe}}^{\text{ML}} = (8,5 \pm 0,2) . 10^2$$

$$\bar{K}_{\text{ML}(\text{S})-\text{Val}}^{\text{ML}} = (1,52 \pm 0,04) . 10^3$$

4.2.4. Conclusions

Les stabilités des complexes mixtes décroissent, en fonction de L', dans le sens :



Les valeurs très voisines des constantes de stabilité des complexes mixtes pour L'= Hist ou His font supposer que l'histidine est ici un ligand bidenté du type histamine, l'effet chélate qui devrait manifester la coordination du groupe carboxylate est inexistant.

La coordination de ligands du type histamine (L'=Hist, His) conduit à des complexes mixtes plus stables que ceux de ligands du type glycine (L'=Val, Phe)

La grande stabilité des complexes $[\text{CuLIm}]^-$ et $[\text{CuLHist}]^-$ peut être due à un "effet de charge". L'imidazole et l'histamine sont des ligands électriquement neutres, leur coordination sur un complexe anionique est favorisée par rapport aux acides aminés qui possèdent une charge négative sur le ion carboxylate.

4.3. Composition du système $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VasPL}']^{n-}$

A l'aide des constantes d'un système, on peut établir le diagramme des concentrations des espèces présentes dans la solution en fonction du pH. La composition du système varie selon la nature du ligand secondaire, elle a été déterminée pour L'=Im, (S)-His, Hist et (S)-Phe (cf. fig.10 a), b), c) et d)). Le calcul a été effectué à l'aide du programme COMIC [52].

4.3.1. Discussion

Les coefficients d'extinction à 416 nm des complexes $[\text{CuLL}']^{n-}$ ou de l'hydroxycomplexe ne sont pas connus. Les particules $[\text{CuHL}]$ et $[\text{Cu}(\text{HL})\text{L}']^{n-}$, bien que le phénol ne soit pas coordonné, absorbent également à cette longueur d'onde. Il est impossible, à partir des diagrammes de la fig.10, en additionnant les concentrations des particules obtenues pour différentes valeurs de pH, de reconstruire exactement la courbe spectrophotométrique expérimentale mesurée pour ces systèmes.

Fig.10 Diagrammes des concentrations des espèces présentes dans le système $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VasPL}']^{n-}$ en fonction du pH.

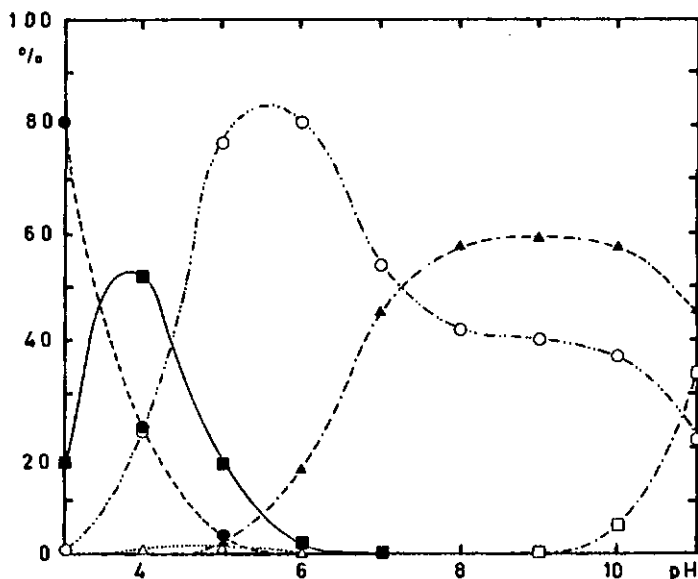


Fig.10a

$L' = 1\text{m}$

- $\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}$, ■ CuHL , ○ CuL , ▲ CuL' ,
- ▲ CuLL' , □ $\text{CuL}(\text{OH})$.

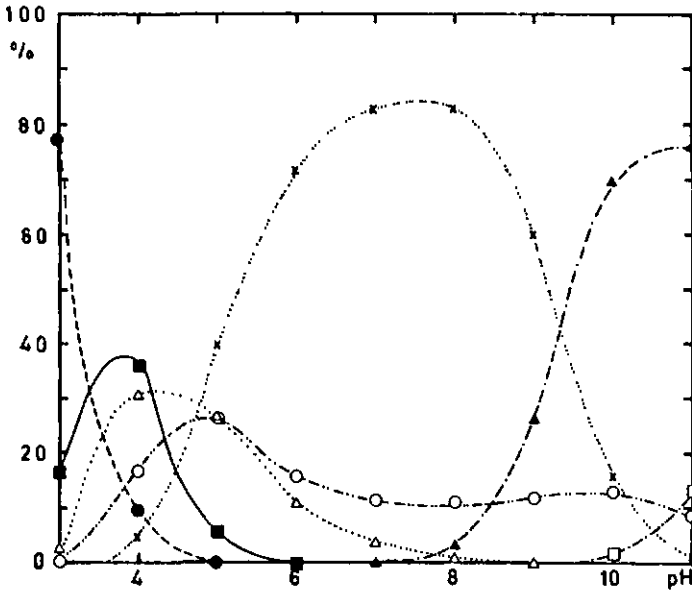


Fig. 10b $L' = (S)\text{-His}$

\bullet $\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}$, \blacksquare CuHL , \circ CuL , \triangle CuL' ,
 \times $\text{Cu(HL)L}'$, \blacktriangle CuLL' , \square CuL(OH) .

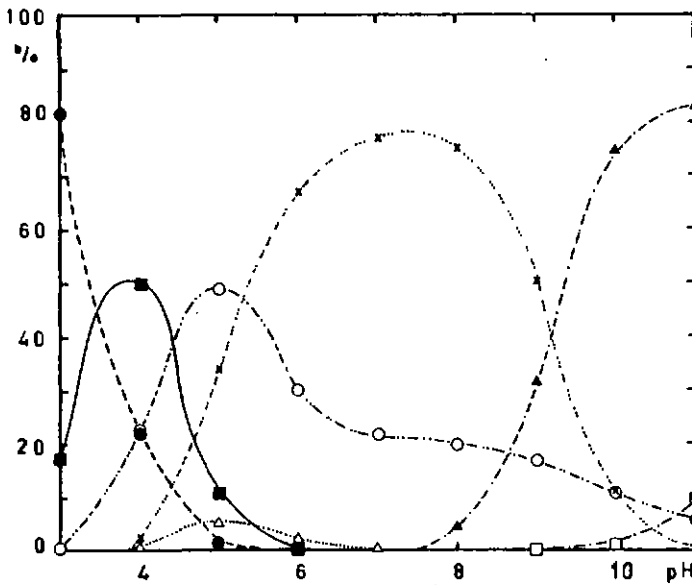


Fig. 10c $L' = \text{Hist}$

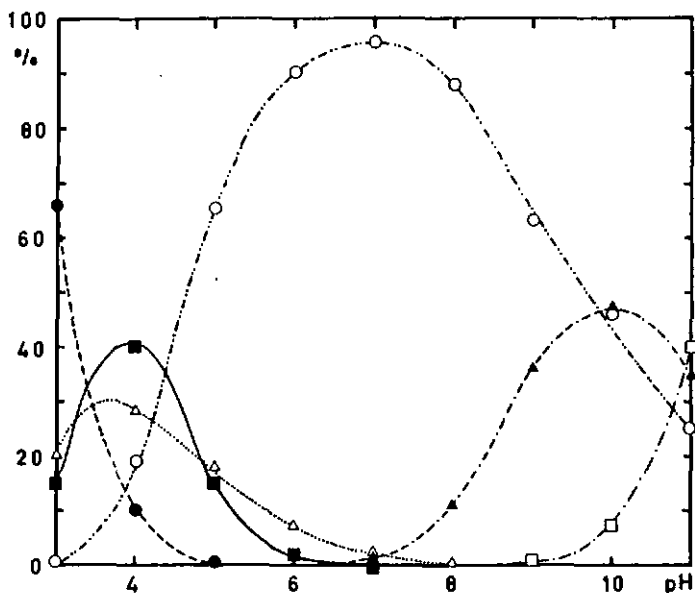


Fig.10d L' = (S)-Phe

● Cu²⁺ , ■ CuHL , ○ CuL , △ CuL' ,
 ▲ CuLL' , □ CuL(OH) .

Les variations observées entre les compositions des systèmes de l'histidine et de l'histamine sont dues principalement à la différence d' "acidité" de ces deux ligands ($K_1K_{2_{\text{His}}} = 5,24 \cdot 10^{-16}$; $K_1K_{2_{\text{Hist}}} = 7,57 \cdot 10^{-17}$).

En milieu acide la stabilité relative des complexes [CuL'] intervient aussi, à partir de $\text{pH} > 7$, les deux systèmes évoluent de façon semblable.

En milieu basique, l'importance relative des complexes [CuLL']ⁿ⁻ et [CuL(OH)]²⁻ varie fortement en fonction du ligand secondaire. Avec l'histidine et l'histamine,

le complexe mixte prédomine nettement à pH 11,0 , l'hydroxycomplexe ne représentant que 10 à 15% de la concentration globale. Pour Im et (S)-Phe, le complexe mixte et l'hydroxycomplexe sont présents en quantité sensiblement égale à ce pH.

4.4. Stéréosélectivité de [Cu(S)-Vasp]⁻

Les courbes de titrations acidimétriques d'un mélange Cu²⁺, (S)-Vasp avec les antipodes optiques de Phe, Val et His ne sont pas superposables (cf. fig.11 et 12) ce qui témoigne généralement de la présence d'une certaine stéréosélectivité dans le système. Pour ces trois acides aminés l'isomère (S) forme le complexe mixte le plus stable avec [Cu(S)-Vasp]⁻.

Avec (R)- et (S)-His la formation du complexe mixte [Cu(HL)His]⁻ est plus stéréosélective que l'étape de la déprotonation et de la fixation du phénol :

les courbes de titrations sont superposées dans ce domaine, les constantes de dissociation $K_{M(L)L}^{M(HL)L'}$ sont assez proches pour les deux énantiomères et respectivement égales à :

$$4,35 \cdot 10^{-10} \quad \text{pour (S)-His}$$

$$4,90 \cdot 10^{-10} \quad \text{pour (R)-His}$$

Les constantes $K_{M(L)L}^{ML}$, pour (R)- et (S)-Phe et Val, les constantes $K_{M(HL)L}^{MHL}$, pour (R)- et (S)-His sont réunies dans le tableau 4.4 , pour chacun de ces acides aminés nous indiquons aussi le facteur stéréosélectif :

$$K_x = K_{ML(S)L}^{ML} / K_{ML(R)L}^{ML}$$

Tableau 4.4 Stéréosélectivité des complexes mixtes
 $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{\text{n-}}$ selon L'

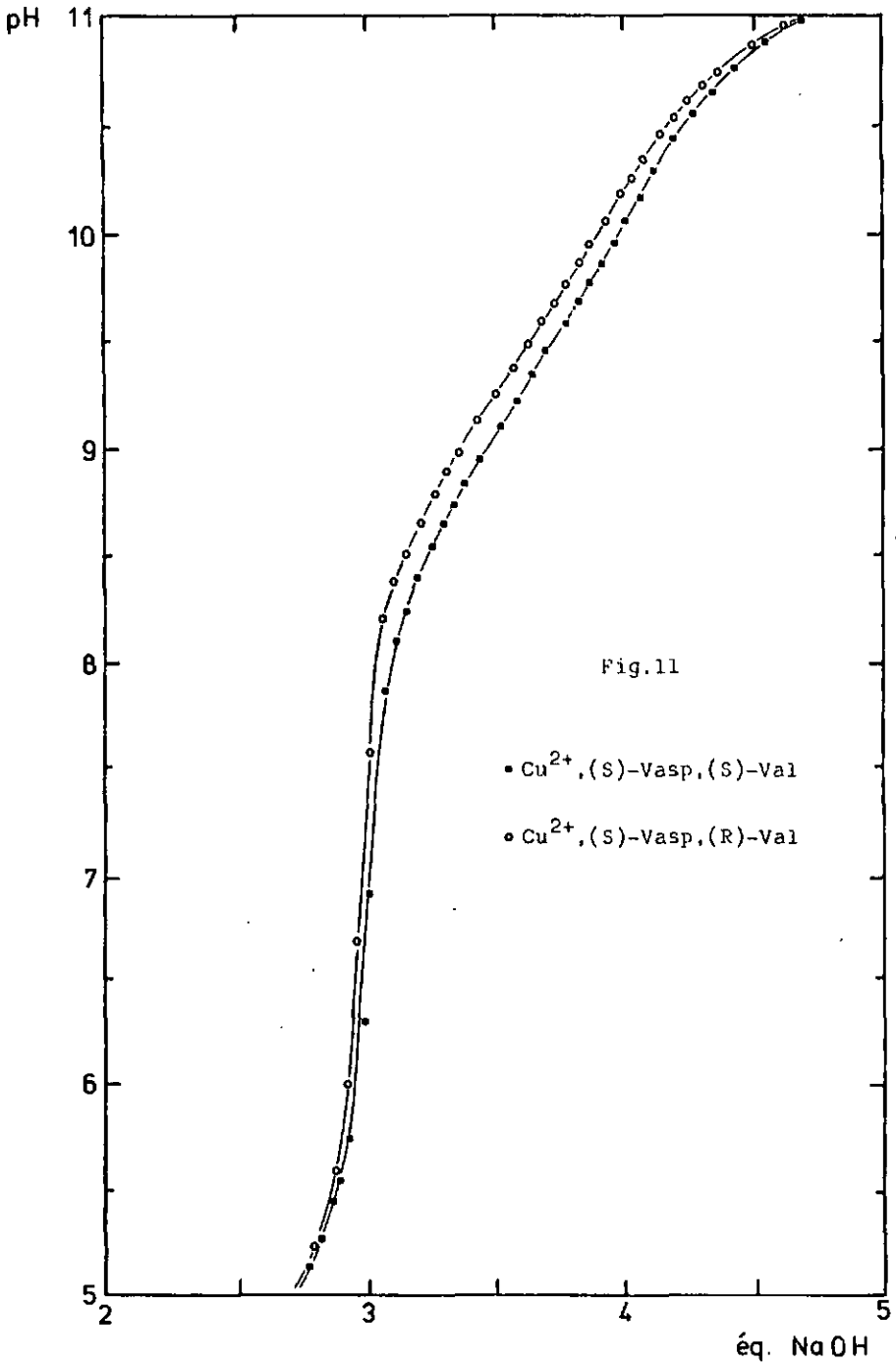
$[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{2-}$	$K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$	$K_{\text{M}(\text{HL})\text{L}'}^{\text{MHL}}$	K_x
L' = (S)-Phe	$8,50 \cdot 10^2$		1,79
(R)-Phe	$4,75 \cdot 10^2$		
L' = (S)-Val	$1,52 \cdot 10^3$		1,94
(R)-Val	$0,78 \cdot 10^3$		
L' = (S)-His		$1,59 \cdot 10^9$	1,47
(R)-His		$1,08 \cdot 10^9$	

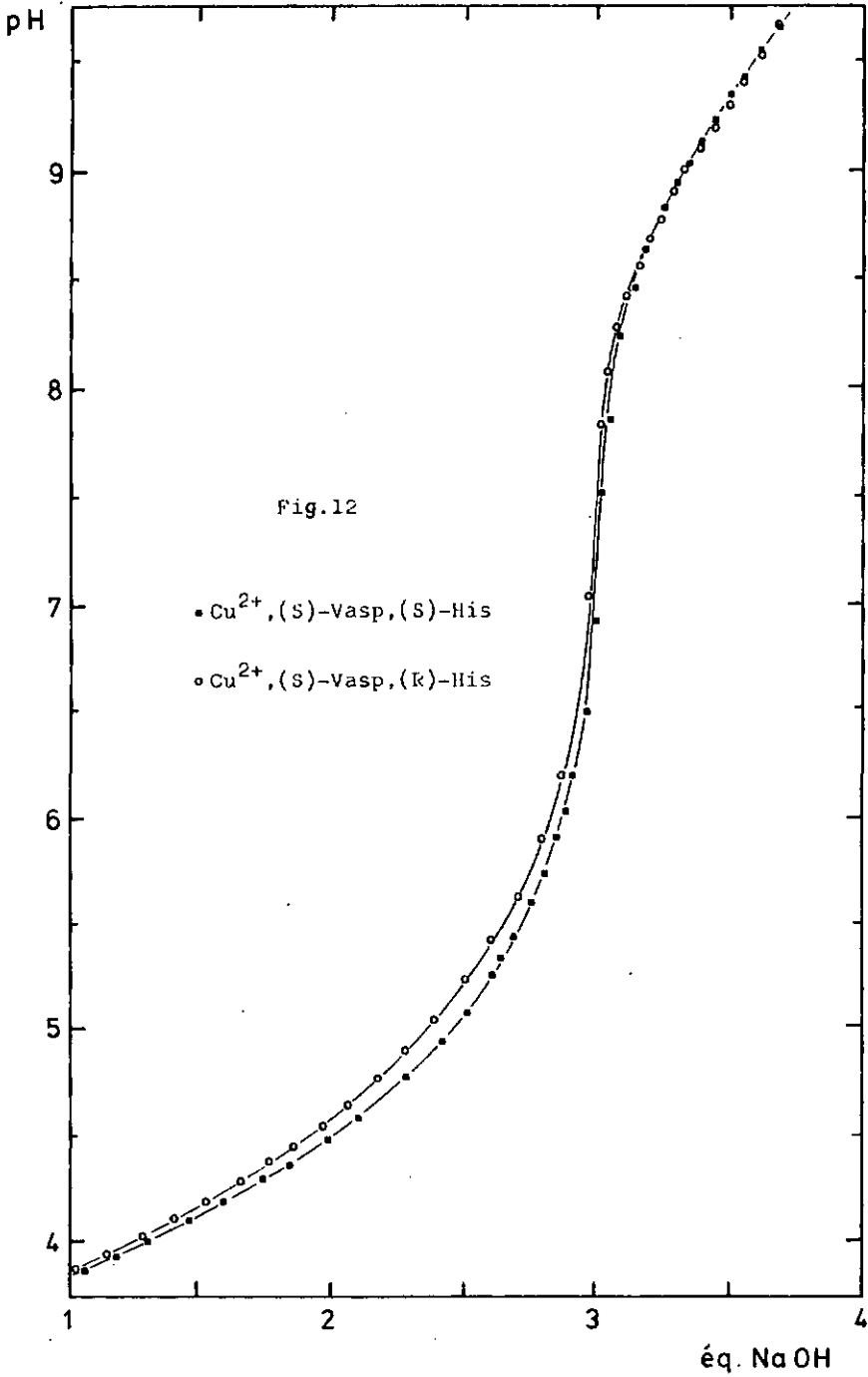
4.4.1. Discussion

Le complexe $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ présente une structure tri-dimensionnelle capable de transmettre certaines informations à une molécule chirale mais la configuration du ligand secondaire influence aussi la stéréosélectivité de la réaction. Le facteur stéréosélectif diminue dans le sens Val > Phe > His.

La faible stéréosélectivité observée avec l'histidine corrobore l'hypothèse que cet acide aminé est bidenté.

G. Colomb [13] a étudié les complexes mixtes de $[\text{Cu}(\text{S})\text{-AMA}]^-$ avec plusieurs acides aminés (R) et (S) dont Phe et Val. Il n'a pas décelé de stéréosélectivité dans la formation de ces complexes à l'aide de titrations acidimétriques. Ceci montre que l'apparition de la stéréosélectivité dans le système $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ est liée à la présence du phénol, le groupe N-monoacétate de (S)-AMA ayant été remplacé par un groupe





N-(2-hydroxy-3-méthoxy-benzyl) dans (S)-Vasp.

L'influence du phénol sur la stéréosélectivité est due, en partie, à des effets stériques. Le facteur K_X relativement petit obtenu avec l'histidine, s'expliquerait par le fait que le phénol n'est pas coordonné lors de l'étape stéréosélective et peut se placer dans une position telle que l'empêchement stérique soit minimal. Il est difficile cependant d'attribuer la stéréosélectivité du système uniquement à des facteurs stériques. D'après les modèles, ils ont peu d'importance dans les complexes mixtes formés avec Val et Phe et ne montrent pas pourquoi l'acide aminé (S) donne un complexe plus stable que l'acide aminé (R).

Il serait intéressant d'examiner si la stéréosélectivité du système est augmentée avec un ligand possédant un ou plusieurs substituants encombrants sur le noyau phénolique.

4.5. Structures des complexes mixtes $S_N[Cu(S)\text{-Vasp}L']^{n-}$

Pour chaque complexe mixte il existe un nombre plus ou moins grand de structures possibles selon la nature de L' .

La fig.13 donne les structures des complexes $[CuLL']$ pour $L'=\text{Im, Phe, Val}$ et $[Cu(HL)L']$ pour $L'=\text{His}$ et Hist . Avec l'histidine on trouve théoriquement 21 formes pour chaque énantiomère de l'acide aminé, nous avons éliminé toutes celles où l'un des groupes amino ou imidazole n'étaient pas coordonnés. Il reste alors 9 structures où l'histidine est bidentée (type histamine) ou tridentée.

4.5.1. $S_N[Cu(S)\text{-Vasplm}]^-$ (structures I et II fig.13)

Deux structures sont possibles selon que l'imidazole est fixée en position équatoriale (I) ou en position axiale (II). La structure de plusieurs complexes mixtes du cuivre avec l'imidazole est connue [16], l'imidazole est toujours coordonnée en position équatoriale, le cycle imidazole est de préférence coplanaire au plan équatorial. La structure I nous paraît donc la forme la plus probable pour le complexe $[CuIIm]^-$.

4.5.2. $S_N[Cu((S)\text{-Vasp})((S)\text{-His})]^{2-}$ (struct. III à XI fig.13,
R = $-COO^-$)

Pour le complexe mixte dans lequel le phénol n'est pas coordonné il y a neuf structures dans lesquelles l'histidine est bidentée (type histamine) ou tridentée.

Nous avons trouvé précédemment (cf. 4.2.2.2) que :

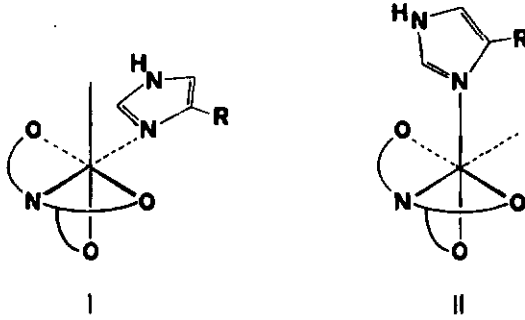
- (a) le groupe amino de (S)-His interagit avec le groupe phénolate de (S)-Vasp
- (b) les constantes de formation K_M^{MHL} sont très proches pour l'histamine et pour l'histidine c'est-à-dire que le groupe carboxylate est très faiblement ou pas du tout coordonné.

Les structures IV,VI,VII,VIII,X et XI ne satisfont pas à la condition (a) ; les structures IX,X et XI sont peu probables en conséquence de (b). Il ne reste que les deux formes III et V.

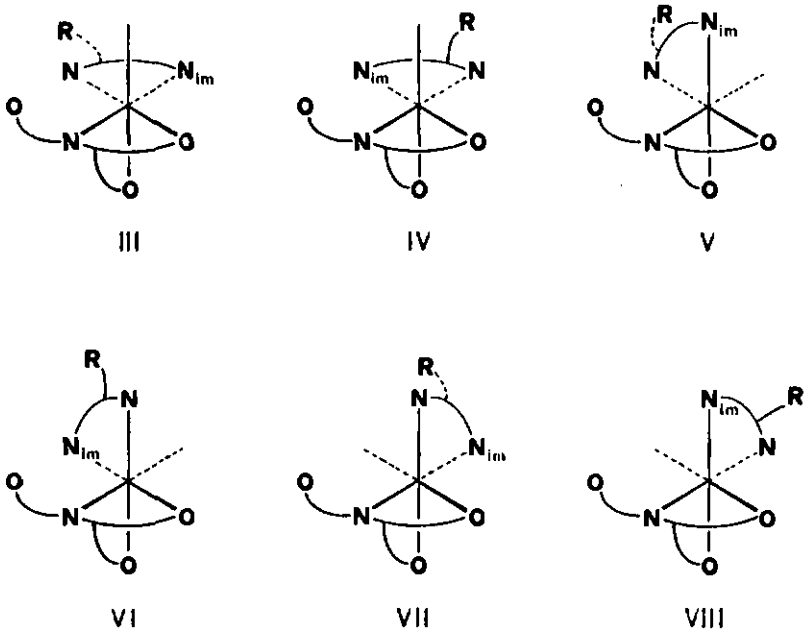
Dans tous les complexes du type CuN_xO_y dont la structure est connue, les atomes d'azotes sont situés dans le plan équatorial [3],[16],[22], on peut attribuer alors au complexe $[Cu(HL)((S)\text{-His})]^-$ la structure III. Dans le complexe $[CuL((S)\text{-His})]^{2-}$ le phénol se coordonne à la place du groupe amino qui doit se fixer dans une position axiale, peu favorable.

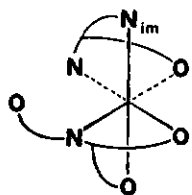
Fig.13 Structures des complexes mixtes de $S_N[Cu(S)\text{-Vasp}L']^{n-}$

13a $[CuLL']^-$ $L' = 1m$ ($R = -H$)

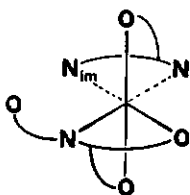


13b $[Cu(HL)L']^-$ $L' = (S)\text{-His}$ ($R = -COO^-$)

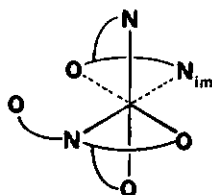




IX



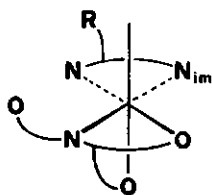
X



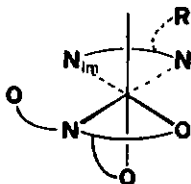
XI

13c [Cu(HL)L']⁻

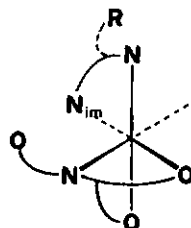
L' = (R)-His (R = -COO⁻)



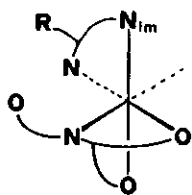
XII



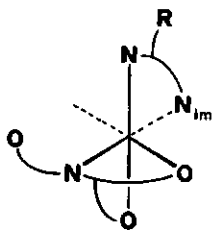
XIII



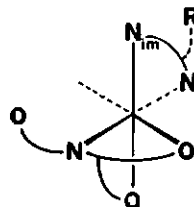
XIV



XV



XVI

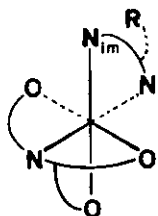


XVII

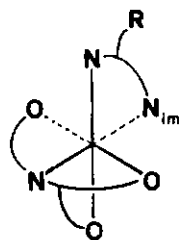
13d [Cu(HL)L']

L' = Hist, cf. L' = (S)-His,
struct. III à VIII (R = -H)

- 13e $[\text{CuLL}']^{n-}$ $L' = (S)\text{-His (R = -H), (R)\text{-His (R = -COO}^-),$
 Hist (R = -H)



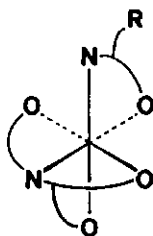
XVIII



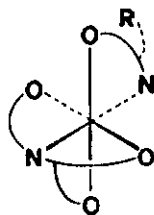
XIX

- 13f $[\text{CuLL}']^{2-}$ $L' = \text{N}\alpha\text{ac}(S)\text{-His, cf. } L' = \text{lm, struct.}$
 $\text{I et II (R = -CH}_2\text{-HC(NHCOCH}_3\text{)COO}^-)$

- 13g $[\text{CuLL}']^{2-}$ $L' = (S)\text{-Phe, (S)\text{-Val}}$

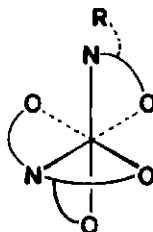


XX

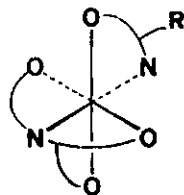


XXI

- 13h $[\text{CuLL}']^{2-}$ $L' = (R)\text{-Phe, (R)\text{-Val}}$



XXII



XXIII

La stéréosélectivité dans l'étape de la fixation du phénol est beaucoup plus faible que lors de la formation du complexe $[\text{Cu}(\text{HL})\text{L}']^-$ ce qui indiquerait que les structures des complexes $[\text{CuLL}']^{2-}$ sont identiques pour les deux isomères de l'histidine. Une isomérisation au moment de la fermeture du cycle phénolique, avec interversion des positions occupées par les atomes d'azote des groupes amino et imidazole de (R)- ou de (S)-histidine n'est pas exclue.

Pour les complexes $[\text{CuLL}']^{n-}$ avec $\text{L}' = (\text{S}), (\text{R})\text{-His, Hist}$ les deux structures XVIII et XIX sont possibles, elles nous paraissent probables l'une et l'autre.

Dans les structures XVIII et XIX les trois atomes d'azote et le métal sont situés dans un même plan CuN_3 auquel le phénol est perpendiculaire. La diminution de l'extinction à 416 nm observée lors des mesures spectrophotométriques pour les complexes mixtes de l'histidine et de l'histamine pourrait signifier que dans ces complexes le plan équatorial contient les trois atomes d'azote et que le phénol se trouve en position axiale donc plus éloigné du cuivre que dans le complexe $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$.

4.5.3. $\text{S}_\text{N}[\text{Cu}((\text{S})\text{-Vasp})((\text{R})\text{-His})]^{2-}$ (struct. XII à XVII fig.13)

Pour le complexe mixte $[\text{Cu}(\text{HL})\text{L}']^-$, six structures sont possibles, en éliminant celles où l'histidine est tridentée. La coordination du phénol est inhibée, comme avec (S)-His, mais nous n'avons pas pu déterminer si le groupe inhibiteur était le groupe amino ou le groupimidazole de (R)-His. Si l'on admet aussi que les atomes d'azote sont tous dans le plan équatorial il ne reste que deux structures possibles: XII et XIII.

Dans la structure XII le groupe carboxylate se trouve dans une position permettant très facilement sa coordination en position axiale, à la place d'une mo-

lécule d'eau. L'histidine serait alors tridentée et le complexe mixte formé devrait être plus stable que celui obtenu avec (S)-His ce qui n'est pas le cas. La structure XIII correspond à la forme la plus probable du complexe $[\text{Cu}(\text{HL})((\text{R})\text{-His})]^{2-}$.

Des facteurs stériques semblent intervenir dans la formation stéréosélective du complexe $[\text{Cu}(\text{HL})((\text{S})\text{-His})]^-$.

Dans le complexe mixte avec (R)-His, d'après la structure XIII, la compétition entre les cycles phénolique et imidazole pour la même position de coordination n'est stériquement pas favorable.

Structure du complexe $[\text{CuL}(\text{R})\text{-His}]^{2-}$ (cf. 4.5.2.)

4.5.4. $\underline{\text{S}_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspHist}]^-}$ (struct. III à VIII, fig.13, R=H)

Pour le complexe $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Hist}]$, six structures sont possibles. En reprenant les considérations faites pour (S)- et (R)-His, les structures V à VIII peuvent être éliminées. Il est assez difficile de dire laquelle des deux formes III ou IV prédomine. D'après le facteur stéréosélectif obtenu pour les énantiomères de l'histidine, la structure III devrait être un peu plus probable que l'autre.

Structure du complexe $[\text{CuLHist}]^-$ (cf. 4.5.2.)

4.5.5. $\underline{\text{S}_N[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}(\text{N}\alpha\text{ac}(\text{S})\text{-His})]^{2-}}$ (struct. I et II, fig.13 R= $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COO}^-$)

Le ligand secondaire n'est coordonné que par le groupe imidazole, deux structures sont possibles comme pour le complexe $[\text{CuLIm}]^-$. De nouveau on peut admettre que l'imidazole se trouve en position équatoriale (structure I) mais le cycle imidazole, à cause de l'encombrement stérique du groupe $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COO}^-$ ne peut

être coplanaire au plan équatorial. D'après les courbes de titrations acidimétriques, le complexe mixte est moins stable que celui obtenu avec l'imidazole.

4.5.6. $S_N[Cu(S)\text{-Vasp}((S)\text{-},(R)\text{-}L')]$ ²⁻ L' = Phe ou Val (struct. XX à XXIII fig.13)

Pour chacun des énantiomères de ces deux acides aminés, deux structures sont possibles.

Les structures XXI et XXI11, avec les deux atomes d'azote et l'oxygène phénolique dans le plan équatorial sont théoriquement les plus probables.

Ces deux structures ont le désavantage de ne pas expliquer par des effets stériques la stéréosélectivité observée avec ces deux acides aminés, alors que dans les structures correspondantes construites à partir de l'isomère $R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$, les modèles à calottes montrent une interaction stérique importante entre le groupe méthoxy en position ortho sur le noyau phénolique et les substituants des chaînes latérales de (R)-Val et (R)-Phe.

La stéréosélectivité de ce système indique que la formation des complexes mixtes de l'isomère $R_N[Cu(S)\text{-Vasp}]^-$ n'est pas exclue bien que la fixation en position axiale d'un bras carboxylate appartenant à un cycle à 5 membres ne soit pas très favorable dans les complexes de Cu(II) (cf. chapitre 3). La stéréosélectivité d'un système ne peut toutefois être réduite uniquement à des facteurs stériques.

4.6. Tableau récapitulatif: Constantes de stabilité de
 $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ et $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$

Complexes	$K_{\text{MHL}}^{\text{M}}$	K_{ML}^{M}	$K_{\text{MLOH}}^{\text{ML}}$
$[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$	$4,00.10^8$	$4,17.10^{15}$	$1,59.10^3$
$[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{n-}$	$K_{\text{M}(\text{HL})\text{L}'}^{\text{MHL}}$	$K_{\text{MLL}'}^{\text{ML}}$	
L' = Im		$1,38.10^3$	
Hist	$2,69.10^9$	$3,71.10^4$	
(S)-His	$1,59.10^9$	$1,45.10^4$	
(R)-His	$1,08.10^9$	$1,15.10^4$	
(S)-Phe		$8,50.10^2$	
(R)-Phe		$4,75.10^2$	
(S)-Val		$1,52.10^3$	
(R)-Val		$0,78.10^3$	

5. REACTIVITE DU SYSTEME $[CuLL']^{n-}$ EN PRESENCE D'OXYGENE
 =====
 MOLECULAIRE
 =====

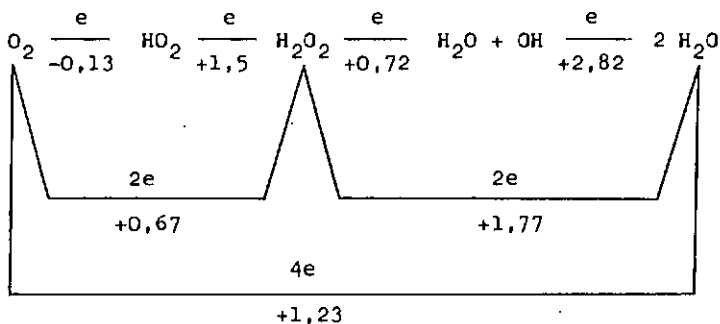
5.1. Introduction

5.1.1. La molécule d'oxygène [6],[24],[25]

L'atome d'oxygène a une configuration électronique $1s^2 2s^2 2p^4$. Deux atomes d'oxygène se combinent en formant des orbitales moléculaires. A l'état fondamental deux électrons se trouvent dans des orbitales antiliantes π^* . Les états excités les plus proches sont obtenus par une redistribution des électrons dans ces orbitales π^* .

L'oxygène possède une énergie d'ionisation élevée (13,6 eV), F_2O est la seule molécule où l'oxygène est sous forme cationique. L'existence des particules O_2^- et O_2^{2-} est prédite par la théorie des orbitales moléculaires : un ou deux électrons peuvent s'introduire dans les orbitales π^* .

La chimie de l'oxygène est caractérisée par son grand pouvoir oxydant et par son inertie cinétique. Sa réduction peut s'effectuer en une seule étape à 4 électrons ou en plusieurs stades à 1 ou 2 électrons.



Lors de la réduction totale $O_2 + 4 H^+ + 4 e \longrightarrow 2 H_2O$, la liaison entre les deux atomes d'oxygène doit être rompue à l'une ou l'autre des phases de la réaction. La formation intermédiaire de H_2O_2 est plus favorable d'un point de vue énergétique [6].

Dans la chimie de coordination l'oxygène peut agir comme ligand et comme réactant. La nature des liaisons dans les complexes métal-oxygène dépend des niveaux d'énergie relatifs des orbitales de valence du métal et des orbitales π et π^* de l'oxygène. Les autres ligands fixés sur le métal peuvent influencer le niveau d'énergie de ses orbitales et modifier ainsi son mode d'action envers l'oxygène [25].

Dans la plupart des systèmes enzymatiques réagissant avec l'oxygène un ion métallique est présent (Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}).

Plusieurs mécanismes peuvent être postulés pour ces réductions enzymatiques. De façon tout à fait générale, on admet que le métal "réunit" le substrat et l'oxygène et permet un transfert d'électrons entre les deux partenaires grâce à ses électrons facilement délocalisables. La protéine forme avec le métal un complexe très stable et modifie les propriétés redox de l'ion métallique.

La recherche de modèles chimiques imitant les systèmes naturels intéressent de nombreux chercheurs. Les réactions d'oxydation les plus diverses catalysées par des métaux ont été étudiées [5],[6],[47].

5.1.2. Réactions d'oxydation non-enzymatiques catalysées par le Cu(II)

5.1.2.1. Oxydation par l'oxygène

L'hydroxylation de phénols en ortho-quinones cataly-

sée par un complexe Cu(II)-morpholine est décrite par W.Brackmann et E.Havinga [26]. Ces auteurs ont cherché un système capable de reproduire l'action de la tyrosinase : hydroxylation spécifique de la tyrosine en position ortho par l'oxygène. Dans le modèle de Brackmann et Havinga, l'agent oxydant actif est H_2O_2 (la réaction est inhibée par la catalase) alors que dans les systèmes naturels c'est l'oxygène.

L'oxydation et la polymérisation de dérivés phénoliques catalysées par des complexes Cu(I)-amine ou Cu(II)-amine ont été étudiées par C.F.Endres [27], H.Finkbeiner [28] et S.Tsuruya [29].

K.Wüthrich et S.Fallab ont examiné l'oxydation de l'orthophénylènediamine (H_2B) par l'oxygène en présence de Cu(II) [49],[50]. La cinétique de la réaction montre que l'espèce réactive est un complexe ternaire $(H_2B)_2Cu^{2+}(O_2)$. La formation de ce complexe détermine la vitesse de la réaction. Le transfert d'électron entre H_2B et O_2 est possible par l'intermédiaire du métal. La réaction est accélérée par la présence de ligands monodentés tels que Cl^- , Br^- , NH_3 , pyridine ou imidazole. L'effet de ces ligands est cinétique (formation d'un complexe mixte réactif $(H_2B)Cu^{2+}(L')$) et thermodynamique (stabilisation du métal à l'état d'oxydation Cu(I)).

L'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène en présence de Cu(II) a été observé par A.E.Martell [51].

R.Jameson et al [30],[31],[32] ont effectué une étude plus approfondie de cette réaction.

Selon ces auteurs, les espèces cinétiquement actives sont des dimères permettant un transfert simultané de deux électrons à l'oxygène via la formation de deux unités Cu(III)-ascorbate. La cinétique de la réaction dépend aussi de la nature et de la concentration de l'électrolyte de base.

Des complexes du Cu(III)-tétra glycine stables en milieu aqueux sont mentionnés par D.W.Margerum [33], [34]. L'existence de tels complexes suggère une voie métabolique permettant l'activation de la molécule d'oxygène lors de l'oxydation des peptides dans les systèmes biologiques. L'apparition d'une bande d'absorption intense à environ 365 nm est caractéristique de la présence de Cu(III) [33].

5.1.2.2. Réactions avec H_2O_2

Les oxydations du catéchol et de l'o-phénylénediamine par H_2O_2 sont catalysées par le Cu(II) [35],[36]. La formation d'un complexe Cu(II)- H_2O_2 a été démontrée dans les deux cas. La décomposition catalatique ou la réduction de H_2O_2 en présence de complexes du Cu(II) avec des ligands aminés ont intéressé plusieurs groupes de chercheurs [37],[38],[39]. Dans ces réactions le ligand aminé simule le rôle de la protéine en formant un complexe très stable avec l'ion métallique sur lequel se fixent une ou deux molécules de H_2O_2 . Le transfert d'électrons se fait par l'intermédiaire du métal [38].

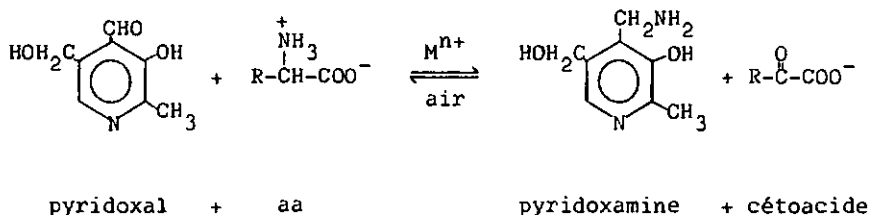
H.Erlenmeyer [40] introduit en plus dans le système un ligand secondaire, hydrazine ou hydroxylamine. La particule réactive est alors un complexe ternaire $[LCuL'H_2O_2]$, le ligand secondaire participe à la réaction, il est oxydé en N_2 .

H. Sigel [41] a montré que la présence de positions de coordination libres est nécessaire à l'activité catalatique des complexes aminés du Cu(II).

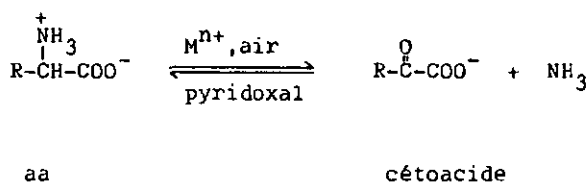
5.1.2.3. Transaminations et oxydations désaminatives

M.Ikawa [42] et D.E.Metzler [43] ont étudié les réactions suivantes :

a) transamination [43]



b) oxydations désaminatives [42]



Les réactions a) et b) se déroulent à 100°C en présence d'un ion métallique ; le Cu²⁺ est le catalyseur le plus efficace. Le pH optimum est situé entre 4 et 5 pour les réactions de transamination.

Les oxydations désaminatives ont lieu de préférence en milieu basique (pH > 9,6). La formation des cétoacides dérivés de Gly, Val et Glu a été démontrée, le cétoacide provenant de l'histidine est décomposé dans les conditions expérimentales utilisées. Le dégagement de NH₃ mesuré correspond à la concentration d'acide aminé transformé. La présence de pyridoxal accélère la réaction, il est partiellement consommé au cours de la réaction.

L'étape oxydative comprend la formation d'un complexe acide aminé-métal-pyridoxal. Un changement de valence du métal n'a pas pu être prouvé.

A.E.Martell et M.Calvin pensent que ces systèmes sont des modèles intéressants pour l'étude de l'oxydation enzymatique des amines [44].

5.2. Observations générales

Une solution aqueuse d'un mélange équimolaire de Cu^{2+} , (S)-Vasp, L' brunit plus ou moins rapidement en présence d'oxygène, en milieu basique.

Après une période d'induction de longueur variable selon L', on observe un changement important du spectre de la solution avec une augmentation de l'absorption dans tout le domaine du visible.

La réaction n'a pas lieu sous azote, en absence de ion métallique ou avec un ligand ne possédant pas de groupe phénolate.

Le Cu(II) est un catalyseur beaucoup plus efficace que Ni(II) ou Zn(II) .

La vitesse de la réaction dépend du pH et de la nature du ligand secondaire. Les produits formés varient également suivant L'.

Une analogie existe entre les phénomènes observés et les oxydations phénoliques dans les systèmes naturels. On peut alors se demander si le système décrit constitue un modèle chimique capable d'imiter l'action des phénoloxydases.

Une étude plus approfondie de la cinétique de la réaction est nécessaire pour répondre à cette question.

5.3. Cinétiques au spectrophotomètre

La cinétique de la réaction peut être suivie facilement au spectrophotomètre. La variation de l'absorption en fonction du temps est relevée à 500 nm afin de rester jusqu'à la fin de la réaction dans le domaine de mesure de l'appareil.

Conditions de mesures

Les cinétiques ont été effectuées dans une cuve Metrohm thermostatée à 25°C. Les différents réactants sont mélangés dans les proportions désirées en pipétant les quantités nécessaires dans des solutions de réserve. La concentration initiale des réactants est généralement comprise entre $1,0 \cdot 10^{-3}M$ et $1,3 \cdot 10^{-3}M$. Le pH du mélange est ajusté à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium et maintenu constant durant toute la réaction par un pH-stat. Un courant d'oxygène barbote à travers la solution. On prend le spectre du mélange réactionnel entre 700 et 380 nm, à des intervalles de temps variables selon la vitesse de la réaction.

5.3.1. Essais d'orientation

Dans une première série de mesures la stabilité des différents constituants du système en milieu basique et en présence d'oxygène a été examinée ainsi que la vitesse d'hydroxylation sur les positions para ou méta du noyau phénolique.

Cinétiques préliminaires

conditions : pH = 11,0 , O₂ , réactants en quantité équimolaire

systèmes étudiés

- | | |
|----------------------|-------------------------------|
| 1 (S)-Vasp | 3 Cu ²⁺ , (S)-Vasp |
| 2 (S)-Vasp , (S)-His | 4 Cu ²⁺ , (S)-His |

- 5 Cu^{2+} , (S)-His , phénol
- 6 Cu^{2+} , (S)-His , pentachlorophénol
- 7 Cu^{2+} , (S)-His , 3,5 diBr(S)-Sasp

Les cinétiques de 1 à 4 permettent de vérifier que la réactivité du système en présence d'oxygène est maximum lorsque les trois partenaires : métal, ligand principal, ligand secondaire sont présents, bien que le système ne soit pas inerte en absence de ligand secondaire (cf. tableau 5.3.2).

Le mélange Cu^{2+} , (S)-His se décompose lentement, la solution initialement bleue devient verdâtre, un léger précipité brun, floconneux apparaît après une période de 2 à 3 jours. Cette décomposition de solutions de Cu^{2+} et d'histidine en milieu basique a déjà été observée [45] et étudiée [46]. Sa vitesse est fonction de la concentration des réactants. La réaction est très lente pour les concentrations (10^{-3}M) avec lesquelles nous travaillons et n'interfère pas avec la réaction d'oxydation du système.

Les cinétiques en présence de phénol ou de 3,5 diBr(S)-Sasp montrent que la coordination oriente le phénol dans une position plus favorable à l'attaque de la molécule d'oxygène et que la position para est beaucoup plus réactive que les positions méta.

Le système contenant le pentachlorophénol évolue de la même façon que le mélange Cu^{2+} , (S)-His car l'hydroxylation sur le noyau phénolique est impossible.

Les résultats donnent une image encore assez imprécise de la réactivité du système. Un certain nombre de facteurs influençant la réaction ont été examinés plus attentivement.

5.3.2. Influence du ligand secondaireTableau 5.3.2 Cinétiques pour différents ligands L'

Conditions : pH = 11,0 , O₂ , réactants en quantité équimolaire

L'	v _E [min ⁻¹]	i _E [min]	E _{final}
-	8,3 .10 ⁻⁴	250	0,38
(S)-Phe	2,7 .10 ⁻³	285	0,88
(S)-Val	3,7 .10 ⁻³	230	-
(S)-His	5,3 .10 ⁻²	20	1,74

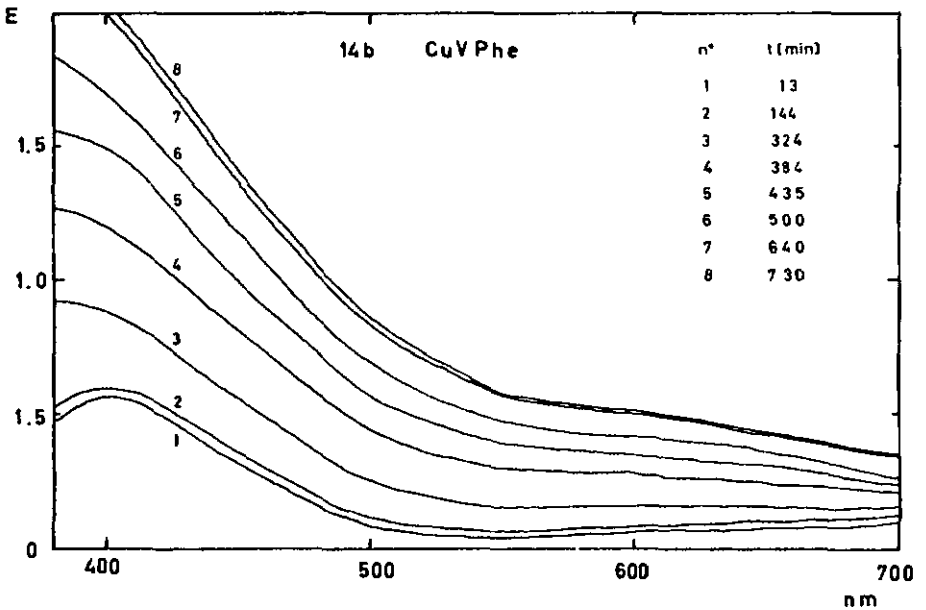
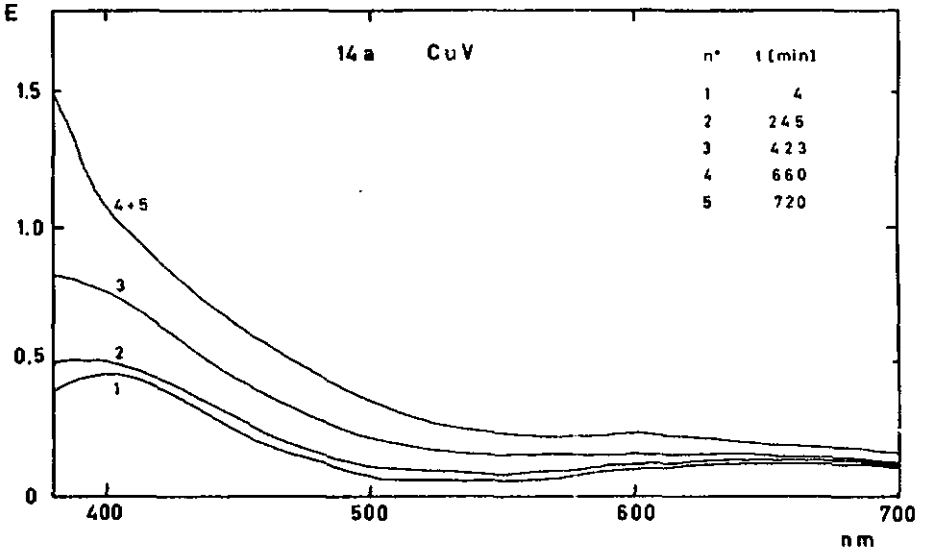
v_E = dE/dt variation de l'absorption à 500 nm en fonction du temps (cf.fig.15)

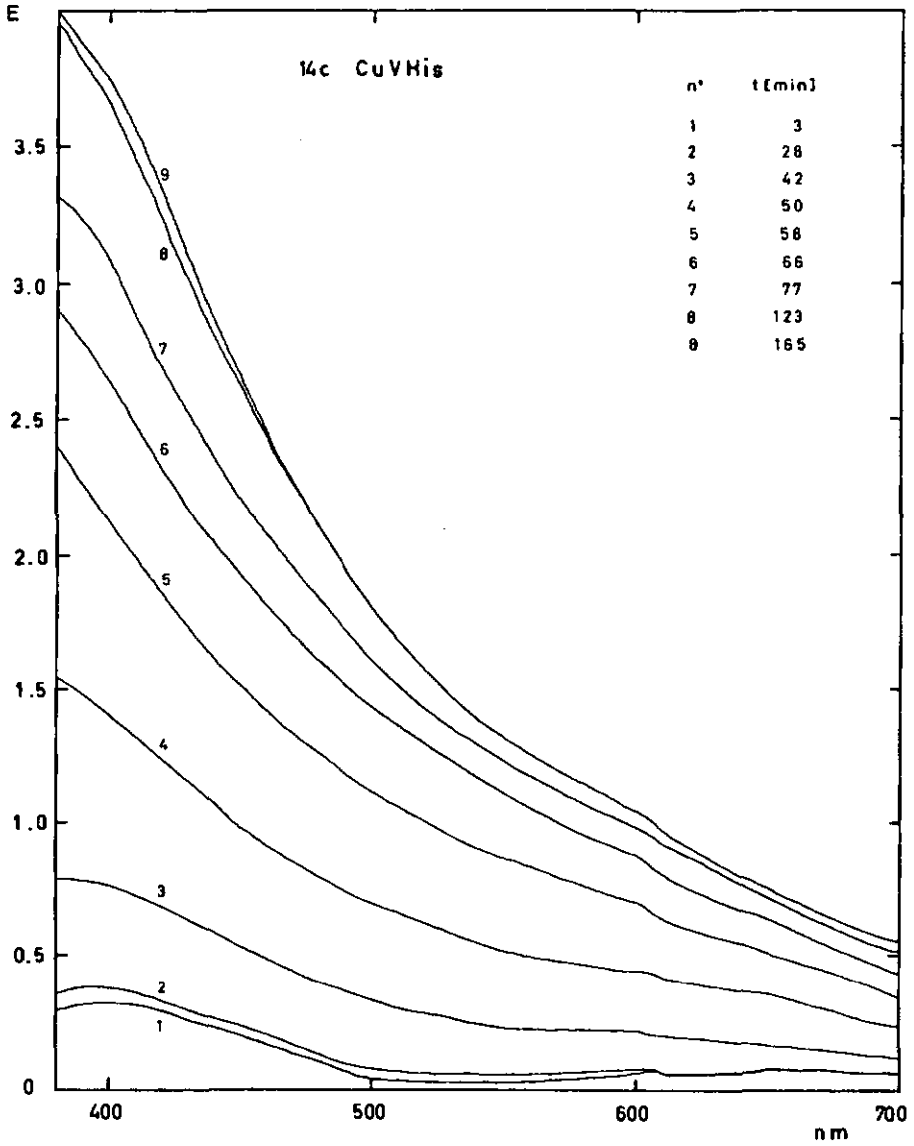
i_E : période d'induction

Dans la fig.14 nous donnons à titre d'exemple la variation des spectres d'absorption pendant l'oxydation pour les systèmes Cu²⁺, (S)-Vasp (CuV), Cu²⁺, (S)-Vasp, (S)-Phe (CuVPhe) et Cu²⁺, (S)-Vasp, (S)-His (CuVHis), la concentration initiale est de 1,2 .10⁻³ M pour chacun des réactants dans les trois systèmes. La variation de l'absorption à 500 nm en fonction du temps pour ces trois systèmes est représentée dans la fig.15. L'histidine est le ligand secondaire qui augmente le plus la réactivité du système en agissant sur la période d'induction, sur la vitesse de la réaction et sur la nature des produits obtenus (cf.tableau 5.3.2).

Une étude plus approfondie de la cinétique de la réaction avec l'histidine a été entreprise, en variant d'autres paramètres (pH, concentration globale, concentration en histidine).

Fig.14 Oxydation de CuVL': variation des spectres visibles en fonction du temps





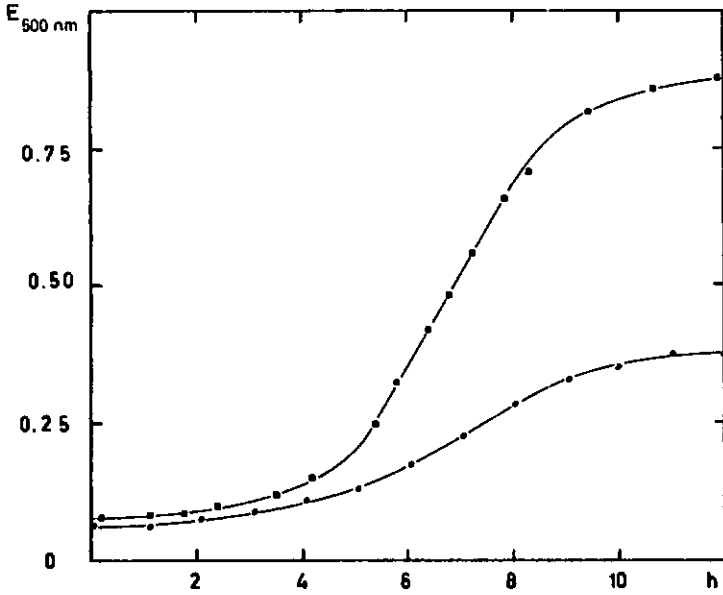
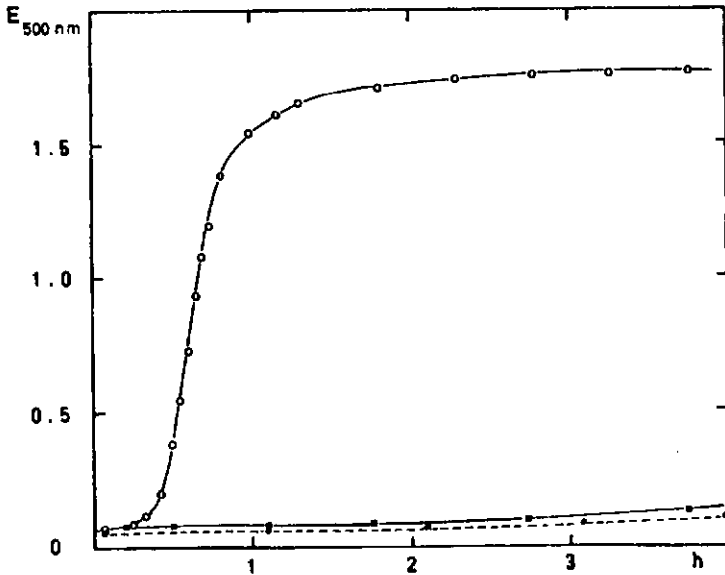


Fig.15 Oxydation de CuVL'

● CuV , ■ CuV(S)-Phe , ○ CuV(S)-His .



5.3.3. Réactivité du système avec l'histidine

5.3.3.1. Influence du pH

Tableau 5.3.3.1 Cinétiques CuVHis à différents pH

Conditions : O_2 , réactants en quantité équimolaire

pH	v_E [min ⁻¹]	i_E [min]	$v_{[OH]}$ [m.l ⁻¹ .min ⁻¹]	$i_{[OH]}$ [min]
7,8	$2,1.10^{-4}$	1680	*	-
9,1	$2,6.10^{-3}$	345	$7,0.10^{-4}$	186
10,2	$1,8.10^{-2}$	55	$6,5.10^{-3}$	60
11,0	$5,3.10^{-2}$	20	$2,0.10^{-2}$	20

* : cf. remarque

$v_{[OH]} = d[OH]/dt$: consommation de base en fonction du temps

$i_{[OH]}$: période d'induction se rapportant à la consommation de base

Remarque : la réaction à pH 7,8 ne consomme pas de base. Le système n'évolue pas comme les autres et ne peut être comparé avec eux.

Les graphes de la variation de l'absorption ou de la consommation de base en fonction du temps sont donnés dans les fig.16 et 17 pour trois valeurs de pH. La longueur de la période d'induction est inversement proportionnelle à la concentration en ions hydroxyles. Une particule dont la concentration augmente en milieu basique réduit le temps de latence. L'étude de la composition du système en fonction du pH effectuée au chapitre précédent (cf.4.3. fig.10) montre que cette particule peut être l'hydroxycomplexe ou le complexe mixte.

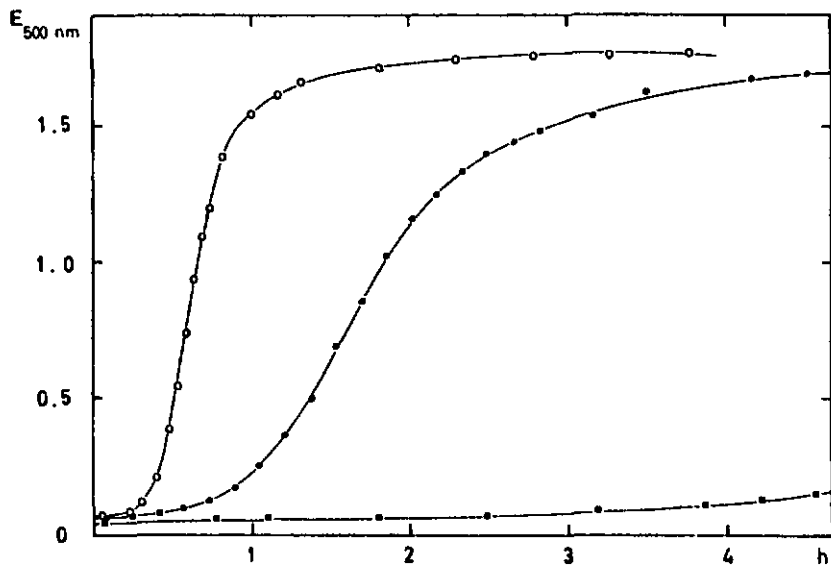
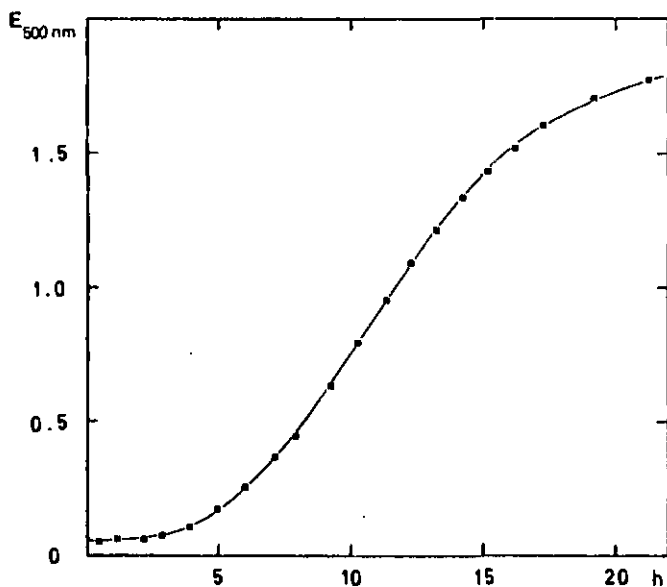


Fig.16 Oxydation de CuVHis : influence du pH

○ pH = 11,0 , • pH = 10,2 , ■ pH = 9,1



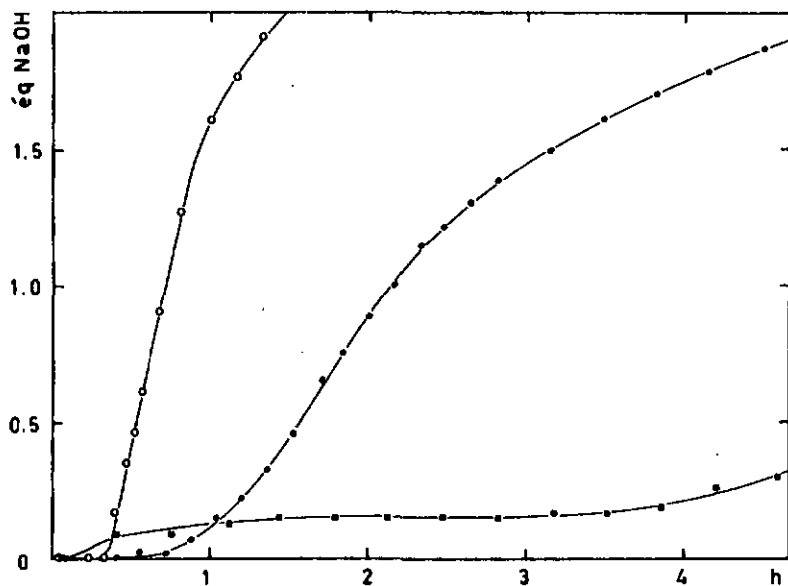
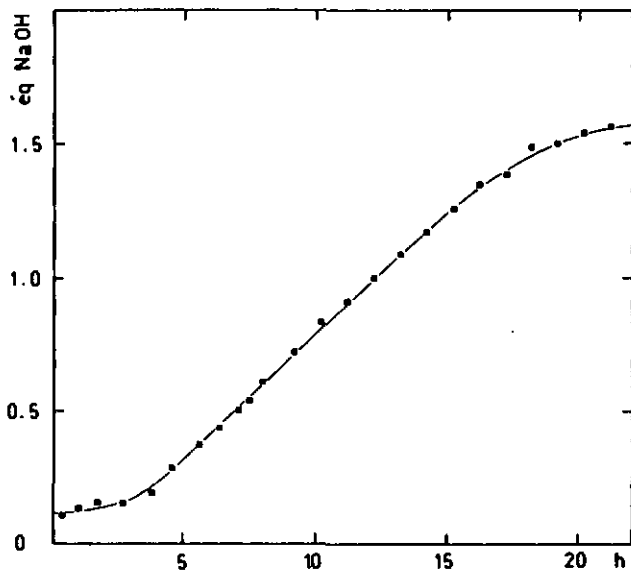


Fig.17 Oxydation de CuVIIis : influence du pH
○ pH = 11,0 , • pH = 10,2 , ■ pH = 9,1



S'il s'agissait de l'hydroxycomplexe, des ions hydroxyles seraient consommés pendant la période d'induction également en milieu basique. Une intervention du complexe mixte durant la période d'induction est probable.

5.3.3.2. Variation de la concentration globale des réactants

Des cinétiques ont été effectuées à pH=11,0 , sous O₂ (solution saturée à 25°C) pour quatre concentrations initiales de Cu²⁺, (S)-Vasp et (S)-His :

$$C_i = 5,60 \cdot 10^{-4} \text{ M} ; 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ M} ; 2,10 \cdot 10^{-3} \text{ M} ; 7,85 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

La vitesse de la réaction est linéairement proportionnelle à la concentration globale des réactants pour les trois premières valeurs de C_i. Un ralentissement de la réaction est observé pour C_i = 7,85.10⁻³M, sans influence sur la quantité (déterminée par la mesure de E_{final} pour les quatre systèmes) de produit formé. L'oxygène pourrait être ici le facteur limitatif. La période d'induction n'est pas influencée par la concentration globale, elle est donc déterminée par la composition du système à un pH donné.

5.3.3.3. Variation de la concentration en histidine

Tableau 5.3.3.3 Cinétiques pour différentes concentrations en histidine, en excès et en défaut

Conditions : pH = 11,0 , O₂

Cu ²⁺ :V:His	v _E [min ⁻¹]	i _E [min]
1:1: 0	8,3 .10 ⁻⁴	250
1:1: 0,02	5,0 .10 ⁻³	-
1:1: 0,066	1,4 .10 ⁻²	-
1:1: 0,66	4,7 .10 ⁻²	20
1:1: 1	5,3 .10 ⁻²	20
1:1: 4	8,5 .10 ⁻³	75
1:1:10	1,3 .10 ⁻³	90

En présence d'un excès d'histidine la formation du complexe $[\text{Cu}(S)\text{-Vasp}]^-$ est plus faible ce qui se manifeste par une diminution de l'absorption à 416 nm. Le brunissement de la solution est plus lent, la période d'induction augmente, (cf. fig. 18). Un défaut d'histidine modifie la cinétique de la réaction (cf. fig. 18). Les spectres se rapprochent de ceux obtenus lors de l'oxydation de Cu^{2+} , (S)-Vasp en absence de ligand secondaire au fur et à mesure que la concentration en histidine diminue.

5.3.4. Bilan

Le système n'est pas simple, les données cinétiques ne peuvent être interprétées directement.

Un intermédiaire réactif, nécessaire à la continuation du processus est formé pendant la période d'induction.

Le brunissement intense de la solution est accompagné d'une consommation en ions hydroxyles qui continue après que le spectre d'absorption ne varie plus. A ce stade de l'oxydation, plusieurs réactions en chaîne semblent avoir lieu simultanément, les vitesses de formation et de consommation du produit brun étant égales (état stationnaire). L'hydroxylation du noyau phénolique peut être suivie d'une polymérisation. La formation d'une quinhydrone est aussi possible : lorsqu'elle est acidifiée la solution passe du brun au jaune-orange, un précipité de couleur foncée (polymère) apparaît également. La quantité de précipité formé dépend de la durée de l'oxydation et de la composition initiale du système.

Le polymère n'a pas pu être identifié, sa nature diffère selon le ligand secondaire présent dans la solution.

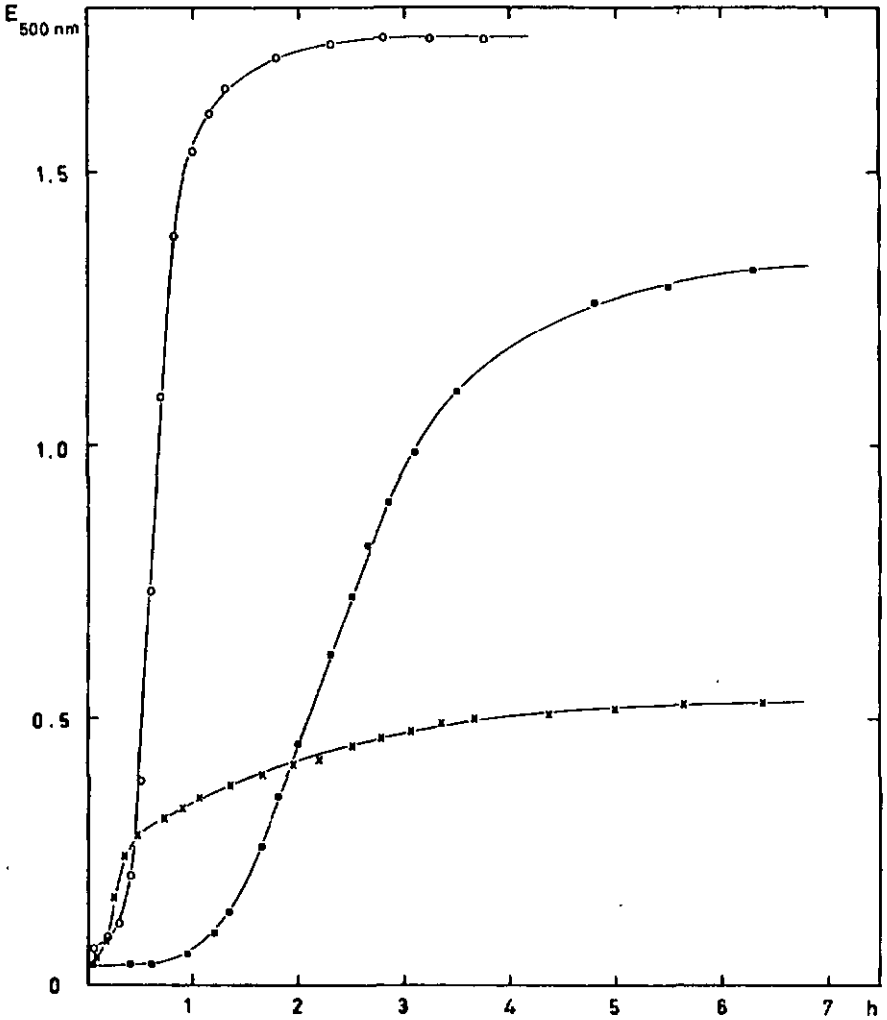


Fig.18 Oxydation de CuVHis : influence de l'histidine

○ CuVHis 1:1:1 , ● CuVHis 1:1:4 ,
* CuVHis 1:1:0,066

Notre intérêt s'est davantage porté sur le début de la réaction, plus particulièrement sur la période d'induction, que sur la polymérisation qui nous paraît assez complexe.

5.4. La période d'induction

Des périodes d'induction ont été observées dans d'autres réactions d'oxydation catalysées par le Cu(II) [26],[32],[49]. Ces périodes d'induction ne représentent pas le même phénomène et sont expliquées de manières différentes pour chacun des systèmes étudiés. Dans le modèle de Brackmann et Havinga [26] la période d'induction concerne la consommation en oxygène et correspond à la formation de H_2O_2 qui est le véritable agent oxydant du noyau phénolique.

Lors de l'oxydation de l'o-phénylénédiamine [49], une période d'induction est observée en fonction de l'apparition du produit de la réaction. Les auteurs l'attribuent à la formation d'un complexe mixte métal-substrat-oxygène qui est un intermédiaire réactif. Notre système présente une période d'induction par rapport à l'augmentation de l'absorption de la solution dans le domaine du visible et par rapport à la consommation de base (cf.5.3.1.).

Cette période dépend de la composition du système à un pH donné, elle est influencée par le ligand secondaire.

Les questions suivantes peuvent être posées :

- Est-ce que H_2O_2 intervient à l'une ou l'autre des étapes de la réaction ?
- L'oxygène est-il nécessaire pendant la période d'induction ?
- Comment le ligand secondaire peut-il agir sur la durée de la période d'induction ?

5.4.1. Rôle de H_2O_2

La réactivité du système CuVHis, à pH = 11 et en présence d'oxygène n'est pas inhibée par la catalase. L'activité catalatique de l'enzyme dans les conditions expérimentales a été vérifiée préalablement.

Si H_2O_2 était un produit intermédiaire formé pendant la réaction, elle devrait réagir plus rapidement avec le système CuVHis qu'avec la catalase, ce qui paraît peu probable.

5.4.2. Rôle de l'oxygène

Des essais qualitatifs ont été effectués avec le système CuVHis à pH = 11 afin de déterminer la consommation éventuelle d'oxygène pendant la période d'induction.

Le mélange réactionnel a été mis d'abord sous azote (aucune variation du spectre d'absorption de la solution n'est alors observée) puis après environ 30 minutes, de l'oxygène est introduit dans la solution. Le brunissement de la solution est aussi précédé d'une période d'induction, de longueur semblable à celle que l'on observe lorsque le système est mis directement sous O_2 . L'oxygène intervient donc pendant la période d'induction.

On a constaté également une augmentation d'environ 10% de l'absorption à 290 nm correspondant à l'ion phénolate pendant la période d'induction. Cet accroissement pourrait être attribué à la formation de diphénol qui serait un intermédiaire réactif nécessaire à la continuation de la réaction.

L'hydroxylation en position ortho du 3,4 diméthylphénol par O_2 et à l'aide d'une phénoloxydase nécessite la présence d'une coenzyme ADP ou ATP pour réduire

le deuxième atome d'oxygène [48]. En absence de la co-enzyme, le diphenol lui-même fonctionne en tant que donneur d'électrons, on observe alors une période d'induction jusqu'à ce que suffisamment de diphenol ait été produit [6].

5.4.3. Rôle du ligand secondaire

D'après les résultats obtenus le ligand secondaire participe à la réaction en diminuant la période d'induction et en augmentant la vitesse de la réaction. C'est avec l'histidine que ces deux effets sont le plus marqués.

Le ligand secondaire peut fonctionner comme donneur d'électron [48]. La désamination oxydative d'acides aminés donnant le cétoacide correspondant et de l'ammoniac a été observée par D.E.Metzler [43], la réaction est catalysée par le Cu(II). Le ligand secondaire, d'autre part, permet la formation d'un complexe mixte dont la réactivité vis à vis de l'oxygène peut être supérieure à celle du complexe $[Cu(S)-Vasp]^-$. On sait en particulier que la fixation de l'oxygène sur l'hème dans l'hémoglobine est favorisée par la présence d'imidazole en position trans [25].

La concentration élevée en complexe mixte, à pH = 11, dans le système contenant de l'histidine (cf.fig.10) et la présence d'un résidu imidazole dans la chaîne latérale de cet acide aminé devrait faciliter la formation du complexe ternaire $[CuLL'O_2]^{n-}$ (cf.fig.20).

Pendant l'oxydation à pH = 11 du système CuVHis, nous avons pu constater :

- a) une disparition de l'histidine
- b) un dégagement de NH_3

- a) Des aliquots sont prélevés dans le mélange réactionnel en fonction du temps. Ils sont acidifiés pour interrompre la réaction et déposés sur une plaque à chromatographie sur couche mince (cf. fig. 19).

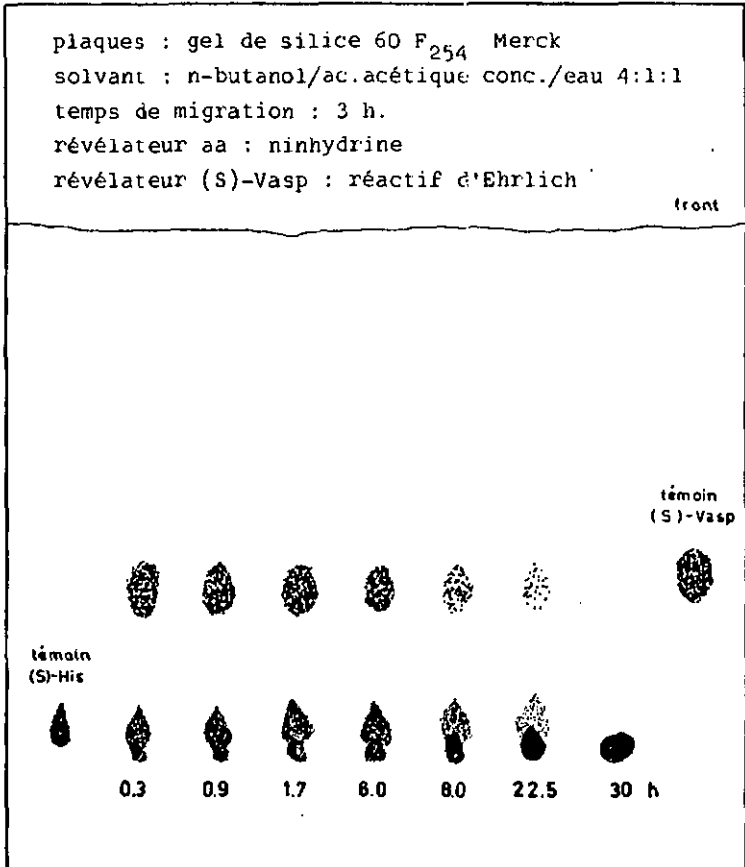


Fig.19 CCM de CuVHis pendant l'oxydation

Le chromatogramme montre que l'histidine et le (S)-Vasp sont consommés quantitativement pendant l'oxydation mais ils ne sont plus détectés (par la ninhydrine ou le réactif d'Ehrlich) qu'au bout de 24 heures seulement. La réaction ne s'arrête donc pas lorsque la variation d'absorption des spectres est terminée.

- b) Le NH_3 dégagé pendant la réaction est recueilli dans une solution de HCl de concentration connue. La quantité d'acide neutralisée est égale à la quantité de NH_3 dégagée. L'identification spécifique du NH_3 est effectuée par le test de Nessler.

Tableau 5.4.3 Dégagement de NH_3 pendant l'oxydation du système CuVHis

Temps de réaction [min]	Test de Nessler	Rendement en NH_3
120	+	13%
210	+	25%
480	+	28%

Le dégagement de NH_3 est certain mais la quantité mesurée reste nettement inférieure à la quantité théorique.

Il n'est toutefois pas impossible que le NH_3 fourni soit consommé ensuite dans une autre étape de la réaction.

5.5. Mécanisme réactionnel

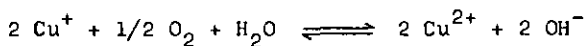
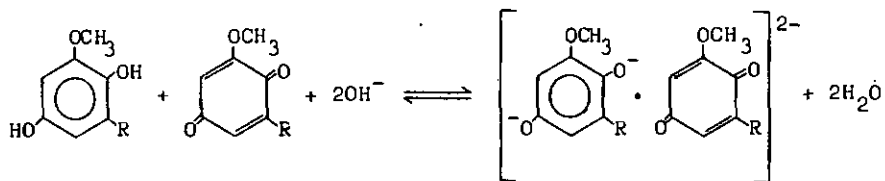
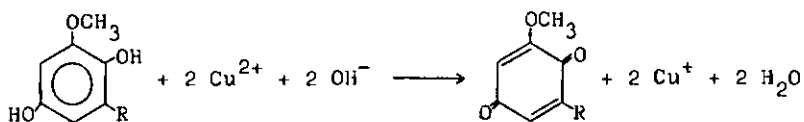
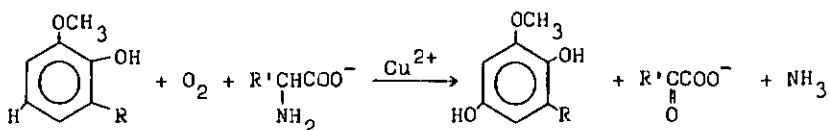
Sur la base des résultats obtenus il n'est pas possible de proposer un mécanisme réactionnel définitif. L'interprétation est rendue particulièrement difficile par la présence dans le système de réactions en chaîne aboutissant à des substances d'un degré de polymérisation plus ou moins élevé (cf. 5.3.4. et 5.4.3.). Les essais d'identifications des produits obtenus - dialysés et chromatographiés par filtration sur gel (Sephadex G25 et G100) - mettent en évidence la nature polymère de ces produits. Bien que les résultats ne soient pas toujours indiscutables et puissent être interprétés de manières différentes, nous proposons comme hypothèse de travail un mécanisme représenté par le schéma réactionnel donné ci-contre.

5.5.1. Discussion

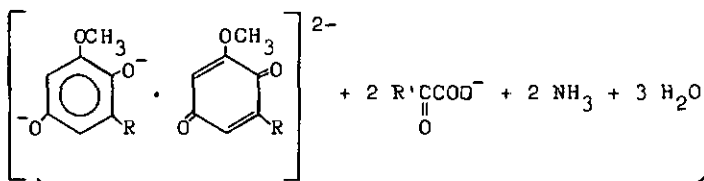
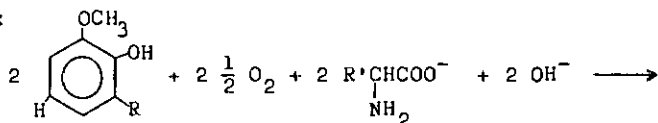
Le schéma réactionnel est en accord avec l'observation d'une période d'induction car le diphenol formé doit ensuite réagir lui-même en tant que donneur d'électrons. Un cas analogue a été mentionné plus haut [6]. Pendant la période d'induction la molécule d'oxygène intervient simultanément dans deux réactions : une hydroxylation et une désamination oxydative. La construction de modèles, à partir des structures des complexes mixtes discutées au chapitre précédent (cf. 4.5.fig.13), montre que la fixation de la molécule d'oxygène sur le complexe mixte lui permet de réagir en même temps avec le noyau phénolique et avec le groupe amino de l'acide aminé (cf. fig.20).

La présence d'un groupe imidazole en position trans paraît augmenter la réactivité du complexe mixte vis à vis de l'oxygène : la période d'induction est raccourcie lorsque le ligand secondaire est l'histidine mais elle n'est pas supprimée car la formation d'une certaine quantité

Schéma réactionnel



Bilan:



\downarrow
 OH^-
 polymérisation

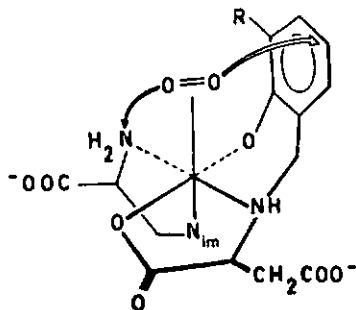


Fig.20 Structure du complexe ternaire
 $[\text{Cu}((\text{S})\text{-Vasp})((\text{S})\text{-His})\text{O}_2]^{2-}$

de diphénol reste nécessaire à la continuation de la réaction [6],[50]. Le schéma réactionnel tient aussi compte du fait qu'une même période d'induction est observée par rapport au changement du spectre visible et à la consommation en ions hydroxydes.

Il est évident que le mécanisme proposé devra être vérifié par des investigations supplémentaires. Il sera en particulier très important de déterminer la quantité d'oxygène consommé au moyen d'une électrode spécifique. Le changement d'état d'oxydation du métal devrait aussi être confirmé, à l'aide de mesures de RPE, par exemple.

5.6. Conclusions

Peut-on trouver une relation entre le système décrit et l'activité biologique du Cu(II) ?

L'oxydation du noyau phénolique suivie de la formation de produits polymères de couleur foncée fait penser à la biosynthèse de la mélanine chez les plantes et les animaux. La réaction est catalysée par la tyrosinase ou polyphénoloxydase qui est une cuproprotéine. Cette enzyme a une double fonction : hydroxylation de la tyrosine en position ortho et déshydrogénation du catéchol en orthoquinone. On ne sait pas encore si ces deux réactions sont effectuées par deux centres actifs situés à des endroits distincts le long de la chaîne peptidique ou par le même centre actif. La présence d'un cofacteur ne semble pas nécessaire [7].

Dans notre modèle l'oxygène intervient également dans une désamination oxydative. On trouve des réactions analogues dans les systèmes naturels, elles sont aussi catalysées par des cuproprotéines : les amines oxydases en présence d'un cofacteur, le PLP (pyridoxalphosphate).

Il est difficile de dire si le système étudié doit être considéré comme un modèle chimique d'une réaction du type "phénoloxydase" (hydroxylation de phénols) ou du type "amine oxydase" (désamination oxydative). Il serait utile d'examiner si l'acide aminé peut être remplacé par un autre donneur d'électrons, tel l'acide ascorbique ou une quinone (par exemple) qui sont les cofacteurs de certaines phénoloxydases [6].

Le système étudié est intéressant du fait même de sa relative complexité. A notre connaissance aucun modèle semblable n'a été découvert jusqu'à maintenant.

L'idée force du modèle réside dans la formation quantitative d'un complexe métal-ligand phénolique qui permet une orientation précise du noyau phénolique. La coordination faciale de l'unité Asp du ligand principal influence la position du phénol tandis que le ligand secondaire, surtout l'histidine, favorise la fixation de la molécule d'oxygène sur le complexe mixte.

Dans les systèmes naturels la protéine remplit aussi ces deux conditions. L'existence d'une analogie structurale entre le modèle chimique et les systèmes naturels pourrait être envisagée.

Cette incursion dans le domaine de la "biochimie inorganique" ou de la "chimie bioinorganique" nous a montré le grand intérêt d'une telle approche des systèmes naturels. L'extrapolation des résultats obtenus à l'aide des modèles chimiques, aux réactions biologiques "in situ" demeure cependant délicate à cause de la "simplification" inhérente à ces modèles (cf.1.2.3.).

6. PARTIE EXPERIMENTALE =====

6.1. Techniques d'analyses

Titration acidimétriques

pH-mètre RADIOMETER PH M 64 muni d'une électrode de verre combinée GK 2301 C. Mesures effectuées sous atmosphère d'azote.

Titration spectrophotométriques

pH-mètre RADIOMETER PH M 64 muni d'une électrode de verre combinée GK 2301 C. Spectrophotomètre double-faisceau UNICAM SP 1800. Cuve en verre de 1 cm. Mesures effectuées sous atmosphère d'azote.

Cinétiques

Spectrophotomètre double-faisceau UNICAM SP 800 équipé pour des mesures cinétiques par enregistrement répété du spectre. Cuve en verre de 1 cm. pH-stat. METROHM Combi-Titrator 53D muni d'une électrode de verre combinée METROHM EA 121. Mesures effectuées sous atmosphère d'oxygène.

6.2. Calculs

Calculatrice TEXAS INSTRUMENT SR 52 programmable.

Système VENUS de l'ETH de Zürich, programme Comics [52]. L'utilisation de ce programme a été possible par l'intermédiaire de M. le prof. BACCINI.

Résumé

Dans la première partie de ce travail (chapitre 2 à 4) nous étudions les propriétés des complexes mixtes $[\text{Cu}(\text{S})\text{-VaspL}']^{\text{n-}}$, ($\text{L}' = \text{Im, His, Hist, Phe et Val}$) lorsque le système est à l'équilibre.

La synthèse et le calcul des constantes d'acidité de $(\text{S})\text{-Vasp}$ font l'objet du chapitre 2.

Les constantes de stabilité du complexe $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ et des complexes mixtes ont été déterminées par des mesures potentiométriques et spectrophotométriques (3.1. à 3.4, 4.2.).

La formation de deux diastéréoisomères R_N^- et S_N^- $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ est possible, leur stabilité relative est discutée (3.5.).

Les constantes de stabilité ont permis de calculer les concentrations des différentes espèces présentes dans le système en fonction du pH (4.3.).

Les titrations potentiométriques de $[\text{Cu}(\text{S})\text{-Vasp}]^-$ avec des acides aminés optiquement actifs (His, Phe et Val) montrent que le système est stéréosélectif. Le complexe mixte formé avec l'acide aminé de configuration (S) est toujours plus stable que l'autre. Le noyau phénolique, en particulier par son substituant en position ortho, est lié à l'apparition d'une certaine stéréosélectivité dans le système (4.4.).

Une étude de la stéréochimie des complexes mixtes a été entreprise, une structure a pu être proposée pour chacun des complexes considérés (4.5.).

Dans la seconde partie nous examinons la réactivité du système en présence d'oxygène moléculaire (chapitre 5).

L'oxydation par l'oxygène, en milieu basique, de solutions de CuVL' donne un produit brun de nature polymère. Une période d'induction est observée par rapport au

changement du spectre visible et à la consommation en $[\text{OH}^-]$.

Différents facteurs influençant la vitesse de la réaction (pH, ligand secondaire, concentration globale ...) ont été examinés ainsi que le rôle de O_2 , H_2O_2 et du ligand secondaire pendant la période d'induction. Ces observations ont permis, bien que le produit final n'ait pas pu être identifié, de proposer un mécanisme réactionnel dans lequel l'oxygène intervient simultanément dans une réaction d'hydroxylation et dans une désamination oxydative. La structure de l'intermédiaire réactif $[\text{CuLL}'\text{O}_2]^{n-}$ favorise une telle réaction.

L'existence possible d'une analogie entre le système décrit et les systèmes naturels est discutée.

Bibliographie

- [1] F.A.Cotton, G.Wilkinson in Advanced Inorganic Chemistry chap 25, 905-922 3th. Edition Interscience Publishers (1972)
- [2] R.Österberg Coord.Chem.Rev. 12 , 309-347 (1974)
- [3] J.Gazo, I.B.Bersuker, J.Garaj Coord.Chem.Rev. 19 , 253-297 (1976)
- [4] R.Malkin in Inorganic Biochemistry vol II, chap 21, 689-709, Elsevier (1973)
- [5] A.E.Martell ibidem vol II, chap 20, 654-688
- [6] S.Fallab Zeit. für naturwissenschaftlich-medizinische Grundlagenforschung 1, Fasc. 4, 333-372, (1963)
- [7] B.L.Vallee, W.E.C.Wacker in The Proteins, vol V, chap III, 25-60, 2nd Edition Academic Press (1970)
- [8] J.A.Fee in Structure and Bonding 23, 1-60, Springer-Verlag (1975)
- [9] X.Bernauer Reprint from Topics in Current Chemistry, 65, 14-24 Springer Verlag (1976)
- [10] W.R.Harris, R.J.Motekaitis, A.E.Martell Inorg.Chem. 14 (5), 974 (1975)
- [11] P.Quitt, J.Hellerbach, K.Vogler Helv.Chim.Acta 46, 327 (1963)
- [12] G.Schwarzenbach, A.Willi, R.D.Bach Helv.Chim.Acta 30, 1303 (1947)
- [13] G.Colomb, thèse, Université de Neuchâtel (1975)
- [14] R.L.Gustafson, A.E.Martell J.Phys.Chem. 67, 576 (1963)
- [15] L.G.Sillen, A.E.Martell in Stability Constants of Metal-Ion Complexes Special publication n°17, The Chemical Society (1964)

- [16] J.D.Bell, H.C.Freeman, A.M.Wood Chem.Comm. 23, 1441 (1969)
- [17] H.Aiba, A.Yokoyama, H.Tanaka, Bull.Chem.Soc. Japan 47 (1), 136 (1974)
- [18] Ibidem, Bull.Chem.Soc. Japan 47 (4), 1003 (1974)
- [19] Ibidem, Bull.Chem.Soc. Japan 47 (6), 1437 (1974)
- [20] H.Sigel, D.B.McCorwick JACS 93, 2041 (1971)
- [21] R.P.Agarwal, D.O.Perrin J.C.S.Dalton 1, 89, (1976)
- [22] T.P.A.Kruck, B.Sarkar Inorg.Chem. 14 (10), 2383 (1975)
- [23] E.Fischer Ber.Deutsch.Chem.Ges. 27, 2895 (1894)
- [24] J.S.Valentine Chem.Rev. 73, 235 (1973)
- [25] E.Bayer, P.Schretzmann in Structure and Bonding 2, 181-250, (1967)
- [26] W.Brackman, E.Havinga Rec.Trav.chim. Pays-Bas 74, 937 (1955)
- [27] G.F.Endres, A.S.Hay, J.W.Eustance J.Org.Chem. 28, 1300 (1963)
- [28] H.Finkbeiner, A.S.Hay, H.S.Blanchard, G.F.Endres J.Org.Chem. 31, 549 (1966)
- [29] S.Tsuruya, T.Yonezawa J.Phys.Chem. 78, 811 (1974)
- [30] R.F.Jameson, N.J.Blackburn J.inorg.nucl.Chem. 37, 809 (1975)
- [31] Ibidem, J.C.S.Dalton 6, 534 (1976)
- [32] Ibidem, J.C.S.Dalton 16, 1596 (1976)
- [33] D.W.Margerum, K.L.Chellappa, F.P.Bossu, G.L.Burce JACS 97, 6894 (1975)
- [34] D.W.Margerum Chem.Eng.News. 53 (49), 26 (1975)
- [35] L.L.Ingraham Arch.Biochem. 81, 309 (1959)
- [36] S.Fallab Chimia 15, 576 (1961)

- [37] V.S.Sharma, J.Schubert JACS 91, 6291 (1969)
- [38] G.Davies, R.Higgins, D.J.Loose Inorg.Chem. 15
(3), 700 (1976)
- [39] H.Sigel, C.Fierl, R.Griesser JACS, 91, 1061
(1969)
- [40] H.Erlenmeyer, C.Fierl, H.Sigel JACS, 91, 1065
(1969)
- [41] H.Sigel Angew.Chem.(Int.Edn) 8, 167 (1969)
- [42] M.Ikawa, E.E.Snell JACS 76, 4900 (1954)
- [43] D.E.Metzler, E.E.Snell JACS 74, 979 (1952)
- [44] A.E.Martell, M.Calvin in Chemistry of Metal
Chelate Compounds Prentice-Hall, Inc., New-York,
N.Y. p.399 (1952)
- [45] D.Perret Comm. privée
- [46] S.Valladas-Dubois Bull.Soc.Chim. France 967,(1961)
- [47] W.S.Trahanovsky ed. in Oxidation in Organic Chemis-
try vol 5-B, chap 11, 126-134, Academic Press (1973)
- [48] H.S.Mason, W.L.Fowlks, E.Peterson JACS 77, 2914
(1955)
- [49] K.Wüthrich, S.Fallab Helv.Chim.Acta 47 (6), 1440
(1964)
- [50] Ibidem Helv.Chim.Acta 47 (6), 1609 (1964)
- [51] M.M.Taqi Khan, A.E.Martell JACS 89, 4176 (1967)
- [52] D.D.Perrin, J.G.Saye "Comics" Programm, Talanta 14,
833 (1967)