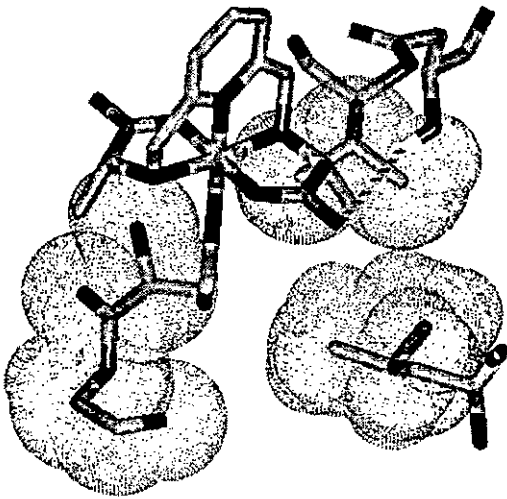


STÉRÉOSÉLECTIVITÉ ET MÉCANISME DU
TRANSFERT D'ÉLECTRON ENTRE DES
PROTÉINES DE CUIVRE BLEU ET DES COMPLEXES DE
FER(II) ET DE COBALT(II) OPTIQUEMENT ACTIFS.
IDENTIFICATION DES SITES RÉACTIONNELS.



Simona Ghizdavu Pellascio

Neuchâtel 2000

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**STÉRÉOSÉLECTIVITÉ ET MÉCANISME DU
TRANSFERT D'ÉLECTRON ENTRE DES
PROTÉINES DE CUIVRE BLEU ET DES COMPLEXES DE
FER(II) ET DE COBALT(II) OPTIQUEMENT ACTIFS.
IDENTIFICATION DES SITES RÉACTIONNELS.**

Thèse présentée à la Faculté des sciences par

SIMONA GHIZDAVU PELLASCIO

Chimiste diplômée de l'Université "Babes-Bolyai" de
Cluj-Napoca, Roumanie pour l'obtention du grade de
Docteur ès sciences

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Stéreo-sélectivité et mécanisme du transfert d'électron entre des protéines de cuivre bleu et des complexes de fer (II) et de cobalt (III) optiquement actifs. Identification des sites réactionnels.

de Mme Simona GHIZDAVU PELLASCIO

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

MM. K. Bernauer (directeur de thèse),
P. Schürmann et A. von Zelewsky (Fribourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 4 juillet 2000

Le doyen:



J.-P. Derendinger

A mes parents

A ma famille

Remerciements

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de Chimie Bioinorganique et de Biochimie Végétale de l'Université de Neuchâtel, d'avril 1995 à septembre 1999.

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de thèse, le professeur K. Bernauer, de m'avoir acceptée dans son groupe de recherche et de m'avoir guidée avec enthousiasme, justesse et beaucoup de patience tout au long de mon travail.

Un grand merci au professeur P. Schürmann, pour m'avoir accueillie et épaulée durant la partie biochimique de ma thèse.

Je remercie également le professeur A. von Zelewsky pour avoir bien voulu faire partie, ensemble au professeur P. Schürmann, du jury de ma thèse.

Un grand merci à mes collègues et amis, chimistes et biochimistes, pour leur soutien, leur aide et leur amitié, en particulier à Charly Nusbaumer, Luca Verardo et Sandrine Stanislas.

Mes remerciements s'adressent également aux étudiants et laborantin(e)s avec lesquels j'ai collaboré : David, Michaël, Olivier, Joelle, Joel, Pascal.

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

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	But du travail	1
1.2	Les réactions de transfert d'électron	3
1.2.1	Types de mécanismes de transfert d'électron	3
1.2.2	Réactions de transfert d'électron de type sphère externe ..	6
1.2.3	Les réactions de transfert d'électron non-adiabatique dans les systèmes biologiques	15
1.3	Description du système chimique	19
1.3.1	Ligands	20
1.3.2	Complexes	22
1.4	Description du système biologique	25
1.4.1	Azurine	29
1.4.2	Plastocyanine	40
1.5	Stéréosélectivité	47

2	Partie expérimentale	51
2.1	Synthèse et caractérisation des ligands	51
2.1.1	Synthèse du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine	52
2.1.2	Synthèse du (R,R)- ou (S,S)-alamp	53
2.1.3	Synthèse du (R,R)- ou (S,S)-promp	57
2.2	Préparation des protéines de cuivre bleu	60
2.2.1	Wt-azurine : préparation, isolement et purification.....	61
2.2.1.1	Cultures	63
2.2.1.2	Isolement	65
2.2.1.3	Purification	67
2.2.2	Plastocyanine : préparation, isolement et purification	70
2.3	Mesures	73
2.3.1	Préparation et caractérisation des solutions des réactifs utilisés	73
2.3.1.1	Solutions tampon	73
2.3.1.2	Solutions de complexe	74
2.3.1.3	Solutions de protéine	78
2.3.2	Mesures cinétiques et détermination des paramètres d'activation	79
2.3.3	Fixation des complexes de cobalt	83
2.3.4	Modélisation	83
2.3.4.1	Simulation de fragments des complexes métalliques avant fixation	84
2.3.4.2	Fixation à la surface des protéines	84

3	Résultats	87
3.1	Mesures cinétiques et paramètres d'activation	87
3.2	Fixation du centre métallique par transfert d'électron	106
3.3	Modélisation	132
4	Discussion	139
4.1	Cinétique	139
4.2	Stéréosélectivité	151
4.3	Paramètres d'activation	156
4.4	Stéréosélectivité basée sur les paramètres d'activation	162
4.5	Cinétique et mécanismes de réaction SI et SE	169
4.6	Sélection du site	173
4.7	Conclusion	177
5	Résumé	179
	Summary	183
6	Bibliographie	187
	Curriculum Vitae	197

1 Introduction

1.1 But du travail

Une caractéristique fondamentale des systèmes biologiques est leur stéréosélectivité [1], retrouvée aussi dans les réactions des métalloprotéines avec leurs partenaires physiologiques. En quête d'explications mécanistiques sur le fonctionnement des systèmes biologiques dans le processus de transfert d'électron, le remplacement des partenaires physiologiques des métalloprotéines par des réactifs synthétiques optiquement actifs a été une des approches proposées.

Ainsi ce travail s'inscrit dans une succession de manuscrits qui a débutée avec la thèse de Sauvain, la première à traiter du transfert stéréosélectif d'électron entre une métalloprotéine, la plastocyanine, et des complexes métalliques optiquement actifs [2, 3].

Les études concernant la plastocyanine ont été poursuivies par Verardo [4] qui a approfondi les aspects mécanistiques du système en variant les partenaires chimiques chiraux. Parallèlement, Nusbaumer [5] a étudié le transfert d'électron stéréosélectif impliquant la plastocyanine en variant sa structure par mutagenèse dirigée et par conséquent les propriétés de la protéine.

Les résultats obtenus avec les plastocyanines ont ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude de la reconnaissance moléculaire des

complexes métalliques chiraux dans des réactions de transfert d'électron avec des métalloprotéines.

Puisque l'azurine fait également partie de la classe des protéines de cuivre bleu, comme la plastocyanine, une extension de ces études de transfert d'électron stéréosélectif entre un réactif artificiel optiquement actif et une métalloprotéine apparaissait comme souhaitable et logique.

Ce travail est caractérisé par trois mots-clé: transfert d'électron, activité optique et stéréosélectivité. Le projet aborde la reconnaissance moléculaire dans l'interaction de deux partenaires optiquement actifs : la cuproprotéine (azurine ou plastocyanine) et des complexes métalliques de deux métaux de transition, le fer(II) et le cobalt(II). La nature et l'importance de la reconnaissance moléculaire ainsi que l'identification des sites réactionnels ont été étudiés d'une part par des mesures cinétiques du transfert d'électron et d'autre part par des mesures de fixation des complexes métalliques optiquement actifs à la surface de la protéine.

1.2 Les réactions de transfert d'électron

1.2.1 Types de mécanismes de transfert d'électron

Les réactions d'oxydoréduction sont des réactions importantes autant en chimie inorganique que dans beaucoup de processus métaboliques biologiques.

D'après la définition originale, on nomme des réactions d'oxydoréduction les réactions où une molécule d'oxygène intervient comme réactif. Cette définition a été généralisée en désignant comme réaction d'oxydoréduction toute réaction dans laquelle un transfert réel ou formel d'électron a lieu ; la réaction avec l'oxygène moléculaire ne représente ainsi qu'un cas particulier, bien que très important.

Du point de vue du mécanisme on distingue deux cas possibles pour les réactions d'oxydoréduction : le transfert d'électrons et le transfert d'atomes, ions ou groupes d'atomes [6].

Généralement on observe des réactions de transfert d'électron pour les réactions rapides et encore lorsqu'un transfert de groupe est trop difficile à réaliser, à cause d'une enthalpie de dissociation trop élevée. Dans les autres cas un transfert d'atomes, de groupes d'atomes ou d'ions peut se présenter comme étant énergétiquement plus favorable [7, 8, 9].

Les réactions de transfert d'électron en solution aqueuse sont soumises à des restrictions :

- la conservation de l'énergie totale du système,
- la conservation de l'état du spin pour l'ensemble des électrons non transférés et
- le réarrangement de la sphère de coordination du métal dans une position intermédiaire entre l'état oxydé et réduit, imposé par le principe de Franck-Condon.

Les études des réactions de transfert d'électron entre les métaux de transition ont montré l'existence de deux types de mécanismes selon l'approche entre le donneur et l'accepteur d'électron [10] :

- transfert d'électron de type sphère interne, dans lequel les sphères de coordination des réactifs partagent un ligand. Le complexe précurseur ainsi formé englobe les deux centres métalliques liés par un pont constitué d'un ligand commun [11, 12].
- transfert d'électron de type sphère externe, qui implique la conservation des sphères de coordination pour chacun des réactifs dans l'état de transition.

Les réactions de transfert d'électron sphère externe sont habituellement examinées dans les termes de la théorie de Marcus [13, 14]. Cette théorie a été développée pour le système impliquant le transfert d'électron entre deux complexes métalliques et est également utilisée avec des modifications pour des réactions de transfert d'électron dans des systèmes biologiques [15].

De plus, le transfert d'électron de type sphère externe dans les systèmes biologiques peut encore avoir lieu par une réaction intramoléculaire (entre deux sites actifs qui se trouvent à l'intérieur d'une seule protéine) ou intermoléculaire (entre des sites actifs appartenant à deux protéines différentes).

Les protéines impliquées dans ce type de réaction catalysent l'oxydation d'une molécule de substrat et de façon concomitante la réduction d'un autre substrat ou cofacteur. Le rôle des protéines transporteuses d'électron est d'assurer la transduction du flux énergétique, soit dans la respiration mitochondriale, soit dans la capture de la lumière dans le processus de photosynthèse [16].

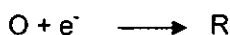
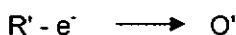
Les processus de transfert d'électron sphère externe dans les systèmes biologiques ne sont pas des réactions isolées impliquant un seul donneur et un seul accepteur, mais plutôt des successions de réactions entre des paires de protéines partenaires. Ces paires de protéines forment des chaînes de donneurs-accepteurs qui sont traversées en cascade par le(s) électron(s).

Puisque le transfert d'électron est effectué typiquement entre les sites métalliques des protéines, les électrons sont ainsi astreints à traverser des distances allant jusqu'à 30 Å entre les unités peptidiques impliquées dans ce processus. Il n'est donc pas surprenant qu'un des facteurs qui contrôle la vitesse du transfert d'électron soit la distance entre les centres d'oxydoréduction.

1.2.2 Réactions de transfert d'électron de type sphère externe

Dans la plupart des réactions impliquant l'azurine mentionnées dans la littérature, le processus de transfert d'électron est décrit comme étant de type sphère externe. Un tel mécanisme implique la formation préalable d'un complexe précurseur (ou de contact) entre les deux réactifs, suivi du transfert d'électron dans ce complexe.

Pour un transfert d'électron d'un système simple, où R' est une espèce riche en électrons et O une espèce pauvre en électrons, le couple de réactions:



conduit à la réaction totale: $O + R' \longrightarrow R + O'$

La réaction de transfert d'électron comporte ainsi trois étapes élémentaires:

- la formation du complexe précurseur : $R' + O \longrightarrow \{R' \cdots O\}$
- le transfert d'électron proprement dit et la formation du complexe successeur : $\{R' \cdots O\} \longrightarrow \{O' \cdots R\}$
- la décomposition du complexe successeur comprenant le réarrangement du solvant : $\{O' \cdots R\} \longrightarrow O' + R$

La théorie de Marcus postule en faveur d'un processus adiabatique du système de transfert d'électron [13, 14]. Si les réactifs et les produits ont des structures très différentes, la configuration nucléaire commune la plus favorable au transfert d'électron est intermédiaire entre celle des

réactifs et celle des produits et son énergie est plus élevée que celle des réactifs et des produits. Si cette énergie de réarrangement est la composante principale de l'énergie d'activation, elle détermine la vitesse globale du transfert d'électron: plus elle est grande, plus la réaction est lente.

Pour le transfert d'électron de type sphère externe, le recouvrement des orbitales électroniques des deux centres de réaction est faible. Pour que la réaction de transfert d'électron ait lieu, les deux partenaires doivent d'un côté s'approcher de sorte à augmenter le couplage des orbitales et d'un autre côté permettre la fluctuation de leurs coordonnées de vibration (pour les réactifs) et de leurs coordonnées d'orientation (pour les molécules de solvant environnant le centre de transfert d'électron). Les coordonnées nucléaires définissent ainsi une surface d'énergie potentielle pluridimensionnelle pour les réactifs et le milieu (Fig. 1-1).

Ainsi le système entier change d'une configuration initiale proche de l'équilibre de l'un des deux réactifs à une autre, celle des produits.

Dans le cas de N coordonnées nucléaires, le point d'intersection représente une surface à $(N-1)$ dimensions. La situation se complique encore lorsque la contribution de la solvation est importante, quand beaucoup de minima locaux apparaissent.

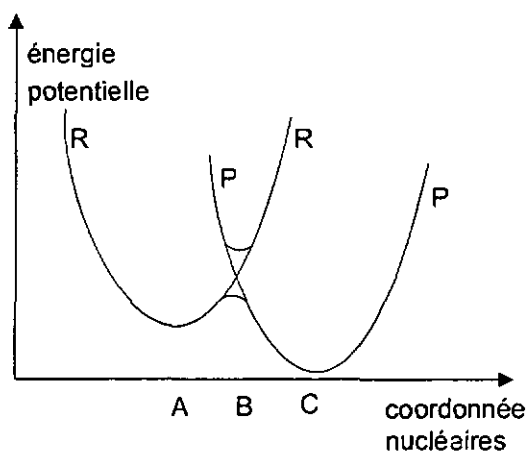


Fig. 1-1 : Coordonnées nucléaires des réactifs (R) et produits (P) d'une réaction de transfert d'électron à différentes configurations d'équilibre entre les produits et les réactifs. A / C = coordonnées nucléaires correspondant à une configuration d'équilibre pour les R respectivement les P ; B = configuration nucléaire à l'intersection des 2 surfaces de potentiel.

Puisque l'électron à transférer est une particule de très petite taille, le principe de Franck-Condon doit être appliqué.

Ce principe stipule que durant le transfert d'électron instantané, les noyaux impliqués n'ont pas le temps de changer ni leurs positions, ni leurs moments magnétiques ; pour satisfaire ces conditions, le transfert d'électron doit se produire à une configuration nucléaire proche de l'intersection des deux surfaces (R et P) d'énergie potentielle (Fig. 1-1). De ce fait, l'énergie du système réactionnel peut être conservée pendant le transfert d'électron. A proximité de cette intersection l'entropie, l'énergie ainsi que l'énergie libre des réactifs et du milieu sont égales [13].

Il s'ensuit que le transfert d'électron se produit seulement à des configurations nucléaires pour lesquelles l'énergie potentielle des réactifs et de leur environnement est égale à celle des produits et de leur environnement.

En plus, des fluctuations thermiques des coordonnées sont nécessaires pour que le système atteigne la surface d'intersection, des changements des coordonnées de vibration doivent être envisagés dans le cas des différences de longueurs et des angles de liaison des réactifs dans les deux états différents d'oxydation. Des fluctuations des coordonnées d'orientation des molécules de solvant se produisent aussi, dans le cas où celui ci est polaire, l'orientation privilégiée de chaque molécule de solvant à proximité de la paire des réactifs différant significativement pour les produits et les réactifs.

Quand le système atteint le point d'intersection des deux surfaces d'énergie potentielle, le sens de l'avancement de la réaction vers la formation des produits dépend de l'étendue du couplage des orbitales des deux réactifs, qui à son tour dépend de leur distance de séparation.

Le coefficient de transmission $k(r)$ nous donne la probabilité moyenne de passage du système à travers la région d'intersection, pour une distance r fixe entre les deux réactifs. Pour une réaction adiabatique, dans laquelle il y a un couplage électronique substantiel entre les deux réactifs (les deux restent largement ou complètement à la surface d'énergie potentielle), ce coefficient de transmission vaut $k(r) \sim 1$ [13].

Le calcul de la constante de vitesse d'une réaction de transfert d'électron comporte la probabilité d'atteindre la région d'intersection pluridimensionnelle multipliée par la fréquence nécessaire pour croiser la région d'intersection et par la probabilité de transition entre la surface correspondant aux réactifs et celle des produits.

La constante de vitesse k d'une réaction bimoléculaire de transfert d'électron est donc donné par :

$$k = k_B \cdot A \cdot \sigma^2 \cdot \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) \quad (1-1)$$

où $A\sigma^2$ est la fréquence de collision, σ la distance moyenne entre les deux centres redox durant le transfert d'électron, ΔG^\ddagger l'énergie libre d'activation et k_B la constante de Boltzmann.

L'énergie libre d'activation ΔG^\ddagger est reliée à l'énergie de réorganisation λ , à l'énergie standard de réaction ΔG° dans le milieu considéré et au travail nécessaire pour amener les réactifs (ω^r) ou produits (ω^p) à la distance de séparation σ [17] :

$$\Delta G^\ddagger = \omega^p + \omega^r + \frac{\lambda}{4} \cdot \left(1 + \frac{\Delta G^{\circ'}}{\lambda}\right)^2 \quad (1-2)$$

$$\text{où} \quad \Delta G^{\circ'} = \Delta G^\circ + \omega^p + \omega^r \quad (1-3)$$

Une relation croisée suit :



$$\text{d'où} \quad \lambda_{12} = \lambda_{11} + \lambda_{22} \quad (1-4)$$

Si l'on corrige k_{11} en fonction du travail (ω^p et ω^r) on obtient la relation croisée qui corrèle avec la constante de vitesse de la réaction (k_{12}) les constantes de vitesse d'auto-échange des réactifs (k_{11} et k_{22}) et la constante d'équilibre (K_{12}) pour la réaction de transfert d'électron :

$$k_{12} = (k_{11} \cdot k_{22} \cdot K_{12} \cdot f_{12})^{1/2} \quad (1-5)$$

$$\text{d'où} \quad K_{12} = \exp(-\Delta G^\circ / RT) \quad (1-6)$$

En pratique la valeur du f_{12} est très proche de l'unité et la valeur du coefficient de transmission électronique $k(r)$ est beaucoup plus petite que 1 pour des faibles couplages.

Pour une distance fixe entre les deux centres on a :

$$k = \frac{2\pi}{h} \cdot H_{AB}^2 \cdot (\text{FC}) \quad (1-7)$$

où FC est le facteur de Franck-Condon et H_{AB} est un élément matriciel électronique qui décrit le couplage électronique des réactifs et des produits. La valeur de la constante de vitesse devient :

$$k = \frac{2\pi}{h} \cdot H_{AB}^2 \cdot \frac{1}{(4\pi\lambda RT)^{1/2}} \cdot e^{\frac{(-\Delta G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda RT}} \quad (1-8)$$

$$\text{et} \quad \Delta G^\ddagger = (\Delta G^\circ + \lambda)^2 / 4\lambda \quad (1-9)$$

En présence d'un environnement polaire, on peut avoir des effets d'entropie considérables, notamment des changements de liberté de rotation des molécules de solvant.

Puisque λ est toujours positive, le terme $(\Delta G + \lambda)$ est le paramètre qui détermine la vitesse de la réaction.

On peut distinguer trois cas, suivant le signe de ce terme : positif, nul ou négatif (Fig. 1-2 a, b, c).

La constante de vitesse dépend de la hauteur de la barrière énergétique suivant l'expression :

$$K = k_0 \cdot \exp [- \Delta G^\ddagger / k_B \cdot R \cdot T] \quad (1-10)$$

où k_0 est la constante de vitesse du transfert d'électron pour $\Delta G^\ddagger = 0$.

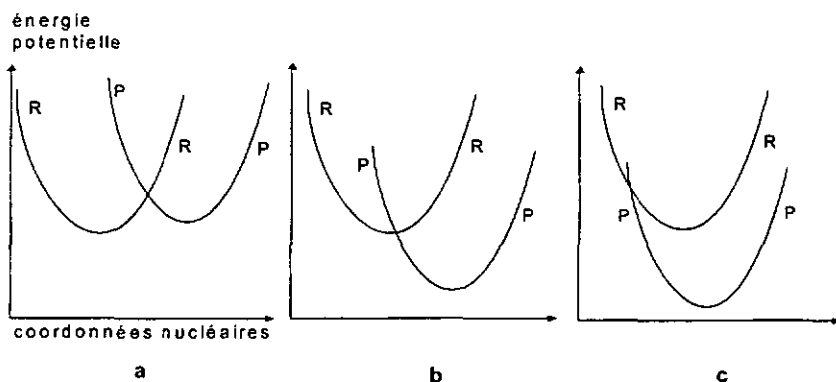


Fig. 1-2 : Diagrammes énergétiques pour les régions

- a) normale ($\Delta G + \lambda > 0$),
- b) inactivée ($\Delta G + \lambda = 0$, $\Delta G^\ddagger = 0$) et
- c) inversée ($\Delta G + \lambda < 0$).

A l'aide des équations (1-8) et (1-9) on peut calculer la variation de la constante de vitesse en fonction du ΔG (voir Fig. 1-2). Dans le cas a) les valeurs du ΔG et ΔG^\ddagger sont positives ; la diminution du ΔG provoque une diminution du ΔG^\ddagger et une augmentation de la constante de vitesse, cette dernière atteignant sa valeur maximale pour $\Delta G^\ddagger = 0$ (cas b). Si la valeur du ΔG diminue encore, le terme $(\Delta G + \lambda)$ devient négatif et ΔG^\ddagger positif ; on se trouve alors dans la région inversée c) où la barrière énergétique augmente de nouveau ce qui provoque une nouvelle diminution de la constante de vitesse.

En plus des facteurs thermodynamiques, la constante de vitesse du processus de transfert d'électron est proportionnelle au couplage électronique entre les deux orbitales par le terme H_{AB} :

$$H_{AB} = H_{AB}^0 \cdot \exp\left[\frac{1}{2} \cdot \beta(r-r^0)\right] \quad (1-11)$$

ou H_{AB}^0 est le couplage électronique à contact rapproché (r^0) et β la diminution du couplage en fonction de la distance r .

Dans le cas des protéines, des valeurs typiques du β observées dans le vide (2.8 Å) montrent que la valeur de la constante de vitesse diminue fortement avec l'augmentation de la distance. Pour le transfert d'électron sur de longues distances, l'énergie de l'électron est réduite et l'importance du milieu augmentée. Sur la base des différentes constantes de vitesse calculées pour des systèmes de transfert d'électron intramoléculaire protéique, la valeur $\beta = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ a été suggérée [18, 19].

Le facteur H_{AB} est maximal pour une valeur de la distance entre les deux centres métalliques de $r = 0.525$ nm. Ce facteur est tellement petit pour les réactions non-adiabatiques, que la probabilité d'une évolution de la réaction vers les produits est quasiment nulle [19].

Dans les réactions d'auto-échange, les réactifs et les produits présentent des propriétés identiques, il s'ensuit que ni changements thermodynamiques, ni changements d'énergie standard de réaction associés au transfert d'électron ne sont observés.

Pour un métal donné, la constante de vitesse augmente avec la taille des ligands, ceci étant dû à une diminution de la barrière d'énergie de réorganisation du solvant ; de même la constante de vitesse diminue quand la distance métal-ligand est très différente dans les deux états d'oxydation.

Le transfert d'électron dans les processus adiabatiques induit des variations dans l'occupation des orbitales localisées sur les centres redox. Ces centres se trouvent dans un milieu diélectrique complexe de géométrie et de polarisation qui sont elles-mêmes une fonction de l'état d'oxydation du système. De plus, une limitation des orbitales impliquées est essentielle pour la promotion du transfert d'électron sur des longues distances. Le transfert d'électron est vu alors comme une transition entre les deux états du système.

1.2.3 Les réactions de transfert d'électron non-adiabatique dans les systèmes biologiques

Les centres d'oxydoréduction biologiques sont constitués de groupes prosthétiques relativement larges, insérés dans les protéines par l'empilement de la chaîne polypeptidique. Grâce à leurs surfaces prochirales, elles déterminent avec précision la forme et l'orientation des réactifs susceptibles d'être considérés comme partenaires, en sélectionnant ainsi, jusqu'à une limite d'une molécule sur 1000, le réactif désiré pour le transfert d'électron [20].

La géométrie du site actif est modélisée par la structure tridimensionnelle du squelette polypeptidique. Cette structure souvent rigide (feuillet β) confère au métal un potentiel contrôlé et une énergie minimale de réarrangement des ligands, favorisant ainsi les réactions rapides de TE. Puisque le métal se trouve à l'intérieur du squelette polypeptidique, une orientation précise et ciblée avec le deuxième réactif permet le transfert d'électron. Des zones de reconnaissance qui définissent les sites réactionnels sont ainsi créées.

Les protéines modulent les propriétés des métaux qu'elles incorporent. Si cette modulation des propriétés électroniques et/ou géométriques est une distorsion fonctionnelle des propriétés observées dans les composés inorganiques habituels, les ions métalliques des métalloprotéines sont considérés dans un état appelé "entatique" [20].

A l'état entatique, une métalloprotéine possède un atome métallique dans une situation énergétique élevée qui augmente l'énergie de l'état fondamental ; ainsi l'énergie d'activation est réduite (Fig. 1-3).

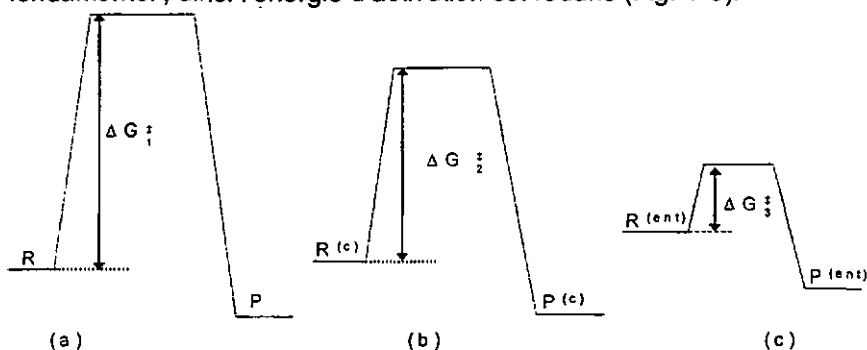


Fig. 1-3 : Différences d'énergie d'activation pour des réactions entre des réactifs simples (a, ΔG_1^\ddagger) en présence de catalyseurs (b, ΔG_2^\ddagger) et à l'état entatique (c, ΔG_3^\ddagger), où R = réactifs, P = produits.

Du fait de l'organisation à l'intérieur des protéines, l'approche trop substantielle des deux centres redox est empêchée et l'électron doit être transféré sur des longues distances. Les faibles interactions résiduelles entre les deux centres placent alors ces processus sous un régime non-adiabatique ; les orbitales appartenant aux deux centres sont trop éloignées pour qu'un recouvrement efficace se produise, ainsi les orbitales du milieu réactionnel leurs servent de médiateur.

La constante de vitesse ne dépendra pas seulement des facteurs nucléaires qui déterminent la dépendance du système de la température, mais aussi des facteurs électroniques qui jouent un rôle central dans les réactions de transfert d'électron sur longues distances.

En plus on doit introduire un facteur stérique pour tenir compte des besoins d'orientation et de la distance entre le milieu et les deux centres d'oxydoréduction [21, 22].

Des différences substantielles entre les réactions des systèmes biologiques et celles des complexes métalliques de faible poids moléculaire se manifestent également dans les propriétés et caractéristiques suivantes:

- les réactions d'auto-échange ne sont en général pas connues et on ne dispose pas d'information structurale permettant de prédire la constante de vitesse absolue ;
- l'environnement qui affecte l'énergie de réorganisation est moins connu et moins homogène ;
- des changements de la conformation des protéines peuvent avoir lieu avant ou après le transfert d'électron ;
- la plupart des réactions de transfert d'électron se passent à une distance de contact entre les réactifs et dépendent des facteurs nucléaires et électroniques ainsi que de l'orientation mutuelle des réactifs, des produits et des molécules du solvant ;
- la constante de vitesse diminue exponentiellement avec la distance entre les deux réactifs mais augmente en même temps à cause de l'état entatique dans lequel se trouve le centre d'oxydoréduction de la protéine. La longue distance du transfert d'électron est compensée par l'existence d'une zone de reconnaissance des partenaires redox à la surface de la protéine, en proximité du centre métallique [16].

Beratan et Onuchic ont développé une hypothèse alternative pour expliquer l'augmentation des constantes de vitesse dans le processus de transfert d'électron sur de grandes distances par un effet tunnel ; l'électron est transféré via des liaisons covalentes, des ponts hydrogène ou même des sauts à travers l'espace qui forment un chemin spécifique à travers le milieu réactionnel [23].

Une conséquence de cette approche est que dans un système biologique on doit prendre en considération plusieurs chemins de transfert d'électron, chacun étant caractérisé par un facteur β individuel. Un chemin plus long peut présenter l'avantage d'une meilleure stabilisation des fonctions d'onde et conduire à des constantes de vitesse plus grandes qu'un chemin plus court.

1.3 Description du système chimique

Un travail concernant la stéréosélectivité demande une connaissance approfondie de la structure des réactifs. Puisque les mesures doivent être effectuées avec des complexes labiles de cobalt(II) et de fer(II), il est nécessaire de leur imposer une structure unique et connue.

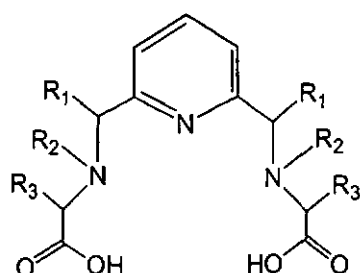
Comme dans une réaction entre des métaux de transition et des ligands pluridentés plusieurs isomères géométriques peuvent théoriquement être formés, on peut restreindre leur nombre en introduisant des caractéristiques structurales spécifiques au ligand. Ces caractéristiques peuvent être telles qu'un arrangement spatial unique autour du centre de coordination soit possible.

Si la sélection se fait entre des diastéréoisomères et qu'une forme prédomine les réactions sont appelées diastéréosélectives ; si une seule forme diastéréoisomère est trouvée les réactions sont dites diastéréospécifiques. Les facteurs qui conduisent à cette diastéréospécificité sont très importants pour les réactions asymétriques.

Les ligands utilisés dans ce travail doivent être diastéréospécifiques : leur chiralité doit déterminer la configuration absolue du complexe.

1.3.1 Ligands

Une série de ligands linéaires pentadentés stéréospécifiques dérivés de N,N' -[(pyridine-2,6diyl)bis(méthylène)]bis(glycine) a été développé dans le groupe Bemauer, le premier de la série étant bamap [24]. Dans le travail présent seront utilisés les ligands alamp et promp, qui font aussi partie de cette série.



	R ₁	R ₂	R ₃	nom
a	-H	-H	-CH ₃	alamp
b	-CH ₃	-CH ₃	-H	bamap
c	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	-H		bapap
d	-H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		promp
e	-H	-CH ₃	-CH ₃	malmp
f	-H	-CH ₃	-H	samp

Fig. 1-4 : Ligands linéaires pentadentés dérivés de la N,N' -[(pyridine-2,6diyl)bis(méthylène)]bis(glycine).

En se coordonnant autour des centres métalliques octaédriques, ces ligands devront laisser un site disponible qui, selon la structure imposée, sera situé en position trans au cycle pyridinique.

De toute la série, sarnmp est le seul ligand n'ayant pas d'atome de carbone asymétrique dans sa structure. Par contre il possède un groupe méthyle sur chacun de ses azotes qui deviennent chiraux lors de la coordination à un ion métallique. Ce ligand peut donc être utilisé pour des études stéréosélectives à condition de se trouver associé à des centres de coordination inertes. Sarnmp peut être comparé à alarnmp qui possède un groupe méthyle sur chaque atome de carbone(α) de l'unité aminocarboxylate.

D'un autre côté, malarnmp et promp portent des substituants aussi bien sur les atomes d'azote que sur les atomes de carbone.

La caractérisation spectroscopique des deux ligands utilisés se trouve dans la partie expérimentale, chapitre 2.1.

1.3.2 Complexes

Généralement, la formation d'un complexe octaédrique par coordination d'un ligand pentadenté linéaire peut conduire à 4 isomères géométriques:

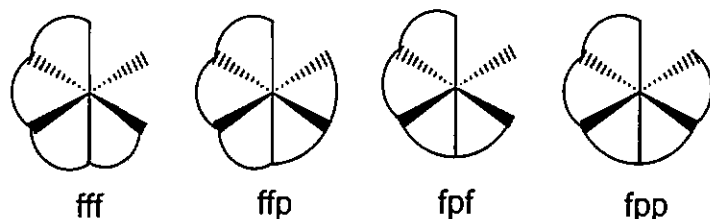


Fig. 1- 5 : Possibilités de coordination d'un ligand pentadenté sur un centre octaédrique (f = facial, p = périphérique).

De ces quatre isomères géométriques, un seul (fff) présente un plan de symétrie, tandis que les trois autres sont chiraux ; en effet ffp, fpf et fpp peuvent exister sous deux formes énantiomériques.

La substitution en position 2,6 de la pyridine impose une coordination périphérique (méridionale) des trois atomes d'azote. La coordination des paires de cycles comprenant l'unité de l'acide aminé favorise par contre un arrangement facial.

La symétrie de type C_2 de l'isomère fpf implique la présence de deux énantiomères qui, par l'introduction de centres stables de chiralité déterminée dans le ligand, deviennent des diastéréoisomères. Les structures de rayons X [25] montrent que l'utilisation des ligands optiquement actifs de chiralité connue impose la formation d'un seul de

ces diastéréoisomères, de configuration absolue Λ pour les ligands de structure S,S et Δ pour ceux de structure R,R.

Ainsi le substituant porté par le carbone asymétrique est toujours dirigé en direction de la sixième position de coordination (*exo*) dans le cas du ligand alamp [24]. La symétrie C_2 et la configuration absolue des complexes de cobalt(III) avec des ligands pentadentés dont la structure ne peut pas être déterminée par diffraction des rayons X peut être confirmée par la comparaison des spectres CD et RMN.

La diastéréospécificité observée pour la formation des complexes inertes de cobalt(III) nous permet d'adopter l'hypothèse que l'on retrouve les mêmes configurations absolues pour les complexes labiles de cobalt(II) et de fer(II) utilisés au long de ce travail (Fig. 1-6).

Les propriétés spectroscopiques des complexes utilisés sont présentées dans la partie expérimentale, chapitre 2.1.

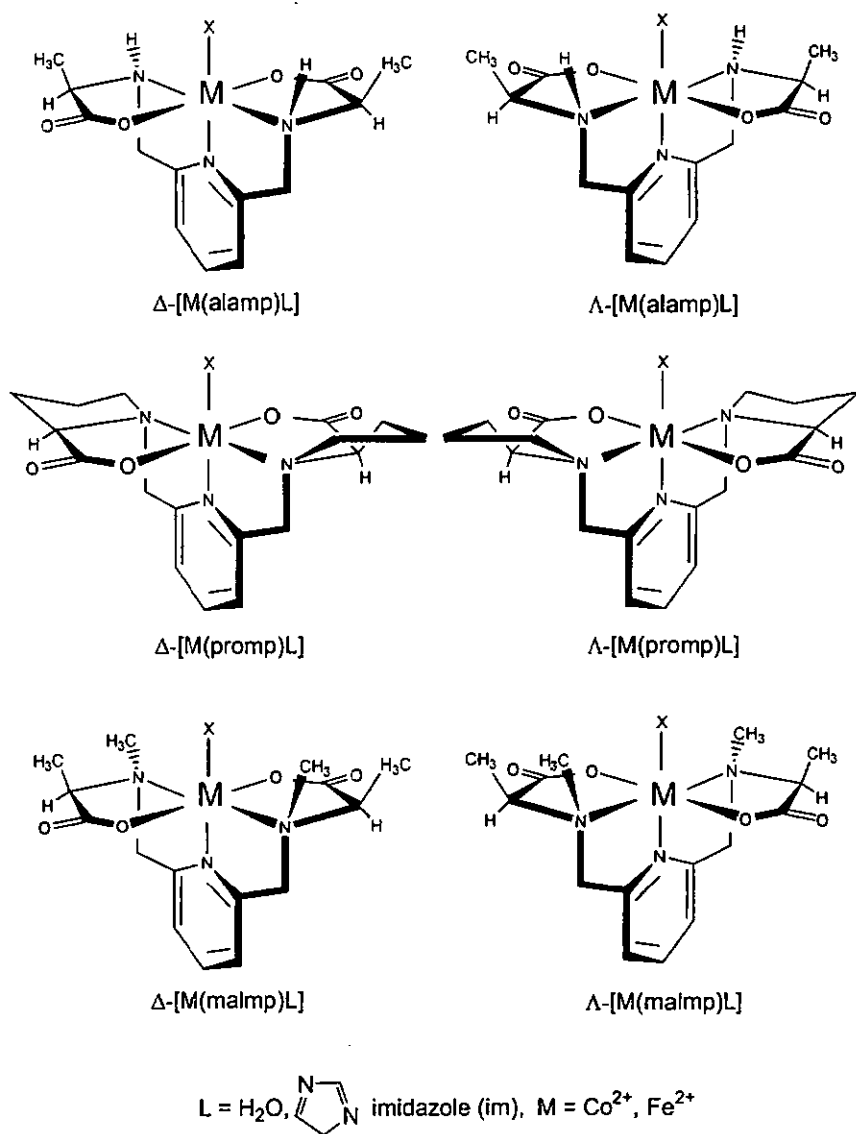


Fig. 1- 6 : Complexes réducteurs optiquement actifs utilisés.

1.4 Description du système biologique

Dans l'étude d'une métalloprotéine, on est confronté à un grand nombre de caractéristiques parmi lesquelles on choisit celles qui sont à même d'expliquer la fonction étudiée. Les caractéristiques les plus importantes sont : la structure tridimensionnelle, en particulier celle de la zone où le métal réside; la nature de l'ion métallique, des groupes coordinateurs ainsi que la géométrie du site actif.

Le mode de coordination des ions métalliques représente un des facteurs principaux pour le comportement des métallobiomolécules. Deux types de ligands prédominent : les groupes coordinateurs des chaînes latérales des acides aminés qui constituent le squelette protéique (histidine, asparagine, glutamine, cystéine et méthionine) et les macrocycles que l'on trouve dans les protéines porphyriques. Les géométries observées pour les sites métalliques présentent des distorsions par rapport à celles des complexes métalliques simples. Ces distorsions sont dues aux contraintes imposées par la structure de la chaîne polypeptidique et représentent un phénomène important dans la fonctionnalisation biologique d'une métalloprotéine.

A côté de fer et de zinc, le cuivre est un des métaux les plus importants dans une série très étendue d'organismes allant des bactéries jusqu'aux mammifères, où il joue souvent un rôle essentiel (synthèse de la porphyrine, autres processus métaboliques).

Sa configuration électronique lui permet l'alternance entre deux états d'oxydation relativement stables, Cu^{2+} ($3d^9 4s^0$) et Cu^+ ($3d^{10} 4s^0$) ce qui permet au cuivre de jouer le rôle de cofacteur redox actif dans des processus bioénergétiques.

Les réactions catalysées par le cuivre incluent le transfert d'électron, le transport de l'oxygène moléculaire, l'oxygénation / oxydation des substrats couplés avec la réduction de la molécule O_2 en H_2O_2 ou H_2O , la réduction des oxydes d'azote dans le métabolisme respiratoire, etc. Le cuivre intervient dans plusieurs processus chimiques dans l'organisme humain comme l'oxydation catalytique, le métabolisme des tissus conjonctifs, la synthèse des phospholipides, la pigmentation des cheveux, l'ossification, etc.

Puisque dans le cytoplasme la concentration en cuivre libre est maintenue à des niveaux ne dépassant pas 10^{-5} M, l'excès étant chélaté par des métallothionéines ou des phytochélatines, le cuivre est soit extracellulaire (par exemple dans la céruloplasmine, la lysine oxydase, la galactose oxydase ou la cytochrome oxydase), soit lié à des protéines de structure essentiellement β où l'échange est fortement inhibé à cause des liaisons fortes M-L [26, 27].

Les atomes de cuivre(II) présents aux biosites ont été classés en fonction de leurs propriétés spectroscopiques [28] :

- le type I (ou bleu) a une absorption très intense dans la région visible du spectre, un potentiel d'oxydoréduction élevé [29] et présente un spectre EPR très particulier ;

- le type II (ou normal) a une faible absorption et un spectre EPR typique des complexes habituels de cuivre(II) ;
- le type III, constitué d'une paire d'ions cuivre(II) couplés antiferromagnétiquement, est présent au site actif et montre une forte bande d'absorption aux environs de 330 nm. Il ne donne pas de signal EPR.

Dans certains cas, une forme de cuivre intermédiaire entre les types I et II a été trouvée [31], présentant des paramètres EPR intermédiaires aux types de cuivre I et II ainsi qu'une coloration moins intense que celle du cuivre bleu.

L'azurine et la plastocyanine sont deux exemples représentatifs de la classe des protéines de cuivre bleu (type I) qui a son tour peut être divisée en deux catégories :

- les oxydases, dont des exemples typiques sont la laccase (diphénoloxydase) et l'oxydase de l'acide ascorbique. Ces enzymes ont un poids moléculaire supérieur à 20 kDa, incorporent entre 4 et 8 atomes de cuivre et sont produites dans les organismes animaux et végétaux.
- les protéines impliquées dans le transfert d'électron, appelées aussi cuprorédoxines, comme l'azurine (isolée des bactéries dénitrifiantes), la plastocyanine (originaires des plantes supérieures et algues vertes) et la stéllacyanine. Toutes les protéines de cette classe ont de petites tailles (entre 10 et 20 kDa) et sont impliquées dans le métabolisme respiratoire où elles reçoivent et délivrent des électrons.

La géométrie du site actif est modélisée par la structure tridimensionnelle du squelette polypeptidique. Cette structure est souvent rigide et l'énergie nécessaire au réarrangement des ligands est minimale, favorisant les réactions rapides de TE. Les règles qui gouvernent la structure des biomolécules sont très semblables pour les apoprotéines et pour les holoprotéines.

Le cuivre(I), (d^{10}), est relativement petit (74 pm) et sa géométrie de coordination la plus stable est linéaire ou trigonale plane. En revanche le cuivre(II), (d^9), est habituellement coordonné octaédriquement avec une déformation de Jahn-Teller [31].

Dans le cas de la plastocyanine et de l'azurine, le cuivre est situé dans un tétraèdre aplati, à mi-chemin entre les deux géométries extrêmes, ce qui facilite de point de vue énergétique le transfert électronique, autrement inhibé par une réorganisation structurale. Cette géométrie de type trigonale des sites actifs, considérée dès les années '60 comme étant à l'origine de leurs propriétés spectroscopiques, a été confirmée par diffraction des rayons-X [32, 33, 34].

1.4.1 Azurine

La protéine bleue de *Pseudomonas* a été découverte en 1958 par Horio [35] et nommée azurine par Sutherland et Wilkinson [36]. A l'heure actuelle 10 formes différentes d'azurine ont été isolées de plusieurs types de bactéries (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bordatella*, *Achromobacter*) et caractérisées. Leurs séquences présentent des similarités sauf dans le cas des azurines isolées de *Achromobacter*. Les bactéries source de l'azurine sont des organismes unicellulaires procaryotes dont la membrane cellulaire est doublée par une membrane externe délimitant l'espace périplasmique qui contient l'azurine [37].

Le gène de l'azurine utilisé dans ce travail provient de *Ps. aeruginosa*, une bactérie gram-négative qui croît tant sous conditions aérobiques qu'anaérobiques [38]. *Ps. aeruginosa* est capable d'utiliser le nitrate comme source d'azote pour sa croissance aérobique dans le sol (assimilation du nitrate) ou comme accepteur terminal d'électron dans la respiration nitrate anaérobique, processus dépendant d'une série d'enzymes redox actives [39] (Fig. 1-7).

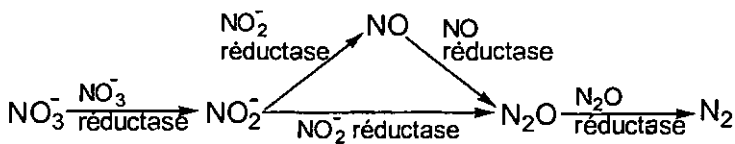


Fig. 1-7 : Les deux possibilités de réduction du nitrate durant la croissance anaérobique de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'azurine opère comme unité de transfert d'électrons associée à la chaîne du cytochrome c_{551} et l'enzyme nitrite réductase dans ce processus de respiration nitrite. Le cytochrome c_{551} , aussi présent dans l'espace périplasmique [40, 41] peut agir à son tour comme donneur d'électrons soit pour la nitrite réductase soit pour l'azurine [39]. L'azurine et le cytochrome c_{551} sont tous les deux réduits par un complexe membranaire qui contient deux types de cytochromes : b et c_1 (Fig. 1-8).

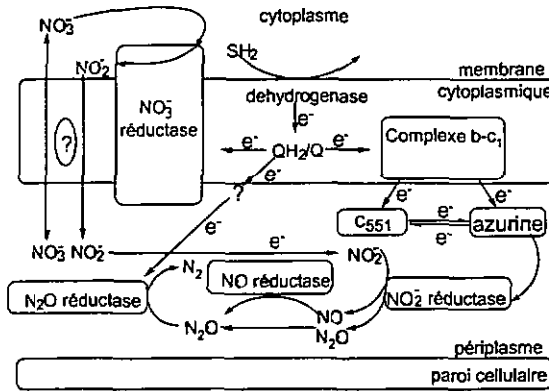


Fig. 1-8 : Organisation des enzymes réductrices, de l'azurine et du cytochrome c_{551} dans la chaîne de respiration anaérobie de *Pseudomonas aeruginosa*.

La réaction très rapide de TE entre l'azurine et le cyt c_{551} a été étudiée en détail par plusieurs groupes et les résultats compilés [42]. Les deux protéines semblent être en compétition pour le centre actif de la nitrite réductase, mais la réaction de la dernière avec le cyt c_{551} paraît plus favorable à cause de la plus grande affinité de l'enzyme [43] ce qui soulève des questions sur le rôle physiologique exact de l'azurine. La compétition entre ces deux donneurs d'électrons est une façon probable

d'adaptation de la bactérie aux concentrations disponibles de fer et de cuivre dans l'environnement.

A cause du caractère pathogène de *Ps. aeruginosa*, l'azurine a été exprimée dans le système cellulaire de *E. coli*, le mieux connu et le plus facilement maniable du point de vue biochimique [44].

E.coli, bactérie localisée dans le tract intestinal des humains et des animaux, est l'organisme le mieux connu au niveau moléculaire. Le cytoplasme de la cellule d'*E. coli* (Fig. 1-9) contient 1 ruban d'ADN long d'environ $10^3 \mu\text{m}$ (a), des ribosomes seuls (b) ou attachés à l'ARN messenger (c). La cellule est délimitée par une membrane double (d, e) qui enferme l'espace periplasmique (g), comme dans le cas de *Ps. Aeruginosa*. Des pili (environ 100) sont attachés (f) à la membrane cellulaire et quelques souches de cette bactérie sont munies de flagelles [45].

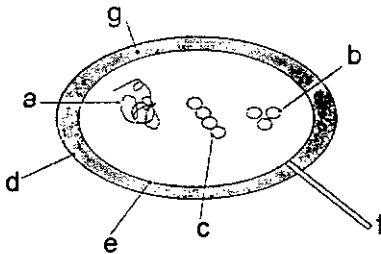


Fig. 1-9 : Coupe schématique d'une cellule d'*Escherichia coli*.

L'azurine produite dans le cytoplasme est programmée de façon à être sécrétée dans l'espace periplasmique, d'une part parce qu'elle y est normalement localisée et d'une autre part pour qu'elle puisse former correctement son pont disulfide dans cet environnement oxydant [44].

Les structures aux rayons-X ont été déterminées pour l'azurine de *Ps. aeruginosa* [46, 47] et de *Alc. denitrificans* [48, 49], une unité cristallographique contenant quatre molécules asymétriques d'azurine. La protéine mature a un poids moléculaire d'environ 14-14.6 kDa et contient entre 124-129 résidus d'acides aminés (Fig.1-10) desquels 47 se conservent pour 10 azurines différentes.

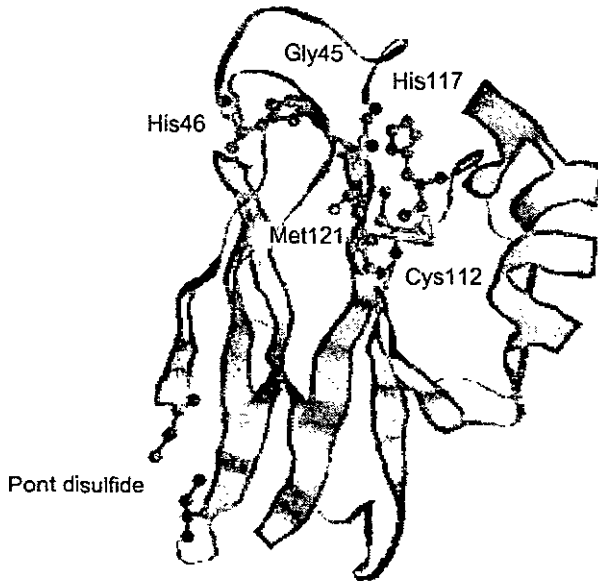


Fig. 1-10 : Structure tertiaire de l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa*.

La protéine a une structure de cylindre aplati (sandwich) composée de 8 brins β qui forment une structure en baril et une hélice α (Fig. 1-11). Un tournant entre deux rubans β contient trois des cinq groupes coordinateurs du cuivre, lequel se trouve à une distance d'environ 7 Å de la surface protéique.

Seulement 9 résidus sont invariables et parmi eux ceux qui forment le site actif: **N**(His46), **S**(Cys112), **N**(His117), **S**(Met121) et **O**(Gly45).

```

AECSDIQGN DQMCFNTNAI TVDKSCKQFT
VNLSHPGNLP KNVMGHNWV LSTAADMQGV
VTDGMASGLD KDYLKPDDSR VIAHTKLIGSG
EKDSVTFDVS KLKEGEQYMF FCTFPGHSAL
MKGTLTLK

```

Fig. 1-11 : Structure primaire de l'azurine de *Ps. aeruginosa*, en gras les acides aminés coordinateurs du cuivre.

La topologie des 8 chaînes β est similaire à celle de la superoxyde dismutase, aux immunoglobulines et aux quelques protéines antitumorales d'origine bactérienne [26]. Cette topologie est apparemment adoptée plutôt pour stabiliser l'unité structurale que pour la fonctionnaliser. Ces protéines, similaires de par leur structure, présentent une fonctionnalité commune en liant chacune des cofacteurs (métal, antigènes ou petites molécules organiques) mais pas nécessairement au même emplacement.

Le cuivre dans l'azurine est pentacoordonné, de géométrie bipyramidale trigonale distordue (Fig. 1-12).

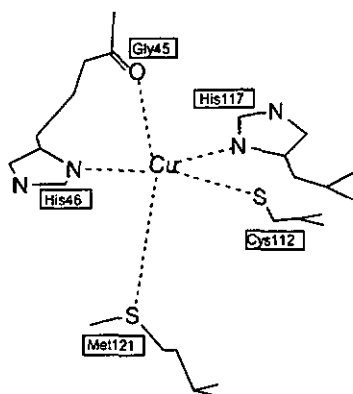


Fig. 1-12 : Site actif de l'azurine oxydée de *Pseudomonas aeruginosa*.

Un soufre appartenant à une cystéine et deux azotes imidazole forment un plan presque trigonal et les deux ligands restants 1 S(Met) et 1 O(Gly) sont fixés en position apicale avec une très longue liaison Cu-S(Met) (Tab. 1-1). A titre de comparaison, les valeurs correspondant à la plastocyanine sont incluses dans le tableau. Dans la stéllacyanine et les protéines analogues ce ligand axial est un groupe amide glutamate.

Azurine	Cu(I)	Cu(II)	Plastocyanine	Cu(I)	Cu(II)
Cu-N-His ⁴⁶	2.13	2.08	Cu-N-His ³⁷	2.12	2.04
Cu-S-Cys ¹¹²	2.26	2.15	Cu-S-Cys ⁸⁴	2.11	2.13
Cu-N-His ¹¹⁷	2.05	2.00	Cu-N-His ⁸⁷	2.25	2.10
Cu-S-Met ¹²¹	3.23	3.11	Cu-S-Met ⁹²	2.90	2.90
Cu-O-Gly ⁴⁵	3.22	3.13			

Tab. 1-1 : Longueurs de liaison (nm) pour les sites biométalliques de l'azurine et de la plastocyanine.

Des études récentes montrent qu'un ion de cuivre entouré de mêmes ligands que dans l'azurine présente une géométrie similaire à celle observée pour le site actif [50]. De plus, la structure trigonale et les propriétés spectroscopiques des protéines sont plutôt dues à la forte interaction covalente S(Cys112) – Cu qu'à la structure imposée par le squelette polypeptidique [51, 52]. Cette interaction plus le fait que l'histidine et la méthionine forment des liaisons souples avec l'ion de cuivre donnent une faible énergie de réorganisation et par cela permet une constante de vitesse importante pour la réaction de transfert d'électron [53].

La seule liaison qui subit des contraintes d'organisation du squelette protéique est celle de Cu-S(Met121) [54] de longueur observée 3.1 Å (normale 2.3 Å). Cette élongation réduit significativement le transfert de charge sur l'ion métallique et augmente ainsi le potentiel redox, hypothèse confirmée par des calculs [54].

Malmström et Leckner ont étendu cette hypothèse aux autres protéines de cuivre bleu [55] et ont souligné que la stellacyanine a la plus forte liaison avec son ligand axial (2.2 Å), un groupe amide / glutamine et aussi le potentiel redox le moins élevé de toutes les protéines de cuivre bleu, 150 mV, comparable au potentiel des aquaions. Les 2 ligands axiaux de l'azurine, une méthionine et un groupe carbonyle peptidique se trouvent à environ 3.1 Å du cuivre et en conséquence le potentiel redox est plus haut (285-310 mV) [56, 57]. Finalement pour la plastocyanine la distance Cu-O augmente encore à 3.9 Å et le potentiel atteint 370 mV [56]. Malmström et Leckner suggèrent que l'enroulement de la chaîne

polypeptidique de la protéine dicte la valeur du potentiel du site métallique en variant la force de la liaison avec les ligands axiaux [55].

Récemment, Olsson et Ryde [58] ont démontré par des calculs (DFC) que les liaisons axiales du cuivre présentent des elongations imposées par la chaîne polypeptidique seulement à l'état réduit, rejoignant ainsi l'hypothèse initiale de Solomon [54].

La géométrie déformée du centre métallique et la nature de ses ligands déterminent les propriétés spectroscopiques de l'azurine :

- une coloration bleu intense à l'état oxydé qui provoque une forte bande d'absorption à 625 nm ($\epsilon = 5\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) principalement due à un transfert de charge du ligand sur le métal ($S_p \rightarrow Cu_{dx^2-y^2}$). A l'état réduit l'azurine n'absorbe pas dans le domaine visible. Les deux formes (oxydée et réduite) ont entre 240-300 nm des pics et des épaulements correspondant aux résidus aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (Fig. 1-13). Les ponts disulfide (cystéine) contribuent aussi à augmenter l'intensité de l'absorption dans cette région. Les solutions d'azurine peuvent se réduire en étant exposés longtemps à la lumière.
- un dédoublement hyperfin très rapproché ($A_{H1} < 0.95 \cdot 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$) dans le spectre de résonance paramagnétique de l'électron (EPR) par rapport au spectre d'un complexe plan carré de Cu(II) (Fig. 1-14).

Le spectre CD confirme la structure tertiaire de la protéine (Fig. 1-15).

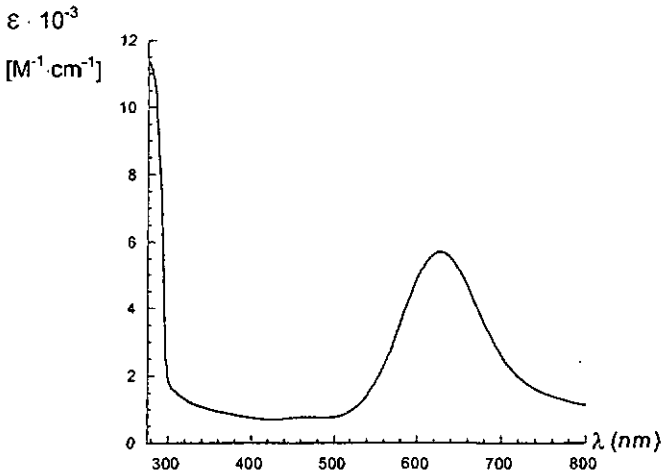


Fig. 1-13 : Spectre UV-Vis de l'azurine oxydée.

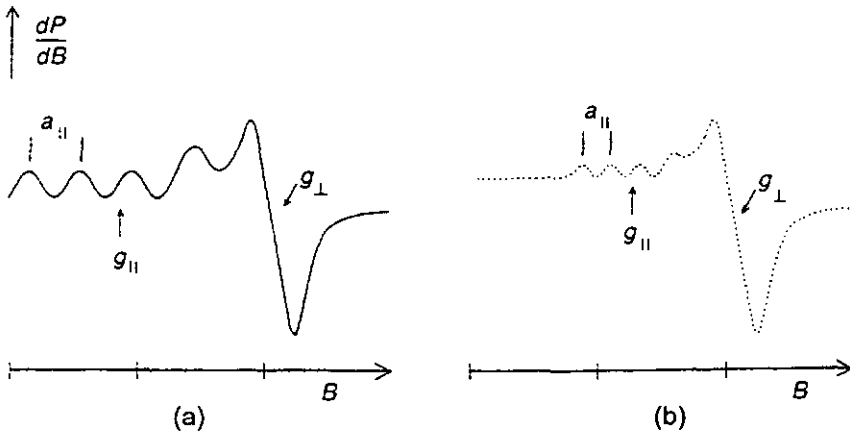


Fig. 1-14 : Différence entre le spectre EPR d'un complexe synthétique de cuivre(II) (a) et celui d'une cuproprotéine (b).

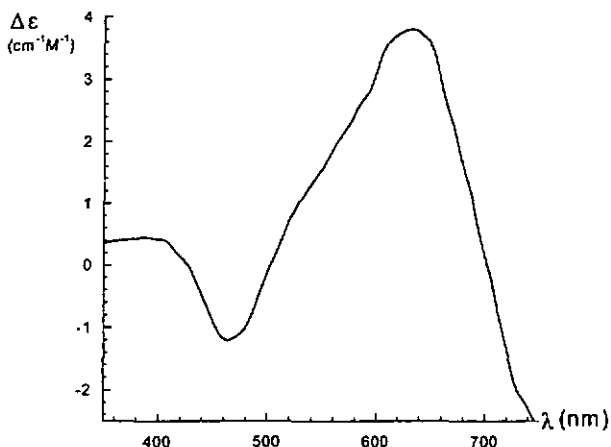


Fig. 1-15 : Spectre CD de l'azurine à l'état oxydé.

Contrairement à la plastocyanine (cf. 1.4.2), l'azurine n'a pas des régions de charge dominante, la plupart des résidus chargés étant neutralisés par un résidu voisin de charge opposée. Sa faible charge négative à $\text{pH} \approx 7$ est compatible avec la valeur de son point isoélectrique $\text{pI} = 5.6$.

Une poche hydrophobe est présente autour de His117, le seul résidu coordinateur exposé au contact avec le solvant, considéré comme site probable de transfert d'électron dans la réaction avec le cytochrome c_{551} [59, 60].

La spectroscopie de l'azurine a été revue par Gray et Solomon [61] et les aspects cinétiques par Farver et Pecht [62].

Cummins et Gray ont défini l'accessibilité cinétique relative de plusieurs protéines par la comparaison des constantes de vitesse de paires des réactifs [63] conformément au formalisme de Marcus [64]. Si les

constantes de vitesse d'auto-échange dérivées ne varient pas, ils concluent qu'un seul chemin réactionnel est utilisé, donc le nombre de constantes de vitesse d'auto-échange est égal au nombre de sites de transfert d'électron.

Plusieurs études cinétiques de l'interaction azurine-cytochrome c_{551} en fonction du pH ont mis en évidence deux phases de relaxation : un processus rapide, attribué à la réduction de l'azurine par le cytochrome c_{551} et une conversion lente entre une forme active et une forme inactive de l'azurine réduite [65, 66, 67, 68]. Par des études RMN, la forme active est attribuée à la présence de l'His35 protonée. Ces résultats corroborent ceux de Lappin et al. [69] obtenus dans le système cyt c_{551} -azurine(Cr).

Brunori [70] et Parr [71] expliquent le mécanisme de réaction avec la cytochrome oxydase (indépendant de la présence du chrome) par l'existence de deux conformations de l'azurine réduite. Si ces deux formes sont les mêmes que dans la réaction avec le cyt c_{551} , l'azurine doit utiliser des sites séparés dans les deux cas.

En conclusion, l'azurine doit posséder au moins deux surfaces d'interaction dont l'une est utilisée par le cytochrome c_{551} , chrome ou $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ et l'autre par la nitrite réductase. Le résidu invariant His35 a été identifié comme coresponsable du comportement cinétique de l'azurine et impliqué dans un chemin interne de transfert d'électron.

1.4.2 Plastocyanine

La plastocyanine est la mieux caractérisée des protéines de cuivre bleu. Isolée de *Chlorella ellipsoidea* et caractérisée pour la première fois par Kato en 1960 [72], la plastocyanine doit son nom à sa couleur bleu et à sa localisation dans le lumen chloroplastique [73]. A l'heure actuelle les plastocyanines d'une trentaine de sources biologiques (plantes supérieures, algues vertes et bactéries photosynthétiques) ont été mises en évidence et caractérisées [29, 74].

La plastocyanine participe, dans les plantes vertes et les algues, au transport d'électrons entre le cytochrome-f et P700⁺ (Fig. 1-16), autrement dit entre les deux photosystèmes (I et II) de la chaîne photosynthétique.

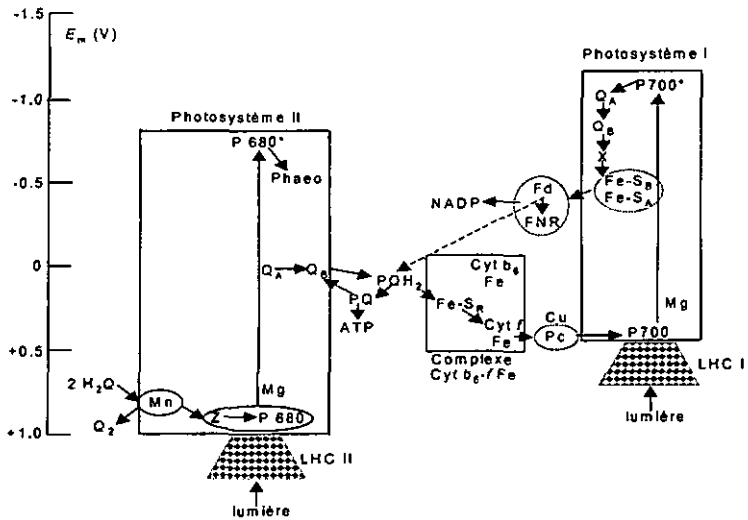


Fig. 1-16 : Schéma du système photosynthétique indiquant la position de la plastocyanine.

La structure aux rayons-X a été déterminée pour l'holoplastocyanine oxydée [27] et réduite [34] ainsi que pour l'apoprotéine [75] de peuplier. A été déterminée aussi la structure cristalline de la plastocyanine de l'algue verte *Enteromorpha prolifera* [76]. Des structures déduites des mesures RMN existent pour la plastocyanine réduite du haricot [77, 78], de l'épinard [79] et de *Scenedesmus obliquus* [80]. Toutes les structures obtenues montrent seulement de faibles différences entre l'état cristallin et la solution. Même entre des plastocyanines de différentes espèces on n'observe pas de changements majeurs.

La plastocyanine (Fig.1-17) est une protéine de cuivre bleu contenant 99 acides aminés et de masse ~10 kDa.

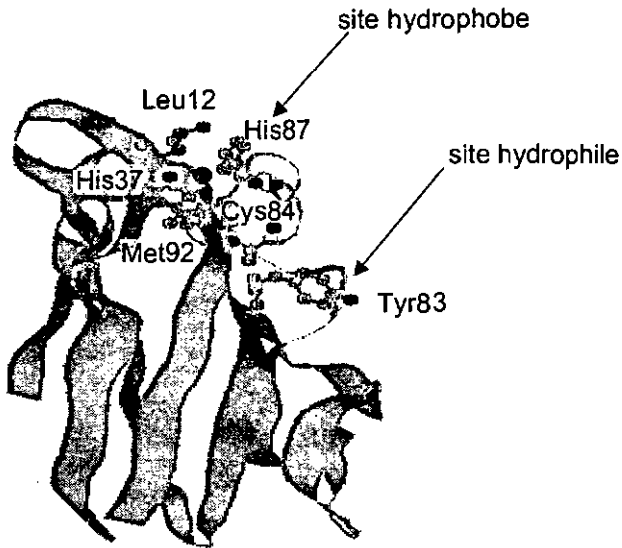


Fig. 1-17 : Structure tertiaire de la Pc de peuplier.

Sa structure tertiaire a la forme d'un cylindre aplati, composé de sept brins β et une hélice α avec le site actif situé au Nord de sa représentation structurale, distant d'environ 6 Å de la surface.

La comparaison des séquences de 67 plantes montre que 64 de ses 99 acides aminés sont conservés, ce qui indique que la conformation de la protéine doit être essentielle pour le fonctionnement de la protéine. Les séquences des plastocyanines provenant de trois algues sont beaucoup moins conservées. Dans ce travail, la séquence de la plastocyanine utilisée correspond à celle de la plastocyanine extraite des feuilles de l'épinard *Spinacia oleracea*.

```
VEVLLGGGDG SLAFLPGDFS VASGEEIVFK  
NNAGFPHNVV FDEDEIPSGV DAAKISMSEE  
DLLNAPGETY KVTLTEKGTY KFYCSPHQGA  
GMVGKVTVN
```

Fig. 1-18 : Structure primaire de la Pc d'épinard ; avec les acides aminés coordinateurs du cuivre, les résidus de la poche négative et les résidus de la poche hydrophobe mis en évidence.

Parmi les acides aminés conservés, quatre se retrouvent dans toutes les séquences de plastocyanine : His37, Cys84, His87 et Met92. Ces groupes fournissent les quatre ligands du cuivre (Fig. 1-19) qui déterminent une même géométrie tétraédrique distordue dans les deux états d'oxydation [34], avec une liaison particulièrement longue Cu - S(Met92), dans l'intervalle de pH de 7 à 4.2.

A un pH inférieur à 4.0 His87 est protonée, ce qui provoque la rupture de sa liaison avec le cuivre. La géométrie de coordination de ce dernier devient trigonale planaire, favorisant fortement l'état réduit Cu(I) qui devient redox inactif [81].

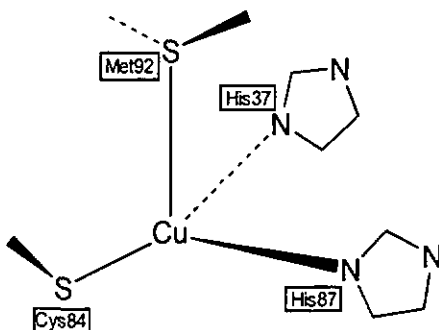


Fig. 1-19 : Site actif de la plastocyanine à pH = 7.

La forme oxydée de la plastocyanine est caractérisée par une couleur bleu intense. Son spectre d'absorption présente une bande principale à 597 nm qui correspond principalement à un transfert de charge ligand-métal $S(p)-Cu(d_{x^2-y^2})$ [82] et une région de pics entre 240 et 300 nm due aux résidus tyrosine et phénylalanine [29] (Fig. 1-20). La forme réduite de la plastocyanine ne présente pas de bande d'absorption à 597 nm et montre une réduction de 30% de l'absorption dans la région 240-300 nm (Fig. 1-20).

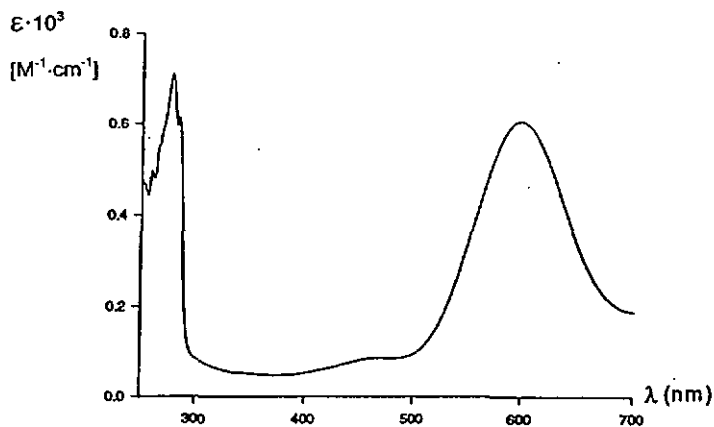


Fig. 1-20 : Spectre UV-Vis de la Pc d'épinard à l'état oxydé.

La structure tertiaire de la plastocyanine est aussi confirmée par son spectre CD (Fig.1-21).

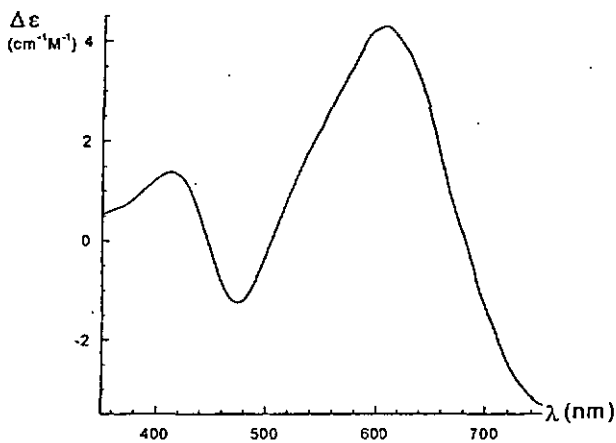


Fig. 1-21 : Spectre CD de la Pc d'épinard à l'état oxydé.

Le potentiel élevé d'oxydoréduction ($E'_0 = +370$ mV) de la plastocyanine explique sa localisation à proximité du photosystème I dans la chaîne photosynthétique. Le potentiel d'oxydoréduction de la plastocyanine est stable dans le domaine pH = 6.5 – 9.5, mais varie en dessous de pH = 6.5 pour atteindre la valeur limite de 420 mV à pH = 5 [83].

Le centre métallique est situé dans une poche hydrophobe qui a l'His87 comme seul contact avec le solvant. Ce résidu a été désigné comme site probable pour le transfert d'électron.

Deux sites ont été localisés pour les réactions de transfert d'électron avec des systèmes synthétiques [81, 56]. Par la suite ces sites ont été reconnus comme étant les mêmes pour les réactions avec partenaires biologiques dans la chaîne des réactions photosynthétiques [32]. Le premier est l'environnement hydrophobe de l'Histidine 87 qui ne contient pas de résidus chargés et le deuxième l'environnement hydrophile de la Tyrosine 83 fortement négatif à pH = 7 à cause de ses nombreux résidus carboxylates (Fig. 1-17).

La poche hydrophile est localisée sur le côté Est de la molécule et utilisée, surtout à l'aide de la Tyr83, dans les réactions avec des complexes cationiques [84] ou pour la fixation des complexes réducteurs de chrome(II) à la surface de la plastocyanine [85-89]. A ce site chargé négativement une association préalable est suggérée entre des complexes cationiques et la protéine [81], conduisant à un phénomène de saturation de la vitesse dépendante du pH et de la force ionique [64].

Des complexes cationiques jouent un rôle inhibiteur dans l'oxydation du cytochrome-f par la plastocyanine, laissant supposer que la Tyr83 est aussi le site de TE pour le cytochrome-f *in vivo* [90].

La poche hydrophobe semble impliquée, à travers His87, dans les réactions avec des complexes anioniques qui sont indépendantes du pH et de la force ionique.

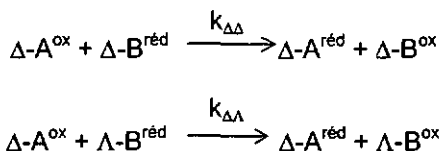
La réactivité diminuée observée entre le mutant PcLeu12Glu et les particules du PS I [91] ont désigné le chemin de TE au niveau de cette poche hydrophobe de la plastocyanine. De plus l'étude du mutant Tyr83His exclue la participation de ce dernier au transfert d'électron vers P700 [92]. L'implication du site hydrophobe a été reconnue dans le TE avec les complexes [Co(alamp)] par Verardo [4].

Les études de mutagenèse dirigée effectuées par Nusbaumer [5] montrent que la Leucine12 a surtout un rôle de support du TE avec le complexe [Co(alamp)]. L'existence d'un troisième site possible pour le transfert d'électron a été suggérée [5] dans le système impliquant [Co^{II}(promp)H₂O]⁺.

1.5 Stéréosélectivité

La stéréosélectivité est définie dans les réactions impliquant des composés chiraux ou prochiraux soit comme une différence entre des constantes de vitesse causée par la formation des intermédiaires diastéréoisomères d'énergie différente (stéréosélectivité cinétique) soit comme une distribution non-statistique entre des produits diastéréoisomères dans une situation d'équilibre (stéréosélectivité thermodynamique) [93].

Une approche théorique de la reconnaissance chirale lors de réactions de TE a été formulée par Lappin [22]. La stéréosélectivité est une mesure directe de la réactivité relative d'un composé optiquement actif avec les formes énantiomères du partenaire redox.



Puisque l'erreur expérimentale pour la détermination des constantes de vitesse est d'environ 5%, la stéréosélectivité peut être mise en évidence/détectée par la mesure des constantes de vitesse individuelles seulement si la différence entre les constantes de vitesse dépasse 10% (le rapport $k_{\Delta}/k_{\Lambda} > 1.1$). Une plus grande sensibilité peut être atteinte par

un enrichissement optique dans la réaction d'un mélange racémique avec un réactif énantiomériquement pur [93].

Dans la réaction de transfert d'électron faisant intervenir une métalloprotéine, la reconnaissance chirale peut intervenir à deux niveaux:

- lors de la formation du complexe précurseur (un des deux énantiomères forme un intermédiaire énergétiquement plus favorable avec la protéine);
- lors du transfert d'électron proprement dit (un de deux énantiomères possède un meilleur recouvrement orbitalaire avec l'autre réactif).

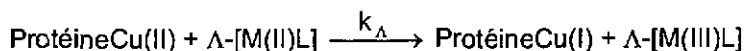
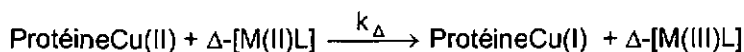
En 1980 Taube [94] parle pour la première fois de stéréosélectivité dans une réaction de TE. Par la suite, il y aura des propositions concernant le mécanisme réactionnel, l'identification du précurseur de TE sphère externe [95] et aussi des propositions de structures intermédiaires entre deux complexes optiquement actifs dans un système de TE sphère interne [12].

Le premier transfert d'électron stéréosélectif dans le cas d'une métalloprotéine a été observé entre la plastocyanine et les complexes de fer(II) optiquement actifs Λ -[Fe(S,S)alamp] et Δ -[Fe(R,R)alamp] par Bernauer et Sauvain [3]. Par la suite il s'est avéré que les mesures de la reconnaissance chirale permettent l'identification des sites réactionnels dans les métalloprotéines [3, 96, 97]. Les complexes métalliques avec des ligands pentadentés optiquement actifs étudiés dans le groupe Bernauer montrent le même comportement avec d'autres métalloprotéines. Le transfert d'électron est en effet stéréosélectif lors de

la réduction du cytochrome c en présence des complexes de fer(II) avec les ligands phemp, alamp et promp [98] ainsi que l'oxydation de la ferrédoxine par des complexes de cobalt(III) avec les ligands alamp et promp [99]. Pour ces trois systèmes, des mesures en fonction de la température ont montré un phénomène compensatoire dans les variations des paramètres d'activation observés, l'enthalpie et l'entropie d'activation. En effet, l'énantiomère possédant la plus faible enthalpie d'activation possède également l'entropie d'activation la plus négative. Par conséquent la stéréosélectivité est fortement influencée par les variations de température.

Ce comportement a été interprété par un ΔH^\ddagger élevé signe d'une bonne reconnaissance chirale et d'une liaison plus forte de la paire redox, ce qui conduit à une plus grande désolvatation et donc à un ΔS^\ddagger plus positif.

La stéréosélectivité du transfert d'électron se traduit par une différence dans les vitesses de réduction entre les deux énantiomères selon les équations suivantes :



Deux techniques peuvent être utilisées pour étudier l'induction chirale dans les réactions de transfert d'électron. Une première est de faire réagir séparément les deux couples diastéréoisomères, de suivre les réactions par UV-Vis ou CD et de mesurer leur différence de vitesse. Cette technique a été utilisée pour les mesures effectuées dans le cadre de ce travail.

La deuxième technique est de faire réagir le racémate d'un complexe inerte avec un excès de complexe optiquement actif et de mesurer la différence de vitesse entre les deux couples par l'apparition temporaire d'une intensité CD dans le spectre visible du produit de départ. Ainsi, on peut déterminer la différence de concentration entre les deux énantiomères du complexe inerte et, par une seule mesure CD, les deux constantes de vitesse, $k_{\Delta\Delta}$ et $k_{\Lambda\Lambda}$. Cette technique ne peut pas être appliquée dans le cas des métalloprotéines étant donné que ces dernières n'existent pas sous forme racémique. De plus, la faible concentration de la protéine ne donne qu'un signal trop faible dans réactif racémique, qui serait d'autre part limité à des réactifs inertes.

2 Partie expérimentale

2.1 Synthèse et caractérisation des ligands

Les ligands utilisés dans ce travail sont:

(R,R)- ou (S,S)-alamp:

N,N'-[pyridine-2,6-diyl]bis(méthylène)]bis[(R)- ou (S)-alanine] ;

(R,R)- ou (S,S)-promp:

N,N'-[pyridine-2,6-diyl]bis(méthylène)]bis[(R)- ou (S)-proline].

Les synthèses des ligands alamp et promp ont été effectuées selon le schéma 1, comme décrit dans [24] en respectant aussi les modifications introduites par Verardo [4].

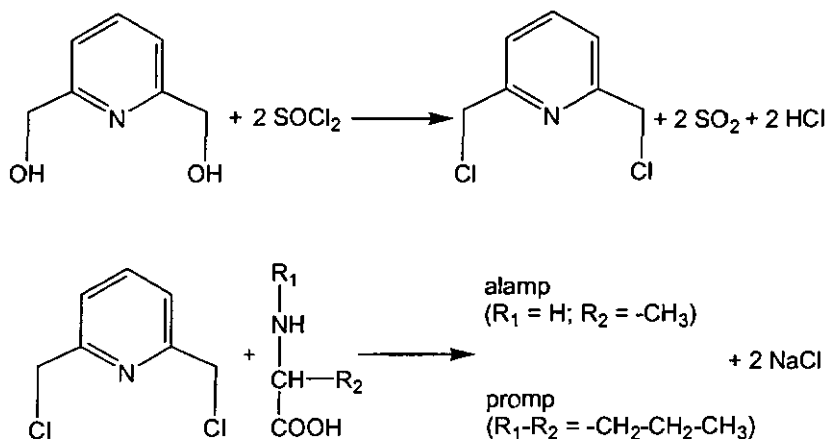


Schéma 2-1 : Principe de synthèse pour les ligands alamp et promp.

Pour la suite, les synthèses et caractérisations des ligands effectuées dans le cadre de ce travail sont décrites en détail ce qui permet une vue d'ensemble des préparations. Les caractéristiques des produits synthétisés peuvent aussi être comparées avec celles décrites dans la littérature.

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

Dans un ballon tricol de 500 ml muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome on introduit 10.0 g de bis(hydroxyméthyl)-2,6-pyridine (0.072 moles) à l'aide d'un entonnoir à solides. A travers l'ampoule à brome, on ajoute 100 ml de dichlorométhane et on refroidit la suspension obtenue dans un bain de glace tout en agitant vigoureusement. Dans la même ampoule à brome, on introduit goutte à goutte 20.7 ml (0.287 moles) de chlorure de thionyle en gardant la suspension en dessous de 5 °C. Une fois l'addition terminée, on retire le bain de glace et on conserve le mélange réactionnel sous agitation constante et à température ambiante durant 8 heures. Ce laps de temps écoulé, le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant encore 12 heures. Après refroidissement dans un bain de glace, on hydrolyse l'excès de chlorure de thionyle avec de la glace et on sépare les deux phases dans une ampoule à décanter.

La phase aqueuse est neutralisée avec du Na_2CO_3 p.a. et le précipité blanc, floconneux de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine obtenu est filtré, séché au dessiccateur, puis purifié par sublimation à 90°C et $p = 1$ mm Hg.

La phase organique est évaporée à sec et le résidu de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine sublimé à 90°C.

On obtient un total de 9.71 g bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine (7.4 g récupérés de la phase aqueuse et 2.31 g de la phase organique) soit un rendement global de 76.7%.

2.1.2 (R,R)- ou (S,S)-alamp :

N,N'-[pyridine-2,6-diyl]bis(méthylène)]bis((R)- ou (S)-alanine]

Les synthèses de (R,R) et (S,S)-alamp sont effectuées de manière identique en utilisant la D-alanine pour la synthèse de (R,R)-alamp et la L-alanine pour la synthèse du (S,S)-alamp.

8.91 g (0.1 mol) d'alanine sont dissous dans de l'eau désionisée et la solution est neutralisée avec une quantité stœchiométrique de NaOH (4.0 g, 0.1 mol). L'alaninate de sodium obtenu après évaporation est séché et gardé dans un dessiccateur sur silicagel.



Pour la suite de cette synthèse on utilise le même type de montage que pour la synthèse du bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine.

L'alaninate de sodium (11.1 g, 0.1 mol) est dissout dans 100 ml de méthanol distillé, introduit dans un ballon tricol de 500 ml et chauffé à 50°C.

3.52 g (20 mmol) de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine sont dissous dans 50 ml de méthanol distillé et introduits goutte à goutte dans le tricol à l'aide de l'ampoule à brome. Pendant toute la réaction on maintient un milieu basique (phénolphtaléïne) en ajoutant du NaOH 4M dans du méthanol. Une fois l'addition terminée, le mélange est chauffé à reflux durant 24 heures.

Le mélange est refroidi et neutralisé avec HCl 1 M, le NaCl précipité est filtré, et finalement le mélange réactionnel est évaporé à sec.

Le résidu est repris dans 500 ml d'eau désionisée. Cette solution est introduite dans une colonne échangeuse de cations (H^+) de type Dowex 50Wx8, 200-400 mesh et la colonne est ensuite lavée à l'eau désionisée jusqu'à neutralité. NaCl est ainsi éliminé sous forme de HCl, pendant que les excès d'alanine et alamp sont retenus sur la colonne. Ces derniers sont déplacés à l'aide de NaOH 0.1 M et, lorsque la bande les contenant arrive en bas de la colonne, ils sont collectés de manière fractionnée. L'ordre d'élution est : alanine en excès, alamp, phénolphtaléïne.

Les fractions sont analysées par chromatographie sur couche mince: la phase stationnaire est la silice et la phase mobile est un mélange composé de n-butanol, acide acétique et eau dans les proportions 12 : 6 : 5 (en volumes). On utilise deux révélateurs : la lumière UV pour l'alamp et la ninhydrine pour l'acide aminé en excès.

Les fractions mixtes acide aminé – ligand sont conservées pour accompagner les produits d'une nouvelle synthèse lors d'un nouveau passage sur la colonne.

Les fractions qui contiennent le ligand seul sont réunies, concentrées au maximum et recristallisées dans un mélange éthanol/acétone au minimum deux fois. Le rendement après deux recristallisations est de 63% pour S,S-alamp et de 61% pour R,R-alamp. Les produits sont caractérisés par polarimétrie, spectropolarimétrie et spectrométrie RMN.

Tableau 2-1 : Valeurs de l'activité optique du ligand alamp obtenues par polarimétrie.

(S,S)-alamp	c = 0.20, H ₂ O				
λ_{Hg} (nm)	365	436	546	578	Référence
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	+43.8	+25.5	+15.1	+13.7	[100]
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	+43.7	+25.5	+15.0	+13.8	ce travail

(R,R)-alamp	c = 0.18, H ₂ O				
λ_{Hg} (nm)	365	436	546	578	Référence
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	-47.6	-26.9	-14.2	-12.1	[100]
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	-44.9	-25.1	-14.6	-13.2	ce travail

Contrôle de la pureté optique et de la masse molaire par spectropolarimétrie

Le ligand optiquement actif ne présentant pas d'absorption spécifique dans le domaine visible, on utilise le complexe de cuivre(II) pour déterminer la masse molaire du ligand lors des mesures spectropolarimétriques.



On prépare une série de 10 solutions de 10 ml. Chacune contient une concentration de 10^{-3} M de Cu^{2+} , un tampon acétate 0.1 M pH = 5.2 et des quantités variables de ligand couvrant un domaine de 0 à $2 \cdot 10^{-3}$ M. La masse théorique du ligand est utilisée pour la préparation des solutions de concentration approximativement connue.

La représentation graphique de l'ellipticité mesurée en fonction du rapport des concentrations ligand/cuivre (g/mol) consiste en deux droites : tant que le cuivre est en excès, l'ellipticité est proportionnelle à la concentration du ligand et une fois que le rapport stœchiométrique 1 : 1 est atteint, l'ellipticité reste constante (Fig. 2-1). L'intersection des deux droites correspond donc à ce rapport stœchiométrique métal : ligand = 1 : 1 et la valeur en abscisse permet de calculer la masse molaire du ligand. Les valeurs ainsi obtenues sont de 297.14 g/mol pour (S,S)-alamp et 291.5 g/mol pour (R,R)-alamp (valeur calculée 281.3 g/mol), pour $\Delta\epsilon = 0.842 \text{ m}^{\circ}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

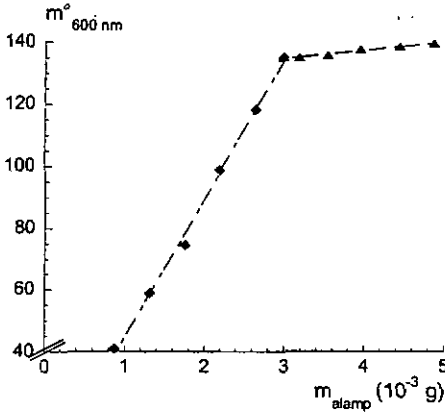


Fig. 2-1 : Titration spectropolarimétrique du $[\text{Cu}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

2.1.3 Synthèse du (R,R)- ou (S,S)-promp :

N,N'-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)]bis[(R)-ou (S)-proline]

Les synthèses de (R,R) et (S,S)-promp sont effectuées de manière analogue à celle de alamp en utilisant la D-proline pour (R,R)-promp respectivement la L-proline pour (S,S)-promp.

12.2 g proline (0.1 mol) sont dissous dans de l'eau désionisée et la solution est neutralisée avec une quantité stœchiométrique de NaOH (4.0 g, 0.1 mol). Le prolinatate de sodium obtenu après évaporation (15.4 g, 0.1 mol) est séché et gardé dans un dessiccateur sur silicagel.



Le prolinatate de sodium est dissout dans 100 ml de méthanol distillé, introduit dans un ballon tricol de 500 ml et chauffé à 50°C.

3.52 g (20 mmol) de bis(chlorométhyl)-2,6-pyridine sont dissous dans 50 ml de méthanol distillé et introduits goutte à goutte dans le tricol à l'aide de l'ampoule à brome. Pendant toute la réaction, on maintient un milieu basique (phénolphthaléine) en ajoutant du NaOH 4M dans du méthanol. Une fois l'addition terminée, le mélange est chauffé à reflux durant 24 heures.

Le mélange obtenu est refroidi et neutralisé avec HCl 1 M, le NaCl précipité est filtré et finalement le mélange réactionnel est évaporé à sec.

Le résidu est dissout dans de l'eau (env. 500 ml) et la solution introduite dans une colonne échangeuse de cations. Séparation et identification sont effectuées comme décrit sous 2.1.2.

Les fractions mixtes acide aminé – ligand sont conservées pour accompagner les produits d'une nouvelle synthèse lors d'un nouveau passage sur la colonne ou pour la synthèse du complexe de Co^{III} [101].

Aux fractions réunies qui contiennent le ligand seul, on ajoute une quantité de HCl 5 M, calculée sur la base d'un rendement théorique de la réaction de 100%, avant d'évaporer la solution à sec. Le chlorhydrate de promp (promp·xHCl) est recristallisé au minimum deux fois dans un mélange éthanol-acétone.

Le rendement après deux recristallisations était de 65% pour (S,S)-promp et de 49% pour (R,R)-promp.

Tableau 2-2 : Valeurs de l'activité optique du ligand promp obtenues par polarimétrie.

(S,S)-promp	c = 0.20, H ₂ O				
λ_{Hg} (nm)	365	436	546	578	Référence
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	-55.3	-38.2	-22.9	-20.4	[100]
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	-57.1	-34.4	-20.5	-18.3	ce travail

(R,R)-promp	c = 0.20, H ₂ O				
λ_{Hg} (nm)	365	436	546	578	Référence
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	+60.8	+43.0	+26.6	+23.7	[100]
$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20}$	+59.2	+41.9	+26.0	+22.9	ce travail

Contrôle de la pureté optique et de la masse molaire par spectropolarimétrie

La masse molaire obtenue par titration spectropolarimétrique est de 399.21 g/mol [(S,S)-promp-1.8 HCl]* et 396.54 g/mol pour [(R,R)-promp-1.73 HCl] ($\Delta\epsilon = 0.462 \text{ m}^{\circ}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{promp} \times 2\text{HCl}} = 403.6 \text{ g/mol}$).

* La teneur en HCl dépend de la température et de la durée du séchage et peut varier entre 1.5 et 2 molécules de HCl par molécule de ligand.

2.2 Préparation de protéines de cuivre bleu

Le support biologique le plus utilisé pour la fabrication de protéines génétiquement modifiées est la bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*). C'est à l'aide de cette bactérie que le gène de l'azurine et séparément celui de la plastocyanine ont été exprimés.

Les étapes d'isolement du gène de l'azurine et de son introduction dans un système d'expression ont été réalisées par Nusbaumer [5] en suivant la méthodologie décrite par Nordling et coll. en 1990 [102, 44]. Pour l'expression de la plastocyanine, une construction chimère est utilisée par l'association du peptide signal de l'azurine à la partie codante de la plastocyanine [102, 44].

L'expression, la production et la purification des deux protéines de cuivre bleu utilisées dans ce travail, l'azurine et la plastocyanine, ont été effectuées comme décrit dans [5].

La source principale des protocoles utilisés pour les manipulations biochimiques est le manuel de laboratoire et protocoles de Sambrook, Fritch et Maniatis [103]. Les modifications apportées par Nusbaumer [5] ont également été suivies.

2.2.1 wt-Azurine, préparation, isolement et purification

Deux **systèmes d'expression** ont été testés. Un de ces deux systèmes, pTrc 99A (Pharmacia), répliqué par les bactéries *E. coli* de souche JM 105 en présence de 50 µg/ml d'ampicilline, a permis l'expression de l'azurine. La carte du système d'expression est décrite dans [5] et la séquence complète de ce vecteur est donnée dans [104].

Pour la majorité des expériences biochimiques effectuées, les cellules lyophilisées de bactéries *E. coli* contenant le gène de l'azurine ou de la plastocyanine préparés par Nusbaumer ont été utilisées.

Les milieux LB et TB ont été utilisés comme **milieu de culture** pour la production de l'azurine, en présence de l'antibiotique adéquat (ampicilline) pour empêcher la croissance des contaminants.

LB (pour les précultures) :		Tryptone	10 g
		Extrait de levure	5 g
		NaCl	10 g
		H ₂ O désionisée	1 l

TB (pour les cultures) :

Tryptone	12 g	tampon	KH ₂ PO ₄	2.31 g
Extrait de levure	24 g		K ₂ HPO ₄	12.54 g
Glycérol	4 ml		H ₂ O désionisée	50.00 ml
H ₂ O désionisée	1 l			

Pour tous les types de culture/préculture poursuivies, les **conditions** (température, aération, agitation du milieu) ont été contrôlées et la

croissance des cellules bactériennes a été suivie par des mesures spectrophotométriques.

La *température* a été maintenue à 37°C pour tous les types de culture.

L'*agitation* a été fixée à 250 rpm pour les précultures (poursuivies dans des erlenmeyers) et à 500 rpm pour les cultures (poursuivies dans le fermenteur).

L'*aération* a été aussi contrôlée de façon distincte pour les précultures, les minicultures et pour les cultures. L'aération des précultures a été faite en utilisant des bouchons en textiles poreux, l'aération des petites cultures a été fixée à ~ 4 litres d'air par minute au moyen d'une pompe et l'aération des cultures de production a été fixée entre 16 et 18 litres par minute.

Une première étape dans la production de l'azurine a été la **transformation des cellules compétentes** : 10 µl de vecteur pTrc 99A \ Az sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes de souche JM 105 et à 1 ml de TB dans un eppendorf stérile. Après une demi-heure d'incubation dans la glace, on applique un choc thermique – 2 minutes à 42°C et ensuite on replonge l'eppendorf dans la glace. On étale stérilement le tout sur une boîte de Pétri de support agar-agar de concentration 50 µM en ampicilline, que l'on place à 37°C pour 20 heures. Une colonie fraîchement récoltée est mélangée stérilement à 5 ml TB + 50 µM ampicilline et gardée à 37°C sous agitation constante (250 rpm) pendant 8 heures. L'aliquote est repris dans 500 ml de TB stérile 50 µM en ampicilline et gardé pendant 8 heures à 37°C et 250 rpm. Cette solution servira d'inoculant lors du démarrage des cultures de production.

2.2.1.1 Cultures

Deux **types de cultures** ont été réalisés : les minicultures et les cultures de production.

Les minicultures ont été effectuées dans un fermenteur de type Multigène (New Brunswick Scientific) de capacité de 1.8 dm^3 , muni des systèmes d'aération, d'agitation et de thermostatisation. Le volume des cultures menées dans ce type de fermenteur a été de 1.1 dm^3 .

Les cultures de production ont été réalisées dans un fermenteur de type L 1523 (Bioengineering) d'une capacité de 15 dm^3 , muni des systèmes réglables d'aération, d'agitation, et de thermostatisation. Le volume total de chaque culture effectuée dans ce type de fermenteur a été de 11 dm^3 .

Pour les **minicultures**, le milieu est inoculé avec 1/10 (volume initial de culture) d'une préculture saturée de *E. coli* issue de bactéries fraîchement transformées (≤ 1 semaine).

Pour garder des conditions appropriées du point de vue chimique pendant la croissance bactérienne, on fixe le milieu de culture à $\text{pH} = 7$ à l'aide d'un tampon phosphate de concentration finale 10^{-3} M .

Lorsque le milieu atteint une densité optique $\text{D.O.}_{550 \text{ nm}} = 1.0$, la culture est induite avec une quantité de IPTG (iso-penthenyl-thio-galactoside) pour atteindre une concentration 0.5 mM . L'IPTG est un analogue de la galactoside qui se fixe sur le répresseur *Lac* en le détachant du promoteur. A ce moment le gène de l'azurine (ou plastocyanine) commence à être exprimé et la culture se poursuit en produisant des bactéries qui expriment en même temps le gène (la protéine) souhaité.

Pour les cultures à grande échelle, le milieu de culture TB a été stérilisé dans l'enceinte du fermenteur. Le tampon phosphate (stérilisé séparément) et la préculture y ont été ensuite introduits et la culture a été démarrée. Lorsqu'une valeur de la densité optique D.O. = 1.0 a été atteinte, la culture a été induite avec IPTG d'une concentration finale 1 mM.

La croissance de la masse des cellules bactériennes a été suivie par turbidimétrie-spectrophotométrie, les mesures de densité optique (D.O.) étant faites à une longueur d'onde fixe ($\lambda = 550$ nm) à des intervalles de temps fixes (1 heure). Les cultures ont été induites et stoppées en fonction des valeurs de D.O. obtenues au long des manipulations.

La croissance cellulaire suit une courbe classique : après une première phase latente d'environ 60 minutes, on atteint une D.O. ~ 1 , moment de l'induction (Fig. 2-1).

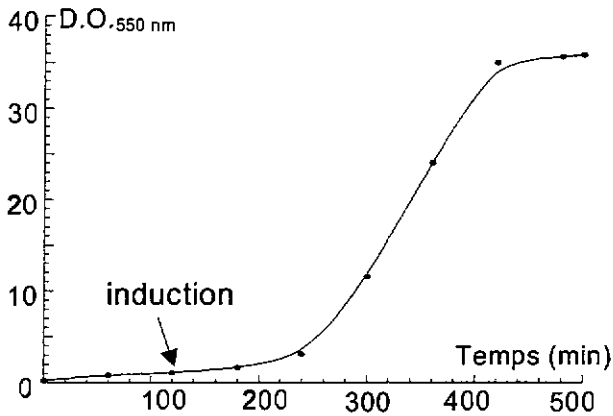


Fig. 2-1 : Courbe typique de croissance cellulaire.

Après l'induction, la production bactérienne suit d'abord une courbe de croissance exponentielle pendant environ 4 heures, puis linéaire pour finalement s'arrêter à une valeur de D.O. ~ 40 . A ce moment on arrête la culture et on récolte les cellules.

2.2.1.2 Isolement

Des étapes de **centrifugation** sont prévues après chaque étape de séparation : fin de la culture, choc osmotique, précipitation. Toutes les centrifugations ont été effectuées sur des centrifugeuses Sorvall® RC5B, à 4°C ou à 10°C et à différentes vitesses de rotation (entre 5000 et 20.000 rpm).

L'azurine se trouve localisée dans l'espace périplasmique des cellules bactériennes. Pour récupérer ce liquide périplasmique, on fait subir un **choc osmotique** au culot bactérien isolé par centrifugation après la culture. Le choc osmotique consiste en deux étapes :

Etape de contraction. Le culot centrifugé est re-suspendu dans une solution hypertonique (800 ml tampon 30 mM Tris-Cl pH = 8.1 et 20% saccharose) à l'aide d'une pipette Pasteur. Le mélange est gardé 20 minutes sous faible agitation à température ambiante. Après centrifugation à 6500g pendant 15 minutes à 4°C on décante et on récupère les cellules.

Etape de décontraction. Les cellules sont re-suspendues rapidement (shaker) dans 800 ml d'une solution hypotonique 0.5 mM en $MgCl_2$. Le mélange re-suspendu est gardé dans la glace pendant 20 minutes sous agitation vigoureuse. Après une nouvelle centrifugation à 11500g à 4°C pendant 20 minutes, la fraction périplasmique contenant les protéines est récupérée par décantation et le culot bactérien est détruit à l'eau de Javel.

Le mélange de protéines obtenu après le choc osmotique est séparé dans une première étape par **précipitation**.

Ainsi on peut choisir la voie de séparation : soit précipiter sélectivement seulement la protéine à purifier, soit précipiter au maximum les autres protéines contaminatrices contenues dans le mélange.

En changeant les paramètres (pH, constante diélectrique ou force ionique) de la solution aqueuse qui contient le mélange de protéines, on modifie leurs solubilités respectives ce qui permet leur séparation.

Dans le cas de l'azurine, qui a un point isoélectrique de 5.1, on a choisi la **précipitation acide** pour éliminer un maximum de protéines contaminatrices présentes dans la culture. Pour cela on a rajouté 1/10 du volume

obtenu après le choc osmotique de tampon acétate pH = 4.1 de concentration finale 0.05 M. Le pH de la solution a été descendu à 4.1 et la suspension a été gardée sous agitation constante durant 30 minutes. Après centrifugation à 11500 g et 4°C durant 20 minutes, le surnageant contenant l'azurine a été filtré sur quatre couches de gaze en vue de la purification.

Le surnageant obtenu après précipitation acide est traité par **ultrafiltration** et **diafiltration** en vue du passage sur les colonnes chromatographiques. L'ultrafiltration et la diafiltration sont faites dans des cellules de concentration, sous une pression d'environ 4 atm de N₂ gazeux, à travers des membranes de porosité connue, YM-5 ou YM-10.

2.2.1.3 Purification

Les étapes de **purification** de l'azurine ont suivi le protocole décrit dans [44]:

- **échange de cations** sur une colonne de type CM-cellulose, Resource-S ou SP-sépharose,
- **tamissage moléculaire** sur une colonne de type Sephadex G-50F,
- **ultrafiltration** sur une membrane Amicon de porosité connue, de type YM-10.

Pour la première étape de purification, un deuxième passage sur la colonne chromatographique a été omis et par la suite la première étape de purification a été modifiée, en utilisant d'abord une colonne de type

Resource S et finalement une colonne de type SP-sépharose à la place de la CM-cellulose.

Le sumageant obtenu après précipitation acide à un pH final de 4.1 dans du tampon acétate 20 mM est chargé sur une **colonne échangeuse de cations** et élué avec du tampon acétate 20 mM de pH = 5.1. A ce pH l'azurine est neutre et migre avec le front de l'éluat. Les fractions contenant l'apoazurine ont été révélées par adjonction de 2 μl CuSO_4 1M par ml d'éluat. Les fractions contenant l'holoprotéine ainsi formée ont été récoltées et concentrées sur une membrane Amicon de type YM-10.

La solution concentrée est dia-filtrée contre un volume 5 fois supérieur de tampon de concentration 200 mM en Tris-Cl et 200 mM en NaCl, de pH = 7.3. Le volume maximal de la solution obtenue est 20 fois inférieur à celui de la colonne de tamisage moléculaire utilisée dans l'étape suivante de purification.

Après une concentration jusqu'à un volume inférieur à 10 ml, la solution d'azurine est chargée sur une colonne de tamisage moléculaire de type Sephadex G-50.

Le protocole de purification de l'azurine décrit dans [44] comporte en première étape le passage sur une colonne ouverte de type CM-cellulose. Ce type de colonne présente deux inconvénients : lenteur de l'éluat à cause de la granulosité réduite de la phase stationnaire d'une part et déprotonation des groupes carboxylate lors d'un changement de pH d'autre part.

Pour ces raisons le rendement de cette étape de purification a été amélioré en utilisant une colonne fermée (de débit plus rapide) avec une

phase stationnaire contenant des groupes non affectés par des changements de pH (sulfométhyle ou sulfopropyle).

La première colonne testée, **Resource-S** (sulfométhyle-polystyrène/divinyle) présente l'inconvénient d'une petite taille (6 ml de volume total) ce qui prolonge le temps de chargement.

L'utilisation d'une colonne fermée de type **SP-sépharose** (sulfopropyle-sépharose) d'un volume de 250 ml a été la solution optimale pour cette première étape de séparation par échange de cations.

Les fractions récoltées après passage sur SP-sépharose et concentrées dans une cellule d'ultrafiltration sont chargées sur une colonne de tamisage moléculaire de type Sephadex G-50F (Pharmacia) de dimensions 2.6 x 95 cm. Le tampon d'élution est Tris-HCl 20 mM pH = 7.3. Pour empêcher la formation de dimères d'azurine la force ionique du tampon est augmentée en rajoutant NaCl jusqu'à une concentration finale de 200 mM. Les fractions contenant l'azurine pure ($A_{278}/A_{625} = 2$) sont récoltées, concentrées et dialysées.

Pour la dialyse de l'azurine et de la plastocyanine ont été utilisées des membranes de cellulose naturelle de type Spectra/Por1 MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries Inc.) fermées avec des fermetures en polypropylène (35 mm, Spectrum). Les sacs ainsi préparés sont plongés dans un volume 2000 fois supérieur à celui de la solution à dialyser et le tout est gardé à température et agitation constante pendant 12 heures. La solution dialysée contre un tampon phosphate (0.1M pH = 7) est finalement aliquotée et conservée à -20°C .

2.2.2 Plastocyanine : préparation, isolement et purification

Les étapes de production de la plastocyanine sont très semblables à celles de l'azurine et sont décrites en détail dans la thèse de C. Nusbaumer [5].

Les modifications par rapport à la production de l'azurine sont :

- le **milieu de culture** est ajusté à une concentration finale de 1 mM CuSO_4 , ce qui favorise la formation rapide de l'holoprotéine à partir de l'apoprotéine trouvée initialement. L'holoprotéine est plus stable envers les protéases qui peuvent attaquer la protéine "étrangère" dès sa formation dans l'espace périplasmique.
- la **transformation des cellules compétentes** suit le protocole établi par Hanahan [105] avec les modifications apportées par Nusbaumer [5].
- la **culture de la plastocyanine** : la croissance cellulaire des cultures de plastocyanine est plus faible que dans le cas de l'azurine, en conséquence la période après l'induction se trouve prolongée de 4 heures pour l'azurine à 5-6 heures pour la plastocyanine. Une culture moyenne de plastocyanine produit environ 9 mg de plastocyanine recombinante par litre de milieu utilisé par rapport à l'azurine où un résultat moyen est d'environ 80 mg protéine par litre de milieu de culture.

La **séparation** de la plastocyanine a suivi les mêmes étapes que celle de l'azurine, à part la dernière : la précipitation acide utilisée pour l'azurine a été remplacée par une **précipitation au sulfate d'ammonium** de la fraction périplasmique contenant la plastocyanine. A la fraction périplasmique on ajoute 1/20 du volume de 1M Tris-HCl pH =

7.3 et une quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de sorte que la concentration finale soit 70% de saturation (436 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / ml de fraction périplasmique). Durant cette opération un maximum de contaminants sont précipités et on récupère par centrifugation (12'500 g, 10 minutes) la plastocyanine contenue dans le liquide surnageant.

Après la précipitation au sulfate d'ammonium, le liquide surnageant contenant la plastocyanine est chargé sur une première colonne de type **DEAE-cellulose** (diéthyle-aminoéthyle-cellulose) et éluée avec un saut de concentration de 70% à 30% saturation en sulfate d'ammonium dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH = 7.3.

La fonction d'échangeuse d'anions de la DEAE-cellulose se retrouve ainsi détournée en faveur d'une **interaction hydrophobique** des résidus éthyle du groupement amine secondaire avec les régions hydrophobes des protéines. La plastocyanine migre avec le front de l'éluant à 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Pour l'étape de **tamissage moléculaire** on utilise le même type de colonne chromatographique Sephadex G-50 (Pharmacia) que pour l'azurine (voir 2.2.1.3). Le tampon utilisé pour l'éluion est le Tris-HCl 20 mM pH = 7.3 et la concentration en NaCl est seulement 50 mM [5]. La solution est diafiltrée sur une membrane Amicon YM-3 contre une solution tampon Tris-HCl de concentration 20 mM exempte de sel et de pH = 7.3 en vue du chargement sur le système FPLC.

La dernière étape de purification de la plastocyanine est le passage sur une colonne échangeuse d'anions de type **Q-Hiload Sepharose FPLC** (Pharmacia, 26x10mm). La plastocyanine, dialysée contre Tris-HCl 20

mM de pH = 7.3 après l'étape de tamisage moléculaire est chargée et éluée avec le même tampon mais de gradient allant de 0% à 30% en NaCl. Les fractions contenant la plastocyanine pure ($A_{278}/A_{597} \sim 1$) sont réunies, concentrées par diafiltration, aliquotées et conservées à -20°C en vue des mesures.

2.3 Mesures

2.3.1 Préparation et caractérisation des solutions des réactifs utilisés

2.3.1.1 Solutions tampon

Des mesures de transfert d'électron ont été effectuées à différents pH entre des complexes de Fe(II) ou de Co(II) avec des ligands optiquement actifs pentadentés et l'azurine. Toutes les mesures cinétiques de transfert d'électron ont été effectuées dans un tampon de concentration 0.1 M préparé par pesée et dissout dans de l'eau bidistillée dégazée. Différentes solutions tampon ont été utilisées, dont le pH a été ajusté par NaOH dilué à la valeur désirée (Tab. 2-3).

Tab. 2-3 : Solutions tampon utilisées lors de mesures de transfert d'électron.

pH	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
tampon	CH ₃ COOH/ CH ₃ COONa	MES	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	Tris-HCl/ Tris-Cl	H ₃ BO ₃ / NaH ₂ BO ₃
			imH ⁺ / im		

Pour les mesures effectuées à pH = 7, le ligand monodenté qui occupe la sixième position de coordination a été également varié. Il s'agit soit d'une molécule d'eau si l'on travaille dans un tampon phosphate de concentration 0.1 M, soit d'une molécule d'imidazole si l'on travaille dans

un tampon imidazole (im) 0.1 M. Ce dernier est en assez grand excès pour garantir la formation quantitative du complexe $[\text{Co}(\text{L})\text{im}]$.

2.3.1.2 Solutions de complexes

Les solutions de complexe ont une concentration de l'ordre de $1.5 \cdot 10^{-3}$ M pour les mesures cinétiques et de l'ordre de $1.5 \cdot 10^{-2}$ M pour les mesures de fixation. Elles ont été préparées en ajoutant 1.2 équivalents de ligand (alamp ou promp) à un volume précis d'une solution aqueuse de sulfate de cobalt(II) ou de sel de Mohr de concentration connue. Le volume est ensuite complété avec la solution tampon qui permet également de fixer la force ionique.

Les solutions des complexes sont purgées sous argon. Cela empêche la formation de complexes oxygénés [106] dans le cas du $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})]$ ou l'oxydation en solution des complexes.

La concentration et l'activité optique des solutions de complexes de cobalt sont vérifiées par spectropolarimétrie. Les solutions de complexes métalliques sont oxydées avec H_2O_2 10% et les spectres CD et UV-Vis enregistrés (Fig. 2-2).

Les valeurs des coefficients d'absorption molaire (Tab. 2-4) correspondent à ceux rapportés dans la littérature [11, 4, 77].

Tab.2-4 : Propriétés spectroscopiques des complexes utilisés.

Complexe	UV / Vis		CD		
	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	$\Delta\Delta\epsilon$ ^(*)
$\Delta\text{-[Co}^{\text{III}}\text{((R,R)-alamp)H}_2\text{O]}^+$	487	171	545	+1.80	4.17
			469	-2.37	
$\Delta\text{-[Co}^{\text{III}}\text{((R,R)-alamp)im]}^+$	466	205	527	+2.23	6.45
			459	-4.22	
$\Lambda\text{-[Co}^{\text{III}}\text{((S,S)-promp)H}_2\text{O]}^+$	504	291	563	-0.40	2.03
			496	+1.63	
$\Lambda\text{-[Co}^{\text{III}}\text{((S,S)-promp)im]}^+$	494	306	556	-0.74	3.44
			489	+2.70	

$$(*) \Delta\Delta\epsilon = |\Delta\epsilon_1| + |\Delta\epsilon_2|$$

Les complexes de Co^{III} utilisés présentent deux bandes typiques d'absorption dans le domaine UV-Vis : la première se trouve dans l'intervalle 340-380 nm et la deuxième entre 460 – 510 nm, en fonction du ligand trouvé à la sixième position de coordination. Pour les complexes avec l'imidazole en sixième position de coordination on observe un déplacement bathochrome de 10-15 nm pour le promp et de 15-25 nm pour le complexe avec le ligand alamp par rapport aux aquacomplexes des mêmes ligands pentadentés.

Les coefficients d'absorption molaire des complexes avec promp sont d'environ 50% plus élevés que pour les complexes avec alamp. Les spectres UV/Vis des complexes mixtes en fonction du ligand monodenté occupant la sixième position de coordination sont présentés dans la Fig. 2-2.

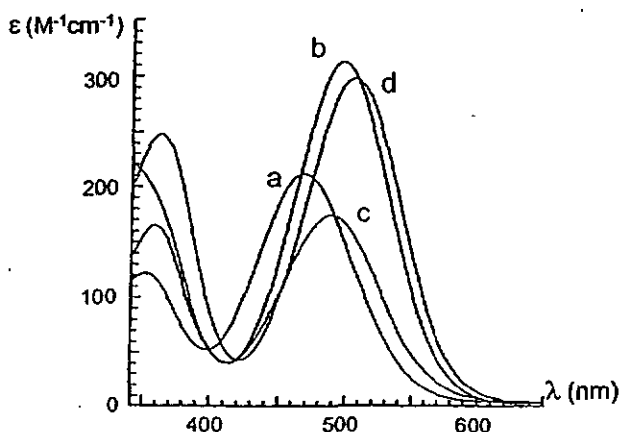


Fig. 2-2 : Spectres UV-Vis des complexes de cobalt(III) utilisés :

- (a) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{im}]^+$; (b) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{im}]^+$; (c) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]^+$;
 (d) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Les spectres CD des complexes de cobalt(III) utilisés présentent dans le domaine visible deux bandes caractéristiques de signe opposé. Dans le cas des complexes de configuration absolue Δ on observe une bande de signe positif à la longueur d'onde la plus élevée et une bande de signe négatif à la longueur d'onde la plus basse.

C'est la bande d'absorption à la longueur d'onde supérieure qui nous donne la configuration absolue du complexe, par rapport à celle du complexe $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ pris comme substance standard. Cette configuration absolue est confirmée par les structures aux rayons-X.

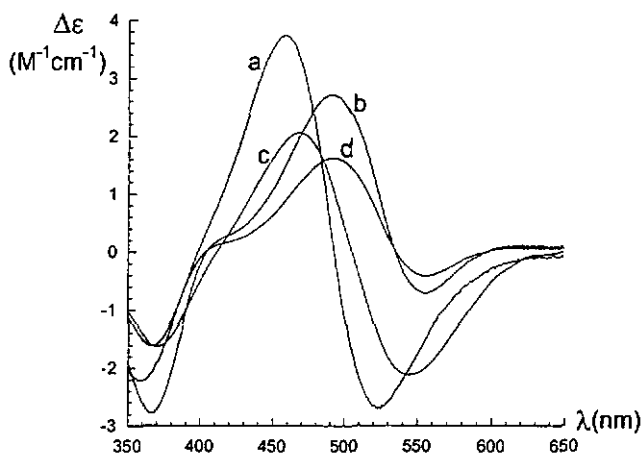


Fig. 2-3 : Spectres CD des complexes de cobalt(III) utilisés :

- (a) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{im}]^+$; (b) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{im}]^+$; (c) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]^+$;
 (d) $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]^+$.

2.3.1.3 Solutions de protéine

La solution de protéine est préparée par dilution d'un échantillon concentré à l'aide de la solution tampon 0.1 M. Des concentrations d'environ $2 \cdot 10^{-5}$ M sont utilisées pour les mesures cinétiques, et $2 \cdot 10^{-4}$ M pour les mesures de fixation. Les protéines ont été contenues dans du tampon de pH convenu et de concentration égale au tampon utilisé pour la solution de complexe métallique.

Préalablement à toutes les mesures effectuées, la solution de protéine est dégazée sous vide et maintenue sous atmosphère inerte d'argon.

La concentration et la pureté de la protéine oxydée sont déterminées par spectrophotométrie. Une valeur de $\epsilon_{625 \text{ nm}} = 5\,700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et un rapport constant des absorbances $A_{278 \text{ nm}} / A_{625 \text{ nm}} \sim 2$ ont été utilisés dans le cas de l'azurine ; une valeur de $\epsilon_{597 \text{ nm}} = 4\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [47] (selon Yocum [128] $\epsilon_{597 \text{ nm}} = 4\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et un rapport constant des absorbances $A_{278 \text{ nm}} / A_{597 \text{ nm}} \sim 1$ ont été utilisés dans le cas de la plastocyanine.

2.3.2 Mesures cinétiques et détermination des paramètres d'activation

Les mesures cinétiques ont été effectuées en suivant la même procédure comme pour la plastocyanine [107] à une longueur d'onde de 625 nm correspondant au maximum de l'azurine. La variation de l'absorbance à 625 nm permet de suivre l'évolution de la réaction de transfert d'électron : dans les conditions expérimentales utilisées, seule l'azurine oxydée absorbe de façon significative à cette longueur d'onde.

La concentration du complexe métallique a été au minimum 20 fois supérieure à la concentration de la protéine, assurant ainsi des conditions cinétiques de pseudo-premier ordre.

Les vitesses de réaction sont déterminées à l'aide du changement de concentration des réactifs ou des produits en fonction du temps.

Des réactions de transfert d'électron de premier ordre ont été observées entre l'azurine oxydée et les complexes de fer(II) ou de cobalt(II). La loi de vitesse correspondante est :

$$v = \frac{-d[AzCu^{II}]}{dt} = k \cdot [AzCu^{II}] \cdot [M^{II}L] = k_{obs} \cdot [AzCu^{II}] \quad (2-1)$$

Après intégration:

$$\ln [AzCu^{II}] = \ln[AzCu]_0 - k_{obs} \cdot t \quad (2-2)$$

d'où

$$[AzCu]_t = [AzCu]_0 \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad (2-3)$$

L'analyse de la réaction de premier ordre à l'aide du logiciel d'approximation de fonction KaleidaGraph conduit à l'utilisation de la fonction:

$$Y = (V_0 - V_{inf}) \exp \{-k_{obs} / t\} + V_{inf} \quad (2-4)$$

où la constante de deuxième ordre est :

$$k = k_{obs} / [\text{complexe réducteur}], \quad (2-5)$$

L'effet de la température sur la constante de vitesse conduit, selon la théorie du complexe activé, à l'expression de l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger et de l'entropie d'activation ΔS^\ddagger . On exprime la constante de vitesse d'une réaction par la relation d'Eyring:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}\right) \quad (2-6)$$

$$\Delta G^\ddagger = - R \cdot T \cdot \ln k \quad (2-7)$$

où :

- k = constante de vitesse à la température T ;
- ΔG^\ddagger = énergie libre d'activation ;
- R = constante de gaz parfait = $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$;
- k_B = constante de Boltzmann = $6.625 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$;
- h = constante de Planck = $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$.

En introduisant $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ on obtient une équation reliant la constante de vitesse k aux paramètres d'activation:

$$k = [(k_B \cdot T) / h] \cdot \exp [(-\Delta H^\ddagger / R \cdot T) + (\Delta S^\ddagger / R)] \quad (2-8)$$

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

Les paramètres d'activation peuvent être déduits par régression linéaire de la représentation $\ln(k/T) = f(1/T)$ (représentation d'Eyring). La valeur de ΔH^\ddagger est obtenue à partir de la pente de cette régression linéaire et la valeur de ΔS^\ddagger par extrapolation de la représentation d'Eyring à $1/T = 0$. Vu le faible domaine de température accessible ($5^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$) pour effectuer des mesures cinétiques, la valeur du ΔS^\ddagger , souvent utilisée comme critère mécanistique, est sujette à de grandes imprécisions.

Parce que les mécanismes de transfert d'électron comprennent trois étapes élémentaires, l'expression de la constante de vitesse observée a l'expression:

$$k_{\text{obs}} = \frac{K \cdot k_{\text{TE}} \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (2-9)$$

où :

K = constante de formation du complexe précurseur;

k_{TE} = constante de transfert d'électron proprement dit;

c = concentration totale du réactif en excès (complexe réducteur);

k_{obs} = constante de vitesse observée.

La relation (2-9) permet de prévoir deux cas limite : $1 \ll k \cdot c$ et $1 \gg k \cdot c$. Dans le premier cas, la vitesse réactionnelle atteint une valeur limite et la relation se simplifie en $k_{\text{obs}} = k_{\text{TE}}$.

Dans le deuxième cas, on obtient $k_{\text{obs}} = K \cdot k_{\text{TE}} \cdot c$ et la vitesse varie proportionnellement à la concentration du réactif en excès. Afin de pouvoir déterminer k_{TE} et K séparément, la vitesse limite doit être atteinte au moins à 40-50%. Dans le domaine des concentrations choisi les vitesses réactionnelles varient toujours d'une manière strictement linéaire avec la concentration du complexe réducteur, de sorte que

$$K \cdot c \ll 1 \Rightarrow k_{\text{obs}} = K \cdot k_{\text{TE}} \cdot c \quad (2-10)$$

d'où la constante de vitesse de deuxième ordre déterminée pour le processus global est :

$$k = \frac{k_{\text{obs}}}{c} \Rightarrow k = K \cdot k_{\text{TE}} \quad (2-11)$$

En fonction de la vitesse de réaction, de la mémoire et de la sensibilité des appareils, différents spectrophotomètres ont été utilisés : spectrophotomètre Cary - pour les réactions lentes (entre 4 et 10 heures); spectrophotomètre Uvikon 810 pour les réactions moyennes (entre 10 et 120 minutes) et un spectrophotomètre à écoulement bloqué Hi-Tech Stopped Flow pour les réactions rapides (ms).

2.3.3 Fixation des complexes du cobalt par transfert d'électron

Les mesures de fixation des complexes de cobalt(III) ont été suivies par dichroïsme circulaire sur un spectropolarimètre Jasco-710.

Des volumes égaux de $AzCu^{II}$ ou $PcCu^{II}$ de concentration $2 \cdot 10^{-4}$ M et de $[Co^{III}(L)H_2O]$ de concentration $2 \cdot 10^{-3}$ M (les deux dans du tampon 0.1 M, en fonction du pH désiré) sont mélangés dans une cuvette tandem en quartz. Le mélange est gardé sous argon et à la température voulue durant 10 demi-vies.

La solution obtenue est dialysée pendant 10 heures contre un volume 2000 fois supérieur de même tampon pour éliminer l'excès de complexe métallique optiquement actif de faible masse moléculaire. La solution dialysée est amenée à un volume connu et le spectre CD est enregistré. L'intensité du signal CD après dialyse permet de calculer le pourcentage de complexe inerte de cobalt(III) fixé à la surface de la protéine.

2.3.4 Modélisation

Le programme *Cerius²* [108] a été utilisé pour simuler les fragments des complexes métalliques et leur approche à la surface des protéines. L'ensemble module *OFF*, *Universal 1.02 force field* et *Qeq_charged1.1* (set de paramètres pour la charge) a été appliqué dans les calculs. Le programme de modélisation *Hyperchem* [109] a été utilisé pour comparer et visualiser les structures des protéines. La structure de la

protéine sous forme oxydée a été importée de la base de données Brookhaven (1azu pour l'azurine et 1plc pour la plastocyanine).

2.3.4.1 Simulation de fragments des complexes métalliques avant fixation

Pour les coordonnées du complexe Λ -[Co^{II}(L)H₂O], ont été utilisées les données du complexe Λ -[Co^{III}(L)H₂O] importées des fichiers des rayons X [25, 110] et optimisées avec *Cenius*² [108]. La molécule d'eau coordonnée a été supprimée de sorte que le fragment pentadenté Λ -[Co^{II}(L)] puisse être utilisé. Le fragment Δ -[Co^{II}(L)] a été généré en appliquant un centre de symétrie à son énantiomère Λ -[Co^{II}(L)].

2.3.4.2 Fixation à la surface des protéines

Le fragment [Co^{II}(L)] a été placé à proximité du site actif de la protéine. La fixation a été réalisée en formant d'abord des liaisons entre l'atome de cobalt et les atomes d'azote exposés à la surface de la protéine, l'His87 dans le cas de la plastocyanine et His83 pour l'azurine. Par la suite, des contraintes ont été appliquées à la partie rigide de la protéine et la vibration des résidus mobiles proches du site actif a été acceptée. Une structure optimisée a été obtenue en approchant lentement le métal de la surface protéique et en minimisant l'énergie de la structure.

Puisque *Universal 1.02* est un champ de force général, des contraintes structurales ont été appliquées aux alentours du fragment [Co^{II}(L)] pour éviter des distorsions dramatiques du fragment au début du processus de minimisation énergétique. Pour limiter la durée des calculs,

seulement les résidus qui interagissent directement soit avec le fragment $[Co^{II}(L)]$, soit avec les résidus mobiles limitrophes ont été inclus dans le modèle.

Les résidus flexibles à la surface de la protéine ont été localisés par comparaison des structures de rayons X connues pour l'azurine et la plastocyanine native et leurs mutants [34, 46, 105, 111, 112].

Pour la plastocyanine, les groupes flexibles sont : la chaîne latérale du Leu12, le groupe imidazole du His87 et le cycle de Pro86. Pour l'azurine, les groupes flexibles utilisés sont les chaînes latérales des résidus suivants : Val80, Leu73 et une partie de His83. Les résultats sont présentés dans le chapitre 3.

3 Résultats

3.1 Mesures cinétiques et détermination des paramètres d'activation

La détermination de la constante de vitesse en fonction de la température permet le calcul des paramètres d'activation ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger du transfert d'électron. Les représentations d'Eyring sont données dans les figures 3-1 à 3-15 et les valeurs des constantes de vitesse sont réunies dans les tableaux 3-1 à 3-15. Les paramètres d'activation déterminés sont donnés dans les tableaux 3-16, 3-17 et 3-18.

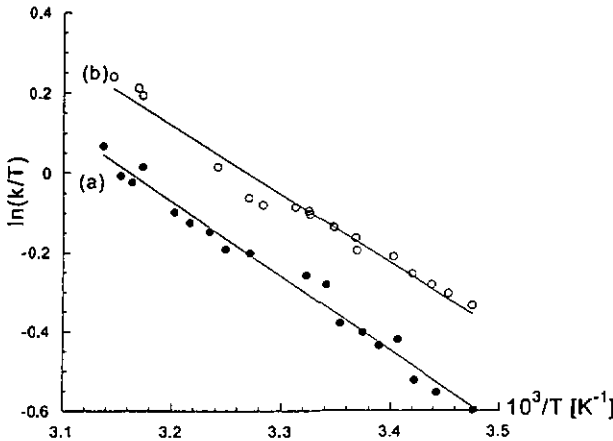


Fig. 3-1 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Fe^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Fe^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Fe^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, phosphate 0.1M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-1 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$; $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{AzCu}^{\text{II}}]_0 = 10^{-5} \text{ M}$, tampon phosphate 0.1M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

t [°C]	$k_A [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]^*$
9.5	187
14.6	206
16.4	214
17.7	220
19.3	227
20.8	238
23.7	244
25.5	261
25.6	261
27.5	271
27.6	274
28.7	277
31.4	281
32.6	288
35.3	313
39.3	325
42.0	383
42.4	390
44.7	404

t [°C]	$k_A [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]^*$
14.5	158
17.3	167
19.1	173
20.4	193
21.9	191
23.2	199
25.0	205
26.2	226
27.8	233
30.0	257
32.5	250
34.6	254
36.0	267
37.8	275
39.2	283
42.0	320
43.0	310
44.0	315
45.6	341

* Moyennes obtenues après 4 mesures minimum.

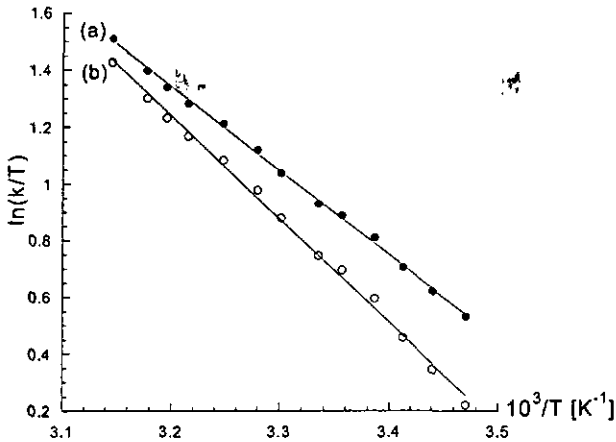


Fig. 3-2 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Δ -[Fe^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Fe^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b) ; [Fe^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, phosphate 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

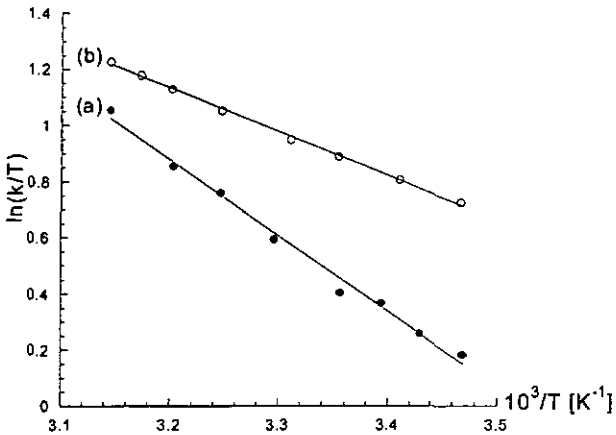


Fig. 3-3 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Δ -[Fe^{II}((S,S)-malmp)H₂O] (a) et Δ -[Fe^{II}((R,R)-malmp)H₂O] (b) ; [Fe^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, phosphate 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-2 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$; $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{AzCu}^{\text{II}}]_0 = 10^{-5} \text{ M}$, tampon phosphate 0.1 M, pH = 7.0, $I = 0.12 \text{ M}$.

t [°C]	$k_{\Delta} [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$
15.0	360
17.5	410
19.9	463
22.2	536
24.8	597
26.7	633
29.8	731
31.8	811
34.8	911
37.9	1000
39.8	1074
41.6	1156
44.7	1325

t [°C]	$k_{\Lambda} [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$
15.0	492
17.5	541
19.9	594
22.2	665
24.8	725
26.7	761
29.8	857
31.8	936
34.8	1034
37.9	1122
39.8	1268
41.6	1275
44.7	1441

Tab. 3-3 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{malmp})\text{H}_2\text{O}]$; $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}]_0 = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{AzCu}^{\text{II}}]_0 = 10^{-5} \text{ M}$, tampon phosphate 0.1 M, pH = 7.0, $I = 0.12 \text{ M}$.

t [°C]	$k_{\Delta} [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$
15.3	596
20.1	656
25.0	724
28.9	780
34.8	882
39.2	966
42.0	1026
44.8	1085

t [°C]	$k_{\Lambda} [\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$
15.1	346
18.4	377
21.5	425
24.8	447
30.2	550
34.9	658
39.1	735
44.8	914

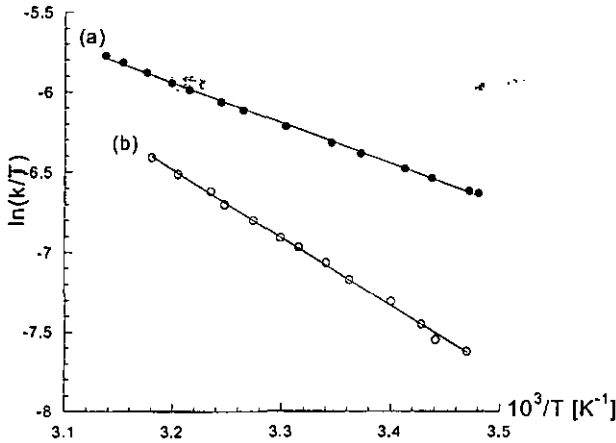


Fig. 3-4 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, pH = 7.0, phosphate 0.1 M, I = 0.12 M.

Tab. 3-4 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)H₂O]. [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon phosphate 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ · M ⁻¹]
15.1	0.141
17.5	0.153
18.6	0.169
21.0	0.197
24.3	0.229
26.2	0.256
28.5	0.284
30.0	0.303
32.3	0.342
34.8	0.379
36.0	0.413
38.9	0.463
41.3	0.518

t [°C]	k _A [s ⁻¹ · M ⁻¹]
14.2	0.379
14.9	0.386
17.8	0.422
19.9	0.450
23.4	0.500
25.8	0.539
29.6	0.604
33.2	0.678
35.1	0.719
37.9	0.782
39.5	0.822
41.8	0.882
44.0	0.947
45.6	0.993

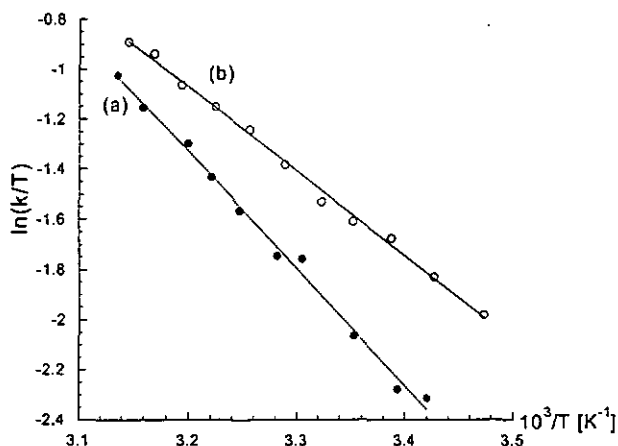


Fig. 3-5 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)im] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)im] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, imidazole 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-5 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)im] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon imidazole 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
14.8	39.7
18.7	46.9
22.1	55.3
25.2	59.7
27.8	65.1
31.0	76.4
34.0	88.9
37.0	98.2
40.0	108
42.5	124
44.8	131

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
19.2	28.9
21.6	30.2
25.1	37.9
29.5	52.3
31.6	53.3
34.8	64.4
37.4	74.2
39.4	85.5
43.4	100
45.8	115

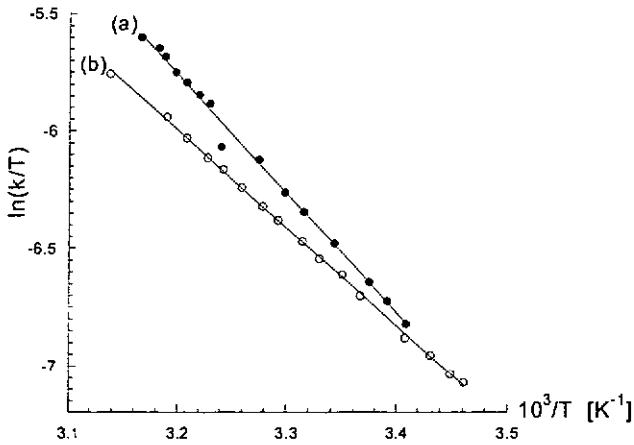


Fig. 3-6 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, phosphate 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-6 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon phosphate 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.8	0.245
16.8	0.255
18.3	0.279
20.3	0.302
23.9	0.366
25.4	0.402
27.2	0.432
30.6	0.515
31.9	0.549
33.7	0.599
35.3	0.649
36.7	0.687
38.6	0.750
40.4	0.825
45.6	1.01

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
20.2	0.320
21.7	0.355
23.2	0.387
26.0	0.460
28.5	0.530
30.0	0.578
32.2	0.671
35.5	0.715
36.5	0.864
37.5	0.899
38.6	0.951
39.6	0.998
40.6	1.07
41.1	1.11
42.7	1.17

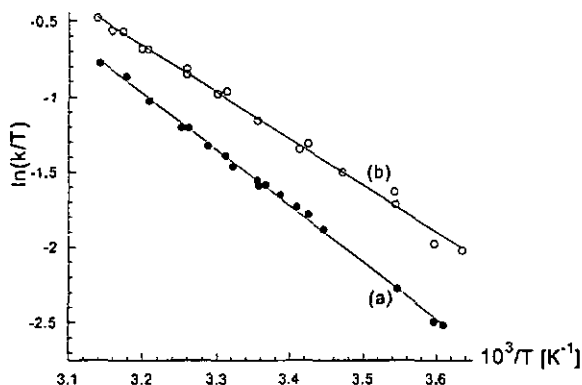


Fig. 3-7 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)im] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)im] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, imidazole 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-7 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)im] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon imidazole 0.1 M, pH = 7.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ · M ⁻¹]
2.0	36.4
4.9	38.5
9.0	50.7
9.2	55.2
15.0	64.2
19.9	76.4
24.9	93.6
28.8	115
29.9	114
33.8	131
33.8	136
38.7	157
39.5	158
39.5	159
42.0	178
43.5	180
45.5	197

t [°C]	k _A [s ⁻¹ · M ⁻¹]
3.9	22.4
4.9	22.9
8.9	29.1
17.1	44.3
18.8	49.2
22.2	56.6
24.0	60.9
24.8	60.5
25.0	62.9
28.0	69.7
28.9	75.4
31.1	80.9
33.5	92.2
34.4	92.6
38.5	112
41.6	133
45.2	147

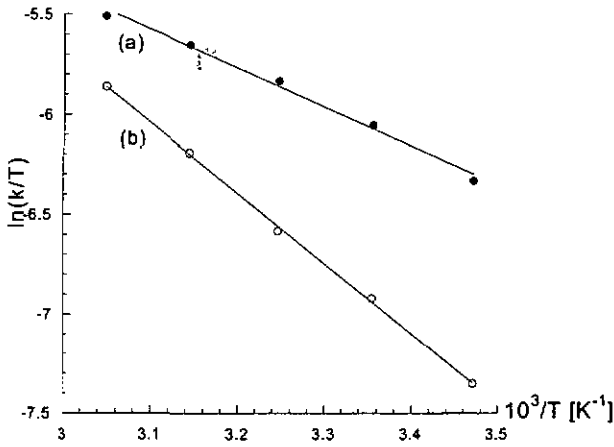


Fig. 3-8 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon MES pH = 6.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-8 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon MES 0.1 M, pH = 6.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _Δ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.211
25.0	0.314
35.0	0.428
45.0	0.611
55.0	0.822

t °C	k _Λ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.585
25.0	0.750
35.0	0.905
45.0	1.05
55.0	1.69

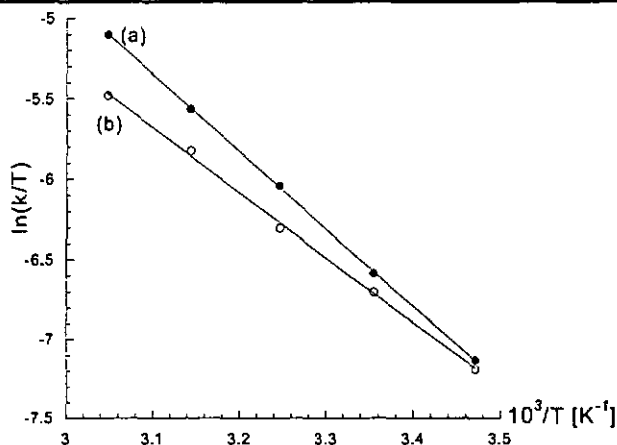


Fig. 3-9 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b). [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon MES 0.1 M, pH = 6.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-9 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon MES 0.1 M, pH = 6.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _Δ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.219
25.0	0.367
35.0	0.565
45.0	0.941
55.0	1.366

t [°C]	k _Λ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.231
25.0	0.412
35.0	0.734
45.0	1.22
55.0	2.00

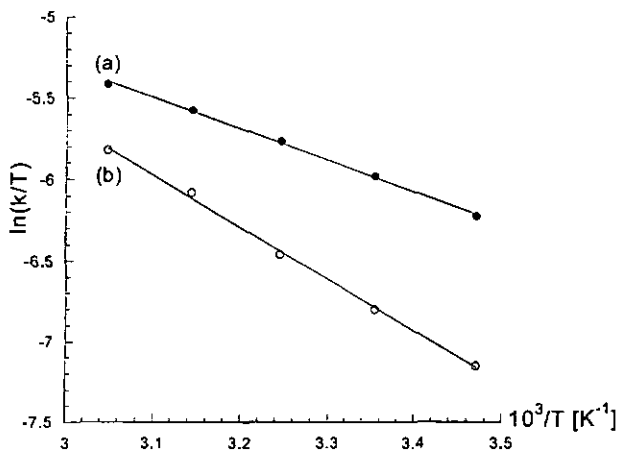


Fig. 3-10 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon acétate 0.1 M, pH = 5.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-10 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon acétate 0.1 M, pH = 5.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.226
25.0	0.332
35.0	0.481
45.0	0.727
55.0	0.973

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.570
25.0	0.753
35.0	0.964
45.0	1.20
55.0	1.46

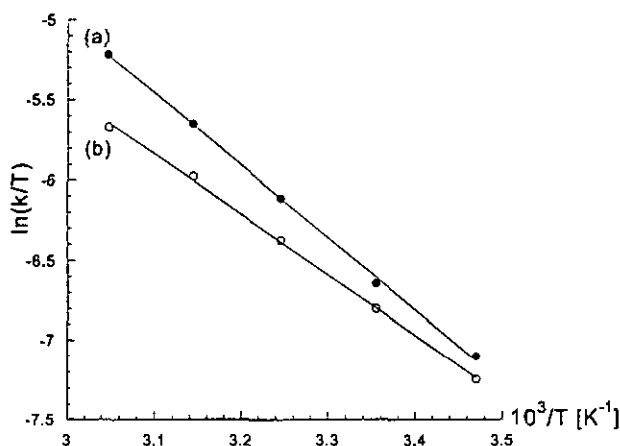


Fig. 3-11 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon acétate 0.1 M, pH = 5.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-11 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon acétate 0.1 M, pH = 5.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.206
25.0	0.332
35.0	0.527
45.0	0.811
55.0	1.13

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.238
25.0	0.390
35.0	0.683
45.0	1.12
55.0	1.78

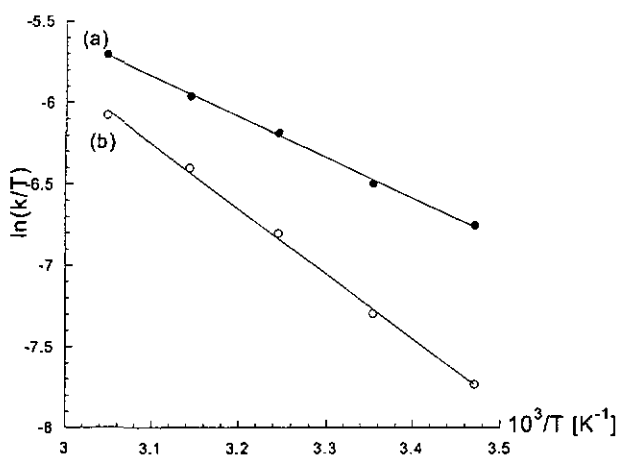


Fig. 3-12 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-12 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.127
25.0	0.203
35.0	0.343
45.0	0.529
55.0	0.755

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.337
25.0	0.451
35.0	0.636
45.0	0.822
55.0	1.10

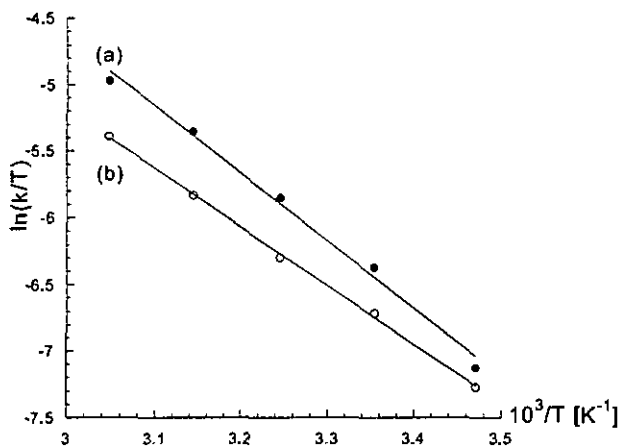


Fig. 3-13 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}⟨(S,S)-promp⟩H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}⟨(R,R)-promp⟩H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-13 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _Δ [s ⁻¹ · M ⁻¹]
15.0	0.201
25.0	0.361
35.0	0.567
45.0	0.933
55.0	1.50

t [°C]	k _Λ [s ⁻¹ · M ⁻¹]
15.0	0.232
25.0	0.510
35.0	0.889
45.0	1.50
55.0	2.28

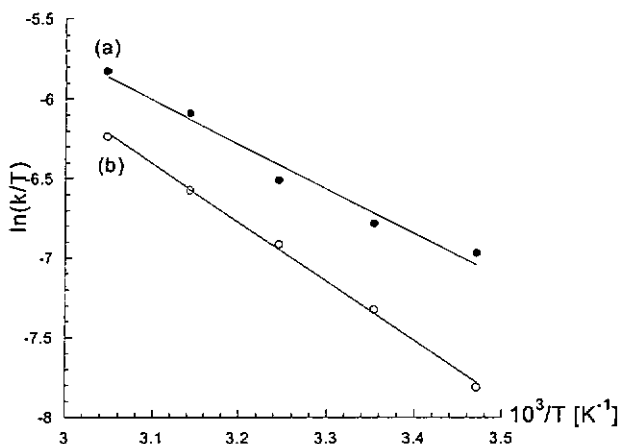


Fig. 3-14 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon borate 0.1 M, pH = 9.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-14 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(alamp)H₂O] ; [Co^{II}L]₀ = 1.5·10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon borate 0.1 M, pH = 9.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.117
25.0	0.197
35.0	0.307
45.0	0.445
55.0	0.643

t [°C]	k _A [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.272
25.0	0.338
35.0	0.460
45.0	0.721
55.0	0.968

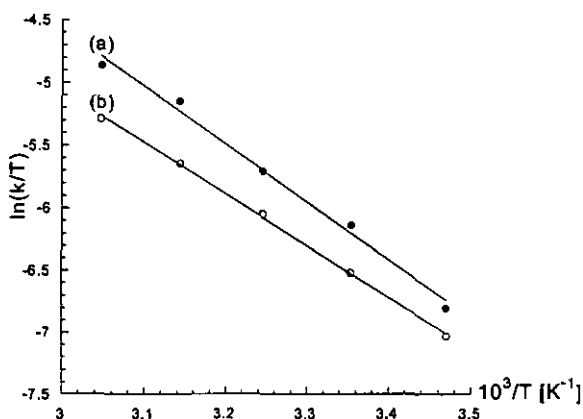


Fig. 3-15 : Représentations d'Eyring pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] (a) et Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] (b) ; [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon borate 0.1 M, pH = 9.0, I = 0.12 M.

Tab. 3-15 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réduction de l'azurine par [Co^{II}(promp)H₂O]. [Co^{II}L]₀ = 1.5 · 10⁻³ M, [AzCu^{II}]₀ = 10⁻⁵ M, tampon borate 0.1 M, pH = 9.0, I = 0.12 M.

t [°C]	k _Δ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.254
25.0	0.439
35.0	0.726
45.0	1.13
55.0	1.66

t [°C]	k _Λ [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
15.0	0.319
25.0	0.643
35.0	1.02
45.0	1.84
55.0	2.53

Tab. 3-16 : Constantes de vitesse de deuxième ordre déterminées dans la réduction de l'azurine par $[M(L)X]$ où $M = Fe^{II}$ ou Co^{II} , $L = alamp$ ou $promp$, $X = H_2O$ ou imidazole. $[M(L)] = 1.5 \cdot 10^{-3}$ M, $[AzCu^{II}]_0 = 10^{-5}$ M, tampon 0.1 M, $I = 0.12$ M.

pH	tampon	complexe	k_A^* [M ⁻¹ .s ⁻¹]	k_{λ}^* [M ⁻¹ .s ⁻¹]	S* (k_A/k_{λ})
5	acétate	[Co ^{II} (alamp)]	0.332	0.753	0.441
		[Co ^{II} (promp)]	0.333	0.390	0.854
6	MES	[Co ^{II} (alamp)]	0.314	0.750	0.419
		[Co ^{II} (promp)]	0.367	0.412	0.890
7	phosphate	[Fe ^{II} (alamp)]	260	204	1.27
		[Fe ^{II} (promp)]	597	725	0.82
		[Fe ^{II} (malamp)]	724	447	1.62
	imidazole	[Co ^{II} (alamp)]	0.256	0.539	0.475
		[Co ^{II} (promp)]	0.402	0.460	0.874
		[Co ^{II} (alamp)]	59.7	37.9	1.58
8	Tris-Cl	[Co ^{II} (alamp)]	0.203	0.451	0.449
		[Co ^{II} (promp)]	0.361	0.510	0.707
9	borate	[Co ^{II} (alamp)]	0.197	0.338	0.581
		[Co ^{II} (promp)]	0.439	0.643	0.683

* à 25°C.

Tab. 3-17 : Paramètres d'activation de la réduction de l'azurine par les complexes de cobalt(II) et de fer(II). tampon 0.1 M, I = 0.12 M.

pH	Tampon	Complexe	ΔH^\ddagger [kJ·mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
5	acétate	Λ -[Co ^{II} (alamp)]	15.9	-193.8
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	26.6	-164.8
		Λ -[Co ^{II} (promp)]	37.4	-126.8
		Δ -[Co ^{II} (promp)]	31.3	-149.0
6	MES	Λ -[Co ^{II} (alamp)]	16.2	-193.8
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	29.2	-157.4
		Λ -[Co ^{II} (promp)]	39.9	-118.2
		Δ -[Co ^{II} (promp)]	33.8	-140.4
7	phosphate	Λ -[Fe ^{II} (alamp)]	15.6	-186.5
		Δ -[Fe ^{II} (alamp)]	14.3	-188.9
		Λ -[Fe ^{II} (promp)]	24.5	-107.8
		Δ -[Fe ^{II} (promp)]	30.1	-90.8
		Λ -[Fe ^{II} (malmp)]	22.4	-118.5
		Δ -[Fe ^{II} (malmp)]	13.0	-146.5
	imidazole	Λ -[Co ^{II} (alamp)]	20.8	-180.2
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	35.3	-138.5
		Λ -[Co ^{II} (promp)]	42.1	-110.6
		Δ -[Co ^{II} (promp)]	34.5	-136.8
		Λ -[Co ^{II} (alamp)]	38.8	-84.4
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	28.0	-116.8
8	Tris-Cl	Λ -[Co ^{II} (alamp)]	20.7	-181.9
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	33.1	-146.9
		Λ -[Co ^{II} (promp)]	42.0	-107.7
		Δ -[Co ^{II} (promp)]	36.5	-131.0
9	borate	Λ -[Co ^{II} (alamp)]	23.3	-175.4
		Δ -[Co ^{II} (alamp)]	30.7	-155.5
		Λ -[Co ^{II} (promp)]	38.4	-120.3
		Δ -[Co ^{II} (promp)]	34.4	-136.5

Tab. 3-18 : Différences des paramètres d'activation de la réduction de l'azurine par les énantiomères de $[M(L)X]$ où $M = Fe^{II}$ ou Co^{II} , $L = alamp$ ou $promp$, $X = H_2O$ ou imidazole. $[M(L)] = 1.5 \cdot 10^{-3}$ M, $[AzCu^{II}]_0 = 10^{-5}$ M, tampon 0.1 M, $I = 0.12$ M.

pH	Tampon	Complexe	$\Delta\Delta H^{\# 1)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$T\Delta\Delta S^{\# 1) 2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta G^{\# 1) 2)}$ [kJ·mol ⁻¹]
5	acétate	$[Co^{II}(alamp)]$	+10.7	+8.65	+2.05
		$[Co^{II}(promp)]$	-6.1	-6.62	+0.52
6	MES	$[Co^{II}(alamp)]$	+13.0	+10.85	+2.15
		$[Co^{II}(promp)]$	-5.5	-6.62	+0.52
7	phosphate	$[Fe^{II}(alamp)]$	-1.3	-0.71	-0.58
		$[Fe^{II}(promp)]$	+5.6	+5.07	+0.53
		$[Fe^{II}(malmp)]$	-9.4	-8.34	-1.06
	imidazole	$[Co^{II}(alamp)]$	+14.5	+12.4	+2.07
		$[Co^{II}(promp)]$	-7.6	-7.81	+0.20
		$[Co^{II}(alamp)]$	-10.8	-9.66	-1.14
8	Tris-Cl	$[Co^{II}(alamp)]$	+12.4	+10.43	+1.96
		$[Co^{II}(promp)]$	-5.5	-6.94	+1.44
9	borate	$[Co^{II}(alamp)]$	+7.4	+5.93	+1.47
		$[Co^{II}(promp)]$	-4.0	-4.83	+0.83

1) $\Delta - \Delta$, voir tableau 3-17.

2) à 25°C.

3.2 Fixation du centre métallique par transfert d'électron

Les mesures cinétiques nous ont permis de déterminer la stéréosélectivité des réactions impliquant les métalloprotéines tout en restant opaques sur les aspects mécanistiques du transfert d'électron.

Taube [113] a mis en évidence les mécanismes de transfert d'électron de type sphère interne en utilisant des complexes labiles de chrome(II). A l'état oxydé, ces complexes deviennent des espèces inertes qui conservent le ligand pontant du transfert d'électron. L'analyse du complexe de chrome(III) permet ainsi l'identification du mécanisme de transfert d'électron. Mais l'utilisation de cette méthode dans les systèmes protéiniques s'avère compliquée puisque l'identification par séquençage du résidu lié au Cr(III) comporte des difficultés [85, 87, 88].

Cette méthode a été modifiée par Bernauer et Verardo [97] par l'utilisation des composés labiles de cobalt(II) optiquement actifs, facilement identifiables par spectropolarimétrie après leur oxydation.

La réaction correspondante de la plastocyanine, qui a lieu sur His87 avec le réactif Λ -[Co(α lamp)] est indiquée schématiquement dans la figure 3-16.

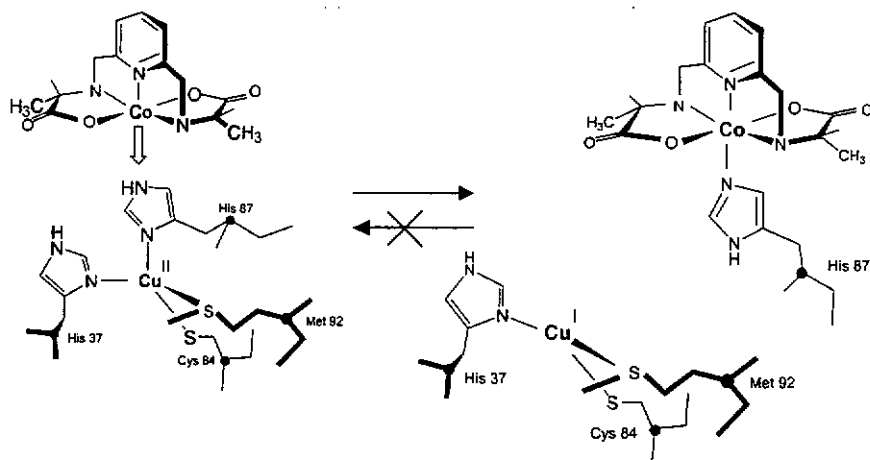


Fig. 3-16 : Représentation schématique de la réaction de type sphère interne entre la plastocyanine et l'isomère Δ - du complexe [Co(alam)].

Les protéines réduites n'ayant pas d'activité CD dans le domaine du visible, l'identification du complexe inerte du cobalt(III) après le transfert d'électron se retrouve simplifiée. Après avoir dialysé l'excès du complexe réducteur, seul le complexe inerte fixé à la surface de la protéine produit un signal CD dans le domaine visible du spectre, délivrant ainsi des informations sur le mécanisme du transfert d'électron.

Dans le cas d'un transfert d'électron de type sphère interne, donc en utilisant un ligand pontant du cuivre à l'état de transition, le spectre de l'histidino-complexe inerte est identifié après réaction et le complexe métallique reste fixé à la surface protéinique.

Dans le cas d'un transfert d'électron de type sphère externe, on retrouve après réaction le spectre de l'aquacomplexe du cobalt(III) qui n'est pas

fixé à la surface de la protéine. Les deux spectres étant sensiblement différents, cette technique nous permet d'obtenir des informations sur la sélection des sites et des mécanismes de transfert d'électron.

Les solutions des réactifs ont été préparées selon les modes opératoires décrits sous 2.3.

Vu les faibles intensités des signaux CD obtenus, les concentrations des réactifs utilisés ont été augmentées d'un facteur 10, la concentration de la solution de protéine étant de l'ordre de 10^{-4} M et celle de la solution de complexe de 10^{-3} M.

Les mesures ont été effectuées dans l'intervalle de pH de 5 à 9 pour l'azurine et dans l'intervalle de pH de 7 à 9 pour la plastocyanine.

Des volumes équivalents d'une solution de protéine (azurine ou plastocyanine) et d'une solution de complexe réducteur sont mélangés dans une cuve tandem spectrophotométrique de 1 cm thermostatisable. Après mélange, la solution est gardée durant 10 demi-vies à la température souhaitée. La solution est ensuite dialysée contre le même tampon que celui de la cuve de mesure, de concentration 10^{-1} M et de volume 2000 fois supérieur à celui de la cuve de mesure. La solution obtenue est ajoutée d'un excès connu d'acide ascorbique pour empêcher la réoxydation de la protéine, amenée à un volume connu, et le spectre CD résiduel correspondant uniquement à la contribution du complexe de cobalt(III) est enregistré (Fig. 3-18 pour la plastocyanine, 3-22 et 3-26 pour l'azurine). La solution est reoxydée à l'aide de quelques cristaux de $K_3[Fe(CN)_6]$ et le spectre est de nouveau enregistré (Fig. 3-19 pour la plastocyanine, 3-23 et 3-27 pour l'azurine). Par

108

soustraction de ces deux spectres, un troisième spectre correspondant à la protéine reoxydée est calculé (Fig. 3-20 pour la plastocyanine, Fig. 3-24 et 3-28 pour l'azurine). Les spectres résiduels obtenus sont comparés aux spectres de référence des aquacomplexes et des histidino-complexes de cobalt(III). Après chaque étape, la solution de mesure a été amenée à un volume exact, de sorte que la concentration réelle a été corrigée en permanence avec les facteurs de dilution.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les deux protéines de cuivre bleu, un certain nombre d'essais supplémentaires a été effectué avec la plastocyanine recombinante.

Fixation des complexes de cobalt(III) par la plastocyanine

Des mesures de fixation en fonction de la température ont été effectuées pour le système plastocyanine recombinante - $[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ à trois pH différents : 7, 8 et 9. Les pourcentages de fixation observés ont été regroupés dans le tableau 3-19 et comparés à ceux obtenus par Bemauer et Verardo [97].

Tab. 3-19 : Fixation (%) du $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})]$ à la surface de la plastocyanine, induite par le transfert d'électron dans le système $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}] / \text{PcCu}^{\text{II}}$. $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{alamp})] = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{PcCu}^{\text{II}}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$, tampon 0.1 M.

pH	t [°C]	[Co(alamp)H ₂ O]		référence
		Δ	Λ	
7.0	20.0	40	100	[97]
	20.0	35	100	ce travail
	30.0	40	100	
	50.0	48	100	
8.0	20.0	50	100	[97]
	20.0	50	100	ce travail
	35.0	56	100	
	50.0	59	100	
9.0	20.0	54	100	ce travail
	35.0	61	100	
	50.0	67	100	

Les spectres CD présentés dans les figures 3-17 à 3-20 décrivent les étapes parcourues dans les mesures de fixation : enregistrement du spectre initial (1), après dialyse (2), après réoxydation (3) et du spectre final (4 = 3-2) pour le système rec-plastocyanine – $[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

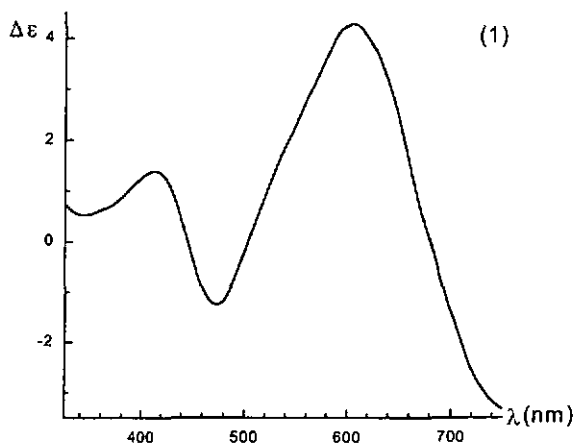


Fig. 3-17 : Spectre CD initial de la plastocyanine oxydée.

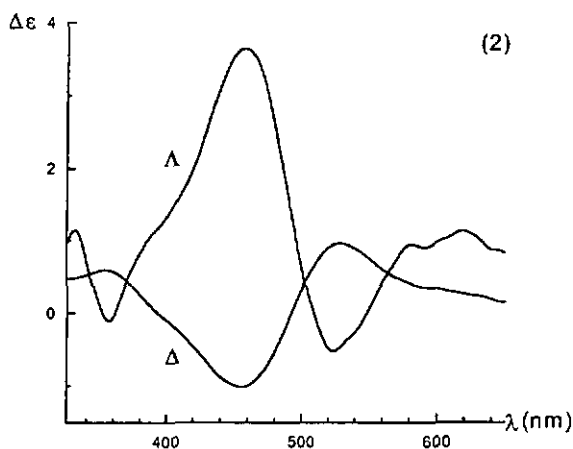


Fig. 3-18 : Spectres résiduels après dialyse pour le système plastocyanine et Δ/Δ - $[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ à 25°C , $\text{pH} = 7.0$, tampon phosphate 0.1 M .

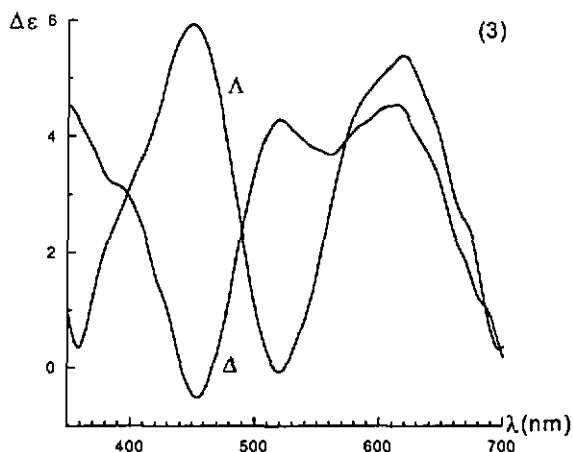


Fig. 3-19 : Spectres CD après réoxydation pour le système plastocyanine et Δ/Λ -[Co(alamp)H₂O] à pH = 7.0, 25°C, tampon phosphate 0.1 M.

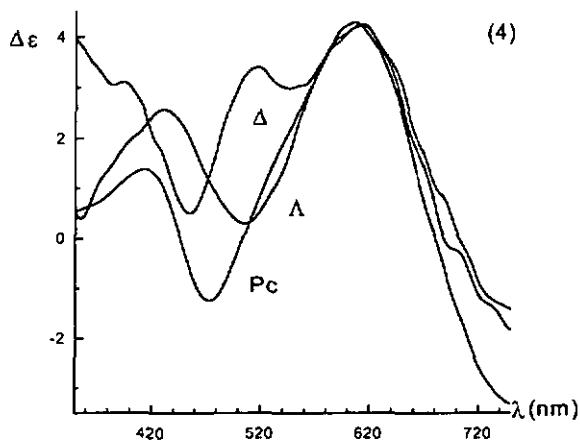


Fig. 3-20 : Spectres CD finals (4) pour le système plastocyanine et Δ/Λ -[Co(alamp)H₂O] obtenus par soustraction des spectres après dialyse (2) des spectres après réoxydation (3) superposés au spectre initial de la plastocyanine oxydée (1). pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M, 25°C.

Fixation des complexes de cobalt(III) par wt-azurine

Les spectres CD présentés dans les figures 3-21 à 3-28 décrivent les étapes parcourues dans les mesures de fixation : spectre initial (1), après dialyse (2), après réoxydation (3) et spectre final (4 = 3-2) pour le système wt-azurine - $[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ ou $[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$. Les pourcentages de fixation observés dans les systèmes étudiés ont été regroupés dans le tableau 3-20.

Les valeurs des constantes de vitesse du transfert d'électron sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) ont été calculées à partir des constantes globales de vitesse (k_{tot}) en fonction du taux de fixation des complexes métalliques à la surface de l'azurine. Leurs valeurs sont données dans les tableaux 3-21 et 3-22.

Les représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par $\Delta/\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ ou $\Delta/\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ sont données dans les figures 3-29 à 3-44.

Les valeurs des paramètres d'activation et des stéréosélectivités déterminées pour les réactions de type sphère interne (SI), sphère externe (SE) et totale (tot) dans le système wt-azurine et $\Delta/\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ ou $\Delta/\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ sont données dans les tableaux 3-23 à 3-28.

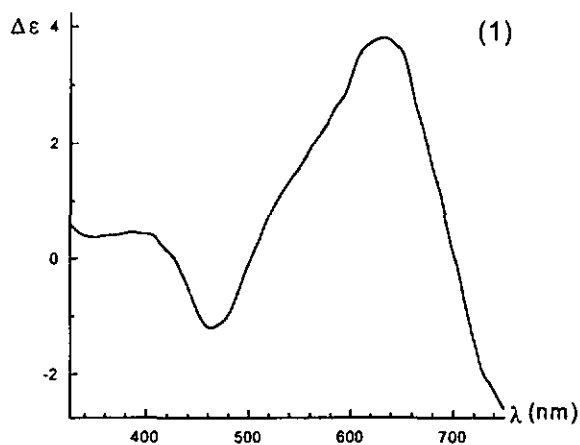


Fig. 3-21 : Spectre CD initial de l'azurine oxydée.

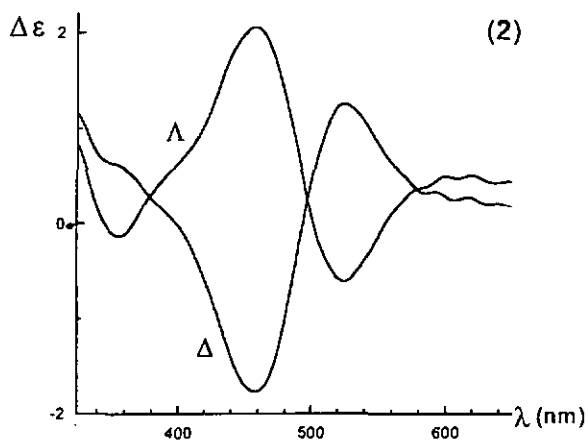


Fig. 3-22 : Spectres résiduels après dialyse pour le système azurine et Δ/Λ -[Co(alamp) H_2O] à 55°C, pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M.

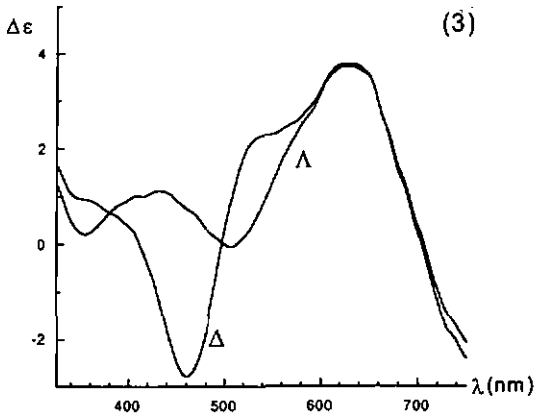


Fig. 3-23 : Spectres CD après réoxydation pour le système azurine et Δ/Δ -[Co(alamp)H₂O] à pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M, 55°C.

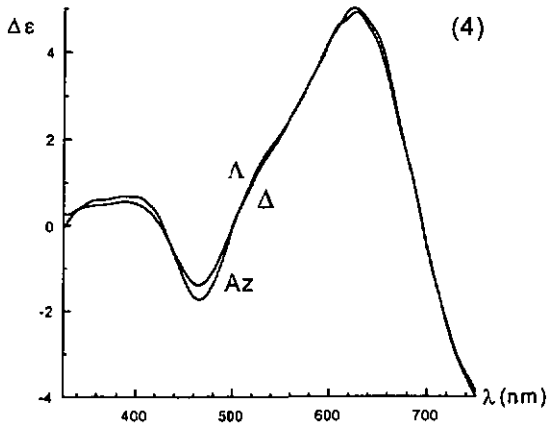


Fig. 3-24 : Spectres CD finals (4) pour le système azurine et Δ/Δ -[Co(alamp)H₂O] obtenus par soustraction des spectres après dialyse (2) des spectres après réoxydation (3) superposés au spectre initial de l'azurine oxydée (1) à pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M, 55°C.

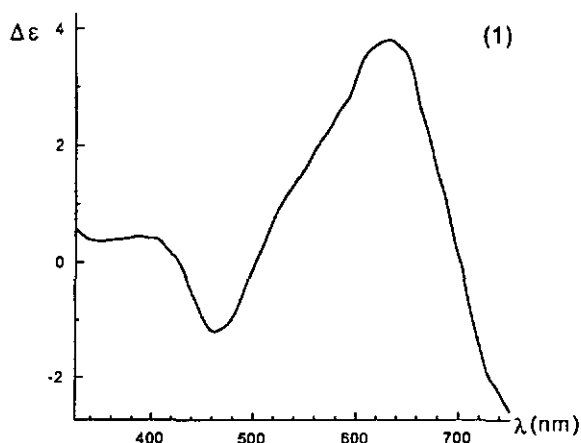


Fig. 3-25 : Spectre CD initial de l'azurine oxydée.

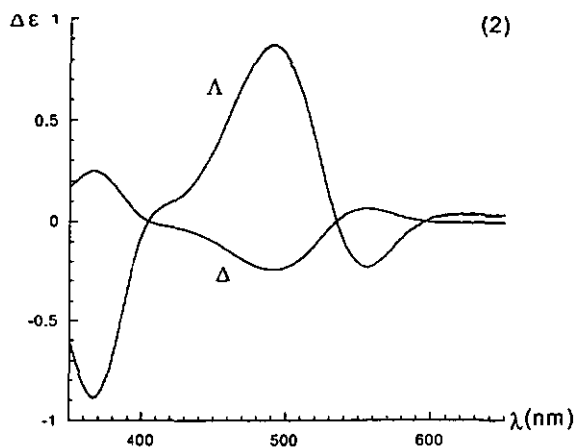


Fig. 3-26 : Spectres résiduels après dialyse pour la réduction de l'azurine par Δ/Δ -[Co(promp)H₂O] à 55°C, pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M.

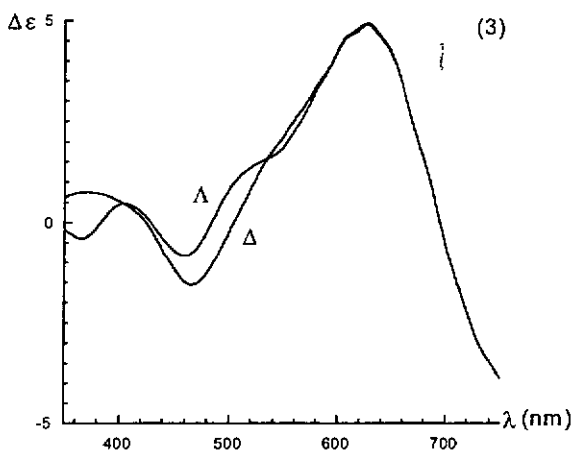


Fig. 3-27 : Spectres CD après réoxydation pour le système azurine et Δ/Λ -[Co(promp)H₂O] à pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M, 55°C.

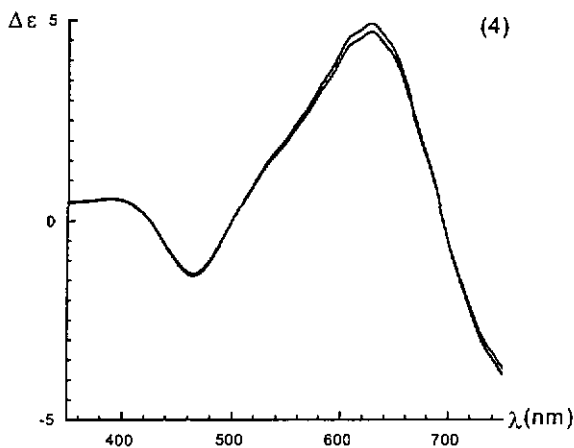


Fig. 3-28 : Spectres CD finals (4) pour le système azurine et Δ/Λ -[Co(promp)H₂O] obtenus par soustraction des spectres après dialyse (2) des spectres après réoxydation (3) superposés au spectre initial de l'azurine oxydée (1) à pH = 7.0, tampon phosphate 0.1 M, 55°C.

Tab. 3-20 : Fixation (%) du $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})]$ à la surface de l'azurine induite par le transfert d'électron dans le système $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{H}_2\text{O}] / \text{AzCu}^{\text{II}}$. L = alamp ou promp, $[\text{M}(\text{L})] = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{AzCu}^{\text{II}}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$, tampon 10^{-1} M .

pH	t [°C]	[Co(alamp)H ₂ O]		[Co(promp)H ₂ O]	
		Δ	Λ	Δ	Λ
5.0	15.0	0	0	0	0
	30.0	0	0	0	0
	55.0	4	1	0	0
6.0	15.0	0.5	0	0	0
	25.0	2	1	0	0
	35.0	4.5	2.4	0	2.0
	45.0	11	6	1.0	5.0
	55.0	16	9.6	2.0	9.0
7.0	15.0	52	26	1.0	10.0
	30.0	61	40	5.0	17.0
	55.0	73	64	9.0	32.0
8.0	15.0	71	48	7.5	23.5
	25.0	72	56.7	10	35.5
	35.0	74	63.8	12	45.8
	45.0	81	68.9	23.9	52.0
	55.0	85.6	74	28.4	63.6
9.0	15.0	89	69	45	71
	35.0	91	77	57	85.8
	55.0	96	85	65	94

Tab. 3-21 : Sélection du site de fixation dans le processus de transfert d'électron entre azurine et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

pH	t [°C]	Δ / Λ	$k_{\text{tot.}} [\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{SI}} [\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{SE}} [\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	$\Delta\Delta G^\# [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$
5.0	55.0	Δ	0.97	0.039	0.93	+8.7
		Λ	1.46	0.015	1.4	+13
6.0	25.0	Δ	0.31	0.0063	0.31	+9.6
		Λ	0.75	0.0075	0.74	+11
	35.0	Δ	0.43	0.019	0.41	+7.8
		Λ	0.91	0.022	0.88	+9.5
	45.0	Δ	0.61	0.067	0.54	+5.5
		Λ	1.1	0.063	0.99	+7.3
55.0	Δ	0.82	0.13	0.69	+4.5	
	Λ	1.69	0.16	1.53	+6.1	
7.0	15.0	Δ	0.14	0.073	0.068	-0.19
		Λ	0.39	0.10	0.29	+2.5
	30.0	Δ	0.30	0.19	0.12	-1.1
		Λ	0.60	0.24	0.36	+1.0
	55.0	Δ	*0.93	0.68	0.25	-2.7
		Λ	*1.3	0.83	0.47	-1.6
8.0	15.0	Δ	0.13	0.09	0.037	-2.1
		Λ	0.34	0.18	0.16	-0.29
	25.0	Δ	0.20	0.15	0.057	-2.3
		Λ	0.45	0.26	0.19	-0.67
	35.0	Δ	0.34	0.25	0.089	-2.7
		Λ	0.64	0.41	0.23	-1.5
	45.0	Δ	0.53	0.43	0.10	-3.8
		Λ	0.82	0.57	0.26	-2.1
	55.0	Δ	0.76	0.65	0.11	-4.8
		Λ	1.1	0.81	0.29	-2.9
9.0	15.0	Δ	0.12	0.10	0.013	-5.0
		Λ	0.27	0.19	0.084	-1.9
	35.0	Δ	0.31	0.28	0.028	-5.9
		Λ	0.46	0.352	0.11	-3.1
	55.0	Δ	0.64	0.62	0.026	-8.6
		Λ	0.97	0.82	0.15	-4.7

* constantes obtenues par extrapolation (Fig. 3.4).

Tab. 3-22 : Sélection du site de fixation dans le processus de transfert d'électron entre l'azurine wild type et $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$.

pH	t [°C]	Δ/Λ	$k_{\text{tot.}} [\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{SI}} [\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{SE}} [\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	$\Delta\Delta G^\# [\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$
6.0	35	Δ	0.57	0.00	0.57	-
		Λ	0.73	0.015	0.72	+9.9
	45	Δ	0.94	0.0094	0.93	+12
		Λ	1.2	0.061	1.2	+7.8
	55	Δ	1.4	0.027	1.3	+11
		Λ	2.0	0.18	1.82	+6.3
7.0	15	Δ	*0.23	0.0023	0.23	+11
		Λ	*0.23	0.023	0.21	+5.3
	30	Δ	*0.50	0.025	0.48	+7.4
		Λ	*0.58	0.099	0.48	+4.0
	55	Δ	*1.5	0.13	1.36	+6.3
		Λ	*2.2	0.69	1.47	+2.1
8.0	15	Δ	0.20	0.015	0.19	+6.0
		Λ	0.23	0.054	0.18	+2.8
	25	Δ	0.36	0.036	0.32	+5.4
		Λ	0.51	0.18	0.33	+1.5
	35	Δ	0.57	0.068	0.49	+5.1
		Λ	0.89	0.41	0.48	+0.43
	45	Δ	0.93	0.22	0.71	+3.1
		Λ	1.5	0.78	0.72	-0.21
55	Δ	1.5	0.43	1.1	+2.5	
	Λ	2.3	1.5	0.83	-1.5	
9.0	15	Δ	0.25	0.12	0.14	+0.47
		Λ	0.32	0.23	0.092	-2.1
	35	Δ	0.73	0.41	0.31	-0.72
		Λ	1.0	0.858	0.14	-4.6
	55	Δ	1.7	1.1	0.58	-1.7
		Λ	2.5	2.35	0.15	-7.5

* constantes obtenues par extrapolation (Fig. 3.6).

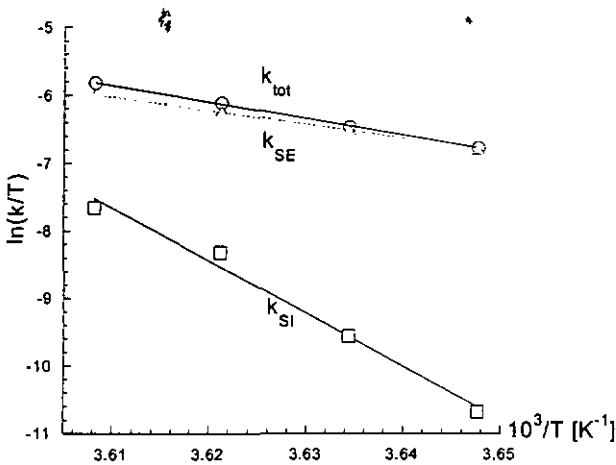


Fig. 3-29 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R,-)alamp)H₂O] ; tampon MES 0.1 M, pH = 6.0.

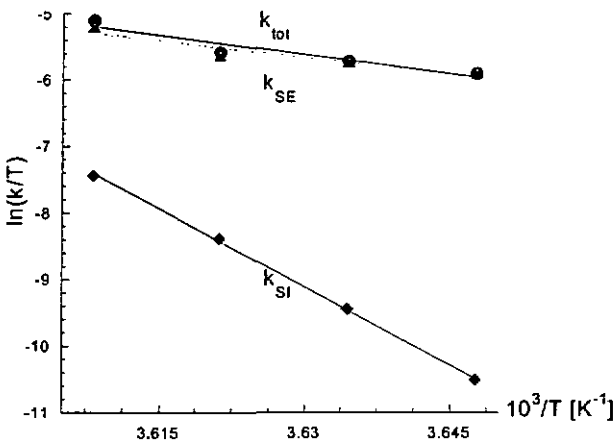


Fig. 3-30 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((R,R,-)alamp)H₂O] ; tampon MES 0.1 M, pH = 6.0.

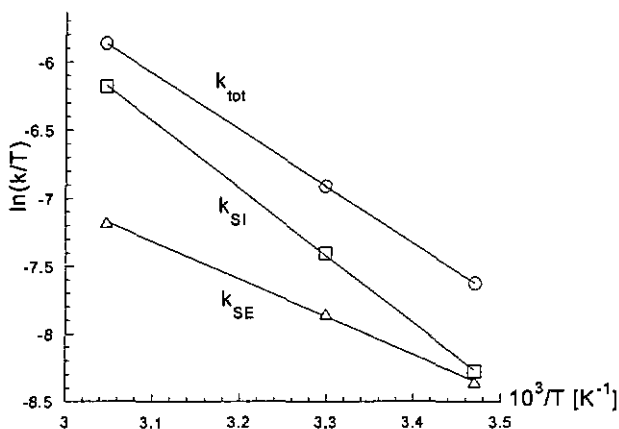


Fig. 3-31 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] ; phosphate 0.1 M, pH = 7.0.

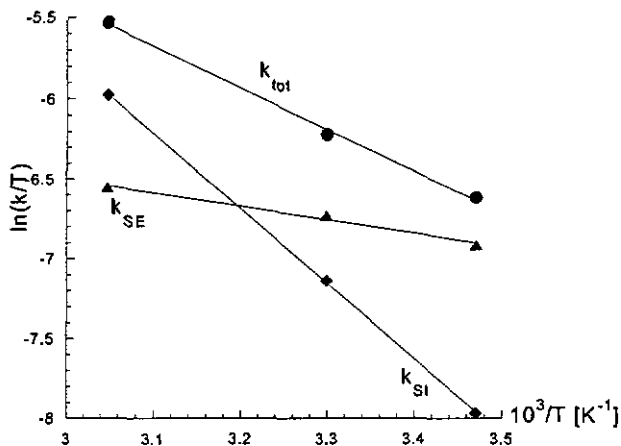


Fig. 3-32 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] ; phosphate 0.1 M, pH = 7.0.

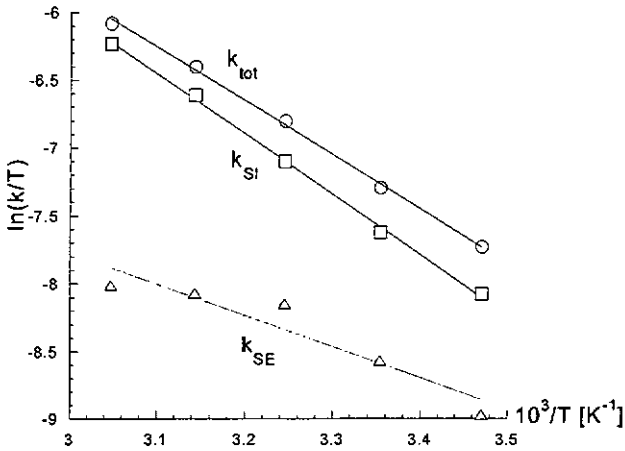


Fig. 3-33 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R,-)alamp)H₂O] ; Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0.

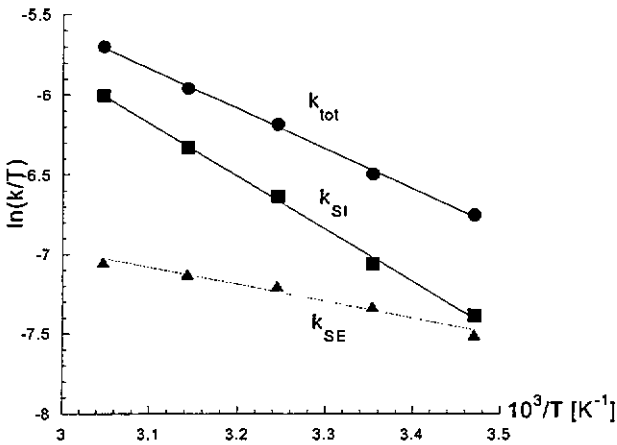


Fig. 3-34 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S,-)alamp)H₂O] ; Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0.

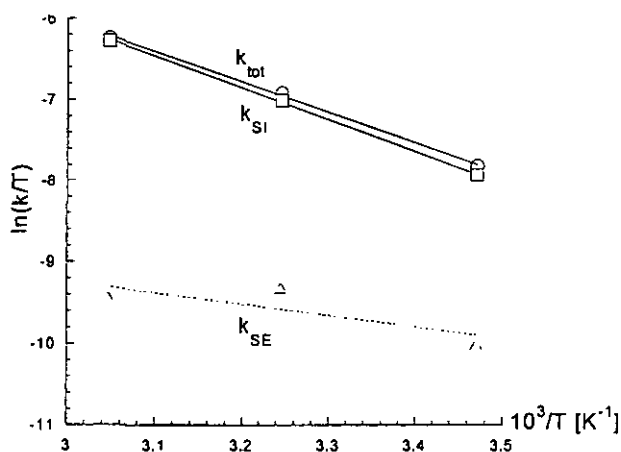


Fig. 3-35 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R)-alamp)H₂O] ; tampon borate 0.1 M, pH = 9.0.

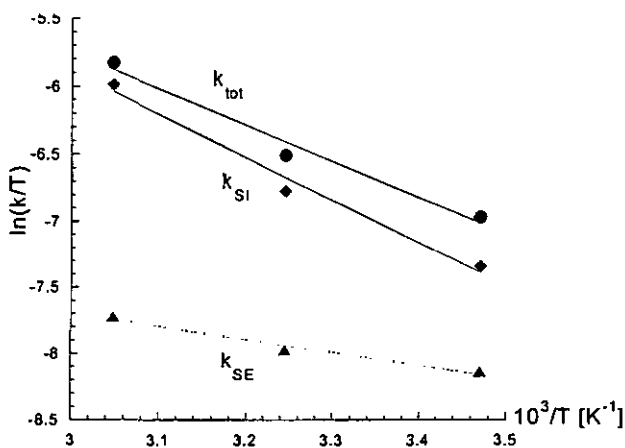


Fig. 3-36 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-alamp)H₂O] ; tampon borate 0.1 M, pH = 9.0

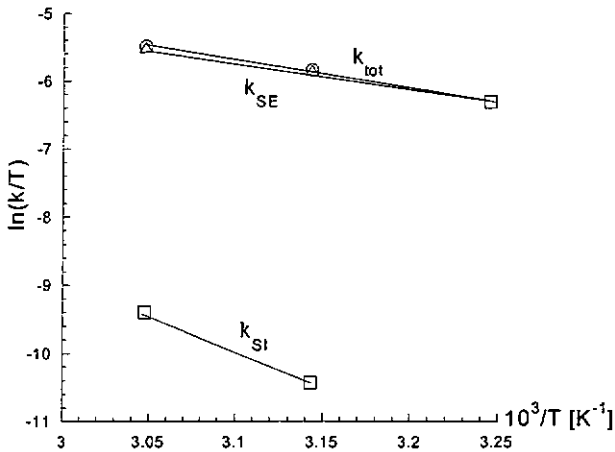


Fig. 3-37 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] ; tampon MES 0.1 M, pH = 6.0.

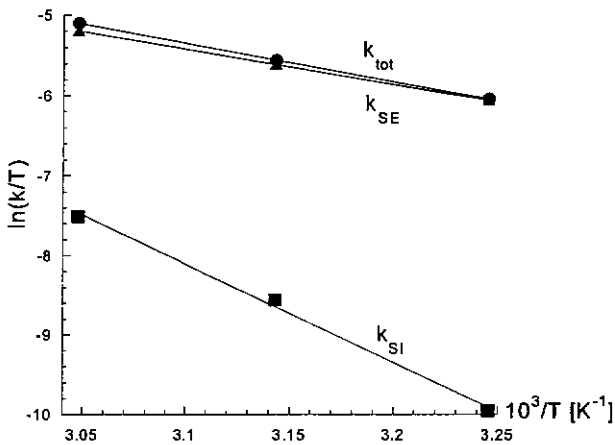


Fig. 3-38 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] ; tampon MES 0.1 M, pH = 6.0.

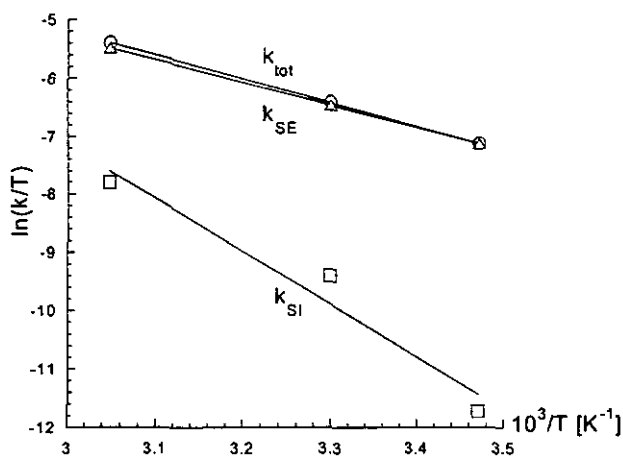


Fig. 3-39 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R,-)promp)H₂O] ; phosphate 0.1 M, pH = 7.0.

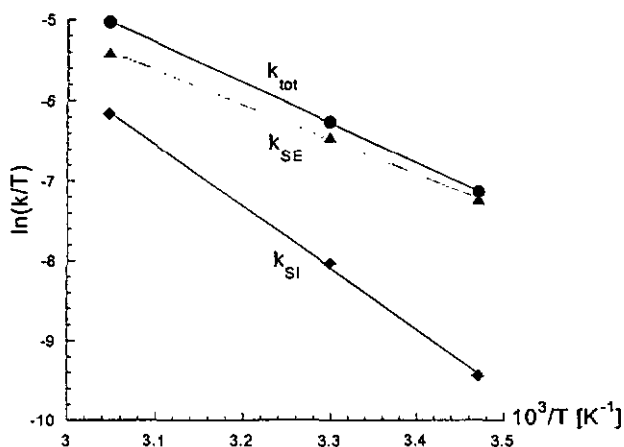


Fig. 3-40 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S,-)promp)H₂O] ; phosphate 0.1 M, pH = 7.0.

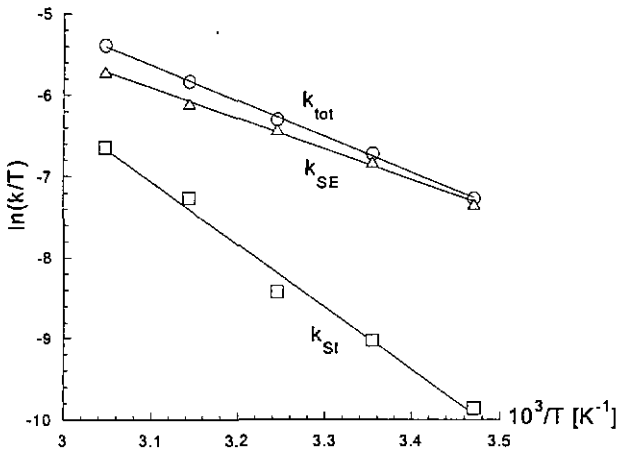


Fig. 3-41 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R)-promp)H₂O] ; tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0.

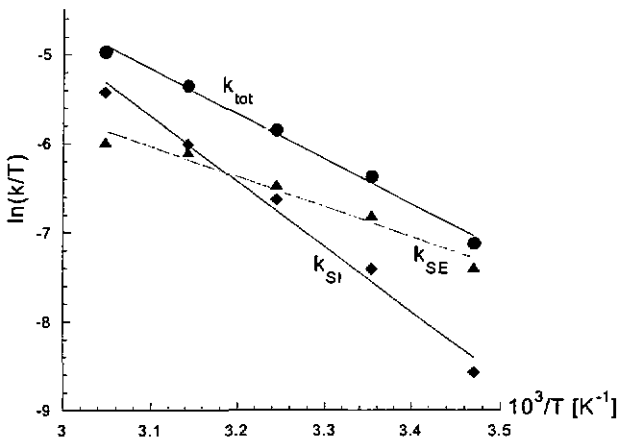


Fig. 3-42 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{SI}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((S,S)-promp)H₂O] ; tampon Tris-Cl 0.1 M, pH = 8.0.

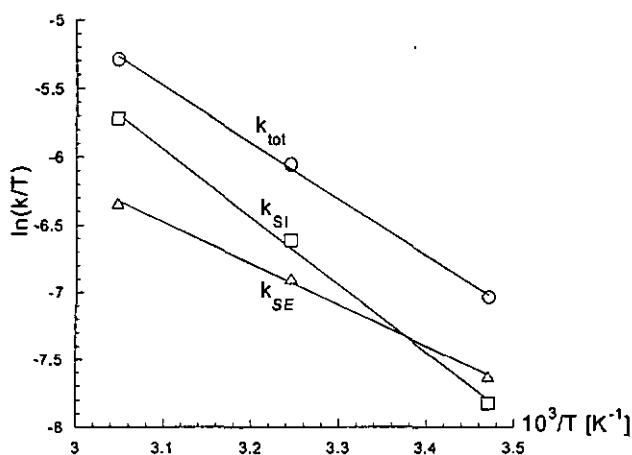


Fig. 3-43 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{Si}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Δ -[Co^{II}((R,R,-)promp)H₂O] ; tampon borate 0.1 M, pH = 9.0.

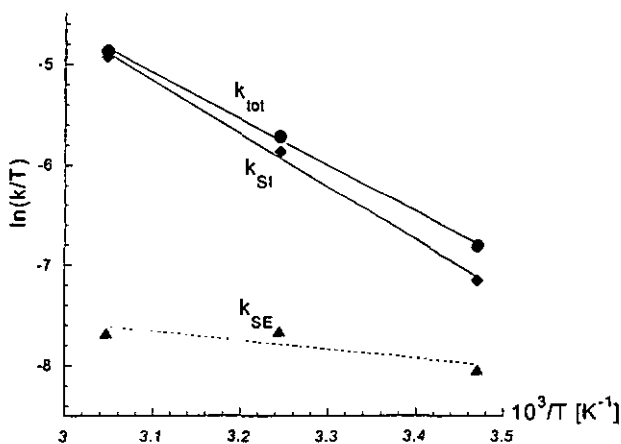


Fig. 3-44 : Représentations d'Eyring des constantes de vitesse globale (k_{tot}), sphère interne (k_{Si}) et sphère externe (k_{SE}) pour la réduction de l'azurine par Λ -[Co^{II}((S,S,-)promp)H₂O] ; tampon borate 0.1 M, pH = 9.0.

Tab. 3-23 : Paramètres d'activation déterminés pour les réactions de type sphère interne (SI), sphère externe (SE) et totale (tot) dans le système wt-azurine et Δ - ou Λ -[Co(alamp)H₂O].

pH	Δ / Λ	$\Delta H^{\#}_{tot}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{tot}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$\Delta H^{\#}_{SI}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{SI}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$\Delta H^{\#}_{SE}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{SE}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
6.0	Δ	29.2	-157	*)			
	Λ	16.2	-194				
7.0	Δ	35.3	-139	41.1	-123	23.1	-187
	Λ	20.8	-180	39.0	-128	7.03	-231
8.0	Δ	33.1	-147	36.9	-137	19.3	-191
	Λ	20.7	-182	27.5	-164	8.92	-229
9.0	Δ	30.7	-156	*)			
	Λ	23.3	-175				

*) vu les taux de fixation trop faibles (à pH = 6.0) ou trop élevés (à pH = 9.0) ainsi que les grandes valeurs des erreurs, les paramètres d'activation individuels n'ont pas pu être déterminés avec précision.

Tab. 3-24 : Paramètres d'activation déterminés pour la réduction de l'azurine par [Co(alamp)H₂O] en fonction du mécanisme de réaction.

pH	type mécanisme	$\Delta\Delta H^{\# 2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$T\Delta\Delta S^{\# 1)2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta G^{\# 1)2)}$ [kJ·mol ⁻¹]
6.0	Tot.	+13.0	+11.0	+2.00
7.0	Tot.	+14.5	+12.2	+2.30
	SI	+2.10	+1.49	+0.61
	SE	+16.1	+13.1	+3.00
8.0	Tot.	+12.4	+10.4	+2.00
	SI	+9.40	+8.05	+1.35
	SE	+10.4	+11.3	-0.90
9.0	Tot.	+7.40	+5.66	+1.74

¹⁾ à 25°C, ²⁾ Δ - Λ .

Tab. 3-25 : Stéréosélectivité observée pour la réduction de l'azurine par [Co(alamp)H₂O] en fonction du mécanisme de réaction : sphère interne (SI), sphère externe (SE) et totale (tot).

pH	S (k_A / k_{Λ}) à 25°C		
	S _{tot.}	S _{SI}	S _{SE}
6.0	0.47	0.84	0.42
7.0	0.48	0.79	0.33
8.0	0.53	0.57	0.29
9.0	0.67	0.79	0.25

Tab. 3-26 : Paramètres d'activation calculés pour les réactions de type sphère interne (SI), sphère externe (SE) et totale (tot) dans le système wt-azurine et Δ - ou Λ -[Co(promp)H₂O].

pH	Δ / Λ	$\Delta H^{\#}_{tot}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{tot}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$\Delta H^{\#}_{SI}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{SI}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$\Delta H^{\#}_{SE}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^{\#}_{SE}$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
6.0	Δ	33.8	-140	*)			
	Λ	39.9	-118				
7.0	Δ	34.5	-137				
	Λ	42.1	-111				
8.0	Δ	36.5	-131	64.2	-56.4	31.3	-150
	Λ	42.0	-108	60.8	-57.2	28.0	-161
9.0	Δ	34.4	-137	41.5	-118	25.4	-173
	Λ	38.4	-120	43.8	-105	7.39	-238

*) vu les faibles taux de fixation ainsi que les grandes valeurs des erreurs, les paramètres d'activation individuels n'ont pas pu être déterminés avec précision.

Tab. 3-27 : Paramètres d'activation déterminés pour la réduction de l'azurine par $[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction.

pH	Type mécanisme	$\Delta\Delta H^{\# 2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$T\Delta\Delta S^{\# 1,2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta G^{\# 1,2)}$ [kJ·mol ⁻¹]
6.0	Tot.	-6.10	-6.56	+0.46
7.0	Tot.	-7.60	-7.75	+0.15
8.0	Tot.	-5.50	-6.86	+1.36
	SI	+3.40	+0.239	+3.15
	SE	+3.30	+3.23	+0.07
9.0	Tot.	-4.00	-5.07	+1.07

¹⁾ à 25°C, ²⁾ Δ - Λ .

Tab. 3-28 : Stéréosélectivité observée pour la réduction de l'azurine par $[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction : sphère interne (SI), sphère externe (SE) et totale (tot).

pH	S (k_{Δ} / k_{Λ}) à 35°C		
	S_{tot}	S_{SI}	S_{SE}
6.0	0.79	-	0.70
7.0	0.87	0.25	0.99
8.0	0.64	0.17	1.0
9.0	0.73	-	-

3.3 Modélisation

Afin de mieux comprendre les résultats expérimentaux des mesures de fixation du centre métallique à la surface de la protéine nous avons effectué des calculs de modélisation moléculaire [114].

Dans le cas de la plastocyanine, une seule histidine se trouve exposée au solvant, la His87. Les spectres finals calculés (voir Fig. 3-20) montrent que le chromophore après réoxydation ne correspond pas au chromophore initial, donc la fixation de réactif ne peut avoir lieu qu'à cet endroit spécifique.

Dans le cas de l'azurine par contre, en plus des histidines coordonnées sur le cuivre, deux histidines supplémentaires sont présentes, dont l'une (His83) est directement accessible au solvant. L'identité des spectres initial et final dans le cas de l'azurine suggère très fortement que la réaction ne se produit pas sur une des histidines coordinatrices du cuivre mais sur la His83.

Sans connaître la structure tertiaire des protéines, il serait difficile de comprendre les raisons de sélection du mécanisme et des sites de fixation pour les processus de transfert d'électron étudiés. Les structures établies par diffraction de rayons X pour l'azurine et la plastocyanine nous permettent donc de reconnaître les similarités des structures tertiaires des deux protéines étudiées et de comparer les structures des chaînes polypeptidiques, des sites actifs ainsi que l'arrangement de quelques résidus localisés aux surfaces exposées au solvant.

Pour comparer les différences entre l'azurine et la plastocyanine, quelques résultats déjà publiés en ce qui concerne la plastocyanine ont été vérifiés [25, 33, 110].

Azurine

Grâce aux structures établies par diffraction de rayons X, on remarque la présence de deux histidines, His117 et His83, placés à la surface de la protéine trouvée soit sous sa forme native [46], soit sous forme mutée [112].

La position de l'azote du groupement liant histidine est éloignée à quelques 4 Å de l'atome de cuivre dans le cas de His117 et de 15 Å dans le cas de His83.

L'environnement de His117 est cependant beaucoup plus encombré que celui de l'His87. Par modélisation il a été trouvé que les résidus Met113 et Phe114, placés autour de His117, interdiraient la fixation du fragment [Co(alamp)] sur His117, au détriment du plus court chemin de transfert d'électron.

De tels stéréo-effets justifient le choix de l'His83, quoique isolé, comme site de fixation (Fig. 3-45).

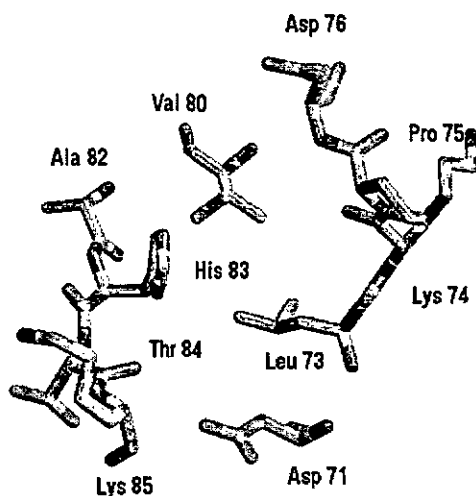


Fig. 3-45 : Localisation de His 83 à la surface de l'azurine.

L'environnement désencombré de l'His83 permet la fixation aisée des deux énantiomères du [Co(alamp)] sur ce même centre, en dépit d'une faible liaison entre le groupement carbonyle du fragment [Co(alamp)] et le proton du groupement N-H du Asp76 ($d_{N-H \cdots O} = 0.29 \text{ \AA}$). Après une perturbation minimale du système environnant, les deux énantiomères du [Co^{III}(alamp)] sont capables de se fixer sur l'His83 (Fig. 3-46).

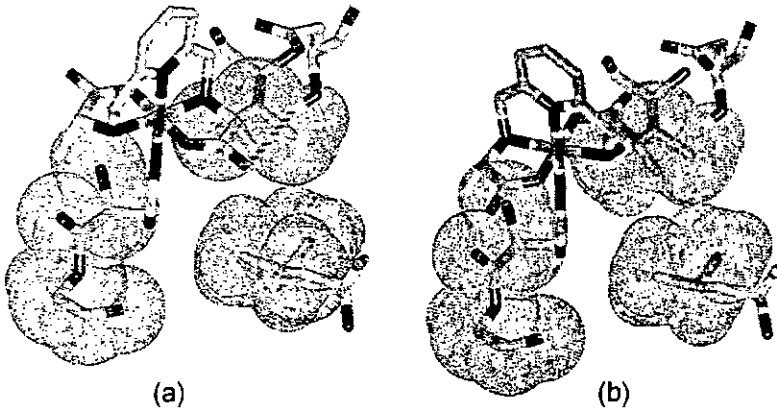


Fig. 3-46 : Orientation des fragments (a) Δ -[Co^{III}(R,R)-alamp] et (b) Λ -[Co^{III}(S,S)-alamp] à la surface exposée au solvant contenant His83 de l'azurine.

L'existence d'une forte liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du groupe Thr84 et le groupement imidazole du His83 entraîne des restrictions structurales applicables sur le groupement imidazole de His83 durant la formation de l'état de transition. En optimisant la structure de l'état de transition, des interactions de type répulsif ont été trouvés entre le groupement proline et une partie du squelette carbonique de l'azurine (Thr84-His83-Ala82).

Un contact plus favorable à l'état de transition a été révélé pour le système Co^{III}(promp)] / AzCu^{II} (Fig. 3-47).

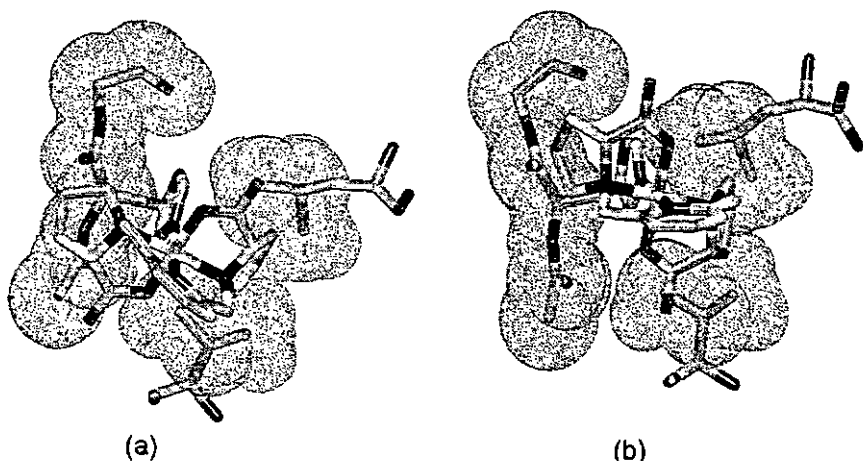


Fig. 3-47 : Orientation des fragments (a) Δ -[Co^{III}(R,R)-promp] et (b) Λ -[Co^{III}(S,S)-promp] à la surface exposée au solvant contenant His83 de l'azurine.

L'exhaussement de l'oxygène de la chaîne polypeptidique de l'His83 force même le mouvement d'un groupement CH₂ appartenant au cycle prolinique du Δ -[Co(promp)] en dehors de sa position stable d'énergie minimale. Ce mouvement n'a pas été mis en évidence pour le système Λ -[Co(promp)] / AzCu^{II}.

Plastocyanine

Des expériences antérieures ont montré qu'une histidine adjacente au centre actif est le site de fixation du fragment [Co(alamp)] dans une réaction de type sphère interne. Cette histidine doit se trouver à la surface de la protéine et d'après les structures aux rayons X [33, 111] la

seule histidine exposée à la surface de la protéine est His87, aussi coordonnée au cuivre (Fig. 3-48).

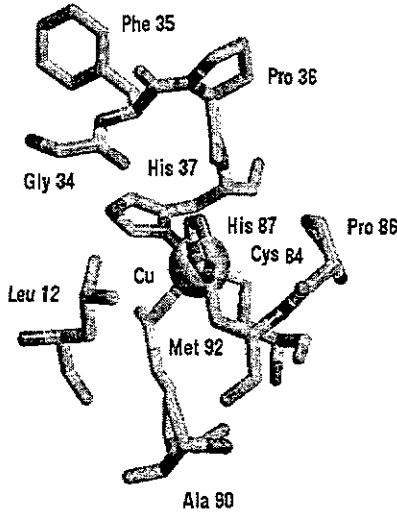


Fig. 3-48 : Localisation de His 87 à la surface de la plastocyanine.

Les alentours du site proposé comportent trois possibilités de fixation : la première est une poche composée par Pro86, His37 et Pro36. Une deuxième possibilité est une poche plus large, entourée par Ala90, His87 et Gly34 et divisée en deux par Leu12. Un changement de la position de la chaîne latérale de la Leu12 peut entraîner la modulation des dimensions des deux poches. Seules quelques poches sont assez larges pour pouvoir héberger le cycle de la proline. Plusieurs distorsions du cycle imidazole coordonné sur le fragment [Co(promp)] ont été enregistrées quand ce cycle a été utilisé pour les calculs de fixation. Ces distorsions n'ont pas pu être enlevées même en appliquant des fortes contraintes géométriques aux alentours du cobalt, ce qui indique des stéréoeffets prohibitifs dus à la présence des fragments Λ -[Co(promp)]

ou Δ -[Co(promp)] à l'égard de la formation des liaisons covalentes entre l'ion de cobalt et N_{His87}.

L'état de transition proposé pour le système plastocyanine – [Co(alamp)] est illustré dans la figure 3-49.

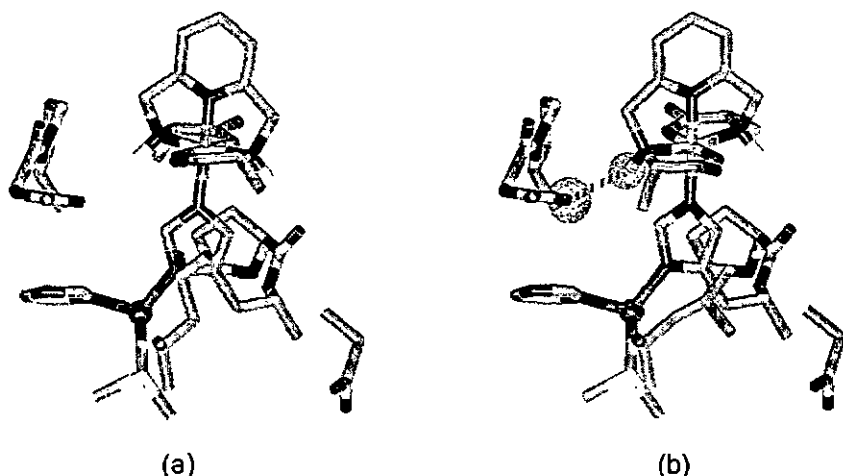


Fig. 3-49 : Orientation des fragments (a) Δ -[Co^{III}(R,R)-alamp] et (b) Λ -[Co^{III}(S,S)-alamp] à la surface exposée au solvant contenant His87 de la plastocyanine.

Une liaison hydrogène entre un azote N-H du fragment Λ -[Co(alamp)] et le groupement carbonyle du Gly34 de la plastocyanine est mise en évidence. Cette unique liaison hydrogène stabilise l'état de transition et aide à préserver His87 à proximité du cuivre après la fixation du Λ -[Co(alamp)]. Aucune liaison hydrogène n'a cependant été mise en évidence dans la réaction avec l'énantiomère Δ -[Co(alamp)].

4 Discussion

4.1 Cinétique

Des mesures cinétiques visant à la détermination de la vitesse de transfert d'électron en fonction de la température et du pH ont été effectuées avec le système azurine - Δ/Λ -[M(L)X] où M = Fe^{II} ou Co^{II}, L = alamp ou promp et X = H₂O ou imidazole. Toutes les réactions ont été étudiées dans des conditions de pseudo-premier ordre.

Influence de la protéine

Une première comparaison peut être faite entre les réactions de l'azurine avec les aquacomplexes de fer(II) ou cobalt(II), de ligand alamp ou promp à pH = 7 et celles de la plastocyanine avec les mêmes réactifs synthétiques [Tab. 4-1], décrites par Sauvain [2] et Verardo [4].

Pour tous les systèmes comparés, les réactions observées de la plastocyanine sont au minimum 3 fois et au maximum 160 fois plus rapides comparées à celles de l'azurine avec le même réactif.

Ces différences peuvent être expliquées d'une part par la différence de 60 mV entre les potentiels d'oxydoréduction des deux protéines en faveur de la plastocyanine (+370 mV), ainsi que par l'influence de la distance du transfert d'électron avec le même réactif synthétique.

Influence de l'ion métallique

Les premières mesures ont été effectuées à $\text{pH} = 7$, dans le tampon phosphate, en variant le centre métallique du complexe. La réduction de l'azurine par les aquacomplexes de cobalt(II) s'est déroulée à une vitesse environ 400 à 1600 fois plus petite que celle de la réaction avec les aquacomplexes de fer(II) du même ligand pentadenté. Cette différence entre les complexes de Co^{II} et de Fe^{II} est légèrement plus grande dans les réactions de l'azurine avec les complexes de promp.

Ce comportement est comparable à celui de la plastocyanine avec les mêmes complexes de cobalt(II) [4] et de fer(II) [2], mais la différence des constantes de vitesse entre les aquacomplexes de cobalt(II) et fer(II) est environ 10'000 à 20'000 fois plus grande dans le cas de la plastocyanine.

Les constantes de vitesse des réactions bimoléculaires calculées pour l'azurine sont réunies dans le tableau 4-1 avec celles obtenues pour la plastocyanine.

Tab. 4-1 : Comparaison des constantes de vitesse bimoléculaires calculées pour les réactions de l'azurine ou de la plastocyanine à pH = 7 et 25°C.

	Azurine			Plastocyanine		
	k_{Δ} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	k_{Λ} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	Réf.	k_{Δ} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	k_{Λ} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	Réf.
[Fe ^{II} (alamp)H ₂ O]	261	205	ce travail	4.1·10 ⁴	2.4·10 ⁴	[2]
[Fe ^{II} (promp)H ₂ O]	597	725		1.4·10 ⁴	1.8·10 ⁴	
[Co ^{II} (alamp)H ₂ O]	0.229	0.539		1.37	1.84	[4]
[Co ^{II} (promp)H ₂ O]	0.402	0.46		1.14	1.38	

Une aussi grande différence de la vitesse du transfert d'électron en fonction de la nature de l'ion métallique a également été observée dans les réactions d'auto-échange impliquant les complexes [Co(NH₃)^{3+/2+}, comparés aux couples Fe_{aq}^{3+/2+} et [Ru(NH₃)^{3+/2+}.

La vitesse relativement petite du transfert d'électron observée dans les systèmes faisant intervenir le couple Co²⁺/Co³⁺ a été attribuée au changement entre les deux états de spin de l'ion métallique (Co^{II} high spin /Co^{III} low spin) ainsi qu'au grand changement des distances de coordination Co-N (Co^{III}-N = 1.936 Å par rapport à Co^{II}-N = 2.114 Å) [116].

Influence du ligand unidenté – effet catalytique de l'imidazole

Lors de la complexation des ions métalliques de fer(II) ou de cobalt(II), cinq des six positions de coordination sont occupées par un ligand

pentadenté. De ce fait, la sixième position reste accessible aux différentes molécules ou ions présents en solution et elle est ainsi modulable à souhait, par exemple par le choix du tampon utilisé.

A $\text{pH} = 7$, les mesures cinétiques ont été d'abord effectuées dans le tampon phosphate 0.1 M, qui présente peu d'affinité pour le cobalt(II), de sorte qu'une molécule d'eau se trouve à la sixième position de coordination. L'imidazole par contre, qui en tant que composant d'un tampon permet de travailler au même pH , présente une plus grande affinité pour le centre métallique.

Des séries de mesures ont donc été effectuées dans le tampon imidazole de $\text{pH} = 7$ et de concentration 0.1 M, en utilisant l'ion cobalt(II) comme centre métallique. Les constantes de formation des complexes mixtes de cobalt(II) en fonction de la température (voir Tab. 4-2) ont été déterminées par Verardo [4].

Les conditions expérimentales adoptées pour les mesures cinétiques ont été telles que les concentrations effectives en complexe mixte représentent plus de 90 % de la concentration totale en cobalt(II), sur tout le domaine de température étudié.

Tab. 4-2 : Constantes de formation des complexes de type $[\text{Co}(\text{L})\text{im}]$ à $\text{pH} = 7$, $I = 0.5 \text{ M}$ (NaCl) [4].

t°C	15	20	25	30	35	40
$[\text{Co}(\text{promp})\text{im}]$	159±10	145±5	130±7	116±6	109±10	96±9
$[\text{Co}(\text{alamp})\text{im}]$	130±8	109±8	92±5	86±6	80±6	74±6

Pour les réactions de l'azurine avec $[\text{Co}(\text{alamp})]$ et $[\text{Co}(\text{promp})]$, une catalyse due à la présence d'un imidazole à la sixième position de coordination a été observée comme ceci a été le cas pour les réactions analogues avec la plastocyanine [4]. Les valeurs obtenues à la température de 25°C sont présentées dans le tableau 4-3.

Tab. 4-3 : Constantes de vitesse de deuxième ordre pour les réactions de l'azurine ou de la plastocyanine à $\text{pH} = 7$ et 25°C.

	azurine*		Plastocyanine**	
	k [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	k _[Co(alamp)im] / k _[Co(alamp)H₂O]	k [M ⁻¹ ·s ⁻¹] [4]	k _[Co(alamp)im] / k _[Co(alamp)H₂O]
$\Delta\text{-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$	0.229	260	1.37	531
$\Delta\text{-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{im}]$	59.7		727	
$\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$	0.539	70	1.84	306
$\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{alamp})\text{im}]$	37.9		563	
$\Delta\text{-}[\text{Co}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$	0.402	233	1.14	391
$\Delta\text{-}[\text{Co}(\text{promp})\text{im}]$	93.6		446	
$\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{promp})\text{im}]$	0.460	137	1.38	401
$\Lambda\text{-}[\text{Co}(\text{promp})\text{im}]$	62.9		554	

* $[\text{imH}^+] = 0.05 \text{ M}$. ** extrapolé à concentration infinie en imidazole.

Une catalyse plus importante est observée dans les réactions effectuées avec les énantiomères Δ des deux complexes mixtes de cobalt(II) et cela pour les deux protéines.

Dans le cas de la plastocyanine, l'effet catalytique de l'imidazole est environ 3 fois plus important que dans celui de l'azurine. Cet effet peut être interprété comme une conséquence du changement de potentiel d'oxydoréduction du complexe de cobalt [12] vers des valeurs plus négatives dans le cas des complexes mixtes. Les valeurs sont présentées dans le tableau 4-4.

Tab. 4-4 : Potentiels d'oxydoréduction des complexes de type $[\text{Co}(\text{L})\text{L}']$.

	L'				Réf.
	py	H ₂ O	im	meim	
E_0 (V) $[\text{Co}(\text{promp})\text{L}']$	-0.07	-0.14	-0.17	-0.17	[12]
E_0 (V) $[\text{Co}(\text{alamp})\text{L}']$	-0.19	-0.20	-0.26	-0.28	

La catalyse due à l'imidazole est cependant trop grande pour qu'elle soit expliquée seulement par la faible variation du potentiel redox observée entre les aquacomplexes et les complexes mixtes de cobalt du même ligand pentadenté.

Ces changements de potentiel représentent des changements de $\Delta\Delta G^\circ$ de 2.9 kJ/mol pour les complexes (promp)imidazole et de 5.8 kJ/mol pour les complexes (alamp)imidazole. Dans le cas le plus favorable, pour une énergie de réorganisation de valeur égale à celle de la différence d'énergie libre, une telle différence de ΔG° produit une accélération maximale d'un facteur de 3 pour le promp et de 11 pour

l'alamp, ce qui n'est pas suffisant pour expliquer les accélérations observées, d'un facteur de 140 pour le promp et de 70 pour l'alamp au minimum.

Les mesures effectuées par Verardo [4] sur le comportement de la plastocyanine en présence de l'imidazole semblent exclure la possibilité d'une catalyse par la substitution d'une histidine coordonnée au cuivre par l'imidazole du complexe mixte. En effet, la substitution des histidines par imidazole est plus lente que le transfert d'électron catalysé. D'autre part, la présence du substituant méthyl- ou n-butyl sur l'atome d'azote non-coordonné ne modifie pratiquement pas l'importance de la catalyse. La même conclusion s'impose par le fait que la modélisation montre que le groupe imidazole des histidines 87 (plastocyanine) et 117 (azurine) ne sont pas accessibles par le complexe [Co(promp)]. Pourtant la catalyse est d'une importance semblable pour les complexes des deux ligands.

En revanche, les valeurs obtenues suggèrent une participation isolée de l'imidazole, à un site spécifique dans le processus de transfert d'électron. Le mécanisme proposé est de type sphère externe, à l'aide d'une interaction du type "stacking" formé par recouvrement de deux cycles imidazole appartenant d'un côté à l'espèce mixte et de l'autre à un résidu histidine localisé à la surface de la protéine.

Influence du pH

La variation de la vitesse de transfert d'électron en fonction du pH présente deux directions différentes pour les deux aquacomplexes de cobalt utilisés (Fig. 4-1).

L'allure générale de la courbe montre une légère diminution de la vitesse globale de transfert d'électron pour les deux énantiomères du complexe [Co(alamp)] et une légère augmentation de cette vitesse pour les deux énantiomères du complexe [Co(promp)] lors de l'augmentation du pH.

Pour les deux complexes étudiés avec l'azurine, la plus faible variation des constantes de vitesse correspond aux isomères Δ de chaque couple énantiomérique.

Ces deux directions différentes laissent supposer l'existence de deux sites de transfert d'électron à la surface de la protéine, qui sont utilisés en fonction du pH du milieu et des pKa des acides aminés impliqués, comme le résidu imidazole exposé au solvant de His83, et dont la déprotonation à $\text{pH} > 7$ modifie l'état de charge de la protéine.

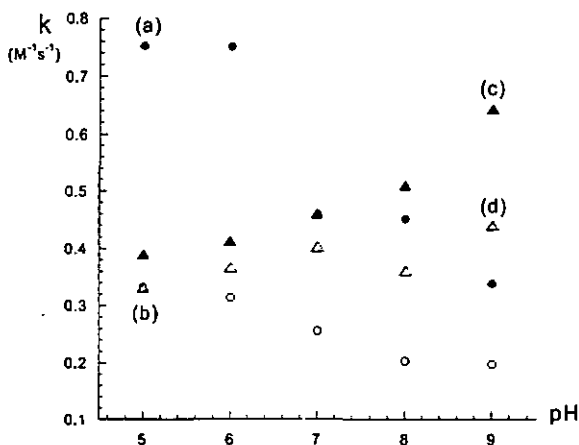


Fig. 4-1: Variation de la vitesse globale du transfert d'électron en fonction du pH à 25°C pour: (a) Λ -[Co(alamp)], (b) Δ -[Co(alamp)], (c) Λ -[Co(promp)], (d) Δ -[Co(promp)].

Il faut cependant remarquer que les différences de vitesses observées pour un système donné, qui ne dépassent jamais un facteur de 2 sur une étendue de quatre unités de pH, pourraient être dues à l'erreur expérimentale. Néanmoins, la même tendance opposée pour les deux ligands est également trouvée pour les séries de mesures effectuées à d'autres températures (voir les tableaux 4-5 et 4-6).

Suite aux études cinétiques, les mesures de fixation nous ont révélé deux mécanismes pour le transfert d'électron. Dans quelques cas, les constantes de vitesse individuelles pour le mécanisme de type sphère interne ou sphère externe ont pu être déterminées (Tab. 3-21, 3-22).

Les valeurs des taux de fixation du complexe métallique (Tab. 3-20) augmentent avec l'augmentation du pH pour tous les systèmes étudiés.

Etant donné la grande erreur expérimentale dans la détermination du taux de fixation, une discussion détaillée de l'influence du pH sur les deux types de réactions, sphère interne et sphère externe semble difficile. Afin de discuter ces variations, les valeurs des tableaux 3-21 et 3-22 ont été regroupées différemment dans le tableau 4-5 pour le complexe [Co(promp)] et dans le tableau 4-6 pour [Co(alamp)].

Ces valeurs permettent de reconnaître comme tendance générale une forte augmentation de la contribution de la réaction sphère interne entre les pH 7 et 9, alors que l'importance de la réaction sphère externe diminue.

Tab. 4-5 : Constantes de vitesse et sélectivité du site (valeurs entre parenthèses) en fonction du pH pour la réaction azurine - [Co(promp)].

T °C	pH	Δ			Λ		
		SI (%)	SE (%)	tot	SI (%)	SE (%)	tot
55	6	0.027 (2)	1.3 (98)	1.4	0.18 (9)	1.82 (91)	2.0
	7	0.13 (9)	1.36 (91)	1.5	0.69 (32)	1.47 (68)	2.2
	8	0.43 (28)	1.1 (72)	1.5	1.5 (64)	0.83 (36)	2.3
	9	1.10 (65)	0.58 (35)	1.7	2.35 (94)	0.15 (6)	2.5
35	6		0.57 (100)	0.57	0.015 (2)	0.72 (98)	0.73
	7	0.025 (6)	0.48 (94)	0.50	0.099 (17)	0.48 (83)	0.58
	8	0.068 (12)	0.50 (88)	0.57	0.41 (46)	0.48 (54)	0.89
	9	0.41 (57)	0.31 (43)	0.73	0.858 (86)	0.15 (14)	1.0

* valeurs obtenues par extrapolation.

Dans le cas du complexe [Co(promp)], l'augmentation du pH provoque une augmentation très légère de la constante de vitesse globale. Les valeurs de la constante de vitesse sphère interne ainsi que du taux de fixation augmentent plus fortement et en même temps la valeur de la constante de vitesse sphère externe diminue.

Dans le cas du complexe [Co(alamp)] par contre, l'augmentation du pH provoque une diminution de la constante de vitesse globale et sphère externe, pendant que la constante de vitesse sphère interne ainsi que le taux de fixation augmentent.

Tab. 4-6 : Constantes de vitesse et sélectivité du site en fonction du pH pour la réaction azurine – [Co(alamp)].

T °C	pH	Δ			Λ		
		SI (%)	SE (%)	tot	SI (%)	SE (%)	tot
55	5	0.039 (4)	0.93 (96)	0.97	0.015 (1)	1.4 (99)	1.46
	6	0.13 (16)	0.69 (84)	0.82	0.16 (9)	1.53 (91)	1.69
	7	0.68 (73)	0.25 (27)	0.93	0.83 (64)	0.47 (36)	1.30
	8	0.65 (85)	0.11 (15)	0.76	0.81 (74)	0.29 (26)	1.10
	9	0.62 (96)	0.026 (4)	0.64	0.82 (85)	0.15 (15)	0.97
25	6	0.007 (2)	0.31 (98)	0.32	0.01 (1)	0.74 (99)	0.75
	7	0.16 (58)	0.09 (42)	0.25	0.19 (38)	0.32 (62)	0.61
	8	0.15 (72)	0.06 (28)	0.21	0.26 (57)	0.19 (57)	0.45
	9	0.19 (90)	0.02 (10)	0.21	0.27 (61)	0.097 (39)	0.37
15	7	0.073 (52)	0.068 (48)	0.14	0.1 (26)	0.29 (74)	0.39
	8	0.09 (71)	0.037 (29)	0.13	0.18 (48)	0.16 (52)	0.34
	9	0.10 (89)	0.013 (11)	0.12	0.19 (69)	0.084 (31)	0.27

La forte augmentation des constantes de vitesse sphère interne ainsi que des taux de fixation avec le pH peuvent être discutés en fonction du degré de déprotonation de l'histidine de la chaîne peptidique. Le groupe imidazolidinium de l'histidine-83 dans l'azurine à un pKa de 7.6 [26].

Etant donné qu'à l'état précurseur le complexe de Co^{2+} est coordonné au groupe imidazole de His83 qui, contrairement au cas de la plastocyanine, ne fait pas partie de la sphère de coordination du Cu^{2+} , la

protonation de ce groupe diminue fortement à des $\text{pH} > 7$ favorisant ainsi, à l'état de transition, la formation d'un pont entre le complexe métallique et la métalloprotéine qui va promouvoir le transfert d'électron sphère interne.

Etant donné que l'augmentation du pH favorise un mécanisme sphère interne, le fait que la vitesse globale ne change que peu implique une diminution du mécanisme sphère externe. Cependant, les groupes histidine ne semblent pas participer directement au transfert d'électron sphère externe, ainsi l'influence de la déprotonation sur le ralentissement de cette réaction ne peut être qu'indirecte. A ce sujet on peut évoquer des changements de conformation dus aux changements de l'état de charge de la protéine ou encore les possibilités de formation des ponts hydrogène, qui se présentent de manière différente pour les deux complexes $[\text{Co}(\text{alamp})]$ et $[\text{Co}(\text{promp})]$. Le fait que la stéréosélectivité de ce dernier inverse le signe, mais pas pour le premier (voir paragraphe suivant) pourrait indiquer que pour la réaction sphère externe $[\text{Co}(\text{promp})]$ utilise des sites différents en fonction du pH cependant que $[\text{Co}(\text{alamp})]$ ne pourrait réagir qu'à un seul site. Ce comportement pourrait expliquer les profils différents des vitesses globales en fonction du pH . Cependant, vu que le site exact de la réaction sphère externe est inconnu, ces hypothèses restent pures spéculations.

4.2 Stéréosélectivité

La stéréosélectivité cinétique est définie comme le rapport des constantes de vitesse pour un couple de diastéréoisomères, à une température donnée. Les mesures effectuées avec l'azurine et les complexes de fer(II) ou de cobalt(II) montrent une stéréosélectivité faible ou modérée, ce qui indique une approche assez proche à la surface protéinique, pour permettre une différenciation énergétique des deux états de transition diastéréoisomères.

En terme d'énergie, la stéréosélectivité s'exprime par la différence d'énergie libre d'activation pour un couple d'énantiomères. Par la suite, afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus, la stéréosélectivité sera toujours donnée par :

$$\Delta\Delta G^{\#}_{\Delta-\Lambda} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\Delta}/k_{\Lambda})$$

Une valeur positive de ce rapport indique que c'est l'isomère Λ qui réagit plus vite, et une valeur négative que la réaction est en faveur de l'isomère Δ . Le sens de la stéréosélectivité, calculé à partir des résultats du tableau 3-16, est donné ensemble avec celui les valeurs correspondantes de la plastocyanine (Tab. 4-7).

Tab. 4-7 : Différence d'énergie libre d'activation $\Delta\Delta G^{\#}_{\Delta-\Lambda}$ pour les réactions de la plastocyanine [4] et de l'azurine.

pH	tampon	réactif	$\Delta\Delta G^{\#}_{\Delta-\Lambda}$	
			Azurine	Plastocyanine
7	phosphate	[Fe(alamp)]	-	-
		[Fe(promp)]	+	+
	phosphate	[Co(alamp)]	+	+
		[Co(promp)]	+	+
	imidazole	[Co(alamp)]	-	-
		[Co(promp)]	-	+

Les résultats obtenus avec l'azurine présentent un parallélisme avec ceux obtenus pour les réactions de la plastocyanine avec les mêmes aquacomplexes de cobalt(II) [4] et de fer(II) [2], à une exception près, dans le cas du complexe [Co(promp)im].

Pour les réactions de l'azurine avec les complexes mixtes [Co(L)im], effectuées à pH = 7, une inversion de la stéréosélectivité en faveur de l'isomère Δ a été observée. Cette inversion apparaît, dans le cas de la plastocyanine, seulement dans la réaction impliquant le complexe [Co(promp)im].

Pour les réactions de transfert d'électron avec les énantiomères des complexes $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{L})\text{H}_2\text{O}]$ mesurés à pH = 7, la stéréosélectivité cinétique est favorable à l'énantiomère Λ pour le complexe avec le ligand promp et en faveur de l'énantiomère Δ pour les complexes de ligands alamp et malmp (Tab. 3-18).

Pour les réactions avec les deux énantiomères du complexe $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$, la stéréosélectivité cinétique est favorable à l'énantiomère Λ (Tab. 3-18) dans tout le domaine pH exploré, donc la même tendance observée, à $\text{pH} = 7$, pour les énantiomères du complexe $[\text{Fe}(\text{promp})\text{H}_2\text{O}]$. La même tendance favorable à l'isomère Λ est observée dans le système azurine - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$, à l'inverse du système azurine - $[\text{Fe}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$.

La représentation graphique de la stéréosélectivité globale des deux systèmes en fonction du pH présente une diminution conséquente à l'augmentation du pH (Fig. 4-2).

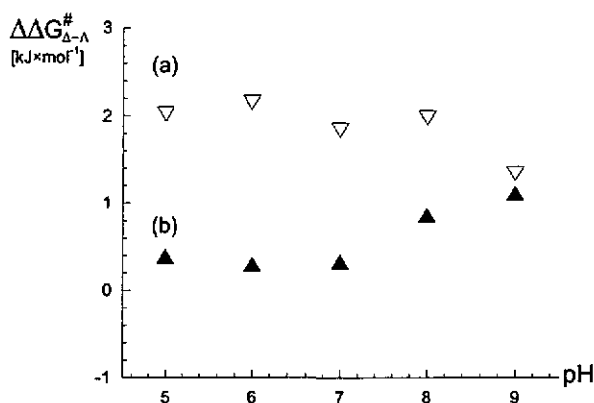


Fig. 4-2 : Variation de la stéréosélectivité $\Delta\Delta G^\#$ (Δ - Λ) en fonction du pH pour (a) $[\text{Co}(\text{alamp})]$ et (b) $[\text{Co}(\text{promp})]$ en réaction avec l'azurine, à $t = 25^\circ \text{C}$. Les valeurs proviennent du tableau 3-18.

Pour tous les aquacomplexes, la stéréosélectivité des réactions impliquant le complexe $[\text{Co}(\text{alamp})]$ est au minimum 1.5 fois plus grande

que celle du complexe [Co(promp)]. Cette différence disparaît pour les réactions de l'azurine avec les complexes mixtes, comme montré dans le tableau 3-18.

La stéréosélectivité varie aussi en fonction du mécanisme de réaction des réactions, comme montré dans les tableaux 4-8 et 4-9.

Tab. 4-8 : Stéréosélectivité des réactions sphère interne et sphère externe en fonction du pH pour la réaction azurine – [Co(promp)].

pH	55°C				35°C			
	Sphère interne		Sphère externe		Sphère interne		Sphère externe	
	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$
6	0.03 / 0.18	+4.88	1.3 / 1.8	+0.887			0.57 / 0.72	+0.6
7	0.13 / 0.69	+4.55	1.36 / 1.47	+0.212	0.025 / 0.1	+3.5	0.48 / 0.48	± 0
8	0.43 / 1.5	+3.4	1.1 / 0.83	-0.768	0.064 / 0.41	+2.28	0.5 / 0.48	-0.1
9	1.1 / 2.35	+2.07	0.58 / 0.15	-3.7	0.41 / 0.86	+1.9	0.31 / 0.15	-1.86

Tab. 4-9 : Stéréosélectivité des réactions sphère interne et sphère externe en fonction du pH pour la réaction azurine – [Co(alamp)].

pH	55°C				25°C			
	Sphère interne		Sphère externe		Sphère interne		Sphère externe	
	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$	k_{Δ}/k_{Λ}	$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}$
5	0.039/ 0.015	- 2.61	0.93 / 1.4	+ 1.11				
6	0.13 / 0.16	+ 0.56	0.69 / 1.53	+ 2.12			0.31 / 0.74	+ 0.419
7	0.68/ 0.83	+ 0.54	0.25 / 0.47	+ 1.72	0.16 / 0.19	+ 0.43	0.09 / 0.32	+ 0.281
8	0.65 / 0.81	+ 0.6	0.11 / 0.29	+ 2.64	0.15 / 0.26	+ 1.36	0.06 / 0.19	+ 2.85
9	0.62 / 0.82	+ 0.76			0.19 / 0.27	+ 0.87	0.02 / 0.097	+ 3.91

L'observation la plus frappante est le fait que la stéréosélectivité de la réaction sphère externe avec [Co(promp)] inverse de signe en fonction du pH, cependant le signe de la stéréosélectivité de la même réaction avec [Co(alamp)] reste le même sur tout le domaine de pH.

4.3 Paramètres d'activation

La compensation des valeurs $\Delta H^\ddagger / \Delta S^\ddagger$ a été mise en évidence dans les réactions impliquant les protéines [117] ainsi que dans les réactions de transfert d'électron des métalloprotéines [118, 119]. Cette compensation a été aussi observée entre des réactifs énantiomériques. La conséquence de cette compensation est un croisement des plots d'Eyring à une certaine température, ce qui conduit à des stéréosélectivités de signe contraire [93, 119] en fonction de la température.

Quand ce model s'applique à des réactifs énantiomériques, la compensation entre $\Delta H^\ddagger / \Delta S^\ddagger$ doit être une conséquence de la différenciation énergétique des deux états de transition énantiomériques à cause des interactions chirales entre les espèces en réaction.

Une grande enthalpie d'activation ensemble à une entropie d'activation plus positive a été expliquée par une approche plus intime d'un des réactifs énantiomériques à la surface de la protéine. Mais l'expression de la stéréosélectivité tient compte, à part les critères énergétiques et structuraux, des effets environnementaux. Donc une approche favorable du réactif à la surface de la protéine ne conduit pas nécessairement à la sélection d'un chemin réactionnel plus favorable pour le transfert d'électron.

Suite aux mesures cinétiques, les paramètres d'activation des réactions globales ont premièrement été calculés. Pour la suite, en partant du principe que les réactions sphère interne et sphère externe sont

parallèles et de pseudo-premier ordre, on a pu calculer les constantes de vitesse et les paramètres d'activation individuels à partir des constantes globales de vitesse et des taux de fixation.

L'évaluation des paramètres d'activation déterminés dans tous les systèmes étudiés montre un phénomène compensatoire dans les variations de l'enthalpie et de l'entropie d'activation - l'énantiomère qui possède le plus faible ΔH^\ddagger possède également l'entropie d'activation ΔS^\ddagger la plus négative; par conséquent, la stéréosélectivité observée est fortement fonction de la température.

Une première comparaison qualitative peut être faite entre les paramètres d'activation des réactions de l'azurine et de la plastocyanine effectuées à pH = 7 et 8, les valeurs étant regroupées dans le tableau 4-10.

Tab. 4-10 : Comparaison des paramètres d'activation entre l'azurine et la plastocyanine.

pH	tampon	réactif	Azurine		Plastocyanine	
			$\Delta\Delta H_{\Delta-\Lambda}$	$T\Delta\Delta S_{\Delta-\Lambda}$	$\Delta\Delta H_{\Delta-\Lambda}$	$T\Delta\Delta S_{\Delta-\Lambda}$
7	phosphate	[Fe(alamp)]	-	-	+	+
		[Fe(promp)]	+	+	+	+
	phosphate	[Co(alamp)]	+	+	-	-
		[Co(promp)]	-	-	-	-
	imidazole	[Co(alamp)]	-	-	+	+
		[Co(promp)]	-	-	+	+

A pH = 7, la réduction de l'azurine par les aquacomplexes du fer(II) ou cobalt(II) présente une variation de l'enthalpie d'activation proportionnelle à l'encombrement stérique des substituants des ligands pentadentés: $alamp < malmp < promp$.

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

Pour les aquacomplexes de fer(II), l'enthalpie d'activation est plus grande et l'entropie d'activation plus positive pour l'énantiomère Δ dans le cas des complexes $[Fe(alamp)]$ et $[Fe(malmp)]$, alors que le contraire est valable pour le complexe $[Fe(promp)]$.

Pour les aquacomplexes du cobalt(II), l'enthalpie d'activation est plus grande et l'entropie d'activation plus positive pour l'énantiomère Δ dans le cas du complexe $[Co(alamp)]$; l'inverse est valable pour le complexe $[Co(promp)]$.

Dans les systèmes de type $AzCu(II) - [Co(alamp)H_2O]$, la réaction avec l'énantiomère Δ du complexe métallique présente une enthalpie d'activation supérieure à celle de la réaction avec l'énantiomère Λ à tous les pH. A l'inverse, dans tous les systèmes de type $AzCu(II) - [Co(promp)]$, la réaction avec l'énantiomère Λ présente une enthalpie d'activation supérieure à celle de la réaction avec l'énantiomère Δ du complexe métallique. Les grandes différences des paramètres

d'activation observés, pour la plastocyanine, en faveur de la réaction avec [Co(alamp)] se retrouvent réduites dans le cas de l'azurine.

La présence de l'imidazole à la sixième position de coordination induit généralement des diminutions sensibles des paramètres d'activation par rapport à ceux calculés pour les réactions effectuées dans le tampon phosphate, sauf dans le cas de l'énantiomère Δ -[Co(alamp)im] pour lequel les valeurs de l'enthalpie et de l'entropie d'activation augmentent. Ce comportement est contraire à celui de la plastocyanine, où la présence de l'imidazole avait conduit à une diminution de l'enthalpie d'activation de plus de 70% par rapport à celle observée pour la réaction avec l'aquacomplexe [Co(alamp)]. Cette augmentation de l'enthalpie d'activation pourrait expliquer la grande différence, en faveur de la plastocyanine [4], des effets catalytiques de l'imidazole sur le transfert d'électron impliquant les deux protéines (Tab. 4-3, 3-17, [4]).

Tab. 4-11 : Paramètres d'activation déterminés pour les réactions globales de l'azurine avec les aquacomplexes et les complexes mixtes de cobalt, à pH = 7.

Complexe		$\Delta H^\#$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta H^\#^{1)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta S^\#$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$T\Delta\Delta S^\#^{1,2)}$ [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta G^\#^{1,2)}$ [kJ·mol ⁻¹]
[Co(alamp)H ₂ O]	Δ	35.3	+ 14.5	- 138.5	+ 12.2	+ 2.3
	Λ	20.8		- 180.2		
[Co(alamp)im]	Δ	28.0	- 10.8	- 120.3	- 9.66	- 1.14
	Λ	38.8		- 105.6		
[Co(promp)H ₂ O]	Δ	34.5	- 7.6	- 136.8	- 7.81	+ 0.21
	Λ	42.1		- 110.6		
[Co(promp)im]	Δ	25.8	- 5.5	- 120.3	- 4.38	- 1.12
	Λ	31.3		- 105.6		

¹⁾ Δ - Λ , voir tableau 3-17, 3-18. ²⁾ à 25°C.

Les valeurs des paramètres d'activation sont aussi influencées par la variation du pH : une augmentation des valeurs de l'enthalpie d'activation ainsi que des valeurs plus positives de l'entropie d'activation accompagnent l'augmentation du pH pour les deux systèmes étudiés (Tab. 3-17, Fig. 4-6, 4-7).

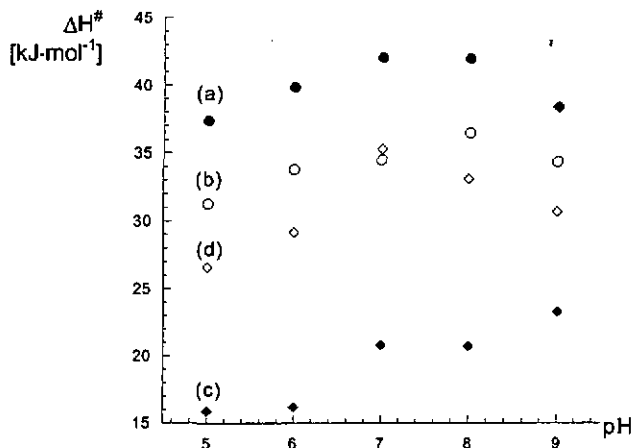


Fig. 4-6 : Evolution de l'enthalpie d'activation des réactions globales de l'azurine avec (a) Λ -[Co(alamp)H₂O], (b) Δ -[Co(alamp)H₂O], (c) Λ -[Co(promp)H₂O] et (d) Δ -[Co(promp)H₂O] en fonction du pH.

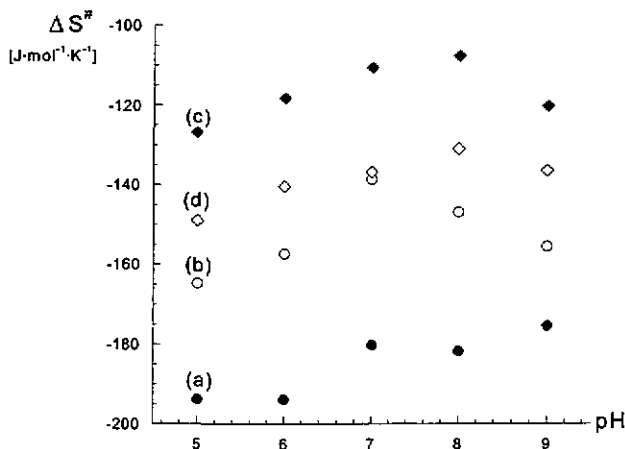


Fig. 4-7 : Evolution de l'entropie d'activation des réactions globales de l'azurine avec (a) Λ -[Co(alamp)H₂O], (b) Δ -[Co(alamp)H₂O], (c) Λ -[Co(promp)H₂O] et (d) Δ -[Co(promp)H₂O] en fonction du pH.

4.4 Stéréosélectivité basée sur les paramètres d'activation

La stéréosélectivité du transfert d'électron a été observée pour la première fois dans les réactions impliquant des composés de faible masse moléculaire [94]. La réaction était considérée sphère externe et la formation des paires d'ions et des ponts hydrogène responsable de la stéréosélectivité observée. Depuis des réactions stéréosélectives sphère interne ont aussi été décrites [87, 123] et récemment a été démontré que des simples stéréoeffets peuvent provoquer une stéréosélectivité importante [124].

La stéréosélectivité a été déterminée en fonction de la température et en fonction des relations isocinétiques $\Delta H^\ddagger / \Delta S^\ddagger$ entre des couples diastéroisomères [96]. Les différences observées pour les paramètres d'activation, généralement faibles, atteignent parfois des valeurs importantes. Pour la plastocyanine a été remarqué que les grandes différences calculées entre les paramètres d'activation des couples énantiomériques sont dues, au moins en partie, à la sélection des différents sites réactionnels [32].

Les paramètres d'activation individuels (sphère interne et sphère externe), calculés à partir des constantes de vitesse sphère interne et sphère externe, montrent des divergences parfois importantes en fonction du pH. Dans tous les systèmes étudiés, la réaction de sphère interne présente une enthalpie d'activation supérieure à la réaction globale qui, à son tour, est supérieure à celle de la réaction sphère externe (Fig. 4-8 à 4-15). La même tendance se confirme pour les

valeurs des entropies d'activation, la valeur la plus positive appartenant à la réaction sphère interne et la valeur minimale à la réaction sphère externe.

Pour les réactions sphère interne, la valeur de l'enthalpie d'activation ΔH^\ddagger augmente et celle de l'entropie d'activation ΔS^\ddagger diminue par rapport aux valeurs des réactions globales (voir Fig. 4-8 à 4-1), un résultat surprenant puisqu'on pouvait s'attendre à une stabilisation de l'état de transition par la coordination d'une molécule d'imidazole au complexe de Co(II).

En assumant que la stabilité de la liaison à un imidazole libre ou lié n'est pas très différente de l'azurine, on peut conclure que dans les conditions de réaction, pas plus de 10% des formes déprotonées de la protéine sont liées au complexe de Co^{2+} dans l'état précurseur de l'équilibre.

L'enthalpie d'activation des réactions sphère interne diminue avec l'augmentation du pH, pour tous les systèmes étudiés, ce qui peut être expliqué par la diminution des besoins énergétiques du système à cause de la déprotonation de l'imidazole à des valeurs supérieures à $\text{pH} = 7$.

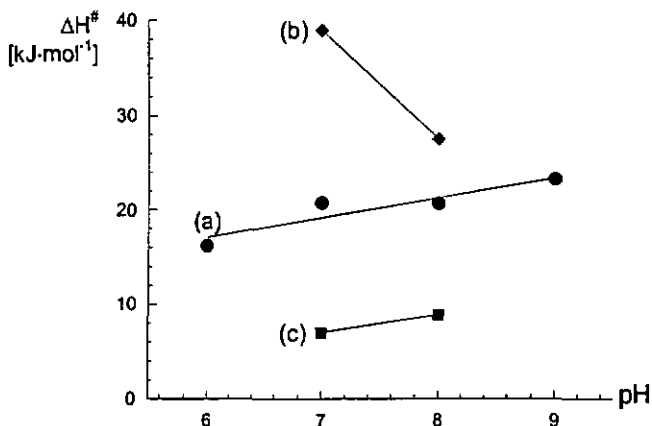


Fig. 4-8 : Influence du pH sur l'enthalpie d'activation de la réaction azurine avec $\Lambda\text{-[Co(alamp)H}_2\text{O]}$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

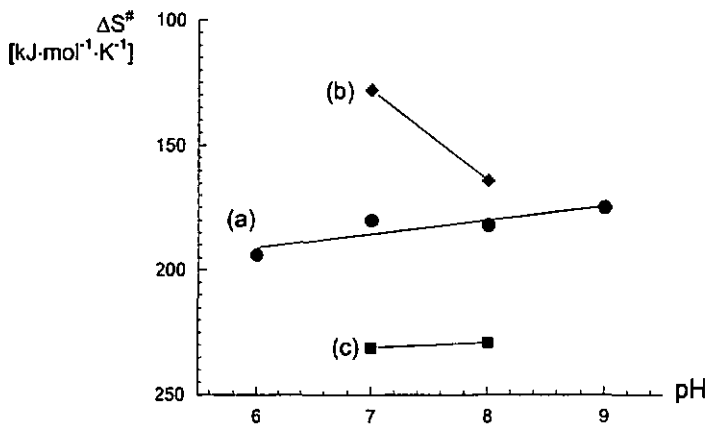


Fig. 4-9 : Influence du pH sur l'entropie d'activation de la réaction azurine avec $\Lambda\text{-[Co(alamp)H}_2\text{O]}$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

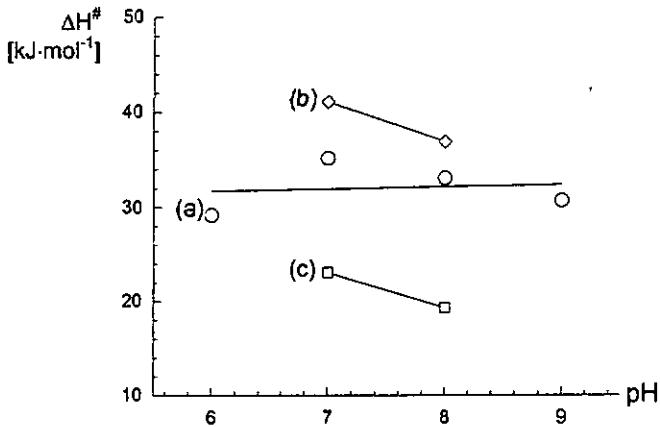


Fig. 4-10 : Influence du pH sur l'enthalpie d'activation de la réaction azurine avec $\Delta\text{-[Co(alamp)H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

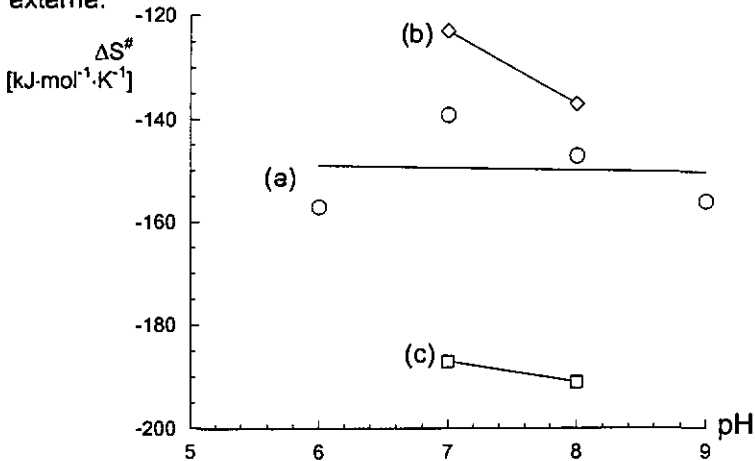


Fig. 4-11 : Influence du pH sur l'entropie d'activation de la réaction azurine avec $\Delta\text{-[Co(alamp)H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

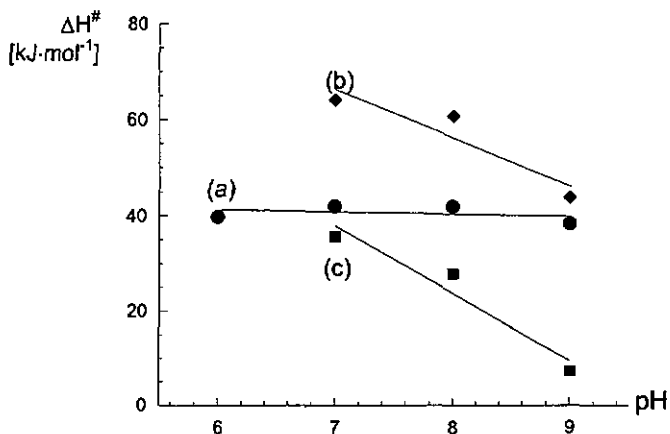


Fig. 4-12 : Influence du pH sur l'enthalpie d'activation de la réaction azurine avec $\Lambda\text{-[Co(promp)H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

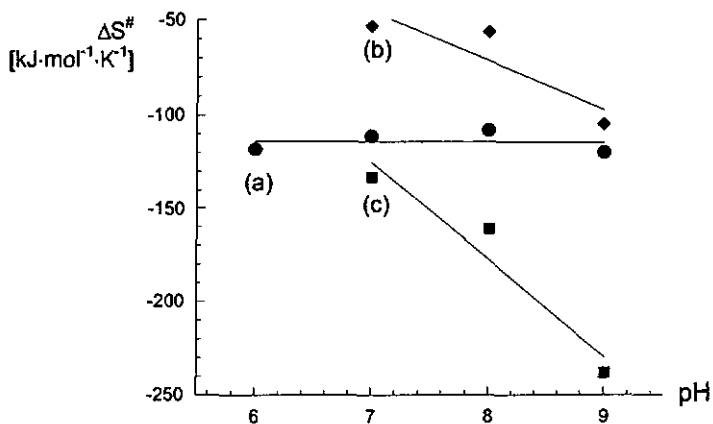


Fig. 4-13 : Influence du pH sur l'entropie d'activation de la réaction azurine avec $\Lambda\text{-[Co(promp)H}_2\text{O}]$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

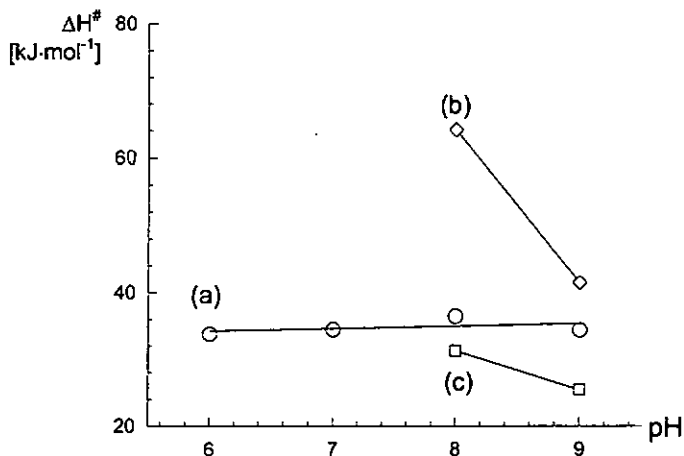


Fig. 4-14 : Influence du pH sur l'enthalpie d'activation de la réaction azurine avec $\Delta\text{-[Co(promp)H}_2\text{O]}$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

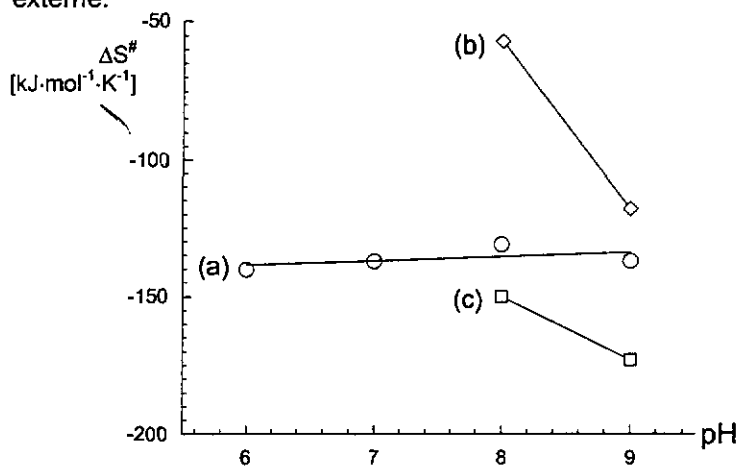


Fig. 4-15 : Influence du pH sur l'entropie d'activation de la réaction azurine avec $\Delta\text{-[Co(promp)H}_2\text{O]}$ en fonction du mécanisme de réaction : (a) réaction globale, (b) réaction sphère interne, (c) réaction sphère externe.

Les différences entre les paramètres d'activation appartenant à un couple d'énantiomères sont présentées dans les tableaux 3-24 et 3-27.

Les valeurs sont obtenues par la variation d'une différence (réaction totale – réaction sphère interne) d'une autre différence ($\Delta-\Delta$). Elles sont donc très peu précises et peuvent tout au plus indiquer une tendance.

Pour [Co(alamp)], le taux de fixation varie de 0 à plus de 80%. Les valeurs de $\Delta\Delta H^\ddagger$ et $T\Delta\Delta S^\ddagger$ conservent le même signe (+) indiquant que la sélectivité basée sur les paramètres d'activation a le même signe pour les deux mécanismes. Ceci est confirmé par le calcul des paramètres individuels d'activation.

Le cas du [Co(promp)] est plus difficile à interpréter mais on peut quand même dire que la stéréosélectivité basée sur les paramètres d'activation soit de même signe (-).

L'information la plus spectaculaire qui peut être retirée de ces valeurs est que l'enthalpie d'activation de la réaction sphère interne est environ deux fois plus grande que celle de la réaction sphère externe. Ces différences sont compensées par les valeurs plus négatives de l'entropie d'activation en faveur de la réaction sphère interne. On s'attendrait à la situation inverse, vu la contribution négative de l'enthalpie dans la formation du complexe intermédiaire. Des explications possibles pour ces observations seraient soit un apport d'énergie supplémentaire nécessaire pour déprotoner l'azote N-H de l'imidazole avant la formation de l'état de transition, soit une grande exigence stéréochimique de la réaction sphère interne. Des différences de solvation des états de

transition individuels doivent aussi être pris en considération. Les trois critères doivent être considérés lors d'une approche supposée plus intime des réactifs à la surface de la protéine par une réaction sphère interne.

En comparant les valeurs des paramètres d'activation individuels, on observe que les réactions de type sphère externe sont favorisées du point de vue de l'enthalpie d'activation, alors que les réactions de type sphère externe sont favorisées du point de vue de l'entropie d'activation.

4.5 Cinétique et mécanismes de réaction SI et SE

Dans le système $PcCu^{II} / [Co^{II}(alamp)H_2O]$ on a récemment observé [97, 107] qu'après le transfert d'électron, le complexe $\Lambda-[Co^{III}alamp]$ reste fixé à la surface de protéine réduite dans une proportion variant de 0 à 100%. En fonction de l'énantiomère utilisé on distingue donc deux mécanismes réactionnels: pour l'énantiomère Λ un mécanisme de type sphère interne est proposé, la réaction conduisant à un seul produit de fixation, $\Lambda-[Co^{III}(alamp)imidazole]_{PcCu}$.

Quand l'énantiomère $\Delta-[Co^{II}(alamp)H_2O]$ a été utilisé, le mécanisme de la réaction de transfert d'électron est un mélange de sphère interne et externe. Bernauer et Verardo proposent la formation d'un intermédiaire dans lequel les deux centres métalliques sont liés par un imidazole chargé négativement, His87 [97]. Par contre quand un ligand volumineux ($L = promp$) est coordonné au cobalt, les réactions de la plastocyanine adoptent un mécanisme de type sphère externe.

Quand l'azurine a été utilisée à la place de la plastocyanine, des changements majeurs ont été observés dans la sélection du mécanisme de réaction.

Pour tous les complexes de type $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{H}_2\text{O}]$ utilisés, les produits de la réaction de transfert d'électron ont été, dans différentes proportions, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{H}_2\text{O}]$ et $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{imidazole}]$, en fonction de la température et du pH. Ce qui veut dire que dans tous les systèmes de réaction avec l'azurine, une co-occurrence des deux types de mécanismes (sphère externe et sphère interne) a été mise en évidence. Tel était le cas seulement pour l'énantiomère Δ - $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{alamp})\text{H}_2\text{O}]$ dans la réaction avec la plastocyanine.

Dans le cas de la plastocyanine et de l'azurine, le transfert d'électron déroulé par un mécanisme de type sphère interne augmente avec le pH, donc les variations dans la sélection du chemin réactionnel dues aux changements du pH peuvent être expliquées comme une influence de l'équilibre de formation du complexe précurseur.

Dans tous les réactions impliquant l'azurine, le taux de fixation des complexes de cobalt(III) conséquent au transfert d'électron augmente autant avec la température qu'avec le pH (Fig. 4-16 à Fig. 4-19). Ce comportement, similaire à celui décrit pour la superoxyde dismutase [120], suggère que la déprotonation de l'imidazole appartenant à l'histidine doit se produire avant la formation du complexe précurseur pour que l'utilisation d'un chemin réactionnel sphère interne soit possible.

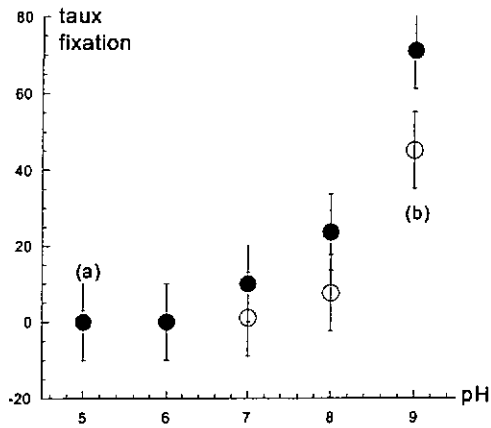


Fig. 4-16 : Variation du taux de fixation dans les réactions de l'azurine avec (a) Λ -[Co(promp)] et (b) Δ -[Co(promp)] à 15 °C.

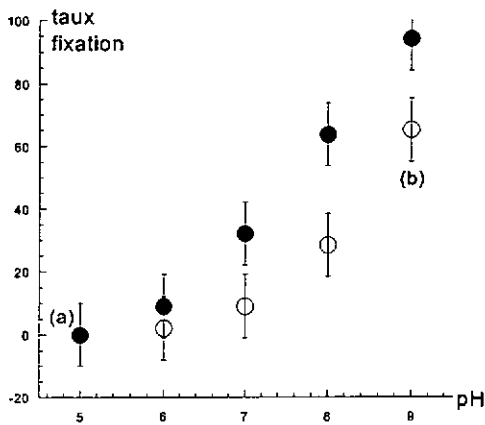


Fig. 4-17 : Variation du taux de fixation dans les réactions de l'azurine avec a) Λ -[Co(promp)], b) Δ -[Co(promp)] à 55 °C.

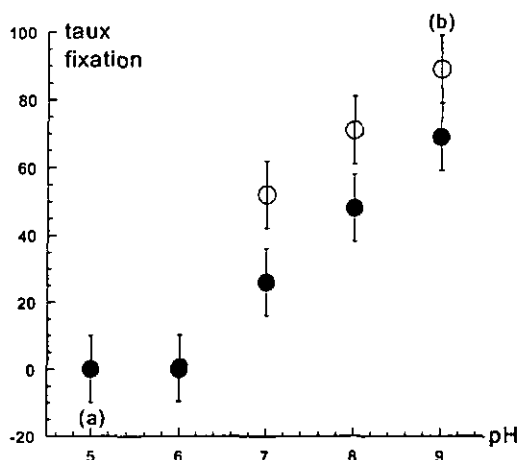


Fig. 4-18 : Variation du taux de fixation dans les réactions de l'azurine avec (a) Λ -[Co(alamp)] et (b) Δ -[Co(alamp)] à 15 °C.

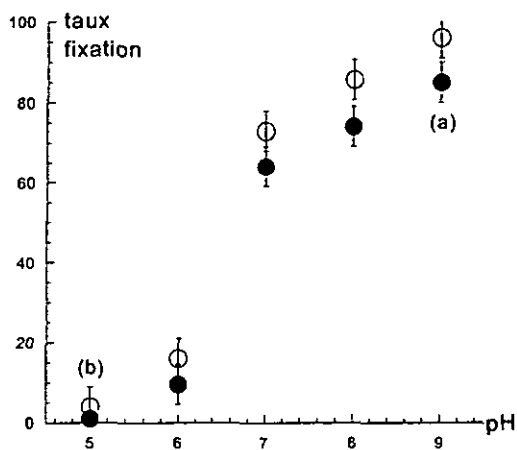


Fig. 4-19 : Variation du taux de fixation dans les réactions de l'azurine avec (a) Λ -[Co(alamp)] et (b) Δ -[Co(alamp)] à 55 °C.

Dans le système azurine – [Co(promp)], la réaction suit un chemin presque exclusivement sphère externe à bas pH. En augmentant le pH, le chemin devient presque exclusivement sphère interne. Le taux de fixation augmente presque proportionnellement avec la déprotonation du groupement imidazole, suggérant que la réaction de type sphère externe parallèle est indépendante du pH.

Dans le système azurine – [Co(alamp)], la réaction suit un chemin partiellement sphère interne et partiellement sphère externe pour toutes les valeurs du pH. Dans ce cas, le taux de fixation augmente presque linéairement avec l'augmentation du pH.

4.6 Sélection du site

Puisque la constante de vitesse globale est en effet la somme des constantes de vitesse de sphère interne et sphère externe, une évaluation de la sélectivité en fonction du pH et à une température donnée ($\Delta\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln(k_{SI}/k_{SE})$) a été effectuée. Si la valeur de ce rapport est positive, le site correspondant à la réaction sphère externe est favorisé ; par contre si la valeur de ce rapport est négative, le site utilisé pour la réaction sphère interne est sélectionné de préférence.

La sélectivité $\Delta\Delta G^\ddagger$ varie différemment avec le pH pour les deux systèmes étudiés : dans le système [Co(alamp)] – azurine, la stéréosélectivité est favorable à l'énantiomère Λ et la valeur du rapport entre les constantes de vitesse diminue avec l'augmentation du pH (Fig. 4-20).

On observe que la différence entre les deux énantiomères du complexe [Co(alamp)] à une valeur minimale à pH = 7, l'augmentation du pH vers des valeurs plus hautes entraînant une augmentation de la sélectivité du site en faveur des réactions sphère interne pour les deux énantiomères.

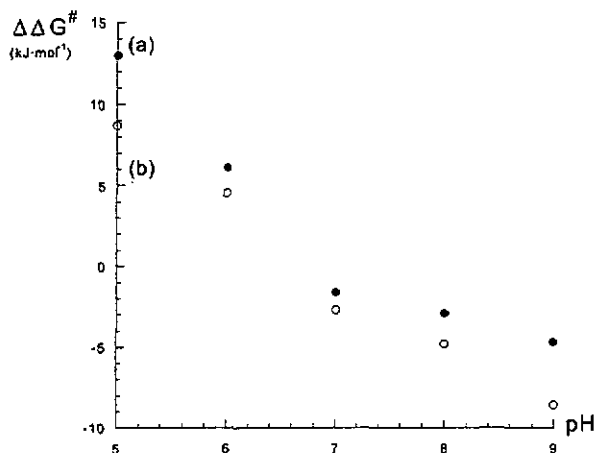


Fig. 4-20 : Variation de la sélectivité du site avec le pH dans le système azurine - [Co(alamp)], $\Delta\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln(k_{SI}/k_{SE})$, à 55°C, (a) Λ -[Co(alamp)], (b) Δ -[Co(alamp)].

Dans le système azurine - [Co(promp)] par contre (Fig. 4-21), la sélectivité est favorable à l'énantiomère Δ et la diminution du rapport k_{SI}/k_{SE} est presque inversement proportionnelle à l'augmentation du pH.

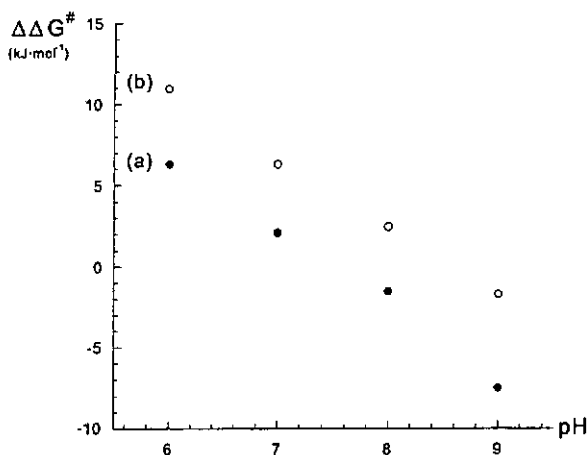


Fig. 4-21 : Variation de la sélectivité avec le pH dans le système azurine - [Co(promp)], $\Delta\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln(k_{SI}/k_{SE})$. (a) Δ -[Co(promp)],
(b) Δ -[Co(promp)].

La sélectivité observée dans les deux systèmes azurine - [Co(promp)] ou [Co(alamp)] est due, dans des proportions variables, aux deux types de réactions. Dans la réaction sphère externe avec les deux énantiomères du complexe [Co(promp)], on observe aussi une inversion de la stéréosélectivité à $\text{pH} > 7$, ce qui laisse supposer deux sites possibles de réaction, en fonction du pH, pour ce complexe, contrairement au complexe [Co(alamp)].

Une estimation qualitative de la sélectivité des réactions sphère interne a été faite par modélisation. Dans le cas de la plastocyanine, le centre commun de réaction His87 est accessible pour le complexe [Co(alamp)] mais pas pour [Co(promp)], d'où l'absence d'une réaction de type sphère

inteme à cause de la grande demande stérique. L'arrangement énergétiquement le plus favorable est atteint par Λ -[Co(S,S)-alamp] qui peut former 1 voir même 2 ponts hydrogène avec la protéine. Une telle stabilisation ne se produit pas pour l'énantiomère Δ (Fig. 3-49). Plusieurs distorsions ont été remarqués sur le cycle imidazole coordonné sur le fragment [Co(promp)] quand c'est celui-ci qui a été utilisé pour les calculs de fixation. Ces distorsions n'ont pas pu être enlevés même en appliquant des fortes contraintes géométriques aux alentours du cobalt, ce qui indique des stéréoeffets prohibitifs dus à la présence des fragments Λ -[Co(promp)] ou Δ -[Co(promp)] à l'égard de la possibilité de formation des liaisons covalentes entre l'ion de cobalt et N_{HIS87}. Ceci peut expliquer un état de transition instable pour le système [Co(promp)] / PcCu^{II} et comme résultat une réaction de type sphère inteme très lente (si observée) pour ce couple. Ces stéréoeffets peuvent étre une raison importante pour l'exclusion du mécanisme de type sphère inteme pour le système [Co(promp)] / PcCu^{II}.

Pour le système [Co(promp)] – azurine (Fig. 3-47), la réaction de type sphère inteme, qui se déroule à un site autour de His83, doit être favorisée par des stéréoeffets. Dans les deux cas, la modélisation reproduit la préférence correcte pour l'un ou l'autre des réactifs énantiomériques.

4.7 Conclusions

Les études de reconnaissance moléculaire entre des petites molécules et des métalloprotéines sont très importantes dans la compréhension des processus biologiques. Les protéines de cuivre bleu azurine et plastocyanine jouent un rôle important dans le transfert d'électron dans les systèmes biologiques [126, 127].

Malgré le grand nombre d'études menées avec des partenaires redox naturels et artificiels pour identifier les chemins réactionnels et les points d'attaque, on ne connaît pas la nature exacte des groupements responsables du transfert d'électrons à la surface de la protéine. La question reste en suspens si c'est une attaque dans un seul point spécifique ou si les électrons peuvent entrer et sortir sur des surfaces plus étendues des protéines.

Dans les réactions de l'azurine et de la plastocyanine, on a pu distinguer deux chemins de réaction : sphère interne et sphère externe.

Le chemin sphère interne est mis en évidence par la fixation du complexe à la surface de la protéine, après le transfert d'électron. Par la réaction de type sphère interne, le site exact de fixation est identifié comme étant His83 pour l'azurine et His87 pour la plastocyanine. En corrélation avec les résultats obtenus, la fixation du complexe inerte de cobalt(III) après le transfert d'électron est seulement partielle dans la plupart des cas, ce qui nous conduit à penser que les réactions découlent partiellement par un mécanisme de type sphère externe, dont le site réactionnel ne peut pas être mis en évidence. Les paramètres

d'activation individuels, pour les deux chemins de réaction empruntés, ont été calculés en fonction du pH. La sélection du chemin de réaction est dépendante pas seulement de conditions de réaction et de la nature des réactifs, mais aussi de leur chiralité.

La modélisation moléculaire suggère que l'énantiosélectivité des réactions de type sphère externe est probablement due aux ponts hydrogène formés à l'état de transition ainsi qu'aux stéréoeffets. Ces stéréoeffets doivent être pris en considération aussi dans la sélection de deux ou plusieurs sites de fixation par un mécanisme sphère externe.

La sélection du chemin et du mécanisme de transfert d'électron est déterminée d'un part par la nature chimique et la chiralité du réactif et d'un autre part de sa capacité à former des ponts hydrogène ou à imposer des stéréoeffets.

On peut donc conclure que les réactifs de petite masse moléculaire optiquement actifs peuvent réagir à différents sites d'une aire proche de la surface de la protéine et qu'on peut induire une sélection considérable des sites de la réaction en utilisant des réactifs énantiomériques. Pour observer le comportement des métalloprotéines (et pas seulement) en détail, l'utilisation des méthodes spectroscopiques tel que le dichroïsme circulaire semble un choix judicieux et une méthode d'analyse raffinée et efficace.

5 Résumé

Les réactions de transfert d'électron entre deux protéines de cuivre bleu, azurine (AzCu^{II}) ou plastocyanine (PcCu^{II}) et les complexes de type Δ - ou Λ - $[\text{M}(\text{L})\text{X}]$ ont été étudiés.

Ce travail comprend deux parties principales. Dans la première partie, des études cinétiques du transfert d'électron stéréosélectif entre des protéines de cuivre bleu, l'azurine et la plastocyanine, et des complexes optiquement actifs de fer(II) et de cobalt(II) ont été effectuées. Dans la deuxième partie, l'identification des chemins et de sites réactionnels a été envisagée à travers des mesures de fixation du site métallique à la surface de la protéine et traduite qualitativement par modélisation.

Une stéréosélectivité cinétique a été observée dans toutes les réactions de l'azurine et de la plastocyanine étudiés, qui rejoignent les résultats antérieurs obtenus avec la plastocyanine [107, 97] ou de la ferredoxine [96] avec les énantiomères des complexes de type $[\text{Co}(\text{L})\text{X}]$.

Les complexes énantiomériques Δ - $[\text{M}((\text{R},\text{R})\text{-L})\text{X}]$ et Λ - $[\text{M}((\text{S},\text{S})\text{-L})\text{X}]$ [125] sont formés entre des ions métalliques transitionnels ($\text{M} = \text{Co}^{2+}$, Fe^{2+}) (Fig. 1-6) et les ligands pentadentés *alamp* et *promp* (Fig. 1-4) où ((R,R)- ou (S,S)-*alamp* = N,N'-[pyridine-2,6-diyl]bis(méthylène)]bis[(R)- ou (S)-alanine] et (R,R)- ou (S,S)-*promp* = N,N'-[pyridine-2,6-diyl]bis(méthylène)]bis[(R)- ou (S)-proline]. La sixième position de

coordination de l'ion métallique a été variée par le choix du tampon utilisé. Le ligand alamp a été choisi à cause sa facilité à former des ponts hydrogène et promp pour la faible accessibilité qu'il confère au centre métallique.

Les réactifs utilisés dans ce travail sont électriquement neutres, ce qui fait que les changements de la charge globale de la protéine par la protonation de ses groupements qui se trouvent en contact avec le solvant sont minimes.

La variation des ligands nous a permis d'étudier les interactions stéréochimiques qui gouvernent la sélection des chemins réactionnels. Des différences ont été mises en évidence pas seulement en variant le centre métallique, le ligand pentadenté ou la chiralité de ce dernier mais aussi suite à l'influence du ligand monodenté fixé à la sixième position de coordination, à savoir une molécule d'imidazole. Comme c'était le cas pour la plastocyanine, l'imidazole a provoqué une catalyse du transfert d'électron, mais d'une ampleur d'environ trois fois inférieure comparée avec la plastocyanine. L'hypothèse d'un site spécifique de réaction par recouvrement de deux cycles imidazole a été proposée. Suite à la détermination des constantes de vitesse, les paramètres d'activation ont été calculés, ce qui a permis la comparaison des valeurs de la stéréosélectivité.

La variation des conditions de réaction (pH, température) donne des informations sur l'influence des modifications apportées à la surface de la protéine et à son milieu environnant. Les constantes de vitesse ainsi

que les paramètres d'activation individuels ont été très sensibles à l'influence du pH, de différences marquantes étant observées autant dans l'énantiosélection que dans la sélection des sites et de chemins réactionnels. Le cas le plus intéressant est celui de [Co(promp)], lequel passe d'un mécanisme presque complètement sphère externe à bas pH vers un mécanisme presque complètement sphère interne à des hauts pH. Pas seulement le mécanisme de sa réaction bascule, mais aussi la stéréosélectivité de sa réaction sphère externe, qui change de signe à un pH avoisinant $\text{pH} = 7$.

Dans le cas de la réaction sphère interne, la sélection du mécanisme de réaction est attribuée à la stabilité de l'état de transition proposé qui à son tour est influencé par la formation des ponts hydrogène et des stéréoeffets.

Les mesures faites montrent un phénomène compensatoire dans les variations de l'enthalpie et de l'entropie d'activation - l'énantiomère qui possède le plus faible ΔH^\ddagger possède également l'entropie d'activation ΔS^\ddagger la plus négative; par conséquent, la stéréosélectivité observée est fortement fonction de la température. Les réactions de type sphère externe sont favorisées du point de vue de l'enthalpie d'activation, les réactions de type sphère interne par l'entropie d'activation.

En corrélation avec les résultats obtenus, la fixation du complexe inerte de cobalt(III) après transfert d'électron est seulement partielle dans la plupart des cas étudiés. Les sites proposés pour les réactions de type sphère interne étant His87 pour PcCu^{II} et His83 au lieu de His117 pour

AzCu^{II}, ce qui nous conduit à affirmer que les réactions découlent partiellement par un mécanisme de type sphère externe.

La conclusion qui s'impose est que le transfert d'électron impliquant des réactifs chiraux peut se produire à au moins deux sites différents avec un même réactif, chacune de ces réactions montrant une enantiosélectivité différente.

Un premier site de réaction est proposé pour le complexe mixte avec l'imidazole, formé par recouvrement des deux cycles imidazole, l'un appartenant au complexe mixte et l'autre à la chaîne polypeptidique de la protéine. Un deuxième site proposé est celui utilisé par la réaction de type sphère interne, par formation d'un pont à l'état de transition. Un troisième site doit être utilisé pour les réactions sphère externe, mais on ne connaît pas sa localisation exacte.

Summary

The electron-transfer reactions between two blue copper proteins, azurin (AzCu^{II}) and plastocyanin (PcCu^{II}) and complexes of the type Δ - ou Λ - $[\text{M}(\text{L})\text{X}]$ were studied.

This work is composed of two main parts. In the first, kinetic studies of the stereoselective electron-transfer between the blue copper proteins, azurin and plastocyanin, and optically active iron(II) or cobalt(II) complexes were performed. The second part involves the identification of the reaction pathway(s) and of the reaction site(s), and was realised by fixation measurements of the metallic site at the protein surface. The results of the fixation measurements were qualitatively illustrated by molecular modelling.

A kinetic stereoselectivity was observed in all of the reactions studied, in accordance with the results obtained previously with plastocyanin [97, 107] and ferredoxin [96], in reactions with the same optically active synthetic partners.

The enantiomeric complexes Δ - $[\text{M}((\text{R},\text{R})\text{-L})\text{X}]$ et Λ - $[\text{M}((\text{S},\text{S})\text{-L})\text{X}]$ [125] were formed between transition metal ions ($\text{M} = \text{Co}^{2+}$, Fe^{2+}) (Fig. 1-6) and the pentadentate ligands *alamp* and *promp* (Fig. 1-4) ; the sixth coordination position of the metal ion being varied by the choice of the appropriate buffer.

The reagents used in this work are electronically neutral, allowing minimal changes of the overall charge at the protein surface through the protonation of the solvent exposed residues.

The choice of the pentadentate ligand was made as a function of its chemical and sterical properties: alamp was chosen because of its hydrogen bonding capabilities, and promp because of the weak accessibility that it confers to the metal center.

The pentadentate ligand variation allowed us to study the stereochemical interactions that govern the reaction pathway selection. Differences were revealed not only after the variation of the metal center and of the pentadentate ligand, but also after the variation of the sixth coordination position, namely using an imidazole molecule. As for plastocyanin, the presence of imidazole at the sixth coordination site catalysed the electron-transfer reaction. However, this catalysis was three time less important in the case of azurin. A specific reaction site formed by the overlap of two imidazole cycles was proposed.

Following the rate constant determinations, the activation parameters were calculated. Their values allowed the comparison of the overall stereoselectivity.

The reaction conditions (pH, temperature) provided information on the influence of the various modifications of the protein surface as well as on its environment.

The kinetic rate constants and the calculated activation parameters were very sensitive to the pH used; important differences were observed in the enantiomeric selection as well as in the site and pathway selection for all of the electron-transfer reactions performed.

The most interesting case is [Co(promp)], which switches from an almost complete outer sphere mechanism at low pH to an almost complete inner sphere mechanism at high pH. Not only does the reaction mechanism change, but also the sign of the stereoselectivity of the outer sphere reaction, at a pH value of approximately 7. The inner sphere mechanism selection is attributed to the stability of the proposed transition state, which in turn is influenced by the hydrogen bonding formation and by stereoeffects.

The measurements performed showed a compensatory phenomenon of the activation enthalpy and activation entropy variation: the enantiomer which possesses the smaller ΔH^\ddagger value has also the most negative ΔS^\ddagger value; the observed stereoselectivity is then strongly influenced by the temperature. In all the cases, the outer sphere reactions are ΔH^\ddagger favoured and the inner sphere reactions are ΔS^\ddagger favoured.

In correlation with the obtained results, the inert cobalt(III) complex fixation after the electron-transfer reaction is only partial, in most of the cases studied. The proposed sites for the inner sphere reaction are His87 for PcCu^{II} and His83 (instead of His117) for AzCu^{II}, which allows us to affirm that the reaction partially occurs by an outer sphere mechanism.

The overall conclusion is that the electron-transfer reactions involving chiral reagents can occur at, at least two different sites with the same chemical synthetic partner, each of these reactions showing a different enantioselectivity.

A first reaction site is proposed for the reaction with the imidazole complex. This site is formed by the overlap of two imidazole cycles, one of which belongs to the imidazole complex and the other to the polypeptide chain of the protein.

A second proposed site is the one used for the inner sphere reaction through the formation of a bridge in the transition state.

A third site must be available for the outer sphere reaction, but its exact location cannot be specified.

6 Bibliographie

- [1] B. Vennesland. In *"Topics in Current Chemistry"*, Springer Verlag, Berlin, 48:39, (1974)
- [2] J.-J. Sauvain. *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, (1990)
- [3] K. Bernauer, J.-J. Sauvain. *Chem. Soc., Chem. Commun.* 353, (1988)
- [4] L. Verardo. *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, (1996)
- [5] C. Nusbaumer. *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, (1996)
- [6] F. Basolo. In : *"Mechanisms of inorganic reactions (A study of metal complexes in solution)"*, Wiley:New York, (1958)
- [7] D.A. Buckingham, C.R. Clark. *Inorg. Chem.* 33:6171, (1994)
- [8] M.R. Grace, T.W. Swaddle. *Inorg. Chem.* 32:5597, (1993)
- [9] H. Espenson, W. Wang, A. Bakac. *Inorg. Chem.* 34:4049, (1995)
- [10] H. Taube. In: *"Electron Transfer Reactions of Complex Ions in Solutions"*, Academic Press, New York, (1970)
- [11] A.J. Thiam. *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, (1996)
- [12] H.J. Hilgers. *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, (1995)
- [13] a) R.A. Marcus. *Disc. Faraday Soc.* 29:21, (1960); b) R.A. Marcus. *Disc. Faraday Soc.* 74:7, (1982)
- [14] R.A. Marcus. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 15:155, (1964)

- [15] P. Bertrand. *Application of Electron Transfer Theories to Biological Systems*. Springer-Verlag : Berlin Heidelberg, p. 3, (1991)
- [16] S.K. Chapman, A.R. Mount. *Natural Products Reports* : 93, (1995)
- [17] R.A. Marcus. *J. Chem. Phys.* 43:679, (1965)
- [18] C.C. Moser, J.M. Keske, K. Wamcke, R.S. Farid, P.L. Dutton. *Nature* 355:796, (1992)
- [19] C.C. Moser, P.L. Dutton. *Biochimica & Biophysica Acta* 171:1101, (1992)
- [20] J.J.R.F. da Silva, R.J.P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford:Clarendon Press, (1994)
- [21] R.A. Marcus, N. Sutin. *Biochimica & Biophysica Acta* 811:265, (1985)
- [22] A.G. Lappin and R.A. Marusak. *Coordination Chem. Rev.* 109:125, (1991)
- [23] D N. Beratan, J.N. Onuchic, J.N. Betts, B.E. Bowler, H.B. Gray. *J.A.C.S.* 112:7915, (1990)
- [24] K. Bernauer, P. Pousaz, A. Jeanguenat, J. Porret. *Helv. Chim. Acta* 71:1339, (1988)
- [25] H. Stoeckli-Evans, L. Brehm, P. Pousaz, K. Bernauer, H.B. Bürgi. *Helv. Chim. Acta* 68, (1985)
- [26] E.T. Adman. In: *Metal Proteins with Redox Reactions*, P. M. Harrison, Weinheim:Verlag Chemie GmbH, 1, (1985)
- [27] J.M. Guss, H.C. Freeman. *J. Mol. Biol.* 169:521, (1983)

-
- [28] D.E. Fenton. In: *Biocoordination Chemistry*, J. Evans, Oxford:Oxford University Press, 31, (1995)
- [29] A.G. Sykes. *Plastocyanin and the Blue Copper Proteins*, Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, p. 177,(1991)
- [30] B.G. Karlsson, M. Nordling, T. Pascher, L.-C. Tsai, L. Sjölin, L.G. Lundberg. *Prot. Eng.* 4:343, (1991)
- [31] M. Brezeanu, P. Spacu. In: *Chimia Combinatiilor Complexe*, A. Gheorghiu, Cluj-Napoca:Ed. Didactica si Pedagogica, p. 51, (1975)
- [32] P.M. Colman, H.C. Freeman, J.M. Guss, M. Murata, V.A. Norris, J.A.M. Ramshaw. *Nature* 272:319, (1978)
- [33] J.M. Guss, H.D. Bartunik, H.C. Freeman. *Acta Cryst.* B48 790:807, (1992)
- [34] J.M. Guss, P.R. Harrowell, M. Murata, V.A. Norris, H.C. Freeman. *J. Mol. Biol.* 192 (361):387, (1986)
- [35] T. Horio. *J. Biochem.* 45:195, (1958)
- [36] I.W. Sutherland, J.F. Wilkinson. *J. Gen. Microbiol.* 30:105, (1963)
- [37] T. Horio, T. Higashi, H. Matsubara, K. Kusai, M. Nakai, K. Okonuki. *Biochim. et Biophys. Acta* 29:279, (1958)
- [38] F.C. Boogerd, H.W. van Verseveld, A.H. Stouthamer. *Biochim. et Biophys. Acta* 723:415, (1983)
- [39] D. Zannoni. *Biochim. et Biophys. Acta* 975:299, (1989)
- [40] R.P. Ambler. *Biochem. J.* 89:349, (1963)
- [41] P.M. Wood. *FEBS Letters* 92:214, (1978)
- [42] O. Farver, I. Pecht. *Boca Raton*:CRC Press, 214, (1984)

- [43] M.G. Tordi, M.C. Silvestrini, A. Colosimo, L. Tuttobello, M. Brunori. *Biochem. J.* 230:797-805, (1985)
- [44] B.G. Karlsson, T. Pascher, M. Nordling, R.H.A. Arvidsson, L.G. Lundberg. *FEBS Letters* 246:211, (1990)
- [45] D.E. Metzler. *The Chemical Reactions of Living Cells*, New York:Acad. Press, 2, (1977)
- [46] H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G.W. Canters. *J. Mol. Biol.* 221:765, (1991)
- [47] E.T. Adman, L.H. Jensen. *Israel J. of Chem.* 21:8, (1981)
- [48] G.E. Norris, B.F. Anderson, E.N. Baker. *J.A.C.S.* 108:2784, (1986)
- [49] E.N. Baker. *J. Mol. Biol.* 203:1071, (1988)
- [50] U. Ryde, M.H.M. Olsson, K. Piertoote, B.O. Roos. *J. Mol. Biol.* 261:586, (1996)
- [51] A.A. Gewirth, E.I. Solomon. *J.A.C.S.* 110:3811, (1988)
- [52] K. Piertoote, J.O.A. de Kerpel, U. Ryde, B.O. Roos. *J.A.C.S.* 119:218, (1997)
- [53] M.H.M. Olsson, U. Ryde, B.O. Roos. *Protein Science* 7:2659, (1998)
- [54] J.A. Guckert, M.D. Lowery, E.I. Solomon. *J.A.C.S.* 117:2817, (1995)
- [55] B.G. Malmström, J. Leckner. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:286, (1998)
- [56] A.G. Sykes. *Adv. Inorg. Chem.* 36:377, (1991)
- [57] B.G. Malmström, T. Vännngard. *J. Mol. Biol.* 2:118, (1960)

-
- [58] M.H.M. Olsson, U. Ryde. *JBIC* 4:654, (1999)
- [59] M. van der Kamp, M.C. Silvestrini, M. Brunori, J. Van Beeumen. *Eur. J. Biochem.* 194:109, (1990)
- [60] T. Pascher, J. Bergström, B.G. Malmström, T. Vänngård, L.G. Lundberg. *FEBS Letters* 258 (2):266, (1989)
- [61] H.B. Gray, E. I. Solomon. In: "Copper proteins", New York: J. Wiley, J., (1981)
- [62] O. Farver, I. Pecht, in: "Copper Proteins", New York: J. Wiley, (1981)
- [63] D. Cummins, H.B. Gray, *J.A.C.S.* 99:5158, (1977)
- [64] R.A. Holwerda, D.B. Knaff, H.B. Gray, J.D. Clemmer, R. Crowley, J.M. Smith, A.G. Mauk. *J.A.C.S.* 102:1142, (1980)
- [65] M.C. Silvestrini, M. Brunori, M.T. Wilson, V.M. Usmar, *Biochem. J.* 14:327, (1981)
- [66] I. Pecht, P. Rosen, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 50:853, (1973)
- [67] M.T. Wilson, C. Greenwood, M. Brunori, E. Antonini, *Biochem. J.* 145:449, (1975)
- [68] P. Rosen, I. Pecht, *Biochemistry* 15:775, (1976)
- [69] A.G. Lappin, M.G. Segal, D.C. Weatherbum, R.A. Henderson, A.G. Sykes. *J.A.C.S.* 101 (9):2302, (1979)
- [70] M. Brunori, S.R. Greenwood, M.T. Wilson, *Biochem. J.* 151:185, (1975)
- [71] S.R. Parr, D. Barber, C. Greenwood, M. Brunori, *Biochem. J.* 167:447, (1977)

- [72] S. Kato, A. Takamiya. *Nature* 189:1665, (1961)
- [73] G. Hauska, R.E. McCarty, R.J. Berzborn, E. Racker. *J. of Biol. Chem.* 246:3524, (1971)
- [74] L.M. Briggs, V.L. Pecoraro, L. McIntosh. *Plant Molecular Biol.* 15:633, (1990)
- [75] T.P.J. Garret, D.J. Clingeleffer, J.M. Guss, S. Rogers, H.C. Freeman. *J. of Biol. Chem.* 259:2822, (1984)
- [76] C.A. Collyer, J.M. Guss, Y. Sugimura, F. Yoshizaki, H. C. Freeman. *J. Mol. Biol.* 211:617, (1990)
- [77] W.J. Chazin, P.E. Wright. *J. Mol. Biol.* 202:623, (1988)
- [78] J.M. Moore, C.A. Lepre, G.P. Gippert, W.J. Chazin, D.A. Case, P.E. Wright. *J. Mol. Biol.* 221:533-555, (1991)
- [79] P.C. Driscoll, H.A.O. Hill, C. Redfield. *Eur. J. Biochem.* 170:279, (1987)
- [80] J.M. Moore, D.A. Case, W.J. Chazin, G.P. Gippert, T.F. Havel, S.R. Powles, P.E. Wright. *Science* 240:314, (1988)
- [81] A.G. Sykes. *Chem. Soc. Rev.* 14:283, (1985)
- [82] E.I. Solomon, J.W. Hare, D.M. Dooley, J.H. Dawson, P.J. Stephens, H.B. Gray. *J.A.C.S.* 102:168, (1980)
- [83] M.D. Scawen, L.B. Anderson, E.L. Gross. *Phytochemistry* 14:1225, (1975)
- [84] S.K. Chapman, C.V. Knox, A.G. Sykes. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.:*2775, (1984)
- [85] O. Farver, I. Pecht. *Coordination Chem. Rev.* 94:17, (1989)

- [86] C.J. Grimes, E.B. Piskiewicz, E.B. Fleisher. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1408, (1974)
- [87] O. Farver, I. Pecht. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:4190, (1981)
- [88] O. Farver, I. Pecht. *Israel J. of Chem.* 21:13, (1981)
- [89] L.K. Skov, K. Olsen, U. Christensen. *Inorg. Chem.* 31:4762, (1993)
- [90] D. Beoku-Betts, S.K. Chapman, C.V. Knox, A.G. Sykes. *Inorg. Chem.* 24:1677, (1985)
- [91] M. Nordling, L.G. Lundberg. *FEBS Letters* 291 (2):327, (1991)
- [92] K. Sigfriddson, O. Hansson, B.G. Karlsson, L. Baltzer, M. Nordling, L.G. Lundberg. *Acta Bio-Energetics* 1228:28, (1995)
- [93] K. Bernauer. In: "*Electron-Transfer Reactions in Metalloproteins, In: Metal ions in Biological Systems*"; 27:265, New York, Marcel Dekker, (1991)
- [94] D. A. Geselowitz, H. Taube. *J.A.C.S.* 102:4525, (1980)
- [95] D.A. Geselowitz, A. Hammershi, H. Taube, *Inorg. Chem.* 26:1842, (1987)
- [96] K. Bernauer, M. Monziona, P. Schürmann, V. Vietta. *Helv. Chim. Acta* 73:4061, (1990)
- [97] K. Bernauer, L. Verardo. *Angew. Chem. Commun.* 35 (15):1716, (1996)
- [98] K. Bernauer, P. Jauslin, *Chimia* 47:218, (1993)
- [99] K. Bernauer, J.-J. Sauvain, P. Schürmann, V. Viette, *Helv. Chim. Acta* 73:346, (1990)
- [100] L. Verardo. *Travail de diplôme, Université de Neuchâtel*, (1992)

- [101] K. Bernauer, P. Pousaz. *Helv. Chim. Acta* 67 (3) (90):796, (1984)
- [102] M. Nordling, T. Olausson, L.G. Lundberg. *FEBS Letters* 276:98, (1990)
- [103] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)
- [104] E. Amann, B. Ochs, K-J Abei. *Gene* 69:301, (1988)
- [105] D. Hanahan. *DNA Cloning, A Practical Approach*, Oxford:IRL Press Limited, 35, (1987)
- [106] S. Megert. *Travail de diplôme*, Université de Neuchâtel, (1990)
- [107] K. Bernauer, L. Verardo. *Inorg. Chem.* submitted, (1998)
- [108] Cerius2. *Molecular Simulation Inc.* (2), San Diego:U.S.A., (1997)
- [109] *Hyperchem, Tools for Molecular Modelling*. Hypercube Inc., Ontario (Canada), (1996)
- [110] K. Bernauer, H. Stoeckli-Evans, D. Hugi-Cleary, H.J. Hilgers, A. Abd-el-Khalek, J. Porret, J.-J. Sauvain. *Helv.Chim.Acta* 75:2327, (1992)
- [111] B.A. Fields, H.H. Bartsch, H.D. Bartunik, J.M. Guss, H.C. Freeman. *Acta Cryst.* D50:709, (1994)
- [112] C. Hammann, A. Messerschmidt, R. Huber, H. Nar, G. Gilardi, G.W. Canters. *J. Mol. Biol.* 255:362, (1996)
- [113] H. Taube, H. Meyers, R.R. Rich. *J.A.C.S.* 75:4118, (1953)
- [114] Z. Fuchun, S.M. Ghizdavu, K. Bernauer. *unpublished results*

- [115] M.T. Hay, M.C. Ang, D.R. Gamelin, E.I. Solomon, W.E. Antholine, M. Ralle, N.J. Blackburn, P.D. Massey, X. Wang, A.H. Kwon, Y. Lu. *Inorg. Chem.* 37:191, (1998)
- [116] H. Taube, H. Myers, R.R. Rich. *J.A.C.S.* 75:4118, (1953)
- [117] R. Lumry, S. Rajender. *Biopolymers*, 9 :1125, (1970)
- [118] F.A. Armstrong, R.A. Henderson, A.G. Sykes. *J.A.C.S.*, 101:6912, (1979)
- [119] J.V. McArdle, C.L. Coyle, H.B. Gray, G.S. Yoneda, R.A. Holwerda. *J.A.C.S.*, 99 (8):2483, (1977)
- [120] F.A. Azab, L. Banchi, M. Bosari, C. Luchinat, M. Sola, M.S. Viezzoli. *Inorg. Chem.*, 31 :4649, (1992)
- [121] K. Bernauer, P. Schürmann, C. Nusbaumer, L. Verardo, S.M. Ghizdavu. *Pure & Appl.Chem.* 70, (4):985, (1998)
- [122] K. Bernauer, S.M. Ghizdavu, L. Verardo. *Coordination Chem. Rev.* 190-192:357, (1999).
- [123] K. Bernauer, E. Fuchs, D. Hugi-Cleary. *Inorg. Chim .Acta* 218:73, (1994)
- [124] H.J. Hilgers, K. Bernauer. *Inorg. Chim. Acta*, 275-276:9, (1998).
- [125] A. von Zelewsky. In: "Stereochemistry of coordination compounds"; Wiley: Chichester, (1996)
- [126] M.R. Redinbo, T.O.Yeates. *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 26:49, (1994)

- [127] A.J. Di Bilio, M.G. Hill, N. Bonander, B.G. Karlsson, R.M. Villahermosa, B.G. Malmström, J.R. Winkler, H.B. Gray. *J.A.C.S.* 119:9921, (1997)
- [128] C.F. Yocum. In: "*Methods in Chloroplast Molecular Biology*"; Elsevier Biomedical Press, 973:981, Amsterdam, M. Edelman, R.B. Hallick, N.-H. Chua, (1982)

Curriculum Vitae

- 1968** Naissance à Cluj-Napoca, Roumanie
- 1975 – 1987** Etudiante au Lycée des Arts (Musique), Diplôme de pianiste, Cluj-Napoca, Roumanie.
- 1987 – 1988** Technicienne au Département de Protection des Plantes, Faculté de Biologie, Université "Babes-Bolyai", Cluj-Napoca, Roumanie.
- 1988 – 1989** Technicienne à l'Institut de Chimie, Laboratoire de Chimie Inorganique, Cluj-Napoca, Roumanie.
- 1988 – 1993** Etudiante en chimie à l'Université "Babes-Bolyai", Cluj-Napoca, Roumanie. Diplôme en Chimie et Physique (Substances inorganiques polluantes du sol et des plantes de la zone Copsa-Mica).
- 1993 – 1994** Chimiste, Département d'Ecologie Université des Sciences Agricoles, Cluj-Napoca, Roumanie.
- 1994 – 1995** Assistante en Chimie et Toxicologie, Département de Toxicologie, Université des Sciences Agricoles, Cluj-Napoca, Roumanie.
- 1995 – 2000** Assistante-doctorante à l'Université de Neuchâtel, Institut de Chimie, Département de Chimie Analytique et Bioinorganique, sous la direction du professeur K. Bernauer. Equivalence du diplôme universitaire roumain.
- Dès 1999** Enseignante en chimie au Gymnase de la rue des Alpes, Bienne.
- 2000** Soutenance de la thèse de doctorat.

Liste des publications

1. Marian, I.; Iliescu, T.; Caragiu, M.; Ghizdavu, S.; Cânta, S., (1994), *Studia Univ. "Babes-Bolyai"*, Ser. *Chemia*, XXXIX, 1-2, 3-14.
2. Iliescu, T.; Marian, I.; Ghizdavu, S.; Caragiu, M., (1994), *Studia Univ. "Babes-Bolyai"*, Ser. *Chemia*, XXXIX, 1-2, 3-14.
3. Stirban, M.; Muntean, L.S.; Crapaturean, S.; Ghizdavu, S., (1994), *Bull. U.S.A.*, 448-457.
4. Ghizdavu, I.; Porca, M.; Oltean, I.; Bunesco, H.; Bodis, I.; Ghizdavu, S., (1995), *Bull. U.S.A. Cluj-Napoca*, 49/1, 103-110.
5. Stirban, M.; Muntean, L.S.; Deliu, C.; Crapaturean, S.; Ghizdavu, S.; Porca, M., (1996), 3rd International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe, Warsaw, Poland, 10-13 September 1996, 118-125.
6. Stirban, M.; Ghizdavu, S.; Nicoara, A., (1997), *Stud. Si cercet. Chimie (u.p.)*.
7. Bernauer, K.; Schürmann, P.; Nusbaumer, C.; Verardo, L.; Ghizdavu, S., (1998), *Pure and Applied Chemistry*, 70/4, 985-991.
8. Bernauer, K.; Ghizdavu, S.; Verardo, L., (1999), *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192, 357-369.
9. Fuchun Zhu, Ghizdavu, S.; Bernauer, K., (1999) unpublished results.

Posters:

1. Stirban, M.; Crapaturean, S.; Bathory, D.; Nicoara, A.; Ghizdavu, S., (1992), A XI-a Conf. Nat. Chim. Anal., Cluj-Napoca, 24-25 September 1992.
2. Popa, M.; Ghizdavu, S., (1993), Univ. "Babes-Bolyai", A XIX-a Ses. De Comunic. Stiint., Cluj-Napoca, 27-29 October 1993.
3. Stirban, M.; Ghizdavu, S., (1993), Ses. St. U.S.A., Cluj-Napoca (poster).
4. Ghizdavu, S.; Marian, C.O., (1994), Congresul National de Chimie Analitica, Constanta, September 1994.
5. Ghizdavu, S.; Nusbaumer, C.; Bernauer, K., (1997), III-eme Rencontre de Chimie Alsace-Suisse, Mulhouse, April 1997 (poster).