

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

RETRORACEMISATION D'ACIDES AMINES
DANS DES COMPLEXES MIXTES DU CUIVRE(II) AVEC
DES BASES DE SCHIFF CONTENANT UN LIGAND
OPTIQUEMENT ACTIF

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES PAR

CHANTAL SOERENSEN

INGENIEUR CHIMISTE DIPLOMEE

DE L'UNIVERSITE DE NEUCHATEL

POUR L'OBTENTION DU GRADE

DE DOCTEUR ES SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE

DE L'UNIVERSITE DE

NEUCHATEL

AVRIL 1985

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

*Rétroacémisation d'acides aminés dans des
complexes mixtes du cuivre(II) avec des
bases de Schiff contenant un ligand
optiquement actif*

de Madame Chantal Soerensen-Jequier

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. les professeurs K. Bernauer,

A. Jacot-Guillarmod et A. Zuberbühler (Bâle)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 novembre 1985

Le doyen:



François Sigrist

A mes parents,

A Papoï, Titube et Blatzek

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de Chimie Inorganique de l'Université de Neuchâtel, sous la direction du Professeur K. Bernauer.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse pour la confiance qu'il m'a accordée en tant qu'assistante pour le soutien, la patience et les conseils qu'il m'a donnés tout au long de ce travail.

Je remercie MM. les Professeurs A. Jacot-Guillarmod et A. Zuberbühler d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. S. Claude pour la réalisation des spectres IR et RMN et au Dr. G. Vuille pour la transcription et l'élaboration de programmes de calcul et de dessins par ordinateur.

Je dis un grand merci à tous mes collègues du département inorganique pour leur gentillesse, leur compréhension et leur bonne humeur, à Tania Hadorn pour son excellent travail et sa grande disponibilité, à mes collègues de JPS chimie pour leurs précieux conseils, à ma famille pour son soutien constant, ainsi qu'à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration de ce travail.

Enfin, je remercie le "Stipendienfonds der Basler chemischen Industrie zur Unterstützung von Doktoranden auf dem Gebiete der Chemie" de l'octroi d'une bourse d'étude.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1	INTRODUCTION	
1.1	Introduction générale	1
1.2	Les composés de la vitamine B6	5
1.2.1	Généralités	5
1.2.2	Aperçu historique.	7
1.3	Les réactions considérées dans ce travail.	9
1.3.1	La racémisation	9
1.3.2	La désamination oxydative.	12
1.4	Présentation du travail	13
1.4.1	La rétroracémisation.	13
1.4.2	But du travail	17
1.4.3	Le choix des ligands.	18
CHAPITRE 2	DESCRIPTION DES SYSTEMES CUIVRE(II)-LIGAND- ACIDE AMINE ET CUIVRE(II)-LIGAND-BASE DE SCHIFF.	
2.1	Introduction.	22
2.2	Etude potentiométrique.	25
2.3	Répartition des espèces en fonction du pH.	28
2.4	Détermination de la constante de formation du complexe cuivre-ligand-base de Schiff	28
2.5	Distribution des espèces en fonction du pH.	33
2.6	Discussion des résultats.	35
CHAPITRE 3	DESAMINATION OXYDATIVE DANS LES COMPLEXES DE CUIVRE-LIGAND-BASE DE SCHIFF.	
3.1	Introduction.	38
3.2	Désamination oxydative de la phénylalanine.	41
3.3	Désamination oxydative de l'alanine.	45
3.4	Désamination oxydative catalytique de l'alanine en présence de pyridoxal.	48
3.5	Remarques:	49
CHAPITRE 4	ETUDE DE LA RACEMISATION DES COMPLEXES MIXTES CUIVRE-LIGAND-BASE DE SCHIFF.	
4.1	Introduction.	51

4.2	Résultats.	55
4.2.1	Salicyaldéhyde-phénylalanine.	55
4.2.1.a	Cinétique de rétro-racémisation.	55
4.2.1.b	Variation de la concentration en ligand.	60
4.2.1.c	Variation de la température.	61
4.2.1.d	Variation de la concentration totale Co.	62
4.2.1.e	Variation du rapport des solvants.	63
4.2.1.f	Mesures à basse température.	63
4.2.1.g	Variation du ligand.	64
4.2.2	Pyridoxal-acide aminé.	64
4.2.2.a	Phénylalanine-BPABP.	65
4.2.2.b	Valine-BPABP.	66
4.2.2.c	Phénylalanine-BABP.	71
4.3	Discussion des résultats.	72

CHAPITRE 5 ETUDE DE LA REACTIVITE DU SYSTEME CUIVRE(II)/
LIGAND/ALDEHYDE SALICYLIQUE/ACIDE AMINE
PAR MESURE DU DICHROISME CIRCULAIRE:
FORMATION DES COMPLEXES MIXTES DE BASE DE SCHIFF,
RACEMISATION.

5.1	Introduction	78
5.2	Le système Cuivre(II)/ligand/salicyaldéhyde/glycine.	80
5.3	Les systèmes cuivre(II)/ligand/salicyaldéhyde/phénylalanine/.	85

CHAPITRE 7 PARTIE EXPERIMENTALE

7.1	Synthèses:	103
7.1.1	2-[(3S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine (PIPEA)	103
7.1.2	2,6-bis[(3S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine (BPABP)	103
7.1.3	Synthèse de 2,6-bis[3-aza-2-butyl]pyridine (BABP).	104
7.1.3.a	Principe de la synthèse.	104
7.1.3.b	Schéma de synthèse.	104
7.1.3.c	Mode opératoire.	105
7.1.4	Dédoublement de 2,6-bis[(3-aza-2-butyl)]pyridine (BABP).	107
7.1.4.a	Mode opératoire.	107
7.1.4.b	Rotation.	107
7.2	Titrations potentiométriques.	108
7.2.1	Titrage des ligands.	109
7.2.2	Titrage des complexes cuivre-ligands (CuL).	109
7.2.3	Titrage des complexes cuivre-ligand-acide aminés (CuLaa).	109
7.3	Désamination oxydative.	110
7.3.1	Désamination oxydative dans des conditions. stoéchiométrique.	110
7.3.1.a	Exemple choisi:	110
7.3.1.b	Mode opératoire.	110
7.3.2	Désamination oxydative dans le système contenant un excès d'acide aminé.	111
7.3.2.a	exemple choisi.	111

7.3.2.b	Mode opératoire.	111
7.4	Rétro racémisation.	112
7.4.1	Rétro racémisation de la phénylalanine en présence du salicylaldéhyde.	112
7.4.1.a	Exemple choisi:	112
7.4.2	Racémisation et rétro racémisation de la phénylalanine en présence de pyridoxal	114
7.4.2.a	Exemple choisi.	114
7.4.2.b	Mode opératoire.	114
7.4.3	Retro racémisation de la phénylalanine dans le méthanol à basse température.	115
7.4.3.a	Exemple choisi.	115
7.4.3.b	Mode opératoire	115
7.5	Analyse par chromatographie en phase gazeuse. (à l'aide d'une phase optiquement active de type: Supelco Sp-300 10% Supelcoport 100-120 mesh).	116
7.5.1	Préparation du dérivé N-acétylé-0-estérifié.	125
7.5.2	Conditions pour l'analyse.	116
7.6	Etude de la formation et de la racémisation de CuLBS par CD.	117
7.6.1	Exemple choisi.	117
7.6.2	Préparation des solutions.	117
7.6.3	Mode opératoire.	118
7.7	Produits utilisés.	118
7.8	Instrumenta.	119

CHAPITRE 6 RESUME

CHAPITRE 7 BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

- PIPEA: 2-[(2S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine
BPABP: 2,6-bis[(2S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine
BABP: 2,6-bis[3-aza-2-butyl]pyridine
BAMAP: 2,6-bis[N-acétato,N-méthyl-amino-2-éthyl]pyridine
PL: pyridoxal
sal: salicylaldéhyde
BS: base de Schiff
aa: acide aminé
ee: excès énantiomérique

CHAPTER 1
INTRODUCTION

1.1 INTRODUCTION GENERALE

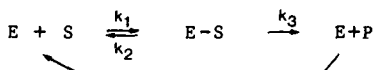
Parmi les réactions qui se produisent dans les cellules et qui sont souvent indispensables à la vie des organismes, certaines sont difficiles à reproduire en laboratoire. Si les organismes peuvent effectuer ces réactions, le plus souvent à une vitesse élevée, c'est grâce à des catalyseurs biologiques, les enzymes.

Lorsqu'on étudie d'un peu plus près une réaction catalysée par un enzyme,



on remarque que l'enzyme participe à la réaction en formant transitoirement un complexe enzyme-substrat spécifique.

On peut donc écrire:



Les enzymes sont des protéines, qui parfois ne suffisent pas à l'action enzymatique; ils nécessitent alors la présence d'un co-facteur.

Il existe différents types de co-facteurs, par exemple:

- o Les ions métalliques qui agissent soit en modifiant la conformation de l'enzyme, soit en permettant la formation et la décomposition du complexe E-S
- o Les co-enzymes (molécules organiques de petite taille) dont certains font partie du site actif et qui se retrouvent inchangés à la fin de la réaction. Un certain nombre de vitamines, en particulier les vitamines du groupe B, sont des co-enzymes ou des constituants essentiels des co-enzymes.

La spécificité de l'action enzymatique peut se manifester d'une part, au niveau du type de réaction catalysée par l'enzyme et d'autre part, au niveau du substrat de la réaction. Certains enzymes sont capables de distinguer deux isomères optiques l'un de l'autre et de n'agir que sur l'un des deux, on parlera alors de stéréospécificité. Ainsi par exemple, une S-amino-oxydase distinguera le S-amino-acide du R-amino-acide. D'autres enzymes présentent une stéréospécificité par rapport à l'isomérisie cis-trans. Ainsi par exemple, la fumarase permet une addition d'eau uniquement sur l'acide transfumrique.

Dans les organismes vivants, les amino-acides occupent une position centrale en ce qui concerne le métabolisme des composés azotés. De nombreuses réactions, parmi lesquelles la transamination, la décarboxylation, la désamination et la racémisation requièrent le même co-enzyme: le pyridoxal-phosphate (composé de la vitamine B6).<1> <2>

On comprend dès lors que de nombreux chimistes et biochimistes se soient intéressés aux composés de la vitamine B6.

A.E. Braunstein, par exemple, publie tout une revue <3> au sujet du pyridoxal phosphate.

H.C. Dunathan, lui, se penche sur les aspects stéréochimiques de la catalyse par le pyridoxal <4> <5>. Il étudie tout spécialement la transamination, la racémisation et la décarboxylation.

Un article publié en 1969 par V.I. Ivanov discute la réaction de transamination en relation avec un système modèle tridimensionnel <6>: on désigne par système modèle, tout système chimique non-enzymatique capable de simuler un processus enzymatique.

Vu la complexité des systèmes enzymatiques, il est intéressant pour le chimiste d'imaginer des systèmes modèles beaucoup plus simples, qui lui permettent d'étudier et de mieux comprendre l'un ou l'autre des aspects de la catalyse enzymatique, notamment la grande spécificité stéréochimique des systèmes biologiques.

La figure 1-1 illustre schématiquement la manière dont une information stéréochimique portée par une matrice complexe-substrat est transmise au réactif dans un système modèle <7>.

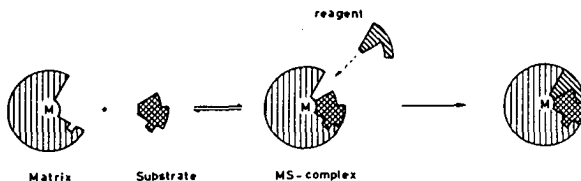


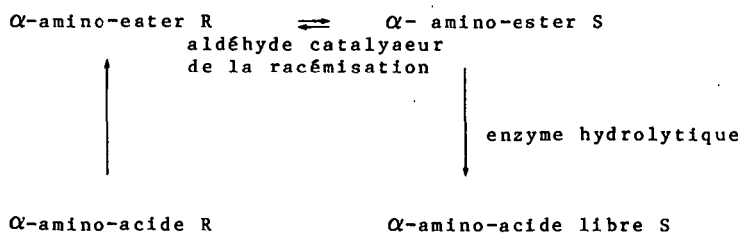
fig. 1-1 : Représentation schématique d'une réaction asymétrique qui se déroule en deux étapes <7>.

La création de systèmes chimiques simples permet aussi d'imiter, dans une certaine mesure, les réactions enzymatiques, afin de développer de nouveaux catalyseurs.

Ainsi, une équipe de chercheurs français <8> propose un procédé de préparation d'un α -amino-acide libre de configuration absolue S, qui utilise conjointement:

- o Un complexe de la vitamine B6 comme catalyseur pour la racémisation d'ester d' α -amino-acide
- o Un enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'ester du R amino-acide uniquement.

Le principe global de fonctionnement du système peut être schématisé ainsi:

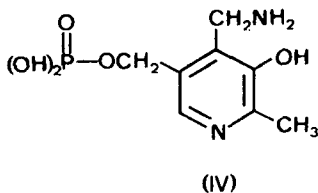
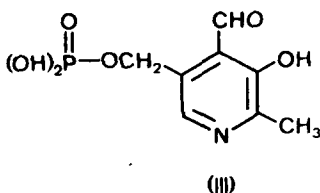
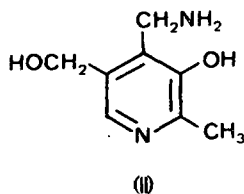
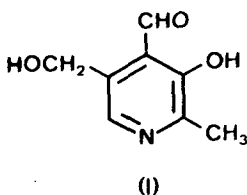


L'avantage d'une telle méthode est de transformer quantitativement un antipode d' α -amino-acide en l'autre antipode, dans des conditions douces et catalytiques.

1.2 LES COMPOSES DE LA VITAMINE B6

1.2.1 Généralités

Les composés de la vitamine B6 incluent le pyridoxal (PL (I)), le pyridoxal-5'-phosphate (PLP (III)), le pyridoxamine (PM (II)) et le pyridoxamine-5'-phosphate (PMP (IV)). Les deux dérivés phosphorylés ((III) et (IV)) sont de première importance dans les systèmes biologiques, puisqu'ils interviennent en tant que co-facteurs pour un grand nombre d'enzymes catalysant une multitude de réactions d'acides aminés.



L'activité de PMP est limitée au transfert de groupements amino tandis que PLP participe à un grand nombre de réactions; parmi elles, la synthèse, la dégradation et l'interconversion d'acides aminés.

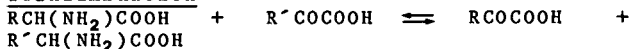
Ces réactions sont résumées dans le tableau 1-1.

Tableau 1-1.<9>, <10>.

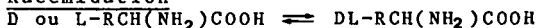
Réactions des acides aminés catalysées par le pyridoxal et les ions métalliques.

A. Réactions dues à la réactivité de l'hydrogène en alpha

1. Transamination

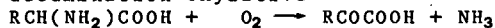


2. Racémisation



3. Dégradation

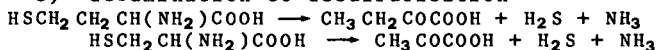
a) désamination oxydative



b) désamination non-oxydative d'un acide hydroxaminé



c) désamination et désulfurisation

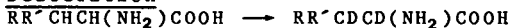


4. Synthèse

a) d'un acide hydroxaminé à partir d'un aldéhyde et de la glycine

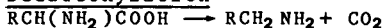
b) de tryptophane à partir de sérine et d'indole

5. Deutération



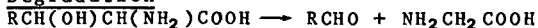
B. Réactions dues à la réactivité du groupe carboxylate

Décarboxylation



C. Réaction dues à la réactivité du reste R

Dégradation

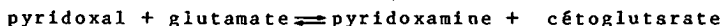


1.2.2 Aperçu historique.

Les composés de la vitamine B6 ont fait l'objet de nombreuses études ces quarante dernières années.

A partir de 1950, des systèmes modèles ont été développés afin de mieux saisir les mécanismes de la catalyse enzymatique.

En 1952, Metzler et Snell étudient la réaction de transamination entre le pyridoxal et plusieurs acides aminés. Ils examinent notamment la réaction suivante:

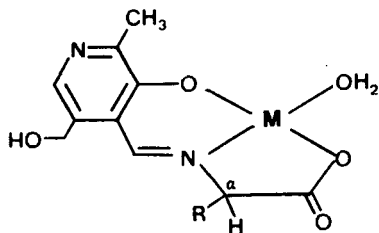


Cette réaction mesurée à 100 °C et à un pH d'environ 4,5 est rapide, presque quantitative et est catalysée par le sulfate de cuivre. <11> <12>

Metzler et ses collaborateurs en 1952 <13> ainsi que Ikawa en 1954 <14> étudient la désamination oxydative catalytique de la sérine et de la cystéine par le pyridoxal et un sel métallique.

En 1952, Olivard, Metzler et Snell publient des résultats concernant la racémisation catalytique de la S-alanine en présence de pyridoxal à 100 °C. Ils observent que cette réaction est catalysée par des sels de fer, de cuivre et d'aluminium. Le domaine pH optimum pour cette réaction est aux environs de 10. <15>

Pour expliquer l'ensemble de ces réactions, on a supposé la formation d'un complexe entre une base de Schiff et un ion métallique (V) <16>.



(V)

Un tel complexe a pu être isolé pour la première fois, en 1957, par Christensen et Collins <17>.

Dès lors, il semble raisonnable de penser que la formation de (V) constitue l'intermédiaire commun des réactions de racémisation, de transamination et de désamination oxydative.

†

A partir des résultats précités, de nombreux travaux, menés par Martell <18, 19, 20>, Metzler <21, 22, 23, 24, 25>, Leussing <26, 27, 28>, Matsushima <29, 30, 31>, Belekou <32, 33, 34, 35>, Tsai <36, 37>, Gillard <38, 39> et Phipps <40> ont permis de compléter et d'approfondir l'étude de ces systèmes.

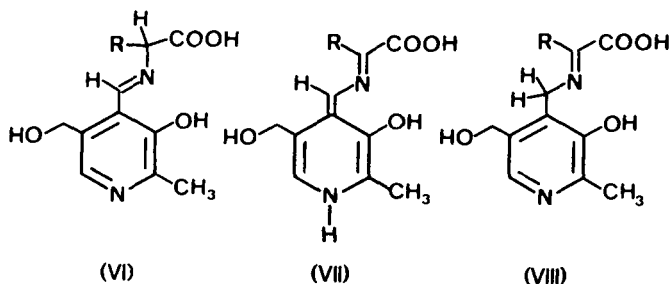
Ces travaux seront cités par la suite, dans la mesure où ils concernent l'étude du présent travail.

1.3 LES REACTIONS CONSIDEREES DANS CE TRAVAIL.

1.3.1 La racémisation

Lorsque l'on mesure l'importance relative de la transamination et de la racémisation en fonction du pH, on constate que la transamination est la réaction prédominante jusqu'à pH=9. Elle est la plus complète quand le pH est environ égal à la valeur du pka (5.5 à 7.5 selon le métal considéré) du proton pyridinium du complexe. La cinétique de racémisation est la plus favorable au moment où l'azote de la pyridine est complètement déprotonné.

Cette observation peut être expliquée par les interconversions suivantes:

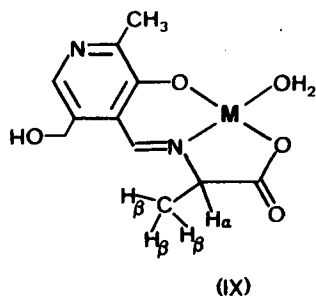


La racémisation implique les réactions (VI)→(VII)→(VI) tandis que la transamination résulte de (VI)→(VII)→(VIII). Comme les réactions (VI)→(VII)→(VIII) sont réversibles, la base de Schiff peut tautomériser en combinant soit (VI)→(VII)→(VIII)→(VII)→(VI), soit (VI)→(VII)→(VI). Ainsi, la racémisation peut aussi résulter de deux transaminations inverses, sans formation du céto-acide.

Cette voie est considérée comme opérative dans des solutions légèrement acides <15>.

Par leur étude RMN de deutération du proton en α ou en β de l'acide aminé, Abbott et ses collaborateurs confirment l'existence des deux mécanismes de racémisation possibles, en fonction du pH <41>.

L'ion métallique choisi pour ce travail est Al(III). Le passage de la double liaison C=N de (VI) à (VII) permet de labiliser suffisamment les protons en β pour que l'échange avec le deutérium ait lieu (IX).



Les figures 1-2 et 1-3 illustrent très bien ces deux mécanismes:

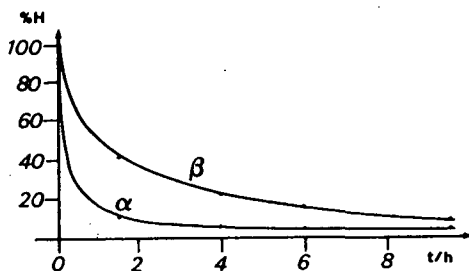


fig. 1-2 Vitesse de deutération du site α et β de la RS-alanine à pH=5.5.

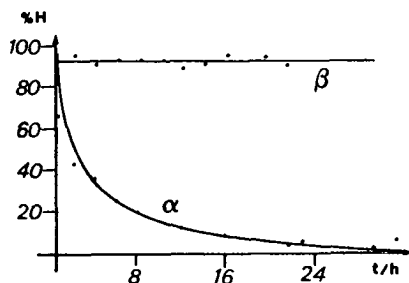


fig. 1-3 Vitesse de deutération du site α et β de la RS-alanine à pH=10.5.

En solution basique, la réaction de racémisation est de premier ordre en complexe et se déroule sans que l'on observe de transamination. Son mécanisme probable est l'élimination du proton en α dans une étape lente (formation d'un carbanion intermédiaire), suivie d'une rapide reprotonation du carbone en α .

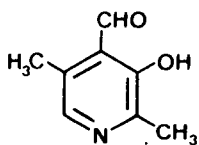
La vitesse de racémisation des complexes aldimes par catalyse basique croît dans l'ordre suivant: $\text{Cu}(\text{sal-S-val}) \ll \text{Cu}(\text{PL-S-val}) < \text{Cu}(4\text{-NO}_2\text{sal-S-val})$ <49>. Il apparaît donc que la vitesse de racémisation en milieu basique dépend de la stabilisation par résonance du carbanion intermédiaire <9>.

1.3.2. La désamination oxydative.

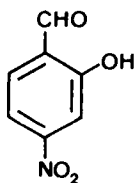
Cette réaction est observée pour la première fois par Snell et Metzler, en 1952 <13>. Ces auteurs découvrent que certains acides aminés produisent des oxéto-acides et de l'ammoniaque quand ils sont chauffés en présence de ions métalliques et de pyridoxal, dans des systèmes catalytiques et à 100 °C.

C'est la désamination oxydative catalytique de la sérine et de la cystéine par le pyridoxal et un sel métallique qui est surtout étudiée par ces auteurs. Ils déterminent le domaine pH (4 à 9) dans lequel la réaction se déroule le mieux. De plus, la vitesse de la catalyse dépend de la concentration en tampon et de l'ion métallique utilisé.

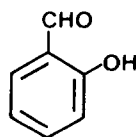
En 1954, Snell et Ikawa étudient l'influence de l'ion métallique et de l'aldéhyde sur la réaction catalytique <14>. Il semble que le cuivre(II) soit très favorable à cette catalyse et que le 5-desoxypyridoxal (X) et le 4-nitrosalicylaldéhyde (XI) remplacent le pyridoxal de manière efficace, tandis que le salicylaldéhyde (XII) est très peu actif.



(X)



(XI)



(XII)

Des résultats non-publiés de Martell <9> indiquent que l'activité catalytique de l'ion métallique décroît dans l'ordre suivant: Mn(II) > Co(II) > Cu(II) >> Ni(II).

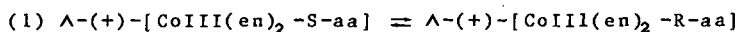
Finalement, la désamination oxydative est la seule transformation de l'acide aminé, parmi celles qui sont mentionnées dans le tableau 1-1, qui requière la présence d'un agent oxydant et qui nécessite peut-être le changement d'état d'oxydation de l'ion métallique.

1.4 PRESENTATION DU TRAVAIL

1.4.1 La rétroracémisation.

Pour introduire le concept de rétroracémisation, les principaux travaux déjà effectués dans ce domaine vont être évoqués.

Une première étude de l'équilibre de racémisation d'acides aminés a été effectuée en 1967 par Marzilli et Sargeson <42> sur des complexes de cobalt(III) (1) optiquement actifs.



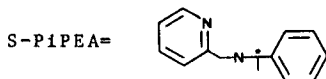
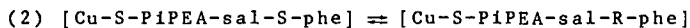
L'échange de l'hydrogène en α de l'acide aminé est rendu possible grâce à l'effet activant du cobalt.

La configuration Λ favorise le R-acide aminé. Cette préférence est d'autant plus grande que le reste de l'acide aminé est volumineux. Dans le cas de la valine, le rapport de chacun des isomères est 1.7:1.

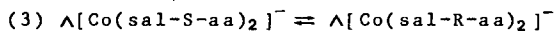
Des sélectivités encore plus grandes avec un système identique à celui décrit ci-dessus ont été obtenues par Legg et Keyes <43>, pour l'acide aspartique et la proline. La réaction d'équilibre est en fait presque complètement stéréosélective pour la proline, résultat dû probablement à la présence de ponts hydrogène intramoléculaires.

Des travaux effectués par Riem <10> sur des complexes labiles de base de Schiff (2) ont permis de mettre en évidence une stéréosélectivité de 15 à 17 % en faveur du R-acide aminé.

La formation du complexe de base de Schiff rend labile le proton porté par le carbone en α de l'acide aminé et permet ainsi l'échange.



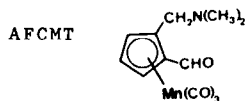
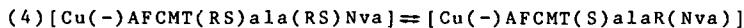
Belekon a'eat aussi beaucoup intéressé à ce problème. Il a notamment travaillé sur des complexes de cobalt inertes (3).



Les acides aminés étudiés sont la tyrosine (70-90% p.o.), la valine (96-98.8% p.o.) et la N-val (93-94% p.o.).<32>

La haute stéréospécificité de ce système est la conséquence d'un grand encombrement stérique de l'une ou de l'autre des faces du carbanion.

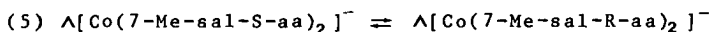
Belekon a aussi étudié des complexes labiles de Cu(II) (4):



Les excès énantiomériques sont de 57% pour la S-alanine et de 20% pour la R-Nval <33> <34>.

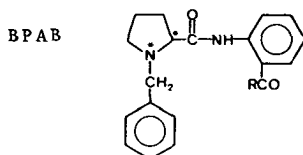
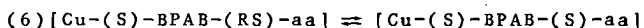
On remarque que dans ce dernier exemple, l'information chirale se trouve directement liée au substrat. Dans les exemples précédents, l'information était transmise par un ligand secondaire fixé de manière indépendante au métal.

Un autre exemple publié par Belekou propose un nouveau complexe de cobalt (III) inerte (5):



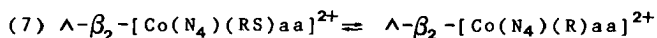
On choisit ici l'ortho-hydroxy-acétophénone comme composé carbonyle, dans le but d'augmenter l'encombrement stérique dans la région du carbone en α de l'acide aminé <35>. Les excès énantiomériques obtenus sont de l'ordre de 80 à 90% en S-aa.

Une publication récente de Belekou <44> décrit la diastéréosélectivité de la réaction de racémisation suivante (6):



Avec ce nouveau ligand, les excès énantiomériques vont de 12% pour la S-alanine à 54% pour la S-valine.

Une transformation asymétrique d' α -amino-acides, faites avec des complexes de Co(III) optiquement actifs (7), a été réalisée en 1980 par un groupe de recherche japonais.



N_4 → tétraamine

Les rendements optiques dans ces systèmes vont de 0 à 80% <45>.

Un autre groupe japonais a pu mettre en évidence une différence d'un facteur de 1.3 environ pour les vitesses de racémisation du R et du S acide glutamique, cela en présence d'un composé chiral analogue au pyridoxal <46>.

Tous ces travaux amènent les remarques suivantes:

- o Une réaction de rétro-racémisation ou de racémisation inverse présente, à l'équilibre, un rapport R/S différent de 1.
- o Cette réaction est possible pour autant que la molécule qui racémise ait un proton labile sur le carbone asymétrique. L'échange de ce dernier permet d'inverser la configuration du carbone optiquement actif.
- o Pour qu'à l'équilibre, le rapport R/S soit différent de 1, il faut qu'une information chirale soit transmise à l'acide aminé. Cette information peut être liée directement au substrat ou être transmise par un ligand secondaire fixé au ion métallique du complexe.

Il est intéressant de noter que tous les exemples de rétro-racémisation cités dans la littérature (à l'exception du travail de Riem), correspondent à des réactions diastéréosélectives <50>.

Dans ce travail, la réaction de rétro-racémisation étudiée est énantiosélective, tout comme le sont les réactions enzymatiques.

1.4.2 But du travail

Le but de ce travail est la mise en évidence et l'étude de la rétro-racémisation d'acides aminés dans des complexes labiles chiraux de Cu(II) (fig. 1-4).

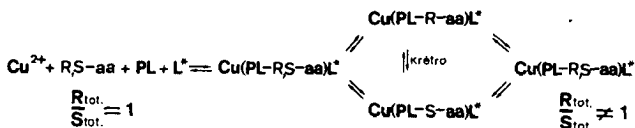
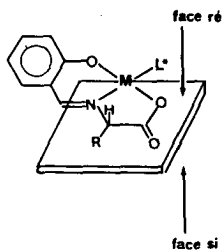


fig. 1-4 Schéma d'une réaction de rétro-racémisation dans un complexe de base de Schiff.

Les réactions de racémisation étudiées dans ce travail sont énantiosélectives. A l'étape clef de la réaction, le proton de l'acide aminé est arraché par l'action d'une base (cf. 1.3.1) et le carbanion résultant réagit avec l'électrophile de manière énantiosélective, déterminée par l'environnement chiral du complexe.

Si dans la représentation du complexe (XIII), le proton vient se fixer au-dessus du carbone α (proton en face ré), l'acide aminé résultant sera de configuration absolue S; par contre, s'il se fixe au-dessous du carbone (en face si), l'acide aminé sera de configuration absolue R.

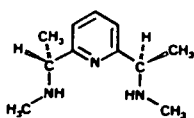


(XIII)

Le choix de la face ré ou de la face si sera fonction de l'encombrement stérique. Ainsi, le reste R de l'acide aminé se placera de préférence sur la face la moins encombrée.

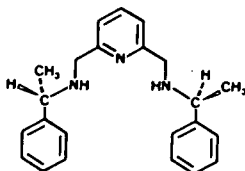
1.4.3 Le choix des ligands.

Les ligands utilisés sont les suivants:



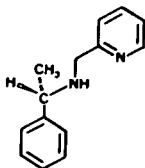
(XIV)

BABP



(XV)

BPABP



(XVI)

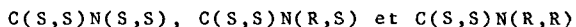
PIPEA

Pour différencier les deux faces et diriger l'attaque préférentiellement d'un côté, les ligands choisis doivent satisfaire plusieurs conditions:

- o Etre tridentés et se coordonner de manière périphérique, la base de Schiff occupant également trois positions dans le plan.
- o Posséder une symétrie C_2 , pour éviter la formation d'isomères cis-trans à cause de la structure non-symétrique de la base de Schiff. Une telle isomérisation géométrique conduirait, par dissipation de l'information stéréochimique dû à des facteurs statistiques, à une diminution des rendements optiques.
- o différencier le mieux possible les deux orientations possibles, sans pour autant réduire trop fortement la réactivité du système comme conséquence des interactions stériques <47>.

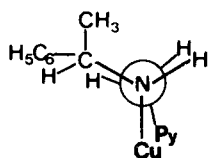
BABP et BPABP satisfont ces conditions, alors que PIPEA ne possède pas une symétrie C_2 . Ce dernier est utilisé dans ce travail uniquement à titre de comparaison.

Les ligands libres se caractérisent par deux carbones asymétriques, mais lorsqu'ils coordonnent, les atomes d'azote acceptent également une chiralité déterminée. La matrice ML^* peut ainsi adopter plusieurs configurations. Par exemple, pour une configuration S des carbones:

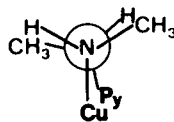


Cela est vrai surtout pour BPABP, car BABP choisira pour des raisons d'encombrement stérique illustrée par la figure 1-5, la configuration $C(S,S)N(R,R)$, qui correspond à un éloignement maximal des deux groupes méthyl. Cette observation a été confirmée par une détermination de la structure aux rayons X d'un complexe de cobalt(III) inerte formé avec un ligand dérivé du BABP le BAMAP (XIX) <48>.

Ces considérations valent pour le ligand racémique.

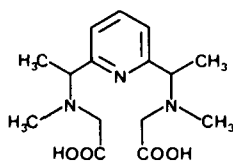


(XVII)



(XVIII)

fig. 1-5 Représentation de Newman des ligands BPABP (XVII) et BABP (XVIII) dans la sphère de coordination de l'ion métallique.



(XIX)

Le choix de l'aldéhyde

Plus un système est simple, plus l'interprétation des résultats sera aisée. D'où l'importance de choisir un système modèle dans lequel aucune réaction secondaire n'est possible.

A cet égard, le choix de l'aldéhyde est primordial. Pour l'essentiel de notre travail, nous avons choisi le salicylaldéhyde, qui à l'avantage de ne catalyser que la racémisation, contrairement au pyridoxal et à ses dérivés, qui catalysent la transamination, la décarboxylation et la désamination oxydative (cf. tableau 1-1)

Quelques mesures ont été entreprises avec le pyridoxal, dans le but de comparer nos résultats avec ceux de Deschenaux <47>, obtenus par transamination catalytique dans un système semblable.

Nous disposons de deux techniques pour mettre en évidence une induction asymétrique, lors de la rétroacémisation:

1. La mesure des spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV du complexe aldimine.

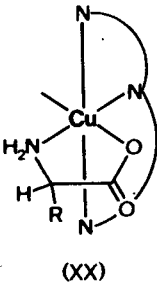
2. La mesure de l'excès énantiomérique de l'un des antipodes de l'acide aminé, par chromatographie en phase gazeuse.

CHAPTER 2

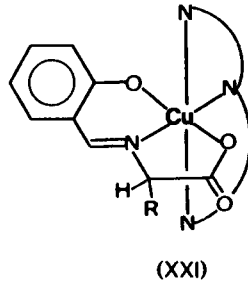
DESCRIPTION DES SYSTEMES CUIVRE(II)-LIGAND-ACIDE AMINE ET CUIVRE(II)-LIGAND-BASE DE SCHIFF.

2.1 Introduction.

Ce chapitre décrit les propriétés thermodynamiques du système Cu;L;aa;aal. Parmi l'ensemble des espèces présentes dans ce système, les complexes [CuLaa](XX) et [CuLBS](XXI) retiennent particulièrement notre attention.



[CuLaa]

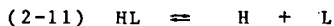
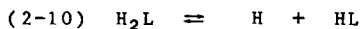
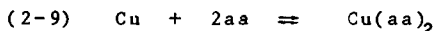
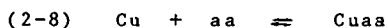
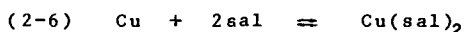
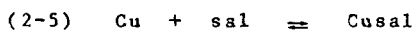
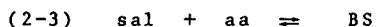
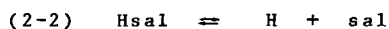
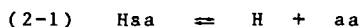


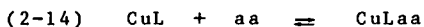
[CuLsalaa]

Afin de pouvoir réaliser une rétoracémisation, il faut d'une part activer l'acide aminé dans le sens d'une labilisation du carbone asymétrique et d'autre part le soumettre à une induction dissymétrique, permettant une différenciation énergétique des deux énantiomères de l'acide aminé, sous forme de complexes mixtes diastéréomères.

Dans notre système, ces conditions sont réalisées seulement pour l'espèce mixte (XXI), qui fait partie d'un ensemble comprenant un nombre relativement élevé de différentes espèces.

Afin de déterminer le taux de sélectivité dans la réaction de racémisation, il est indispensable de connaître la concentration du complexe mixte (XXI) dans le système, aux conditions données. Pour déterminer cette concentration, il faut connaître les différentes constantes de formation de toutes les espèces qui peuvent être présentes dans le système. Ces constantes de formation concernent les équilibres suivants:





Dans la mesure où ces constantes sont connues, les valeurs de la littérature ont été utilisées, à savoir:

- o constantes d'acidité des acides aminés et des bases de Schiff avec l'aldéhyde salicylique. <51>, <26>, <52>, <53>, <54>
- o constantes de formation des complexes [CuBS] <53> <55>, [Cuaa], [Cu(aa)₂] <51>, [Cusal] et [Cu(sal)₂] <52>.

Les constantes d'acidité des ligands BABP et BPABP ainsi que les constantes de formation des complexes [CuL], [CuL(OH)] et [CuL(aa)] (L = BABP et BPABP; aa = gly, ala, val, leu, phe) ont été déterminées par titrations acidimétriques (pour les détails voir la partie expérimentale).

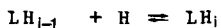
La constante de formation du complexe mixte [Cu(salgly)BPABP] a finalement été déterminée par la mesure du dichroïsme circulaire. On discutera en détail, au chapitre V, l'apparition d'une bande CD à 355 nm, lors de l'adjonction du ligand optiquement actif au complexe [Cu(salgly)], qui permet cette détermination.

2.2 Etude potentiométrique.

La détermination des constantes d'équilibre du système [Cu(II)-L-aa] (où L = BPABP et BABP et aa = gly, ala, val, leu et phe) est réalisée à l'aide de titrations potentiométriques.

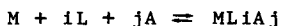
Les constantes d'équilibre sont définies comme suit:

o Les constantes de protonation des ligands



$$K_i^H = [LH_i] / [LH_{i-1}] [H]$$

o La constante de formation du complexe mixte métal-ligand-acide aminé



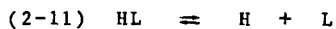
$$\beta_{ij} = [ML_iA_j] / [M][L]^i [A]^j$$

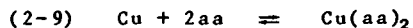
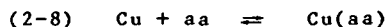
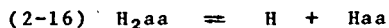
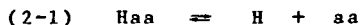
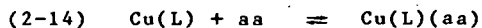
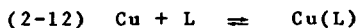
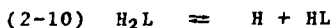
Toutes les constantes utilisées dans ce travail sont calculées à l'aide de l'activité des protons.

Les programmes COMICS <56> et COMICS modifié <57> ont été utilisés pour déterminer la répartition des espèces en fonction du pH.

Les constantes de stabilité ainsi que les pka des ligands sont déterminés par la méthode décrite sous référence <58>.

Le système chimique considéré, dans le but de calculer les constantes de formation des complexes mixtes, est le suivant:<59>





où L = BPABP, BABP et aa = gly, ala, val, leu, phe.

Les valeurs ainsi obtenues sont réunies dans les tableaux 2-1, 2-2, et 2-3.

Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à la déviation standard sur la détermination de la constante d'équilibre.

Tableau 2-1:

Valeurs des pka des deux ligands utilisés:
(équations (2-11) et (2-10))

pka	BABP	BPABP
H ₂ L/H.HL	8.99 (0.03)	7.49 (0.004)
HL/H.L	9.82 (0.07)	8.57 (0.005)

Tableau 2-2:

Valeurs des constantes cuivre/ligand (équations
(2-12) et (2-13)).

logk	BABP	BPABP
CuL /Cu.L	14.13 (0.004)	10.50 (0.009)
CuLH ₂ O/CuLOH.H	5.65 (0.006)	2.77 (0.02)

Tableau 2-3:

Valeurs des constantes de formation pour les complexes mixtes (équation (2-14)). Les constantes sont données sous la forme [CuLaa]/[CuL].[aa]. Elles sont exprimées de cette manière pour mieux mettre en évidence la stabilité du complexe mixte. Ainsi, la valeur obtenue est indépendante de la stabilité de [CuL].

logk	BABP	BPABP
gly	4.48 (0.007)*	4.92 (0.02)
sla	3.98 (0.005)	4.70 (0.02)
val	3.74 (0.005)	4.51 (0.02)
phe	3.81 (0.008)	4.49 (0.02)
leu	3.95 (0.004)	4.63 (0.03)

*: réf <50>

2.3 Répartition des espèces en fonction du pH.

A l'aide des constantes d'équilibre individuelles, déterminées en 2.1. ou trouvées dans la littérature, il est possible de calculer la répartition des espèces en fonction du pH.

Les figures 1 (A, B, C, D), 2 (A, B, C, D) et 3 (A, B) illustrent la distribution des espèces: [Cu²⁺] (1), [Cu(aa)₂] (2), [CuL] (3), [CuLOH] (4), [CuL(aa)] (5) en fonction du pH pour une solution de Cu²⁺, aa, L de concentration égale à 2.5.10⁻³M.

2.4 Détermination de la constante de formation du complexe cuivre-ligand-base de Schiff.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la détermination de la constante [CuLBS] (où L = BPABP et BS = salgly) a été réalisée par l'intermédiaire des spectres de dichroïsme circulaire.

Le principe et le détail de ces mesures seront développés au chapitre V.

Les programmes MARQ <60> et MARQ modifié <61> nous permettent de calculer la constante de formation du complexe [CuLBS] et le programme COMICS modifié <57>, la répartition des espèces en fonction du pH.

Principe du programme MARQ.

Dans ce programme, nous déterminons $\Delta\epsilon$ et K_{CuLBS} par minimisation au sens des moindres carrés de l'erreur sur la fonction $f(i) = \Delta\epsilon * 33000 * [CuLBS]$, où [CuLBS] est dépendante de K_{CuLBS}, C_{tot.}, L_{tot.}, K_{form.} et du pH.

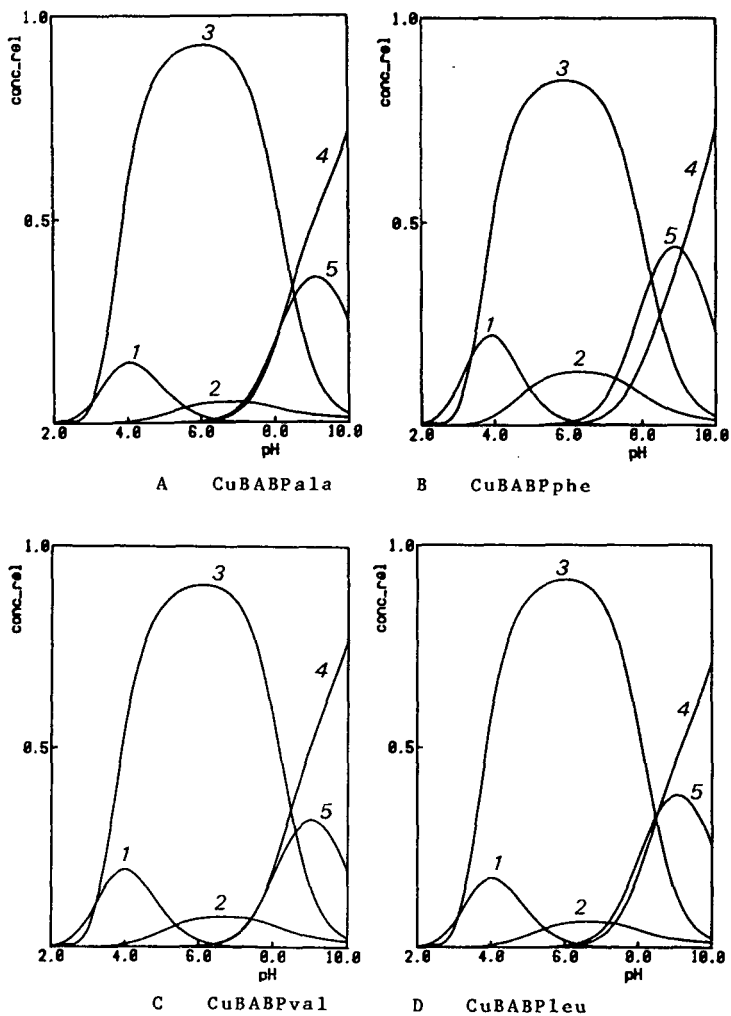
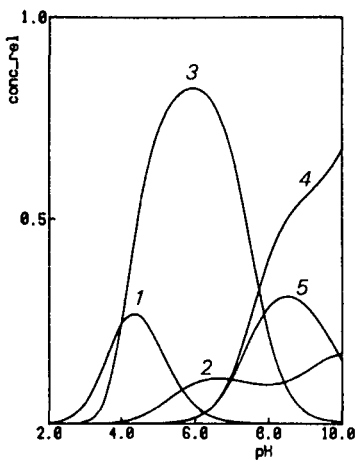
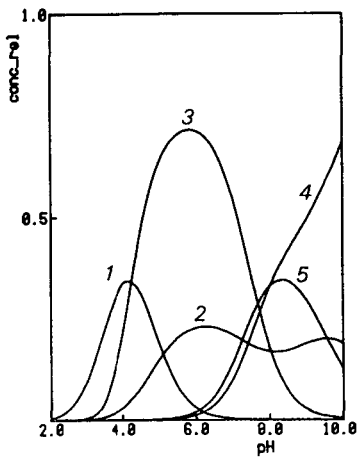


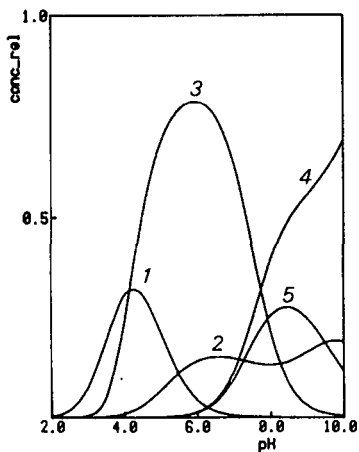
fig. 2-1 : Distribution des espèces en fonction du pH pour le système Cu;BABP;aa.
 Cuaa(1); Cu(aa)₂(2); CuL(3); CuL(OH)(4); CuLaa(5)



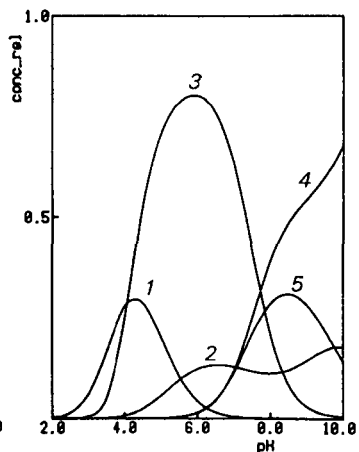
A CuBPABPala



B CuBPABPphe



C CuBPABPval



D CuBPABPleu

fig. 2-2 : Distribution des espèces en fonction du pH pour le système Cu;BPABP;aa.
 Cuaa(1); Cu(aa)₂ (2); CuL(3); CuL(OH)(4); CuLaa(5)

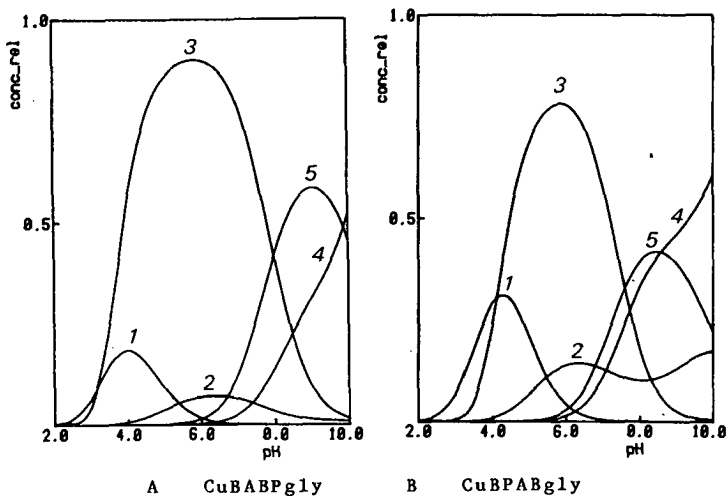
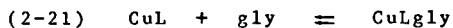
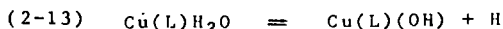
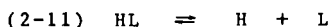
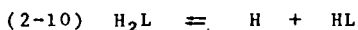
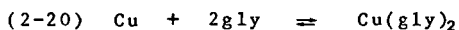
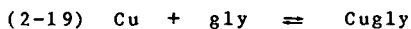
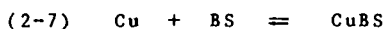
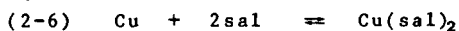
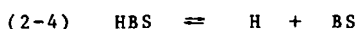
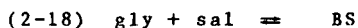
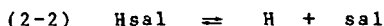
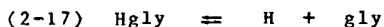


fig. 2-3 ; Distribution des espèces en fonction du pH pour le système Cu;L;gly.
 Cuaa(1);Cu(aa)₂(2);CuL(3);CuL(OH)(4);CuLaa(5)

Le système chimique utilisé pour le calcul de la constante de formation du complexe mixte est le suivant:



(2-17), (2-19), (2-20); <51> (2-2), (2-4); <26> -
 (2-5), (2-6); <52> (2-18), (2-7); <53>

Tableau 2-4:

Valeurs de la constante de formation K et de $\Delta\epsilon$ du complexe mixte. La constante est donnée sous la forme $[\text{CuLBS}]/[\text{CuBS}].[L]$.

$$K = 2.85.10^3 \quad \Delta\epsilon = 0.29$$

Les valeurs extrêmes de K et de $\Delta\epsilon$ calculées par le programme, pour des limites de confiance non-linéaires, sont:

$$2.44.10^3 \leq K \leq 3.40.10^3$$
$$0.28 \leq \Delta\epsilon \leq 0.30$$

2.5 Distribution des espèces en fonction du pH.

La figure 2-4, montre la répartition des espèces présentes dans la solution: $[\text{CuLBS}]$ (1), $[\text{CuLgly}]$ (2), $[\text{CuBS}]$ (3), $[\text{CuLOH}]$ (4), $[\text{CuL}]$ (5) en fonction du pH, pour une concentration en Cu^{2+} de $2.5.10^{-3}\text{M}$ et pour un rapport $\text{Cu}^{2+}/\text{BPABP}/\text{sal}/\text{gly}$ (1:1:1:1).

La figure 2-5, montre la même répartition que la figure 2-4 mais pour un rapport $\text{Cu}/\text{BPABP}/\text{sal}/\text{gly}$ (1:6:1:1).

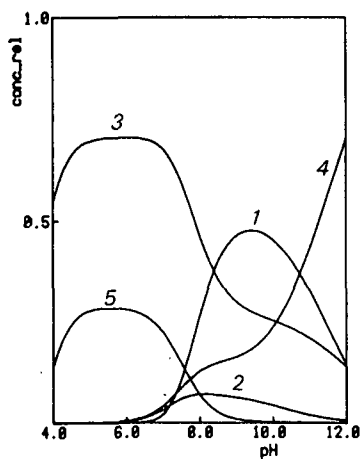


fig. 2-4 : Répartition des espèces en fonction du pH pour le système Cu/BPABP/sal/gly (1:1:1:1).

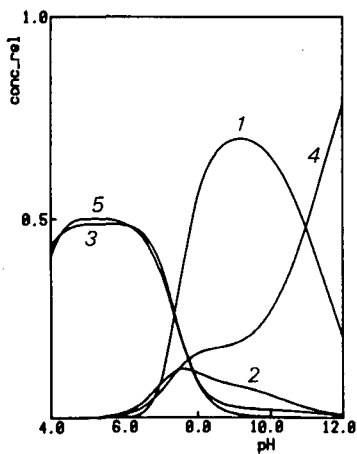


fig. 2-5 : Répartition des espèces en fonction du pH pour le système Cu/BPABP/sal/gly (1:6:1:1).
 CuLBS(1); CuLgly(2); CuBS(3); CuLOH(4); CuL(5)

2.6 Discussion des résultats.

On note, à la page 22, que le complexe de Cu(II) pentacoordonné (XX) est lié par un oxygène en position apicale et que le complexe de Cu(II) hexacoordonné (XXI) l'est par deux oxygènes. Cela est dû à l'effet Jahn-Teller qui se traduit par la tendance du cuivre (II) à former quatre liaisons fortes dans un même plan et deux autres plus faibles perpendiculaire à ce dernier. Ainsi, les complexes obtenus sont des octaèdres déformés.

Lorsque les quatre atomes d'azote se sont fixés (ont remplacé les molécules d'eau de la sphère d'hydratation) dans le plan, il est difficile de coordonner en positions apicales d'autres molécules donneuses d'électrons. Ainsi, le cuivre ne peut pas fixer plus de quatre atomes d'azote, les deux autres positions étant occupées soit par l'eau, soit par un ligand ayant des propriétés proches de l'eau, c'est-à-dire un ligand dur (peu polarisable).

Afin de mieux pouvoir discuter les valeurs des constantes données dans les tableaux 2-1, 2-2 et 2-3, il est intéressant de rappeler ici ce que représentent un ion métallique et un ligand au sens de Lewis; un ligand peut être considéré comme une base et un ion métallique comme un acide. Il en découle que le degré d'affinité d'un ion métallique pour un ligand peut être considéré comme une mesure de son acidité et la tendance d'un ligand à se lier à un ion métallique, comme une mesure de sa basicité.

Si l'on examine le tableau 2-1, on constate que BABP est plus basique d'environ une unité pk que BPABP. Il s'ensuit que l'affinité de BABP pour un ion métallique (acide au sens de Lewis) sera plus grande que celle de BPABP. Cette hypothèse est confirmée par les valeurs des constantes obtenues au tableau 2-2.

On remarque aussi que la constante obtenue pour l'hydroxycomplexe de BABP est plus grande que celle de BPABP. Cela est dû à la plus grande acidité (au sens de Lewis) du complexe formé avec BPABP.

A la lecture du tableau 2-3, on remarque que le complexe mixte formé avec BPABP est plus stable que celui formé avec BABP. Pour former le complexe mixte [CuLaa], l'acide aminé doit se lier au complexe [CuL] déjà formé. Il coordonnera d'autant plus facilement que le complexe [CuL] est acide. L'effet électronique, pris dans le sens d'un don d'électrons au cuivre, lié à la présence du ligand sur l'ion métallique, est d'autant plus grand que le ligand est basique. Ainsi, le complexe [CuBPABP] est plus acide que le complexe [CuBABP].

Une autre raison de la différence de stabilité thermodynamique de ces deux complexes peut être la présence d'effets stériques plus importants sur le complexe formé avec le BABP (vu la présence des deux méthyles portés par les carbones en α du cycle pyridinique). Cette encombrement pourrait entraîner une certaine déstabilisation du complexe mixte formé avec le BABP.

L'explication liée aux effets électroniques paraît plus vraisemblable, dans la mesure où la construction de modèles à calottes ne permet pas d'étayer l'hypothèse des effets stériques.

Si l'on examine le tableau 2-3, on voit que la stabilité du complexe mixte [CuLaa] en fonction de l'acide aminé est la suivante:

Gly > ala > leu > phe > val

Cette stabilité décroissante peut s'expliquer par le fait que le complexe formé avec l'acide aminé le moins encombré est le plus stable.

Dans le domaine pH 8 à 10, [CuLaa] et [CuLOH] sont en compétition. La quantité maximale de complexe mixte obtenue dépend de la stabilité relative des deux complexes.

Ainsi, plus la constante de formation de [Cuaa] est grande, plus la concentration du complexe mixte devient importante dans la solution.

Avec les concentrations utilisées ($2.5 \cdot 10^{-3}$) et pour un rapport Cu:L:aa (1:1:1), à un pH = 9 pour BABP et un pH = 8.5 pour BPABP, la quantité de complexe mixte maximale varie de 35% à 45% suivant l'acide aminé.

La valeur de la constante de formation du complexe mixte [CuLBS] doit être considérée comme approximative pour les raisons suivantes.

Toutes les constantes d'équilibre indiquées dans le schéma des équations (page 32) et utilisées pour le calcul de la constante de formation du complexe mixte [CuLBS] sont valables pour une solution aqueuse. La mesure de l'équilibre de formation du complexe mixte (équation (2-21)) a cependant été effectuée dans un mélange eau:méthanol 1:1.

En effet, pour des raisons de solubilité, nous n'avons pas pu enregistrer les CD dans une solution 100% aqueuse.

Nous avons choisi le méthanol, car c'est le solvant organique qui, de par sa structure et ses propriétés, ressemble le plus à l'eau.

Cette constante conditionnelle nous permet cependant de déterminer la teneur en complexe mixte dans les systèmes utilisés pour la rétroacémisation.

Une autre estimation de la concentration de [CuLBS] sera donnée au chapitre 4, sur la base de résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

CHAPTER 3

DESAMINATION OXYDATIVE DANS LES COMPLEXES DE CUIVRE-LIGAND-BASE DE SCHIFF.

3.1 Introduction.

Lorsque des solutions contenant du cuivre (II), un ligand L, un acide aminé et le pyridoxal sont exposées à l'air, on observe des variations dans le spectre d'absorption qui ne peuvent pas être attribuées à la formation du complexe de base de Schiff mais sont dues à des réactions consécutives. Comme ces variations sont supprimées, lorsque l'on travaille sous une atmosphère inerte, nous les attribuons à une désamination oxydative.

Bien que la désamination oxydative soit une importante réaction de catabolisme, elle semble avoir été peu étudiée dans des systèmes modèles.

Cette réaction peut être représentée par le schéma de la figure 3-1.

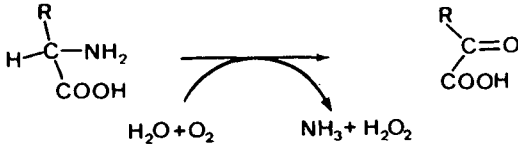


fig. 3-1 Schéma d'une désamination oxydative catalysée par une amino-oxydase PLP-dépendante.

Comme il a été exposé au chapitre 1, dans l'introduction, Snell et Metzler ont été les premiers à étudier cette réaction <13> <14>. Ces auteurs ont constaté qu'un acide aminé se transforme en céto-acide, en présence de cuivre et de pyridoxal à pH environ 9. Ils ont pu mettre en évidence le céto-acide par chromatographie sur couche mince et doser l'ammoniaque par colorimétrie, grâce au réactif de Nessler modifié par Johnson. Ils n'ont cependant pas proposé de mécanisme réactionnel.

En 1960, Hamilton, dans de son étude de complexes de base de Schiff de manganèse(II), propose pour la première fois un mécanisme réactionnel <64>. Il pense que l'espèce active de la réaction correspond à un complexe de base de Schiff de manganèse(III) (fig.3-2). Ainsi, le schéma réactionnel imaginé propose, dans une première étape, la fixation d'oxygène moléculaire sur le métal, suivie par la libération du NH_2 de l'acide aminé sous forme de NH_3 . Ce mécanisme prévoit la formation de peroxyde d'hydrogène.

Comme le mécanisme proposé par Hamilton est en accord avec les observations présentées par la suite, nous admettons que les désaminations oxydatives étudiées dans ce chapitre se déroulent selon un modèle similaire.

D'autres auteurs, tels que A. Marx (1970) <65>, A. Singh (1978) <66>, T. Navaneeth Rao (1980) <67> et M. Maasol (1980) <68> étudient la désamination oxydative, sans toutefois donner de détails concernant le mécanisme de la réaction.

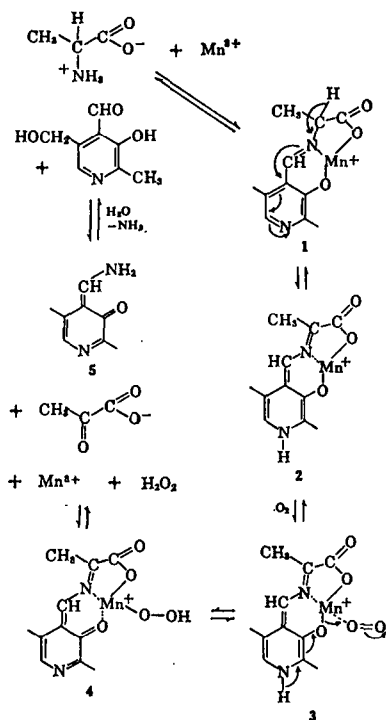


fig. 3-2 Mécanisme de la réaction de désamination proposé par Hamilton <64>.

3.2 Désamination oxydative de la phénylalanine.

La méthode utilisée pour suivre la réaction de désamination est la spectroscopie UV. On observe à la figure 3-3, une diminution au cours du temps de l'intensité de la bande UV, dont le maximum se situe aux environs de 400 nm. Sachant que cette bande correspond à l'absorption de la double liaison de la fonction azométhine du complexe aldimine [CuLPLphe], on peut supposer que sa disparition est proportionnelle à la transformation de l'acide aminé en céto-acide.

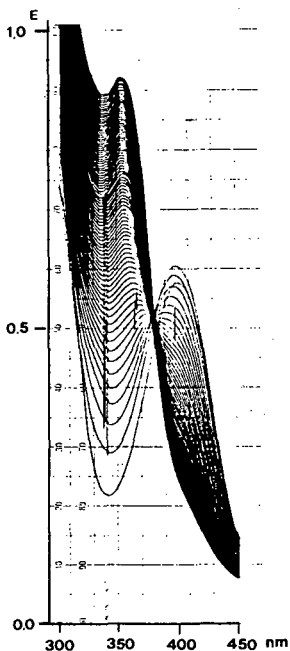


fig. 3-3 Spectres UV enregistrés au cours de la désamination oxydative de la phénylalanine.
 $CCu^{2+} = CPL = Cphe = CBPABP = 1.25 \cdot 10^{-3}$ M. $t = 30$ min. $T = 25$ °C $pH_{départ} = 9.9$, $pH_{fin} = 8.2$, la réaction se déroule à l'air.

En effet, après deux jours et demi, il est possible d'isoler un solide jaune pâle, par extraction à l'éther du mélange réactionnel acidifié. Le produit obtenu est ensuite analysé par résonance magnétique du proton (fig.3-4) et du carbone (fig.3-5).

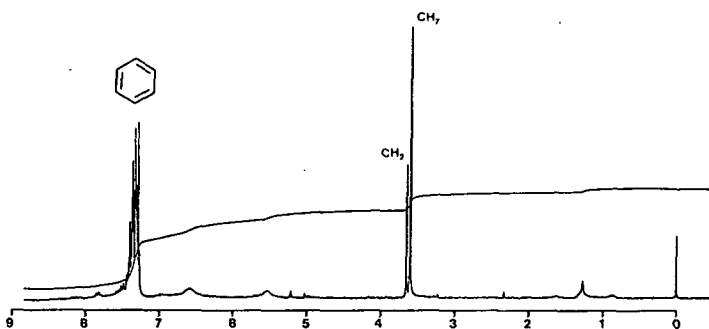


fig. 3-4 Spectre RMN du proton des acides phénylpyruviques et phénylacétiques.

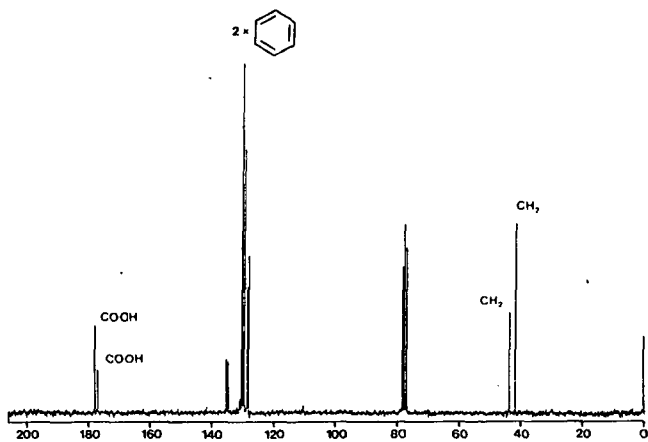


fig. 3-5 Spectre RMN du carbone¹³ des acides phénylpyruvique et phénylacétique (la fonction cétone du cét-acide a un déplacement chimique d'environ 210 ppm).

L'analyse spectrale permet de mettre en évidence la présence de deux acides, soit l'acide phénylacétique et l'acide phénylpyruvique.

Comme l'acide phénylpyruvique est peu stable, il peut se décarboxyler facilement pour donner l'aldéhyde correspondant qui, dans le milieu réactionnel, est réoxydé en acide phénylacétique. Le produit principal de la réaction est d'ailleurs l'acide phénylacétique. Une estimation de la proportion de chacun des deux acides obtenus est possible sur la base des intégrales correspondant aux CH_2 du spectre RMN du proton. Il semble que seulement un tiers du produit isolé soit de l'acide phénylpyruvique.

Pour compléter cette étude, on s'est intéressé à analyser l'influence de l'oxygène et de l'azote sur la vitesse de la réaction (fig.3-6).

A la figure (3-6), on observe un comportement très différent de la bande UV située à 400 nm suivant que la solution est soumise à un milieu oxydant ou à un milieu inerte.

Sous O_2 , la bande qui correspond à la transition π de la fonction azométhine de l'aldimine disparaît au cours du temps, par oxydation de l'acide aminé en céto-acide. Sous N_2 , cette même bande augmente au cours du temps et permet de suivre la formation de la base de Schiff (pyridoxal-acide aminé) au cours du temps. Ce comportement confirme l'absence de désamination oxydative de l'acide aminé dans un milieu inerte. La variation du spectre UV à l'air présente une désamination oxydative moins rapide que sous O_2 . Il semble qu'une grande concentration en oxygène favorise la réaction de désamination.

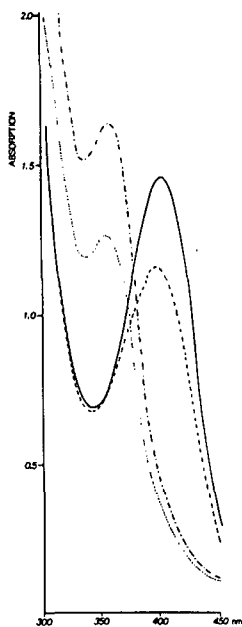


fig. 3-6 Spectres UV de la réaction de désamination oxydative de la phénylalanine dans différents milieux.

..... sous O_2 après 19h30min.
 ——— sous N_2 après 19h40min.
 à l'air après 19h45min.
 -.-.- solution initiale au temps $t=0$
 $CCu^{2+} = C_{phe} = C_{PL} = C_{BPABP} = 2.5 \cdot 10^{-3} M$
 $pH_{initial} = 10.0$, $pH_{final} = 8.3$, $T = 25 \text{ } ^\circ C$.

3.3 Désamination oxydative de l'alanine.

Afin d'éviter la formation de produits secondaires (aldéhyde ou acide), dus à la décomposition du céto-acide, nous avons poursuivi cette étude avec un céto-acide moins sensible à la décarboxylation, soit l'acide pyruvique.

La figure 3-6, qui illustre la variation du spectre UV en fonction du temps, présente un aspect semblable à celui observé pour la phénylalanine, soit la disparition de la bande aldimine au cours du temps.

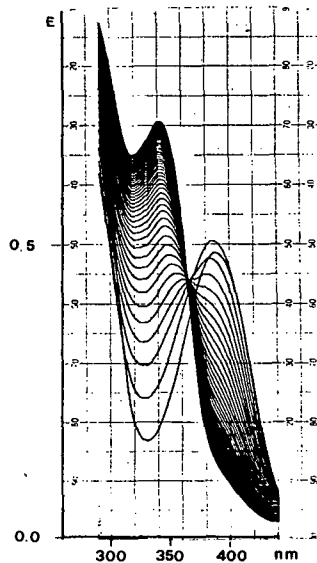


fig. 3-6 Spectres UV enregistrés au cours de la désamination oxydative de l'alanine.

$CCu^{2+} = CPL = Cala = CBPABP = 2.5 \cdot 10^{-3} M.$

$t = 30 \text{ min.} \quad T = 25 \text{ } ^\circ C \quad pH_{\text{départ}} = 10.0,$
 $pH_{\text{final}} = 8.3$

La réaction se déroule à l'air.

Une analyse préliminaire, par chromatographie sur couche mince du mélange réactionnel, permet de mettre en évidence la présence d'acide pyruvique. Les rf obtenus pour la solution témoin (0.46) et pour la solution d'analyse (0.44) sont rassemblés dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1:

Valeurs rf de la chromatographie sur couche mince de l'acide pyruvique et du mélange réactionnel. Le révélateur utilisé est la 2,4-dinitrophénylhydrazine.

Témoin	mélange réactionnel	révélateur
0.46	0.44	-
-	0.64	-
-	0.83	0.79
-	1.00	1.00

Le solvant de migration utilisé est un mélange d'alcool isoamylique et d'ammoniaque 0.25N dans les proportions 20 à 1.

Comme l'acide pyruvique est très soluble dans l'eau, il est difficile de l'isoler par extraction à l'éther. Le procédé de séparation choisi ici est la chromatographie sur colonne. Le mélange réactionnel acidifié est passé sur une résine Dowex 50WX8 200-400 mesh chargée en protons. Etant donné que l'acide pyruvique n'est pas chargé en milieu acide, contrairement aux autres espèces présentes dans la solution (pyridoxal, ligand et acide aminé), il n'est pas retenu par la résine et peut être isolé par élution à l'eau. Une analyse par polarographie du solide blanc obtenu après évaporation à sec de l'éluat aqueux, confirme la présence d'acide pyruvique comme produit de la réaction. Comme les polarogrammes enregistrés à un pH plus petit que 4.1 ne présentent qu'une vague, celle correspondant à la forme énol <69>, nous avons choisi un pH de travail de 2,2 qui est fixé par HCl/KCl 0.1M. La figure 3-7 donne le polarogramme du produit isolé et la figure 3-8 celui de ce même produit additionné d'un peu d'acide pyruvique. Le potentiel de demi-vague se situe aux environs de -0.93 mV, valeur qui est en accord avec celle obtenue dans les mêmes conditions pour l'acide pyruvique pur (-0.96 mV).

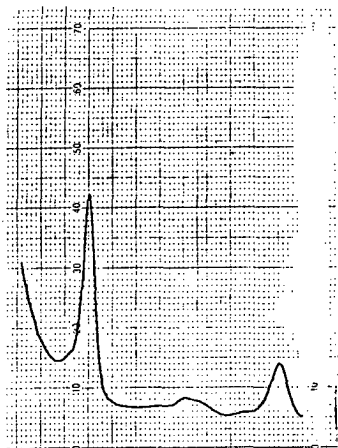


fig 3-7 Polarogramme du produit isolé du mélange réactionnel.
 pH=2.2, (HCl/KCl 0.1M), (-)0.03-(-)1.20 V, DP10,
 20 $\frac{\text{nA}}{\text{mm}}$, damp1 0.5 s/gouttes, 100 mV/cm

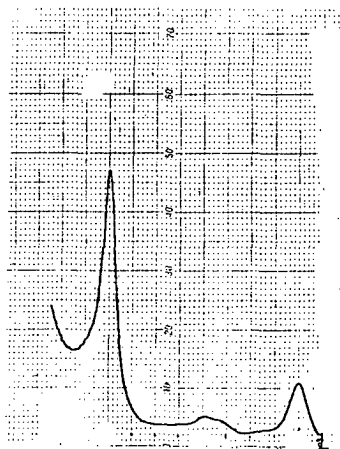


fig. 3-8 Polarogramme du produit isolé du mélange réactionnel additionné d'acide pyruvique.
 pH=2.2, (HCl/KCl 0.1M), (-)0.03-(-)1.20 V, DP10,
 20 $\frac{\text{nA}}{\text{mm}}$, damp1 0.5 s/gouttes, 100 mV/cm

3.4 Désamination oxydative catalytique de l'alanine en présence de pyridoxal.

Les expériences menées jusque là ont permis de mettre en évidence la présence de céto-acide comme produit de décomposition de l'acide aminé. Les différentes réactions faites sous O_2 , N_2 ou à l'air indiquent une nette catalyse de la réaction par l'oxygène. Il est alors intéressant d'examiner si cette réaction pourrait être utilisée comme procédé catalytique de synthèse d'un céto-acide.

Quelques expériences dans ce sens ont été entreprises avec l'alanine. La titration en continu, au pH-stat du NH_3 libéré au cours de la réaction et entraîné par le courant d'oxygène, permet de suivre la réaction au cours du temps. Les résultats présentés dans la figure 3-9 montrent que l'augmentation de la température accélère la réaction et que le ligand a tendance à la ralentir.

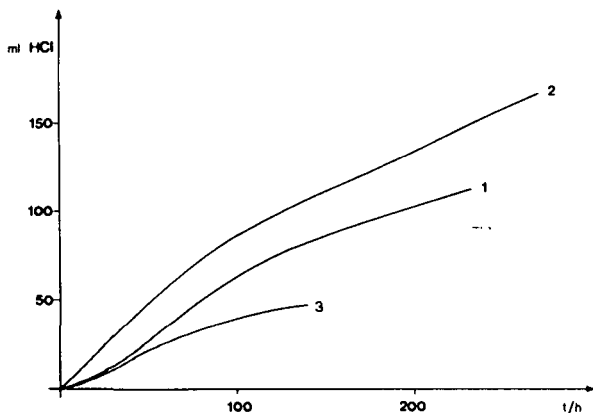


fig. 3-9 Titration du NH_3 libéré par le système catalytique avec HCl 0.01N.
 $CCu^{2+} : CPL : Cala : CBPABP = (1 : 1 : 20 : x) Co$;
 $Co = 2.5 \cdot 10^{-3} M$.
pH=10.2 tampon = $NaHCO_3 / Na_2CO_3$ 0.1M
solvant=MeOH/ H_2O (1:1)
1:x=1; t=25 °C; 2:x=1; t=52 °C; 3:x=2;
t=25 °C.

Une analyse quantitative de l'alanine non-réagi, pour 1 équivalent de ligand à 25 °C, par chromatographie en phase gazeuse montre une bonne corrélation avec la quantité de NH₃ titré (l'étalon interne choisi est la valine). Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau 3-2.

Tableau 3-2:

Dosage du NH₃ libéré par titration acide-base avec HCl 0.1N et dosage de l'alanine non-réagi par chromatographie en phase gazeuse.

NH ₃ titré	ala non-réagi(GC)	ala tot
1.12mmoles(2.3éq.ala)	16.7éq.	20.0éq.

La détermination de la quantité d'alanine transformée soit par GC (3.3 éq.), soit par titration (2.3 éq.), montre que ce système peut fonctionner de manière catalytique.

3.5 Remarques:

Aux figures 3-3 et 3-6, la bande UV qui apparaît aux environs de 340nm n'a pas pu être identifiée. Les solutions suivantes ont été testées: 1) cuivre-pyridoxal-NH₃, 2) cuivre-ligand-pyridoxal-NH₃-acide pyruvique, 3) cuivre-ligand-pyridoxamine-acide pyruvique, 4) cuivre-ligand-pyridoxamine-pyridoxal-acide pyruvique et ce dans des conditions de concentration, de solvant, de tampon et de pH semblables à celles utilisées lors de l'étude de la désamination oxydative.

Lors de l'étude de la désamination catalytique de l'alanine, on peut observer, à la figure 3-9, la présence d'une période d'induction qui est caractéristique de ce type de réaction. D'autre part, on constate un ralentissement de la réaction avec l'augmentation de la concentration en ligand (courbe 3 fig. 3-9). Cette observation amène à penser que la réaction de désamination oxydative passe par une forme de résonance, ainsi que le propose Hamilton. La présence du ligand sur le complexe mixte crée une distorsion de la base de Schiff et empêche ainsi une bonne résonance du système. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus dans les chapitres 4 et 5.

En conclusion, la réaction de désamination oxydative est une réaction qui, à première vue, peut être développée dans un système catalytique. Elle peut ainsi présenter un intérêt pour la préparation de céto-acides.

L'étude de la rétroracémisation en présence de pyridoxal se fera dès lors sous azote, pour inhiber la destruction de l'acide aminé par formation de céto-acide.

CHAPTER 4

ETUDE DE LA RACEMISATION DES COMPLEXES MIXTES CUIVRE-LIGAND-BASE DE SCHIFF.

4.1 Introduction.

Ce chapitre décrit la réaction de racémisation de l'acide aminé dans les complexes [CuL*al] du point de vue de la stéréochimie dite dynamique.

"La stéréochimie dynamique traite des propriétés chimiques des molécules en relation avec la stéréochimie du (ou des) réactant(s) et du (ou des) produit(s) réactionnel(s)".<62>

La stéréochimie dynamique se présente sous un double aspect, selon que

la nature des produits impliqués dans la réaction est cinétiquement ou thermodynamiquement contrôlée.

Les réactions cinétiquement contrôlées sont celles où il n'y a pas d'équilibre entre les produits stéréoisomères formés.

Dans les réactions thermodynamiquement, contrôlées les conditions expérimentales sont telles que les produits stéréoisomères formés s'interconvertissent et se mettent en équilibre. Dans ce cas, la stéréosélectivité est une simple mesure des stabilités relatives des stéréoisomères. Les diagrammes des figures 4-1 et 4-2 représentent le cas où un réactant

a_0 donne les produits A_1 et A_2 stéréoisomères en quantités inégales: <62>

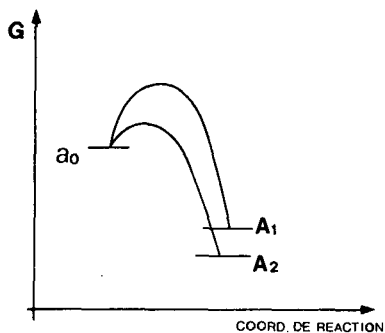


fig. 4-1 : Le stéréoisomère A_2 est formé en prédominance.

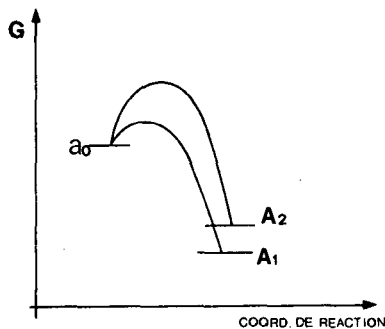


fig. 4-2 : Le stéréoisomère A_1 est formé en prédominance

si $G_{A1} < G_{A2}$ \longrightarrow A_1 prédomine (fig. 4-2)
 si $G_{A1} > G_{A2}$ \longrightarrow A_2 prédomine (fig. 4-1)

Les réactions de racémisation et de rétroracémisation examinées par la suite concernent un type de réaction, dont le contrôle des produits est exclusivement thermodynamique.

En 1970, Holm étudie de manière approfondie, la racémisation des complexes de base de Schiff de type, [Cu(sal-S-val)], [Cu(pyr-S-val)] et [Cu(4-No₂sal-S-val)] <63>.

- o Il conclut à une vitesse de racémisation de pseudo-premier ordre. En effet, la représentation graphique de $\log \alpha_{589}$ en fonction du temps donne une droite pour au moins deux demi-vies et la variation de la concentration en OH⁻ influence la constante $k_r(\text{obs})$ de manière linéaire.
- o Il exprime la constante de racémisation k_r par la relation suivante:

$$k_r = k_r(\text{obs})/[\text{OH}^-]$$

Vu la complexité du système utilisant le pyridoxal pour la formation du complexe mixte [CuPLaal*] (cf. introduction), il est préférable d'entreprendre tout d'abord une étude systématique d'un système plus simple, soit le complexe mixte de la base de Schiff formé avec le salicyaldéhyde et des acides aminés [Cu(sal-aa)L], afin de mieux comprendre comment les différents facteurs (équivalents de ligand, température, solvant, concentration totale) influencent la stéréosélectivité.

Le choix de l'acide aminé est déterminé par des facteurs cinétiques. En effet, dans ce système, seule la phénylalanine racémise, dans les conditions expérimentales choisies, à une vitesse facilement mesurable.

La caractérisation expérimentale des énantiomères d'un mélange d'antipodes (R et S par exemple) est possible grâce à la différence de comportement de chacun d'eux face à un réactif ou un phénomène chiral. Par conséquent, la méthode choisie dans le cadre de ce travail pour la détermination du rapport énantiomérique des acides aminés est l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (colonne optiquement active) de l'acide aminé isolé après que l'équilibre de la réaction est atteint.

Les mélanges équimolaires d'antipodes sont appelés mélanges racémiques. Dans ce cas, la surface du pic de chaque antipode est identique. Pour des mélanges enrichis en l'un ou l'autre des antipodes en revanche, le rapport des surfaces des pics devient différent de 1.

La pureté optique ou l'excès énantiomérique est défini comme suit:

$$\%ee = (R-S/R+S).100$$

où R et S représentent le nombre de molécules de chaque énantiomère.

La mesure de l'excès énantiomérique de l'acide aminé pour un complexe cuivre-ligand-base de Schiff donné permet de suivre la racémisation, si l'on part de l'un ou de l'autre des antipodes et la rétro-racémisation, si l'on part du mélange racémique.

4.2 Résultats.

4.2.1 Salicyaldéhyde-phénylalanine.

4.2.1.a Cinétique de rétoracémisation. -

Tableau 4-1:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction du temps pour 1 équivalent de ligand à 25 °C.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	sal 1	SS-BPABP 1	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=25 °C pH=10.2 Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M H ₂ O/MeOH (1:1)			
<u>t [h]</u>	<u>%ee</u>	<u>ln(ee⁰⁰-ee^t / ee⁰⁰)</u>		
5.00	6.2	-0.47		
13.75	12.4	-1.43		
24.00	14.5	-2.20		
37.60	16.3	-		
53.00	16.3	-		
78.40	15.8	-		

Tableau 4-2:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 25 °C.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	sal 1	SS-BPABP 6	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=25 °C pH=10.20 Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M H ₂ O/MeOH (1:1)			
<u>t [h]</u>	<u>%ee</u>		<u>ln(ee[∞]-ee^t / ee[∞])</u>	
1	4.2	5.7	-0.21	-0.30
2	7.0		-0.38	
3	9.3	9.0	-0.55	-0.53
4	9.3		-0.55	
5	10.4	10.4	-0.64	
6	11.5		-0.74	
7	12.2		-0.81	
8	13.2		-0.92	
140	22.0		-	

Tableau 4-3:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 15 °C.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	Sal 1	SS-BPABP 6	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=15 °C pH=10.18 Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M H ₂ O/MeOH (1:1)			
<u>t [h]</u>	<u>%ee</u>		<u>ln(ee[∞] - ee^t / ee[∞])</u>	
11.7	6.8		-0.30	
27.3	12.0		-0.62	
52.4	18.6		-1.26	
122.8	26.0		-	
146.5	26.0		-	

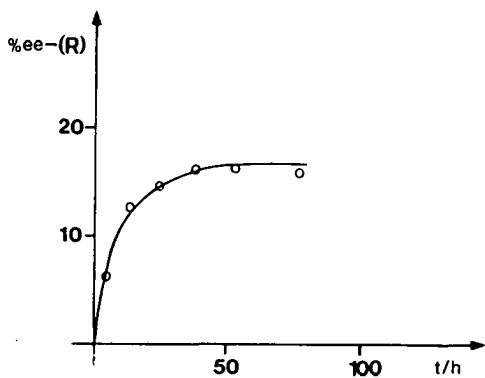


fig. 4-3 ; %ee en fonction du temps pour 1 équivalent de ligand à 25 °C.

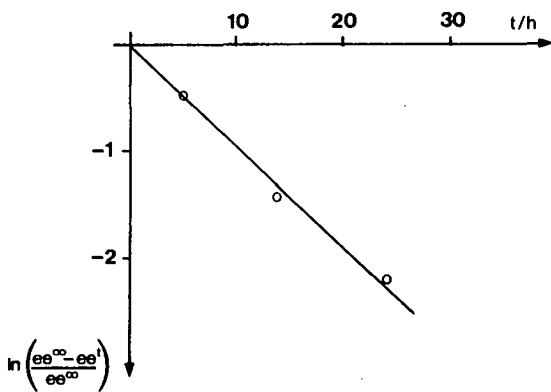


fig. 4-4 ; $\ln\left(\frac{ee^\infty - ee^t}{ee^\infty}\right)$ en fonction de temps pour 1 équivalent de ligand à 25 °C.

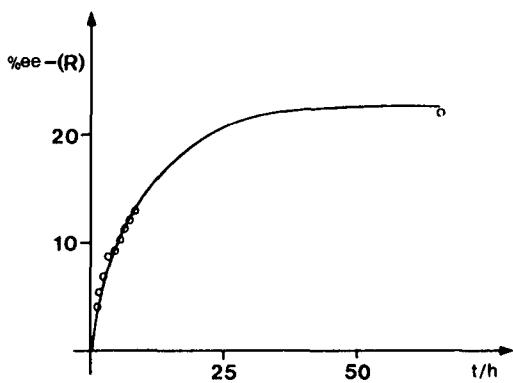


fig. 4-5 ; $\%ee$ en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 25 °C.

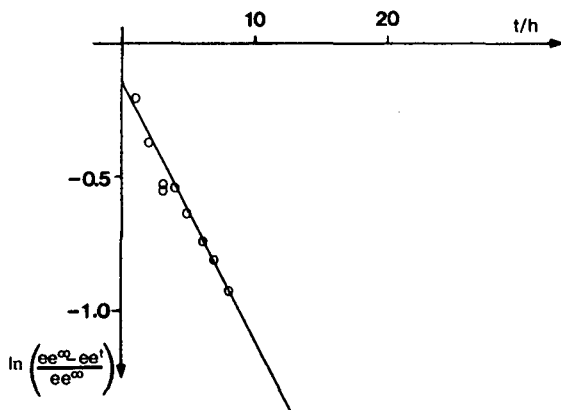


fig. 4-6 ; $\ln\left(\frac{ee^\infty - ee^t}{ee^\infty}\right)$ en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 25 °C.

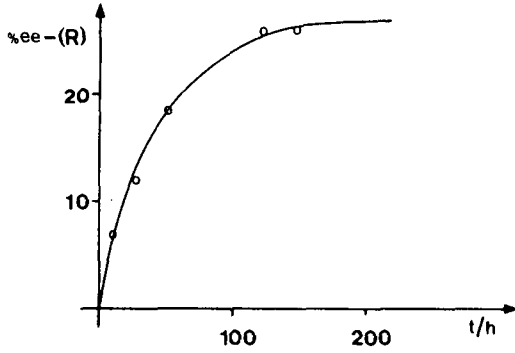


fig. 4-7 : %ee en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 15 °C.

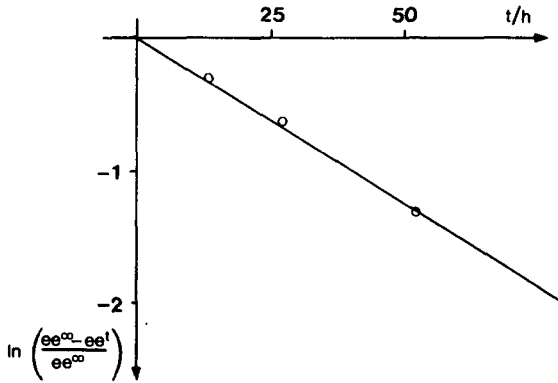


fig. 4-8 : $\ln\left(\frac{ee^\infty - ee^t}{ee^\infty}\right)$ en fonction du temps pour 6 équivalents de ligand à 15 °C.

4.2.1.b Variation de la concentration en ligand. -

Tableau 4-4:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction de la concentration du ligand.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺	sal	SS-BPABP	RS-phe
	1	1	x	1
	2.5.10 ⁻³ M			
<u>Conditions:</u>	T=amb Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ 0.1M H ₂ O/MeOH (1:1)			t=12j
<u>éq.</u>	<u>ligand</u>	<u>%ee</u>	<u>pH</u>	
0.4		5.5	10.15	
0.8		10.3	10.20	
1.0		15.0	10.20	
1.2		16.4	10.10	
1.6		18.3	10.20	
2.0		19.4	10.20	
4.0		22.4	10.25	
6.0		24.5	10.20	

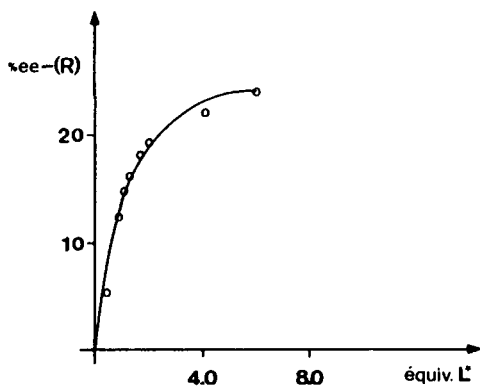


fig. 4-9 : %ee en fonction de la concentration en ligand à température ambiante.

4.2.1.c Variation de la température. -

Tableau 4-5:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction de la température.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	sal 1	SS-BPABP 6	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M H ₂ O/MeOH (1:1)			
<u>T °C</u>	<u>1/T K</u>		<u>%ee</u>	<u>pH</u>
15	0.00347		26	10.18
25	0.00336		22	10.20
35	0.00324		17	10.25

1) Valeurs obtenues à partir des mesures indiquées sous 4.2.1 a, tableaux 4-2 et 4-3.

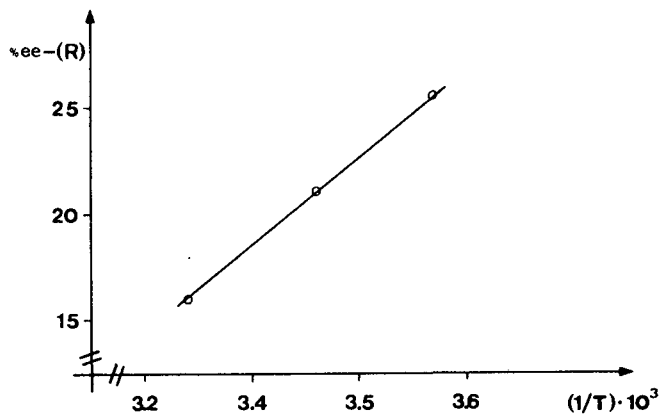


fig. 4-10 : %ee en fonction de 1/T pour 6 équivalents de ligand.

4.2.1.d Variation de la concentration totale Co. -

Tableau 4-6:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction de la concentration totale.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺	sal	SS-BPABP	RS-phe
1	1	1	1.0	1 A
1	1	1	1.3	1 B
1	1	1	6.0	1 C

<u>Conditions:</u>	A:	Co=1.25.10 ⁻³ M	2.5.10 ⁻³ M	T=25 °C
	B:	Co=2.5.10 ⁻³ M	5.0.10 ⁻³ M	T=amb.
	C:	Co=5.0.10 ⁻⁴ M	1.25.10 ⁻³ M	2.5.10 ⁻³ M

T=amb.
 Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1M
 MeOH/H₂O (1:1)

	Co	pH	%ee
A	1.25.10 ⁻³ M	10.2	9.3
	2.5.10 ⁻³ M	10.2	13.7
B	2.5.10 ⁻³ M	10.1	18.0
	5.0.10 ⁻³ M	10.2	23.0
C	5.0.10 ⁻⁴ M	10.25	24.5
	1.25.10 ⁻³ M	10.2	22.0
	2.5.10 ⁻³ M	10.2	24.0

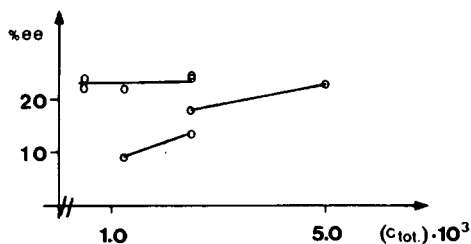


fig. 4-11 : %ee en fonction de la concentration totale du système.

4.2.1.e Variation du rapport des solvants. -

Tableau 4-7:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en fonction du rapport MeOH/H₂O.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	sal 1	SS-BPABP 6	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M t=6j (1:1)		t=18j (1.5:1)	
T °C	pH	%ee	MeOH/H ₂ O	
28	10.20	19.4	1.5/1	
25	10.20	22.0	1/1	

4.2.1.f Mesures à basse température. -

Tableau 4-8:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine dans le méthanol à basse température.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.0.10 ⁻² M	sal 1	SS-BPABP 2	S-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=0 °C	pH=13		
	T=-25 °C	pH=13		
	T=-50 °C	pH=12.4		
		%ee	t [h]	
T=0 °C		23.9	48.00	
T=-25 °C		41.0	16.25	
		40.3	65.25	
		45.2	160.10	
		45.2	255.80	
T=-50 °C		43.9	312.00	

4.2.1.g Variation du ligand. -

Tableau 4-9:

Mesure de l'excès énantiomérique en R-phénylalanine en présence de S-PIPEA.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	sal 1	S-PIPEA x	RS-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=28 °C pH=10.25 pH=10.25 Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M MeOH/H ₂ O (1:1)			
			x=1 x=6	
<u>%ee en R-phe</u>		éq.	L*	t[[j]
0.9		1	10	
9.4		6	10	

4.2.2 Pyridoxal-acide aminé.

De grandes précautions ont dû être prises pour la réalisation de ce travail, afin d'éviter la présence d'oxygène dans le milieu réactionnel. En effet, comme cela a été exposé au chapitre 3, l'acide aminé se décompose rapidement en céto-acide et ammoniacque, dans un milieu oxydant.

4.2.2.a Phénylalanine-BPABP. -

Tableau 4-10:

Racémisation et rétro-racémisation de la phénylalanine.

<u>Système:</u>		Cu ²⁺	PL	RR-BPABP	R,S,RS-phe
		1	1	6	1
		2.5.10 ⁻³ M			
<u>Conditions:</u>		T=25 °C atmosphère de N ₂			
		pH=10.2 (S-phe)			
		pH=10.2 (R-phe)			
		pH=10.2 (RS-phe)			
		Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M			
		MeOH/H ₂ O (1:1)			
<u>S-phe</u>	<u>t[h]</u>	<u>R-phe</u>	<u>t[h]</u>	<u>RS-phe</u>	<u>t[h]</u>
<u>%ee</u>		<u>%ee</u>		<u>%ee</u>	
50.1S	0.38	45.3R	0.25	0.2R	0.33
36.7S	0.55	30.2R	0.50	1.0R	0.47
25.5S	1.00	-	-	0.0	0.75
19.8S	2.00	13.2R	2.00	0.7S	0.97
17.2S	4.10	11.1R	4.00	3.0S	3.00
14.0S	6.00	7.0R	5.87	1.0S	5.00
10.1S	9.45	3.7R	9.33	4.2S	7.00
13.4S	12.40	4.1S	12.30	12.1S	23.27
8.7S	22.10	5.7S	22.00	10.1S	30.57
11.7S	30.30	9.7S	30.10	11.9S	47.27
9.8S	45.00	8.4S	45.00	-	-

4.2.2.b Valine-BPABP. -

Tableau 4-11:

Racémisation et rétroracémisation de la valine.

<u>Système:</u>		Cu ²⁺	PL	RR-BPABP	R,S,RS-val
		1	1	6	1
		2.5.10 ⁻³ M			
<u>Conditions:</u>		T=25 °C atmosphère de N ₂			
		pH=10.21 (RS-val)			
		pH=10.22 (S-val)			
		pH=10.20 (R-val)			
		Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M			
		MeOH/H ₂ O (1:1)			
<u>S-val</u>	<u>t[h]</u>	<u>R-val</u>	<u>t[h]</u>	<u>RS-val</u>	<u>t[h]</u>
<u>%ee</u>		<u>%ee</u>		<u>%ee</u>	
90.8S	4.0	80.6R	4.0	1.3S	4.0
80.0S	11.0	72.2R	11.0	1.2S	11.0
66.2S	24.0	56.8R	24.0	1.0S	24.0
58.3S	36.6	50.4R	36.2	1.3S	36.5
50.5S	53.0	44.8R	53.2	8.0S	53.2
39.2S	75.0	-	-	14.7S	75.3
-	-	23.6R	166.0	-	-

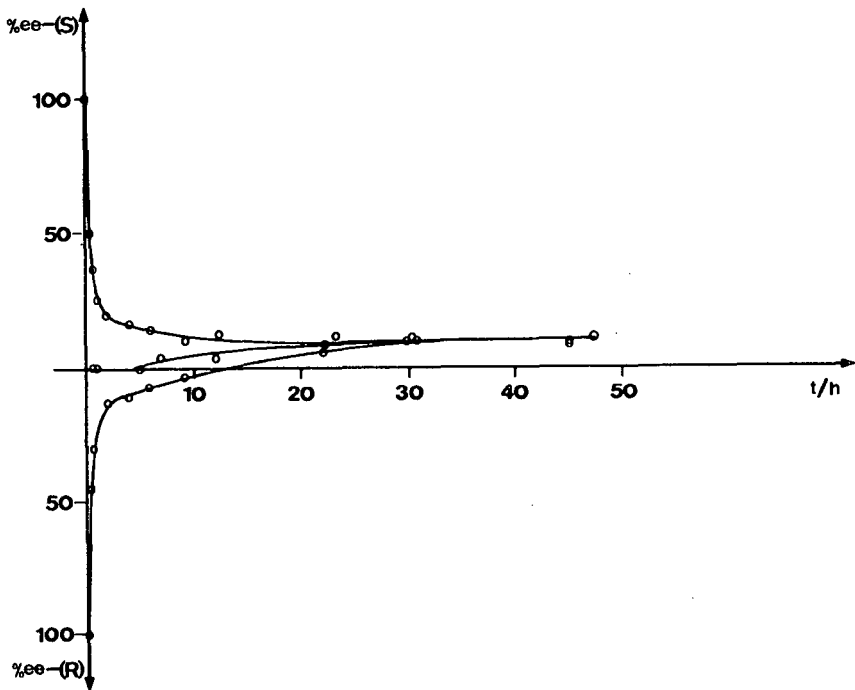


fig. 4-12 : Racémisation et rétro-racémisation de la phénylalanine.

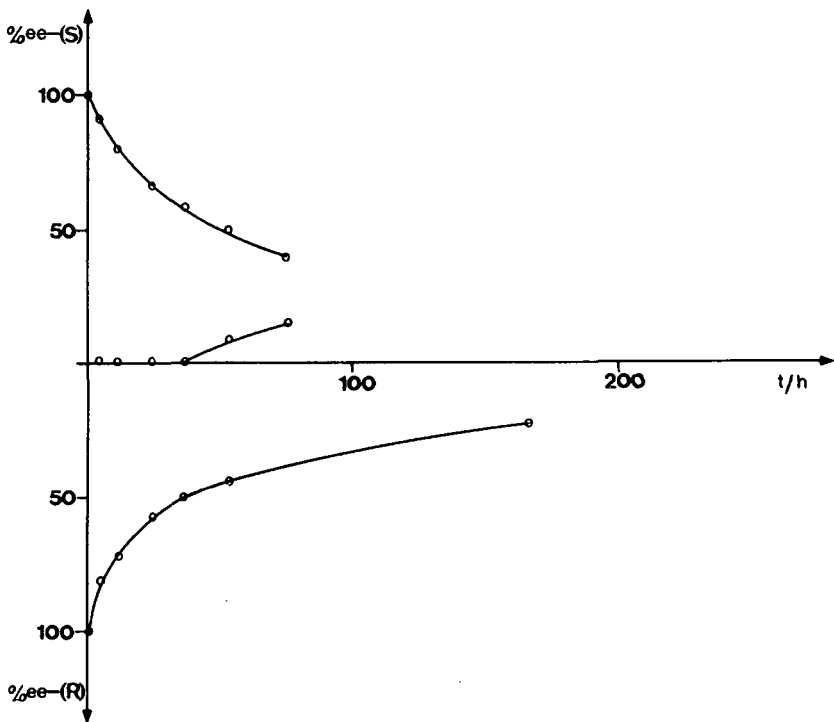


fig. 4-13 : Racémisation et rétro-racémisation de la valine.

Remarques.

Malgré les précautions prises pour protéger le mélange réactionnel de l'oxygène, la réaction de la valine n'a pas pu être suivie jusqu'à l'équilibre, vu la décomposition de la solution.

La complexité du système empêche une étude cinétique détaillée dans le cadre de ce travail.

Cependant, une appréciation qualitative de la situation peut tout de même être donnée.

La lecture des courbes obtenues montre qu'il n'y a aucune rétro-racémisation du RS-acide aminé en début de réaction, alors que la racémisation soit du S soit du R-acide aminé est rapide. Au moment où la rétro-racémisation du RS-acide aminé commence, la racémisation des antipodes S et R devient plus lente.

A l'équilibre, les trois courbes tendent vers une valeur différente de zéro (soit environ 27% pour la valine (valeur obtenue par extrapolation) et 10% pour la phénylalanine).

Une représentation graphique de $\ln(ee^{\infty} - ee^t)$ en fonction de t pour la S et la R-phénylalanine (figure 4-14) illustre très bien ce phénomène.

- o Période A: racémisation de l'acide aminé sur le complexe de base de Schiff sans ligand. Hypothèse confirmée par la détermination indépendante de la constante de vitesse de racémisation du complexe sans ligand soit $[\text{CuPL-S-phe}]$ (tableau 4-14).
- o Période B: racémisation de l'acide aminé sur le complexe mixte $[\text{CuL}^*\text{PL-S ou R-phe}]$.

Il semble donc que la réaction de racémisation sur le complexe $[\text{Cu}^*\text{al}^*]$ est beaucoup plus rapide que la formation du complexe $[\text{CuL}^*\text{al}^*]$. et que la réaction de racémisation est plus lente sur le complexe mixte $[\text{CuL}^*\text{al}^*]$ que sur le complexe $[\text{Cu}^*\text{al}^*]$.

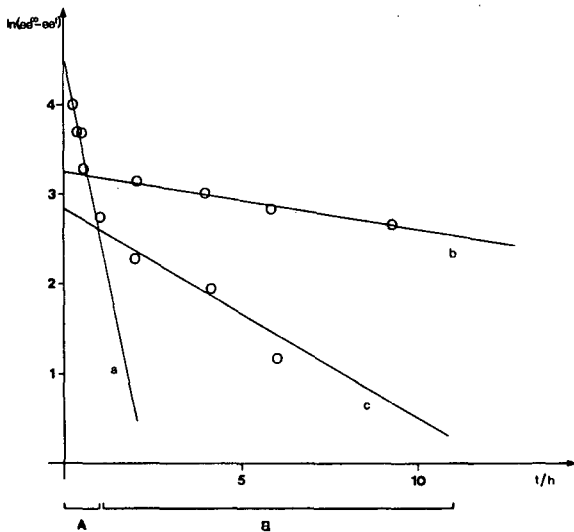


fig. 4-14 : Représentation graphique de $\ln(e^{e^{\infty}} - e^{e^t})$ en fonction du temps pour les complexes $[\text{CuL}^*\text{PL-R-phe}]$ et $[\text{CuL}^*\text{PL-S-phe}]$.
 a) Cinétique de racémisation des solutions contenant $[\text{CuL}^*\text{PL-R-phe}]$ et $[\text{CuL}^*\text{PL-S-phe}]$ dans la première heure de réaction.
 b) Cinétique de racémisation de la solution contenant le complexe $[\text{CuL}^*\text{PL-R-phe}]$ après environ une heure de réaction.
 c) Cinétique de racémisation de la solution contenant le complexe $[\text{CuL}^*\text{PL-S-phe}]$ après environ une heure de réaction.

4.2.2.c Phénylalanine-BABP. -

Tableau 4-12:

Racémisation et rétro-racémisation de la phénylalanine en présence de BABP.

<u>Système:</u>	Cu ²⁺ 1 2.5.10 ⁻³ M	PL 1	BABP* 2	R,S,RS,-phe 1
<u>Conditions:</u>	T=amb. Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 0.1M			
<u>Solvant:</u>	H ₂ O	pH=10.2 S-phe pH=10.2 RS-phe pH=10.3 R-phe		
<u>Solvant:</u>	H ₂ O/MeOH (70/30)	pH=8.1 R-phe pH=8.1 RS-phe		
		<u>%ee en R-phe</u>	<u>solvant</u>	
CuPL(+)BABP	S-phe	6.97	H ₂ O	
	RS-phe	6.75	H ₂ O	
	R-phe	15.70	H ₂ O	
CuPL(+)BABP	RS-phe	12.4	H ₂ O/MeOH	
	R-phe	10.8	H ₂ O/MeOH	

4.3 Discussion des résultats.

Il est intéressant ici de résumer en quelques lignes les conclusions tirées par Holm, au sujet de son travail sur la cinétique de racémisation des complexes de base de Schiff <65>. Ces renseignements seront d'une grande utilité pour l'interprétation des résultats de ce chapitre.

- o Holm classe les complexes étudiés selon leurs vitesses de racémisation; l'ordre en est le suivant: $[\text{Cu}(4\text{-NO}_2\text{sal-L-val})] > [\text{Cu}(3,2\text{-hpy-L-val})] > [\text{Cu}(\text{pyr-L-val})] \gg [\text{Cu}(\text{sal-L-val})]$
- o Le terme le plus remarquable de cette série est la vitesse de racémisation très lente (environ dix fois plus que les autres) du complexe comprenant le salicylaldehyde.
- o Comme pour ce dernier complexe, la stabilisation par résonance de l'intermédiaire anionique ($1 \leftrightarrow 2$) (figure 4-15) est relativement faible (et ceci à cause du manque de groupements attracteurs, en ortho ou en para de la fonction azoméline). La formation de l'intermédiaire anionique requiert une grande énergie d'activation, d'où une basse vitesse de réaction.

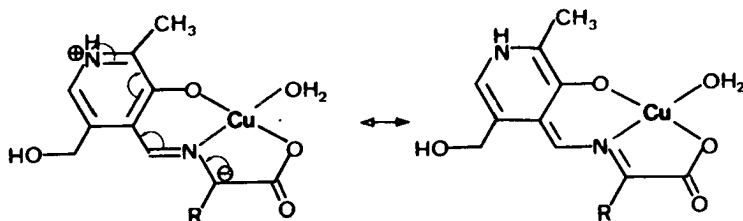


fig. 4-15 : Stabilisation par résonance de l'intermédiaire anionique du complexe $[\text{Cu}1]$ dans le cas du pyridoxal.

L'étude cinétique de la réaction de rétro-racémisation montre que celle-ci est de pseudo-premier ordre. La constante de vitesse $k_{\text{re}}(\text{obs.})$ est calculée par régression linéaire. Le facteur de corrélation (>99%) est bon étant donné le grand nombre de manipulations nécessaires pour

l'obtention d'un des points de la courbe. Les constantes de vitesse obtenues sont réunies dans le tableau 4-13.

Tableau 4-13:

Constantes de vitesse de racémisation et de rétro-racémisation obtenues à partir des mesures de chromatographie en phase gazeuse.

Complexe	T °C	k(obs.) min ⁻¹	
Cusal-S-phe ¹⁾	25	5.11.10 ⁻³	
CuBPABP*sai-RS-phe			
1 éq. L*	25	1.51.10 ⁻³	
6 éq. L*	25	1.48.10 ⁻³	
6 éq. L*	15	0.39.10 ⁻³	
CuPL-S-phe ¹⁾	25	3.05.10 ⁻²	
CuBPABP*PL-phe ²⁾			
R-phe	25	3.12.10 ⁻²	1.2.10 ⁻³
S-phe	25	3.12.10 ⁻²	4.33.10 ⁻³

1) Mesures chiroptiques

2) Détermination graphique de k à partir du diagramme de la figure 4-14.

Au paragraphe 4.2.1.a, il semble que le ligand ait peu d'influence sur la vitesse de racémisation du complexe de base de Schiff comprenant le salicylaldéhyde. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par la valeur de krac. obtenue pour le complexe de base de Schiff sans ligand ([Cusal-S-phe]) (tableau 4-13). En revanche, aux paragraphes 4.2.2.a et 4.2.2.b, les expériences menées avec le pyridoxal montrent un net ralentissement de la vitesse de racémisation du complexe de base de Schiff, en présence du ligand. La valeur moyenne obtenue pour le complexe mixte avec le ligand est d'environ 3.0.10⁻³ min⁻¹, tandis que celle du complexe sans ligand est de 3.05.10⁻² min⁻¹ (cf. tableau 4-13).

Ce ralentissement de la réaction de racémisation du complexe mixte [CuL*PLAA] peut résulter d'une moins bonne stabilisation par résonance du carbanion intermédiaire, d'où une augmentation de l'énergie d'activation.

Il est en effet possible que la présence du ligand impose au cycle portant la fonction azométhine une structure non-planaire, qui défavorise la résonnance avec le pyridoxal.

Cet effet est moins marqué avec le salicylaldéhyde puisque, de toute manière, le carbanion intermédiaire est peu stabilisé par le cycle aromatique de l'aldéhyde.

L'abaissement de la température entraîne une diminution de l'énergie moyenne des particules, qui se traduit par une vitesse de réaction plus lente (§ 4.2.1.c).

Au paragraphe 4.2.1.b, on constate que l'augmentation de la concentration en ligand s'accompagne d'une élévation de la stéréosélectivité jusqu'à une valeur limite (6 éq. de ligand), correspondant à la quantité maximum de complexe $[CuL*al]$ qui peut être formée dans les conditions expérimentales standard choisies ici.

L'abaissement de la température (paragraphe 4.2.1.c) a pour conséquence une augmentation de l'excès énantiomérique (17% lorsque $T=35^{\circ}C$; 26% lorsque $T=15^{\circ}C$). Cette variation peut s'expliquer par un accroissement de K_{SSRS} , suite à la diminution de la température ($\Delta G = -RT \ln K$).

Il n'a pas été possible d'abaisser la température en dessous de $15^{\circ}C$ dans les conditions expérimentales standard choisies (solvant, tampon), sans qu'il apparaisse un précipité dans la solution.

L'augmentation de la concentration totale entraîne également une augmentation de l'excès énantiomérique, par l'accroissement de la concentration de $[CuL*al]$. Grâce à ces mesures, une estimation de la quantité de complexe mixte ($[CuL*al]$) présente dans la solution est possible. Les valeurs obtenues figurent dans le tableau 4-14.

Tableau 4-14:

Z de complexe mixte [CuL*al] formé dans le mélange réactionnel

			Z complexe
1.3 éq.	L*	T=amb.	60 ± 5
1.0 éq.	L*	T=25 °C	45 ± 8

Le principe de la méthode repose sur le fait qu'un changement de la concentration influence davantage la teneur du complexe mixte [ML*al] que celle des espèces non-mixtes [ML*] et [Mal].

Dans la réaction (4-1), la variation relative de la teneur du complexe mixte [ML*al] en fonction de la concentration totale, par rapport à celle des espèces non-mixtes, est elle-même une fonction de la stabilité relative du complexe mixte.



En admettant que le rendement optique est directement proportionnel à la concentration de [CuL*al], la variation de l'excès énantiomérique en fonction de la concentration totale du système devrait permettre une estimation de la concentration relative du complexe mixte. <64> <47>

A partir des mesures obtenues pour Z_{ee} en fonction de la concentration totale du système (figure 4-11), il a été possible de calculer le pourcentage approximatif moyen de complexe mixte se trouvant dans la solution d'analyse (tableau 4-14).

Il en résulte la possibilité de calculer la sélectivité réelle du système étudié, soit: 34% ee pour 1.3 éq. de ligand à température ambiante et 26% ee pour 1.0 éq. de ligand à 25 °C.

En ce qui concerne la modification du rapport H₂O/MeOH (paragraphe 4.2.1.e), il s'avère que la marge de travail est très petite. L'addition d'un léger excès d'eau entraîne la précipitation du complexe, tandis qu'une addition trop importante de méthanol provoque la précipitation du tampon carbonate.

Dans le domaine étudié, la variation du rapport MeOH/H₂O n'influence pas beaucoup la sélectivité.

Le choix du méthanol, comme solvant de la réaction de racémisation, permet d'abaisser la température jusqu'à -50 °C sans qu'il y ait apparition d'un précipité. Il en résulte une grande augmentation de l'excès énantiomérique, qui est due aux facteurs suivants:

- o Augmentation de K_{Schiff} comme conséquence de l'abaissement de la température.
- o Augmentation de la concentration totale du complexe mixte [CuL*al], due à une meilleure formation de la base de Schiff dans un milieu non-aqueux.



Le ligand bidenté S-PIPEA a une sélectivité relativement faible. N'étant pas caractérisé par une symétrie C₂, il peut en effet se fixer au complexe de base de Schiff de plusieurs manières, d'où une diminution de la sélectivité.

Le ligand (+)-BAPP présente une sélectivité comparable à celle obtenue avec BPAPP. Malheureusement, le dédoublement de ce ligand s'avère très laborieux, et la quantité de ligand optiquement actif obtenue est très petite. Il en résulte peu de possibilités de mesures.

En conclusion:

- o Le choix d'un ligand à symétrie C₂ favorise l'obtention d'une bonne sélectivité.
- o L'addition du ligand au complexe de base de Schiff déstabilise le carbanion intermédiaire de la réaction de racémisation, par déformation du cycle comprenant la fonction azométhine.
- o L'abaissement de la température favorise la sélectivité du système par augmentation de K_{Schiff} .

- o L'accroissement de la concentration totale du système conduit à une meilleure sélectivité, par augmentation de la concentration en complexe mixte [CuL*al*].
- o Les sélectivités obtenues avec les complexes de base de Schiff contenant le pyridoxal ou le salicylaldéhyde sont comparables.
- o¹ Avec le salicylaldéhyde, la vitesse de racémisation des différents acides aminés (leucine, alanine et valine) est beaucoup trop lente pour que cette étude soit aisément possible.

3

97

CHAPTER 5

ETUDE DE LA REACTIVITE DU SYSTEME CUIVRE(II)/LI-GAND/ALDEHYDE SALICYLIQUE/ACIDE AMINE PAR MESURE DU DICHROISME CIRCULAIRE:FORMATION DES COMPLEXES MIXTES DE BASE DE SCHIFF, RACEMISATION.

5.1 Introduction

Dans ses travaux sur la transamination stéréosélective entre un céto acide et le pyridoxamine, Deschenaux <47> a montré qu'il était possible de déterminer le rapport énantiomérique du produit par la mesure de l'intensité de la bande CD, lors de la formation du complexe Cu -aldimine, aux environs de 390 nm.

En effet, Deschenaux a montré qu'à un pH de 4.0 à 5.5, l'apparition de cette bande et son intensité n'étaient pas influencées par la présence d'un ligand optiquement actif. Ainsi, le rapport énantiomérique obtenu correspondait, aux limites d'erreur près, à celui obtenu lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

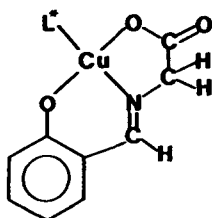
Comme cette méthode est beaucoup plus rapide et beaucoup plus simple que l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, elle permet d'obtenir un nombre de résultats plus élevé. Il était donc intéressant d'examiner si cette méthode pouvait également être utilisée pour suivre la réaction de rétro-racémisation.

Comme Deschenaux l'a montré, l'apparition de la bande CD aux environs de 390 nm est due à la perturbation dissymétrique de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ créée par la présence d'un carbone asymétrique en position α de la double liaison C=N. Cette transition est également responsable de la bande

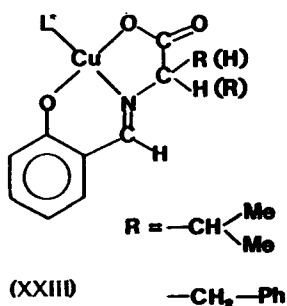
d'absorption dans la même région.

Dans un complexe mixte optiquement actif comprenant la glycine comme acide aminé, cette transition $\pi \rightarrow \pi^*$ devrait donc être optiquement inactive, à condition qu'il n'y ait pas d'interactions non-liantes dissymétriques entre les ligands imposant un effet vicinal conformationnel à cette dernière. L'absence de tels effets conformationnels constitue donc une condition d'application directe d'une mesure du dichroïsme circulaire à la détermination du rapport énantiomérique d'un acide aminé non-racémique, dans un complexe mixte de base de Schiff.

Les mesures présentées dans ce chapitre se limitent aux composés formés de l'aldéhyde salicylique (composé carbonyle de la base de Schiff) et des acides aminés glycine, valine et phénylalanine.



(XXII)



(XXIII)

Le composé tridenté (S,S)-BPABP et le composé bidenté (S)-PIPEA (voir page 18) ont été utilisés comme ligands.

5.2 Le système Cuivre(II)/ligand/salicyaldéhyde/-glycine.

Au cours de la formation du complexe Cu^{2+} -salicylidène-glycine, lorsque la solution réactionnelle contient un ligand optiquement actif, on observe en même temps que la variation du spectre UV l'apparition d'une bande CD. Le maximum de cette bande se situe pratiquement à la même longueur d'onde que celui du spectre UV du complexe de la base de Schiff (fig 5-1).

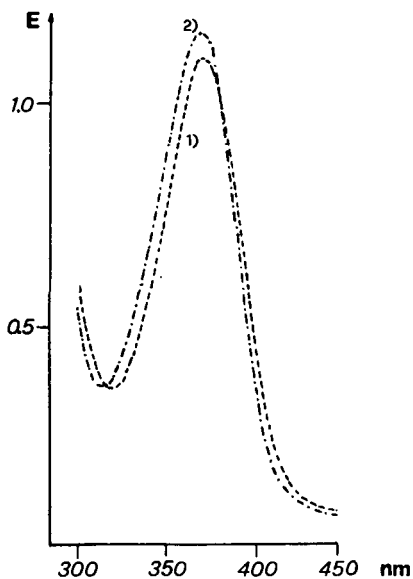


fig.5-1 (a)

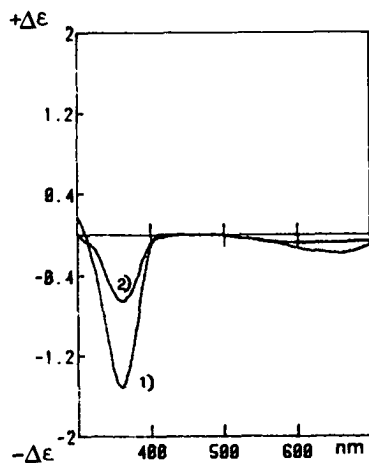


fig.5-1 (b)

fig 5-1 : Spectres UV (a) et CD (b) de
 Cu(sal-gly).L
 L= (S,S)-BPABP (1) et (S)-PIPEA (2)
 $CCu^{2+} = Caal = CL = 2.5 \cdot 10^{-3}$; $Cgly = 7.5 \cdot 10^{-3}$
 pH=9.7

Lorsque l'on compare la vitesse d'apparition du signal CD avec la variation du spectre UV, on constate que les deux variations relatives se déroulent à la même vitesse. En outre, elles ne dépendent que peu de la nature du ligand (figure 5-2).

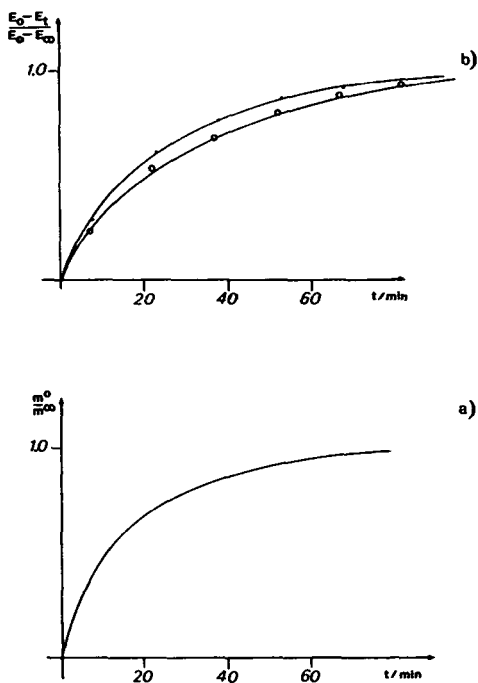


fig 5-2 : Vitesse de la variation relative du spectre CD ($\lambda=355\text{nm}$) (a) et du spectre UV ($\lambda=390\text{nm}$) (b). Conditions réactionnelles comme indiquées dans la figure 5-1.

○—○ : BPABP; — : PIPEA

Si l'on reporte l'intensité du signal CD en fonction de la concentration du ligand, on constate que cette intensité tend vers une valeur limite (figure 5-3). Selon la constante de formation du complexe mixte, calculée sur la base de ces mesures (cf. chapitre 2, page 33), le taux de complexe mixte est de 72% pour la valeur limite, aux conditions choisies.

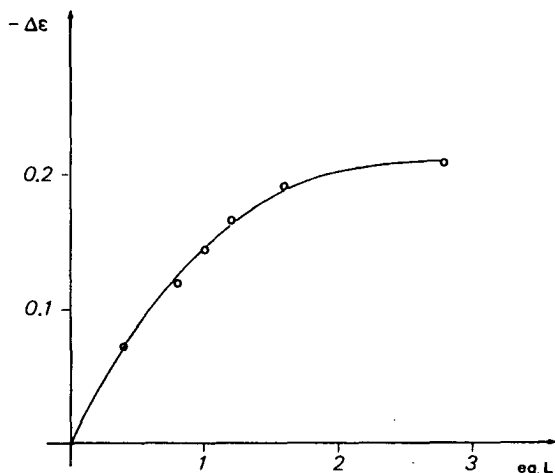


fig 5-3 : Variation de l'intensité CD ($\lambda=355\text{nm}$); $CCu^{2+}=C_{sal}=2.5.10^{-3}$; $C_{gly}=7.5.10^{-3}$; $L=(S,S)\text{-BPABP}$; $t=25^{\circ}$; MeOH/H₂O (1:1); $pH=10.5$ (tampon HCO_3^-/CO_3^{2-}).

Si l'on admet que le signal CD est dû à la présence de la double liaison dans le complexe mixte Cu^{2+} -aldimine-ligand, ce dernier se formant lentement (cf. schéma réactionnel décrit dans la thèse de Deschenaux <47>), une activité optique peut apparaître dans le chromophore C=N, de par la présence d'un effet vicinal dû à un centre asymétrique proche ou en raison d'une conformation privilégiée du cycle de chélation dans laquelle se trouve le chromophore (Hawkins, p.176 <71>).

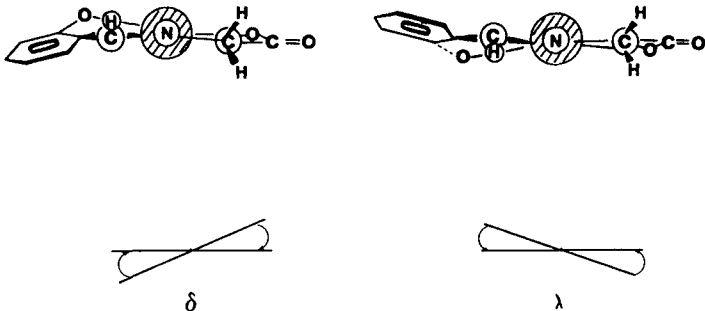


fig 5-4 : Conformations énantiomères du complexe Cu²⁺-salicylidèneglycine.

Il n'est bien sûr pas possible de conclure à l'une ou l'autre de ces conformations sur la seule base du signe de la bande CD observée, pour un ligand de configuration absolue donnée.

Une hypothèse peut cependant être proposée lorsque l'on prend également en considération les résultats de la rétoracémisation, ainsi que les spectres CD obtenus pour les complexes mixtes des bases de Schiff d'acides aminés optiquement actifs.

Avant de discuter cette hypothèse, nous présentons donc les spectres CD obtenus pour les acides aminés phénylalanine et valine.

5.3 Les systèmes cuivre(II)/ligand/salicylaldehyde/phénylalanine/.

Lorsque l'on fait réagir un mélange équimolaire de Cu²⁺, BPABP, salicylaldehyde et phénylalanine, le spectre UV varie d'une manière tout à fait semblable à celle observée pour le système analogue comprenant la glycine (figure 5-5).

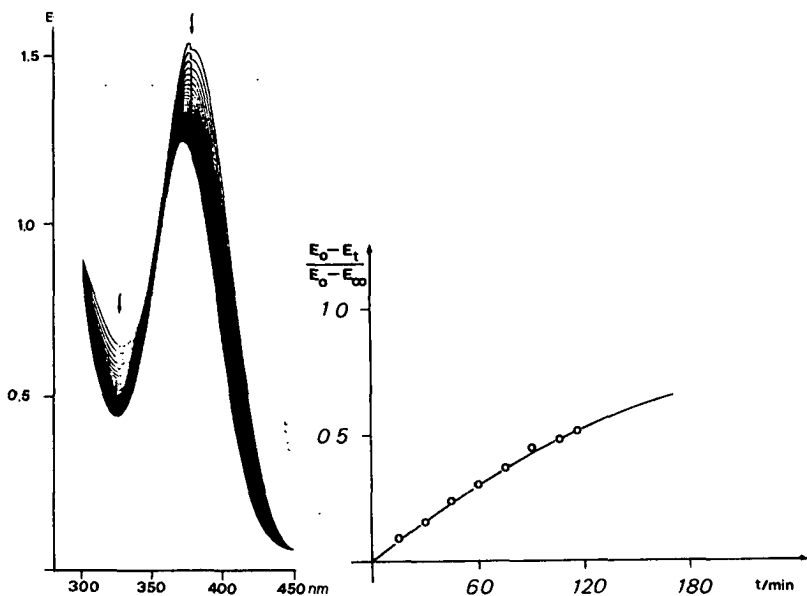


fig 5-5a) : Variation du spectre UV d'une solution $CCu=Csa1=CBPABP=Cphe=2.5.10^{-3}$, $MeOH/H_2O(1:1)$; $pH=10.2$

fig 5-5b) : Variation relative de l'absorption UV ($\lambda=370nm$). Conditions comme indiquées sous fig. 5-5a).

La mesure de la même réaction par le dichroïsme circulaire donne cependant un résultat surprenant. La figure 5-6a) montre la variation de l'intensité CD à $\lambda=375nm$ (longueur d'onde à laquelle se trouve le maximum de la bande CD) pour les deux antipodes de la phénylalanine, ainsi que pour le mélange racémique en fonction du temps. La figure 5-6b) montre les spectres CD correspondants, enregistrés au moment où l'intensité atteint son maximum.

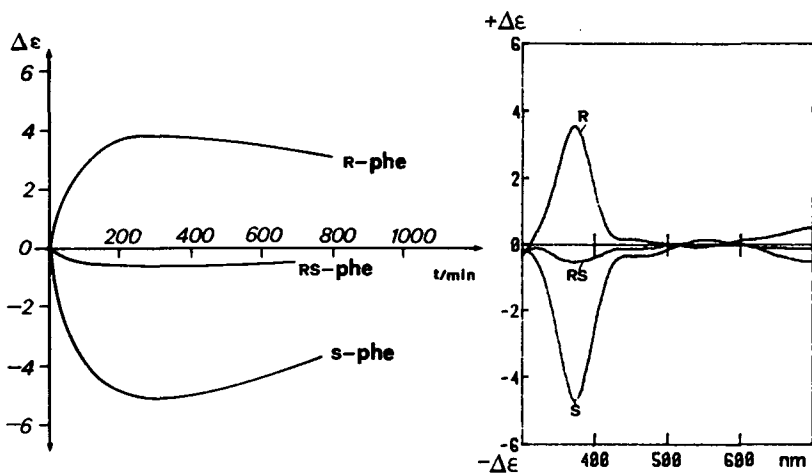


fig 5-6a) : Variation de l'intensité CD en fonction du temps ($\lambda=375\text{nm}$) $\text{CCu}=\text{Caal}=-\text{CBPABP}=\text{Cphe}=2.5.10^{-3}$, $\text{pH}=10.2$, $t=25^\circ\text{C}$

fig 5-6b) : Spectres CD du mélange réactionnel d'intensité maximale. Conditions comme indiquées sous fig 5-6a).

On observe d'abord une augmentation de l'intensité CD. La vitesse de cette évolution correspond à celle de la variation du spectre UV et peut donc être attribuée à la formation de la base de Schiff. Après avoir passé un maximum, l'intensité CD diminue pour atteindre une valeur finale commune aux différentes réactions, qu'il s'agisse initialement de l'acide aminé de configuration S ou R, ou encore du mélange racémique. Cette valeur finale est $\Delta\epsilon_{375} = +0.01 \pm 0.005$ pour le ligand de configuration (S,S). Sur la base des mesures d'analyse faites par GC et présentées au chapitre 4, nous savons que ce mélange équilibré (dans les conditions indiquées ci-dessus) contient un excès énantiomérique de 16.3% en phénylalanine de configuration (R) et que le taux de formation du complexe mixte est de $50 \pm 5\%$.

Il est intéressant de constater que la réaction avec le mélange racémique conduit également à un signal CD d'intensité supérieure à celle du mélange d'équilibre et donne une valeur maximale de $\Delta\epsilon_{375} = -0.61$.

Sur la base de la deuxième partie de la variation de l'intensité CD au cours du temps (diminution; cf fig 5-6a), on peut calculer la constante de (rétro-)racémisation de l'acide aminé. La figure 5-7 montre la détermination graphique de cette constante réactionnelle: une valeur de $7.3 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ est obtenue pour l'acide aminé de configuration (R) et une valeur de $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ pour le composé de configuration (S), valeurs que l'on peut considérer comme identiques dans les limites d'erreur.

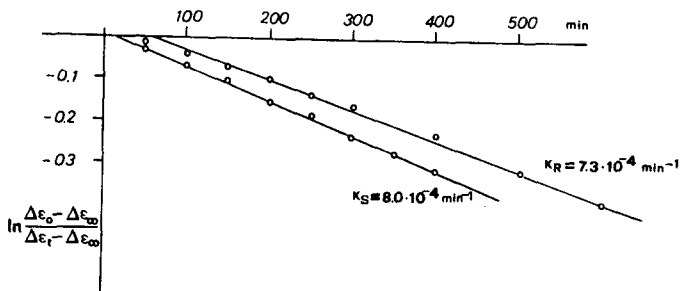
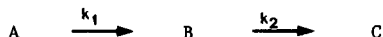


fig 5-7 : Détermination graphique de la constante de racémisation. Conditions réactionnelles comme indiquées dans la figure 5-6a).

Il n'est donc pas possible d'obtenir pour la phénylalanine les intensités CD du complexe mixte, à l'aide des résultats présentés ci-dessus, pour les trois raisons suivantes: la formation incomplète du complexe mixte, la différence de stabilité du complexe mixte par rapport aux (R) et (S) amino-acides et, finalement, la réaction de racémisation.

L'influence de la racémisation peut cependant être calculée, en la considérant comme partie d'un système de deux réactions consécutives de premier ordre:



$$[B]_{\max} = [A]_0 (k_2/k_1) \exp(k_2/k_1) / (1 - k_2/k_1)$$

En utilisant une valeur moyenne de $7.6 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ pour k_2 et de $9.4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (obtenue à partir de la vitesse initiale) pour k_1 , on peut calculer, pour le rapport $[B]_{\max} / [A]_0$, une valeur de 0.8. C'est à dire qu'au moment où l'intensité du signal CD atteint son maximum, le taux de racémisation est de 20%.

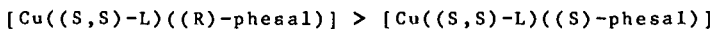
Le tableau 5.1 donne l'évolution du signal CD en fonction du temps pour les complexes de (R), (S) et (RS)-phénylalanine ainsi que les valeurs calculées pour une réaction sans racémisation (trac.=0).

Tableau 5-1: Intensité CD ($\lambda=375$) en fonction du temps:

CCu:Caal:Cphe:CSS-BPABP=1:1:1:1=2.5.10⁻³
MeOH/H₂O=(1:1); t=25°C; pH=10.2 l=0.1cm

t (min)	R-phe		S-phe		RS-phe	
	m°	Δε	m°	Δε	m°	Δε
20	+8.2	+0.99	-9.0	-1.09	-1.3	-0.16
30	+11.2	+1.36	-13.7	-1.67	-1.8	-0.22
40	+14.4	+1.75	-17.1	-2.07	-2.3	-0.28
50	+16.2	+1.96	-20.1	-2.44	-2.8	-0.34
60	+18.2	+2.21	-23.2	-2.82	-3.2	-0.39
100	+23.8	+2.88	-31.1	-3.78	-4.2	-0.51
150	+28.0	+3.39	-36.9	-4.47	-4.8	-0.58
200	+30.0	+3.64	-40.1	-4.85	-4.9	-0.59
250	+31.0	+3.76	-41.8	-5.06	-4.9	-0.60
300	+31.2	+3.78	-42.5	-5.10	-5.0	-0.61
400	+30.8	+3.73	-42.1	-5.05	-4.8	-0.59
450	+30.6	+3.71	-40.5	-4.91	-4.7	-0.57
500	+30.0	+3.64	-39.3	-4.76	-4.6	-0.56
550	+29.0	+3.52	-38.0	-4.60	-4.5	-0.55
600	+28.4	+3.44	-36.3	-4.39	-4.3	-0.52
650	+27.4	+3.32	-35.1	-4.25	-4.1	-0.49
700	+26.8	+3.25	-33.5	-4.06	-3.9	-0.47
800	+25.2	+3.05	-31.0	-3.76	-	-
900	+23.2	+2.81	-	-	-	-
1000	+21.6	+2.62	-	-	-	-
∞	+1.5	+0.18	+0.8	+0.1	+0.05	+0.06
trac. (calculé)		+4.73		-6.38		-0.76

Comme mentionné précédemment, le mélange réactionnel contient, à l'équilibre et dans des conditions indiquées, un excès énantiomérique de 16.3% en (R)-phénylalanine provenant de la réaction de racémisation. Cet excès énantiomérique résulte d'une différence de stabilité des deux complexes mixtes diastéréomères



Cette différence de stabilité doit également se manifester dans la formation des complexes mixtes avant la réaction d'interconversion (R)-acide aminé \rightleftharpoons (S)-acide aminé. Nous pouvons ainsi distinguer deux cas:

- o répartition d'équilibre des acides aminés (R) et (S) d'un mélange racémique sans interconversion des deux antipodes,
- o répartition d'équilibre des acides aminés (R) et (S) avec possibilité d'interconversion des deux antipodes (rétro-racémisation).

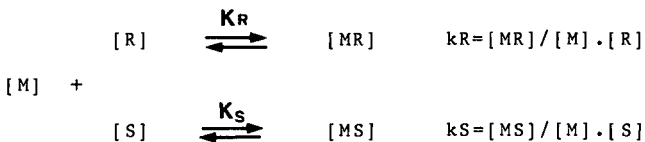
La mesure de l'excès énantiomérique obtenu par rétro-racémisation devrait ainsi permettre de calculer la stabilité relative des deux complexes mixtes.

Le calcul d'un système fortement simplifié nous permet d'illustrer ce principe:

Abréviations: M= [Cu(S,S)-BPAPP]
 R= salicylidène (R)phénylalanine
 S= salicylidène (S)phénylalanine

Equilibre sans réaction d'interconversion:

$$CR = CS$$



Bilans du système:

$$CM = [M] + [MR] + [MS]$$

$$CR = [R] + [MR]$$

$$CS = [S] + [MS]$$

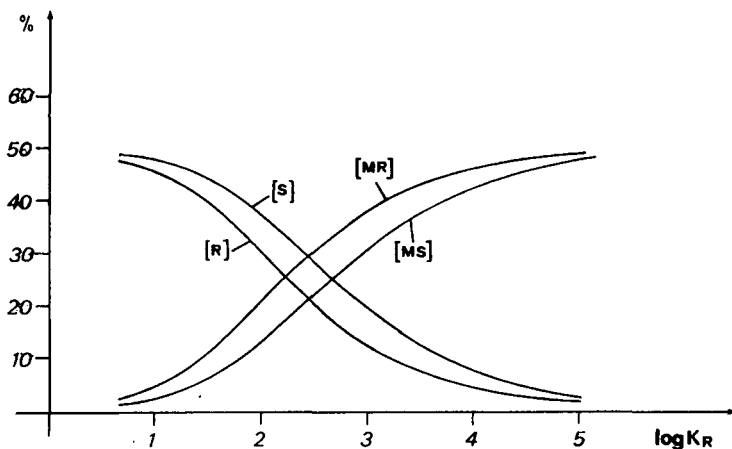
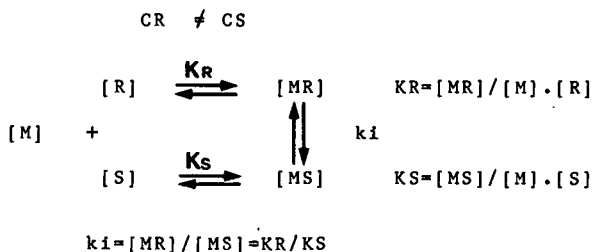


fig 5-8 : Répartition d'un ligand racémique en fonction de la stabilité des complexes mixtes: $K_R/K_S=2$; $CM=CR/2=CS/2=10^{-2}$

La répartition des espèces représentées à la figure 5-9 pour un cas théorique arbitraire, montre que la sélectivité se manifeste surtout dans le complexe lorsque la formation de ce dernier est peu importante et dans le ligand libre lorsque la concentration du complexe s'approche de sa valeur limite. En effet, pour une concentration faible en complexe, le rapport MR/MS est d'environ 2 et le rapport S/R d'environ 1. Ces rapports sont inversés au moment où la concentration du complexe atteint sa valeur limite.

b) Equilibre avec la possibilité d'interconversion (rétro-racémisation).



Bilans du système:

$$\begin{aligned}
 \text{CM} &= [M] + [MR] + [MS] \\
 \text{CRS} &= [R] + [S] + [MR] + [MS] \text{ et } [R] = [S]
 \end{aligned}$$

La figure 5-9 montre également un exemple théorique arbitraire, utilisant les mêmes données que celles du cas représenté à la figure 5-9. On remarque ici que la sélectivité ne peut s'exprimer que par le rapport des deux complexes mixtes. Il a en fait qu'elle augmente dans le système avec l'augmentation de la stabilité des complexes et atteint une valeur maximale lorsque la concentration des complexes atteint la valeur limite.

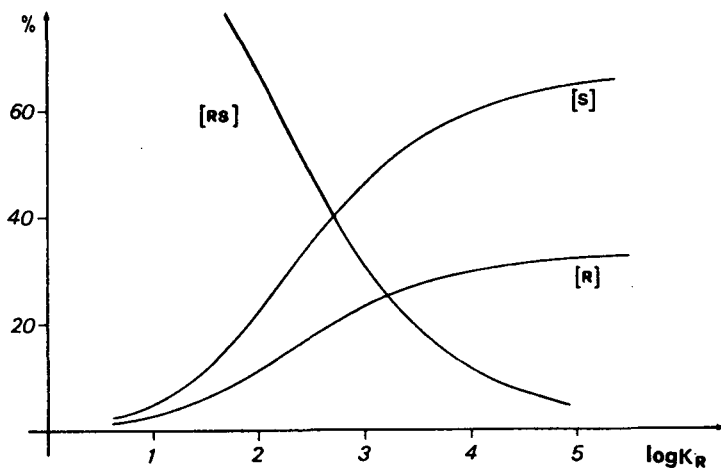


fig 5-9 : Répartition de rétroisomérisation en fonction de la stabilité des complexes mixtes. $CM=CR+CS/2=10$, $KR/KS=2$

Bien que les constantes d'équilibre du système réel (cf. schéma) ne soient connues que d'une manière approximative, la variation du taux de rétroisomérisation en fonction de la concentration du ligand (fig. 5-10), ainsi que le fait que le taux limite de formation du complexe mixte soit d'environ 72% (voir page 34) permettent d'estimer la valeur de la constante d'interconversion K_i qui, dans les conditions d'équilibre de rétroisomérisation, correspond au rapport des deux complexes mixtes diastéréomères. En admettant un excès énantiomérique limite de 25% (pour les conditions réactionnelles données), la valeur de K_i est égale à :

$$K_i = \frac{[CuL(R-BS)]}{[CuL(S-BS)]} = \frac{Co/2(1+\%ee/72)}{Co/2(1-\%ee/72)} = 2.08$$

Avec cette valeur, il devient maintenant possible de calculer les constantes apparentes des autres équilibres de formation de complexes selon le schéma réactionnel suivant:

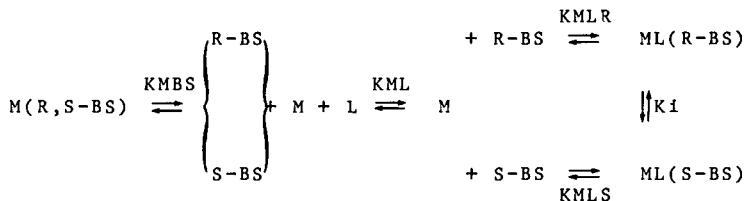


Schéma réactionnel utilisant des constantes apparentes.

Les constantes KML, KMBS, KMLR et KMLS ont été choisies de manière à reproduire le mieux possible toutes les valeurs expérimentales représentées dans la figure 5-9. La répartition des différentes espèces avant et après la mise en équilibre de rétro-racémisation indiquée dans le tableau 5-2 est obtenue à l'aide de ces valeurs.

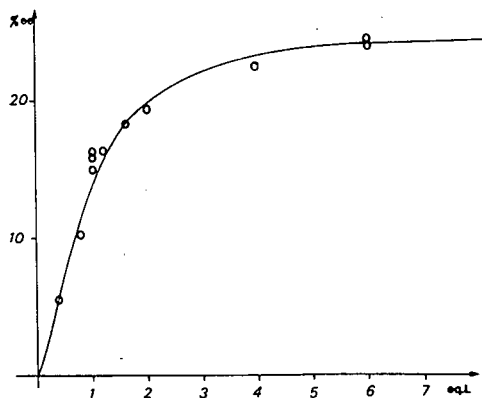


fig 5-10 : Variation de l'excès énantiomérique en fonction de la concentration du ligand.
 o o valeurs mesurées
 — valeurs calculées

Tableau 5-2: Répartition des espèces avant et après rétro-racémisation

CCu:Csal:Cphe:CL=(1:1:1:1).Co; Co=2.5.10⁻³
 pH=10.2; t=25 °C; CH₃OH:H₂O=1:1

KML=8.5.10⁹; KMBS=3.7.10¹⁰; KMLS=2.7.10³; Ki=2.08;
 KMLR=5.62.10³

	[ML]	[MBS]		[ML(R-BS)]	[ML(S-BS)]
		(R)	(S)		
Sans rétro-racémisation (R,S)-phe	4.95-04	4.44-04	5.89-04	5.93-04	3.78-04
A l'équilibre de rétro-racémisation	4.91-04	1.02-03		6.67-04	3.21-04
<u>Avec les antipodes séparés sans rétro-racémisation</u>					
R-phe	4.46-04	9.32-04	-	1.12-03	-
S-phe	5.47-04	-	1.14-03	-	8.1-04

Sur la base de ces résultats, il devient possible de calculer les spectres individuels de chacune des espèces, à partir des spectres du mélange mesuré. En admettant que le complexe ML n'a pas d'activité CD significative dans le domaine UV compris entre 300 et 450nm et en utilisant la valeur de $\Delta\epsilon$ du complexe non-mixte [CuBS] (obtenu à l'aide des mesures représentées dans la figure 5-11), on peut poser:

$$Co \cdot \Delta\epsilon_{obs} = \Delta\epsilon_{CuBS} [CuBS] + \Delta\epsilon_{CuLBS} [CuL(BS)] + \Delta\epsilon_{ML} [CuL]$$

$$\Delta\epsilon_{CuLBS} = \frac{Co \cdot \Delta\epsilon_{obs} - \Delta\epsilon_{CuBS} \cdot [CuBS]}{[CuL(BS)]}$$

Les valeurs ainsi obtenues sont représentées dans le tableau 5-3 et les spectres correspondants dans la figure 5-12.

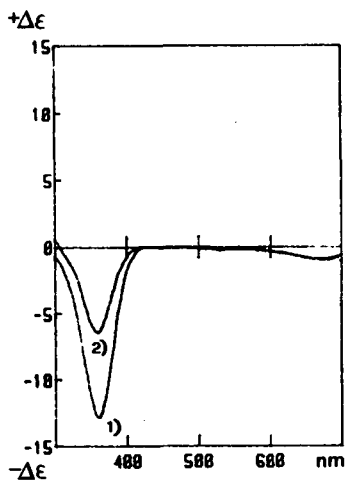


fig 5-11 : Spectres CD de Cu(sal-S-phe)(1) et de Cu(sal-S-val)(2), $C=2.5.10^{-3}$; MeOH/H₂O(1:1); pH=10.2

On constate que la bande CD qui correspond à l'absorption de la double liaison est dédoublée en deux bandes de signes opposés. Lorsque l'on effectue l'addition des spectres des deux complexes mixtes diastéréomères, on obtient une courbe de CD résiduel de signe négatif. Cette observation, ainsi que le fait que ce CD résiduel ressemble à la bande observée pour le complexe mixte avec la glycine, permettent de penser qu'il est dû à un effet conformationnel dont l'intensité serait différente dans les deux complexes mixtes diastéréoisomères. Si le maximum du CD résiduel est déplacé vers des longueurs d'ondes plus élevées (390nm) par rapport au maximum du complexe de la glycine, cela peut être la conséquence de l'effet inductif du substituant lié au carbone α .

Tableau 5-3: Spectres CD (UV) des complexes de base de Schiff Cu²⁺/salicyaldéhyde/(R)-ou-(S)-phénylalanine et des complexes mixtes avec (S,S)-BPABP.

λ (nm)	$\Delta \epsilon$		$\Delta \epsilon$		$\Delta \epsilon$	
	Cu(S-BS)	mél.1	CuL(S-BS) calculé	mél.2	CuL(R-BS) calculé	$\Delta \Delta \epsilon$
300	-0.75	-0.21	+0.41	-0.42	-1.46	-1.05
310	-1.56	-0.33	+1.18	-0.05	-1.41	-0.23
320	-3.00	-0.67	+2.15	+0.50	-1.38	+0.77
330	-5.37	-1.39	+3.27	+1.10	-2.01	+1.26
340	-8.68	-2.52	+4.44	+1.82	-3.16	+1.28
350	-11.67	-3.92	+4.33	+2.95	-3.13	+1.20
360	-13.30	-5.44	+1.93	+4.04	-2.05	-0.02
370	-11.67	-6.38	-3.27	+4.66	+0.69	-2.58
380	-8.12	-6.13	-7.49	+4.35	+2.95	-4.54
390	-4.43	-4.86	-8.77	+3.32	+3.72	-5.05
400	-1.90	-3.38	-7.76	+2.07	+3.04	-4.72
410	-0.62	-2.09	-5.58	+1.09	+1.92	-3.66
420	-0.09	-1.08	-3.21	+0.47	+0.97	-2.24
430	0.00	-0.60	-1.85	+0.26	+0.58	-1.27
440	0.00	-0.50	-1.54	+0.22	+0.49	-1.05
450	0.00	-0.50	-1.55	+0.21	+0.47	-1.08
460	-	-0.48	-1.48	+0.20	+0.45	-1.03
470	-	-0.47	-1.45	+0.12	+0.27	-1.18
480	-	-0.44	-1.36	+0.10	+0.22	-1.14
490	-	-0.33	-1.02	+0.05	+0.11	-0.91

mélange 1: [CuL]=5.47-04
 [Cu(S-BS)]=1.14-03
 [CuL(S-BS)]=8.1-04

mélange 2: [CuL]=4.46-04
 [Cu(R-BS)]=9.32.-04
 [CuL(R-BS)]=1.12-03

a) Spectre CD corrigé tenant compte de la racémisation par extrapolation à t=0, selon les mesures cinétiques reportées dans le tableau 5.1

b) Pour le calcul, les valeurs de la première colonne ont été utilisées avec un signe (+)

Cette contribution conformationnelle est encore mieux visible dans le cas de la valine, étant donné que cet acide aminé ne racémise que très lentement dans les conditions de la réaction et que l'intensité de la bande CD dans l'UV est plus faible pour la valine que pour la phénylalanine. Les effets conformationnels deviennent ainsi relativement plus importants.

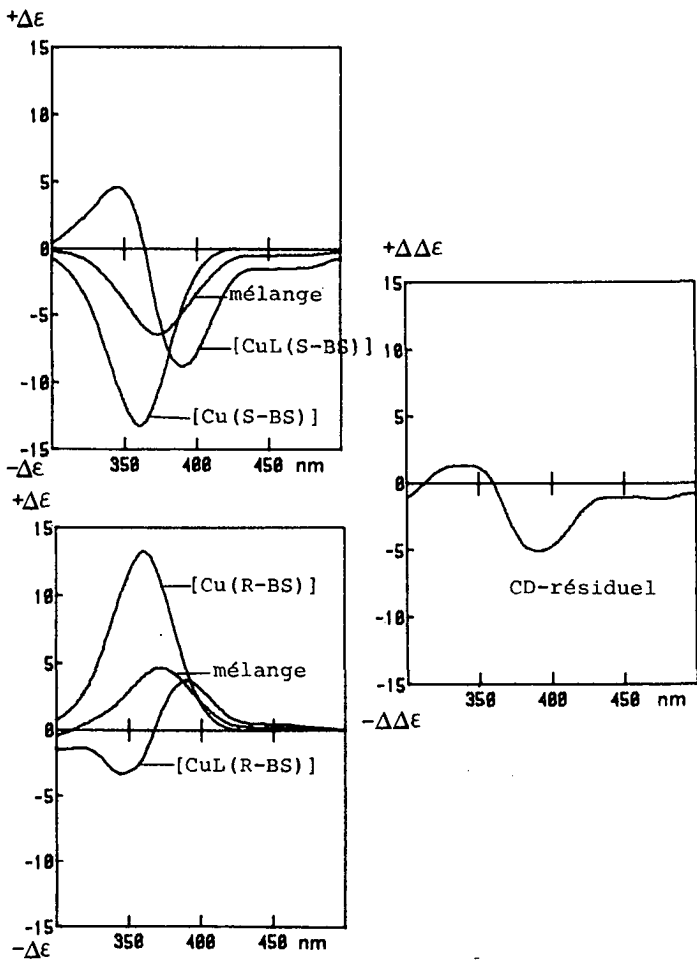


fig 5-12 : Spectres CD (valeurs du tableau 5-3).

Les figures 5-13 et 5-14 montrent l'évolution du système en fonction du temps et les spectres CD pour les ligands (S)-PIPEA resp. (SS)-BPABP.

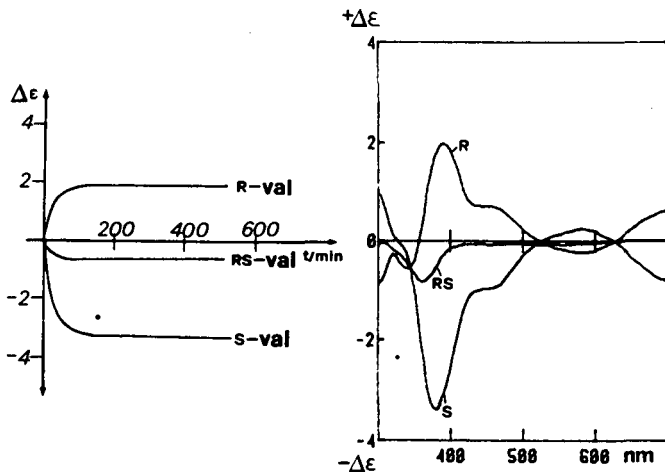


fig 5-13 : Variation de l'intensité CD ($\lambda=370\text{nm}$) en fonction du temps (a) et spectres CD après réaction complète (b) d'un mélange:
 Cu^{2+} /sal/(R),(S)ou(R,S)-val/(S)-PIPEA
 (1:1:3:1)Co $\text{Co}=2.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $\text{pH}=9.8$; $t=25^\circ\text{C}$,
 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}(1:1)$, tampon carbonate.

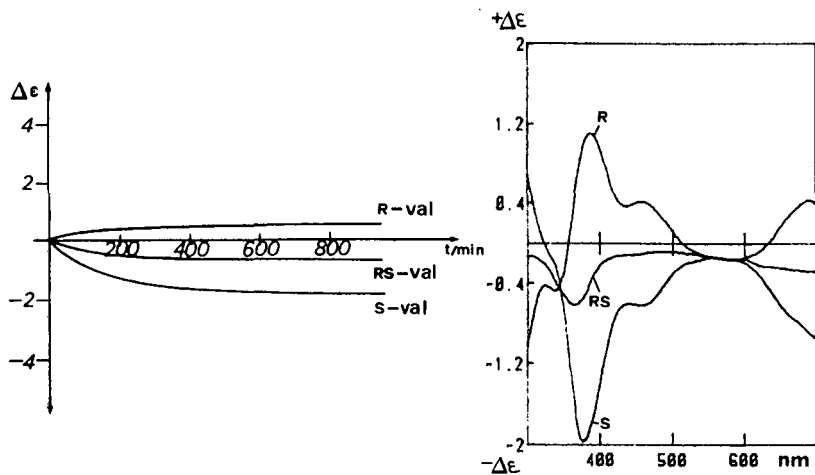


fig 5-14 : Variation de l'intensité CD ($\lambda=375$) en fonction du temps (a) et spectres CD après réaction complète (b) d'un mélange: Cu^{2+} /sal/(R),(S)ou(R,S)-val/(S)-BPABP (1:1:1)Co Co= $2.5 \cdot 10^{-3}$ M; pH=10.2; $t=25^\circ\text{C}$; solvant:MeOH/ H_2O (1:1); tampon carbonate.

Comme les constantes apparentes de formation ne sont pas connues pour ce système, il n'est pas possible de déterminer les spectres des espèces isolées.

Il reste maintenant à résoudre le problème qui s'était posé dans l'introduction de ce chapitre (paragraphe 5.1), à savoir si des mesures CD pourraient être utilisées pour une détermination de l'excès énantiomérique dans une réaction de rétro-racémisation.

Au vu des résultats et de la discussion de ces derniers, on peut conclure qu'une telle détermination simple n'est pas possible comme cela l'était dans la réaction de transamination en milieu légèrement acide <70>. Dans ce dernier cas, la détermination de l'excès énantiomérique par la mesure de l'intensité du spectre CD était possible, puisque la concentration du complexe mixte était négligeable à la fin de la réaction et que le signal CD était uniquement déterminé par le complexe cuivre-base de Schiff. Dans un milieu alcalin, en revanche, la concentration du complexe mixte est importante et l'intensité du signal CD ne donne pas une mesure directe de la quantité relative des deux antipodes de l'acide aminé, étant donné que le complexe mixte et le complexe non-mixte ne présentent pas la même intensité et que le complexe mixte est composé de deux diastéréoisomères.

Une détermination de l'excès énantiomérique après une réaction de réroracémisation est cependant possible par la mesure de l'intensité CD du mélange réactionnel, à condition de connaître l'intensité CD du mélange, dans les mêmes conditions, pour les deux antipodes optiquement purs.

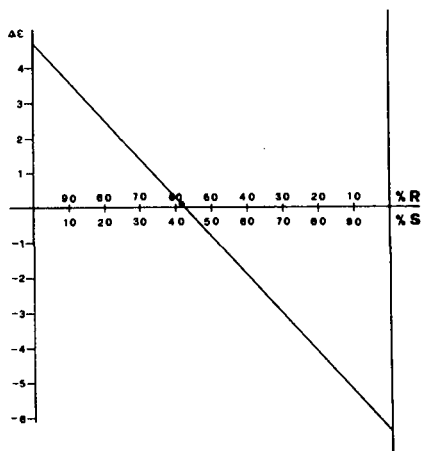


fig 5-15 : Détermination graphique de l'excès énantiomérique par mesure du CD. Conditions et valeurs selon le tableau 5-1.

Une telle détermination par voie graphique est représentée dans la figure 5-15. Les valeurs pour les diastéréoisomères purs sont calculées par extrapolation au temps 0 du tableau 5-1 ($\Delta\epsilon = +4.73$ pour (R)-phe et -6.38 pour (S)-phe). La valeur mesurée à l'équilibre connue pour (R)-, (S)- ou (RS)-phe est de $\Delta\epsilon = +0.12 \pm 0.06$. Elle indique sur le graphique une composition $\langle R \rangle : \langle S \rangle = 42 : 58$. Cette valeur correspond parfaitement aux résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse, laquelle révèle un excès énantiomérique de $16 \pm 1\%$ pour des conditions réactionnelles identiques (cf. fig 5-11).

CHAPTER 7

PARTIE EXPERIMENTALE

7.1 Synthèses:

7.1.1 2-[(3S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine (PiPEA)

(sous forme de chlorhydrate)

La substance est obtenue selon <10>, ses caractéristiques sont:

$$[\alpha]_{sp} = -20.40 \text{ c} = 0.2, \text{ solvant} = \text{H}_2\text{O}, \text{ t} = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

PM = 285.04 La pureté chimique déterminée par titration potentiométrique est de 98.8%.

7.1.2 2,6-bis[(3S)-3-phényl-2-azabutyl]pyridine (BPABP)

(sous forme de monosulfhydrate)

Obtenu selon K. Bernauer et al. <47>.

$$[\alpha]_{sp} = +36.12 \text{ c} = 0.2, \text{ solvant} = \text{H}_2\text{O}, \text{ t} = 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

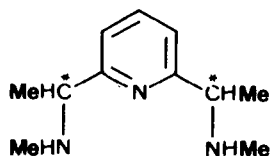
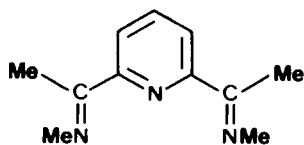
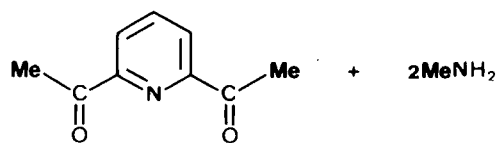
PM = 443.23 La pureté chimique déterminée par titration potentiométrique est de 99%.

7.1.3 Synthèse de 2,6-bis[3-aza-2-butyl]pyridine (BABP).

7.1.3.a Principe de la synthèse. -

Le BABP est obtenu par réduction catalytique de la base de Schiff formée par condensation de la méthylamine et du bis(acétyl)-2,6-pyridine.

7.1.3.b Schéma de synthèse. -



7.1.3.c Mode opératoire. -

1 g de bis(acétyl)-2,6-pyridine (5.1mmoles) sont dissous dans 10 ml d'éthanol absolu et additionnés à 15 ml d'une solution de méthylamine à 33% dans l'éthanol.

La solution ainsi obtenue est soumise à une pression de 4 atmosphères d'hydrogène, en présence d'un catalyseur qui est le palladium sur charbon (10%). La réduction de la base de Schiff formée dure environ 10 heures.

Le mélange réactionnel est filtré sur cellite puis le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif.

On obtient ainsi une huile jaunâtre qui est distillée à 78 °C sous 0.15 mmHg.

Le spectre RMN du produit obtenu avec un rendement de 95% est présenté à la figure (7-2). Le poids moléculaire du ligand est de 193.18 g.

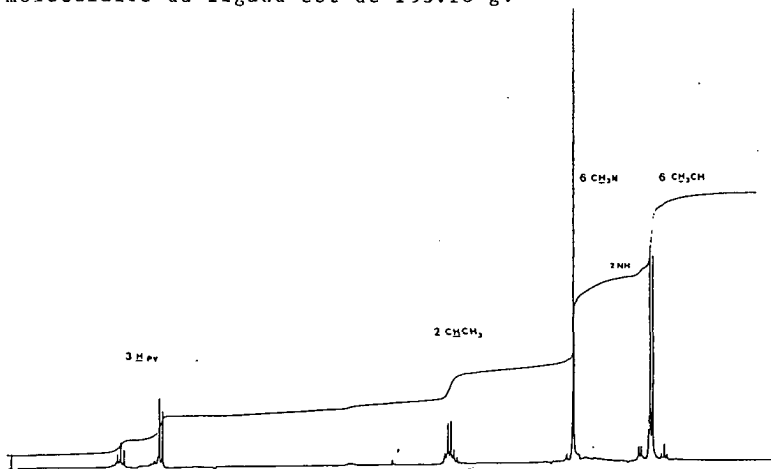


fig. 7-2 : Spectre Rmn du proton à 200 MHz, solvant CDCl₃ référence: DSS T=amb.

Tableau 7-1.

Analyse du spectre RMN du proton.

Position [ppm]	Multiplicité	Protons	J _{xy} [Hz]
1.36	d	-CH (1)	6.5
2.51	s	-NH (2)	-
2.30	s	-CH-	-
3.78	q	-CH- (4)	6.5
7.20	AB	Ha	-
7.67	AB	Hb	-

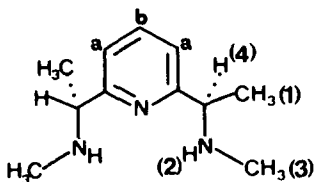


fig. 7-3 : Formule développée du ligand visant à situer les protons analysés.

7.1.4 Dédoublément de 2,6-bis[(3-aza-2-butyl)]pyridine (BABP).

7.1.4.a Mode opératoire. -

Deux équivalents d'acide dibenzoyl-d-tartrique pour un équivalent de BABP sont dissous dans une solution éthanol-eau (3:1). Le rapport des produits et du solvant est d'environ 1 à 12. La solution ainsi préparée est filtrée et placée au réfrigérateur (T=4 °C) pendant quelques heures. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et recristallisé quatre fois dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. A ce moment, la rotation spécifique de l'amine libérée par passage sur colonne échangeuse d'ions Dowex 1 (OH⁻) reste constante.

7.1.4.b Rotation. -

Tableau 7-2.

Valeurs des α spécifiques de (-)BABP obtenus après quatre recristallisations

λ [nm]	365	436	546	578
$[\alpha]_{sp}$	-223.1	-155.4	-96.2	-87.2
<u>Conditions:</u> c = 0.04, solvant = H ₂ O, t = 25 °C.				

Ce dédoublément n'a malheureusement pu être réalisé qu'une fois selon ce mode opératoire. Par la suite, il a posé de gros problèmes. Les difficultés rencontrées sont probablement dues à la présence de l'isomère méso dans le produit synthétisé. (40% si l'on se réfère au travail de P. Pousaz sur les complexes inertes de cobalt(III)).<48>

7.2 Titration potentiométriques.

Les titrations acidimétriques ont été effectuées dans une cuve thermostatée à $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sous atmosphère d'azote et à une force ionique constante fixée par KNO_3 (0.1M). La concentration des solutions titrées est de l'ordre de 10^{-3} M, le titre de la solution de NaOH est d'environ 0.02 M.

Le pH-mètre utilisé est un pH-mètre de précision Metrohm E 605 muni d'une électrode de verre combinée Metrohm EA 125 ou Ross 81-02 (Orion). L'addition de NaOH se fait à l'aide d'une burette Metrohm E 645. Le pH-mètre est calibré avec deux solutions tampon (pH=4.008 tampon hydrogénéphthalate et pH=9.18 tampon borate). De nouveaux tampons sont préparés pour chaque série de mesures.

Les substances utilisées pour ces mesures sont les suivantes:

Métal: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck)
Ligands: BABP, BPABP synthétisés au cours de ce travail.
Acides aminés: ala, gly, val, leu, phe p.a. (Fluka)
Solvant: eau bidistillée dégazée
NaOH: 0.02M 0.1M en KNO_3

Chacune des solutions préparées contient une quantité appropriée de KNO_3 . La solution de mélange est titrée par NaOH 0.02M, après avoir été soumise 15 minutes à un barbotage à l'azote.

7.2.1 Titration des ligands.

A une prise de 5 ml de la solution de ligand sous forme de dichlorhydrate (pour BABP) et de sulfate (pour BPABP) ($5.10^{-3}M$), on ajoute 20 ml d'eau bidistillée dégazée 0.1M en KNO_3 . La solution résultante est titrée par NaOH 0.02M

7.2.2 Titration des complexes cuivre-ligands (CuL).

A une prise de 5 ml de la solution de ligand ($5.10^{-3}M$), on ajoute 5 ml d'une solution de sulfate de cuivre ($5.10^{-3}M$) et 15 ml d'eau bidistillée dégazée 0.1M en KNO_3 . La solution de mélange est titrée par une solution de NaOH 0.02M.

7.2.3 Titration des complexes cuivre-ligand-acide aminés (CuLaa).

A une prise de 5 ml de la solution de ligand ($5.10^{-3}M$), on ajoute 5 ml d'une solution de sulfate de cuivre ($5.10^{-3}M$), 5 ml d'une solution d'acide aminé ($5.10^{-3}M$) et 10 ml d'eau bidistillée dégazée 0.1 M en KNO_3 . La solution de mélange est ensuite titrée par NaOH 0.02M.

7.3 Désamination oxydative.

7.3.1 Désamination oxydative dans le système contenant les réactifs dans des conditions stoechiométriques.

7.3.1.a Exemple choisi: -

	Cu ²⁺	+	PL	+	RS-BPABP	+	S-ala
Éqts	1		1		1		1
conc.	2.5.10 ⁻³ M						

Conditions réactionnelles: T = 25 °C

pHdépart = 10.0

pHfin = 8.3*

solvant : MeOH/H₂O
 1 1

* La solution n'est pas tamponnée.

7.3.1.b Mode opératoire. -

0.1248 g de sulfate de cuivre, 0.1018 g de chlorhydrate de pyridoxal, 0.2216 g de sulfate de ligand et 0.04455 g de RS-alanine sont dissous dans un ballon jaugé de 200 ml avec une solution MeOH/H₂O 1:1. Le pH est amené à 10.0 par addition de NaOH 2N avant de compléter à la jauge par l'adjonction de MeOH/H₂O (1:1).

Cette solution est placée dans un ballon réactionnel thermostatizable et agitée à 25 °C à l'aide d'un agitateur magnétique. Une pompe péristaltique et deux cellules à flux continu permettent de suivre au spectrophotomètre et au polarimètre l'évolution de la réaction au cours du temps.

7.3.2 Désamination oxydative dans le système contenant un excès d'acide aminé.

7.3.2.a Exemple choisi. -

	Cu^{2+}	+	PL	+	SS-BPABP	+	ala
éqta	1		1		1		20
conc.	$2.5 \cdot 10^{-3}$		M				$5.0 \cdot 10^{-2}$

Conditions réactionnels: T = 25 °C

pH = 10.2

solvant = MeOH/H₂O
 1 1

Cette solution est tamponnée avec Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1 M

7.3.2.b Mode opératoire. -

0.1248 g de sulfate de cuivre, 0.1018 g de chlorhydrate de pyridoxal, 0.2216 g de sulfate de ligand et 0.891 g de S-alanine sont dissous dans un ballon jaugé de 200 ml avec une solution MeOH/H₂O. Après addition d'une quantité appropriée de tampon, vérification et correction du pH si nécessaire, la solution est amenée à la jauge par l'addition de MeOH/H₂O (1:1).

La solution est ensuite placée dans un ballon réactionnel thermostatisable et agitée à 25 °C

La réaction se déroule sous un barbottage d'oxygène, le NH₃ libéré et entraîné par le courant d'oxygène est recueilli dans une solution aqueuse et titré automatiquement à l'aide d'un pH-stat par HCl 0.01 N. (Le pH-mètre et l'électrode utilisés sont les mêmes que pour les titrations potentiométriques, le pH-stat est composé d'un impulsomat Metrohm E 473 et d'un pH-mètre Metrohm E 300B).

A la fin de la réaction, le pH de la solution est amené à 2 par addition de HCl conc. (37%, d=1.19), le mélange réactionnel est passé sur colonne (l=35 cm, Ø =1.5 cm) Dowex 50X8 200-400 mesh chargée en protons. L'acide pyruvique peut ainsi être isolé après élution avec de l'eau déminéralisée.

7.4 Rétroacémisation.

7.4.1 Rétroacémisation de la phénylalanine en présence du salicyaldéhyde.

7.4.1.a Exemple choisi: -

	Cu ²⁺	sal	SS-BPABP	+	RS-phe
éqts	1	1		x	1
conc.	2.5.10 ⁻³ M				

Conditions réactionnels: T = amb.

pH = 10.2

solvant = MeOH/H₂O
1 1

Le tampon utilisé est Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1 M.

7.4.1.b Préparation des solutions:

Les solutions suivantes sont préparées dans des ballons jaugés de 100 ml.

CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5.10 ⁻² M (1)
Sal	2.5.10 ⁻² M (2)
SS-BPABP	5.0.10 ⁻² M (3)
RS-phe	2.5.10 ⁻² M (4)
Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃	1 M (dans H ₂ O)

Les solutions 2,3 et 4 sont préparées dans un mélange MeOH/H₂O (1:1). La solution 1, est préparée dans l'eau avec une concentration de 5.10⁻² M. Peu avant la préparation des solutions d'analyse, cette dernière est diluée de moitié par addition de MeOH et ceci pour éviter que le sulfate de cuivre ne précipite dans la solution mère.

7.4.1.c Mode opératoire.

Les solutions d'analyse sont préparées dans des ballons jaugés de 10 ml.

Pipeter dans l'ordre: 1 ml de sulfate de cuivre, 1 ml de salicylaldéhyde, x ml de SS-BPABP, 1 ml de RS-phénylalanine, 1 ml de tampon et 1 ml de méthanol. Vérifier le pH et amener à 10 ml par addition de MeOH/H₂O (1:1). (Si le pH ne correspond pas à la valeur désirée, il est ajusté par addition de HCl 2N ou de NaOH 2N).

x = 0.2-0.4-0.5-0.6-0.8-0.9-2.0-3.0 ml.

Les solutions sont laissées à température ambiante* pendant 14 jours puis hydrolysées avec HCl conc. (37%, d=1.19). Chaque solution est passée sur colonne (l=35 cm, ϕ =1.5 cm) Dowex 50X8 200-400 mesh chargée en protons et éluée avec NH₃ 0.2 M.

*Pour les réactions effectuées à des températures précises, les solutions sont laissées dans le bain d'un thermostat Haake N3 si T > 0 °C ou dans celui d'un cryomat Haake F3 si T < 0 °C.

La phénylalanine est récupérée dans un erlenmeyer, mise en évidence par chromatographie sur couche mince (plaque de silicagel 60F . Solvant: n-BuOH: Acétone: AcOH: NH₃ (5%): H₂O 4.5:1.5:1:1:2. Révélateur avec ninhydrine) et concentrée à sec, sous vide, à l'évaporateur rotatif.

7.4.2 Racémisation et rétoracémisation de la phénylalanine en présence de pyridoxal.

7.4.2.a Exemple choisi. -

	Cu ²⁺	+	PL	+	RR-BPABP	+	R,S,RS-phe
éqts	1		1		1		1
conc.	2.5.10 ⁻³ M						

Conditions réactionnelles. T = 25 °C

pH = 10.2

Tampon = Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1M

Solvant = MeOH/H₂O (1:1)

Les réactions sont conduites sous azote pour éviter la décomposition de l'acide aminé par désamination oxydative.

7.4.2.b Mode opératoire. -

0.06242 g de sulfste de cuivre, 0.05091 g de chlorhydrate de pyridoxal, 0.04130 g de (R ou S ouRS)-phénylalanine et 0.11081 g de SS-BPABP sont pesés précisément. Ce mélange est dissous dans 20 ml d'eau et 30 ml de méthanol puis transvasé dans un ballon jaugé de 100 ml. MeOH/H₂O (1:1) (jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 80 ml) puis 10 ml de tampon carbonate 1 M (dans H₂O) sont additionnés au mélange. Le pH est ajusté par adjonction de HCl 2N et la solution est amenée à la jauge (100 ml) par addition de MeOH/H₂O.

(Le tampon carbonate est préparé dans l'eau pour des raisons de solubilité).

Les solutions sont thermoatatisées à 25 °C et placées sous azote (pour éviter toute décomposition). 10 ml de chacune des solutions (R, S, RS-aa), sont prélevés au cours du temps et décomposés par addition de HCl conc. (HCl 37%, d=1.19).

L'acide aminé est isolé et analysé selon le mode opératoire décrit sous 7.4.1.c et 7.5.

L'étude du complexe CuPL(R,S,RS)-val-RR-BPABP est réalisée par analogie au mode opératoire décrit sous 7.4.2.

7.4.3 Retroracémisation de la phénylalanine dans le méthanol à basse température.

7.4.3.a Exemple choisi. -

	Cusal-S-phe	+	SS-BPABP
éqts	1		2
conc.	$2.0.10^{-2}$ M		$4.0.10^{-2}$ M

Conditions réactionnelles: T = 25 °C

pH = 12.4

solvant = MeOH distillé

7.4.3.b Mode opératoire -

0.1 mmoles de Cusal-S-phe et 0.2 mmoles de SS-BPABP sont pesées précisément. Le ligand est dissous dans MeOH distillé et neutralisé par l'addition de MeONa. Le complexe [Cusal-S-phe] est également dissous dans MeOH et ensuite additionné au ligand. Le solvant est en partie évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le résidu est transvasé dans un ballon jaugé de 5 ml. MeONa est additionné jusqu'à l'obtention d'un pH aux environs de 13 à 25 °C. La solution est ensuite amenée à la jauge par l'addition de MeOH distillé et le ballon jaugé placé dans un cryomat Haake F3 à -50 °C.

Pour la réaction à -25 °C, 50 ml de solution sont préparés exactement de la même manière et des prises de 5 ml sont prélevées au cours du temps afin de déterminer la cinétique de la réaction.

L'analyse de l'acide aminé est réalisée par analogie au mode opératoire décrit sous 7.5.

7.5 Analyse par chromatographie en phase gazeuse. (à l'aide d'une phase optiquement active de type: Supelco Sp-300 10% Supelcoport 100-120 mesh).

7.5.1 Préparation du dérivé N-acétylé-O-estérifié.

L'acide aminé précédemment isolé est estérifié avec 2 ml de HCl 2.5 N dans l'isopropanol à 100 °C dans un ballon poire ronor de 20 ml fermé par un réfrigérant à spirales ronor ou par un bouchon en verre rodé assuré avec une pince. Après 30 min., la solution est ramenée à température ambiante et concentrée à sec, sous vide, à l'évaporateur rotatif.

3 ml de chlorure de méthylène et 0.5 ml d'anhydride trifluoroacétique sont additionnés au dérivé estérifié. Le ballon est fermé comme précédemment et la solution chauffée à 60 °C pendant 5 minutes. La solution est concentrée à sec, sous vide, à l'évaporateur rotatif.

7.5.2 Conditions pour l'analyse.

Le dérivé N-acétylé-O-estérifié est dissous dans 0.05 ml de chloroforme et 1 µl de cette solution est injecté.

Colonne (aupelco): SP-300 10% sur Supelcoport 100-200 mesh.

longueur = 4 m
ø int. = 2 mm
t inj. = t dét. = 140 °C
t col. = 130 °C
gaz porteur : N₂
débit = 30 ml/min.

Les temps de rétention observés par chromatographie en phase gazeuse pour les deux acides aminés étudiés sont indiqués dans le tableau 7-3.

Tableau 7-3.

acide aminé	t(R)-aa [min]	t(S)-aa [min]
phe	290	345
val*	34	40

*tcol. = 120 °C, débit N₂ = 20 ml/min

7.6 Etude de la formation et de la racémisation du complexe mixte cuivre-ligand-base de Schiff (CuLBS) par dichroïsme circulaire.

7.6.1 Exemple choisi.

	Cu ²⁺ +	sal +	SS-BPABP +	gly
éqts	1	1	x	3
conc.	2.5.10 ⁻³ M			7.5.10 ⁻³ M

Conditions réactionnelles. T = 25 °C

pH = 10.5

solvant = MeOH/H₂O (1:1)

tampon Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1M

7.6.2 Préparation des solutions.

CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5.10 ⁻² M	(1)
sal	2.5.10 ⁻² M	(2)
SS-BPABP	5.0.10 ⁻² M	(3)
gly	7.5.10 ⁻² M	(4)
tampon	1M	(5)

Les solutions (2), (3) et (4) sont préparées dans un mélange MeOH/H₂O (1:1). La solution (1) est préparée dans l'eau avec une concentration de 5.10⁻²M. Peu avant la préparation des solutions d'analyse, cette solution est diluée de moitié par addition de MeOH pour des raisons de solubilité. La solution (5) est préparée dans l'eau.

7.6.3 Mode opératoire.

Des solutions correspondantes, les volumes suivants sont pipetés dans des ballons jaugés de 10ml;

1 ml de sulfate de cuivre, 1 ml d'aldéhyde salicylique, x ml de SS-BPABP, 1 ml de glycine, 1 ml de tampon et 1 ml de MeOH. Le pH de chaque solution est vérifié et corrigé si nécessaire par addition de HCl 2N ou de NaOH 2N. Les solutions sont ensuite amenées à la jauge (10 ml) par addition de MeOH/H₂O (1:1).

x = 0.0-0.2-0.4-0.5-0.6-0.8-2.0-3.0 ml.

La réaction de formation du complexe est suivie par spectrophotométrie et spectropolarimétrie à 25 °C pour la solution contenant l'équivalent de ligand. Les autres solutions sont placées dans un bain thermostaté à 25 °C jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. A ce moment, les spectres de dichroïsme circulaire et les spectres UV sont enregistrés de 450 à 300 nm pour chaque solution.

[Cusalvall*] et [CusalpheL*] sont préparées par analogie au mode opératoire décrit sous 7.9.

7.7 Produits utilisés.

Métal: CuSO₄.5H₂O p.a. (Merck)
Acides aminés: gly, ala, phe, val, leu puriss (Fluka)
Ligands: PIPEA, BPABP, BABP synthétisés dans les laboratoires de chimie inorganique à Neuchâtel.
Tampon: Na₂CO₃.10H₂O p.a. (Fluka)
Complexe: [Cusal-S-phe] synthétisé par H. Riem à Neuchâtel.
Aldéhyde: Pyridoxal.HCl puriss (Fluka)
Salicylaldéhyde Riedel-De Haën AG.

7.8 Instruments.

Spectres UV: Spectrophotomètre UVIKON 810 et 820, cuve 0.1 cm.

Rotations: Polarimètre Perkin-Elmer 241, cuve de 1dm.

Spectres de dichroïsme circulaire: Spectropolarimètre Jasco-J 500C, cuve de 0.1 cm.

Chromatographie en phase gazeuse: Chromatographe Dani 3400.

Spectres de résonance magnétique nucléaire: Spectromètre Bruker WP-200

Thermostatisation: Thermostats Haake N3 et F3.

pH-stat: pH-mètre E300B Metrohm, Impulsomat E473.

CHAPTER 6

RESUME

L'étude entreprise dans ce travail, soit celle de la rétro-racémisation en milieu basique des complexes de base de Schiff (CuLPLaa et CuLSalaa), peut se résumer comme suit:

En premier lieu, les constantes d'acidité et de formation de toutes les espèces présentes dans la solution et non-décrites dans la littérature ont été déterminées par titration potentiométrique ou par dichroïsme circulaire, afin de connaître la répartition de toutes les espèces en fonction du pH. Grâce à ces mesures, il a été possible de déterminer le pourcentage de l'espèce active dans ces systèmes ainsi que la sélectivité réelle du complexe mixte.

L'observation d'une réaction secondaire de décomposition, lors des premières mesures de rétro-racémisation en présence de pyridoxal, nous a amené à une brève étude de la désamination oxydative dans ces systèmes. L'intérêt de cette étude réside dans le fait que cette réaction peut être catalytique et apparaît comme une voie de synthèse intéressante pour la formation de céto-acides. Il en ressort aussi que la présence du ligand tend à ralentir la réaction.

L'examen de la rétro-racémisation montre des sélectivités relatives allant de 5 à 45% d'excès énantiomérique selon le solvant, la température et les équivalents de ligand considérés. En outre, il faut préciser que la présence du ligand dans les solutions ralentit également la vitesse de racémisation. Ainsi,

le proton de l'acide aminé est arraché plus difficilement sur les complexes formés avec le ligand. Ceci peut être dû à une distorsion des cycles chélatants de la base de Schiff. Cette distorsion rendrait la résonnance dans ces systèmes beaucoup plus difficile, vu le manque de co-planarité des orbitales π des doubles liaisons. De ce fait, le complexe intermédiaire n'est plus stabilisé comme il l'est dans un système planaire.

Finalement, une étude du dichroïsme circulaire, comme mesure directe de la sélectivité dans ces systèmes, permet de mettre en évidence une bande CD aux environs de 350-390nm (suivant l'acide aminé considéré), indépendante de la présence d'un carbone asymétrique de l'acide aminé. Cette bande, aussi présente dans le cas de la glycine, est attribuée à la fixation d'une conformation de chiralité précise due à la présence du ligand. Enfin, l'établissement d'une courbe d'étalonnage pour le complexe CuBPABPsalphe montre qu'il est possible malgré tout de déterminer une sélectivité par la mesure des spectres CD, en tenant compte des contributions des différents éléments de chiralité aux spectres CD des complexes mixtes.

En conclusion:

Ce travail a permis de montrer que le ligand BPABP impose au système une conformation telle que le complexe formé avec l'un des antipodes de l'acide aminé est plus stable que l'autre. La différence de stabilité imposée au système provoque une différence d'excès énantiomérique réelle de 26 à 34%, à 25 °C, pour le complexe CuLsalphe.

La présence du ligand sur le complexe crée une distorsion des cycles chélatants, qui se manifeste par un ralentissement de la réaction de désamination oxydative et de racémisation, ainsi que l'apparition d'un spectre CD de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la double liaison C=N, en l'absence d'un carbone asymétrique en α de la double liaison.

CHAPTER 7

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Weil J.H., Biochimie Générale, chap 2, Masson et Cie, Paris, (1975).
- [2] Basolo F., Burwell R.L., Catalysis Progress in Research, part. 1, Plenum, London et New York, (1973).
- [3] Braunstein, A.E., The Enzymes, vol.2, Eds, Academic Press, New York, 113-181, (1960).
- [4] Dunathan H.C., Adv. Enzymol., 35, 79-134, (1971).
- [5] Dunathan H.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 55, 712-716, (1966).
- [6] Ivanov V.I., Adv. Enzymol., 32, 21-53, (1969).
- [7] Bernauer K, Topics in Current Chemistry, 65, 1, (1976).
- [8] Patente Européenne Numéro 0 089 886.
- [9] Holm R.H., Inorganic Biochemistry, vol 2, chap 31, G.L Eichhorn, ed, Elsevier, New York (1973).
- [10] Riem Huy, Thèse, Université de Neuchâtel.
- [11] Metzler D.E, Snell E.E, J. Am. Chem. Soc., 74, 979-983, (1952).

- [12] Olivard J, Metzler D.E., Snell E.E., J. Am. Chem. Soc., 76, 644-648, (1953).
- [13] Metzler D.E., Snell E.E., J. Biol. Chem., 198, 353-373, (1952).
- [14] Ikawa M., Snell E.E., J. Am. Chem. Soc., 76, 4900-4902, (1954).
- [15] Metzler D.E., Olivard J, Snell E.E., J. Biol. Chem., 199, 669-675, (1952).
- [16] Metzler D.E., Snell E.E., Ikawa M., J. Am. Chem. Soc., 76, 648-652, (1954).
- [17] Christensen H.N., Collina S., J. Biol. Chem., 220, 279, (1956).
- [18] Martell A.E., Abbott E.H., J. Am. Chem. Soc., 92, 5845-5851, (1970).
- [19] Martell A.E., Eidson A.F., Bioinorg. Chem., 4, 277-289, (1975).
- [20] Martell A.E., Kubala G., J. Am. Chem. Soc., 105, 449-455, (1983).
- [21] Metzler D.E., Frances R., Leodis D., J. Am. Chem. Soc., 83, 127-133, (1961).
- [22] Metzler D.E., Nagano k., Pyridoxal Catalysis, Enzymes and Model Systems, International Symposium, 2nd, 81-98, New York, (1968).
- [23] Metzler D.E., Johnson R.J., Methods in Enzymology, 18A, 433-470, (1970).
- [24] Metzler D.E., Johnson R.J., Biochemistry, 12, 5377-5392, (1973).
- [25] Metzler D.E., Cahill A, Metzler C.M., J. Am. Chem. Soc., 102, 6075-6082, (1980).
- [26] Leussing D.L., Bai K.S., Anal. Chem., 40, 575-581, (1968).
- [27] Leussing D.L., Hopgood D., J. Am. Chem. Soc., 91, 3740-3750, (1969).
- [28] Leussing D.L., Met. Ions Biol. Syst., 5, 1-77, (1976).

- [29] Matsushima Y, Chem. Pharm. Bull., 16, 2046-2055, (1968).
- [30] Matsushima Y, Chem. Pharm. Bull., 16, 2151-2159, (1968).
- [31] Matsushima Y, Chem. Pharm. Bull., 27, 703-709, (1979).
- [32] Belekou Yu.N. et al, Tetrahedron, 36, 2327-2335, (1980).
- [33] Belekou Yu.N. et al, Tetrahedron, 36, 1089-1097, (1980).
- [34] Belekou Yu.N. et al, J.C.S. Chem. Comm., 789-790, (1979).
- [35] Belekou Yu.N. et al, Inorganica Chimica Acta, 55, 117-124, (1981).
- [36] Ming-Daw Tsai et al, Biochemistry, 17, 3183-3188, (1978).
- [37] Ming-Daw Tsai et al, Biochemistry, 17, 3177-3182, (1978).
- [38] Gillard R.D., Inorg. Chim. Acta, Rev., 1, 69-86, (1967).
- [39] Gillard R.D., J.Chem. Soc. Dalton, 1444-1447, (1978).
- [40] Phipps D.A., Journal of Molecular Catalysis, 5, 81-107, (1979).
- [41] Tenenbaum S.W., Witherup T.H., Abbott E.H., Biochemica et Biophysica Acta, 362, 308-315, (1974).
- [42] Buckingham D.A., Marzilli L.G. et Sargeson A.M., J. Am. Chem. Soc., 89, 5133, (1967).
- [43] Keyes W.E. et Legg J.I., J. Am. Chem. Soc., 98, 4970, (1976).
- [44] Belekou Y.N. et al, J. Am. Chem. Soc., 105, 2010-2017, (1983).
- [45] Yamaguchi M. et al, Inorg. Chem., 19, 2010-2016, (1980).

- [46] Kuzuhara H., Masaaki I., Sakae E.,
J. Am. Chem. Soc., 99, 4173-4174, (1977).
- [47] Deschenaux R., Thèse, Université de Neuchâtel.
- [48] Pousaz P., Thèse, Université de Neuchâtel.
- [49] Weinstein G.N., O'Connor M.J., Holm R.H.,
Inorg. Chem., 9, 2104, (1970).
- [50] Heng Su, Thèse en préparation, Université de
Neuchâtel.
- [51] Martell A.E., Smith R.M., Critical Stability
Constants, vol.1, Plenum Press, New York
(1974).
- [52] Hershey S. A., Formation and Transamination
of Pyridoxal-5'-Phosphate Schiff Bases and
their Copper(II) Complexes; Studies of a
Vitamin-B6 Model System,
microfilms-xerography, Michigan, U.S.A,
(1981).
- [53] Sigel H, Metal Ions In Biological Systems,
vol.5, chap 1, M. Dekker, New York et Basel,
(1976)
- [54] Mix H., Z. Physiol. Chem., 1, 315, (1959).
- [55] Bruce T.C., Benkovic S.J., Bioorganic
Mechanisms, vol.1, W.A. Benjamin, New York,
(1966).
- [56] Programme Comix.
- [57] Programme Comix modifié par G. Vuille.
- [58] Vuille G., thèse, Université de Neuchâtel.
- [59] Programme de calcul de G. Vuille non publié.
- [60] MARQ, J. Soc. Indust. Appl. Math., 11,
431-441, (1963).
- [61] MARQ modifié par G. Vuille.
- [62] Kagan H, La Stéréochimie Organique, chap. 5,
presses universitaires de France, (1975).
- [63] Holm H., Inorganic Chemistry, 9, 2104-2112,
(1970).

- [64] Hamilton G.A. et Revesz A., J. Am. Chem. Soc., 88, 2069-2070, (1966).
- [65] Marx A., Sendrea M. et Pecovici M., *Experientia*, 26, 35-36, (1970).
- [66] Rai M., Singh A., Indian J. Chem., 17B, 169-170, (1979).
- [67] Navaneeth Rao T. et coll., Indian J. Chem., 20A, 395-397, (1981).
- [68] Massol M., Nepveu F., Laurent J.P., C.R. Acad. Sc. Paris, 290, 117-120, (1980).
- [69] Kolthoff I.M., Lingane J.J., *Polarography*, vol 2, chap 4, Interscience, New York-London, (1952).
- [70] Bernauer K, Deschenaux R., Taura T., *Helv. Chim. Acta*, 66, 2049-2058, (1983).
- [71] Hawkins C.J., *Absolute Configuration of Metal Complexes*, chap.5, Wiley-Interscience, New York, (1971)
- [72] Job P., Schipper P.E., J. Am. Chem. Soc., 103, 48-51, (1981)
- [73] Schipper P.E., J. Am. Chem. Soc., 100(5), 1433-41, (1978)