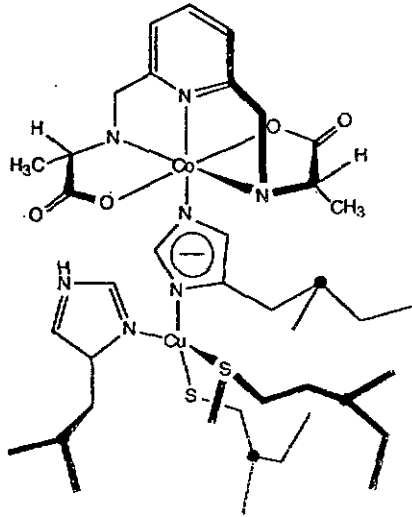


Reconnaissance moléculaire et mécanismes
de réduction de la plastocyanine
d'épinard par des complexes du cobalt(II)
optiquement actifs



Luca Verardo

Neuchâtel 1996

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

Reconnaissance moléculaire et mécanismes
de réduction de la plastocyanine
d'épinard par des complexes du cobalt(II)
optiquement actifs.

Thèse présentée à la faculté des Sciences par

Luca Verardo

Chimiste diplômé de l'université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès sciences.

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Reconnaissance moléculaire et mécanismes de
réduction de la plastocyanine d'épinard par des
complexes du cobalt (II) optiquement actifs

de M. Luca Verardo

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. K. Bernauer (directeur de thèse),
P. Schürmann, Th. Kaden (Bâle),
et J.-P. Sauvage (Strasbourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 février 1997

Le doyen:

R. Dändliker



*Any man who,
upon looking down at his bare feet,
doesn't laugh,
has either no sense of symmetry
or no sense of humour.*

René Descartes

Ce travail a été réalisé d'août 1992 à juin 1996 dans les laboratoires de Chimie Inorganique du Professeur K. Bernauer de l'Université de Neuchâtel, dans les laboratoires de Biochimie du Professeur P. Schürmann de l'Université de Neuchâtel, ainsi que dans les laboratoires de Chimie Minérale du Professeur A. Merbach de l'Université de Lausanne.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Klaus Bernauer; dont je salue la compétence, l'enthousiasme, ses précieux conseils, sa grande disponibilité et sa patience. Je le remercie également pour son enseignement (qui remonte à ma première leçon de chimie à l'Université...) ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée en me donnant la responsabilité d'apprenti(e)s laborantin(e)s et l'organisation des travaux pratiques des étudiants.

Je remercie Messieurs les Professeurs P. Schürmann et A. Merbach pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et Messieurs les Professeurs P. Schürmann, P. Sauvage et T. Kaden d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Pascal Bugnon avec qui nous avons réalisé les mesures de transfert d'électron sous pression, à Charly Nusbaumer pour son aide biochimique et à Pascal Jauslin pour son aide informatique. Je remercie David Monnard, Anick Rochat, Cyril Barzaghi, Paola Vivone et Gaëlle Soguel, toutes et tous apprenti(e)s laborantin(e)s à l'Institut de Chimie et qui ont participé dans le courant de leur formation à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin l'Etat de Neuchâtel, qui m'a accordé un poste d'assistant, ainsi que le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour leur soutien financier.

Et je n'oublie pas de remercier tous mes collègues, pour la bonne ambiance de travail et les très bons moments passés ensemble.

Table des matières

1.	<u>Introduction</u>	1-31
1.1	But du travail	1-4
1.2	Transfert d'électron et protéines	5-22
1.2.1	Aspects théoriques	5-17
1.2.2	Approches expérimentales dans l'étude du transfert d'électron impliquant une métalloprotéine	17-20
1.2.2.1	Méthodes générales	17-18
1.2.2.2	La stéréosélectivité	19-20
1.2.3	Stéréosélectivité dans les réactions de transfert d'électron impliquant une métalloprotéine	20-22
1.3	La plastocyanine	22-31
1.3.1	Fonction naturelle	22-23
1.3.2	Propriétés et structure	23-26
1.3.3	Le site actif	26-28
1.3.4	Les sites de transfert d'électron	28-31
2.	<u>Synthèse et caractérisation des ligands et des complexes</u>	33-51
2.1	Généralités	33-34
2.2	Synthèse des ligands alamp et promp	34-35
2.2.1	Principes de synthèse	34
2.2.2	Caractérisation des ligands	35
2.3	Synthèse des complexes inhibiteurs	35
2.4	Synthèse des complexes mixtes de cobalt(III)	35-47
2.4.1	Principes de synthèse	35-36
2.4.2	Caractérisation par spectroscopie UV/Vis et CD	36-39
2.4.3	Caractérisation par spectroscopie ^1H -RMN	39-42
2.4.4	Caractérisation par diffraction aux rayons-X	42-47
2.4.5	Caractérisation par spectre de masse.	47
2.5	Modes opératoires	48-51
2.5.1	Synthèse du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine	48
2.5.2	Synthèse de promp	49-50
2.5.3	Synthèse d'alamp	50
2.5.4	Synthèse des complexes mixtes de cobalt(III)	50-51

Table des matières

3.	<u>Extraction et purification de la plastocyanine des feuilles d'épinard</u>	53-55
3.1	Mode opératoire	53-54
3.2	Caracérisation par spectroscopie d'absorption et CD	54-55
4.	<u>Etude cinétique de la réduction de la plastocyanine</u>	57-120
4.1	Généralités	57-62
4.2	Techniques et conditions expérimentales	62-63
4.3	Réduction de la plastocyanine dans un tampon phosphate	64-88
4.3.1	Mesures en fonction de la concentration du complexe réducteur	64-67
4.3.2	Mesures en présence d'un complexe inhibiteur et en fonction de la force ionique	67-68
4.3.3	Mesures en fonction de la température	66-75
4.3.4	Fixation du centre métallique par transfert d'électron mesurée à l'aide du dichroïsme circulaire	75-88
4.3.4.1	Conditions expérimentales	76-78
4.3.4.2	Résultats	78-88
4.4	Réduction de la plastocyanine dans les tampons imidazoles	88-115
4.4.1	Mesures en fonction de la concentration du tampon imidazole	89-95
4.4.2	Mesures en fonction de la température	95-109
4.4.3	Mesures en fonction de la pression	109-115
4.5	Discussion	115-116
4.6	Modes opératoires	116-120
4.6.1	Préparation des solutions d'aquacomplexes et de complexes mixtes de cobalt(II)	116-118
4.6.2	Préparation des solutions de plastocyanine	119
4.6.3	Préparation des tampons	119-120
4.6.4	Mesure cinétique	120
5.	<u>Détermination des constantes de formation des complexes mixtes de cobalt(II)</u>	121-128
5.1	Généralités	121-122
5.2	Résultats	123-127
5.3	Modes opératoires	127-128

Table des matières

6.	<u>Stabilité du site actif de la plastocyanine</u>	129-152
6.1	Séquestration du cuivre par l'imidazole	129-148
6.1.1	Généralités	129-132
6.1.2	Analyse cinétique	132-147
6.1.2.1	Préparation des solutions de mesures	132
6.1.2.2	Résultats	133-147
6.1.3	Stabilité thermodynamique de l'association de la plastocyanine et du cuivre(II)	147-149
6.2	Séquestration du cuivre de la plastocyanine par les ligands alamp et promp	149-152
7.	<u>Détermination spectropolarimétrique des constantes de formation [Cu(promp)] et [Cu(alamp)] par compétition avecNTA</u>	153-159
7.1	Généralités	153-154
7.2	Développement mathématique	154-156
7.3	Mode opératoire	156
7.4	Résultats	157-159
8.	<u>Conclusion</u>	161-163
9.	<u>Bibliographie</u>	165-173

Préface

Le transfert d'électron intéresse de nombreux scientifiques: le physicien qui développe des matériaux aux propriétés électroniques particulières, le chimiste et le métallurgiste qui s'occupent de phénomènes de corrosion, le biologiste qui étudie des processus biochimiques tels que la photosynthèse ou la respiration.

C'est au travers de telles réactions d'oxydoréduction que les systèmes vivants puisent leur énergie. Par le biais d'une séquence de protéines particulières jouant le rôle du "circuit électrique" de la cellule, les végétaux capturent la lumière et les animaux brûlent des sucres. Ces protéines "transporteuses d'électron" appartiennent à la famille des métalloprotéines. Elles sont constituées d'une chaîne polypeptidique repliée autour d'un centre métallique à l'état alternativement réduit ou oxydé.

Etudiées depuis la seconde moitié du XX^e siècle, les réactions de transfert d'électron suscitent encore beaucoup d'intérêt. Une meilleure compréhension des mécanismes développés par la nature pour son approvisionnement en énergie est une tâche ardue mais passionnante et qui sera sans aucun doute d'une très grande utilité au développement de futures technologies respectueuses de l'environnement.

1. Introduction

1.1 But du travail

A l'heure actuelle, il est clairement établi que les métaux jouent un rôle fondamental dans beaucoup de processus biochimiques cellulaires ou extra cellulaires. Ils permettent en particulier aux métalloprotéines d'assumer leur fonction de médiateur électronique ou de transporteur de petites molécules. C'est à cette famille importante de biomolécules qu'appartient la plastocyanine. L'étude des métalloprotéines relève d'une discipline scientifique nouvelle, qui prend actuellement un essor considérable: la chimie bioinorganique ou la biochimie des métaux.

Une grande collaboration scientifique est nécessaire à l'étude approfondie d'une métalloprotéine. Des informations concernant la structure tridimensionnelle de la molécule, des groupes coordinateurs de l'ion métallique, de la géométrie du site actif et des propriétés physico-chimiques du métal en présence du squelette polypeptidique sont en effet indispensables à la compréhension des mécanismes qui permettent la régulation d'une telle biomolécule dans un processus physiologique. La collaboration de nombreux biologistes, chimistes et physiciens, ainsi qu'une grande diversité de techniques expérimentales sont donc investies dans ces recherches.

La compréhension du fonctionnement des métalloprotéines ne constitue pas le seul domaine de la chimie bioinorganique. Deux ouvrages récents^[1-2] décrivent ses différentes applications ainsi que les recherches actuelles des scientifiques concernés par le sujet.

Les réactions de transfert d'électron sont au centre de nombreux processus métaboliques nécessaires à la survie des organismes vivants, comme par exemple la photosynthèse ou la respiration. Ces transferts d'électron sont généralement assurés par des métalloprotéines. Parmi les plus connues figurent les cytochromes qui exercent des fonctions importantes dans la chaîne respiratoire et les protéines de cuivre bleu impliquées dans la photosynthèse. Les mécanismes de ces transferts d'électron sont encore peu connus. Il s'agit pourtant d'une recherche fondamentale à la compréhension du fonctionnement de ces molécules indispensables à tout système vivant.

Les difficultés expérimentales rencontrées dans l'étude de ces systèmes *in vivo* peuvent être partiellement contournées par l'utilisation de systèmes artificiels. De nombreuses études, dont les résultats ont été réunis récemment dans plusieurs ouvrages^[3], font appel à une variété de complexes métalliques cationiques, anioniques ou neutres, utilisés comme agents de transfert d'électron. Pour la plastocyanine, les études cinétiques impliquant ces complexes métalliques ont notamment permis de localiser deux sites distincts où les réactions de transfert d'électron peuvent avoir lieu^[4,5]. Ces sites sont aujourd'hui reconnus comme étant les lieux d'interactions utilisés également par la nature dans la chaîne des réactions photosynthétiques où est impliquée la plastocyanine^[6]. Le premier site, localisé dans l'environnement du résidu His87, est de nature hydrophobe, alors que le second, localisé dans l'environnement de Tyr83, est rendu hydrophile par la présence de nombreux résidus carboxylates. (Figure 1.3.2). Récemment, l'engagement de plastocyanines mutantes a également permis d'obtenir certaines informations concernant les contraintes stéréochimiques de ces réactions de transfert d'électron^[7,78].

Dans la gamme des composés synthétiques utilisés jusqu'à présent, les composés de coordination optiquement actifs demeurent peu étudiés. Pourtant, la stéréosélectivité est une propriété fondamentale des systèmes biologiques.

Ce sont les composés de coordination optiquement actifs des ligands dérivés de la N,N' -[(pyridinediyl-2,6)bis(méthylène)]bis[glycine] (Figure 1.1.1), qui ont montré pour la première fois et sans ambiguïté une reconnaissance moléculaire dans le transfert d'électron impliquant une métalloprotéine^[8,9].

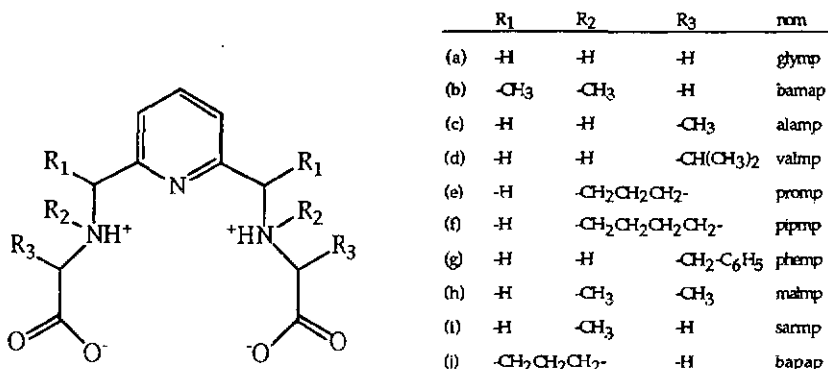


Figure 1.1.1 Ligands dérivés de la N,N' -[(pyridinediyl-2,6)bis(méthylène)]bis[glycine]

La stéréosélectivité observée dans la réduction de la plastocyanine par les complexes de fer(II) [Fe(alamp)], [Fe(promp)] et [Fe(valmp)]^[57], nous encourage à poursuivre les mesures de transfert d'électron entreprises avec cette métalloprotéine. Le choix de nos réactifs synthétiques s'est porté sur les complexes du cobalt(II) des ligands pentadentés promp et alamp et contenant différents ligands monodentés à la sixième position de coordination (Figure 1.1.2).

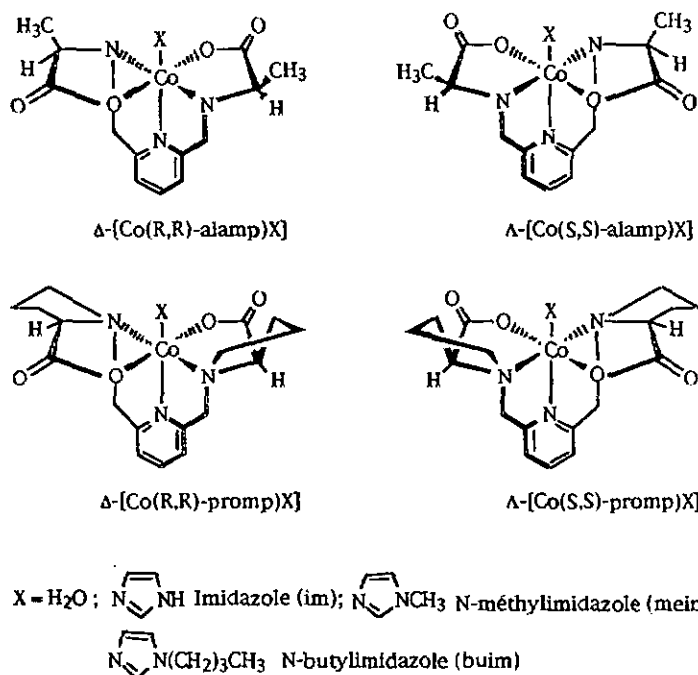


Figure 1.1.2 Complexes réducteurs optiquement actifs utilisés dans ce travail.

Dans ce travail, nous étudions l'influence du choix de l'ion métallique des complexes réducteurs, des substituants des ligands pentadentés et de la nature des ligands monodentés, sur la cinétique et la stéréosélectivité du transfert d'électron. Ces paramètres sont ensuite analysés dans le but de mieux définir les sites et les mécanismes de réduction de la plastocyanine.

1.2 Transfert d'électron et protéines

1.2.1 Aspects théoriques

L'étude approfondie des mécanismes des réactions d'oxydoréduction a débuté en 1940. Une grande partie du travail expérimental a été accompli par des chimistes inorganiciens, par l'étude de la réactivité de complexes métalliques en solution^[11-12]. En ce qui concerne les mécanismes réactionnels des transferts d'électron impliquant une métalloprotéine, des parallèles ont souvent été établis avec le comportement de complexes métalliques de faibles poids moléculaires. Il est cependant important de rappeler qu'une métalloprotéine représente un ensemble plus complexe qu'un simple ion métallique entouré d'une sphère de ligands:

- Les ligands qui coordonnent l'ion métallique d'une métalloprotéine sont naturellement choisis de façon à promouvoir le transfert d'électron: ils réduisent la charge du métal ou induisent un état low spin plutôt que high spin (résidus soufrés, imidazoles ou porphyrines, pour les ions métalliques fer ou cuivre).
- La géométrie du site actif est modélisée par la structure tridimensionnelle du squelette polypeptidique. L'énergie nécessaire au réarrangement des ligands lors du transfert d'électron reste minimale, permettant des réactions rapides. Les protéines de cuivre bleu adoptent cet état entatique par une géométrie tétraédrique distordue du site actif.
- Le groupe prosthétique, placé à l'intérieur de la protéine est généralement bien protégé de l'action du solvant, mais allonge particulièrement les distances donneur-accepteur lors du transfert d'électron. La somme des rayons de Van der Waals généralement utilisée pour déterminer la distance donneur-accepteur lors du transfert d'électron entre de petites molécules, ne s'applique pas aux métalloprotéines.

- En plaçant le métal à l'intérieur du squelette polypeptidique, la rencontre des réactifs doit se faire selon une orientation précise afin de permettre le transfert d'électron. Des zones de reconnaissance, définissant les sites réactionnels, sont ainsi créées.

Les facteurs qui gouvernent les vitesses de transfert d'électron des systèmes biologiques sont ainsi complexes et multiples, incluant la répartition des charges de surface, la géométrie globale de la protéine, la distance entre le site actif et le centre rédox, la nature des résidus peptidiques, la géométrie et la nature de la sphère de coordination du centre métallique, etc.

Avant d'aborder ces systèmes complexes, il est donc utile de discuter certains aspects théoriques qui sont généralement appliqués aux systèmes plus simples.

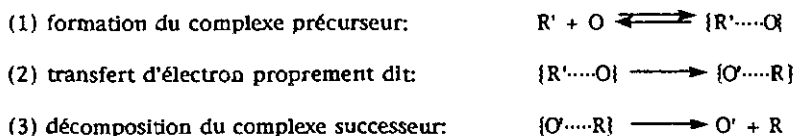
Les réactions d'oxydoréduction peuvent être classées selon le type sphère interne ou sphère externe. Dans le premier cas, un ligand commun pontre les deux centres rédox à l'état de transition alors que dans le second, la sphère de coordination des réactifs reste intacte à l'état de transition, c'est-à-dire que toute rupture ou formation de liaison n'a lieu qu'après le transfert d'électron.

:

Les bases théoriques du transfert d'électron ont été établies par Marcus^[13] au début des années 1960. Les travaux de Marcus concernent essentiellement des réactions de type sphère externe entre petits composés inorganiques en solution, pour lesquelles les interactions entre les centres rédox qui résultent du couplage orbitalaire des réactifs sont suffisamment fortes pour que la constante de vitesse du transfert d'électron soit indépendante d'elles (réactions adiabatiques). Les contributions de Gray^[14], Levich^[15], Dogonadze^[16] et plus tard de Kestner^[17] et Hopfield^[18] ont permis d'élargir le champ d'application de la théorie. Ces auteurs ont montré que lorsque les interactions entre les centres rédox sont suffisamment

faibles, en raison de la grande distance qui les sépare, l'expression de la constante de vitesse dépend explicitement de ces interactions au travers d'un facteur électronique (réactions non adiabatiques). Comme pour les réactions adiabatiques, la constante de vitesse des réactions non adiabatiques dépend du facteur nucléaire dont la valeur est déterminée par les mouvements nucléaires du système. Ces mouvements sont étudiés de façon semi-classique par Hopfield et via la mécanique quantique par Jortner^[17].

Typiquement, une réaction de transfert d'électron procède suite à la collision des réactifs et à leur association en un état particulier appelé complexe précurseur. Le principe de Franck-Condon permet de postuler que le produit initialement formé suite au transfert d'électron, le complexe successeur, conserve la même configuration nucléaire que le complexe précurseur (longueurs de liaisons, angles de liaisons, distribution des molécules de solvant et des contre-ions...). La réaction globale se décompose ainsi en trois étapes élémentaires:



Si les réactifs et les produits possèdent des structures très différentes, la configuration nucléaire commune la plus favorable au transfert d'électron est intermédiaire entre celle des réactifs et celle des produits. L'énergie du système est alors plus élevée que celle des réactifs ou celle des produits prise séparément. Si cette énergie de réarrangement est la composante principale de l'énergie d'activation, elle détermine la vitesse globale du transfert d'électron: plus elle est élevée et plus la réaction est lente.

Dans une description semi-classique du mouvement atomique, Marcus montre que le transfert d'électron a lieu à l'intersection de deux courbes de potentiels, l'une décrivant le système réactif (E_R), l'autre décrivant le système produit (E_P).

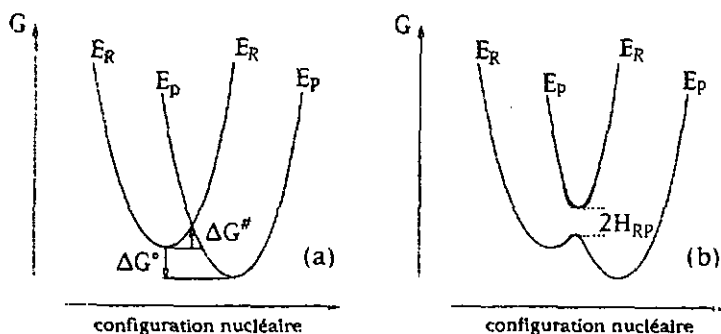


Figure 1.2.1 Représentation de l'énergie libre (G) en fonction d'une coordonnée de réaction. Réaction non adiabatique (a); réaction adiabatique (b).

L'énergie libre (G) est fonction des coordonnées nucléaires de l'ensemble du système et représente la somme des degrés de liberté de translation, de rotation et de vibration des molécules de réactifs et des molécules de solvant, dans un système à $3N$ dimensions (N est le nombre de noyaux présents dans le système).

Les minima énergétiques du système réactif (E_R) et des produits de la réaction (E_P), adoptent un ensemble de coordonnées nucléaires différentes (sauf pour les réactions d'auto échanges), représentées par la variation du minimum des deux paraboles le long de la coordonnée de réaction. Une perturbation de ces paramètres d'équilibre augmente l'énergie du système suivant une parabole propre au système considéré (en première approximation). Pour que le transfert d'électron puisse avoir lieu en accord avec le principe de Franck-Condon, le

système précurseur doit atteindre un état énergétique commun avec le système successeur. Cet état est représenté par l'intersection des deux paraboles et correspond aux coordonnées de l'état de transition (complexe activé).

Les courbes représentées à la figure 1.2.1(a) supposent que le système électronique demeure localisé à l'état de transition. Tant que cette situation prévaut, aucun transfert ne peut avoir lieu. Un couplage des orbitales électroniques des réactifs est nécessaire pour que le système évolue du complexe précurseur au complexe successeur. Ce couplage est représenté par la matrice H_{RP} (Figure 1.2.1(b)). L'amplitude du couplage électronique détermine le comportement du système précurseur au point d'intersection des deux courbes de potentiel (à l'état de transition). Si le couplage est très faible, la probabilité que le système s'évolue pas en direction du complexe successeur est forte (réaction non adiabatique). Si par contre le couplage orbitalaire est important, le système a une grande probabilité d'évoluer en direction des produits du transfert d'électron (Figure 1.2.1(b)). Une réaction pour laquelle le transfert d'électron a lieu chaque fois que le système réactif atteint l'état de transition (probabilité de transfert = 1) est une réaction adiabatique. Le degré d'adiabaticité d'une réaction est représenté par le coefficient de transmission électronique κ , qui varie de 0 à 1. Pour des réactions où H_{RP} est grand, $\kappa = 1$. Les réactions adiabatiques ont lieu lorsque les centres réactionnels sont très proches l'un de l'autre, présentent une symétrie orbitalaire favorable et aucun changement géométrique conséquent ne s'impose lors du transfert d'électron. Le coefficient de transmission électronique est cependant généralement inférieur à l'unité pour les réactions impliquant des métalloprotéines, rendant compte de la non adiabaticité de ces systèmes.

Dans la théorie semi-classique développée par Marcus pour les réactions de transfert d'électron intramoléculaires, l'expression de la constante de vitesse du transfert d'électron est donnée par:

$$k = \kappa \nu_n \Gamma_n \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) \quad (\text{éq. 1.1})$$

ν_n représente la fréquence du mouvement nucléaire qui permet au système de traverser la zone d'intersection ($10^{11} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ pour de petites molécules) et Γ_n est un facteur correctif tenant compte d'un effet tunnel.

Si $\kappa = 1$ dans l'hypothèse d'une réaction adiabatique, le calcul de la constante de vitesse se ramène à celui de ΔG^\ddagger , donné par:

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\lambda + \Delta G^{\circ*})^2}{4\lambda} \quad (\text{éq. 1.2})$$

$$\Delta G^{\circ*} = \Delta G^{\circ} + w^P - w^T \quad (\text{éq. 1.3})$$

w^T représente le travail électrostatique impliquant l'approche des réactifs à la distance moyenne du complexe activé et w^P est le terme analogue correspondant à la dissociation du complexe successeur. (Ces termes disparaissent dans le cas où l'un des réactifs n'est pas chargé). ΔG° est l'énergie libre de la réaction (calculable à partir de ΔE°). L'énergie nécessaire à la réorganisation des coordonnées nucléaires du système, λ , est un paramètre qui contient la contribution de la réorganisation de la sphère interne (λ_I) et de la sphère externe (λ_O) des réactifs.

λ_I représente le changement d'énergie libre liée aux variations des longueurs de liaisons et des angles de liaisons. Ce terme peut s'approcher par le modèle des oscillateurs harmoniques par la relation:

$$\lambda_I = 1/2 \sum k_j (\Delta x_j)^2 \quad (\text{éq. 1.4})$$

avec k_j les constantes de forces et Δx_j les variations des longueurs moyennes des liaisons.

La contribution λ_0 implique les changements de polarisation des molécules de solvant qui peut s'approcher par la relation:

$$\lambda_0 = e^2 \left\{ \left(\frac{1}{2r_A} \right) + \left(\frac{1}{2r_B} \right) - \left(\frac{1}{d} \right) \right\} \left\{ \left(\frac{1}{D_{op}} \right) - \left(\frac{1}{D_s} \right) \right\} \quad (\text{éq. 1.5})$$

d est la distance séparant les centres rédox de rayon r_A et r_B dans le complexe activé; D_{op} est la constante diélectrique optique (la racine de l'indice de réfraction) et D_s la constante diélectrique statique. Il est intéressant de remarquer qu'à l'intérieur d'une protéine, $D_s = 4$ alors que $D_s = 78$ pour l'eau.

D'une manière générale, λ peut avoir une influence énorme sur la constante de vitesse d'une réaction de transfert d'électron.

En tenant compte que λ est toujours positif, cette relation permet de prévoir que k augmente si ΔG° devient plus négatif, jusqu'à atteindre une valeur maximale lorsque $|\Delta G^\circ| = \lambda$. Si $|\Delta G^\circ|$ devient plus grand que λ , la vitesse diminue à nouveau.

Paradoxalement k peut ainsi diminuer alors que ΔG° devient plus négatif. Ces deux situations $|\Delta G^\circ| < \lambda$ et $|\Delta G^\circ| > \lambda$ correspondent aux régions normales et inversées de Marcus (Figures 1.2.2 et 1.2.3).

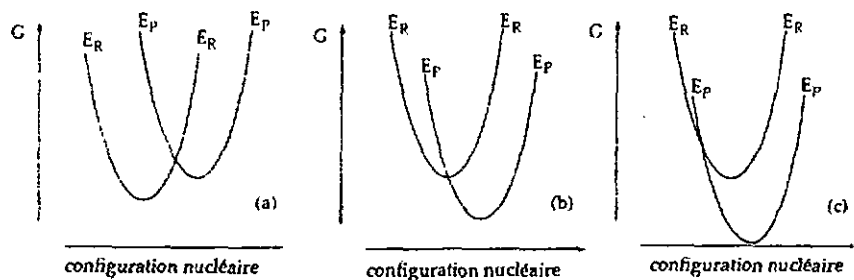


Figure 1.2.2 Diagrammes énergétiques pour la région normale (a), sans barrière d'activation (b), et la région inversée (c) de Marcus.

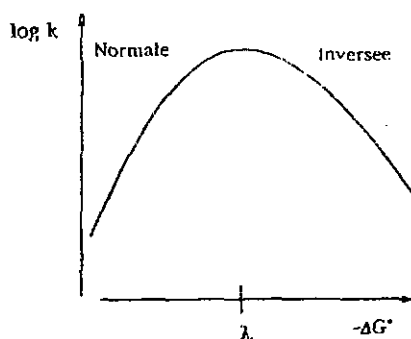


Figure 1.2.3 Variation de $\log k$ en fonction de la variation d'énergie libre.

De ces considérations, Marcus a déduit la célèbre "relation croisée" qui permet de calculer la constante de vitesse du transfert d'électron sur la base de l'utilisation des paramètres des réactions d'auto échanges:

$$k_{te} = (k_{11}k_{22}K_{12}f_{12})^{1/2} \quad (\text{eq. 1.6})$$

k_{11} et k_{12} sont les constantes de vitesse d'auto échange, K_{12} la constante d'équilibre du système rédox et $\ln f_{12} = (\ln K_{12})^2 / [4 \ln(k_{11}k_{22}/v_n^2)]$.

Cette relation fut testée avec succès pour un grand nombre de réactions entre complexes d'ions métalliques en solution et également pour des systèmes biologiques, suite aux travaux de Gray^[19].

Pour une réaction de type sphère externe qui se situe dans la région normale de Marcus, cette relation prévoit l'existence d'une LFER (Linear Free Energy Relationship). Pour une série de réactions de transfert d'électron apparentées (λ_{12} idéalement identiques), la représentation $\ln k_{te}$ en fonction de $\ln K_{12}$ est en effet linéaire avec une pente de 0.5 et une ordonnée à l'origine de $0.5 \cdot \ln(k_{11} \cdot k_{12})$.

La "relation croisée" a été appliquée aux réactions de transfert d'électron impliquant certaines protéines de cuivre bleu et les réactifs synthétiques $[\text{Fe}(\text{edta})]^{2-}$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ et $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{py})]^{3+}$. A partir de la détermination expérimentale de la constante de vitesse du transfert d'électron, la constante de vitesse d'auto échange de la protéine peut se calculer en retour par la "relation croisée" (Tableau 1.2.1).

Gray et ses collaborateurs^[14] ont émis l'idée que plus les écarts observés entre les différentes valeurs expérimentales et calculées sont grandes, plus l'accessibilité du site actif de la protéine en question est aisée et rend probable un nombre important de mécanismes de transfert d'électron. Ces écarts démontrent aussi clairement les limites d'une application de la "relation croisée" aux systèmes biologiques.

Tableau 1.2.1 Application de la "relation croisée" aux transferts d'électron des protéines de cuivre bleu [3e].

Protéine (1)	réactif (2)	$k_{te}(\text{obs})^a$	K_{12}	$k_{11}(\text{calc})^a$
Stellacyanine	$\text{Fe}(\text{edta})^{2-}$	$4.3 \cdot 10^5$	15	$2.3 \cdot 10^5$
	$\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$	$1.8 \cdot 10^5$	750	$6.3 \cdot 10^4$
	$\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}^{3+}$	$1.9 \cdot 10^5$	160	$1.5 \cdot 10^6$
Plastocyanine	$\text{Fe}(\text{edta})^{2-}$	82	$1.1 \cdot 10^4$	$5.8 \cdot 10^5$
	$\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$	$1.0 \cdot 10^3$	1.0	$2.1 \cdot 10^2$
	$\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}^{3+}$	$7.1 \cdot 10^3$	0.21	$4.8 \cdot 10^3$
Azurine	$\text{Fe}(\text{edta})^{2-}$	$1.3 \cdot 10^3$	$1.6 \cdot 10^3$	$2.2 \cdot 10^6$
	$\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$	$4.4 \cdot 10^3$	7.0	$5.6 \cdot 10^3$
	$\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}^{3+}$	$2.0 \cdot 10^3$	1.5	$1.3 \cdot 10^5$

^a [M⁻¹s⁻¹]

Pour les réactions de transfert d'électron entre petits composés inorganiques en solution, la bonne corrélation entre la théorie et l'expérience a justifié l'hypothèse d'interactions orbitales fortes (réactions adiabatiques) entre les partenaires rédox. Les interactions électrostatiques ou hydrophobes, négligées dans ce modèle, sont cependant importantes chez les métalloprotéines. Pour tenir compte de ces influences, un développement théorique décrivant la protéine comme une sphère rigide avec une répartition uniforme des charges électriques a été envisagé[14]. Ce modèle reste cependant approximatif car une métalloprotéine possède une répartition inhomogène des charges électriques. De plus, la contribution d'autres types d'interactions et en particulier l'influence du degré de non adiabaticité sont prédominantes. Ces facteurs sont cependant difficilement quantifiables[18].

Dans les systèmes biologiques, la constante de vitesse k ne se calcule plus exclusivement à l'aide de paramètres thermodynamiques. Les centres rédox pouvant être particulièrement éloignés, l'efficacité et la vitesse du transfert d'électron dépendent principalement d'un paramètre exprimant la qualité du recouvrement orbitalaire. Les fonctions d'ondes décroissant typiquement de façon exponentielle avec la distance, la vitesse du transfert d'électron suit la même tendance. Ainsi κ devient un facteur déterminant dans l'expression de la constante de vitesse des réactions non adiabatiques. Proportionnel au couplage électronique, κ est contenu dans l'élément matriciel H_{RP} qui dépend de la distance séparant les centres rédox, de leur orientation respective et du milieu réactionnel. Le coefficient κ a été formulé par^[20]:

$$\kappa = \frac{2 \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-v_{el}}{2\nu_n}\right) \right]}{2 - \exp\left(\frac{-v_{el}}{2\nu_n}\right)} \quad (\text{éq. 1.7})$$

$$\text{où } v_{el} = \frac{H_{RP}^2}{\hbar} \left(\frac{\pi}{\lambda RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{éq. 1.8})$$

v_{el} est la fréquence de transition électronique à l'état de transition.

De ces relations, nous remarquons que $\kappa = 1$ (réaction adiabatique) lorsque $v_{el} \gg 2\nu_n$, et que la réaction est non adiabatique lorsque $v_{el} \ll 2\nu_n$.

Dans une réaction de transfert d'électron non adiabatique, la constante de vitesse est essentiellement dépendante du coefficient de fréquence électronique v_{el} alors que pour une réaction adiabatique, la constante de vitesse est essentiellement dépendante du facteur de fréquence nucléaire ν_n .

Le paramètre qui détermine l'adiabaticité d'une réaction est ainsi le rapport $v_{el}/2\nu_n$. En conséquence, un transfert d'électron peut être adiabatique même lors

d'un transfert longue distance, pour autant que v_n soit suffisamment petit. Certaines réactions de transfert d'électron impliquant des métalloprotéines couplées à des changements de conformation suffisamment lents sont ainsi considérées comme adiabatiques.

Le calcul de la constante de vitesse dans les situations non adiabatiques peut s'approcher par la relation (1.9) en combinant les équations (1.1), (1.7) et (1.8):

$$k = \frac{H_{RP}^2}{\hbar} \left[\frac{\pi}{\lambda RT} \right]^{\frac{1}{2}} \exp \left[\frac{-(\lambda + \Delta G^{\ddagger})^2}{4\lambda RT} \right] \quad (\text{éq. 1. 9})$$

Pour beaucoup de systèmes, le couplage électronique semble diminuer de façon exponentielle avec la distance séparant les centres rédox:

$$H_{RP} = H^{\circ}_{RP} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \beta (d - d^{\circ}) \right\} \quad (\text{éq. 1. 10})$$

H°_{RP} est l'expression du couplage orbitalaire au contact proche d° (rayons de Van der Waals) et β exprime la décroissance du couplage avec la distance d . Un grand nombre de mesures de transferts d'électron intramoléculaires a suggéré une valeur typique de β aux environ de 1.4 \AA^{-1} [21]. Dans les premières applications de cette théorie, β a été ajusté plus ou moins arbitrairement. Depuis les années 1980, d'importants progrès théoriques ont été réalisés en ce qui concerne l'influence de la nature du milieu réactionnel sur le facteur électronique et sur l'énergie de réorganisation.

Beratan, Onuchic et leurs collaborateurs ont basé le développement théorique du calcul de β en considérant la nature chimique du chemin emprunté par l'électron lors de son transfert (liaisons covalentes, ponts hydrogènes, système π , sauts entre deux résidus) [22]. Chaque transfert est caractérisé par un facteur propre qui

est finalement considéré dans le calcul de la constante de vitesse globale du transfert d'électron.

Une conséquence importante de ce modèle "pathways" est la prise en considération de la probabilité de mécanismes réactionnels multiples. Le transfert d'électron peut avoir lieu le long de plusieurs chemins réactionnels parallèles.

1.2.2 Approches expérimentales dans l'étude du transfert d'électron impliquant une métalloprotéine.

1.2.2.1 Méthodes générales

Dans l'étude détaillée du transfert d'électron impliquant une métalloprotéine, la connaissance de la structure de la protéine est essentielle. Sans cette information, autant les sites d'interaction entre les partenaires rédox que les distances entre les centres actifs ne peuvent être précisément déterminés.

Certaines réactions de transfert d'électron étant très rapides (10^{-12} s), les mesures cinétiques nécessitent l'utilisation de techniques analytiques particulières. Dans notre travail, les réactions les plus rapides sont de l'ordre de la seconde et peuvent être aisément suivies par la technique de l'écoulement bloqué (stopped flow).

Actuellement, les différentes techniques physiques sont combinées avec le génie génétique. La mutation spécifique de certains acides aminés modulent la force motrice du transfert d'électron et permet l'identification des résidus impliqués dans le transfert d'électron. De bons résultats ont été obtenus pour le cytochrome-c[23], l'azurine[24a-d] ou la plastocyanine[24e]. Ces mesures ont également prouvé que ce n'est pas uniquement la nature du résidu impliqué dans le transfert d'électron qui contrôle la force motrice de la réaction, mais une combinaison de

plusieurs facteurs qui modifient l'environnement du site actif (réseau des ponts hydrogènes, interactions dipolaires, accessibilité du solvant, etc....).

Une technique expérimentale fréquemment utilisée dans ces études est la fixation d'un partenaire rédox à un résidu bien défini de la protéine et le déclenchement retardé du transfert d'électron. Cette méthode à l'avantage d'éliminer du calcul de la constante de vitesse du transfert d'électron, la contribution de l'étape d'association présente dans toutes les réactions bimoléculaires. Un tel réactif "fixant" est par exemple $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ qui se coordonne spécifiquement aux histidines accessibles, donnant une protéine modifiée de type $(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-(\text{His-protéine})$ ^[25]. Ces mesures de transfert d'électron intramoléculaires ont permis de proposer des chemins de transfert d'électron du centre actif de certaines métalloprotéines au complexe de ruthénium et vice-versa.

La résonance magnétique nucléaire est également une aide précieuse à l'analyse des interactions protéine-réactif. La stratégie consiste à utiliser un composé à base de chrome(III), inactif au point de vue rédox, mais de structure et de charge analogues au réactif étudié. Le complexe de chrome permet de déceler le site de formation du complexe précurseur du transfert d'électron, par l'induction d'un signal très large dans un domaine précis du spectre $^1\text{H-RMN}$ de la protéine. L'approche du complexe de chrome de la surface active de la métalloprotéine agit comme une "sonde paramagnétique".

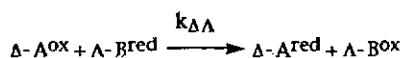
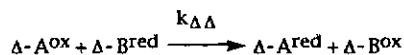
Dans le cas des réactions de transfert d'électron sphère interne, l'utilisation du Cr^{2+} est également très utile. La formation de composés inertes de Cr^{3+} coordonnés au site du transfert d'électron a permis d'expliquer de nombreuses réactions impliquant de petites molécules^[26]. Cette technique a également été utilisée pour l'étude de métalloprotéines^[27], mais l'identification des résidus contenant le chrome fixé par séquençage du polypeptide est difficile.

1.2.2.2 La stéréosélectivité

Une des approches expérimentales à l'étude des mécanismes de transfert d'électron des composés de coordination en solution est la stéréosélectivité. Les premières mesures de stéréosélectivité effectuées avec succès remontent à une quinzaine d'années[28].

Une approche théorique de la reconnaissance chirale lors des réactions de transfert d'électron a été formulée par Lappin[29] pour deux partenaires rédox ayant une configuration connue et où le transfert d'électron est de type sphère externe. En appliquant cette théorie à l'oxydation de $[\text{Co}(\text{en})_3]^{2+}$ par $\Delta\text{-}[\text{Co}(\text{edta})]^-$, Lappin montre qu'une différence de 0.03Å dans la distance effective séparant les centres rédox à l'état de transition se traduit par 10% de stéréosélectivité cinétique.

La stéréosélectivité est une mesure directe de la réactivité relative d'un composé optiquement actif avec les formes énantiomères du partenaire rédox:



Deux techniques sont généralement utilisées pour détecter l'induction chirale.

La première est l'observation d'une différence de vitesse de réaction entre les énantiomères d'un réactif et le complexe optiquement actif. En général, on détermine $k_{\Delta\Delta}$ et $k_{\Delta\Lambda}$ ce qui requiert qu'oxydant et réducteur soient isolables sous forme d'énantiomères. Si l'un des deux réactifs ne peut être isolé sous forme d'énantiomères, la stéréosélectivité peut se mesurer cinétiquement par la détection d'une différence de vitesse dans la réaction parallèle utilisant le

mélange racémique, à condition que la vitesse d'interconversion des deux isomères soit nettement plus lente que la vitesse du transfert d'électron.

La seconde technique utilisée est la détection d'une induction chirale au niveau des produits de la réaction, en utilisant comme réactif le mélange racémique. Cette méthode exige par contre que la vitesse d'interconversion des isomères dans le racémate soit plus rapide que le transfert d'électron.

Le maintien de la chiralité dans un complexe de substitution labile peut être de première importance dans ces mesures. A cette fin, l'utilisation de ligands stabilisant la forme optiquement active par des contraintes stéréochimiques est nécessaire.

1.2.3 Stéréosélectivité dans les réactions de transfert d'électron impliquant une métalloprotéine

Les réactions entre métalloprotéines sont hautement spécifiques^[30]. Le transfert d'électron entre un complexe métallique optiquement actif et un réactif biologique est ainsi supposé dégager une stéréosélectivité significative.

Les premiers travaux impliquant des organismes intacts et des extraits de protéines ont en effet montré que certains complexes d'ions métalliques sont métabolisés de manière stéréosélective^[31-35].

Les premières mesures cinétiques effectuées à partir de protéines isolées n'ont cependant pas montré de stéréosélectivité (oxydation de la ferrédoxine par Δ -[Co(en)₃]³⁺ et rac-[Co(en)₃]³⁺ ^[36]). De même, le cytochrome-c est réduit à des vitesses identiques par Δ -[Co(sep)]²⁺ et Λ -[Co(sep)]²⁺ ^[10c].

La reconnaissance chirale peut intervenir soit lors de la formation du complexe précurseur (un des énantiomères forme avec la protéine un complexe précurseur énergétiquement plus favorable), soit lors du transfert d'électron proprement dit (un des énantiomères possède un meilleur recouvrement orbitalaire avec la protéine).

La première stéréosélectivité observée dans le transfert d'électron entre une métalloprotéine et des composés de coordination optiquement actifs provient de la réduction de la plastocyanine d'épinard par le complexe du fer(II) $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{alamp})]$, par Bernauer et Sauvain^[8]. Les complexes formés à partir des ligands développés par le groupe Bernauer (Figure 1.1.1) ont également montré une stéréosélectivité significative dans les réactions de transfert d'électron impliquant d'autres métalloprotéines: réduction du cytochrome-c par les complexes du fer(II) des ligands phemp, alamp et promp^[9b] et oxydation de la ferrédoxine par les complexes du cobalt(III) des ligands alamp et promp^[9a]. Pour ces trois systèmes, des mesures en fonction de la température ont montré un phénomène de compensation dans les variations de l'enthalpie et de l'entropie d'activation, en ce sens que l'énantiomère possédant la plus faible enthalpie d'activation possède également l'entropie d'activation la plus négative. Par conséquent, la stéréosélectivité observée est une fonction de la température. Ce comportement a été interprété par un ΔH^\ddagger élevé significatif d'une bonne reconnaissance chirale et d'une liaison plus forte de la paire rédox, conduisant à une plus grande désolvatation et ainsi à un ΔS^\ddagger plus positif.

D'autres stéréosélectivités dans les réactions de transfert d'électron ont été observées pour l'oxydation du ferrocyclochrome-c par $[\text{Co}(\text{acétylacétone})_3]$, $[\text{Co}(\text{bipyridine})_3]^{3+}$ et $[\text{Co}(\text{oxalate})_3]^{3-}$ [10a,d,e]. La réduction de la plastocyanine par le complexe $[\text{Co}(\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2\text{-sarcophagine}]^{4+}$ [37] révèle également une

stéréosélectivité en faveur de l'énantiomère Λ , dépendante du pH mais indépendante de la force ionique. La réduction du ferricytochrome-c par le même complexe ne montre par contre aucune stéréosélectivité. Citons encore la réduction stéréosélective de la superoxyde dismutase par $[\text{Fe}(\text{pdt})]^{2-}$ [38].

1.3 La plastocyanine

1.3.1 Fonction naturelle

Il est actuellement bien reconnu que la fonction biologique de la plastocyanine se situe au niveau des réactions de transfert d'électron de la chaîne photosynthétique de toutes les plantes vertes et de certaines algues. La plastocyanine sert de médiateur dans le passage de l'électron du cytochrome-f au P700^+ .



Dans ce rôle, la structure de la plastocyanine a trois fonctions importantes:

- 1) Maintenir le site actif à un potentiel qui se situe entre celui de ses partenaires physiologiques.
- 2) Fournir les sites spécifiques de réaction aux deux partenaires physiologiques afin d'assurer sa fonction de médiateur dans la chaîne de transport électronique de la photosynthèse.
- 3) Permettre le transfert électronique de ces sites de réaction au cuivre et inversement.

1.3.2 Propriétés et structure

La plastocyanine, biosynthétisée exclusivement dans le cytoplasme des plantes vertes et de certaines algues, est une petite protéine de 10.5kD contenant quelque 99 acides aminés et un atome de cuivre (Figure 1.3.2).

Les chloroplastes sont des organites propres aux cellules des végétaux et plus particulièrement aux cellules exposées à la lumière. Ils ont environ 5 μ m de diamètre, possèdent une membrane interne entourant le stroma et des structures membraneuse appelées thylakoïdes, en forme de sacs aplatis (Figure 1.3.1). Les thylakoïdes contiennent la chlorophylle, la plastocyanine et tous les autres composants de la machinerie qui convertit l'énergie solaire en énergie chimique.

Le mécanisme de la biosynthèse de la plastocyanine est encore obscure. On suppose qu'elle est présynthétisée dans le cytoplasme sous forme de précurseur contenant un polypeptide de transit et qu'elle migre ensuite dans le chloroplaste. A l'intérieur du chloroplaste, la protéine se développe tout d'abord sous forme d'apoprotéine, qui joue un rôle d'agent chélatant spécifique pour le cuivre.

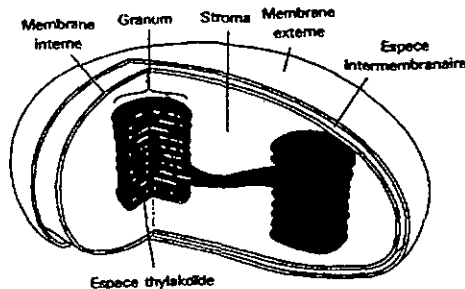


Figure 1.3.1 Chloroplaste

La première caractérisation de la plastocyanine par Katoh remonte à 1961^[39]. A l'heure actuelle, les plastocyanines extraites de 19 variétés de plantes vertes (épinard, haricot, peuplier...), 4 variétés d'algues vertes (*Chlorella fusca*, *Ulva arasakii*, *Scenedesmus obliquus*, *Enteromorpha prolifera*), et une algue bleue-verte (*Anabaena variabilis*) ont été séquencées, ce qui permet à la plastocyanine de figurer parmi les protéines les mieux documentées.

Pour les 19 plastocyanines de plantes vertes séquencées, 47 des 99 acides aminés sont conservés. En incluant les 4 plastocyanines d'algues vertes, cette homologie diminue à 28 résidus. Les résidus définissant le site actif: His37, Cys84, His87 et Met92 sont conservés pour toutes les plastocyanines, de même que les résidus 31-44 et 78-92.

La structure de la plastocyanine de peuplier fut déterminée pour la première fois par Freeman en 1978^[40], elle est actuellement raffinée à 1.33Å^[41]. Elle consiste en 8 feuillets β antiparallèles et une seule hélice α . L'atome de cuivre est coordonné par les résidus de deux histidines, une cystéine et une méthionine. La molécule de plastocyanine adopte des dimensions de l'ordre de 40x32x28Å. Dans la représentation la plus commune de la structure, l'axe de 40Å définit l'axe nord-sud et le groupe prosthétique est ainsi localisé au "nord" de la molécule (Figure 1.3.2).

Si la charge électrique globale de la plastocyanine à pH = 7 est de -9 ± 1 (PI = 4.1), aucun des 10 résidus chargés ne se trouve dans le quartier supérieur de la molécule. His87, exposé partiellement au solvant, est entouré uniquement par des résidus non-polaires, définissant un site hydrophobe. Les résidus acides Asp/Glu 42-45 et 59-61 sont concentrés aux alentours du résidu Tyr83, définissant parallèlement au site hydrophobe, un site acide.

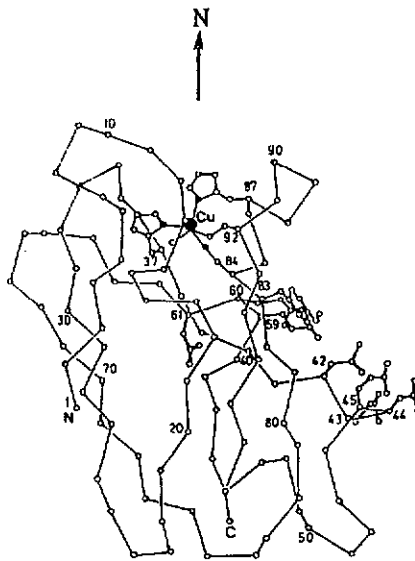


Figure 1.3.2 La plastocyanine selon la représentation de Freeman [41]

Les structures ont été déterminées pour l'apoplastocyanine, pour la plastocyanine dont l'atome de cuivre est substitué par du mercure et pour la plastocyanine réduite à six pH différents de 3.8 à 7.8[42-44]. Pour d'autres plastocyanines, les conformations en solution ont été étudiées par ^1H -RMN. Pour la plastocyanine d'épinard en particulier, ces mesures ^1H -RMN ont indiqué une structure très similaire à celle de la plastocyanine de peuplier[45]. Il est intéressant de noter qu'une seconde plastocyanine a été isolée des feuilles de peuplier. Comparée à la première caractérisation par Freeman, la séquence de cette seconde plastocyanine contient 12 modifications dont un carboxylate supplémentaire. Deux protéines de cuivre bleu de type 1 ont également été isolées des concombres.

Ces exemples démontrent l'existence possible de différentes plastocyanines dans une même famille de végétaux. Dans notre travail, la plastocyanine est extraite des feuilles de l'épinard *Spinacia oleracea*.

1.3.3 Le site actif

Le site actif est localisé au nord de la représentation structurale, $\sim 6\text{\AA}$ à l'intérieur de la protéine. Le cuivre est coordonné par les atomes d'azote de His37 et de His87 et par les atomes de soufre de Cys84 et de Met92. La géométrie du site de coordination est un tétraèdre irrégulier (Figure 1.3.3). Les deux liaisons Cu-N, ainsi que la liaison Cu-S (Cys84) sont considérées normales, mais la liaison Cu-S (Met92) de 2.9\AA est très longue.

La structure du site actif de la plastocyanine de peuplier à $\text{pH} = 6$ est pratiquement identique à celle de la protéine réduite à $\text{pH} = 7.8$. Cependant, si le pH est abaissé, la géométrie du site actif de la protéine réduite subit un changement profond dû à la protonation de His87 qui s'éloigne également du site de coordination par un mouvement de rotation de 180° . L'atome de cuivre s'enfonce alors dans la cavité du site et n'est plus coordonné que par les ligands His37, Cys84 et Met92. A un pH inférieur à 5.1, le cuivre et ses trois ligands sont quasiment coplanaires (Figure 1.3.4(a)).

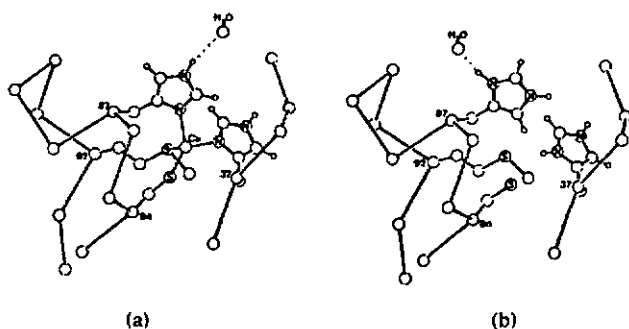


Figure 1.3.3 Site actif de la plastocyanine oxydée (a) et de l'apoplastocyanine (b) selon réf. [41]

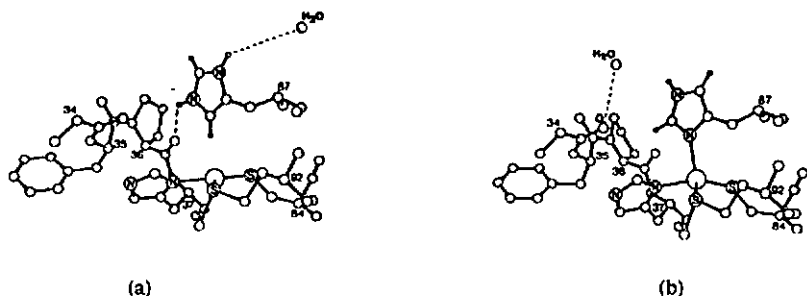


Figure 1.3.4 Site actif de la protéine réduite à pH = 3.8 (a) et à pH = 7.8 (b) selon réf. [41]

La forme trigonale stabilisant l'état réduit du cuivre, le potentiel de la protéine est de 430mV à pH = 4.2 contre 370mV à pH = 7.0. Comparé à l'aqua-ion $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+/1+}$, qui a un potentiel de 115mV, le site actif du cuivre de la plastocyanine est optimal pour ses fonctions physiologiques de transporteur d'électron (cytochrome f. 360mV; P700, 520mV). Ce potentiel idéal est la conséquence de la structure de la protéine, qui stabilise les deux formes Cu(II) et Cu(I) par la géométrie du site actif.

De plus, deux des quatre ligands sont des bases intermédiaires (imidazoles) qui sont préférées par le Cu(II) tandis que les deux autres ligands sont des bases molles (sulfures), préférées par le Cu(I).

La détermination de la structure de l'apoplastocyanine montre que la structure de la protéine ne change quasiment pas en retirant l'atome de cuivre. His87 est cependant retourné de 180° et dirige l'azote coordinateur en direction du solvant (Figure 1.3.3(b)). Garrett et ses collaborateurs ont ainsi suggéré que His87 joue un rôle de portillon d'entrée pour l'atome de cuivre dans le site actif lors de la biosynthèse de la protéine^[42].

Les protéines de cuivre bleu de type 1 ont une intense couleur bleue à l'état oxydé et présentent un très faible dédoublement hyperfin dans la région a_{\parallel} du spectre EPR. Le coefficient d'absorption molaire très important à 600nm provient d'un transfert de charge (LMCT) de faible énergie de l'orbitale $5f(\text{Cys-84})-\pi$ à l'orbitale $\text{Cu}-d_{x^2-y^2}$, alors que le faible dédoublement hyperfin est la conséquence de l'asymétrie dans l'environnement du cuivre. A l'heure actuelle, les propriétés du groupe prosthétique des protéines de cuivre bleu ne sont pas encore totalement reproduites pour des composés de coordination synthétiques.

1.3.4 Les sites de transfert d'électron

Beaucoup d'études récentes ont apporté leur contribution à l'image d'une plastocyanine exploitant deux sites de transfert d'électron. Le premier est localisé au "nord" de la molécule, environnant His87, et le second débouche à "l'est" via Cys84 et Tyr83. La nature des résidus au voisinage de His87 et de Tyr83 définissent deux zones bien distinctes (Figure 1.3.2).

Le premier site est hydrophobe, très proche de l'atome de cuivre, et implique His87, le seul ligand du cuivre exposé au solvant. Huit résidus environnant His87 complètent ce site et sont conservés pour toutes les plastocyanines eucaryotiques connues: Leu12; Ala33, Gly34, Phe35, Pro36, Pro86, Gly89, et Ala90. Il n'y a donc ni acide aminé chargé, ni résidu polaire dans cette région.

Le second site est rendu acide par la présence de nombreux carboxylates contenus dans les résidus 42 à 45 et 59 à 61. Il est par conséquent fortement négatif à pH = 7. Cette concentration de charges négatives rend cette région de la biomolécule unique. Trois résidus sont conservés pour toutes les plastocyanines eucaryotiques connues: Asp42, Asp43 et Glu44. Ce site est finalement complété par les résidus 59, 60, 61, qui sont des aspartates ou des glutamates, selon la source de la plastocyanine. Se trouvant passablement éloigné de l'atome de cuivre (~1.5Å), ce site est également dénommé le site éloigné.

Pour toutes les plastocyanines issues de cyanobactéries, la région acide n'existe pas.

La découverte de cette dualité dans le transfert d'électron de la plastocyanine des plantes vertes a été possible grâce à l'utilisation de complexes métalliques comme agents de transfert d'électron.

Deux couples rédox fréquemment utilisés dans les premières investigations concernant l'oxydation de la plastocyanine sont $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$ (410mV) et $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ (370mV) (phen = 1,10 phénantroline)[46-50]. La constante de vitesse observée pour l'oxydation de la plastocyanine par $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ montre un phénomène de saturation qui s'explique par l'association préalable relativement forte du complexe cationique et de la protéine. Cette saturation n'est par contre pas observée lors de l'emploi du réactif anionique. D'autres mesures ont montré une

augmentation de la constante d'association à force ionique plus faible et inversement, une disparition de cette association dans NaCl 0.5M^[51]. Cette dépendance de la constante de vitesse vis-à-vis de la force ionique diminue dans un milieu plus acide, où les résidus acides sont protonés. Les mesures cinétiques en fonction du pH ont permis de déterminer l'équilibre de protonation du site acide par un pKa voisin de 5.1^[52].

La vitesse de l'oxydation de la plastocyanine par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ n'est par contre pas affectée par une variation de la force ionique ou du pH.

L'analyse du spectre ^1H -RMN de la protéine en présence des composés $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$ et $[\text{Cr}(\text{pben})_3]^{3+}$ montre que les deux complexes de chrome se fixent en des endroits différents selon leur charge^[53]. La proposition des acides aminés impliqués dans l'association protéine - complexe ont aussi défini les deux sites réactionnels hydrophobe et acide^[54]. Ces études menées pour différentes sources de plastocyanines montrent une association proche de His87 pour les complexes anioniques et une association au site acide, impliquant en particulier Tyr83 pour les complexes cationiques $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ ou $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Le discernement entre un site spécifique ou une zone d'interaction n'est cependant pas encore clair. Les perturbations du spectre ^1H -RMN de la protéine liées à la présence du complexe de chrome montrent en effet que plusieurs résidus sont impliqués plus ou moins fortement dans cette association.

Une autre technique utilisée pour la localisation des sites de transfert d'électron est la réduction de la plastocyanine par l'aquacomplexe de chrome(II) et le séquençage consécutif de la protéine contenant le chrome(III) fixé au squelette polypeptidique^[27]. Cette technique a permis d'isoler un fragment polypeptidique contenant le chrome(III) fixé au niveau des résidus 42-45, identifiant également le site éloigné.

L'utilisation de plastocyanines mutantes^[24e] a encore permis de déceler le rôle critique joué par le résidu Leu12, dans la réactivité du site hydrophobe. L'importance de la nature du résidu Leu12 est très vraisemblablement liée à sa position très proche de His87.

La réactivité de petits composés de coordination a démontré que le site éloigné est également utilisé par la plastocyanine dans les réactions de transfert d'électron *in vivo*. Les complexes cationiques réagissant au site éloigné jouent en effet un rôle inhibiteur dans l'oxydation du cytochrome-f par la plastocyanine, ce qui laisse supposer que le cytochrome-f (qui possède également une zone de charges positives) réagit aux alentours de Tyr83^[55]. L'interaction du site hydrophobe et des partenaires physiologiques n'est par contre pas encore bien définie. La plastocyanine mutée L12E montre une moindre affinité pour le photosystème I par une vitesse de réduction passablement ralentie, ce qui laisse également supposer que ce partenaire physiologique réagit au niveau du site hydrophobe.

2. Synthèse et caractérisation des ligands et des complexes

2.1 Généralités

Un travail basé sur des mesures de stéréosélectivité requiert une connaissance parfaite de la structure des réactifs. Or, lors de la formation des composés de coordination, l'utilisation de ligands pluridentés conduit le plus souvent à la formation de multiples isomères géométriques. Par l'introduction de propriétés structurales spéciales dans l'élaboration du ligand, certains de ces isomères peuvent être fortement favorisés, voire formés de manière exclusive. La synthèse des complexes à partir de tels ligands est alors stéréospécifique. Parmi le choix des ligands coordonnant de manière stéréosélective, peu d'entre-eux sont linéaires et pentadentés. Alamp et promp (Figure 1.1.1c;e) sont de tels ligands et ont l'avantage de laisser une position de coordination libre dans un site octaédrique.

Dérivés de la N,N'-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)]bis[glycine], les ligands alamp et promp possèdent une symétrie C_2 et imposent par le biais de la pyridine substituée en 2 et en 6 une coordination f_{pf} du centre métallique^[56] (Figure 2.1.1). Cette diastéréosélectivité est très importante et elle permet d'attribuer une configuration absolue uniquement à partir de la chiralité du ligand.

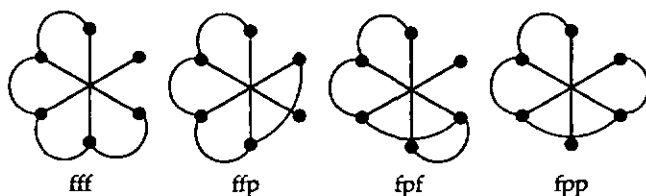


Figure 2.1.1 Isomères géométriques des complexes octaédriques formés avec un ligand linéaire pentadenté (f=facial; p= périphérique).

Par la détermination des structures aux rayons-X et par la comparaison des spectres CD, il a été démontré en effet que les cations complexes de cobalt(III) $[\text{Co}(\text{S,S})\text{-alamp}(\text{py})]^+$ et $[\text{Co}(\text{S,S})\text{-promp}(\text{H}_2\text{O})]^+$ adoptent une configuration absolue Λ -exo, alors que pour $[\text{Co}(\text{R,R})\text{-alamp}(\text{py})]^+$ et $[\text{Co}(\text{R,R})\text{-promp}(\text{H}_2\text{O})]^+$ la configuration absolue est Δ -exo^[57]. La diastéréosélectivité observée dans la formation des complexes inertes du cobalt(III) permet d'admettre que les complexes labiles du cobalt(II) adoptent les mêmes configurations absolues.

2.2 Synthèse des ligands alamp et promp

2.2.1 Principes de synthèse

Les ligands $\text{N,N}'\text{-}[(\text{pyridinediyl-2,6})\text{bis}(\text{méthylène})]\text{bis}[(\text{R})\text{- ou }(\text{S})\text{-prolioel}]$ ($(\text{R,R})\text{- ou }(\text{S,S})\text{-promp}$) et $\text{N,N}'\text{-}[(\text{pyridinediyl-2,6})\text{bis}(\text{méthylène})]\text{bis}[(\text{R})\text{- ou }(\text{S})\text{-alanine}]$ ($(\text{R,R})\text{- ou }(\text{S,S})\text{-alamp}$) utilisés dans ce travail sont synthétisés et purifiés par analogie aux modes opératoires décrits^[57], en introduisant quelques modifications:

- 1) Remplacement du bis(bromométhyl)-2,6-pyridine par le bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine qui est moins agressif pour la peau et permet ainsi une manipulation plus facile.
- 2) Recristallisation des ligands dans un mélange éthanol/acétone.

Les modes opératoires détaillés concernant la synthèse du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine et des ligands alamp et promp sont donnés au chapitre 2.5.

2.2.2 Caractérisation des ligands

Les principales analyses des ligands alamp et promp sont décrites dans la référence [57]. Les tests de pureté des ligands synthétisés dans ce travail sont effectués par polarimétrie et titration spectropolarimétrique du complexe de cuivre.

2.3 Synthèse des complexes inhibiteurs

Les complexes $[(\text{NH}_3)_5\text{Co}(\text{NH}_2)\text{Co}(\text{NH}_3)_5]\text{Br}_5$ et $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ sont utilisés dans le but d'inhiber le site éloigné de la plastocyanine lors des mesures de transfert d'électron (Chapitre 4).

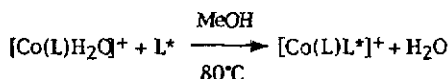
$[(\text{NH}_3)_5\text{Co}(\text{NH}_2)\text{Co}(\text{NH}_3)_5]\text{Br}_5$ et $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ sont synthétisés selon les modes opératoires décrits dans les références [58] et [59].

2.4 Synthèse des complexes mixtes de cobalt(III)

2.4.1 Principes de synthèse

Dans ce travail de synthèse, entrepris en collaboration avec A. Thiam^[60] et H.J. Hilgers^[61] qui ont décrit dans leur thèse de doctorat, la synthèse et les caractéristiques des complexes mixtes de promp et alamp contenant les ligands monodentés imidazole (im), thiazole (tz), et pyrazine (pz), nous décrivons la synthèse et la caractérisation des complexes mixtes $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\text{ClO}_4$, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{-buim}]\text{ClO}_4$ ainsi que des histidino-complexes $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{L-his}]\text{ClO}_4$ et $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{L-his}]\text{ClO}_4$. Les modes opératoires sont détaillés au chapitre 2.5.

Le principe de la synthèse du complexe mixte consiste à substituer la molécule d'eau de l'aquacomplexe du cobalt(III) obtenu selon [58] par L*, en présence d'un excès de ligand L* (L* = imidazole, N-méthylimidazole, N-butylimidazole ou L-histidine).



Les complexes mixtes sont recristallisés sous forme de perchlorates. Les histidino-complexes et le complexe mixte $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{buim}]^+$ n'ont pu être recristallisés sous la forme de perchlorate.

2.4.2 Caractérisation par spectroscopie UV/Vis et CD

Les différents coefficients d'extinction molaire de la série des complexes mixtes de cobalt(III) sont réunis dans le tableau 2.4.1, où nous avons également inclus les valeurs des potentiels de pic déterminés pour certains d'entre-eux par voltammétrie cyclique[60-61].

Les spectres d'absorption et CD enregistrés dans le domaine des longueurs d'onde du visible sont comparables pour toute la série des complexes imidazoles, y compris pour les solutions des histidino-complexes. Cette analogie spectrale permet d'admettre que les valeurs $\Delta\epsilon$ des histidino-complexes et des complexes imidazoles sont pratiquement équivalentes. Le tableau 2.4.2 confirme cette hypothèse en montrant que le rapport des maxima du spectre d'absorption et du spectre CD des solutions d'histidino-complexes ($E(\lambda) / m^*(\lambda)$) correspond bien au rapport $\epsilon(\lambda)/\Delta\epsilon(\lambda)$ des complexes imidazoles recristallisés.

$$\text{En considérant } \epsilon = \frac{E}{c \cdot l} \text{ et } \Delta\epsilon = \frac{m^*}{33000 c \cdot l}, \text{ alors } \frac{\epsilon}{\Delta\epsilon} = \frac{E \cdot 33000}{m^*} \quad (\text{éq. 2.1})$$

Tableau 2.4.1 Coefficients d'extinction molaire et potentiels de pic des aquacomplexes et des complexes mixtes de cobalt(III).

complexe	$\epsilon / [M^{-1}cm^{-1}]$	$\Delta\epsilon [M^{-1}cm^{-1}]$	$E_{pic}^*/ [mV]$	référence
$\Lambda-[Co^{III}(alamp)H_2O]^+$	171 (487nm)	2.37 (469nm)	- 0.20	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(alamp)im]^+$	205 (466nm)	4.22 (459nm)	- 0.26	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(alamp)meim]^+$	177 (467nm)	3.75 (460nm)	- 0.28	[60-61]
$\Delta-[Co^{III}(alamp)buim]^+$	200 (466nm)	-4.12 (460nm)	-----	ce travail
$\Lambda-[Co^{III}(alamp)L-bis]^+$	— (466nm)	— (460nm)	-----	ce travail
$\Lambda-[Co^{III}(promp)H_2O]^+$	291 (504nm)	1.63 (496nm)	- 0.14	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(promp)im]^+$	306 (494nm)	2.47 (489nm)	- 0.17	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(promp)meim]^+$	301 (496nm)	2.58 (490nm)	- 0.17	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(promp)buim]^+$	— (496nm)	— (490nm)	-----	[60-61]
$\Lambda-[Co^{III}(promp)L-bis]^+$	— (494nm)	— (489nm)	-----	ce travail

*mesuré à pH = 5.5 (valeurs calculées par rapport à l'ENH)

Tableau 2.4.2 Rapports $\epsilon(\lambda)/\Delta\epsilon(\lambda) = (\epsilon(\lambda)-33000)/m^*(\lambda)$ pour la série des histidino-complexes et des complexes imidazoles de cobalt(III).

complexe	L* = im	meim	buim	L-bis
$[Co^{III}(alamp)L^*]^+$	48.6 ^{a)}	47.2 ^{a)}	48.5 ^{a)}	48.5 ^{a)}
$[Co^{III}(promp)L^*]^+$	123.9 ^{b)}	116.7 ^{b)}	122.8 ^{b)}	123.2 ^{b)}

a) rapport $\epsilon(466nm)/\Delta\epsilon(460nm)$

b) rapport $\epsilon(496nm)/\Delta\epsilon(490nm)$

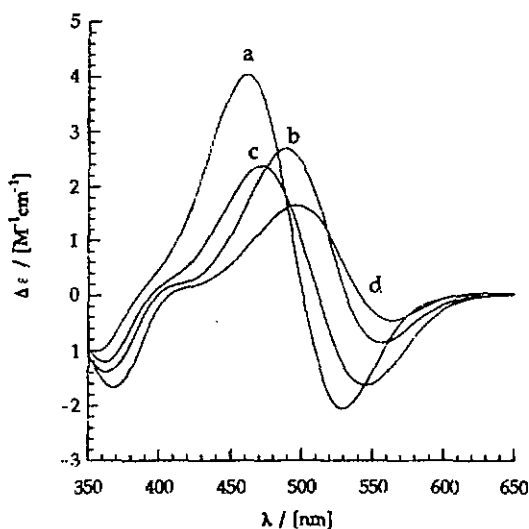


Figure 2.4.1 Spectres CD des complexes mixtes Λ -[Co^{III}((S,S)-alamp)im]⁺ (a); Λ -[Co^{III}((S,S)-promp)im]⁺ (b) et des aquacomplexes Λ -[Co^{III}((S,S)-alamp)H₂O]⁺(c); Λ -[Co^{III}((S,S)-promp)H₂O]⁺ (d).

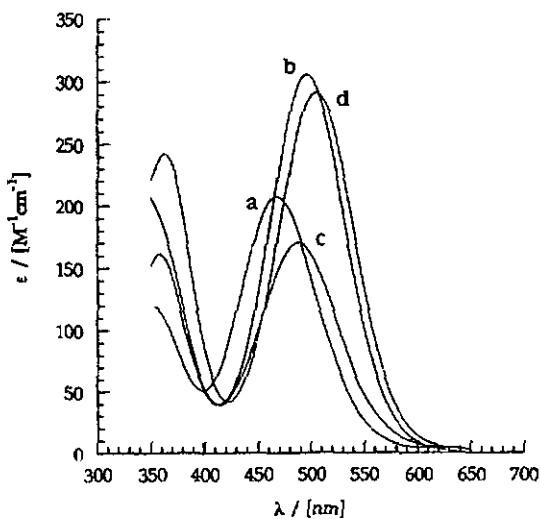


Figure 2.4.2 Spectres d'absorption des complexes mixtes [Co^{III}(alamp)im]⁺ (a); [Co^{III}(promp)im]⁺ (b) et des aquacomplexes [Co^{III}(alamp)H₂O]⁺ (c); [Co^{III}(promp)H₂O]⁺ (d).

Le reste méthyle ou butyle présent sur l'azote N¹ de l'imidazole, de même que le carbone asymétrique supplémentaire des histidino-complexes, modifient légèrement le spectre d'absorption ou le spectre CD des complexes mixtes de cobalt(III) dans le domaine des longueurs d'onde du visible. Si les intensités d'absorption et CD varient, leur rapport reste cependant rigoureusement constant. Cette observation est importante et en relation directe avec la détermination de la quantité de cobalt(III) fixé à la protéine lors des réactions de transfert d'électron (Chapitre 4).

Les spectres des complexes mixtes se distinguent cependant nettement des aquacomplexes de cobalt(III) par un déplacement hypsochrome, déjà observé pour les pyridino-complexes^[57].

Les spectres d'absorption sont caractéristiques des complexes de cobalt(III) d⁶ low-spin. Ils présentent deux bandes d'absorption correspondant aux transitions ${}^1A_{1g} \longrightarrow {}^1T_{1g}$ et ${}^1A_{1g} \longrightarrow {}^1T_{2g}$.

2.4.3 Caractérisation par spectroscopie RMN

Les produits recristallisés ont été analysés par ¹H-RMN dans D₂O. (Figures 2.4.3 et 2.4.4).

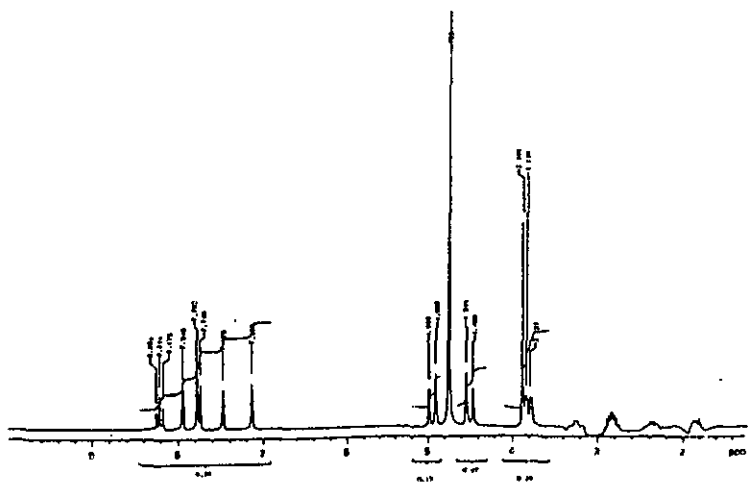


Figure 2.4.3 Spectre ^1H -RMN de $\text{rac}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\text{ClO}_4$

1.85 (m, 4H, pyrrolidine), 2.37 (m, 4H, pyrrolidine), 2.85 (m, 2H, pyrrolidine), 3.2 (m, 2H, pyrrolidine), 3.80 (dd, 2H, C^*H), 3.85 (s, 3H, N-CH_3 méthylimidazole), 4.50 (système AB, 2H, $\text{py-CHi}_2\text{-NH}$), 4.95 (système AB, 2H, $\text{py-CHi}_2\text{-NH}$), 7.14 (m, 1H, méthylimidazole), 7.48 (m, 1H, méthylimidazole), 7.76, (d, 2H, pyridine), 7.95 (s, 1H, méthylimidazole), 8.20 (t 1H, pyridine).

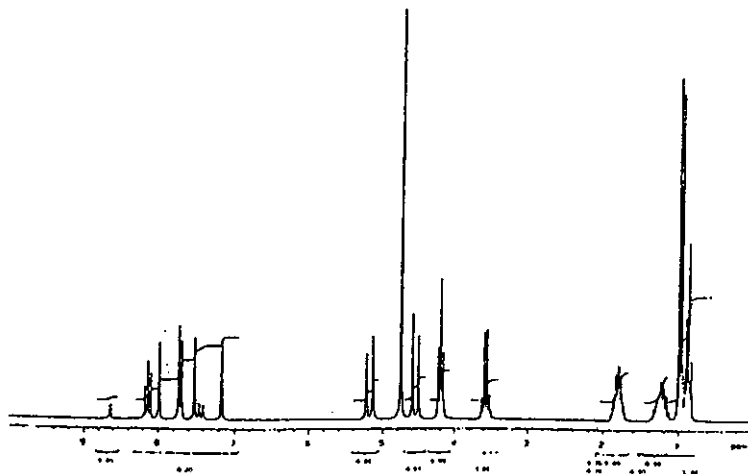


Figure 2.4.4 Spectre ^1H -RMN de δ - $[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$

0.90 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ - butylimidazole), 0.97 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$), 1.22 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ - butylimidazole), 1.80 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ - butylimidazole), 3.6 (q, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$), 4.6 (d, 2H, py-CHi-NH), 5.2 (d, 2H, py-CHj-NH), 7.17 (m, 1H, butylimidazole), 7.55 (m, 1H, butylimidazole), 7.70, (d, 2H, pyridine), 8.0 (s, 2H, NH), 8.2 (t 1H, pyridine), 8.65 (s, 1H, NH butylimidazole).

Si l'on ne tient pas compte du ligand à la sixième position de coordination, les complexes mixtes de cobalt(III) synthétisés possèdent une symétrie C_2 qui simplifie l'interprétation du spectre ^1H -RMN. La coordination du ligand autour du cobalt rend les deux protons méthyléniques non équivalents. Dans le cas du complexe δ - $[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-alamp})\text{buim}]^+$, le signal du proton en cis par rapport au

proton de l'amine (H_i) sort sous forme d'un doublet car il est couplé avec H_j ($J_{gem} = 17.5\text{Hz}$). Contrairement au spectre $^1\text{H-RMN}$ du pyridino-complexe effectué par Sauvain^[57], nous n'observons pas le couplage H_iH_j de 5Hz.

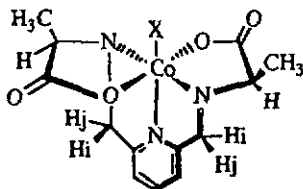


Figure 2.4.5 Numérotation des deux protons méthyléniques non équivalents (valable pour $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{X}]$ également).

2.4.4 Caractérisation par diffraction aux rayons-X

La recristallisation des complexes $\text{rac-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\text{ClO}_4$, $\text{rac-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{-buim}]\text{ClO}_4$ et $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{R,R-alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$ a permis une analyse par diffraction aux rayons-X (Figures 2.4.6 et 2.4.7). Les tableaux 2.4.3 à 2.4.6 regroupent les différents paramètres cristallographiques.

Pour l'ensemble des complexes de cobalt(III) à base des ligands linéaires pentadentés *alamp* et *promp*, les analyses aux rayons-X effectuées jusqu'à présent indiquent plusieurs structures cristallines. Pour les complexes mixtes de $[\text{Co}(\text{promp})]^+$, les caractéristiques liées à la géométrie des cristaux, à l'arrangement moléculaire du ligand et aux interactions entre unités de coordination, peuvent être nettement différentes. Le complexe mixte $\text{rac-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\text{ClO}_4$ cristallise sous forme d'un polymère avec une structure en chaîne infinie (Figure 2.4.6a). Le composé optiquement actif cristallise

également sous forme de polymère^[60], mais présente un arrangement différent dans la structure en chaîne infinie, tout en possédant le même nombre d'unités chimiques dans la période de chaîne (Figure 2.4.6b): $\text{rac}-([\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{-meim}]\cdot\text{Na}(\text{ClO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O})_n$ et $\Delta-([\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-promp})\text{meim}]\text{ClO}_4\cdot\text{NaClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O})_n$. Les maillons de la chaîne du polymère sont reliés dans les deux cas par un pont sodium hexacoordonné par des atomes d'oxygène.

Dans le racémate, deux perchlorates sont reliés chacun par un oxygène à l'atome de sodium. La chaîne du polymère n'est pas symétrique, elle se partage en une succession d'entités $\Lambda-[\text{Co}^{\text{III}}((\text{S},\text{S})\text{-promp})\text{meim}]^+$ et $\Delta-[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-promp})\text{meim}]^+$. L'ion sodium est lié par un simple pont carboxylate sur une entité ($d_{\text{Co-Na}} = 5.452\text{\AA}$) et par un double pont carboxylate du complexe de cobalt(III) sur l'autre ($d_{\text{Co-Na}} = 4.450\text{\AA}$), (Figure 2.4.6). La molécule d'eau reste symétriquement partagée de part et d'autre des maillons du polymère. Dans le cas du complexe mixte optiquement actif, un seul perchlorate est coordonné au sodium par deux atomes d'oxygène et la molécule d'eau coordonnée sur le pont sodium est en position trans par rapport au perchlorate. Dans ce cas, les maillons de la chaîne sont parfaitement symétriques au pont formé par le sodium et l'ion sodium est lié par un double pont carboxylate du complexe de cobalt(III).

Les structures des complexes synthétisés à base de $[\text{Co}(\text{alamp})]$, $\text{rac}-[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$ et la forme optiquement active $\Delta-[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$ ne se présentent pas sous la forme de polymères, mais sous une forme discrète. La grande mobilité du groupe butylimidazole a rendu nécessaire une analyse aux rayons-X à -50°C .

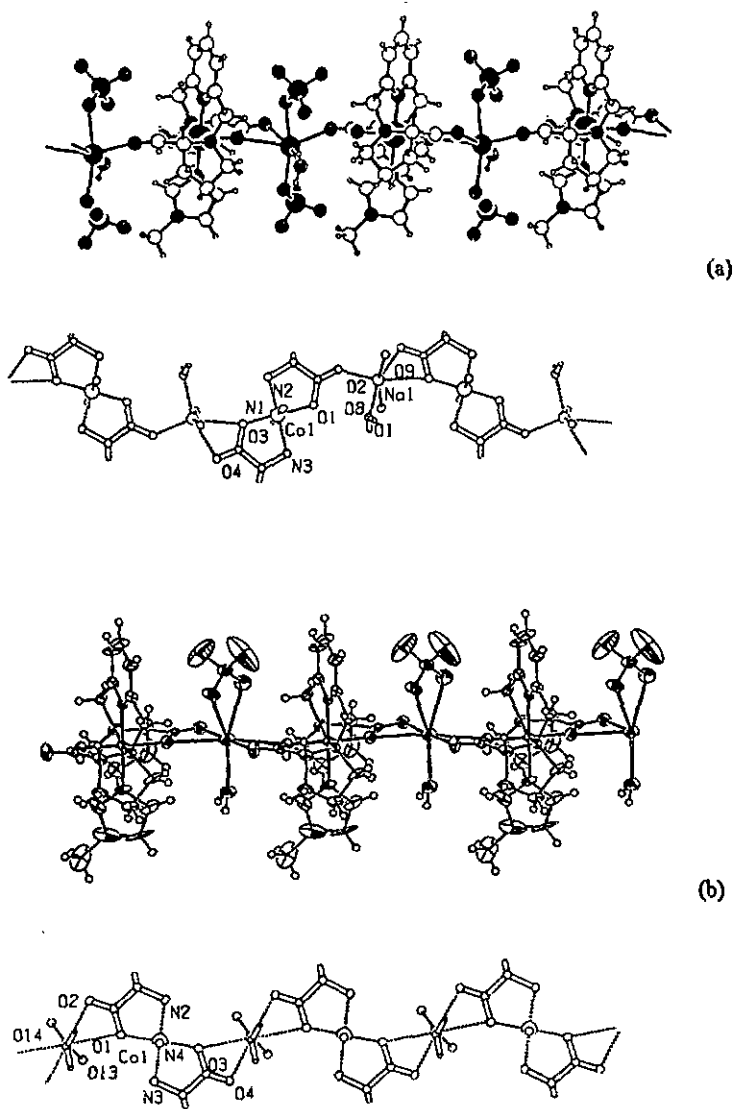


Figure 2.4.6 Structure de $\text{rac-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\text{Na}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_i\text{n}$ (a) et de $\delta\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R},\text{R})\text{-promp})\text{meim}]\text{Na}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_i\text{n}$ (b).

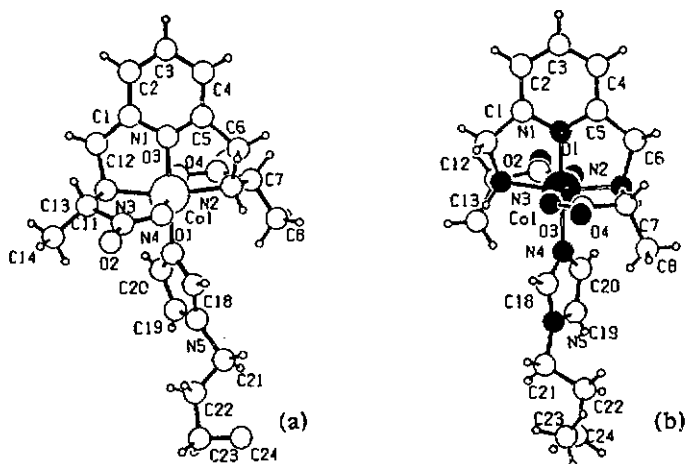


Figure 2.4.7 Structures de $\text{rac-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$ (a) et de $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4$ (b).

Tableau 2.4.3 Données cristallographiques des complexes mixtes de cobalt(III) synthétisés dans ce travail.

Ligand	(RR,SS)-promp	(RR,SS)-alamp	(R,R)-alamp
L'	Méthylimidazole	Butylimidazole	Butylimidazole
formule empirique	$\text{rac-}[\text{Co}(\text{promp})\text{meim}]\text{Na}(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_n$	$\text{rac-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4 \cdot \text{buimHClO}_4$	$\Delta\text{-}[\text{Co}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{buim}]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
système cristallin	orthorhombique	triclinique	monoclinique
groupe spatial	P bca	P -1 (Z = 2)	P 21 (Z = 2)
a (Å)	13.288	10.307	13.818
b (Å)	19.164	13.703	9.534
c (Å)	22.284	14.193	12.057
α	90	88.34	90
β	90	73.92	125.84
γ	90	70.90	90
V (Å ³)	5674.6	1815.9	1287.6

Tableau 2.4.4 Longueurs de liaisons [Å] et angles de torsion [°] pour rac-[Co^{III}(promp)meim]-ClO₄

Co(1)-N(1)	1.874	Co(1)-N(4)	1.935	Co(1)-O(1)	1.873
Co(1)-N(2)	2.011	Co(1)-N(3)	2.008	Co(1)-O(3)	1.884
N(1)-Co(1)-O(1)	89.1	N(1)-Co(1)-N(4)	178.5	Na(1)-O(2)	2.249
N(1)-Co(1)-O(3)	90.8	N(1)-Co(1)-N(3)	82.6	Na(1)-O(3)	2.633
N(2)-Co(1)-O(1)	88.3	N(1)-Co(1)-N(2)	83.2	Na(1)-O(4)	2.354
N(2)-Co(1)-O(3)	91.8	N(2)-Co(1)-N(4)	96.2	Na(1)-O(5)	2.450
N(3)-Co(1)-O(1)	92.3	N(2)-Co(1)-N(3)	165.8	Na(1)-O(9)	2.395
N(3)-Co(1)-O(3)	87.6	N(3)-Co(1)-N(4)	98.0	Na(1)-O(w)	2.297
N(4)-Co(1)-O(1)	89.5	O(1)-Co(1)-O(3)	179.9		
N(4)-Co(1)-O(3)	90.6				
O(2)-Na(1)-O(w)	99.9	O(2)-Na(1)-O(5)	86.3	O(4)-Na(1)-O(3)	52.35
O(2)-Na(1)-O(4)	98.2	O(w)-Na(1)-O(5)	88.2	O(9)-Na(1)-O(3)	88.8
O(w)-Na(1)-O(4)	160.6	O(4)-Na(1)-O(5)	85.9	O(5)-Na(1)-O(3)	79.0
O(2)-Na(1)-O(9)	106.4	O(9)-Na(1)-O(5)	167.1		
O(w)-Na(1)-O(4)	91.6	O(2)-Na(1)-O(3)	147.5		
O(4)-Na(1)-O(9)	90.1	O(w)-Na(1)-O(3)	108.3		

Tableau 2.4.5 Longueurs de liaisons [Å] et angles de torsion [°] pour rac-[Co(alam)pbulm]ClO₄

Co(1)-N(1)	1.863	Co(1)-N(4)	1.940	Co(1)-O(1)	1.884
Co(1)-N(2)	1.970	Co(1)-N(3)	1.961	Co(1)-O(3)	1.894
N(1)-Co(1)-O(1)	94.4	N(1)-Co(1)-N(4)	176.2	Na(1)-O(2)	2.249
N(1)-Co(1)-O(3)	87.1	N(1)-Co(1)-N(3)	84.0	Na(1)-O(3)	2.633
N(2)-Co(1)-O(1)	93.2	N(1)-Co(1)-N(2)	83.0	Na(1)-O(4)	2.354
N(2)-Co(1)-O(3)	86.7	N(2)-Co(1)-N(4)	96.0	Na(1)-O(5)	2.450
N(3)-Co(1)-O(1)	87.6	N(2)-Co(1)-N(3)	167.0	Na(1)-O(9)	2.395
N(3)-Co(1)-O(3)	92.9	N(3)-Co(1)-N(4)	97.0	Na(1)-O(w)	2.297
N(4)-Co(1)-O(1)	89.3	O(1)-Co(1)-O(3)	178.5		
N(4)-Co(1)-O(3)	89.2				

Tableau 2.4.6 Longueurs de liaisons [Å] et angles de torsion [°] pour Δ -[Co((R,R)-alamp)-bulm]ClO₄

Co(1)-N(1)	1.867	Co(1)-N(4)	1.938	Co(1)-O(1)	1.899
Co(1)-N(2)	1.967	Co(1)-N(3)	1.956	Co(1)-O(3)	1.885
N(1)-Co(1)-O(1)	88.1	N(1)-Co(1)-N(4)	178.0	Na(1)-O(2)	2.249
N(1)-Co(1)-O(3)	90.2	N(1)-Co(1)-N(3)	84.0	Na(1)-O(3)	2.633
N(2)-Co(1)-O(1)	92.4	N(1)-Co(1)-N(2)	84.0	Na(1)-O(4)	2.354
N(2)-Co(1)-O(3)	87.3	N(2)-Co(1)-N(4)	95.5	Na(1)-O(5)	2.450
N(3)-Co(1)-O(1)	87.5	N(2)-Co(1)-N(3)	168.0	Na(1)-O(9)	2.395
N(3)-Co(1)-O(3)	92.4	N(3)-Co(1)-N(4)	96.5	Na(1)-O(w)	2.297
N(4)-Co(1)-O(1)	90.0	O(1)-Co(1)-O(3)	178.3		
N(4)-Co(1)-O(3)	91.6				

2.4.5 Caractérisation par spectre de masse

Le complexe $\text{rac-}\{[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\cdot\text{Na}(\text{ClO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$ a également été caractérisé par un spectre de masse (electrospray positif). Un seul signal significatif est observé à $m/z = 472.1$ correspondant à $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]^+$.

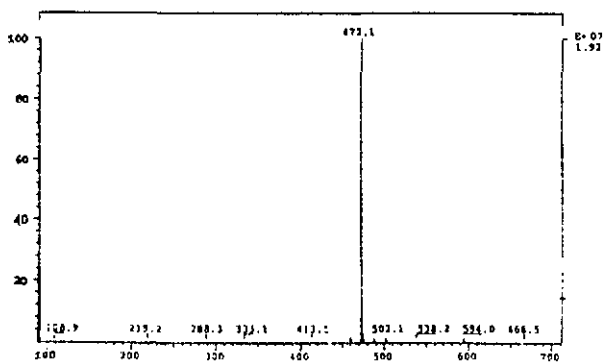
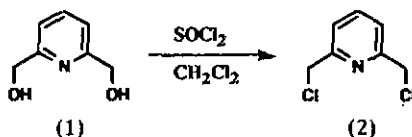


Figure 2.4.9 Analyse par électrospray positif du complexe $\text{rac-}\{[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{meim}]\cdot\text{Na}(\text{ClO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$

2.5 Modes opératoires

2.5.1 Synthèse du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine



50g (0.359mol) de bis(hydroxyméthyl)-2,6-pyridine (1) et 500ml de dichlorométhane fraîchement distillé sont introduits un ballon tricol de 1l surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à introduction.

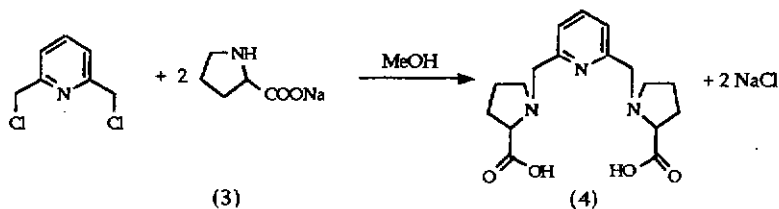
A la suspension préalablement refroidie par un bain de glace, 171g (1.435mol; 4éq.) de chlorure de thionyle fraîchement distillés sont introduits goutte à goutte via une ampoule à introduction, sous forte agitation. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 8h, avant d'être chauffé à reflux pendant une nuit.

Après refroidissement, l'excès de chlorure de thionyle est hydrolysé en versant le mélange réactionnel dans de la glace. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est neutralisée par une solution de carbonate de sodium saturée. Le bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine (2) précipité est filtré, séché au dessiccateur et purifié par sublimation à P = 12mmHg et T = 90°C.

La phase organique est concentrée à sec et le résidu de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine est également purifié par sublimation.

9.5g de produit sont ainsi récupérés de la phase organique et 40.0g de la phase aqueuse, soit un rendement de 78%.

2.5.2 Synthèse de promp



12.6g (91.9mmol 2.5éq.) de (S)- ou (R)-prolinate de sodium (3) - obtenu par neutralisation de l'acide aminé par une quantité stoechiométrique de NaOH(aq) - sont dissous dans 100ml de méthanol distillé et introduits dans un ballon tricol de 500ml muni d'une agitation magnétique, équipé d'un réfrigérant et d'une ampoule à introduction. La solution est rendue basique par NaOH 4M dans du méthanol. (La basicité est contrôlée par la présence de deux gouttes d'une solution de phénolphaléine dans le milieu réactionnel).

6.47g (36.76mmol) de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine dans 80ml de méthanol distillé sont ajoutés goutte à goutte et sous vive agitation en maintenant le milieu réactionnel basique par l'adjonction de NaOH 4M méthanolique.

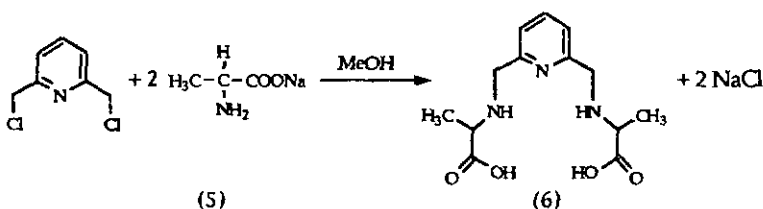
Le reflux est maintenu 24h. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à température ambiante et neutralisé par HCl 1:1. Le NaCl précipité est filtré et le mélange réactionnel évaporé à sec.

L'acide aminé en excès est séparé du ligand par chromatographie sur résine échangeuse d'ions DOWEX 50 W x 8, 200-400 mesh, H⁺. Le déplacement avec une solution de NaOH 0.05M permet de séparer l'acide aminé non réagi du ligand. Les différentes fractions récoltées sont analysées sur gel de silice (phase mobile: butanol/acide acétique/eau 2:1:1). Les fractions contenant l'acide aminé (révélé

par la ninhydrine) sont écartées et celles contenant le ligand seul sont réunies et concentrées.

Promp (4) est ensuite cristallisé sous forme de dichlorhydrate (promp-2HCl) dans un mélange HCl 5M/éthanol/acétone (le volume de HCl ajouté est calculé sur la base d'un rendement théorique de 100%). Après deux recristallisations, nous obtenons un produit pur. (12.7g; 62% de rendement).

2.5.3 Synthèse d'alamp



Ce ligand est obtenu de manière analogue à la synthèse de promp, par la condensation du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine avec 2 équivalents d'alaninate de sodium (5) conduisant à un rendement de 65%. La cristallisation d'alamp (6) s'effectue dans un mélange éthanol/acétone, sans formation du dichlorhydrate.

2.5.4 Synthèse des complexes mixtes de cobalt(III)

1 éq. de $[\text{Co}(\text{L})\text{H}_2\text{O}]\text{CO}_4$ (où L = promp ou alamp) sont mélangés à 10 équivalents de L* (L* = imidazole, N-méthylimidazole, N-butylimidazole) dans du méthanol fraîchement distillé. Le mélange réactionnel est agité et porté à reflux pendant 24h.

Le méthanol est éliminé par évaporation rotative et le résidu repris dans un peu d'eau. Le mélange est tout d'abord passé sur Sephadex G-10 puis chromatographié sur Sephadex SP-25. La bande rouge (orangée dans le cas des complexes imidazoles [Co(alamp)L*]⁺) est éluée par NaClO₄ 1%. L'éluion permet de récupérer une très faible quantité d'aquacomplexe non réagi. La solution contenant le complexe mixte désiré est concentrée et l'excès de perchlorate éliminé par passage sur Sephadex G-10. La forme optiquement active ou les racémates des complexes sythétisés sont recristallisés dans un mélange eau/éthanol 1:1 à 4°C.

Les histidino-complexes [Co^{III}(alamp)L-his]ClO₄ et [Co^{III}(promp)L-his]ClO₄ sont sythétisés de manière analogue. Nous n'avons cependant pas réussi à les recristalliser dans un mélange eau/éthanol 1:1 à 4°C.

3. Extraction et purification de la plastocyanine des feuilles d'épinard

Les manipulations décrites ci-dessous ont été effectuées dans les laboratoires de l'institut de biochimie de l'Université de Neuchâtel.

3.1 Mode opératoire

Le mode opératoire utilisé est tiré de la référence [62].

3kg de feuilles d'épinard fraîches sont broyées en présence de 3l d'une solution K_2HPO_4 25mM, Na_2H_2edta 0.2mM, et MET (mercapto-éthanol) 14mM. Après filtration et centrifugation (20min, 13000 t/min) le pH est ajusté à 7.0 par K_2HPO_4 1M.

Une première précipitation au sulfate d'ammonium est effectuée en ajoutant $(NH_4)_2SO_4$ solide jusqu'à 50% de saturation et en maintenant le pH à 7.0 par NH_3 2M. Les culots de la centrifugation (10min; 13000t/min) sont jetés. Une nouvelle adjonction de sulfate d'ammonium est effectuée jusqu'à 80% de saturation. Après centrifugation (10min; 13000t/min) le surnageant est passé sur DEAE cellulose DE-23 (5X23cm). Un lavage avec 5 volumes de colonne de tampon Tris-HCl pH = 7.9 contenant 60% de sulfate d'ammonium est d'abord effectué, puis une élution avec le même tampon contenant 30% de sulfate d'ammonium.

Les fractions colorées contenant la plastocyanine, la ferrédoxine et d'autres protéines sont combinées et concentrées sur YM-10. La solution concentrée (25ml) est éluee sur Séphadex G-50F (2.5X98cm) par un tampon 50mM tris-HCl pH = 7.3 et 50mM en NaCl. La plastocyanine est détectée par l'addition de $K_3[Fe(CN)_6]$ dans les fractions.

Les fractions bleues sont récupérées et chromatographiées sur DEAE-trisacryl équilibrée par le même tampon utilisé dans l'étape précédente. Les protéines sont éluées au moyen d'un gradient linéaire en NaCl (50mM-300mM) dans Tris/HCl (50mM pH = 7.3). Les fractions contenant la plastocyanine sont concentrées sur YM-5 jusqu'à un volume de 10ml. La purification finale est effectuée par FPLC sur colonne de résine phényl sépharose High Load. La protéine pure ($R_{597/278} < 1.2$) est ensuite conservée à -20°C). Une quantité de 70mg de plastocyanine pure a été obtenue.

3.2 Caractérisation par spectroscopie d'absorption et CD

Les spectres d'absorption et CD des solutions de plastocyanine utilisée dans ce travail sont donnés aux figures 3.2.1 et 3.2.2.

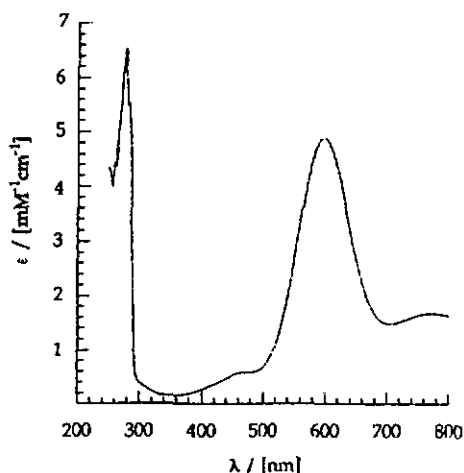


Figure 3.2.1 Spectre d'absorption de la plastocyanine oxydée

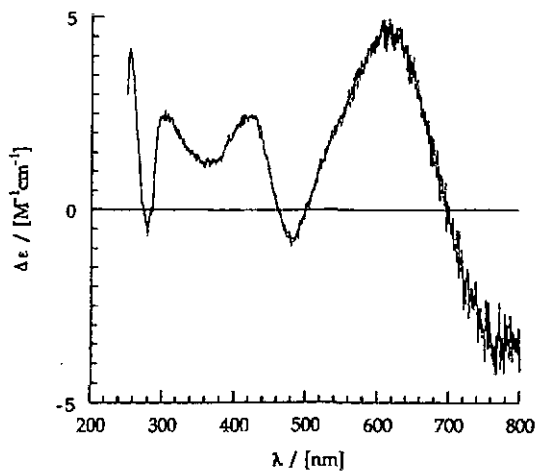


Figure 3.2.2 Spectre CD de la plastocyanine oxydée

4. Etude cinétique de la réduction de la plastocyanine

4.1 Généralités

Les organismes vivants naissent, croissent, se reproduisent et meurent suite à des millions de transformations chimiques plus ou moins rapides. Le soleil brûle son réservoir d'hydrogène à un rythme qui nous permet d'envisager son existence pendant quelques milliards d'années encore. De même que pour nos océans ou notre atmosphère, une caractéristique de tout matériau est sa capacité de subir des transformations de nature chimique ou physique. Le domaine de temps de ces réactions est extrêmement variable: quelques femtosecondes (10^{-15} s) pour les plus rapides, à des milliards d'années pour les transformations des systèmes géologiques.

Si la thermodynamique décrit un système chimique à l'équilibre, la cinétique étudie le changement des propriétés chimiques avec le temps, lorsque le système évolue en direction de son équilibre. L'interprétation cinétique des réactions chimiques est fréquemment appelée dynamique de réaction.

Cette connaissance dynamique des réactions chimiques a permis de concevoir et de produire un nombre important de composés qui sont devenus essentiels à notre société. Il faut néanmoins admettre que nos connaissances sur les dynamiques de nombreuses réactions sont encore très lacunaires et tout particulièrement en ce qui concerne les réactions agissant dans les organismes vivants.

La cinétique est en rapport direct avec les dynamiques des réactions chimiques, elles déterminent les vitesses de réactions et permettent en parallèle de décrire un mécanisme de réaction. Idéalement, un mécanisme implique la connaissance de tous les détails de chacune des étapes moléculaires impliquées dans la réaction

globale (incluant les énergies, la stéréochimie...). En pratique, l'expérience permet de déterminer la vitesse moyenne des transformations d'un grand nombre de molécules et les mécanismes proposés présentent une succession d'étapes où les molécules sont supposées avoir une énergie moyenne.

Les vitesses de réaction sont mesurées à partir de l'observation du changement des concentrations des réactifs ou des produits en fonction du temps. A l'exception des réactions d'ordre zéro, la vitesse dépend de la concentration d'au moins un des réactifs. La nature exacte de cette dépendance est décrite par une loi de vitesse:

$$v = k \cdot [A]^n [B]^m \dots$$

La constante de vitesse k , indépendante de la concentration et déterminée pour une température donnée (habituellement 298K) est le paramètre cinétique utilisé pour décrire, comparer ou différencier les vitesses des réactions ayant des lois de vitesse similaires. Ces constantes sont généralement évaluées à partir de deux types de méthodes expérimentales distinctes:

- a) mesure de la concentration des espèces en fonction du degré d'avancement de la réaction,
- b) observation du changement d'une propriété physique du système qui est fonction, si possible linéaire, de la concentration d'une espèce.

La détermination de la constante de vitesse à température ambiante ne suffit pas à une étude exhaustive. La mesure des constantes de vitesse en fonction de variables physiques et chimiques permet d'élucider de manière plus adéquate les mécanismes réactionnels. La température est le paramètre physique privilégié des études cinétiques: elle produit un large effet sur la vitesse de réaction et se maîtrise bien au niveau expérimental.

L'effet de la température sur la constante de vitesse conduit, selon la théorie du complexe activé, à l'obtention de l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger et de l'entropie d'activation ΔS^\ddagger . L'entropie d'activation est souvent utilisée comme critère mécanistique, ce paramètre étant une quantification de la variation du désordre dans l'état de transition.

La détermination des paramètres d'activation est une étape importante lors de l'étude d'un mécanisme réactionnel. Les informations concernant les changements énergétiques intervenant lors de réactions moléculaires sont souvent primordiales. Le calcul de ces paramètres est possible en connaissant les constantes de vitesse à différentes températures.

Selon la théorie du complexe activé, la constante de vitesse d'une réaction chimique s'exprime par la relation de Eyring^[63, 64].

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}\right) \quad (\text{éq. 4.1})$$

k est la constante de vitesse de la réaction à la température T ; ΔG^\ddagger est l'énergie libre d'activation; R la constante des gaz parfaits; k_B la constante de Boltzmann et h la constante de Planck. En introduisant l'équation $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ dans la relation de Eyring, on obtient une équation qui relie la constante de vitesse de réaction k à l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger et à l'entropie d'activation ΔS^\ddagger .

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \quad (\text{éq. 4.2})$$

Cette relation, établie pour des réactions en phase gazeuse est couramment utilisée pour les réactions en solution.

Les paramètres d'activation peuvent alors se déduire par régression linéaire de la représentation $\ln(k/T) = f(1/T)$. La valeur de ΔS^\ddagger est entachée d'une grande

imprécision, car elle est obtenue par extrapolation de la représentation de Eyring ($1/T$ tendant vers 0).

Il ne faut pas oublier que les mécanismes de transfert d'électron procèdent en trois étapes élémentaires (Chapitre 1). Dans l'hypothèse du pré-équilibre (les vitesses de la formation du complexe précurseur et de la réaction inverse sont beaucoup plus rapides que le transfert d'électron), l'expression de la constante de vitesse observée se ramène à l'expression:

$$-\frac{d[\text{PCu(II)}]}{dt} = K \cdot k_{te} \cdot [\text{CoL}] \cdot [\text{PCu(II)}] \quad (\text{éq. 4.3})$$

K définit la constante de formation du complexe précurseur et k_{te} la constante de vitesse du transfert d'électron proprement dit. La constante de vitesse observée $k_{obs} = K \cdot k_{te} \cdot [\text{CoL}]$ contient donc implicitement la constante de formation du complexe précurseur. Les conditions expérimentales de pseudo-premier ordre utilisées dans ce travail permettent finalement de déterminer une constante de vitesse de deuxième ordre par $k = K \cdot k_{te}$. Les paramètres d'activation obtenus par les mesures à température variable (ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger) sont donc des fonctions composites.

L'utilisation de nouveaux matériaux a permis le développement d'appareils de mesure utilisant la pression comme paramètre supplémentaire lors d'études cinétiques. L'effet de la pression sur la constante de vitesse conduit à l'obtention du volume d'activation ΔV^\ddagger , qui représente la différence entre la somme des volumes molaires partiels de l'état de transition et la somme des volumes molaires partiels des réactifs. ΔV^\ddagger se compose de deux contributions:

a) une contribution intrinsèque ΔV^\ddagger_{int} qui rend compte de la différence de volume intrinsèque entre l'état de transition et les réactifs,

b) une contribution électrostrictive $\Delta V^{\#}_{\text{elec}}$ qui correspond au changement de volume provoqué par les effets de solvation.

La contribution intrinsèque est représentative des changements des longueurs de liaison et donne une information directe sur le mécanisme.

La dépendance des paramètres cinétiques avec la pression peut également se décrire à partir de la théorie du complexe activé. En exprimant la relation de Eyring sous sa forme logarithmique, on obtient:

$$\Delta G^{\#} = -R \cdot T \cdot \left(\ln \frac{k_B \cdot T}{h} - \ln k \right) \quad (\text{éq. 4.4})$$

En dérivant cette expression en fonction de la pression à température constante, on obtient:

$$\left(\frac{\partial \Delta G^{\#}}{\partial P} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T = \Delta V^{\#} \quad (\text{éq. 4.5})$$

Une accélération de la vitesse de réaction avec la pression se traduit par un volume d'activation négatif. Inversement, une diminution de la constante de vitesse avec la pression correspond à un $\Delta V^{\#}$ positif.

Par intégration de la relation ci-dessus et en considérant que $\Delta V^{\#}$ est indépendant de la pression, on obtient l'équation:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{\Delta V^{\#}}{RT} \cdot P \quad (\text{éq. 4.6})$$

k_0 est la constante de vitesse à pression nulle, pratiquement égale à la constante de vitesse à pression ambiante. Si le volume d'activation dépend de la pression, on peut exprimer la variation de $\ln k$ par rapport à P par une fonction quadratique:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{\Delta V^{\#}_0 \cdot P}{RT} + \frac{\Delta \beta^{\#} P^2}{2RT} \quad (\text{éq. 4.7})$$

ΔV_0^\ddagger est le volume d'activation à pression nulle (pratiquement égal au volume d'activation à pression ambiante). $\Delta\beta^\ddagger$ est le coefficient de compressibilité d'activation donné par:

$$\Delta\beta^\ddagger = -(\partial\Delta V^\ddagger / \partial P)_T \quad (\text{éq. 4.8})$$

en combinant les équations, on obtient finalement:

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V_0^\ddagger - \Delta\beta^\ddagger \Delta P \quad (\text{éq. 4.9})$$

Pour tenir compte de la variation de ΔV^\ddagger en fonction de la température, on peut définir un coefficient d'expansivité thermique d'activation $\Delta\alpha^\ddagger$ défini par:

$$\Delta\alpha^\ddagger = 1 / \Delta V_{298}^\ddagger - \left(\partial\Delta V^\ddagger / \partial T \right)_P \quad (\text{éq. 4.10})$$

Les valeurs de $\Delta\alpha^\ddagger$ sont très faibles et ΔV^\ddagger peut être considéré comme constant dans un petit intervalle de température.

4.2 Techniques et conditions expérimentales

Les vitesses des réactions chimiques se répartissant sur une échelle de temps très vaste, il n'existe pas une technique expérimentale unique. Les réactions rapides sont fréquemment étudiées par des méthodes d'injection continue ou bloquée. L'utilisation de détecteurs UV/Vis permet de suivre spectrophotométriquement les réactions chimiques mettant en jeu des substances qui absorbent dans ce domaine des longueurs d'onde.

Pour les systèmes que nous nous proposons d'étudier, l'appareillage utilisé pour les réactions rapides est un stopped flow Hi-Tech couplé à un détecteur UV/Vis

monolongueur d'onde, et un spectrophotomètre UVIKON-930 ou un spectropolarimètre JASCO J-710 pour les réactions plus lentes.

La variation en absorbance à 597nm permet de suivre l'évolution de la concentration en protéine oxydée. Dans les conditions expérimentales envisagées, seule la plastocyanine oxydée absorbe de façon significative à cette longueur d'onde (Figure 3.2.1).

Toutes les mesures cinétiques de réduction de la plastocyanine sont effectuées dans des conditions expérimentales de pseudo-premier ordre, la concentration du complexe de cobalt(II) étant au minimum 20 fois supérieure à celle de la protéine. La loi de vitesse se ramène ainsi à:

$$v = -\frac{d[\text{PCu(II)}]}{dt} = K \cdot k_{te} \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}] \cdot [\text{PCu(II)}] = k \cdot [\text{PCu}] \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 = k_{\text{obs}} \cdot [\text{PCu}]$$

Après intégration: $\ln[\text{PCu}]_t = \ln[\text{PCu}]_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$

Sous une forme exponentielle : $[\text{PCu}]_t = [\text{PCu}]_0 \cdot \exp\{-k_{\text{obs}} \cdot t\}$ (éq. 4.11)

La constante de vitesse k_{obs} est déterminée à l'aide du logiciel KALEIDAGRAPH. Ce logiciel, installé sur Macintosh, permet de calculer les paramètres correspondant au mieux à une fonction mathématique donnée. Dans l'analyse de premier ordre, la fonction introduite dans ce logiciel de fitting est:

$$V = (V_0 - V_{\text{inf}}) \cdot \exp\{-k_{\text{obs}} \cdot t\} + V_{\text{inf}}$$
 (éq. 4.12)

V représente l'absorption à 597nm ou un signal électrique proportionnel. Pour obtenir la constante de vitesse de deuxième ordre k , la constante de vitesse observée est divisée par la concentration initiale en complexe réducteur présente dans la cellule de mesure.

$$k = k_{\text{obs}} / [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0$$
 (éq. 4.13)

4.3 Réduction de la plastocyanine dans un tampon phosphate

La préparation des différentes solutions de complexes réducteurs et de plastocyanine est détaillée au chapitre 4.6.

Dans un tampon phosphate, nous rappelons que les complexes réducteurs se présentent sous la forme d'aquacomplexes.

4.3.1 Mesures en fonction de la concentration du complexe réducteur

La constante de vitesse observée dans la réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes de cobalt(II) est proportionnelle à la concentration du complexe réducteur dans le domaine de concentrations étudié (Figures 4.3.1 et 4.3.2).

Cette proportionnalité directe indique que la constante d'association des réactifs avant le transfert d'électron (formation du complexe précurseur) est relativement faible ($K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \ll 1$ et $k_{\text{obs}} = K \cdot k_{\text{te}} \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0$). La pente de la représentation k_{obs} en fonction de la concentration du réducteur permet ainsi de déterminer $K \cdot k_{\text{te}}$, définissant une constante de vitesse bimoléculaire moyenne k_{A} ou k_{A} . Ces constantes de vitesse sont données dans le tableau 4.3.1, où nous avons également reporté les constantes de vitesse de la réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes de fer(II), déterminées dans les mêmes conditions expérimentales par Sauvain^[57].

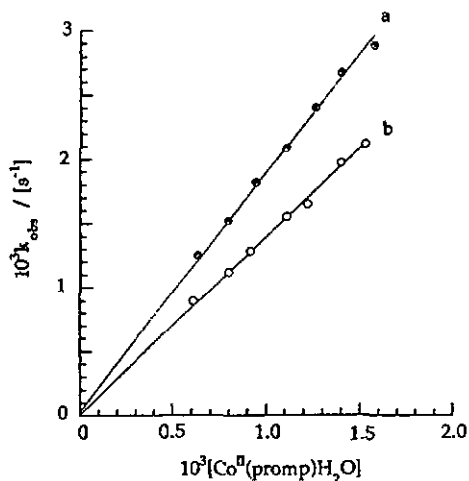


Figure 4.3.1 Réduction de la plastocyanine par $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-promp})\text{H}_2\text{O}]$ (a) et $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-promp})\text{H}_2\text{O}]$ (b). $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; $T = 25.0^\circ\text{C}$; tampon phosphate $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.12\text{M}$

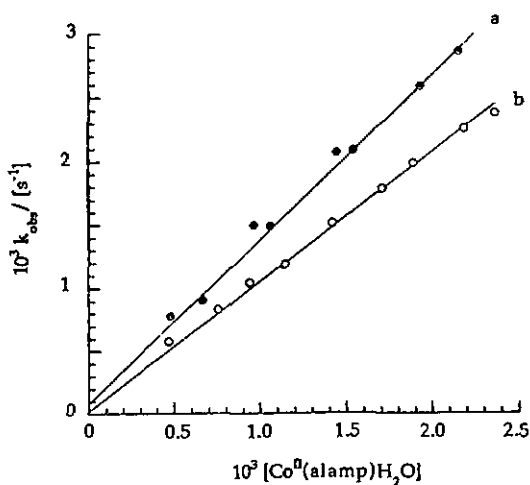


Figure 4.3.2 Réduction de la plastocyanine par $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]$ (a) et $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]$ (b). $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; $T = 25.0^\circ\text{C}$; tampon phosphate $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.12\text{M}$

Tableau 4.3.1 Constantes de vitesse de deuxième ordre et stéréosélectivité dans la réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes de fer(II) et de cobalt(II). T = 25.0°C; tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M

complexe	pH	k_{Δ} [M ⁻¹ s ⁻¹] ^a	k_{Λ} [M ⁻¹ s ⁻¹] ^a	k_{Δ} / k_{Λ}	Ref.
[Fe ^{II} (alamp)H ₂ O]	7.0	(4.1 ± 0.2)·10 ⁴	(2.4 ± 0.2)·10 ⁴	1.70	[57]
	7.0 ^a)	(4.1 ± 0.2)·10 ⁴	(2.1 ± 0.1)·10 ⁴	1.95	
	7.0 ^b)	(3.7 ± 0.2)·10 ⁴	(2.1 ± 0.1)·10 ⁴	1.76	
	6.2	(3.6 ± 0.2)·10 ⁴	(2.2 ± 0.1)·10 ⁴	1.64	
[Fe ^{II} (promp)H ₂ O]	7.0	(1.4 ± 0.2)·10 ⁴	(1.8 ± 0.2)·10 ⁴	0.76	[57]
	7.0	(1.3 ± 0.1)·10 ⁴	(1.7 ± 0.2)·10 ⁴	0.74	
[Fe ^{II} (valmp)H ₂ O]	7.0	(1.4 ± 0.1)·10 ⁴	(1.2 ± 0.1)·10 ⁴	1.14	[57]
[Co ^{II} (alamp)H ₂ O]	7.0	1.37 ± 0.03	1.84 ± 0.05	0.74	ce travail
	7.0 ^a)	1.34 ± 0.03	1.85 ± 0.05	0.72	
[Co ^{II} (promp)H ₂ O]	7.0	1.14 ± 0.03	1.38 ± 0.06	0.83	ce travail
	7.0 ^a)	1.17 ± 0.03	1.34 ± 0.06	0.87	

^a) valeur moyenne obtenue par l'analyse de 4 traces cinétiques au minimum

^a) présence de 1.0·10⁻⁶ à 1.0·10⁻³M en [Co(NH₃)₆]³⁺

^b) présence de 3.1·10⁻⁵ à 1.9·10⁻⁴M en [(NH₃)₅CoNH₂Co(NH₃)₅]⁵⁺

Pour les deux complexes étudiés [Co^{II}(promp)H₂O] et [Co^{II}(alamp)H₂O], le rapport des constantes de vitesses bimoléculaires k_{Δ}/k_{Λ} à T = 25°C définit une stéréosélectivité cinétique en faveur de l'énantiomère Λ . Pour les aquacomplexes du fer(II), la stéréosélectivité est aussi en faveur de l'énantiomère Λ pour [Fe^{II}(promp)H₂O], mais pour l'énantiomère Δ dans le cas de [Fe^{II}(alamp)H₂O]. La réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes du cobalt(II) dans ces conditions expérimentales est cependant environ 10000 à 20000 fois plus lente que pour les aquacomplexes du fer(II).

Une telle différence de vitesse du transfert d'électron en fonction de la nature de l'ion métallique a également été observée lors des réactions d'auto échange de [Co(NH₃)₅]^{3+/2+} comparé à Fe(aq)^{3+/2+} et à [Ru(NH₃)₅]^{3+/2+}. La lenteur de la

réaction avec le cobalt a été attribué en particulier à la grande différence des distances $\text{Co}^{\text{II}}\text{-N}$ (2.114Å) et $\text{Co}^{\text{III}}\text{-N}$ (1.936Å) impliquant une forte énergie de réorganisation λ , ainsi qu'au changement de multiplicité du spin, en passant d'une situation high spin (Co^{II}) à un état low spin (Co^{III}) [74, 75].

4.3.2 Mesures en présence d'un complexe inhibiteur et en fonction de la force ionique

La présence d'un inhibiteur du site acide de la plastocyanine ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$; $K = 470 \text{ M}^{-1}$ [57]), ne modifie pas la vitesse du transfert d'électron par les aquacomplexes du cobalt(II), dans le domaine de concentration étudié (Figure 4.3.3).

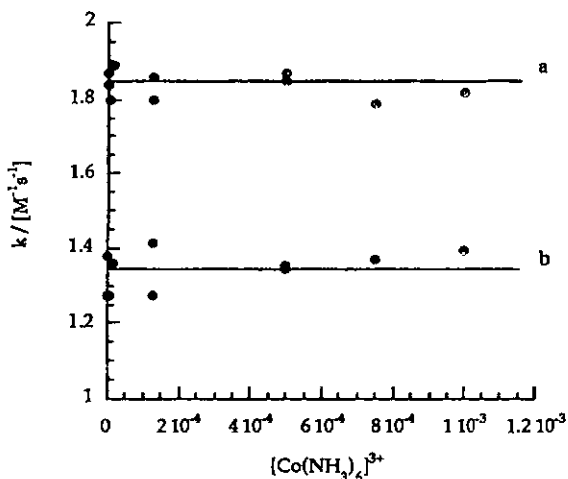


Figure 4.3.3 Variation de k en fonction de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. (a) $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]$; (b) $\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-promp})\text{H}_2\text{O}]$. $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$; tampon phosphate $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.12 \text{ M}$

La variation de la force ionique provoquée par des tampons phosphate de différentes concentrations ne modifie pas non plus la vitesse du transfert d'électron par les aquacomplexes du cobalt(II) (Figure 4.3.4).

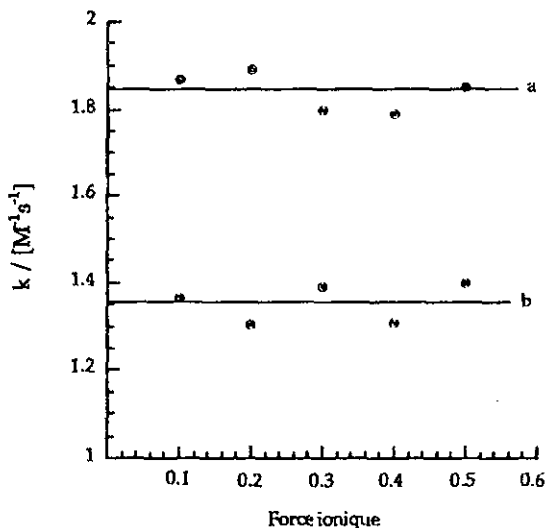


Figure 4.3.4 Variation de k en fonction de la force ionique (a) Δ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O]; (b) Δ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O]. T = 25.0 °C; tampon phosphate pH = 7.0

Cette constance de la vitesse du transfert d'électron en présence d'un complexe inhibiteur du site acide et en fonction de la force ionique, démontre que le site éloigné de la plastocyanine ne participe vraisemblablement pas au mécanisme de réduction par les aquacomplexes, et ce autant pour les aquacomplexes du fer(II)^[57] que pour ceux du cobalt(II). Considérant les facteurs électrostatiques des aquacomplexes (neutres), ainsi que la polarité des ligands alamp et promp (restes méthyles ou pyrrolidinyles) passablement hydrophobes, le choix du site réactionnel adjacent, proche de His87, n'est pas surprenant.

4.3.3 Mesures en fonction de la température

La détermination de la constante de vitesse en fonction de la température (Tableaux 4.3.2 et 4.3.3) permet le calcul des paramètres d'activation ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger du transfert d'électron. Les représentations de Eyring sont données aux figures 4.3.5 et 4.3.6 et les paramètres d'activation sont réunis dans le tableau 4.3.4.

Tableau 4.3.2 Constantes de vitesses de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon phosphate pH = 7.0; $I = 0.12\text{M}$

T / [°C]	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]^*$	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]^*$
16.0	0.76 ± 0.08	1.00 ± 0.08
20.7	1.00 ± 0.09	1.32 ± 0.05
25.3	1.35 ± 0.11	1.73 ± 0.06
29.5	1.67 ± 0.08	2.31 ± 0.12
34.5	2.20 ± 0.10	2.96 ± 0.15
39.3	2.76 ± 0.12	3.60 ± 0.12

*) Valeurs moyennes obtenues sur un minimum de 4 mesures par température

Tableau 4.3.3 Constantes de vitesses de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon phosphate pH = 7.0; $I = 0.12\text{M}$

T / [°C]	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]^*$	T / [°C]	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]^*$
16.0	0.58 ± 0.02	17.0	0.60 ± 0.03
17.2	0.64 ± 0.06	17.3	0.62 ± 0.02
19.2	0.72 ± 0.03	19.0	0.72 ± 0.02
20.3	0.85 ± 0.07	20.5	0.88 ± 0.02
21.4	0.87 ± 0.03	21.1	0.88 ± 0.05
23.0	1.00 ± 0.08	23.1	1.14 ± 0.02
25.0	1.20 ± 0.12	25.0	1.38 ± 0.06
25.0	1.14 ± 0.03	25.0	1.40 ± 0.05
27.0	1.36 ± 0.02	27.0	1.68 ± 0.12
29.0	1.67 ± 0.04	29.1	2.08 ± 0.12
29.3	1.84 ± 0.10	29.4	2.30 ± 0.04
31.0	1.95 ± 0.05	31.0	2.48 ± 0.08

*) Valeurs moyennes regroupant deux séries de mesures.

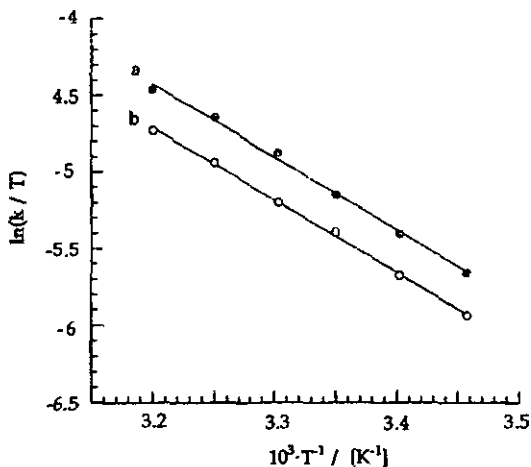


Figure 4.3.5 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b). [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; tampon phosphaté pH = 7.0; I = 0.12M

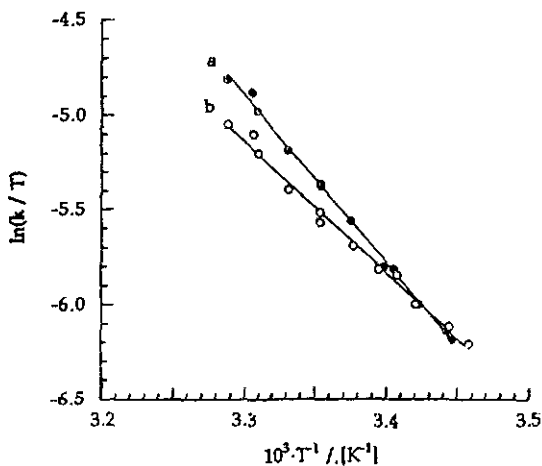


Figure 4.3.6 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b). [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M

La dépendance de la constante de vitesse de deuxième ordre en fonction de la température est particulière: des différences importantes sont observées non seulement entre les aquacomplexes du fer(II) et ceux du cobalt(II), non seulement selon la nature des ligands des complexes réducteurs, mais également entre deux énantiomères (en particulier pour $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$). Ces comportements sont significatifs de différences énergétiques importantes lors de la formation de l'état de transition.

Tableau 4.3.4 Paramètres d'activation déterminés pour la réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes de fer(II) [57] et de cobalt(II). Tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M

Complexe	ΔH^\ddagger [kJmol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [Jmol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta\Delta H^\ddagger$ [kJmol ⁻¹] (Δ - Λ)	$T\Delta\Delta S^\ddagger$ [kJmol ⁻¹]a)	$\Delta\Delta G^\ddagger$ [kJmol ⁻¹]b)
Δ -[Fe ^{II} (alamp)]	18.1 ± 0.8	-94 ± 4	+ 3.0 ± 1.6	+ 4.47 ± 3.6	-1.47 ± 0.15
Λ -[Fe ^{II} (alamp)]	15.1 ± 0.8	-109 ± 8			
Δ -[Fe ^{II} (promp)]	29.1 ± 1.2	-68 ± 6	+ 3.0 ± 2.4	+ 2.08 ± 3.6	+0.71 ± 0.50
Λ -[Fe ^{II} (promp)]	26.1 ± 1.2	-75 ± 6			
Δ -[Fe ^{II} (valmp)]	37.1 ± 2.0	-42 ± 4	+ 1.1 ± 4.0	+ 1.50 ± 2.4	-0.40 ± 0.38
Λ -[Fe ^{II} (valmp)]	36.0 ± 2.0	-47 ± 4			
Δ -[Co ^{II} (alamp)]	57.6 ± 1.7	-50 ± 6	-16.1 ± 2.9	-16.50 ± 3.0	+0.47 ± 0.18
Λ -[Co ^{II} (alamp)]	73.7 ± 1.2	+ 5 ± 4			
Δ -[Co ^{II} (promp)]	39.4 ± 0.7	-111 ± 2	-0.3 ± 2.0	-1.19 ± 1.8	+0.73 ± 0.09
Λ -[Co ^{II} (promp)]	39.7 ± 1.3	-107 ± 4			

a) T = 298.15 K;

b) $\Delta\Delta G^\ddagger$ calculé à partir des rapports $k(\Delta)/k(\Lambda)$ (Tableau 4.3.1) à T = 25.0°C.

La comparaison des paramètres d'activation entre les aquacomplexes de fer(II) et ceux de cobalt(II) montre deux divergences importantes:

- Pour les aquacomplexes de fer(II), l'enthalpie d'activation est toujours plus grande et l'entropie d'activation toujours plus positive pour le dérivé Δ , alors que

le contraire est vérifié pour les aquacomplexes du cobalt(II), en tout cas en ce qui concerne $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

- La réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes du fer(II) présente une variation de l'enthalpie d'activation en proportion à l'encombrement stérique des substituants des ligands: $\text{alamp} < \text{promp} < \text{valmp}$. Pour les complexes du cobalt(II), l'enthalpie d'activation est considérablement plus grande pour le ligand le moins volumineux.

Des études récentes^[61,70] ont montré que le transfert d'électron entre les complexes $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]^+$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}']$, où L et L' sont des ligands de même type que ceux utilisés dans ce travail, se déroule par un mécanisme de type sphère interne impliquant très probablement un groupe carboxylate pontant les deux centres métalliques. Dans le cas des réactions de quasi auto échange $[\text{Co}^{\text{II}}\text{LX}]^+ / [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]$, le transfert d'électron est également assuré par un carboxylate quand X = pyridine, mais par un pont imidazole quand ce dernier occupe la sixième position de coordination du complexe du cobalt(III)^[60]. En considérant de plus la préférence relative du fer(II) et du cobalt(II) pour les atomes coordinateurs oxygène et azote, les différences des paramètres d'activation observées en fonction de la nature de l'ion métallique peuvent résulter de mécanismes de transfert d'électron impliquant des résidus différents de la plastocyanine.

Dans le cas du complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$, la variation de la constante de vitesse en fonction de la température pour chaque énantiomère est semblable (Figure 4.3.5), ce qui rejoint les observations de J.-J. Sauvain pour la réduction de la plastocyanine par les complexes du fer(II)^[57]. Pour $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ cependant, les représentations de Eyring sont nettement différentes, conduisant même à leur intersection aux environs de 19°C (Figure 4.3.6). A cette température, la

stéréosélectivité s'inverse, devenant favorable à l'énantiomère Δ pour des températures plus basses.

Le système $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]/\text{PCu}(\text{II})$ crée une situation où les différences des paramètres d'activation entre deux énantiomères sont conséquentes. Ce n'est pas uniquement le système avec les enthalpies d'activation les plus importantes, mais également le système avec les plus grandes différences des paramètres d'activation jamais mesurés entre deux énantiomères dans les études de transfert d'électron impliquant une métalloprotéine. $\Delta\Delta H^\ddagger$ représente 20 à 35% de l'enthalpie d'activation totale.

En considérant les couples ferrédoxine/ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{py}]^+$ et cytochrome *c*/ $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$, la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ est le troisième cas où un croisement des représentations de Eyring s'observe dans le domaine de température étudié. Ces trois cas impliquent toujours le complexe du ligand *alamp*, bien que les métalloprotéines soient totalement différentes.

La détermination des paramètres d'activation permet d'observer un phénomène de compensation entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation. A une enthalpie d'activation élevée correspond toujours une entropie d'activation plus positive. Les phénomènes de compensation $\Delta H^\ddagger/\Delta S^\ddagger$ sont bien connus dans les réactions impliquant des protéines^[67] et ont également été observé pour les réactions de transfert d'électron^[68,69]. Les trois métalloprotéines engagées jusqu'à présent dans les réactions de transfert d'électron avec les complexes synthétiques dérivés de la *N,N'*-[(pyridinediyl-2,6)bis(méthylène)]bis(glycine) le montre clairement^[8,9]. Il est important de constater que la stéréosélectivité résulte d'une compensation incomplète entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation et reste ainsi relativement faible comparée aux différences des chaleurs d'activation de ces processus.

Dans l'hypothèse d'une réaction de transfert d'électron de type sphère externe et où le site d'interaction est reconnu le même pour chaque énantiomère, ce phénomène compensatoire peut s'interpréter par des interactions diastéréoisomères qui modulent la distance d'approche des réactifs^[9a] (Figure 4.3.7).

Plus le complexe s'approche de la surface de la métalloprotéine plus la désolvatation est importante et conduit à une enthalpie d'activation élevée. Le réarrangement des molécules de solvant lié à cette forte désolvatation est aussi plus conséquent et rend compte d'un ΔS^\ddagger plus positif.

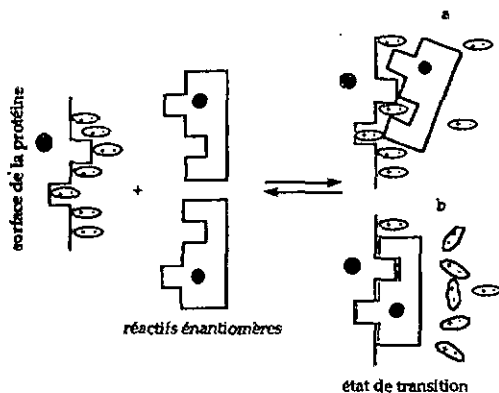


Figure 4.3.7 Représentation schématique de la formation d'un état de transition diastéréoisomère entre une métalloprotéine et les énantiomères d'un réactif optiquement actif. $\Delta H^\ddagger(a) < \Delta H^\ddagger(b)$ et $\Delta S^\ddagger(a) < \Delta S^\ddagger(b)$.

Appliquée aux réactifs énantiomères qui conduisent à un état de transition diastéréoisomère, l'enthalpie d'activation devient ainsi une mesure de la reconnaissance chirale: l'énantiomère qui possède la plus grande enthalpie d'activation s'imbrique mieux à la surface protéinique. La stéréosélectivité cinétique, définie comme le rapport des constantes de vitesses k_D/k_A ne traduit donc pas la reconnaissance chirale à elle seule, mais l'expression macroscopique

de tous les facteurs énergétiques qui caractérisent le système. Il se peut ainsi que l'énantiomère présentant la meilleure reconnaissance chirale réagisse le plus lentement.

Cette hypothèse sous-entend que seules les interactions stéréochimiques parviennent à différencier de manière conséquente les paramètres d'activation du transfert d'électron entre deux énantiomères. Tous les systèmes envisagés jusqu'à présent montrent que ces différences sont faibles, sauf pour $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$. Il se pose alors la question de savoir si les interactions stéréochimiques sont à elles seules suffisantes pour expliquer les grandes différences énergétiques rencontrées entre les deux énantiomères du complexe $[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

Les mesures de fixation du réducteur à la surface de la protéine ont été entreprises dans le but de répondre à cette question.

4.3.4 Fixation du centre métallique par transfert d'électron, mesurée à l'aide du dichroïsme circulaire

L'emploi de complexes labiles de Cr^{2+} par Taube et ses collaborateurs a mis en évidence les mécanismes de transfert d'électron sphère interne^[75]. Les complexes labiles du Cr^{2+} s'oxydent en composés inertes de Cr^{3+} qui peuvent conserver le ligand pontant du transfert d'électron. L'analyse du complexe du chrome(III) permet ainsi d'identifier le mécanisme du transfert d'électron. Cette technique a également été appliquée à des transferts d'électron impliquant des métalloprotéines, mais l'identification par séquençage de la protéine des résidus contenant le Cr^{3+} fixé se révèle difficile [27b-d].

Nous nous sommes proposés de modifier cette technique d'analyse par l'utilisation de composés optiquement actifs et en identifiant les produits du transfert d'électron par mesure au dichroïsme circulaire. De même que pour les complexes du chrome(II), les complexes labiles du cobalt(II) utilisés dans ce travail deviennent inertes suite à leur oxydation en cobalt(III) (Chapitre 2.4).

La plastocyanine réduite n'ayant pas d'activité CD dans le domaine du visible, l'identification du complexe inerte du cobalt(III) formé suite au transfert d'électron est facilitée: l'excès du complexe réducteur mis à part, le complexe du cobalt(III) formé est la seule espèce conservant un signal CD significatif dans ce domaine des longueurs d'onde.

Dans le cas d'un transfert d'électron sphère interne se déroulant par un état de transition où le complexe réducteur est ponté par l'imidazole de His87, ce cycle imidazole être coordonné au complexe du cobalt(III) (Figure 4.3.8). Par contre, si le transfert d'électron est de type sphère externe, seul l'aquacomplexe du cobalt(III) est formé et le métal ne se coordonne pas à la protéine. Le spectre CD de l'aquacomplexe étant sensiblement différent de celui de l'histidino-complexe (ou du complexe imidazole) du cobalt(III) (Figure 2.4.1), cette analyse devrait permettre d'obtenir des informations précieuses sur les sites et les mécanismes du transfert d'électron.

4.3.4.1 Conditions expérimentales

Les solutions de la plastocyanine et des complexes réducteurs sont préparées selon les modes opératoires détaillés au chapitre 4.6. En fonction de l'intensité CD des complexes du cobalt(III), la concentration en plastocyanine dans la cellule de

mesure est plus élevée que celle utilisée pour les mesures de transfert d'électron précédentes: elle est de l'ordre de 10^{-4} M et celle en complexe de $2 \cdot 10^{-3}$ M.

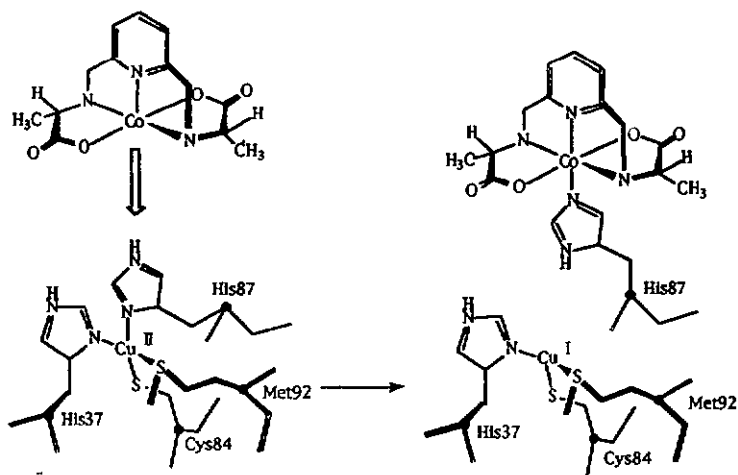


Figure 4.3.8 Hypothèse d'un mécanisme de transfert d'électron par coordination de His87 .

Les mesures ont été effectuées dans des tampons phosphate de différents pH à $T = 20^\circ\text{C}$ et dans le cas de la réduction par $\Delta\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{R,R}\text{-aiamp})\text{H}_2\text{O}]$, température et pH ont été variés.

Un volume équivalent d'une solution de plastocyanine et de complexe réducteur sont mélangés dans une cuve spectropolarimétrique de 1cm thermostatée. Le spectre CD est enregistré de 350 à 650nm à des intervalles de temps réguliers. Lorsque la réaction est terminée, un spectre final est enregistré et corrigé en soustrayant la contribution de l'excès de l'aquacomplexe du cobalt(II). Cette contribution se calcule en connaissant la concentration initiale précise en plastocyanine oxydée et en complexe réducteur. Le spectre CD résiduel ainsi

déterminé correspond uniquement à la contribution du complexe du cobalt(III) formé lors du transfert d'électrode.

Après l'enregistrement du spectre CD final, le mélange réactionnel est également dialysé dans 2.5 l de tampon phosphate. Seule la part de cobalt(III) fixée à la protéine est ainsi récupérée. Pour minimiser les erreurs provenant de la dilution ou de la concentration de l'échantillon suite à la dialyse, l'échantillon récupéré est porté à un volume précis. Le facteur de dilution est ainsi connu et permet de déterminer le taux de fixation en cobalt(III). Ces deux techniques (détermination du spectre CD résiduel et du spectre CD après dialyse), sont utilisées pour la détermination du taux de fixation.

4.3.4.2 Résultats

Les spectres CD résiduels obtenus pour chaque énantiomère des complexes $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ sont comparés aux spectres de références des aquacomplexes et des bistidino-complexes (ou du complexe imidazole) de cobalt(III).

Pour les réactions de réduction de la plastocyanine par les deux énantiomères du complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ à pH = 7.0 et à 20°C, le spectre CD résiduel correspond parfaitement au spectre CD de l'aquacomplexe de cobalt(III) (Figure 4.3.9). Après dialyse, l'échantillon n'a plus aucun signal CD dans le visible, indiquant également aucune fixation du cobalt à la protéine (Tableau 4.3.5).

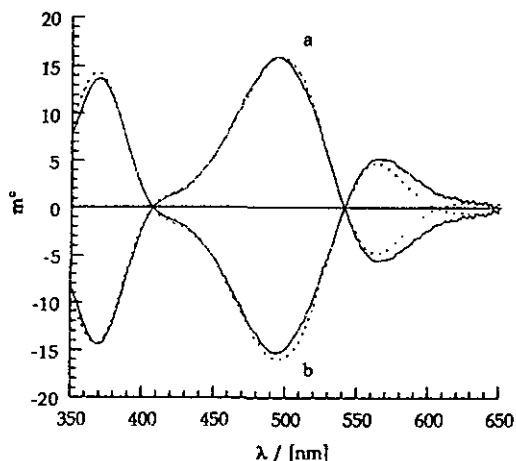


Figure 4.3.9 Réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b). Superposition du spectre CD résiduel aux spectres de références Λ -[Co^{III}((S,S)-promp)H₂O]⁺ et Δ -[Co^{III}((R,R)-promp)H₂O]⁺ (pointillés). [PCu]₀ = 10⁻⁴M; [Co^{II}]₀ = 2 · 10⁻³M. tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M

Pour les mesures effectuées avec le complexe [Co^{II}(alamp)H₂O] dans les mêmes conditions expérimentales, les résultats sont totalement différents.

Le spectre résiduel de la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] correspond parfaitement au spectre de l'histidino-complexe (ou du complexe imidazole) de cobalt(III) (Figure 4.3.10), significatif d'une association du complexe à un cycle imidazole via la sixième position de coordination. Lorsque la solution de plastocyanine réduite contenant le complexe Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)] fixé est dialysée puis réoxydée par [Fe(CN)₆]³⁻, le spectre CD met également en évidence la présence du cobalt(III) coordonné. La figure 4.3.11 montre le spectre CD après réoxydation (a) et pour comparaison le spectre CD de la plastocyanine (b).

En déduisant du spectre (a) celui du complexe Λ -[Co(alamp)im]⁺ (voir figure 2.4.1), on obtient la contribution de la plastocyanine seule contenant le complexe du cobalt(III) fixé. Comparé au spectre de la plastocyanine native, les deux bandes à 610 et 775nm montrent un déplacement bathochrome d'environ 20nm dû à la disparition de l'histidine, vraisemblablement remplacée par une molécule d'eau dans la sphère de coordination du cuivre(II) (Figure 4.3.12).

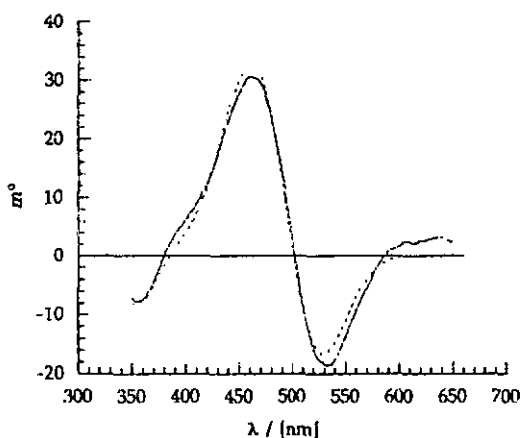


Figure 4.3.10 Réduction de la plastocyanine par Λ -Co^{II}[(S,S)-alamp]H₂O]. Superposition du spectre CD résiduel au spectre de référence Λ -Co^{III}[(S,S)-alamp]H₂O]⁺ (pointillés). [PCu]₀ = 1.1·10⁻⁴M; [Co^{III}]₀ = 2·10⁻³M, tampon phosphate pH = 7.0; l = 0.12M

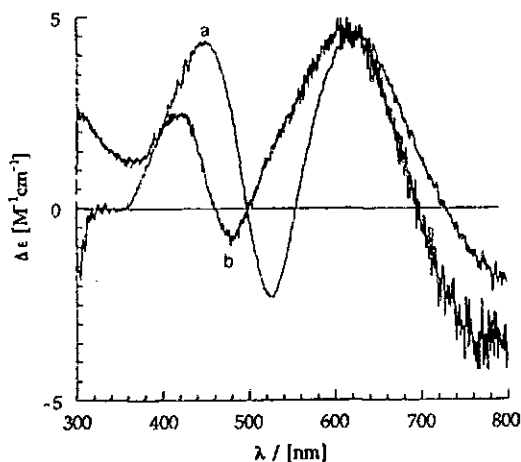


Figure 4.3.11 Superposition du spectre CD de la plastocyanine contenant le complexe Λ - $[\text{Co}^{\text{III}}((S,S)\text{-alamp})]^+$ fixé et réoxydé par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (a), au spectre CD de la plastocyanine native (b).

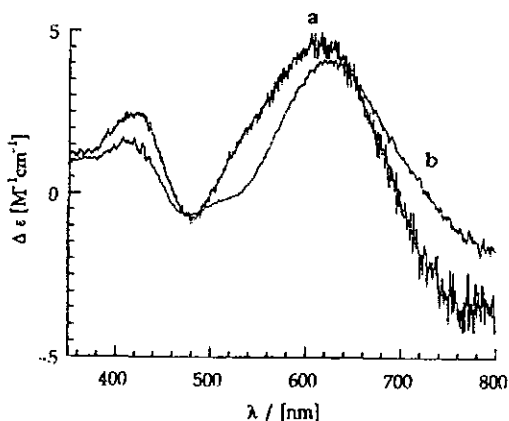


Figure 4.3.12 Superposition du spectre CD de la plastocyanine native (a) au spectre CD de la plastocyanine contenant le complexe Λ - $[\text{Co}^{\text{III}}((S,S)\text{-alamp})]$ fixé mais dont la contribution CD est déduite (b).

Une situation intermédiaire est observée pour la réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O]. Le spectre CD résiduel correspond à une contribution de 60% d'aquacomplexe et de 40% d'histidino-complexe (Figure 4.3.12 et Tableau 4.3.5). Le spectre CD obtenu après dialyse du mélange réactionnel confirme également ce taux de fixation de 40% pour l'énantiomère Δ .

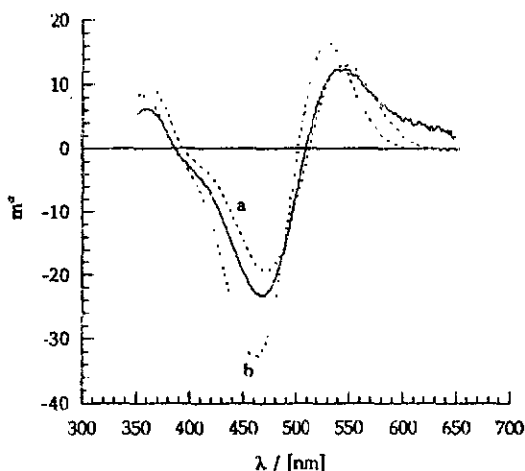


Figure 4.3.13 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O]. Superposition du spectre CD résiduel aux spectres de référence Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp)H₂O]⁺ (a) et Δ -[Co^{III}((R,R)-alamp)im]⁺ (b). [PCu]₀ = 1.1·10⁻⁴M; [Co^{II}]₀ = 2·10⁻³M. tampon phosphate pH = 7.0; I = 0.12M

La question se pose de savoir si la coordination du complexe de cobalt ne s'effectue pas après le transfert d'électron. Lorsque la protéine est réduite par l'acide ascorbique en présence de Δ -[Co^{III}((S,S)-alamp)H₂O]⁺ (qui ne réagit pas avec l'acide ascorbique dans l'intervalle de temps considéré), aucune fixation du cobalt(III) n'est cependant observée. La coordination résulte donc bien d'une

association précèdent le transfert d'électron et non pas d'une réaction consécutive.

Tableau 4.3.5 Taux de fixation (%) des différents complexes de cobalt(III) à la plastocyanine suite au transfert d'électron (erreur expérimentale estimée à $\pm 5\%$)

pH	Λ -[Co(S,S)-alamp]	Δ -[Co(R,R)-alamp]	Λ -[Co(S,S)-promp]	Δ -[Co(R,R)-promp]
5.5	80	13	-	-
6.0	>95	21	-	-
7.0	100	40	0	0
8.0	100	50	-	-

Des informations complémentaires concernant la structure exacte de l'état de transition impliquant le pont imidazole sont obtenues par les mesures en fonction du pH.

Les résultats obtenus dans un domaine pH de 5.5 à 8.0 (Tableau 4.3.5) montrent que le taux de fixation diminue avec un abaissement du pH. L'influence du pH est quantitativement différente pour les deux énantiomères et la différence relative de leur comportement devient le plus visible à pH = 5.5. Même à ce pH, environ 80% du cobalt(III) se fixe à la protéine lors de la réduction par l'énantiomère Λ , alors que l'aquacomplexe de cobalt(III) est formé à plus de 85% pour l'énantiomère Δ .

Cette variation du taux de fixation suggère une déprotonation de l'imidazole à l'état de transition. Les centres métalliques seraient ainsi reliés par l'intermédiaire du cycle imidazole de l'histidine déprotonée (Figure 4.3.14). Cette structure est analogue aux cuivre-zinc superoxydes dismutases^[76] ou aux systèmes comparables^[77].

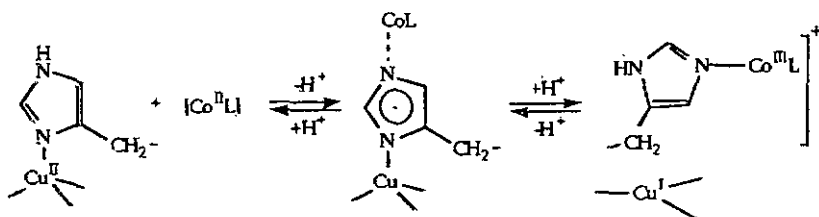
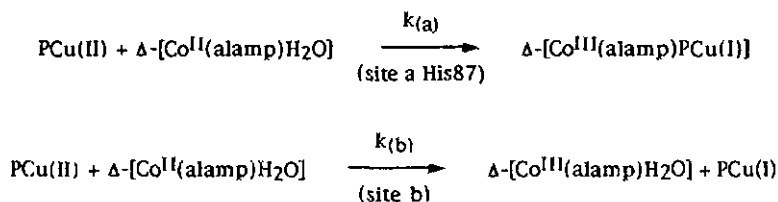


Figure 4.3.14 Proposition d'un état de transition pour le mécanisme de transfert d'électron au site His87.

La réduction de la plastocyanine par $\Delta-[Co^{II}((R,R)\text{-alamp})H_2O]$ a été mesurée à différentes températures à $pH = 7.0$. Les spectres CD résiduels montrent un taux de fixation qui augmente clairement avec une augmentation de la température (Figure 4.3.15 et Tableau 4.3.6).

En considérant la constante de vitesse globale de la réduction comme étant la somme de deux constantes de vitesse d'une réaction parallèle, il est possible d'obtenir une estimation différenciée des paramètres d'activation pour les deux mécanismes.



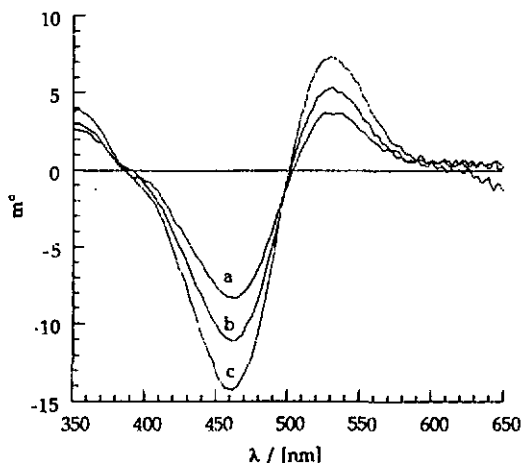


Figure 4.3.15 Spectres CD après dialyse lors de la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]$. $T = 10^\circ\text{C}$ (a); $T = 30^\circ\text{C}$ (b); $T = 50^\circ\text{C}$ (c). $[\text{PCu}]_0 = 1.6 \cdot 10^{-4}\text{M}$; $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 2 \cdot 10^{-3}\text{M}$; tampon phosphate $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.12\text{M}$

Tableau 4.3.6 Variation du taux de fixation en fonction de la température pour la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{H}_2\text{O}]$. Constantes de vitesses au site a (His87) et au site b.

$T / [^\circ\text{C}]$	10	20	30	50
Taux (%)	35	40	48	62
$k / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	0.341	0.803	1.77	7.52
$k_{(a)} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	0.119	0.321	0.850	4.66
$k_{(b)} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	0.221	0.482	0.920	2.86

Les représentations de Eyring différenciées permettent le calcul des paramètres d'activation pour les deux mécanismes proposés (Figure 4.3.16 et Tableau 4.3.7).

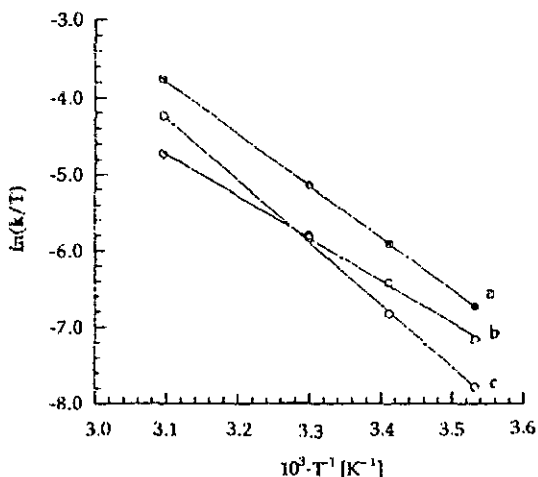


Figure 4.3.16 Représentations de Eyring différenciées pour la réduction de la plastocyanine par $\Delta\text{-[Co}^{II}\text{]((R,R)\text{-alamp})H}_2\text{O}$. Représentation globale (a); site b (b); site a (His87) (c).

Tableau 4.3.7 Paramètres d'activation liés au transfert d'électron des deux sites de réduction de la plastocyanine par $\Delta\text{-[Co}^{II}\text{]((R,R)\text{-alamp})H}_2\text{O}$

	$\Delta H^\ddagger / [kJ/mol]$	$\Delta S^\ddagger / [J/mol \cdot K]$
site a (His87)	67.5 ± 1.1	-23.7 ± 3.5
site b	45.9 ± 1.3	-94.6 ± 4.2

Le transfert d'électron dans l'environnement hydrophobe de la plastocyanine a lieu selon au moins deux mécanismes différents: le premier (site a) implique l'unité imidazole de His87 comme groupe pontant (Figure 4.3.13), le second (site b) est très probablement lié à un mécanisme de type sphère externe mais les résidus impliqués sont encore inconnus. Des informations supplémentaires concernant la

localisation précise du site b et l'identification des résidus impliqués font l'objet d'une étude de la réactivité de plastocyanines mutantes, actuellement en cours^[78].

Pour le site a, l'énergie d'activation ΔG^\ddagger a pu être déterminée pour les deux énantiomères, à savoir 74.4 kJ/mol pour l'isomère Δ et 72.2 kJ/mol pour l'isomère Λ (Tableau 4.3.7) à 20°C. Ces valeurs permettent de calculer une stéréosélectivité k_A/k_Δ de 2.5 à cette température. Il est cependant intéressant qu'à cette température aucune stéréosélectivité n'est observée - comme l'indique le croisement des droites de Eyring (Figure 4.3.6) - provenant de la réaction partielle de l'isomère Δ à ce site. Ceci n'est cependant possible que si le site b montre une stéréosélectivité opposée, c'est-à-dire une nette préférence pour l'isomère Δ . Cette préférence peut être calculée sur la base des résultats obtenus à pH \approx 5.5. Dans ces conditions, l'isomère Λ réagit à 80% et l'isomère Δ à 13% par l'intermédiaire du site a. Pour l'isomère Λ la réaction est donc de 4.6kJ/mol plus favorable au site a, cependant que la réaction avec l'isomère Δ est favorisée par 3.4 kJ/mol au site b.

Ces résultats permettent de définir un nouveau concept de l'énantiosélection des sites. Nous pouvons distinguer entre deux types de stéréosélectivité: la sélection d'un site entre deux énantiomères et la sélection d'un énantiomère entre deux ou plusieurs sites. Il est intéressant de constater que dans le cas présent, ces deux types de sélectivités se compensent exactement à 19°C. (Figure 4.3.6).

Les différents chemins réactionnels découverts pour la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ peuvent expliquer les grandes différences des paramètres d'activation déterminés pour les deux énantiomères de ce complexe (Chapitre 4.3.3). La détermination différenciée des paramètres d'activation pour les deux mécanismes permet cependant de retrouver pour le site a (His87) des valeurs se rapprochant de celles obtenues pour l'énantiomère Λ , alors que pour le site b, ces valeurs se rapprochent de celles déterminées pour la réduction par

$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ (Tableau 4.3.7). Ce rapprochement indique peut-être que le site b correspond au site de transfert d'électron de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$. L'énergie libre de déprotonation de l'His87 se retrouvant implicitement contenue dans les paramètres d'activation globaux calculés, l'enthalpie d'activation du site a (His87) est ainsi normalement plus élevée que celle du site b.

L'oxydation de la plastocyanine par $[\text{Co}(4,7\text{-DPSphen})_3]^{3-}$ est indépendante du pH et montre une forte association à la plastocyanine^[79]. Un complexe anionique est supposé réagir dans l'environnement du site hydrophobe, or la présence de ce complexe de cobalt ne perturbe pas l'oxydation de la plastocyanine par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, supposé réagir également au site hydrophobe. Ce résultat avait déjà conduit à l'hypothèse de plusieurs sites de réactions dans la poche hydrophobe de la plastocyanine.

4.4 Réduction de la plastocyanine dans les tampons imidazoles

Les complexes réducteurs utilisés dans ce travail présentent une position de coordination modulable, conséquence du choix d'un ligand chélatant pentacoordonné. De ce fait, différents ions ou molécules présents en solution peuvent se coordonner à cette position. L'étude cinétique de la réduction de la plastocyanine par les aquacomplexes du cobalt(II) a démontré l'importance de cette position de coordination dans les mécanismes du transfert d'électron.

Afin de varier la nature du ligand à la sixième position de coordination du complexe labile du cobalt(II), nous avons varié la nature du tampon. Dans le cas de l'utilisation d'un tampon phosphate, cette sixième position est occupée par une molécule d'eau, l'ion phosphate n'ayant que très peu d'affinité pour le cobalt(II). Les ligands monodentés dérivés de l'imidazole ont par contre une affinité plus

grande pour le centre métallique. L'utilisation de tampons imidazole, N-méthylimidazole et N-butylimidazole permet ainsi de varier la nature des complexes réducteurs sans pour autant modifier le pH du milieu, le pKa de l'imidazole étant voisin de 7.

La détermination des constantes de formation des espèces mixtes a été effectuée par spectropolarimétrie. Les résultats de ces mesures sont présentés au chapitre 5.

Dans ce chapitre 4, consacré aux études cinétiques de transfert d'électron, nous décrivons l'influence du choix du tampon et par conséquent de la nature du ligand présent à la sixième position de coordination des complexes réducteurs sur le mécanisme de réduction de la plastocyanine.

4.4.1 Mesures en fonction de la concentration du tampon imidazole

La préparation des solutions des complexes mixtes est décrite au chapitre 4.6. Les réactions de transfert d'électron se déroulant en moins de 10s dans nos conditions expérimentales, il est nécessaire d'utiliser la technique stopped-flow pour l'enregistrement des cinétiques de transfert d'électron.

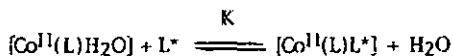
La substitution du tampon phosphate par les tampons imidazoles (imidazole, N-méthylimidazole ou N-butylimidazole), mène à plusieurs observations importantes:

1) En l'absence de complexe métallique réducteur, l'intensité de l'absorption de la plastocyanine à 597nm décroît en présence d'imidazole. Selon la concentration du tampon, l'absorption se stabilise à une valeur plus ou moins élevée. Cette influence de l'imidazole sur la stabilité du site actif de la plastocyanine est étudiée au chapitre 6.

2) La réduction de la plastocyanine par les complexes du cobalt(II) dans les tampons imidazoles est nettement plus rapide que dans le tampon phosphate (accélération d'un facteur 500 à 1000).

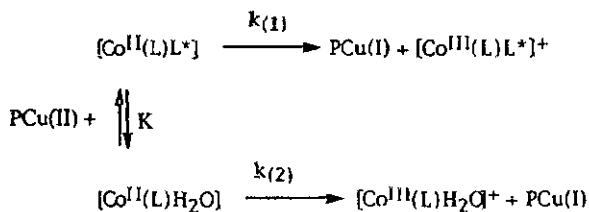
3) La variation de la constante de vitesse de réduction en fonction de la concentration en imidazole n'est pas linéaire (Figures 4.4.1 à 4.4.6). Une saturation de la constante de vitesse est observée pour de grandes concentrations en imidazole.

Ce comportement de saturation s'explique en considérant que l'espèce mixte est en équilibre avec l'aquacomplexe et beaucoup plus réactive que ce dernier.



$$K = \frac{[\text{Co}(\text{L})\text{L}^*]}{[\text{Co}(\text{L})\text{H}_2\text{O}][\text{L}^*]} \quad (\text{éq. 4.14})$$

La réduction de la plastocyanine peut ainsi s'effectuer par la présence de deux espèces selon le mécanisme:



Dans les conditions où $k_{\text{te}(1)} \gg k_{\text{te}(2)}$, la loi de vitesse se réduit à:

$$v = -d[\text{PCu}]/dt = k(1) \cdot [\text{PCu}] \cdot [\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] \quad (\text{éq. 4.15})$$

L'utilisation du bilan matière et de l'expression (4.14) permettent d'écrire:

$$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] = [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 - [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]$$

$$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] = [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 - ([\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] / K \cdot [\text{L}^*])$$

$$K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] \cdot [\text{L}^*] = K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \cdot [\text{L}^*] - [\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*]$$

$$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{L}^*] = K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \cdot [\text{L}^*] / (K \cdot [\text{L}^*] + 1)$$

$$-d[\text{PCu}]/dt = k_{(1)} \cdot [\text{PCu}] \cdot K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \cdot [\text{L}^*] / (K \cdot [\text{L}^*] + 1)$$

$$-d[\text{PCu}]/[\text{PCu}] = \{k_{(1)} \cdot K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \cdot [\text{L}^*] / (K \cdot [\text{L}^*] + 1)\} dt$$

par conséquent, la variation de [PCu] en fonction du temps s'exprime par :

$$[\text{PCu}] = [\text{PCu}]_0 \exp\{-k_{\text{obs}} \cdot t\}$$

$$\text{où} \quad k_{\text{obs}} = k_{(1)} \cdot K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 \cdot [\text{L}^*]_0 / (K \cdot [\text{L}^*]_0 + 1) \quad (\text{éq. 4.16})$$

En définissant $k_{\text{ex}} = k_{\text{obs}}/[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0$:

$$k_{\text{ex}} = k_{(1)} \cdot K \cdot [\text{L}^*]_0 / (K \cdot [\text{L}^*]_0 + 1) \quad [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad (\text{éq. 4.17})$$

$k_{(1)}$ et K peuvent se déterminer en reportant $1/k_{\text{ex}} = f([\text{L}^*]_0)$. La pente de la droite obtenue représente $a = 1/k_{(1)} \cdot K$ et l'ordonnée à l'origine $b = 1/k_{(1)}$.

Les différentes valeurs des constantes de vitesse $k_{(1)}$ déterminées à 25.0°C et à $I = 0.2\text{M}$ (NaCl) sont données dans le tableau 4.4.1. Les constantes de formation des complexes mixtes déterminées par l'analyse cinétique sont reportées dans le tableau 5.2.2 où elles sont comparées aux valeurs obtenues par des mesures spectropolarimétriques de l'équilibre de répartition. Les deux techniques indépendantes donnent des résultats concordants, confirmant l'hypothèse du mécanisme décrit.

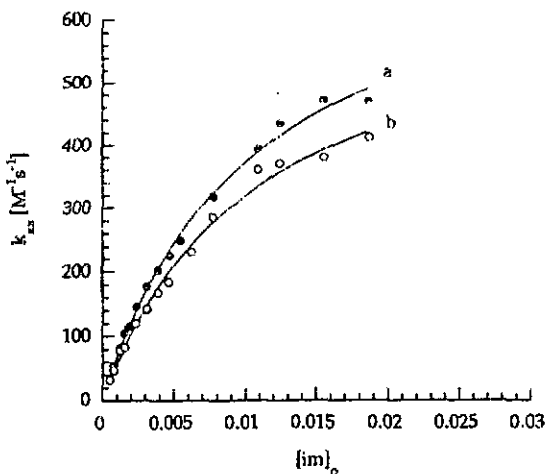


Figure 4.4.1 Réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)im] (a); Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)im] (b). [Co^{II}L]₀=10⁻³M; [PCu]₀=10⁻⁵M; T=25.0°C; tampon imidazole pH=7.0; I=0.2M (NaCl)

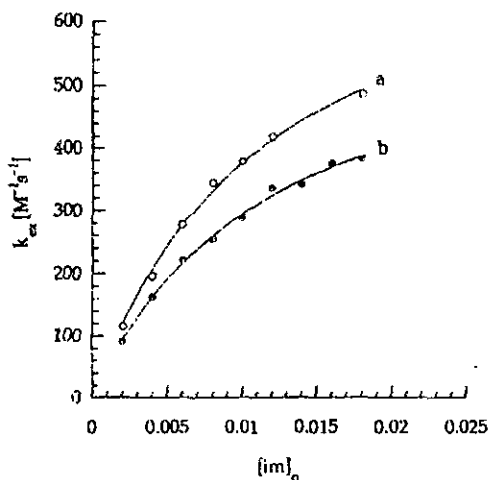


Figure 4.4.2 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)im] (a); Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)im] (b). [Co^{II}L]₀=10⁻³M; [PCu]₀=10⁻⁵M; T=25.0°C; tampon imidazole pH=7.0; I=0.2 (NaCl)

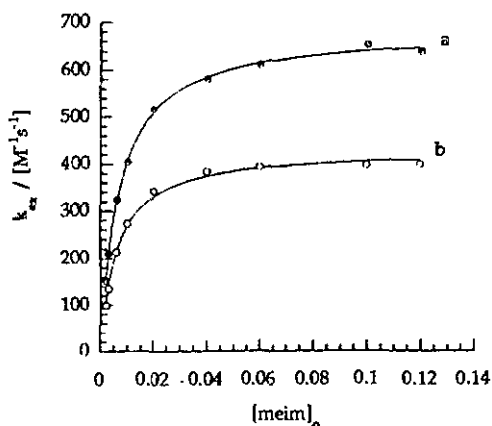


Figure 4.4.3 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((S,S)-promp)meim] (a); Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)meim] (b). [Co^{II}]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; T = 25.0°C; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; I = 0.2M (NaCl)

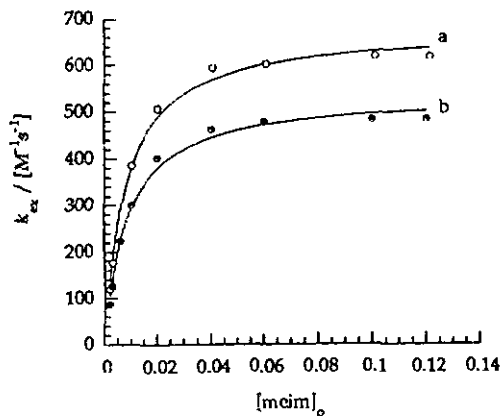


Figure 4.4.4 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)meim] (a); Δ -[Co^{II}((S,S)-alamp)meim] (b). [Co^{II}]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; T = 25.0°C; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; I = 0.2 (NaCl)

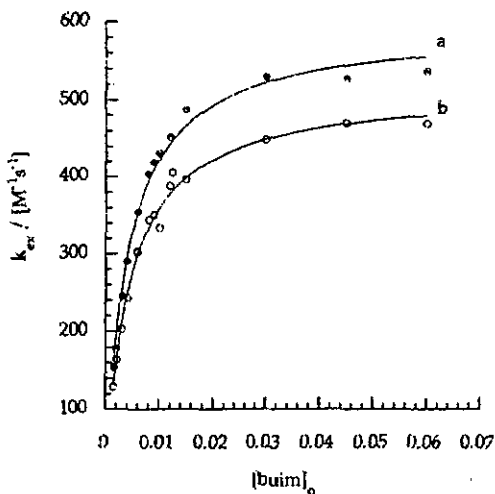


Figure 4.4.5 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}[(S,S)-promp]buim] (a); Δ -[Co^{II}[(R,R)-promp]buim] (b). [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; T = 25.0°C; tampon N-butyylimidazole pH = 7.0; I = 0.2M (NaCl)

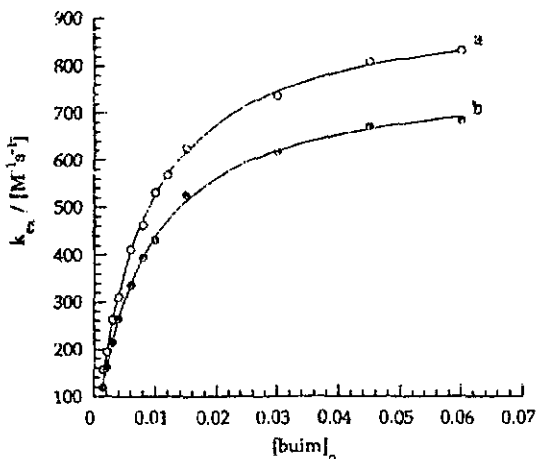


Figure 4.4.6 Réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}[(R,R)-alamp]buim] (a); Δ -[Co^{II}[(S,S)-alamp]buim] (b). [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; T = 25.0°C; tampon N-butyylimidazole pH = 7.0; I = 0.2M (NaCl).

Tableau 4.4.1 Constantes de vitesse de deuxième ordre et stéréosélectivités de la réduction de la plastocyanine par les différents complexes de cobalt(II) dans les tampons imidazole, N-méthylimidazole et N-butylimidazole. pH = 7.0; T = 25.0°C; I = 0.2M (NaCl)

Complexe	$k_{te(1)}$ [$M^{-1}s^{-1}$] a)	k_{Δ}/k_{Λ}
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)im]	813 ± 40	1.27 ± 0.12
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)im]	638 ± 25	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)im]	538 ± 72	0.76 ± 0.16
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)im]	707 ± 48	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)meim]	678 ± 13	1.27 ± 0.15
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)meim]	535 ± 12	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)meim]	430 ± 6	0.63 ± 0.05
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)meim]	684 ± 5	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)buim]	942 ± 7	1.20 ± 0.02
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)buim]	783 ± 6	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)buim]	513 ± 8	0.87 ± 0.02
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)buim]	592 ± 9	

a) extrapolation à concentration infinie du tampon

4.4.2 Mesures en fonction de la température

Les conditions expérimentales ont été choisies sur la base de l'étude de la variation de la constante de formation des complexes mixtes en fonction de la température, détaillée au chapitre 5 (Tableau 5.2.2 p.120). Ces conditions sont telles que la concentration de l'espèce mixte représente plus de 90% de la concentration totale en cobalt(II) sur tout le domaine de température étudié. Les paramètres d'activation calculés sont ainsi bien représentatifs du mécanisme de transfert d'électron impliquant l'espèce mixte.

Sur la base des résultats obtenus et présentés dans le tableau 4.4.8, il est intéressant de remarquer que la catalyse du transfert d'électron liée à la présence de l'espèce

mixte correspond à une diminution notable de l'enthalpie d'activation par rapport aux transferts d'électron effectués dans le tampon phosphate. Les paramètres d'activation sont relativement semblables pour les aquacomplexes d'une part et pour les complexes imidazoles de l'autre, la nature du reste présent sur N³ de l'imidazole ne modifiant pas de manière significative les paramètres d'activation. Les paramètres d'activation montrent également que la stéréosélectivité résulte d'un phénomène de compensation incomplète entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation. Les différentes représentations de Eyring sont données aux figures 4.4.7 à 4.4.12.

Tableau 4.4.2 Paramètres d'activation pour la réduction de la plastocyanine par les complexes mixtes de cobalt(II). $[Co^{II}]_0 = 10^{-3}M$; tampons imidazoles pH = 7.0; $[L^*]_0 = 0.15M$; $I = 0.5M$ (NaCl).

Complexe	ΔH^\ddagger [kJmol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [Jmol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta\Delta G^\ddagger$ [kJmol ⁻¹] ($\Delta-\Lambda$) ^{a)}
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)im]	31.7 ± 0.4	-87.8 ± 1.4	+0.68
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)im]	31.4 ± 0.2	-87.5 ± 0.8	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)meim]	35.7 ± 0.5	-75.8 ± 1.7	+1.14
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)meim]	31.8 ± 0.4	-85.9 ± 1.3	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-promp)buim]	35.8 ± 0.3	-73.0 ± 0.9	+0.34
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-promp)buim]	31.8 ± 0.4	-85.7 ± 1.0	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)im]	20.1 ± 0.4	-122.8 ± 1.3	-0.55
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)im]	19.8 ± 0.3	-126.0 ± 0.9	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)meim]	25.5 ± 0.4	-106.0 ± 1.3	-0.26
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)meim]	26.1 ± 0.5	-104.8 ± 1.7	
Δ -[Co ^{II} ((R,R)-alamp)buim]	21.8 ± 0.8	-116.9 ± 2.6	-0.45
Λ -[Co ^{II} ((S,S)-alamp)buim]	21.6 ± 0.5	-118.9 ± 1.8	

a) calculé de k_Δ / k_Λ à 25.0°C

Tableau 4.4.3 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{im}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon imidazole $\text{pH} = 7.0$; $[\text{im}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

T / [°C]	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	T / [K]	$k_A / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
10.0	211 ± 2	8.0	228 ± 5
13.0	248 ± 3	11.0	267 ± 2
16.0	280 ± 4	14.0	310 ± 3
19.0	340 ± 2	17.0	365 ± 12
22.0	385 ± 10	20.0	418 ± 7
25.0	446 ± 12	23.0	481 ± 3
28.0	525 ± 3	26.0	554 ± 19
31.0	589 ± 11	29.0	635 ± 25
34.0	665 ± 28	32.0	712 ± 30
37.0	782 ± 37		
40.0	874 ± 29		

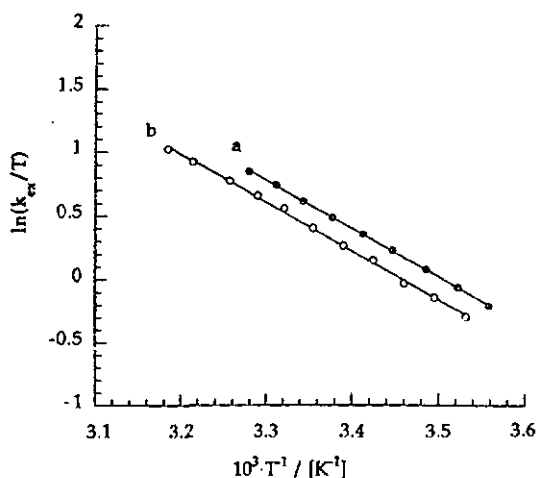


Figure 4.4.7 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-promp})\text{im}]$ (a) et Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-promp})\text{im}]$ (b). $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon imidazole $\text{pH} = 7.0$; $[\text{im}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

Tableau 4.4.4 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{im}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon imidazole pH = 7.0; $[\text{im}]_0 = 0.15\text{M}$; I = 0.5M (NaCl).

T / [°C]	$k_{\Delta} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	T / [K]	$k_{\Lambda} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
10.2	440 ± 3	7.5	329 ± 3
13.1	494 ± 2	10.2	355 ± 4
16.0	545 ± 4	12.8	384 ± 4
18.8	602 ± 7	15.8	425 ± 4
21.8	659 ± 10	18.7	465 ± 9
24.7	727 ± 8	21.8	515 ± 3
28.0	782 ± 15	24.7	563 ± 13
30.8	848 ± 12	27.8	627 ± 12
33.7	951 ± 4	30.3	654 ± 3
36.8	1003 ± 30	33.5	729 ± 10

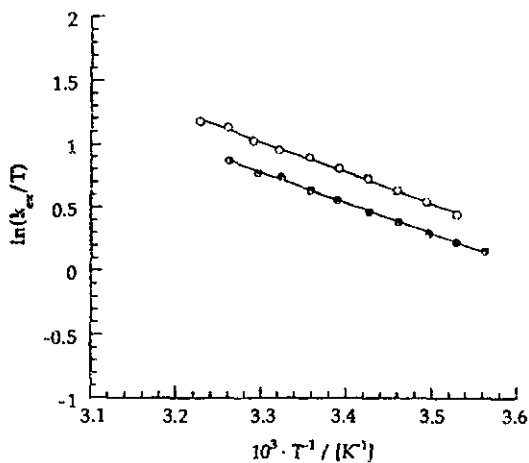


Figure 4.4.8 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{im}]$ (a); Λ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-alamp})\text{im}]$ (b). $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon imidazole pH = 7.0; $[\text{im}]_0 = 0.15\text{M}$; I = 0.5M (NaCl)

Tableau 4.4.5 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par [Co(promp)meim]. [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; [meim]₀ = 0.15M; I = 0.5M (NaCl).

T / [°C]	k _Δ / [M ⁻¹ s ⁻¹]	T / [K]	k _Λ / [M ⁻¹ s ⁻¹]
9.2	157 ± 2	9.0	235 ± 5
12.0	185 ± 3	12.0	292 ± 5
15.0	209 ± 5	15.0	342 ± 4
18.0	261 ± 3	18.0	390 ± 12
21.0	301 ± 8	21.0	440 ± 6
25.0	384 ± 12	24.0	506 ± 12
30.0	480 ± 6	27.0	563 ± 10
33.0	559 ± 12	30.0	674 ± 10
36.0	640 ± 10	33.0	796 ± 21
39.0	764 ± 10	36.0	868 ± 13
42.0	825 ± 25	40.0	1016 ± 29

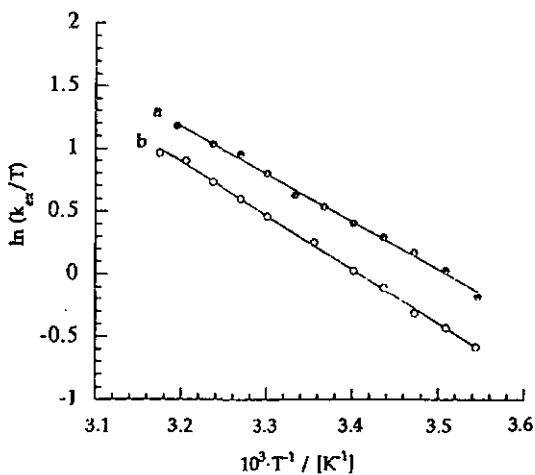


Figure 4.4.9 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)meim] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)meim] (b). [Co^{II}L]₀ = 10⁻³M; [PCu]₀ = 10⁻⁵M; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; [meim]₀ = 0.15M; I = 0.5M (NaCl).

Tableau 4.4.6 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{meim}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; $[\text{meim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

T / [°C]	$k_{\Delta} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{\Lambda} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
8.0	305 ± 10	266 ± 3
11.0	339 ± 4	318 ± 12
14.0	387 ± 3	354 ± 9
17.0	451 ± 5	399 ± 8
20.0	509 ± 7	457 ± 10
23.0	568 ± 9	523 ± 23
26.0	628 ± 12	565 ± 20
29.0	728 ± 10	654 ± 12
32.0	784 ± 12	728 ± 29
36.0	908 ± 7	842 ± 25
40.0	1060 ± 20	922 ± 22
46.0	1231 ± 21	

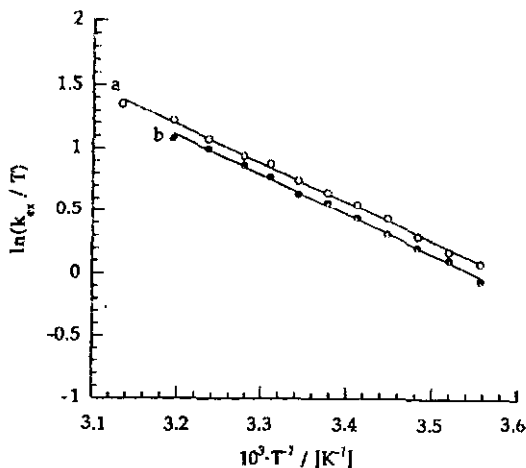


Figure 4.4.10 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R},\text{R})\text{-alamp})\text{meim}]$ (a) et Λ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S},\text{S})\text{-alamp})\text{meim}]$ (b). $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon N-méthylimidazole pH = 7.0; $[\text{meim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

Tableau 4.4.7 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon N-butylimidazole $\text{pH} = 7.0$; $[\text{buim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

T / [°C]	$k_{\Delta} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	T / [K]	$k_{\Lambda} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
7.0	190 ± 6	5.0	206 ± 4
12.0	251 ± 1	10.0	269 ± 2
17.0	331 ± 2	15.0	363 ± 12
22.0	433 ± 1	20.0	453 ± 3
27.0	573 ± 3	25.0	567 ± 5
32.0	744 ± 23	30.0	730 ± 17
37.0	932 ± 25	35.0	914 ± 45
42.0	1150 ± 54	40.0	1016 ± 102
		45.0	1410 ± 295

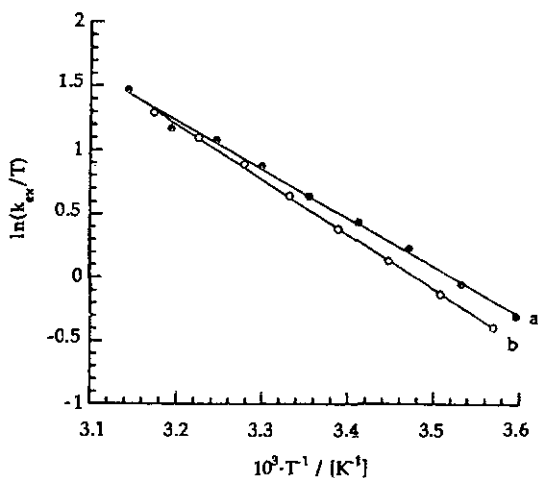


Figure 4.4.11 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Λ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-promp})\text{buim}]$ (a) et Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-promp})\text{buim}]$ (b). $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon N-butylimidazole $\text{pH} = 7.0$; $[\text{buim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

Tableau 4.4.8 Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{buim}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon *N*-butylimidazole pH = 7.0; $[\text{buim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

T / [°C]	$k_{\Delta} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{\Lambda} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
5.0	355 ± 10	301 ± 2
10.0	445 ± 19	371 ± 5
15.0	558 ± 13	452 ± 9
20.0	664 ± 29	539 ± 13
25.0	758 ± 17	644 ± 19
30.0	883 ± 4	764 ± 28
35.0	1029 ± 9	848 ± 12
40.0	1162 ± 17	980 ± 19
45.0	-	1123 ± 40

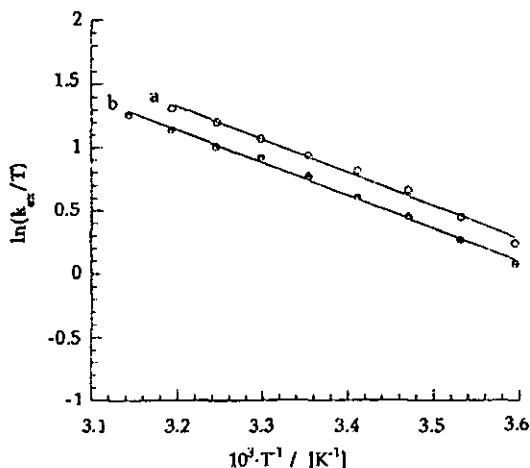


Figure 4.4.12 Représentations de Eyring pour la réduction de la plastocyanine par Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-alamp})\text{buim}]$ (a) et Λ - $[\text{Co}^{\text{II}}((\text{S,S})\text{-alamp})\text{buim}]$ (b). $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{PCu}]_0 = 10^{-5}\text{M}$; tampon *N*-butylimidazole pH = 7.0; $[\text{buim}]_0 = 0.15\text{M}$; $I = 0.5\text{M}$ (NaCl).

Le cas le plus spectaculaire est à nouveau la réduction de la plastocyanine par Δ -[Co^{II}((S,S)-alamp)]. La présence d'imidazole diminue l'enthalpie d'activation de plus de 70% par rapport aux mesures effectuées dans le tampon phosphate, alors que l'entropie d'activation devient plus négative de $130 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. La grande différence d'enthalpie d'activation rencontrée dans le tampon phosphate entre les deux énantiomères ($\Delta\Delta H^\ddagger_{(\Delta-\Lambda)} = -16.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) disparaît complètement par l'addition d'imidazole et la stéréosélectivité reste constante sur tout le domaine de température étudié. Ce comportement est représenté par la figure 4.4.13 où nous observons la forte variation de stéréosélectivité lors de la réduction de la plastocyanine par [Co(alamp)H₂O], avec une inversion du signe à 19°C. En relation avec les résultats décrits dans le paragraphe 4.3.4 nous pouvons interpréter cette variation comme étant principalement due à une variation du taux de réaction de l'isomère Δ -[Co((R,R)-alamp)H₂O] sur les deux sites de la poche hydrophobe.

Un deuxième point intéressant se situe à 11°C. A cette température, la réaction montre exactement la même stéréosélectivité pour les deux complexes. Cette situation est cependant le résultat de paramètres d'activation et de vitesses réactionnelles fort différents.

La réaction avec [Co^{II}(promp)L*] est quant à elle favorisée et par une enthalpie d'activation plus faible et par une entropie d'activation plus positive.

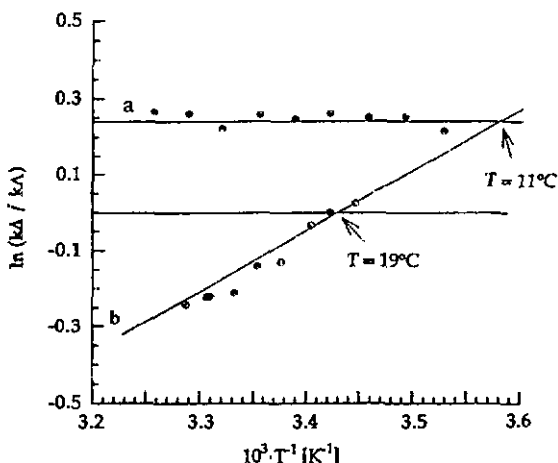


Figure 4.4.13 Variation de la stéréosélectivité en fonction de la température pour la réduction de la plastocyanine par $[Co^{II}(alamp)H_2O]$ (a) et $[Co^{II}(alamp)Im]$ (b).

En considérant également les résultats obtenus pour la réduction de la plastocyanine par les complexes du fer(II)[57], ces phénomènes de compensation permettent de représenter trois courbes isocinétiques, dont les températures isocinétiques sont de 300 K pour les aquacomplexes et les complexes mixtes du cobalt(II), et de 345 K pour les complexes du fer(II) (Figure 4.4.14).

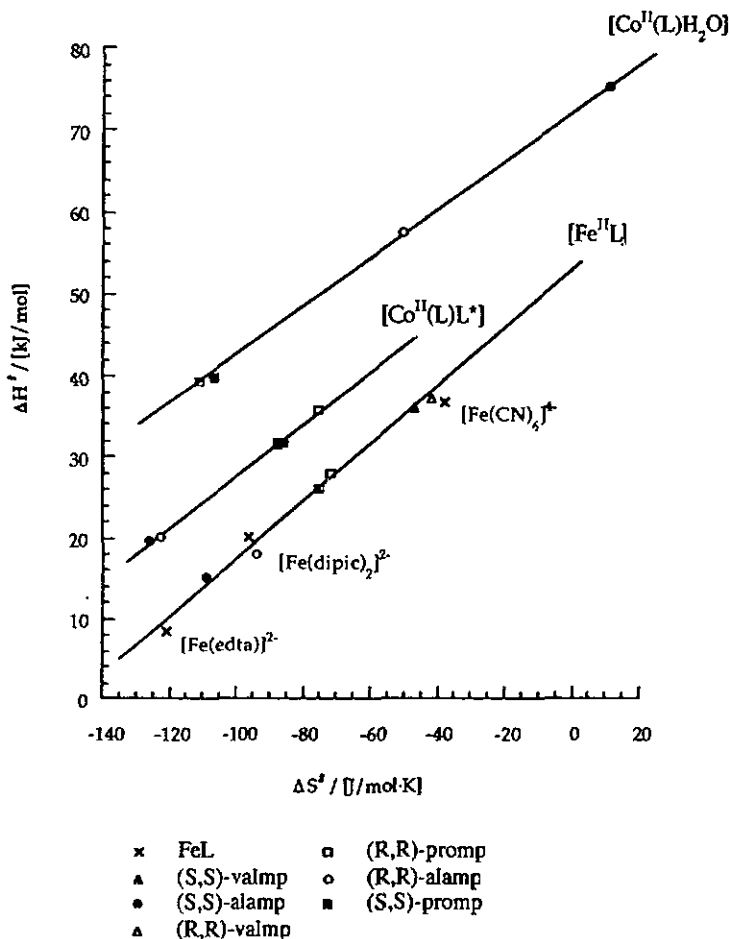
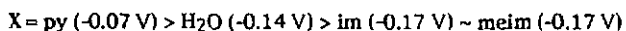


Figure 4.4.14 Représentations isocinétiques dans la réduction de la plastocyanine par différents complexes de fer(II)^[57] et de cobalt(II).

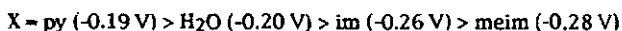
Il a été suggéré qu'une relation isocinétique obtenue pour des réactions de transfert d'électron impliquant des systèmes chimiques similaires peut être la

conséquence d'une coordonnée de réaction identique^[73]. En considérant l'ensemble des observations faites pour la réduction de la plastocyanine, cette hypothèse ne peut pas être retenue pour le cas de la réduction par les aquacomplexes de cobalt(II) où nous avons mis en évidence l'existence d'au moins deux mécanismes réactionnels (Chapitre 4.3.4).

On pourrait interpréter l'effet catalytique de la présence de l'imidazole par un changement du potentiel d'oxydoréduction du complexe de cobalt. Ces potentiels varient selon la série suivante pour les complexes de $[\text{Co}(\text{promp})\text{X}]$ [61]:



et selon la série suivante pour les complexes de $[\text{Co}(\text{alamp})\text{X}]$ [61]:



Par rapport aux aquacomplexes, ces différences de potentiels correspondent à des différences de $\Delta\Delta G^\circ$ de 2,9 kJ/mol pour les complexes imidazoles de promp et de 5,8 kJ/mol respectivement de 7,7 kJ/mol (meim) dans le cas des complexes d'alamp. Selon la théorie de Marcus (voir Chapitre 1), de telles différences de ΔG° devraient produire dans le cas le plus favorable ($\lambda = \Delta G^\circ$) une accélération maximale du transfert d'électron d'un facteur de 3,3 dans le cas de promp et de 11 (im) respectivement de 24 (meim) dans le cas d'alamp. Or, les accélérations observées sont d'une part de deux ordres de grandeurs plus élevées et d'autre part du même ordre de grandeur pour les complexes de promp et d'alamp. Ces résultats suggèrent une participation spécifique des imidazoles au transfert d'électron.

Une autre mécanisme possible est la substitution de l'histidine 87 par le groupe imidazole du complexe mixte. Celle-ci semble également peu probable pour les raisons suivantes:

- La substitution de l'histidine par l'imidazole libre est beaucoup plus lente que le transfert d'électron (l'étude de cette substitution est décrite au chapitre 6).
- Un Intermédiaire pour lequel les deux centres rédox sont pontés par une molécule d'imidazole nécessite une déprotonation préalable de cette dernière (Chapitre 4.3.4) pour former un anion imidazole. Une telle formation d'anion n'est cependant pas possible pour les dérivés portant un groupe N-méthyl ou N-butyl. Malgré ce fait, aucune différence significative n'est observée dans l'activité catalytique entre l'imidazole et les dérivés N-substitués.
- L'abaissement de l'enthalpie d'activation qui est particulièrement importante dans le cas de $[\text{Co}(\text{alamp})\text{im}]$ est peu compatible avec une rupture de la liaison Cu-His87.

L'hypothèse la plus probable du mécanisme de transfert d'électron catalysé par l'imidazole est un transfert électronique réalisé par intercalation des deux unités imidazoles de l'histidine 87 et des complexes mixtes $[\text{Co}(\text{L})\text{L}^*]$, représenté schématiquement par la figure 4.4.15.

Des mécanismes de transfert d'électron par intercalations de cycles aromatiques ont déjà été proposés pour des systèmes $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ et $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ contenant des dérivés de la pyrazine comme ligands^[73,74].

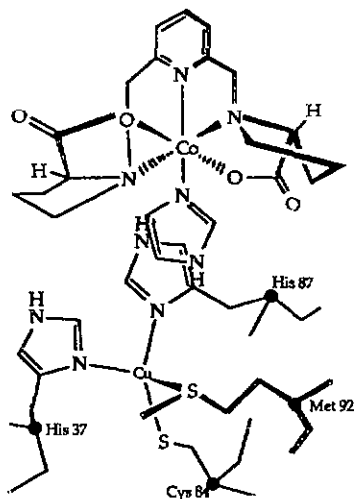


Figure 4.4.15 Représentation schématique de l'état de transition proposé pour le transfert d'électron entre la plastocyanine et les complexes mixtes du cobalt(II).

L'hypothèse d'une même coordonnée de réaction pour des systèmes se situant sur une même droite isocinétique implique que la stéréosélectivité liée à la différence des constantes de vitesse et/ou la reconnaissance moléculaire caractérisée par la différence des paramètres d'activation, provienne des interactions diastéréoisomères entre la protéine et les deux centres énantiomères du réactif. Ces interactions diastéréoisomères peuvent également être à la base d'une différence de recouvrement orbitalaire des deux centres d'oxydoréduction à l'état de transition. Une différence dans l'approche des réactifs devrait se manifester par des volumes d'activation distincts.

En vue de la détermination des volumes d'activation, des mesures cinétiques en fonction de la pression ont été effectuées en collaboration avec l'Université de

Lausanne, avec les systèmes PCu(II) / [Co(promp)im] et PCu(II) / [Co(promp)buim] (Voir également [80]).

4.4.3 Mesures en fonction de la pression

Le spectrophotomètre stopped-flow H.P. utilisé pour les mesures cinétique du transfert d'électron en fonction de la pression a été développé dans les laboratoires de Chimie Minérale du prof. A. Merbach, dans le cadre du travail de thèse de P. Bugnon^[80].

Les réactions suivies sur un temps relativement long ($t > 10s$) ne sont pas appropriées pour la technique de l'écoulement bloqué sous haute pression, qui présente des risques importants de diffusion des réactifs. Compte tenu de cette contrainte, ainsi que de l'extrême sensibilité de l'aquacomplexe $[Co(alamp)H_2O]$ à l'oxygène, des mesures préliminaires effectuées dans le tampon phosphate n'ont pas donné de résultats interprétables.

Les résultats des mesures sous pression effectuées pour la réduction de la plastocyanine par $[Co^{II}(promp)im]$ et $[Co^{II}(promp)buim]$ peuvent cependant être présentés dans ce travail.

La réduction de la plastocyanine sous pression a été étudiée à 25.0°C et également à 5.0°C pour la réduction par $[Co^{II}(promp)buim]$, à 6 ou 7 pressions différentes variant entre 2.5 et 200 MPa. Les constantes de vitesse calculées représentent la moyenne de 4 à 5 injections par pression. Les constantes de vitesse sont déterminées par un fitting exponentiel de la trace expérimentale comme pour les mesures effectuées à pression ambiante (Tableaux 4.4.9 et 4.4.10).

Tableau 4.4.9 Constantes de vitesse de deuxième ordre en fonction de la pression déterminées pour la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{im}]$. $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{im}]_0 = 0.1\text{M}$; $I = 0.2\text{M}$ (NaCl) $\text{pH} = 7.0$ (tampon imidazole); $T = 25.0^\circ\text{C}$.

P / [MPa]	k_A	k_A
2.5	420.1 ± 16.5	467.7 ± 32.6
50	557.3 ± 19.4	601.9 ± 1.7
75	-	773.2 ± 0.6
100	874.3 ± 38.5	955.3 ± 63.4
125	927.6 ± 10.3	1181.5
150	1352.3 ± 89.7	1612.3 ± 148.3
200	1684.5 ± 178.7	2276.0 ± 251.6

Tableau 4.4.10 Constantes de vitesse de deuxième ordre en fonction de la pression déterminées pour la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$ à $T = 25.0^\circ\text{C}$ et 5.0°C . $[\text{Co}^{\text{II}}]_0 = 10^{-3}\text{M}$; $[\text{buim}]_0 = 0.1\text{M}$; $I = 0.2\text{M}$ (NaCl); $\text{pH} = 7.0$ (tampon imidazole)

P / [MPa]	k_A		k_A	
	$T = 298\text{K}$	$T = 278\text{K}$	$T = 298\text{K}$	$T = 278\text{K}$
?	529.3 ± 0.7	186.0 ± 1.3	-	-
2.5	-	-	596.7 ± 2.0	230.0 ± 1.3
50	675.3 ± 3.4	243.3 ± 10.7	826.7 ± 39.9	291.3 ± 4.7
100	884 ± 15.3	310.7 ± 6.6	1068.0 ± 2.7	409.3 ± 20.0
150	1182.7 ± 13.3	433.3 ± 4.0	1530.0 ± 56.7	584.7 ± 23.9
200	1657.3 ± 64.7	644.7 ± 29.3	2015.3 ± 20.0	856.7 ± 16.6

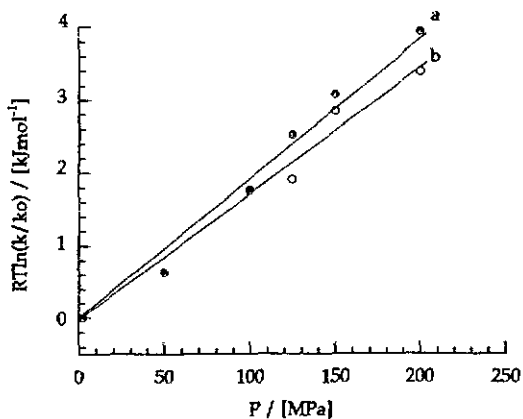


Figure 4.4.16 Variation de $RT \ln(k/k_0)$ en fonction de la pression pour la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)im] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)im] (b) à $T = 25.0^\circ\text{C}$.

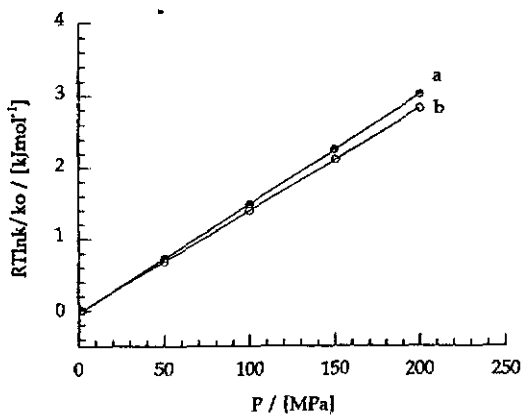


Figure 4.4.17 Variation de $RT \ln(k/k_0)$ en fonction de la pression pour la réduction de la plastocyanine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)buim] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)buim] (b) à $T = 25.0^\circ\text{C}$.

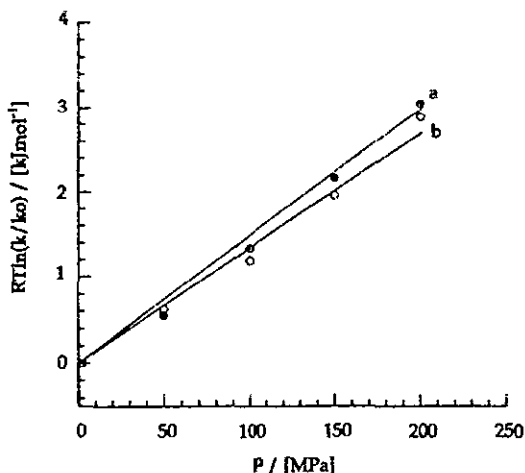


Figure 4.4.18 Variation de $RT \ln(k/k_0)$ en fonction de la pression pour la réduction de la plastocyanine par $\Lambda\text{-[Co}^{\text{II}}(\text{S,S})\text{-promp)]buim}$ (a) et $\Lambda\text{-[Co}^{\text{II}}(\text{R,R})\text{-promp)]buim}$ (b) à $T = 5^\circ\text{C}$.

La pente des représentations $RT \ln(k/k_0) = f(P)$ permet de déterminer les volumes d'activation dont les valeurs sont reportées dans le tableau 4.4.11.

Tableau 4.4.11 Volumes d'activation déterminés pour la réduction de la plastocyanine par les complexes mixtes $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{im}]$ et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$

Complexe	T / [°C]	$\Delta V^\ddagger (\Delta) / [\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}]$	$\Delta V^\ddagger (\Lambda) / [\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}]$
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{im}]$	25.0	-17.8 ± 1.3	-21.0 ± 1.0
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$	25.0	-14.2 ± 0.5	-15.2 ± 0.4
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$	5.0	-14.3 ± 0.8	-15.5 ± 0.7

Pour des réactions de substitution, la rupture de liaison lors de la formation de l'état de transition conduit à un volume d'activation positif, le volume du complexe activé étant généralement plus grand que celui des réactifs. Si au contraire, une liaison supplémentaire est formée à l'état de transition, on s'attend à un volume d'activation négatif car le volume du complexe activé est alors plus petit que le volume occupé par les réactifs. Ces prévisions permettent une interprétation des réactions d'échange de solvant en termes de deux mécanismes types: le mécanisme dissociatif et le mécanisme associatif.

Les volumes d'activation découlant de processus d'oxydoréduction sont moins évidents à interpréter^[3d]. Les mesures concernant une variété de complexes de cobalt(III) du type $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{2+}$ ou $[\text{Co}(\text{NH}_3)_2\text{X}_2]^+$ réduits par l'aqua-ion du fer(II) ont été envisagées dans le but de distinguer les mécanismes de type sphère externe et ceux de type sphère interne. Les volumes d'activation mesurés pour ces réductions sont tous positifs (+2 à +11 $\text{cm}^3\text{mol}^{-1}$) et ont été attribués à des mécanismes de type sphère interne, puisque l'expulsion d'une molécule d'eau de la sphère d'hydratation du fer(II), nécessaire à la formation du pont Co-X-Fe provoque une expansion de volume. Par contre, pour les mécanismes de type sphère externe, l'accroissement de l'électrostriction du solvant provoqué en amenant les deux cations proches l'un de l'autre à l'état de transition doit donner des volumes d'activation uniquement négatifs^[82]. Le volume d'activation expérimental ΔV^\ddagger est déterminé par la contribution du volume molaire partiel de la formation du complexe précurseur ($\Delta V^\ddagger_{\text{préc}}$) et de $\Delta V^\ddagger_{\text{te}}$, le volume d'activation pour l'étape de transfert d'électron proprement dit:

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V^\ddagger_{\text{préc}} + \Delta V^\ddagger_{\text{te}} \quad (\text{éq. 4.18})$$

Les contributions de Stranks, Swaddle et Wherland^[83-85] à la théorie de Marcus-Hush^[13] peuvent être parfois utilisées pour calculer le volume d'activation des réactions de transfert d'électron :

$$\Delta V^{\#}_{te} = \Delta V^{\#}_{IR} + \Delta V^{\#}_{SR} + \Delta V^{\#}_{COUL} + \Delta V^{\#}_{DH} + \lambda \cdot \Delta V \quad (\text{éq. 4.19})$$

$\Delta V^{\#}_{IR}$ représente la contribution du réarrangement des espèces réactives, $\Delta V^{\#}_{SR}$ le réarrangement des molécules de solvant aux alentours, $\Delta V^{\#}_{COUL}$ la contribution coulombienne requise pour amener les espèces réactives proches l'une de l'autre, $\Delta V^{\#}_{DH}$ l'effet Debye-Hückel ou tout autre effet électrolyte, $\lambda \cdot \Delta V$ la contribution due au changement de configuration électronique à l'état de transition (réorganisation de Franck-Condon).

Il n'est pas possible à l'heure actuelle de calculer chacune de ces contributions afin d'interpréter de manière rigoureuse les volumes d'activation déterminés. Nous pouvons cependant observer que les volumes d'activation sont négatifs, ce qui va dans le sens d'un mécanisme de type sphère externe. Les volumes d'activation obtenus pour $[\text{Co}^{II}(\text{promp})\text{im}]$ sont sensiblement plus négatifs que ceux déterminés pour $[\text{Co}^{II}(\text{promp})\text{buim}]$ rendant sans doute compte d'une meilleure approche pour le complexe dont le substituant sur N7 de l'imidazole est le plus petit. Ces variations sont cependant faibles et il est encore plus difficile de discuter les différences des volumes d'activation observés entre deux énantiomères. Il semble cependant que les énantiomères Δ possèdent des volumes d'activation moins négatifs que les énantiomères Λ . Les différences d'enthalpies d'activation entre énantiomères sont également très faibles et dégager une relation entre l'enthalpie d'activation et le volume d'activation est périlleuse. Des volumes d'activation plus négatifs rendant compte d'une meilleure approche des réactifs permettent peut-être un meilleur couplage orbitalaire des deux centres rédox, ce qui abaisserait l'enthalpie d'activation. Cette hypothèse correspond aux

observations expérimentales : l'enthalpie d'activation est plus faible pour le complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{im}]$ que pour le complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{buim}]$ et les énantiomères Δ possèdent une enthalpie d'activation légèrement plus importante que les énantiomères Λ .

4.5 Discussion

Il devient de plus en plus clair que l'utilisation de composés optiquement actifs dans l'étude des réactions de transfert d'électron a son importance.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence l'influence de l'ion métallique des complexes réducteurs sur les sites et les mécanismes du transfert d'électron.

Les complexes réducteurs optiquement actifs ont permis l'utilisation du dichroïsme circulaire dans l'identification des sites de transfert d'électron. Cette technique a mis en évidence l'existence d'au moins deux sites réactionnels dans la poche hydrophobe de la plastocyanine. La réactivité de ces deux sites dépend non seulement de la nature du ligand porté par le complexe du cobalt(II), mais également de la chiralité du réactif. Ce résultat est important car il pourrait expliquer le comportement encore obscur de certaines biomolécules vis-à-vis de réactifs optiquement actifs.

La diversité des chemins réactionnels permet également d'expliquer les grandes différences d'énergies d'activation rencontrées entre les complexes et leurs énantiomères, en complément à l'hypothèse d'une distance d'approche modulée par des interactions stéréochimiques au même site réactionnel.

Ce travail montre également l'importance du milieu réactionnel. La coordination d'une molécule d'imidazole à nos complexes réducteurs accélère le transfert

d'électron d'un facteur 500 à 1000, qui ne s'explique pas uniquement par la faible variation du potentiel rédox qu'entraîne la substitution d'une molécule d'eau par l'imidazole (Tableau 2.5.1). Cette catalyse ne peut s'expliquer que si l'on suppose un mécanisme de transfert d'électron particulier lié à la présence de l'espèce mixte.

Trois mécanismes de transfert d'électron peuvent être proposés pour rendre compte de nos observations. Au premier mécanisme correspond un transfert électronique par le biais du pont imidazole fourni par His87. Le second mécanisme est vraisemblablement lié à un transfert d'électron sphère externe, mais le site réactionnel reste à découvrir. Le troisième mécanisme se rencontre avec les complexes imidazoles et se situe également dans l'environnement de His87.

La comparaison de ces résultats avec la réactivité de plastocyanines mutantes, actuellement en cours d'étude^[78], permettra de compléter ces résultats.

4.6 Modes opératoires

4.6.1 Préparation des solutions d'aquacomplexes et de complexes mixtes de cobalt(II)

Les solutions de complexes de cobalt(II) sont très sensibles à la présence d'oxygène pour deux raisons:

- 1) Lente oxydation des complexes de cobalt(II) en cobalt(III),
- 2) Fixation de l'oxygène moléculaire par le complexe $[\text{Co}(\text{alamp})]$ ^[65]

Toutes les solutions des complexes de cobalt(II) sont ainsi conservées et manipulées sous atmosphère inerte, dans un sac à gants maintenu sous azote.

a) Préparation des solutions d'aquacomplexes de cobalt(II).

Un volume précis d'une solution aqueuse de sulfate de cobalt(II) étalonnée par complexométrie est ajouté à 1.2 éq de ligand alamp ou promp. Le pH est ajusté à 7 par NaOH dilué, puis en complétant le volume de la solution de complexe par un tampon phosphate pH = 7.0 dont la concentration permet également de fixer la force ionique. La concentration précise en complexe est encore déterminée par spectropolarimétrie. Les solutions préparées pour les mesures cinétiques de transfert d'électron ont une concentration de l'ordre de $10^{-3}M$.

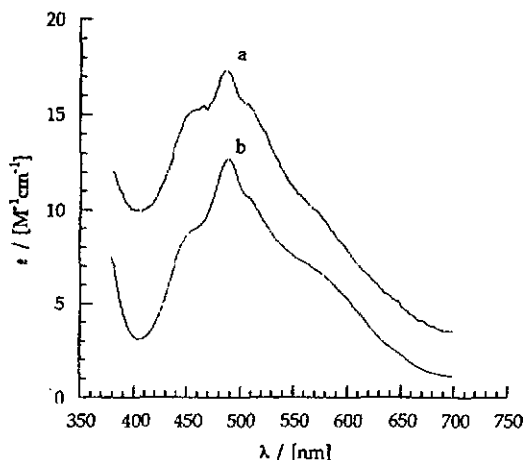


Figure 4.6.1 Spectres d'absorption de $[Co^{II}(alamp)H_2O]$ (a) et $[Co^{II}(promp)H_2O]$ (b). pH = 7.0 (tampon phosphate 0.1M)

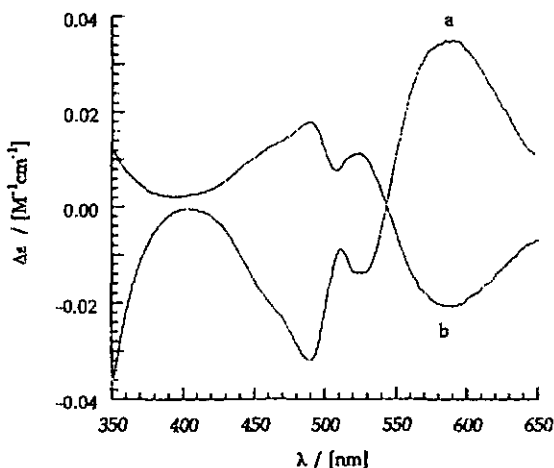


Figure 4.6.2 Spectres CD de Δ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et de Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) pH = 7.0 (tampon phosphate 0.1M)

b) Préparation des solutions de complexes mixtes de cobalt(II)

Un volume précis d'une solution aqueuse de sulfate de cobalt(II) étalonée par complexométrie est ajouté à 1.2 éq. de ligand alamp ou promp. Le pH est ajusté le plus précisément possible à pH = 7.0 par NaOH dilué. On additionne ensuite un volume précis d'une solution de tampon imidazole, N-méthylimidazole ou N-butylimidazole pH = 7.0 dont la concentration en espèce non protonée est déterminée préalablement par titration acidimétrique. La force ionique est finalement ajustée par NaCl_(aq) et le volume complété par de l'eau bidistillée. Les solutions de complexes mixtes ont également des concentrations voisines de 10^{-3} M.

4.6.2 Préparation des solutions de plastocyanine

L'isolement de la plastocyanine des feuilles d'épinard et sa purification sont décrits au chapitre 3. L'échantillon cocentré est dilué dans un tampon phosphate pH=7.0.

Pour les raisons décrites au chapitre 6, la solution de plastocyanine ne doit pas être diluée dans un tampon imidazole. La solution de plastocyanine est débarrassée de l'oxygène dissous par un rapide dégazage sous vide. L'échantillon est ensuite conservé sous atmosphère inerte dans un sac à gants.

La coccentration en protéine est déterminée par l'absorption à 597nm avec $\epsilon = 4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dans les mesures de transfert d'électron, la concentration de la solution de mesure est de l'ordre de 10^{-5}M et de $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ pour les mesures spectropolarimétriques.

Les mesures en fonction de la température peuvent se faire sur un domaine relativement étroit en raison de la stabilité thermique de la plastocyanine^[66]. Nous avons choisi une gamme de températures comprise entre 5 et 45°C.

La qualité de l'échantillon de plastocyanine pendant la journée de mesure est également vérifié régulièrement par son spectre visible.

4.6.3 Préparation des tampons

Tous les produits utilisés pour la préparation des tampons sont de qualité purum p.a. ou supérieure. Les différents tampons sont préparés dans de l'eau bidistillée et dégazée sous vide.

Les tampons phosphates sont préparés par pesée de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 . Les tampons imidazole, N-méthylimidazole et N-butylimidazole sont préparés par mélange de volumes égaux de solutions équimolaires en imidazole, l'une non protonée et l'autre protonée par 1éq. de $\text{HCl}(\text{aq})$. La concentration en imidazole non protoné est déterminée précisément par titration acidimétrique par $\text{HCl}(\text{aq})$ de titre connu.

4.6.4 Mesures cinétiques

Des volumes égaux de solutions de complexe réducteur et de plastocyanine préalablement thermostatisés sont introduits dans la cellule de mesure. La variation de la concentration en plastocyanine oxydée est suivie en fonction du temps par la décroissance de l'absorption à 597nm.

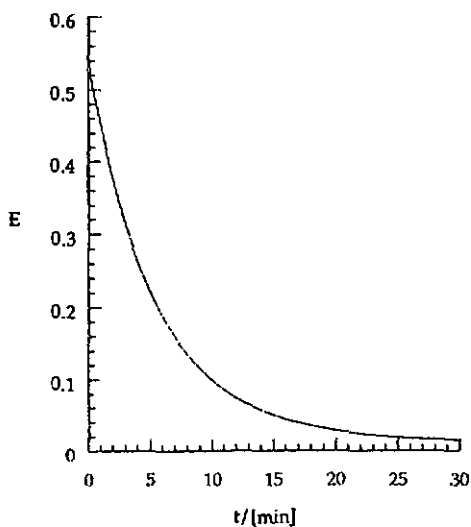
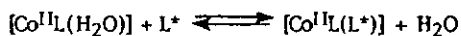


Figure 4.6.3 Trace cinétique expérimentale.

5. Détermination spectropolarimétrique des constantes de formation des complexes mixtes de cobalt(II)

5.1 Généralités

La présence d'imidazole ou de l'un de ses dérivés N-méthylimidazole ou N-butylimidazole (L^*), dans une solution d'aquacomplexe de cobalt(II) $[Co^{II}L(H_2O)]$ ($L = \text{promp}$ ou alamp), conduit à la formation de l'espèce mixte $[Co^{II}L(L^*)]$ selon l'équilibre:



$$K = \frac{[Co^{II}L(L^*)]}{[Co^{II}L(H_2O)] \cdot [L^*]} \quad (\text{éq. 5.1})$$

A pH = 7.0, la formation du complexe de cobalt(II) avec les ligands promp ou alamp peut être considérée comme quantitative^[57]. A ce pH et en présence de L^* , le cobalt(II) se répartit donc sous forme d'aquacomplexe et de complexe mixte.

$$[Co^{II}L]_0 = [Co^{II}L(H_2O)] + [Co^{II}L(L^*)]$$

En partant de l'hypothèse que $[L^*] = [L^*]_0$,

$$K = \frac{[Co^{II}L(L^*)]}{([Co^{II}L]_0 - [Co^{II}L(L^*)]) \cdot [L^*]_0} \quad (\text{éq. 5.2})$$

La détermination expérimentale de $[Co^{II}L(L^*)]$ permet alors de calculer K.

Les spectres CD de l'aquacomplexe et du complexe mixte étant relativement différents, l'évaluation de K peut se faire aisément par spectropolarimétrie.

A la longueur d'onde choisie pour l'analyse ($\lambda = 490\text{nm}$), il faut tenir compte d'une absorption de l'aquacomplexe et du complexe mixte (Figure 5.2.1).

$$\begin{aligned}
 m^*_{\text{tot}} &= m^*[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})] + m^*[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)] = (\Delta\varepsilon[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})] + \Delta\varepsilon[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)]) \cdot 1.33000 = \\
 &= \Delta\varepsilon'[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})] \cdot ([\text{Co}^{\text{II}}]_0 - [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)]) + \Delta\varepsilon'[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)] \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)] = \\
 &= \Delta\varepsilon' \cdot [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)] + \Delta\varepsilon'[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})] \cdot [\text{Co}^{\text{II}}]_0
 \end{aligned}$$

par conséquent:

$$(m^*_{\text{tot}} - m^*[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})]_0) / \Delta\varepsilon' = [\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{L}^*)] \quad (\text{éq. 5.3})$$

et en substituant dans l'expression de l'équilibre:

$$\begin{aligned}
 (K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}]_0 - K \cdot \frac{(m^*_{\text{tot}} - m^*[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})]_0)}{\Delta\varepsilon'}) \cdot [\text{L}^*]_0 &= \frac{(m^*_{\text{tot}} - m^*[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}(\text{H}_2\text{O})]_0)}{\Delta\varepsilon'} \\
 \frac{1}{\Delta m^*} - \frac{1}{[\text{Co}^{\text{II}}]_0 \cdot \Delta\varepsilon'} &= \frac{1}{[\text{L}^*]_0} - \frac{1}{K \cdot [\text{Co}^{\text{II}}]_0 \Delta\varepsilon'} \quad (\text{éq. 5.4})
 \end{aligned}$$

La représentation $1/\Delta m^*$ en fonction de $1/[\text{L}^*]_0$ permet d'évaluer K par le rapport de l'ordonnée à l'origine et de la pente de la droite obtenue (Figures 5.2.2 et 5.2.3).

Les paramètres thermodynamiques de formation des complexes mixtes sont obtenus par la détermination de K à différentes températures.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (\text{éq. 5.5})$$

Par la représentation graphique $R \cdot \ln K = f(T^{-1})$ on obtient ΔH par la pente et ΔS par l'ordonnée à l'origine (Figures 5.2.4 et 5.2.5).

5.2 Résultats

Tableau 5.2.1 Constantes de formation des complexes mixtes $K / [l\text{-mol}^{-1}]$. Tampons L^* pH = 7.0; $I = 0.5M$ (NaCl).

T / [°C]	15	20	25	30	35	40
[Co(promp)im]	159 ± 10	145 ± 5	130 ± 7	116 ± 6	109 ± 10	96 ± 9
[Co(promp)meim]	225 ± 20	200 ± 6	179 ± 4	160 ± 4	145 ± 6	136 ± 10
[Co(promp)buim]	359 ± 8	320 ± 4	283 ± 4	257 ± 4	230 ± 7	212 ± 7
[Co(alamp)im]	130 ± 8	109 ± 8	92 ± 5	86 ± 6	80 ± 6	74 ± 6
[Co(alamp)meim]	175 ± 10	158 ± 7	139 ± 4	133 ± 4	120 ± 6	110 ± 6
[Co(alamp)buim]	232 ± 10	202 ± 10	180 ± 8	160 ± 12	146 ± 10	135 ± 10

Tableau 5.2.2 Constantes de formation des complexes mixtes obtenues par évaluation cinétique^a) et par spectropolarimétrie^b). Détermination des paramètres thermodynamiques de formation ΔH et ΔS . Tampons L^* pH = 7.0; $I = 0.5M$ (NaCl).

	L = promp	L = alamp
$L^* = im$		
$K^{25^\circ C}$	92 ± 15 ^a / 130 ± 7 ^b	86 ± 15 ^a / 92 ± 10 ^b
$\Delta H [kJ/mol]^b$	-14.9 ± 0.5	-16.5 ± 1.7
$\Delta S [J/molK]^b$	-9.8 ± 1.8	-16.9 ± 5.6
$L^* = meim$		
$K^{25^\circ C}$	157 ± 14 ^a / 179 ± 4 ^b	125 ± 22 ^a / 139 ± 10 ^b
$\Delta H [kJ/mol]^b$	-15.4 ± 0.6	-13.6 ± 0.6
$\Delta S [J/molK]^b$	-8.6 ± 1.7	-4.6 ± 2.1
$L^* = buim$		
$K^{25^\circ C}$	241 ± 15 ^a / 283 ± 4 ^b	127 ± 10 ^a / 180 ± 17 ^b
$\Delta H [kJ/mol]^b$	-16.0 ± 0.3	-16.3 ± 0.6
$\Delta S [J/molK]^b$	-6.5 ± 1.0	-11.5 ± 2.0

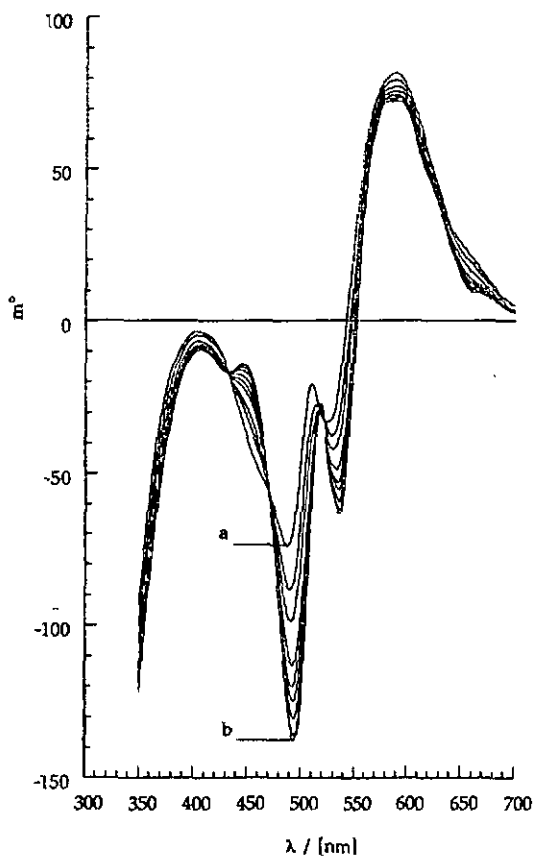


Figure 5.2.1 Variation du spectre CD de l'aqua-complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ en présence d'Imidazole; (a) 100% d'aqua-complexe; (b) ~100% de complexe mixte.

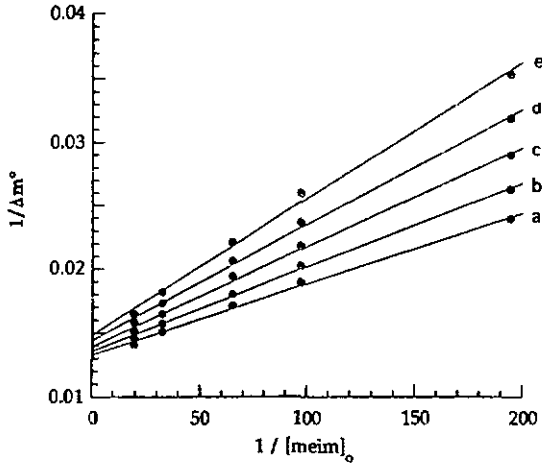


Figure 5.2.2 Représentation $1/\Delta m^\circ$ en fonction de $1/[L^*]$ pour la détermination de la constante de formation de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{meim}]$; $T = 15^\circ\text{C}$ (a); 20°C (b); 25°C (c); 30°C (d); 35°C (e); 40°C (f)

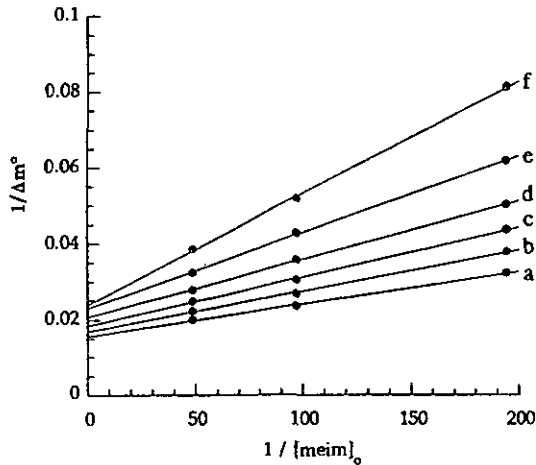


Figure 5.2.3 Représentation $1/\Delta m^\circ$ en fonction de $1/[L^*]$ pour la détermination de la constante de formation de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{meim}]$; $T = 15^\circ\text{C}$ (a); 20°C (b); 25°C (c); 30°C (d); 35°C (e); 40°C (f)

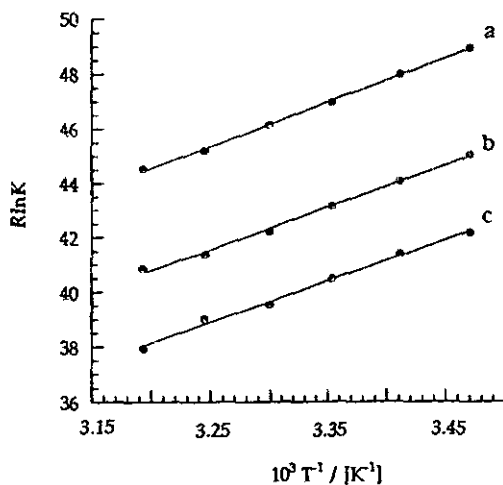


Figure 5.2.4 Représentation $R \ln K$ en fonction de $1/T$ pour les complexes mixtes; (a) $[Co^{II}(promp)(im)]$; (b) $[Co^{II}(promp)(meim)]$; (c) $[Co^{II}(promp)(buim)]$.

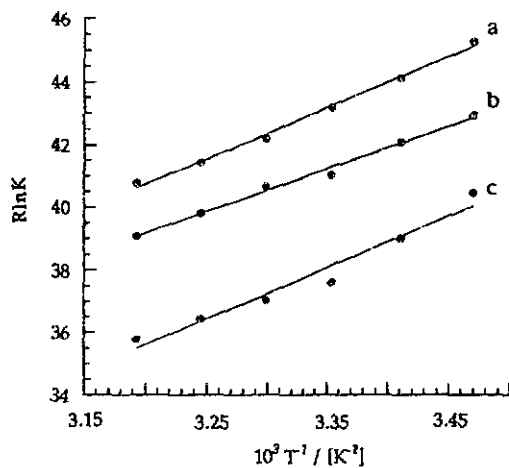


Figure 5.2.5 Représentation $R \ln K$ en fonction de T^{-1} pour les complexes mixtes (a) $[Co^{II}(alamp)(im)]$; (b) $[Co^{II}(alamp)(meim)]$; (c) $[Co^{II}(alamp)(buim)]$.

Pour tous les complexes mixtes formés, les valeurs des constantes de formation sont dans le même ordre de grandeur et leur variation en fonction de la température est comparable. La formation du complexe mixte est très légèrement exothermique et s'accompagne d'une faible variation d'entropie.

La détermination des constantes de formation en fonction de la température permet de vérifier que la variation de la concentration du complexe mixte lors des mesures cinétiques de la réduction de la plastocyanine dans les tampons imidazoles (Chapitre 4.4) est effectivement négligeable.

5.3 Modes opératoires

Les mesures spectropolarimétriques sont effectuées à l'aide de solutions de cobalt(II) et de tampon L* étalonnées.

Une solution standard 37.5mM en cobalt(II) est préparée par pesée de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. et un tampon L* 1M de pH = 7.0 est préparé par mélange d'une solution de L* et d'une solution de $[\text{HL}^*]^+$ (protonée par un équivalent en HCl). La concentration en L* libre est ensuite déterminée précisément par titration acidimétrique d'une prise de la solution tampon.

Les solutions d'aquacomplexes $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ ou $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ sont préparées dans des ballons jaugés de 25ml en introduisant 5ml de la solution standard de cobalt(II) et 1.2éq de ligand promp-2HCl ou alamp. Le ballon jaugé est complété par H_2O bidistillée en ajustant le pH à 7.0 précisément par NaOH dilué. La solution est purgée sous argon et s'utilise pour la préparation des solutions de mesures.

Les solutions de mesures sont préparées dans des ballons jaugés de 10ml en introduisant 2ml de la solution d'aquacomplexe et des volumes variables de tampon L^+ variant de 0 à 20éq. Le ballon jaugé est complété par $NaCl_{(aq)}$ de façon à fixer la force ionique à 0.5M pour chaque solution de mesure.

Toutes les solutions sont purgées à l'azote et maintenues sous atmosphère inerte.

La solution de mesure est introduite dans une cuve spectropolarimétrique de 5cm et thermostatisée pendant 10min. Le spectre CD est enregistré de 350 à 700nm. L'analyse spectrale est effectuée à $\lambda = 490nm$, qui correspond au maximum d'absorption de l'aquacomplexe (Figure 5.2.1).

6. Stabilité du site actif de la plastocyanine

6.1 Séquestration du cuivre par l'imidazole

6.1.1 Généralités

La plastocyanine possède un atome de cuivre coordonné par deux histidines, une méthionine et une cystéine, dans un site tétraédrique déformé. Plusieurs métaux peuvent s'insérer dans un tel site, mais seul le cuivre permet d'obtenir une protéine dont le potentiel rédox répond aux exigences physiologiques. Le mécanisme intracellulaire par lequel le cuivre est sélectivement incorporé dans le polypeptide n'est pas bien connu. L'insertion du métal peut intervenir après la biosynthèse de la chaîne polypeptidique, comme il semble que ce soit le cas pour d'autres métalloprotéines^[86]. Bien que plusieurs facteurs ont leur importance (phénomènes de transport, abondance relative des ions métalliques dans le milieu, potentiels rédox), l'insertion sélective d'un ion particulier dans une métalloprotéine s'explique finalement par des facteurs cinétiques ou thermodynamiques^[87].

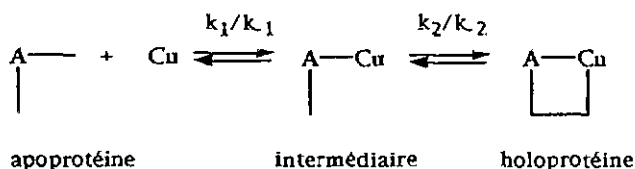
Des mesures d'incorporation d'ions métalliques dans les protéines de cuivre bleues ont été effectuées pour l'apoazurine et l'apostellacyanine. Dans le cas de l'apoazurine, le cuivre(II) est retenu beaucoup plus rapidement que le cobalt(II), le nickel(II) ou le manganèse(II)^[88]. Une coordination pseudotétraédrique impliquant un donneur thioéther est cependant rare pour le cuivre(II) et il semble que cette spécificité soit le résultat de différences cinétiques importantes.

Les études cinétiques d'incorporation du cuivre dans l'apoazurine à différents pH^[89a] ont montré que la constante de vitesse observée dépend de manière hyperbolique avec la concentration en cuivre(II). La formation définitive du site

actif ne résulte donc pas d'une réaction bimoléculaire simple. Un changement de conformation de la protéine, responsable de la formation définitive du site, est supposé devenir l'étape cinétique limitante pour de grandes concentrations en cuivre.

Les mesures d'insertion du cuivre dans l'apostellacyanine^[90] correspondent également à ce modèle en deux étapes dont l'une est iodépendante de la concentration en cuivre. Pour cette protéine, le changement de conformation est l'étape cinétique limitante, même pour des concentrations en cuivre inférieures à un équivalent. Ce changement de conformation est environ 500 fois plus lent pour la stellacyanine que pour l'azurine.

Le mécanisme suivant a donc été postulé en supposant que seule l'holoprotéine contient le chromophore responsable de la couleur bleue:



Si la première étape est un équilibre rapidement atteint, une cinétique de premier ordre détermine une constante de vitesse k_{obs} qui dépend de manière hyperbolique de la concentration en cuivre selon l'équation :

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 K_1 [\text{Cu}]}{1 + K_1 [\text{Cu}]} + k_{-2} \quad (\text{éq. 6.1})$$

où $K_1 = k_1/k_{-1}$

D'autres mesures cinétiques d'incorporation du cuivre dans l'apoazurine ont été effectuées en présence d'imidazole. Selon les conditions expérimentales (pH, température, concentration en imidazole), les cinétiques enregistrées à 626nm

La présence du tampon imidazole dans nos mesures cinétiques de transfert d'électron peut donc dénaturer le site actif de la plastocyanine par compétition pour le cuivre(II). Un test effectué avec un échantillon de plastocyanine a montré en effet que la présence d'imidazole provoque une décoloration de la solution contenant la métalloprotéine. L'ajout de $K_3Fe(CN)_6$ ne restituant pas la couleur bleue de la protéine oxydée - contrairement à l'apport de cuivre(II) - démontre que cette décoloration n'est pas due à une réduction, mais bel et bien à un équilibre de répartition du cuivre entre la protéine et l'imidazole.

Afin de connaître plus précisément l'action de l'imidazole au niveau du site actif, nous avons effectué une étude cinétique de la séquestration à $pH = 7.0$ et en fonction de la concentration en imidazole libre.

6.1.2 Analyse cinétique

6.1.2.1 Préparation des solutions de mesures

Nous utilisons un tampon imidazole $pH = 7.0$ dont la concentration en imidazole non protoné est connue précisément par titration acidimétrique. Sa préparation est décrite au chapitre 4.6. La force ionique des solutions de tampon imidazole est fixée à 0.3M par $NaCl_{(aq)}$. L'échantillon de plastocyanine est dialysé fraîchement contre H_2O bidistillée et dilué dans $NaCl$ 0.3M. Les mesures cinétiques sont effectuées au spectrophotomètre UVIKON 930 dans des cuvettes tandem de 1cm thermostatées à 25°C. Les cuvettes tandem permettent de déterminer précisément la valeur de l'absorption initiale, avant mélange des réactifs. L'absorption mesurée est corrigée en tenant compte de l'absorption propre des cuvettes et du solvant.

6.1.2.2 Résultats

Quelques unes des mesures cinétiques de séquestration enregistrées à 597nm sont représentées par les figures 6.1.2 et 6.1.3.

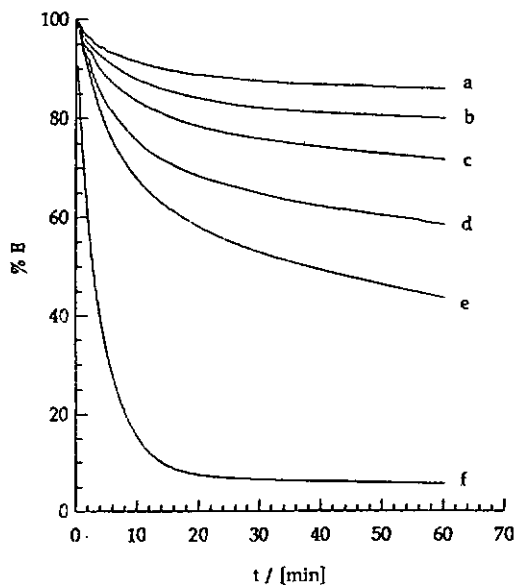


Figure 6.1.2 Cinétiques de séquestration du cuivre de la plastocyanine par l'imidazole.

$[PCu]_0 = 5 \cdot 10^{-5} M$; $pH = 7.0$ (tampon Imidazole); $I = 0.3M$ (NaCl); $T = 25^\circ C$. (a) $[Im]_0 = 0.06M$; (b) $[Im]_0 = 0.08M$; (c) $[Im]_0 = 0.10M$; (d) $[Im]_0 = 0.12M$; (e) $[Im]_0 = 0.14M$; (f) $[Im]_0 = 0.25M$.

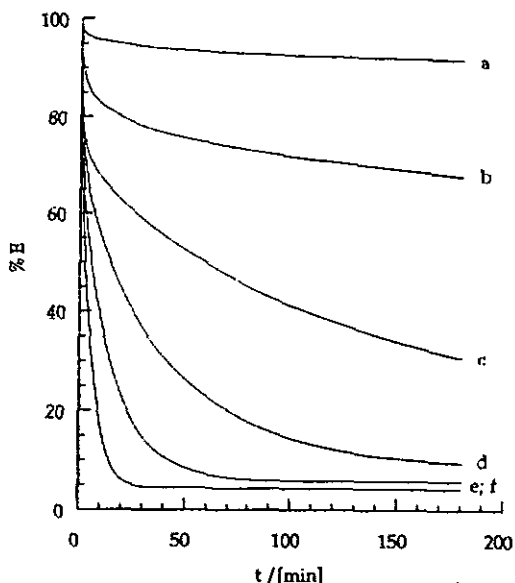


Figure 6.1.3 Cinétiques de séquestration du cuivre de la plastocyanine par l'imidazole.

$[PCu]_0 = 9.4 \cdot 10^{-5} M$; pH = 7.0 (tampon imidazole); I = 0.3M (NaCl); T = 25°C. (a) $[im]_0 = 0.02M$; (b) $[im]_0 = 0.08M$; (c) $[im]_0 = 0.12M$; (d) $[im]_0 = 0.16M$; (e) $[im]_0 = 0.20M$; (f) $[im]_0 = 0.25M$.

L'allure biphasique de la cinétique de séquestration peut s'expliquer par la formation d'intermédiaire(s) qui absorbe à 597nm. L'analyse de la variation du spectre visible pendant la réaction de séquestration indique effectivement que le spectre de l'intermédiaire et celui de la protéine native sont très semblables (Figure 6.1.4). L'environnement du cuivre est donc très similaire pour l'intermédiaire(s) formé(s) durant la réaction et contient très certainement le soufre de Cys84. La séquestration du cuivre de la plastocyanine rejoint ainsi les observations effectuées pour les mesures d'incorporation du cuivre dans l'apoazurine^[89c].

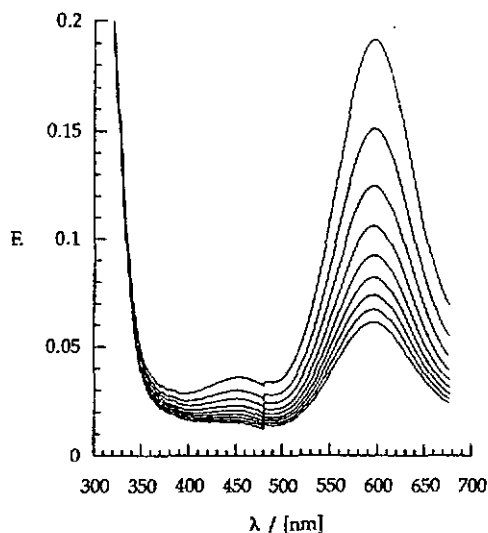
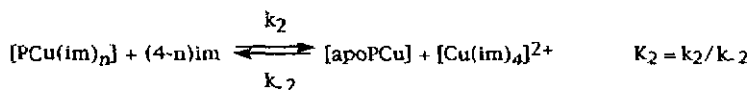
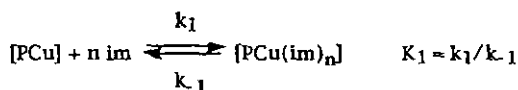


Figure 6.1.4 Variation du spectre visible de la plastocyanine en présence d'imidazole.
[PCu]₀ = $4 \cdot 10^{-5}$ M; [im]₀ = 0.1 M; pH = 7.0; I = 0.3 M (NaCl); T = 25.0°C.

La séquestration du cuivre n'est pas quantitative pour toutes les concentrations en tampon imidazole. La valeur de l'absorption finale (considérée après 30 h de réaction) dépend de la concentration en imidazole libre du tampon (Tableaux 6.1.2 et 6.1.3).

L'hypothèse d'un mécanisme de répartition du cuivre entre la plastocyanine et l'imidazole en deux étapes peut ainsi être proposée.



La constante du premier équilibre K_1 ainsi que la valeur de n peuvent se calculer en connaissant les valeurs finales d'absorption liées à la première réaction $E^\infty(1)$. Ces valeurs sont estimées par extrapolation à $t = 0$ de la seconde réaction, en prolongeant la tangente de la trace cinétique après ~ 5 demi-vies de la première réaction. Ces estimations sont donnés dans le tableau 6.1.1 où une incertitude de $\pm 10\%$ doit être considérée.

Tableau 6.1.1 Estimation de % $E^\infty(1)$

$[\text{im}]_0$	$-\log[\text{im}]_0$	% $E^\infty(1)$	$\log \frac{[\text{PCu(im)}_n]}{[\text{PCu}]}$
0.02	-1.7	97	-1.15
0.04	-1.4	96	-0.95
0.06	-1.22	94	-0.76
0.08	-1.10	87	-0.35
0.10	-1.0	80	0
0.12	-0.92	75	0.21
0.14	-0.854	71.5	0.39
0.16	-0.796	69	0.54
0.20	-0.70	66.5	0.72
∞		60	

Pour les grandes concentrations en imidazole, les valeurs extrapolées à $t = 0$ semblent converger vers 60% de l'absorption initiale. Si la formation de l'intermédiaire est quasi quantitative pour ces concentrations en imidazole élevées, le coefficient d'absorption molaire de l'intermédiaire se situe ainsi aux environs de:

$$4900 \cdot 0.6 = 2950 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

Le calcul des concentrations en intermédiaire et en plastocyanine native liées au premier équilibre s'effectue en considérant le développement mathématique donné ci-dessous:

$$E_{\infty(1)}^{\circ} = 4900 \cdot [\text{PCu}] \cdot l + 2950 [\text{PCu}(\text{im})_n] \cdot l = E_0 - 4900 \cdot [\text{PCu}(\text{im})_n] \cdot l + 2950 \cdot [\text{PCu}(\text{im})_n] \cdot l = E_0 - 1950 \cdot [\text{PCu}(\text{im})_n] \cdot l$$

$$\text{donc} \quad [\text{PCu}(\text{im})_n] = (E_0 - E_{\infty(1)}^{\circ}) / 1950 \quad (\text{éq. 6.2})$$

$$\text{et} \quad [\text{PCu}] = [\text{PCu}]_0 - [\text{PCu}(\text{im})_n] \quad (\text{éq. 6.3})$$

En considérant l'expression du premier équilibre, $K_1 = [\text{PCu}(\text{im})_n] / [\text{PCu}] \cdot [\text{im}]^n$

nous pouvons écrire : $\log K_1 = \log([\text{PCu}(\text{im})_n] / [\text{PCu}]) - n \cdot \log[\text{im}]$.

K_1 est déterminé par la représentation linéaire $\log([\text{PCu}(\text{im})_n] / [\text{PCu}])$ en fonction de $-\log[\text{im}]_0$ (Figure 6.1.5). La pente de la meilleure droite et l'ordonnée à l'origine permettent de déterminer la valeur de n et de K_1 .

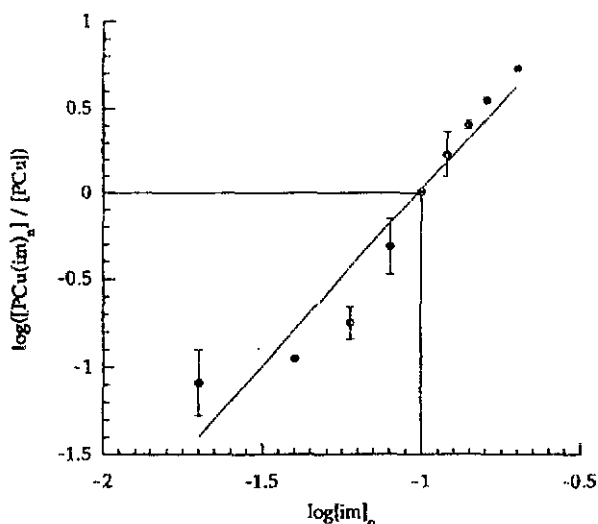
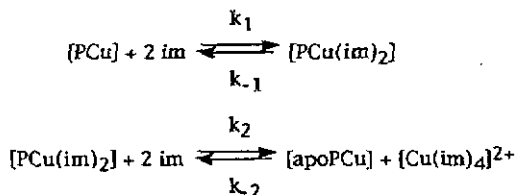


Figure 6.1.5 Détermination de n et de K_1 .

L'incertitude de la détermination de $E^{\infty}_{(1)}$ se reflète bien sur la représentation graphique de la figure 6.1.5. Une régression linéaire effectuée sur toutes les valeurs expérimentales permet de déterminer $n = 2.03 \pm 0.10$ et $K_1 = 100 \pm 40 \text{ M}^{-2}$. L'intermédiaire le plus probable semble être $[\text{PCu}(\text{im})_2]$.

Ces résultats permettent de détailler l'hypothèse du mécanisme de séquestration :



La constante d'équilibre de la seconde réaction est calculée à l'aide des valeurs finales $E^\infty_{(2)}$ et de K_1 .

Par le développement mathématique donné ci-dessous, nous déterminons les concentrations finales en $[\text{PCu}]$ et en $[\text{PCu}(\text{im})_2]$ et aussi $E^\infty_{(2)}$ en fixant arbitrairement une valeur pour K_2 .

Expression des constantes d'équilibres et du bilan matière de la protéine :

$$K_1 = \frac{[\text{PCu}(\text{im})_2]}{[\text{PCu}] \cdot [\text{im}]^2} ; K_2 = \frac{[\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+} \cdot [\text{apoPCu}]}{[\text{PCu}(\text{im})_2] \cdot [\text{im}]^2}$$

$$c_p = [\text{PCu}] + [\text{PCu}(\text{im})_2] + [\text{apoPCu}]$$

La concentration en apoprotéine équivaut celle en complexe $[\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+}$.

$$[\text{apoPCu}] = [\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+}$$

dans les conditions expérimentales, $[\text{im}] = [\text{im}]_0$ donc :

$$[\text{PCu}(\text{im})_2] = K_1 \cdot [\text{PCu}] \cdot [\text{im}]_0^2$$

ce qui permet d'écrire :

$$[\text{apoPCu}] = c_p - [\text{PCu}] - [\text{PCu}(\text{im})_2]$$

$$[\text{apoPCu}] = c_p - [\text{PCu}] \cdot (1 + K_1 [\text{im}]_0^2)$$

et K_2 devient :

$$K_2 = \frac{\{c_p - [\text{PCu}] \cdot (1 + K_1 [\text{im}]_0^2)\}^2}{K_1 \cdot [\text{PCu}] \cdot [\text{im}]_0^4} \quad (\text{éq. 6.4})$$

$[PCu]$ peut se calculer en résolvant :

$$[PCu]^2 (1 + K_1 [im]_0^2)^2 - [PCu] (2c_p + 2c_p K_1 [im]_0^2 + K_1 K_2 [im]_0^4) + c_p^4 = 0 \quad (\text{éq. 6.5})$$

La valeur $E^\infty_{(2)}$ calculée est comparée à la valeur expérimentale. K_2 est ensuite ajustée jusqu'à ce que les absorptions finales $E^\infty_{(2)}$ calculées et expérimentales correspondent le mieux possible.

Tableau 6.1.2 Evaluation de K_2 (cinétiques de la figure 6.2)

$[im]_0$	% $E^\infty_{(2)}$	K_2
0.04	78.1	$7.6 \cdot 10^{-3}^*$
0.06	60.7	$7.5 \cdot 10^{-3}^*$
0.08	38.6	0.012
0.10	24.2	0.015
0.12	15.8	0.016
0.14	10.4	0.019
0.25	4.2	-

* non considérées dans la moyenne.

Tableau 6.1.3 Evaluation de K_2 (cinétiques de la figure 6.3)

$[im]_0$	% $E^\infty_{(2)}$	K_2
0.02	70.4	0.69*
0.08	45.2	0.015
0.12	15.2	0.036
0.16	8.0	0.0355
0.20	4.3	0.040
0.24	3.0	0.375

* non considérée dans la moyenne.

La moyenne de K_2 pour les deux séries de mesures permet d'estimer une constante d'équilibre K_2 voisine de : $K_2 = 2.4 \cdot 10^{-2} M^{-1}$

Estimation des constantes de vitesses

les constantes k_1 et k_{-1} sont estimées à l'aide de la vitesse initiale et de K_1 .

$$v = d[\text{PCu}]/dt = k_1 \cdot [\text{PCu}] \cdot c_{(\text{im})}^2$$

$$v_0 = \Delta[\text{PCu}]_0 / \Delta t_0 = k_1 \cdot [\text{PCu}]_0 \cdot c_{(\text{im})}^2 \quad \text{et} \quad k_1 = 1 / (\Delta t_0 \cdot [\text{im}]_0^2) \quad (\text{éq. 6.6})$$

Δt_0 est le temps nécessaire à diminuer l'absorption de E_0 à $E^{\infty}(1)$ si la vitesse était constante et égale à v_0 . Cette détermination est très difficile compte tenu du peu d'information que nous possédons sur la première partie de la cinétique. Certaines traces cinétiques, en particulier celles obtenues pour les séquestrations en présence de faibles concentrations d'imidazole ont dû être écartées.

Tableau 6.1.4 Evaluation de k_1 par la vitesse initiale

$[\text{im}]_0$	$\Delta t_0 / [\text{s}]$	k_1
0.08	260	0.6
0.12	116	0.6
0.2	63	0.4
0.04	1250	0.5
0.1	333	0.3
0.14	170	0.3

Moyenne considérée : $k_1 = 0.45 \pm 0.13 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$

par $K_1 = k_1 / k_{-1}$:

$$k_{-1} = (4.5 \pm 1.3) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

La connaissance de K_2 permet de fixer le rapport k_2/k_{-2} . Pour trouver les valeurs adéquates de k_2 et k_{-2} , nous avons effectué une simulation théorique des courbes

expérimentales. Pour trouver une première valeur approximative de k_2 , nous avons choisi une réaction qui se déroule à près de 100% et négligé k_2 .

Cette simulation permet également de vérifier le modèle du mécanisme et d'affiner les valeurs des différentes constantes estimées par les calculs précédents.

Le calcul des concentrations de toutes les espèces en fonction du temps a été effectué par les lois de vitesses établies pour le mécanisme considéré:

$$\frac{d[\text{PCu}]}{dt} = -k_1[\text{im}]^2[\text{PCu}] + k_{-1}[\text{PCu}(\text{im})_2] \quad (\text{éq. 6.7})$$

$$\frac{d[\text{im}]}{dt} = -k_1[\text{im}]^2[\text{PCu}] + k_{-1}[\text{PCu}(\text{im})_2] \quad (\text{éq. 6.8})$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{PCu}(\text{im})_2]}{dt} &= k_1[\text{im}]^2[\text{PCu}] - k_{-1}[\text{PCu}(\text{im})_2] - k_2[\text{PCu}(\text{im})_2][\text{im}]^2 \\ &+ k_{-2}[\text{apoPCu}][\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+} \end{aligned} \quad (\text{éq. 6.9})$$

$$\frac{d[\text{apoPCu}]}{dt} = \frac{d[\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+}}{dt} = k_2[\text{PCu}(\text{im})_2][\text{im}]^2 - k_{-2}[\text{apoPCu}][\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+} \quad (\text{éq. 6.10})$$

Le logiciel Excel nous a permis d'effectuer cette simulation en considérant une incrémentation $dt = 1\text{s}$. Cette incrémentation permet d'avoir une relativement bonne correspondance entre le modèle théorique et la trace cinétique expérimentale sur un temps de réaction de 15min. Le choix d'une incrémentation de temps trop grande provoque rapidement une déviation importante des traces cinétiques expérimentales et théoriques.

Pour avoir la meilleure correspondance possible entre les courbes expérimentales et les courbes calculées, nous avons ajusté les valeurs des autres paramètres k_1 , k_2 , k_1 et k_{-1} .

La simulation de six traces cinétiques expérimentales concernant les deux séries de mesures indépendantes a permis de dégager une valeur moyenne pour k_2 et k_{-2} :

$$k_2 = 0.030 \pm 0.016 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ et } k_{-2} = 1.26 \pm 0.66 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Les paramètres correspondant à ces simulations sont donnés dans le tableau 6.1.5.

Tableau 6.1.5 Paramètres conduisant à la meilleure simulation visuelle de certaines traces cinétiques des figures 6.2 et 6.3

$[\text{im}]_0 / [\text{mol/l}]$	0.8	0.12	0.2	0.04	0.1	0.14
$[\text{PCu}]_0 / [\text{mol/l}]$	$9.4 \cdot 10^{-5}$	$9.4 \cdot 10^{-5}$	$9.4 \cdot 10^{-5}$	$4.6 \cdot 10^{-5}$	$4.6 \cdot 10^{-5}$	$4.6 \cdot 10^{-5}$
$\varepsilon(\text{PCu}(\text{im})_2)$	3000	2850	2850	2900	3000	3000
K_1	90	110	85	110	80	100
K_2	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024
k_1	0.50	0.55	0.40	0.50	0.25	0.25
k_{-1}	0.0056	0.0050	0.0050	0.0045	0.0030	0.0025
k_2	0.030	0.015	0.033	0.060	0.024	0.020
k_{-2}	1.25	0.63	1.38	2.50	1.00	0.83

De ces simulations, nous avons déterminés les constantes moyennes regroupées dans le tableau 6.1.6.

Tableau 6.1.6 Constantes de vitesse moyennes déterminées dans le mécanisme proposé de la séquestration du cuivre de la plastocyanine par l'imidazole

$k_1 / [\text{M}^{-3} \text{s}^{-1}]$	$k_{-1} / [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_2 / [\text{M}^{-3} \text{s}^{-1}]$	$k_{-2} / [\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}]$	$\varepsilon(\text{PCu}(\text{im})_2)$
0.41 ± 0.13	$(4.3 \pm 1.2) \cdot 10^{-3}$	0.030 ± 0.016	1.26 ± 0.66	2933 ± 75

avec $K_1 = 96 \pm 13 \text{ M}^{-2}$ et $K_2 = 0.024 \text{ M}^{-1}$

La connaissance des constantes d'équilibres K_1 et K_2 permet de calculer les concentrations d'équilibre en apoplastocyanine, en intermédiaire et en plastocyanine, en fonction de la concentration initiale en imidazole (Figure 6.1.6).

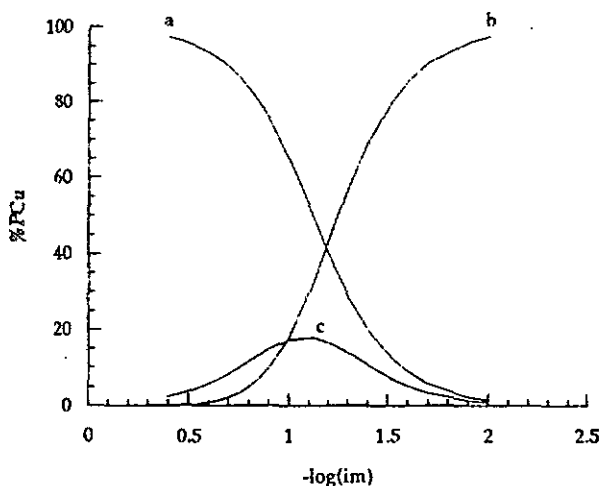


Figure 6.1.6 Répartition des espèces à l'équilibre en fonction de la concentration initiale en imidazole: apoplastocyanine (a); plastocyanine (b); intermédiaire (c)

Les superpositions de certaines traces cinétiques expérimentales par des courbes calculées en considérant les paramètres moyens donnés dans le tableau 6.1.6 sont données aux figures 6.1.7 et 6.1.8.

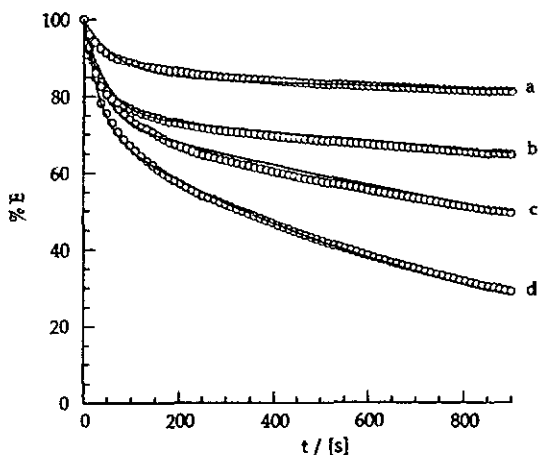


Figure 6.1.7 Cinétiques expérimentales (o) superposées aux traces calculées à l'aide des constantes données dans le tableau 6.1.6. (a) $[im]_0 = 0.08M$; (b) $[im]_0 = 0.12M$; (c) $[im]_0 = 0.16M$; (d) $[im]_0 = 0.20M$. $T = 25^\circ C$; $[PCu]_0 = 9.4 \cdot 10^{-5}M$

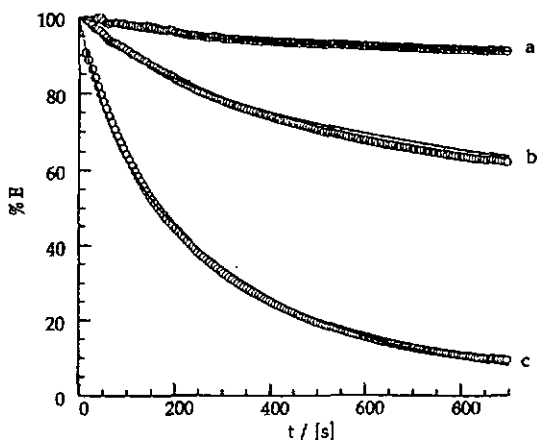


Figure 6.1.8 Cinétiques expérimentales (o) superposées aux traces simulées à l'aide des constantes données dans le tableau 6.1.6. (a) $[im]_0 = 0.04M$; (b) $[im]_0 = 0.14M$; (c) $[im]_0 = 0.25M$. $T = 25^\circ C$; $[PCu]_0 = 4.6 \cdot 10^{-5}M$

Les courbes théoriques obtenues avec ce modèle de mécanisme de séquestration correspondent de manière satisfaisante aux cinétiques expérimentales. Il va de soi vu le grand nombre de paramètres qui ont dû être adaptés, que des mesures supplémentaires, en particulier dans le but d'une meilleure détermination de la première phase réactionnelle, permettraient d'affiner le modèle. La première phase réactionnelle, difficile à analyser par des mesures au spectrophotomètre UVIKON, peut être suivie plus judicieusement par les techniques d'analyses de cinétiques rapides (stopped-flow).

De telles mesures exigent cependant un volume de solution de plastocyanine beaucoup plus important. Si des volumes de 0.3ml permettent d'effectuer une mesure complète au spectrophotomètre UVIKON, un minimum de 10ml sont nécessaires afin de purger et de remplir le volume mort du spectrophotomètre stopped-flow. Selon les concentrations en imidazole choisies, la faible variation en absorption lors de cette première phase réactionnelle rend également très difficile la détermination précise de k_1 , même lors d'une mesure stopped-flow. Dans le but fixé pour ce travail, nous n'avons pas entrepris ces mesures complémentaires.

Le nombre très élevé des paramètres à déterminer dans cette analyse cinétique (4 constantes de vitesses et un coefficient d'absorption) rend difficile leur ajustement dans le programme de simulation choisi. Plusieurs de ces paramètres conduisent à une même modification visuelle de la courbe calculée (augmentation de K_1 et diminution du coefficient d'absorption molaire de l'intermédiaire). Des mesures multilongueurs d'onde accompagnées d'une analyse cinétique globale du spectre d'absorption seraient d'une aide précieuse.

Bien que les valeurs déterminées des constantes de vitesse soient entachées d'erreurs relativement grandes, le mécanisme proposé semble correct et confirme

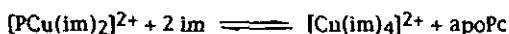
le passage par la formation d'intermédiaire(s), également observé pour l'azurine et la stellacyanine dans les différentes mesures d'incorporation du cuivre. Le spectre d'absorption de l'intermédiaire, très semblable à celui de la plastocyanine native peut suggérer que les premières substitutions par l'imidazole concernent les deux histidines, His87 et His37, la deuxième étape impliquant les substitutions de Cys84 et de Met92.

Bien que la première phase réactionnelle de la séquestration du cuivre soit relativement rapide, les mesures cinétiques des réactions de transfert d'électron dans les tampons imidazoles décrites au chapitre 4 ne sont pas faussées. La vitesse du transfert d'électron est en effet beaucoup plus rapide que la séquestration du cuivre.

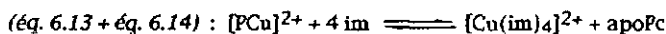
6.1.3 Stabilité thermodynamique de l'association de la plastocyanine et du cuivre(II).

A partir des deux constantes d'équilibre correspondantes aux deux étapes de la séquestration du cuivre(II) de la plastocyanine, il devient possible de calculer une constante conditionnelle (pH = 7.0) de la formation de complexe entre l'apoplastocyanine et le cuivre(II).





$$K_2 = \frac{[\text{Cu}(\text{im})_4]^{2+} [\text{apoPc}]}{[\text{PCu}(\text{im})_2]^{2+} [\text{im}]^2} \quad (\text{éq. 6.14})$$



$$K = K_1 \cdot K_2$$

$$\text{Des relations ci-dessus on peut en déduire : } \beta = \frac{K_{\text{im}}}{K_1 \cdot K_2} \quad (\text{éq. 6.15})$$

A l'aide des constantes déterminées expérimentalement et avec $K_{\text{im}} = 4 \cdot 10^{12}$ [91] on calcule:

$$\beta = 1.7 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}.$$

On constate que la stabilité du complexe de plastocyanine n'est pas très élevée. La plastocyanine devrait ainsi exister uniquement sous forme d'apoprotéine en présence d'un ligand comme $\text{H}_2\text{eda}^{2-}$ (constante apparente à pH = 7.0 : " β " = $4 \cdot 10^{15}$). Si la plastocyanine peut néanmoins conserver l'atome de cuivre en présence de ce ligand (utilisé pendant l'isolement de la plastocyanine des feuilles d'épinard) c'est donc pour des raisons cinétiques et non pour des raisons thermodynamiques.

Ce critère cinétique est également mis en évidence par les réactions de séquestration du cuivre par les ligands *alamp* et *promp*, décrits dans le paragraphe suivant.

6.2 Séquestration du cuivre de la plastocyanine par les ligands alamp et promp

L'influence du ligand imidazole sur le site de coordination du cuivre de la plastocyanine permet de supposer que nos ligands - qui ont une affinité bien plus grande pour le cuivre que l'imidazole ou que l'apoplastocyanine (Chapitre 7) - peuvent également intervenir comme agent compétiteur. Si tel est le cas, des mesures de séquestration par les ligands sont rendues nécessaires pour connaître l'influence de l'excès de ligand présent dans nos solutions de complexes de cobalt(II) utilisées pour les mesures cinétiques des réactions de transfert d'électron.

La présence d'un excès de 15éq en ligand par rapport à la protéine - correspondant à celui qui existe dans les solutions utilisées pour les mesures de transfert d'électron - ne provoque cependant aucune modification du spectre visible de la plastocyanine sur un temps de mesure comparatif à celui du temps de réduction (30 - 40min). La séquestration du cuivre par nos ligands devient significative seulement pour un excès de ligand beaucoup plus important. Par curiosité, nous avons effectué des mesures cinétiques à pH = 7.0 et à 25°C dans le but de déceler si la séquestration par les ligands présente également une stéréosélectivité. (Figures 6.2.1 et 6.2.2).

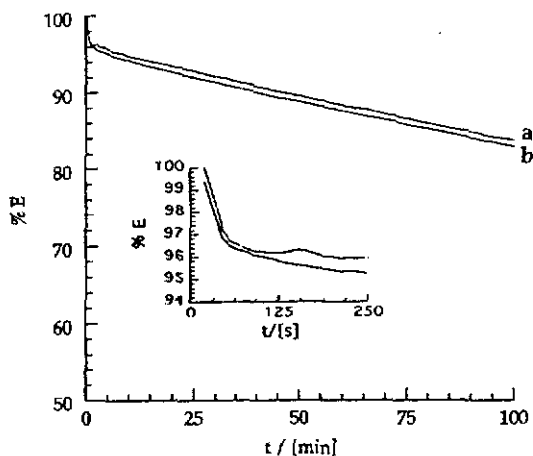


Figure 6.2.1 Séquestration du cuivre de la plastocyanine par le ligand alamp. (a) (S,S)-alamp 0.5M; (b) (R,R)-alamp 0.5M. pH = 7.0 (tampon phosphate 0.1M); T = 25°C; $[PCu]_0 = 0.1\text{mM}$

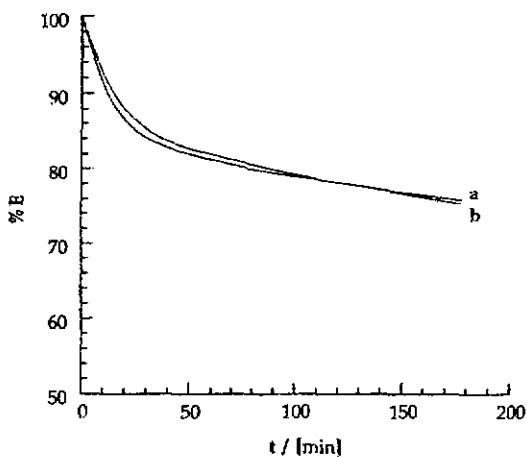


Figure 6.2.2 Séquestration du cuivre de la plastocyanine par le ligand promp. (S,S)-promp 0.5M (a); (R,R)-promp 0.5M (b). pH = 7.0 (tampon phosphate 0.1M); T = 25°C; $[PCu]_0 = 0.1\text{mM}$

La cinétique de la séquestration du cuivre par les ligands alamp et promp est également biphasique. La comparaison des traces cinétiques pour les deux énantiomères de chaque ligand montre un comportement semblable, et aucune stéréosélectivité n'est observée en tenant compte des limites d'erreur de mesure. Ce résultat n'est pas en contradiction avec les observations concernant le transfert d'électron, puisque le type de chiralité présenté par les ligands n'est pas comparable à la chiralité du complexe de cobalt(II). Si la séquestration du cuivre par l'imidazole conduit à un équilibre pour la majorité des concentrations en imidazole utilisées, les séquestrations par alamp et promp en grand excès sont beaucoup plus lentes mais se déroulent jusqu'à la séquestration totale du cuivre par le ligand.

La séquestration du cuivre par les ligands alamp et promp est beaucoup plus lente que la séquestration par l'imidazole cependant que l'affinité du cuivre pour ces ligands est nettement supérieure : $\log K_{\text{Cu(alamp)}} = 17.21 \pm 0.05$ et $\log K_{\text{Cu(promp)}} = 18.91 \pm 0.02$ (Chapitre 7), alors que $\log K_{\text{Cu(im)}_4} = 12.6$.

Ce fait permet de conclure que l'accès au cuivre qui se trouve à l'intérieur de la protéine est nettement plus difficile pour les ligands alamp et promp que pour une petite molécule telle que l'imidazole. Ces résultats montrent bien que pour des systèmes biologiques, les phénomènes cinétiques peuvent être dominants dans le contrôle de l'existence de certaines espèces thermodynamiquement instables. La mesure cinétique de séquestration du cuivre par l'imidazole est non seulement un moyen de comparer l'accessibilité du site actif pour différentes protéines de cuivre bleues, mais également pour déterminer l'influence d'une mutation sur l'accessibilité du site actif. Des comparaisons entre différentes plastocyanines génétiquement transformées ont été effectuées dans le but de répondre à cette question^[78]. Il est intéressant de noter qu'une mutation effectuée sur un résidu

passablement éloigné de l'environnement direct du cuivre, Glu68Gly, produit une plastocyanine mutante nettement plus sensible à l'imidazole^[78].

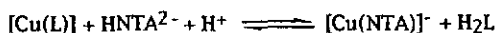
Ce résultat n'est pas sans conséquence pour les études de transfert d'électron. La variation de la vitesse de transfert d'électron consécutive à la mutation d'un résidu d'une métalloprotéine n'indique pas forcément que le résidu en question est directement lié au site actif. Son influence peut être indirecte, par exemple en modifiant l'accessibilité du réactif au site actif.

Il serait également intéressant d'effectuer ces mesures de séquestration par l'imidazole pour l'azurine, dont le site actif est plus encombré que la plastocyanine, notamment par la présence du résidu Phe115.

7. Détermination spectropolarimétrique des constantes de formation [Cu(promp)] et [Cu(alamp)] par compétition avec NTA

7.1 Généralités

Afin de décrire l'ensemble des conditions thermodynamiques régnant dans le système que nous avons étudié, il faut également connaître les équilibres de formation des complexes des ligands utilisés, alamp et promp, avec les deux ions métalliques qui se trouvent dans le système: le cobalt(II) et le cuivre(II). Alors que les équilibres de formation des complexes du cobalt(II) ont été déterminées par titration acidimétrique^[57], les constantes correspondantes avec le cuivre(II) sont inconnues. Etant donné qu'une titration préalable des systèmes $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{alamp}$ et $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{promp}$ indique déjà une formation de complexes presque quantitative dans un milieu fortement acide, la détermination des constantes d'équilibre par cette méthode devient imprécise, d'autant plus qu'il faut vraisemblablement tenir compte d'espèces protonées additionnelles, aussi bien des ligands que des complexes. Pour ces raisons, nous avons préféré choisir une méthode de compétition utilisant un ligand auxiliaire. En tant que tel, l'acide nitrilotriacétique (H_3NTA) présente une affinité adéquate vis-à-vis de l'ion Cu^{2+} afin de permettre l'étude de l'équilibre d'échange:



où $\text{H}_2\text{L} = \text{H}_2\text{alamp}$ et H_2promp .

Etant donné que les complexes de alamp et de promp sont optiquement actifs, la concentration relative de ces complexes peut être mesurée par dichroïsme

circulaire, indépendamment de la présence de $[\text{Cu}(\text{NTA})]^-$ qui est achiral, ainsi que H_2L qui ne présente pas de signal dans le domaine des longueurs d'onde du visible.

Un exemple de mesure est représenté pour chacun des deux ligands par la figure 7.1.1.

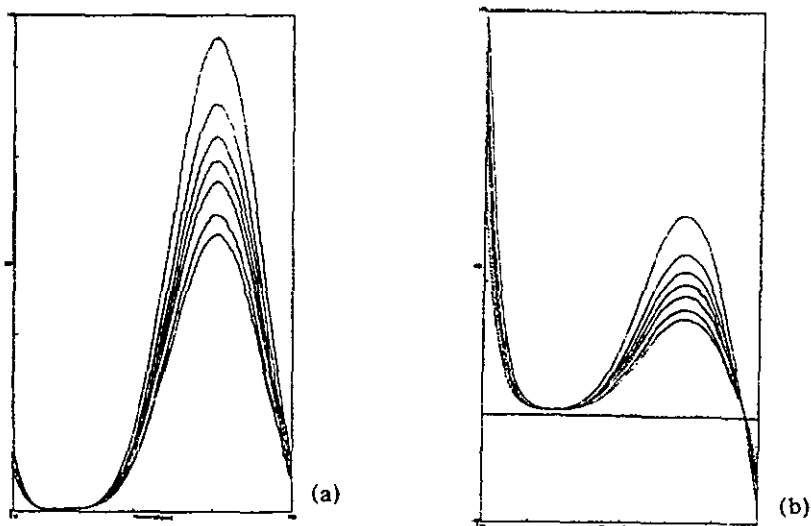
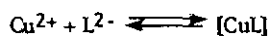


Figure 7.1.1 Variation des spectres CD de $[\text{Cu}((\text{S,S})\text{-L})]$ en fonction de la concentration de HNTA^{2-} pour $\text{L} = (\text{S,S})\text{-alamp}$ (a) et $(\text{S,S})\text{-promp}$ (b). Les concentrations sont celles indiquées dans le tableau 7.4.1 (a) et 7.4.3 (b) de haut en bas.

7.2 Développement mathématique

Equilibres considérés ($\text{L} = \text{alamp}$ ou promp):



$$K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{L}^{2-}]}$$

(*éq. 7.1*)



$$K_{\text{CuNTA}^{-}}^{\text{Cu}} = \frac{[\text{CuNTA}^{-}]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{NTA}^{3-}]} \quad (\text{éq. 7.2})$$



$$K_1 = \frac{[\text{H}^{+}][\text{L}^{2-}]}{[\text{HL}^{-}]} \quad (\text{éq. 7.3})$$



$$K_2 = \frac{[\text{HL}^{-}][\text{H}^{+}]}{[\text{H}_2\text{L}]} \quad (\text{éq. 7.4})$$



$$K_3 = \frac{[\text{H}^{+}][\text{NTA}^{3-}]}{[\text{HNTA}^{2-}]} \quad (\text{éq. 7.5})$$

Dans le domaine pH des mesures (tampon acétate, pH = 4.7), les ligands L et NTA sont essentiellement présents sous la forme H₂L et HNTA²⁻. Le cuivre est donc distribué sous forme de complexe avec L et avec NTA selon l'équation:

$$\frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}(\text{NTA})^{-}]} = \frac{K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [\text{H}_2\text{L}]}{K_{\text{CuNTA}^{-}}^{\text{Cu}} \cdot K_3 \cdot [\text{HNTA}^{2-}][\text{H}^{+}]} = K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \cdot K' \cdot \frac{[\text{H}_2\text{L}]}{[\text{HNTA}^{2-}][\text{H}^{+}]} \quad (\text{éq. 7.6})$$

$$\text{avec } K' = \frac{K_1 \cdot K_2}{K_{\text{CuNTA}^{-}}^{\text{Cu}} \cdot K_3}$$

Deux cas sont à distinguer:

a) Si $[\text{Cu}^{2+}]_0 \ll [\text{L}]_0$ et $[\text{NTA}]_0$ alors $[\text{H}_2\text{L}] = [\text{L}]_0$ et $[\text{HNTA}] = [\text{NTA}]_0$

$$\frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}(\text{NTA})^{-}]} = K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \cdot K' \cdot \frac{[\text{L}]_0}{[\text{NTA}]_0[\text{H}^{+}]} \quad (\text{éq. 7.7})$$

comme $[\text{CuNTA}^-] = [\text{Cu}^{2+}]_0 - [\text{CuL}]$, ($[\text{Cu}^{2+}] \ll [\text{Cu}^{2+}]_0$)

$$K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} = \frac{[\text{CuL}][\text{NTA}]_0[\text{H}^+]}{K'[\text{L}]_0([\text{Cu}^{2+}]_0 - [\text{CuL}])} \quad (\text{éq. 7.8})$$

b) pour $[\text{Cu}^{2+}]_0 = [\text{L}]_0 = [\text{NTA}]_0$

$$\frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}^{2+}]_0 - [\text{CuL}]} = K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \cdot K' \cdot \frac{[\text{H}_2\text{L}]}{[\text{HNTA}^{2-}][\text{H}^+]} = \frac{K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \cdot K'([\text{L}]_0 - [\text{CuL}])}{([\text{NTA}]_0 - [\text{Cu}^{2+}] + [\text{CuL}])[\text{H}^+]} \quad (\text{éq. 7.9})$$

en isolant $K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}}$:

$$K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} = \frac{[\text{CuL}][\text{H}^+]([\text{NTA}]_0 - [\text{Cu}^{2+}]_0 + [\text{CuL}])}{K' \cdot \{ [\text{L}]_0 [\text{Cu}^{2+}]_0 - [\text{CuL}]([\text{L}]_0 + [\text{Cu}^{2+}]_0 - [\text{CuL}]) \}} \quad (\text{éq. 7.10})$$

Etant donné que seule l'espèce $[\text{CuL}]$ possède un signal CD dans le visible, l'intensité de ce signal est directement proportionnel à la concentration de $[\text{CuL}]$. Il est à ce moment possible de déterminer $K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}}$ selon l'équation ci-dessus.

7.3 Mode opératoire

Des volumes variables d'une solution standard de NTA préparée dans un tampon acétate 0.1M sont ajoutés à une solution de concentration précisément connue en Cu^{2+} et en ligand alamp ou promp préparée dans le tampon acétate 0.1M. Le volume choisi est complété par le tampon acétate et le spectre CD de la solution est enregistré à $T = 25^\circ\text{C}$. Dans ces conditions expérimentales, une cuve de 5cm a été utilisée. L'analyse spectrale est effectuée à 600nm pour $[\text{Cu}(\text{S,S})\text{-alamp}]$ et 564nm pour $[\text{Cu}(\text{S,S})\text{-promp}]$.

7.4 Résultats

Les résultats sont réunis sous forme de tableaux.

Tableau 7.4.1 Détermination de la constante de formation du complexe $[\text{Cu}(\text{alamp})]$; $[\text{L}]_0 = 1.2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{Cu}^{2+}]_0 = 2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $I = 0.1 \text{M}$

$[\text{NTA}]_0 / [\text{M}]$	pH	$\% [\text{CuL}]^*$	logK
0	4.68	100	.
$1.257 \cdot 10^{-3}$	4.68	97.56	17.17
$2.513 \cdot 10^{-3}$	4.67	94.42	17.37
$3.770 \cdot 10^{-3}$	4.64	89.90	17.30
$5.027 \cdot 10^{-3}$	4.64	84.67	17.22
$7.540 \cdot 10^{-3}$	4.63	78.40	17.21
$10.053 \cdot 10^{-3}$	4.65	71.78	17.16

Tableau 7.4.2 Détermination de la constante de formation du complexe $[\text{Cu}(\text{alamp})]$; $[\text{L}]_0 = 1.2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{Cu}^{2+}]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $I = 0.1 \text{M}$

$[\text{NTA}]_0 / [\text{M}]$	pH	$\% [\text{CuL}]^*$	logK
0	4.67	100	..
$1.257 \cdot 10^{-3}$	4.66	85.93	17.15
$2.513 \cdot 10^{-3}$	4.65	79.22	17.18
$3.770 \cdot 10^{-3}$	4.64	74.03	17.18
$5.027 \cdot 10^{-3}$	4.65	69.91	17.19
$7.540 \cdot 10^{-3}$	4.65	62.71	17.17
$10.053 \cdot 10^{-3}$	4.65	58.87	17.20

Tableau 7.4.3 Détermination de la constante de formation du complexe $[\text{Cu}(\text{promp})]$; $[\text{L}]_0 = 1.2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{Cu}^{2+}]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $I = 0.1 \text{M}$

$[\text{NTA}]_0 / [\text{M}]$	pH	% $[\text{CuL}]^*$	logK
0	4.76	100	-
$1.257 \cdot 10^{-3}$	4.75	87.21	18.89
$2.513 \cdot 10^{-3}$	4.75	79.07	18.91
$3.770 \cdot 10^{-3}$	4.75	73.26	18.94
$5.027 \cdot 10^{-3}$	4.74	67.44	18.93
$7.540 \cdot 10^{-3}$	4.74	57.56	18.90
$10.053 \cdot 10^{-3}$	4.73	52.33	18.92

Tableau 7.4.4 Détermination de la constante de formation du complexe $[\text{Cu}(\text{promp})]$; $[\text{L}]_0 = 1.2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{Cu}^{2+}]_0 = 0.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $I = 0.1 \text{M}$

$[\text{NTA}]_0 / [\text{M}]$	pH	% $[\text{CuL}]^*$	logK
0	4.72	100	-
$1.257 \cdot 10^{-3}$	4.72	81.03	18.90
$2.513 \cdot 10^{-3}$	4.72	72.31	18.92
$3.770 \cdot 10^{-3}$	4.70	65.64	18.91
$5.027 \cdot 10^{-3}$	4.72	60.51	18.91
$7.540 \cdot 10^{-3}$	4.72	53.33	18.91
$10.053 \cdot 10^{-3}$	4.70	48.21	18.92

Les moyennes considérées sont les suivantes:

$$\log K_{\text{Cu(alamp)}} = 17.21 \pm 0.05$$

$$\log K_{\text{Cu(promp)}} = 18.91 \pm 0.02$$

Tableau 7.4.5 Constantes d'équilibres utilisées

alamp ^[57] / promp ^[57]		NTA ^[91]	
$\text{H}_2\text{L} = \text{H}^+ + \text{HL}^-$	pK = 8.24 / 9.33	$\text{H}_2\text{L}^- = \text{H}^+ + \text{HL}^{2-}$	pK = 2.48
$\text{HL}^- = \text{H}^+ + \text{L}^{2-}$	pK = 9.06 / 10.02	$\text{HL}^{2-} = \text{H}^+ + \text{L}^{3-}$	pK = 9.65
		[Cu(NTA)]	$\log K_{\text{CuNTA}^-}^{\text{Cu}} = 12.4^*$

* valeur déterminée à force ionique 0.1M et à T = 25.0°C.

8. Conclusions

Pour la plastocyanine, comme pour la ferrédoxine ou le cytochrome c, le transfert d'électron entre la métalloprotéine et les complexes de promp et d'alamp à base de fer ou de cobalt est stéréosélectif.

Ce travail a démontré que la stéréosélectivité d'une réaction de transfert d'électron impliquant une métalloprotéine peut être le résultat d'interactions diastéréoisomères entre la protéine et le complexe réactif au même site réactionnel ou le résultat de l'existence de plusieurs sites de transfert d'électron. En fonction de la configuration absolue du complexe réducteur, ces sites peuvent être plus ou moins réactifs.

Dans le cas de la réduction de la plastocyanine par l'aquacomplexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$, les grandes différences entre les paramètres d'activation des deux énantiomères résultent de la participation simultanée de deux sites de transfert d'électron. Le premier site est lié à un mécanisme de type sphère interne, dont His87 joue le rôle de ligand pontant. Le second site localisé sans doute également dans la poche hydrophobe de la plastocyanine est lié vraisemblablement à un mécanisme de type sphère externe mais les résidus impliqués n'ont pas été identifiés.

Le calcul différencié des paramètres d'activation liés aux mécanismes de la réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ rend compte pour le mécanisme de type sphère externe, de valeurs comparables avec celles déterminées pour la réduction de la protéine par l'aquacomplexe de promp. Ce qui nous amène à nous poser la question suivante: le site de réaction lié au mécanisme de type sphère externe est-il le même pour les deux aquacomplexes ? Cette question

reste ouverte et l'étude de la réactivité de plastocyanines mutantes^[78] tente d'y apporter une réponse.

La réduction de la plastocyanine par $[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ ne montre par contre aucune réactivité par coordination à His87 et la stéréosélectivité observée lors de l'utilisation de ce complexe est faible et identique sur tout le domaine de température étudié. Les valeurs des paramètres d'activation pour les deux énantiomères du complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ sont ainsi nettement plus similaires que pour $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ et rendent compte d'une stéréosélectivité liée uniquement à des différences du couplage orbitalaire des réactifs à l'état de transition. Dans cette situation où le site du transfert d'électron est identique pour les deux énantiomères, la stéréosélectivité peut être discutée en termes de compensation incomplète entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation, rejoignant ainsi les discussions liées à la réduction de la plastocyanine par les complexes du fer(II)^[57], la réduction de la ferrédoxine par les complexes du cobalt(III)^[9a] et la réduction du cytochrome c par les complexes du fer(II)^[9b].

D'une manière globale, ces résultats démontrent l'importance de l'utilisation des composés optiquement actifs dans l'étude du transfert d'électron et en particulier les composés optiquement actifs labiles ou inertes selon leur état d'oxydation. Ceux-ci rendent possible l'utilisation du dichroïsme circulaire dans l'identification des sites de transfert d'électron. Cette technique analytique très sensible et très simple d'utilisation sera sans aucun doute d'une grande utilité pour la suite des études des mécanismes de transfert d'électron impliquant une métalloprotéine.

Il serait cependant très utile d'équiper toutes nos installations spectrophotométriques d'un dispositif informatique permettant une analyse en multilongueur d'onde. L'analyse en multilongueur d'onde permet l'identification d'intermédiaires réactionnels de manière plus fiable et par conséquent une analyse mécanistique

globale plus fine. Ce genre d'analyse permettrait d'en savoir plus en ce qui concerne le mécanisme de séquestration du cuivre de la plastocyanine.

Comme le montrent les résultats des transferts d'électron effectués dans les tampons imidazoles, la nature du milieu réactionnel a également une grande importance. Un troisième type de mécanisme est à considérer pour la réduction de la plastocyanine dans les tampons imidazoles. Le rôle catalytique joué par ces ligands monodentés provient de leur coordination à la sixième position de coordination des complexes réducteurs, substituant la molécule d'eau et favorisant le transfert d'électron via cette position de coordination du complexe mixte. Un mécanisme par intercalation de l'imidazole de l'espèce mixte et de His87 est proposé, rendant compte non seulement des résultats des mesures de transfert d'électron, mais également des observations liées à la substitution du cuivre de la plastocyanine par l'imidazole.

L'étude cinétique de l'équilibre de répartition du cuivre entre la plastocyanine et l'imidazole a permis de dégager un mécanisme de séquestration en deux étapes dont la première est liée à la formation d'un intermédiaire où les deux ligands du cuivre His87 et His37 de la plastocyanine sont remplacés par deux molécules d'imidazole. L'équilibre de répartition du cuivre entre la plastocyanine et l'imidazole montre finalement que l'association cuivre-plastocyanine n'est pas si forte qu'on pourrait le penser et que l'influence des paramètres cinétiques liés à l'accessibilité du site actif est déterminante pour le maintien du cuivre dans la protéine.

9. Bibliographie

- [1] S.J. Lippard, J.M. Berg, Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, California, 1994
- [2] I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine, Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, California, 1994
- [3] (a) P. Harrison, Metalloproteins, Metal proteins with Redox Roles, Verlag chemie, 1985
- (b) Inorganic Compounds with Unusual Properties III. Electron Transfer in Biology and the Solid State, M.K. Johnson, R.B. King, D.M. Kurtz, C. Kotal, M.L. Norton, A. Scott, Eds., Advances in Chemistry 226, American Chemical Society, Washington DC, 1990
- (c) D.N. Seratan, J.N. Onuchic, H.B. Gray, Electron Transfer Reactions in Metalloproteins, *Met. Ions Biol. Syst.*, 27,97,1991
- (d) A.G. Lippin, Redox Mechanism in Inorganic Chemistry, E. Horwood, London, 1994
- (e) A.G. Lippin, Properties of Copper "Blue" Proteins, *Met. Ions Biol. Syst.*, 13, 16,1981
- [4] P.M. Handford, H.A.O. Hill, W.K. Lee, R.A. Henderson, A.G. Sykes, J. Inorg. Biochem., 13,83,1980
- [5] D.J. Cookson, M.T. Hayes, P.E. Wright, Biochim. Biophys. Acta 591,162,1980
- [6] D. Beoku-Betts, S.K. Chapman, C.V. Knox, A.G. Sykes, J. Chem. Soc.. Chem. Commun. 1150,1983
- [7] (a) W. Haehnel, T. Jansen, K. Gause, R.B. Klösgen, B. Stahl, D. Michl, B. Hubermann, M. Karas, R.G. Herrmann, *EMBO J.* 13,1028,1994
- (b) S. He, S. Modi, D.S. Bendall, J.C. Gray, *EMBO J.* 10,4011,1991
- (c) S. Modi, M. Nordling, L.G. Lundberg, O. Hansson, D.S. Bendall, *Biochem. Biophys. Acta* 1102, 85, 1992

- (d) M. Nordling, K. Sigfridson, S. Young, L.G. Lundberg, O. Hansson, *FEBS Lett.* **291**,327,1991
- (e) P. Kyritsis, L.G. Lundberg, M. Nordling, T. Vanngard, M. Young, N.P. Tomkinson, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1441**, 1991
- [8] K. Bernauer, J.-J. Sauvain, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **353**, 1988
- [9] (a) K. Bernauer, M. Monziona, P. Schürmann, V. Viette, *Helv. Chim. Acta* , **73**,346,1990
- (b) P. Jauslin, *thèse de doctorat, Université de Neuchâtel*, 1994
- [10] (a) S. Sakaki, Y. Nishijima, H. Koga, K. Ohkubo, *Inorg. Chem.* **28**,4061,1989
- (b) R.A. Marusak, T.P. Shields, A.G. Lappin, *Ref 3b*, p.237
- (c) H. E. Toma, R.A. Murakami, *Inorg. Chim. Acta* , **L33**, 1984
- (d) J. T. Ficke, J. R. Pladziewicz, E.C. Sheu, A.G. Lappin, *Inorg. Chem.* **30**,4282, 1991
- (e) S. Sakaki, Y. Nishijima, H. Koga, K. Ohkubo, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1143**,1991
- [11] H. Taube, *Agew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**,329-334,1984
- [12] R.D. Cannon, *Electron-Transfer Reactions*, Butterworths, 1980
- [13] (a) R.A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, **24**,966,1956
- (b) R.A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, **43**,679,1965
- (c) R.A. Marcus, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **15**,15S,1964
- (d) R.A. Marcus, *Electrochim. Acta.*, **13**,9S,1968
- (e) R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta.*, **811**,26S,198S
- [14] (a) S. Wherland, H.B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**,2950,1976

- (b) S. Wherland, H.B. Gray, *Biological Aspects of Inorganic Chemistry*, Wiley, New-York, 289, 1977
- [15] V.G. Levich, *Adv. Electrochem. Electrochem. Eng.* 4,249,1966
- [16] R.R. Dogonadze, A.M. Kuznetsov, M.A. Vorotyntsev, *Phys. Stat. Sol. B* 54, 12S, 1972
- [17] N.R. Kestner, J. Logan, J. Jortner, *J. Phys. Chem.* 78,2148,1974
- [18] J.J. Hopfield, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71,3640,1974
- (b) J. Jortner, *J. Chem. Phys.*, 64,4860,1976
- (c) J.C.W. Chien, *J. Phys. Chem.*, 82,2171,1978
- [19] (a) A.G. Mauk, R.A. Scott, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* 102,4360-4363,1980
- (b) S. Wherland, I. Pecht, *Biochemistry*, 17,2585-2591,1978
- [20] (a) B.S. Brunshwig, N. Sutin, *Comments Inorg.Chem.* 6,209-235,1987
- (b) N. Sutin dans *Inorganic Reactions and Methods*, J.J. Zuckermann, ed. VCH Publishers, XV, 23-24, 1986
- (d) J.R. Winkler, H.B. Gray, *Chem. Rev.* 92,369-379,1992
- [21] (a) C.C. Moser, J.M. Keske, K. Warncke, R.S. Farid, P.L. Dutton, *Nature (London)*, 355,796,1992
- (b) C.C. Moser, P.L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta.*, 171,1101,1992
- [22] (a) D.N. Beratan, J.N. Onuchic, *Photosynthesis Res.*, 22,173,1989
- (b) D.N. Beratan, J.N. Onuchic, J.N. Betts, B.E. Bowler, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, 112,7915,1990
- (c) D.N. Beratan, J.N. Betts, J.N. Onuchic, *Science*, 252,1285,1991
- [23] (a) A.L. Raphael, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, 113,1038,1991
- (b) A.L. Raphael, H.B. Gray, *Proteins*, 6,33B,1989

- [24] (a) A.J. Di Bilio, T.K. Chang, B.G. Malmström, H.B. Gray, B.G. Karlsson, M. Nordling, T. Pascher, L.G. Lundberg, *Inorg. Chim. Acta.*, **198**,145,1992
- (b) T. Pascher, B.G. Karlsson, M. Nordling, B.G. Malmström, T. Vänngård, *Eur. J. Biochem.*, **212**,289,1993
- (c) C.W.G. Hoiting, G.W. Canters, *J. Biol. Chem.*, **267**,13836,1992
- (d) A. Romero, C.W.G. Hoiting, H. Nar, R. Huber, A.Messerschmidt, G.W. Canters, *J. Mol. Biol.*, **229**,1007,1993
- (e) A.G. Sykes, P. Kyritsis, M. Nordling, *Electron Transfer in Blue Copper Protein Mutants, dans Bioinorganic Chemistry of Copper*, **78**, Chapman & Hall, New York, 1993
- [25] (a) M.P. Jackman, J. McGinnis, R. Pows, G.A. Salmon, A.G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**,5880,1988
- (b) N.M. Kostic, R. Magalit, C.-M. Che, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**,7765, 1983
- (c) R. Magalit, N.M. Kostic, C.-M. Che, D.F. Blair, H.-J. Chang, I. Pecht, J.B. Shelton, J.R. Shelton, W.A. Schroeder, H.B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**,6554,1984
- [26] H. Taube, H. Myers, R.R. Rich, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**,4118-4119,1953
- [27] (a) C.J. Grimes, D. Piskiewicz, E.B. Fleisher, *Proc. Nat. Acad. Sci.*,**75**,1408-1412, 1974
- (b) O. Farver, I. Pecht, *Coordination Chemistry Reviews*, **94**,17-45,1989
- (c) O. Farver, I. Pecht, *Proc. Nat. Acad. Sci.***78**,4190-4193,1981
- (d) O. Farver, I. Pecht, *Israel J. Chem.*, **21**,13-17,1981
- (e) L.K. Skov, K. Olsen, U. Christensen. *Inorg. Chem.*, **31**,4762-4765,1993
- [28] D.A. Geselowitz, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**,4525,1980
- [29] P. Osvalth, A.G. Lappin, *Inorg. Chem.*, **26**,195,1987

- [30] E. Cheung, K. Taylor, J.A. Kornblatt, A.M. English, G. McLendon, J.R. Miller, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83,1330,1986
- [31] J.C. Bailar, H. Itatani, M.J.S. Crespi, J.F. Galdard, Adv. Chem., 62,103,1967
- [32] R.D. Gillard, C. Thorpe, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 997, 1970
- [33] R.D. Gillard, J.R. Lyons, C. Thorpe, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1584, 1972
- [34] C. Thorpe, R.D. Gillard, Biochim. Biophys. Acta. 392,175,1975
- [35] L.S. Dollimore, R.D. Gillard, I.H. Mather, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 518, 1974
- [36] F.A. Armstrong, A.G. Sykes, J. Am. Chem. Soc., 100,7710,1978
- [37] J.R. Pladziewicz, M.A. Accola, P. Osvath, A.M. Sargeson, Inorg. Chem., 32, 2525,1993
- [38] J.R. Pladziewicz, S.O. Gullerud, M.A. Accola, Inorganica Chimica Acta, 225, 151,1994
- [39] S. Katoh, I. Shiratori, S. Takamiya, Biochemistry, 51,32,1962
- [40] O.M. Colman, H.C. Freeman, J.M. Guss, M. Murata, V.A. Norris, J.A. Ramshaw, M.P. Venkatappa, Nature, 272,319,1978
- [41] J.M. Guss, H.D. Bartunik, H.C. Freeman, Acta Crystallogr., B48, 790, 1992
- [42] T.P.J. Garrett, D.J. Clingeleffer, J.M. Guss, S.J. Rogers, H.C. Freeman. J.Biol.Chem, 259,2822,1984
- [43] W.B. Church, J.M. Guss, J.J. Potter, H.C. Freeman, J. Biol. Chem, 261,234,1986
- [44] J.M. Guss, P.R. Harrowell, M. Murata, V.A. Norris, H.C. Freeman, J. Mol. Biol., 192,361,1986
- [45] (a) J.M. Moore, O.A. Case, W.J. Chazin, G.P. Gippert, T.F. Havel, R. Powlis, P.E. Wright, Science, 240,314,1990
- (b) R.A. Scott, J.E. Hahn, S. Doniach, H.C. Freeman, K.O. Hodgson, J. Am. Chem. Soc. 104,5364,1982

- (c) M.G. Segal, A.G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, *100*,4585,1978
- (d) P.C. Driscoll, H.A.O. Hill, C. Redfill, *Eur. J. Biochem.*, *170*,279,1987
- [46] A.G. Sykes, *Chem. Soc. Rev.*, *14*,283,1985
- [47] M.G. Segal, A.G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, *100*,4585,1978
- [48] M.P. Jackman, J. McGinnis, A.G. Sykes, C.A. Collyer, M. Murata, H.C. Freeman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2573, 1987
- [49] J.D. Sinclair-Day, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2069,1980
- [50] J. McGinnis, J.D. Sinclair, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2007, 1986
- [51] R.A. Holwerda, D.B. Knaff, H.8. Gray, J.D. Clemmer, R. Crowley, J.M. Smith, A.G. Mauk, *J. Am. Chem. Soc.*, *102*,1142,1980
- [52] J. McGinnis, J.D. Sinclair-Day, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc.: Dalton Trans.* 2011, 1986
- [53] (a) S.K. Chapman, A.D. Watson, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2543, 1983
- (b) S.K. Chapman, C.V. Knox, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2275, 1984
- (c) J. McGinnis, J.D. Sinclair-Day, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2007, 1986
- [54] (a) D.J. Cookson, M.T. Hayes, P.E. Wright, *Biochim. Biophys. Acta.* *591*,162, 1980
- (b) P.M. Handford, H.A. Hill, W.K. Lee, R.A. Henderson, A.G. Sykes, *J. Inorg. Biochem.*, *13*,83,1980
- [55] D. Beoku-Betts, S.K. Chapman, C.V. Knox, A.G. Sykes, *Inorg. Chem.*, *24*,1677, 1985
- [56] K. Bernauer, H. Stoeckli-Evans, D. Hugi-Cleary, H.J. Hilgers, H. Abd-el-Khalek, J. Porret, J.J. Sauvain; *Helv. Chim. Acta.* *75*,2327,1992

- [57] J.-J. Sauvain, thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, 1990
- [58] R.W. Parry, *Inorganic Synthesis*, 12, 212, McGraw-Hill Company, New-York, 1970
- [59] W.C. Fernelius, *Inorganic Synthesis*, 2, 217, McGraw-Hill company, New-York, 1946
- [60] A. Thiam, thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, 1996
- [61] H.-J. Hilgers, thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, 1995
- [62] P. Schürmann, K. Maeda, A. Tsugita, *Eur. J. Biochem.*, 116, 37, 1981
- [63] H. Eyring, *J. Phys. Chem.*, 3, 107, 1935
- [64] H. Eyring, *Chemical Reviews*, 17, 65, 1935
- [65] S. Maegert, travail de diplôme, Université de Neuchâtel, 1990
- [66] E. L. Gross, J. E. Draheim, A.S. Curtiss, B. Cromble, A. Scheffer, B. Pan, C. Chiang, A. Lopez, *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 413, 1992.
- [67] R. Lumry, S. Rajender. *Biopolymers*, 9, 1125, 1970.
- [68] F.A. Armstrong, R.A. Henderson, A.G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 6912, 1979.
- [69] J.V. McArdle, C.L. Coyle, H.B. Gray, G.S. Yoneda, R.A. Holwerda, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 2484, 1977.
- [70] K. Bernauer, E. Fuchs, D. Hugli-Cleary, *Inorg. Chim. Acta*, 73, 218, 1994.
- [71] A.G. Sykes, *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Vol. 1, p.391, Academic Press, London, 1982.
- [72] H.C. Stynes, J.A. Ibers, *Inorg. Chem.*, 10, 2304, 1971
- [73] A. Neves, W. Herrmann, K. Wieghart, *Inorg. Chem.*, 22, 3435, 1984
- [74] H. Bertram, K. Wieghart, *Inorg. Chem.*, 18, 1799, 1979

- [75] H. Taube, H. Myers, R.R. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**,4118,1953
- [76] H.A. Azab, L. Banchi, M. Bosari, C. Luchinat, M. Sola, M.S. Viezzoli, *Inorg. Chem.*, **31**,4649,1992
- [77] J. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Béguin, A. El Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**,1965,1995
- [78] C. Nusbaumer, thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, 1996
- [79] (d) A.G. Lappin, M.G. Segal, D.C. Weatherburn, A.G. Sykes, *J. Am. chem. Soc.*, **101**,2297,1979
- [80] P. Bugnon, thèse de doctorat, Université de Lausanne, 1996
- [81] J.P. Candlin, J. Halpern, *Inorg. Chem.*, **4**,1086,1965
- [82] K. Heremans, M. Bormans, J. Snauwaert, H. Vandersypen, *Faraday Disc. Chem. Soc.*, **74**,343,1982
- [83] D.R. Stranks, *Pure Appl. Chem.*, **38**,303,1974
- [84] T.W. Swaddle, *Inorg. Chem.*, **29**,S017,1990
- [85] S. Wherland, *Inorg. Chem.*, **22**,2349,1983
- [86] (a) G.W. Evans, *Physiol. Rev.* **53**,535,1973
(b) M.I. Harris, J.E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **243**,5063-5070,1968
(c) H. Bohner, H. Böhme, P. Böger, *FEBS Lett.* **131**,386-388,1981
(d) J.K. Rayton, E.D. Harris, *J. Biol. Chem.* **254**,621,1984
- [87] J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P. Williams, *Struct. Bonding*, **29**,67,1976
- [88] D.L. Tennent, D.R. McMillin, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**,2307,1979
- [89] (a) R.H.L. Marks, R.D. Miller, *Arch. biochem. Biophys.*, **195**,103,1979
(b) T. Yamanaka, S. Kijimoto, K. Okunuki, *J. Biochem.*, **53**,2S6,1963

- (c) J.A. Błaszak, D.R. McMillin, A.T. Thornton, D.L. Tennent, J. Biol. Chem. 258,9886,1983
- [90] L. Morpugo, G. Rotilio, A. Finazzi-Agro. B. Mondovi, Arch. Biochem. Biophys. 161,291-296,1974
- [91] R.M. Smith, A.E.Martel. Critical stability constants, 2, 144, Plenum Press, New York, 1975