

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL  
Faculté des Sciences

*Reconnaissance moléculaire et réduction  
stéréosélective du cytochrome c par des complexes du  
fer(II) optiquement actifs*

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

**PASCAL JAUSLIN**

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

Institut de chimie

Juillet 1994

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Reconnaissance moléculaire et réduction.....  
stéréosélective du cytochrome c par des.....  
complexes du fer(II) optiquement actifs.....

.....  
.....  
de Monsieur Pascal Jauslin.....

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

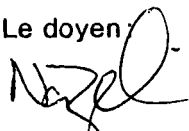
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel  
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs K. Bernauer, E. Stutz  
et E. Dubler (Zurich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 27 octobre 1994.....

Le doyen



H.-H. Nägeli

A ma famille

1245

## Remerciements

Le présent travail a été effectué de janvier 1990 à juillet 1994 dans les laboratoires du département de Chimie Inorganique I de l'Université de Neuchâtel.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Klaus Bernauer, pour m'avoir accueilli dans son département, pour sa grande disponibilité et ses conseils tout au long de ce travail et pour sa gentillesse.

Je le remercie aussi pour m'avoir fait confiance en me donnant deux ans la responsabilité de l'organisation et du déroulement des laboratoires de chimie pour les étudiants de première année en chimie, pharmacie et biologie.

Je remercie Messieurs les Professeurs E. Stutz (Université de Neuchâtel) et E. Dubler (Université de Zürich) d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie L. Verardo pour les discussions enrichissantes et pour sa constante disponibilité.

Je remercie A. Rochat et D. Monnard pour leur contribution à ce travail et leur bonne humeur.

Je remercie également tous mes collègues du département pour les bons moments passés pendant et après les journées de travail.

Je remercie encore toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail.

Enfin, je remercie l'État de Neuchâtel, pour m'avoir accordé un poste d'assistant, et le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour son soutien financier.

# Table des matières

<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. Stéréosélectivité dans le transfert d'électron.....	1
1.2. But du travail .....	3
<b>2. Le cytochrome c.....</b>	<b>4</b>
2.1. Généralités .....	4
2.2. Classification.....	4
2.3. Structure.....	7
2.3.1. Structure cristalline .....	7
2.3.2. Structure en solution aqueuse.....	10
2.4. Propriétés.....	10
2.4.1. Potentiel normal d'oxydoréduction .....	10
2.4.2. Propriétés spectrales .....	12
2.4.3. Influence du pH et de la température .....	13
2.5. Rôle biologique .....	17
2.6. Réactions de transfert d'électron.....	20
<b>3. Synthèse des ligands .....</b>	<b>25</b>
3.1. Généralités .....	25
3.2. Synthèse du promp et de l'alamp.....	26
3.3. Synthèse du phemp .....	26
3.4. Analyse du phemp.....	27
3.4.1. CCM.....	27
3.4.2. IR.....	28
3.4.3. Rotation optique .....	28
3.4.4. RMN.....	29
3.5. Titration du phemp .....	30
3.5.1. Constantes de dissociation du phemp.....	30
3.5.2. Constante de stabilité du complexe [Fe(phemp)] .....	30
3.5.3. Discussion.....	32
3.6. Synthèse du complexe [Co(phemp)H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> .....	33
3.7. Analyse du [Co(phemp)H <sub>2</sub> O]NO <sub>3</sub> .....	34
3.7.1. VIS.....	34
3.7.2. RMN.....	34
3.8. Spectres CD.....	36
<b>4. Mesures cinétiques.....</b>	<b>38</b>
4.1. Traitement des données.....	38
4.1.1. Modèles cinétiques .....	38
4.1.2. Détermination de la constante de vitesse.....	44
4.1.3. Détermination des enthalpie et entropie d'activation .....	44

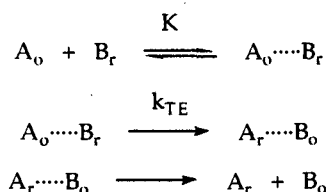
<b>4.2. Partie expérimentale</b> .....	<b>45</b>
4.2.1. Préparation des solutions.....	45
4.2.2. Conditions expérimentales.....	46
<b>5. Réduction du cytochrome c dans l'eau</b> .....	<b>48</b>
5.1. Généralités.....	48
5.2. Réduction par le complexe [Fe(promp)].....	49
5.3. Réduction par le complexe [Fe(alamp)].....	51
5.4. Réduction par le complexe [Fe(phemp)].....	53
5.5. Discussion.....	58
<b>6. Influence de l'alcool sur la réduction du cytochrome c</b> .....	<b>66</b>
6.1. Généralités.....	66
6.2. Réduction par le complexe [Fe(promp)].....	67
6.3. Réduction par le complexe [Fe(phemp)].....	75
6.4. Discussion.....	77
<b>7. Caractère biphasique de la réduction du cytochrome c</b> .....	<b>82</b>
7.1. Influence de l'éthanol sur le cytochrome c.....	82
7.2. Etude cinétique de la deuxième réaction.....	84
<b>8. Conclusions</b> .....	<b>89</b>
<b>9. Bibliographie</b> .....	<b>91</b>

# 1. Introduction

## 1.1. Stéréosélectivité dans le transfert d'électron

Les réactions de transfert d'électron entre des protéines et des complexes de métaux de transition ont été beaucoup étudiées ces dernières années dans le but de mieux comprendre les propriétés de ces protéines, leur fonction biologique et le mécanisme du transfert d'électron. Beaucoup de réactions avec des protéines hémiques ont été étudiées, plus récemment avec des protéines hémiques modifiées, mais peu d'études ont porté sur la stéréosélectivité dans le transfert d'électron alors que la stéréospécificité est une des caractéristiques principales des systèmes biologiques [1].

Le modèle le plus simple pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des protéines postule la formation d'un complexe précurseur suivi du transfert d'électron proprement dit [2]:



La reconnaissance chirale peut donc intervenir à deux niveaux: soit lors de la formation du complexe précurseur, soit lors du transfert d'électron proprement dit. Dans le premier cas, cela signifie qu'un des énantiomères forme avec la protéine un complexe précurseur énergétiquement plus favorable; dans le second cas, un des énantiomères possède un recouvrement orbitalaire meilleur avec la protéine.

Des réactions entre des complexes métalliques et des micro-organismes ont montré une stéréosélectivité, comme par exemple la réduction des complexes  $K[\text{Co}(\text{edta})]$ ,  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{phen})]\text{Cl}_3$  et  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{phen})]\text{Cl}_3$  par *Pseudomonas stutzeri* [3] (en: éthylènediamine; phen: phénanthroline; edta: éthylènediaminetétracétate). Les premières tentatives avec des protéines isolées datent d'une quinzaine d'année avec l'étude de l'oxydation de la ferre-

doxine de peuplier par les complexes  $\Delta$ -[Co(en)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> et rac-[Co(en)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> [4] et la réduction du ferricytochrome c du cheval par les complexes  $\Delta$ - et  $\Lambda$ -[Co(sepulchrate)]<sup>2+</sup> [5]. Dans les deux cas, aucune stéréosélectivité significative n'a été observée.

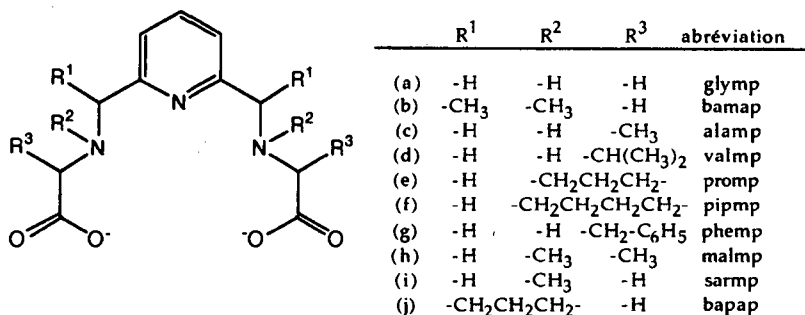


Fig. 1.1 Structure des ligands utilisés pour la formation des complexes de fer(II) optiquement actifs.

C'est l'étude de la réduction de la plastocyanine par les complexes chiraux  $\Delta$ -[Fe(RR)-alamp] et  $\Lambda$ -[Fe(SS)-alamp] (Fig. 1.1) par Bernauer et Sauvain [6] qui ont montré pour la première fois sans ambiguïté une stéréosélectivité dans le transfert d'électron. Le même comportement a été observé pour cette protéine en présence de complexes de cobalt(II) et de fer(II) formés avec les énantiomères RR ou SS des ligands alamp, promp et valmp (Fig. 1.1) [7, 8] ainsi que lors de l'oxydation de la ferredoxine de l'épinard par des complexes de cobalt(III) coordonnés avec les ligands optiquement actifs RR- ou SS-alamp et RR- ou SS-promp [9]. Dans les deux cas, la stéréosélectivité est influencée d'une part par la reconnaissance chirale et d'autre part par la température. De plus, les deux protéines montrent un comportement isocinétique lorsqu'elles réagissent avec des complexes formés aussi bien par des ligands de nature différente que par des énantiomères d'un même ligand donné.

Une stéréosélectivité a aussi été observée lors de l'oxydation du ferrocyclochrome c par des complexes chiraux. En présence du complexe neutre [Co(acétylacétone)<sub>3</sub>] [10, 11], le complexe  $\Delta$  réagit le plus rapidement et la

stéréosélectivité dépend de la force ionique, du tampon, de la température, du pourcentage d'alcool et du pH. Tous ces facteurs modifient la flexibilité et/ou la polarité de la protéine, ce qui favorise l'ouverture de la crevasse hémique et l'approche du réactif qui réagit préférentiellement. Le même comportement est observé avec le complexe  $[\text{Co}(\text{bipyridine})_3]^{3+}$  [11] où cependant la forme  $\Lambda$  réagit le plus rapidement et où la stéréosélectivité n'est pas fonction du tampon utilisé.

L'oxydation du ferrocyclochrome c par le complexe  $[\text{Co}(\text{oxalate})_3]^{3-}$  [12, 13] est plus rapide avec l'énantiomère  $\Lambda$  et la stéréosélectivité n'est pas influencée par le pH et le tampon, mais par la force ionique.

Enfin, la réduction de la plastocyanine par le complexe  $[\text{Co}(\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{-sarcophagine})]^{4+}$  [14] révèle une stéréosélectivité, en faveur de l'énantiomère  $\Lambda$ , qui est fonction du pH mais indépendante de la force ionique. La réduction du ferricytochrome c par le même complexe ne montre aucune stéréosélectivité. Cette différence est expliquée par les interactions de charges entre le complexe réducteur et les deux protéines.

## 1.2. But du travail

Les complexes formés à partir des ligands développés dans le groupe Bernauer (Fig. 1.1) montre une grande stéréosélectivité lorsqu'ils réagissent avec la plastocyanine ou la ferredoxine. Afin de savoir si le comportement trouvé pour ces deux protéines peut être généralisé à toutes les métalloprotéines, il faudrait étudier d'autres systèmes naturels transporteurs d'électrons.

Dans ce travail, nous avons étudié la stéréosélectivité dans la réduction du ferricytochrome c du cœur de cheval par des complexes de fer(II) optiquement actifs formés à partir de ligands donnés dans la Figure 1.1. Nous avons également étudié l'influence de la polarité du solvant sur ces réactions.

Afin d'agrandir la collection des réactifs chiraux, nous avons synthétisé les deux énantiomères du ligand  $\text{N,N}'\text{-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)-bis[(R)- ou (S)-phénylalanine]}$  (phemp).

## 2. Le cytochrome c

### 2.1. Généralités

Les cytochromes sont des protéines transporteurs d'électrons qui contiennent un ou plusieurs groupes prosthétiques hémiques. Les protéines hémiques jouent un rôle très important en biologie; on en dénombre trois espèces [15]:

- les transporteurs d'oxygène (hémoglobine, myoglobine),
- les transporteurs d'électrons (cytochrome c),
- les catalyseurs des oxydations par  $O_2$  et  $H_2O_2$  (oxydases, peroxydases).

La première observation de cytochromes date de 1886 lorsque C. A. MacMunn découvre des pigments qui semblent jouer un rôle dans la fonction respiratoire. En 1925, D. Keilin découvre que les cytochromes agissent comme transporteurs d'un électron dans la chaîne respiratoire de tout organisme aérobie et qu'il en existe au moins trois types caractérisés par des groupes hémiques différents [16]. L'isolation très facile du cytochrome c et la détermination de sa structure par diffraction par rayons X (R. Dickerson & collaborateurs) en ont fait la protéine certainement la plus étudiée comme en témoigne plusieurs publications générales [17, 18, 19, 20, 21].

### 2.2. Classification

Les cytochromes sont classés par type. Les trois types les plus fréquents sont les cytochromes a, b et c, qui se distinguent par la différence de structure de leur groupe hémique (Fig. 2.1), différence suffisante pour donner dans le visible des spectres d'absorption différents. Cette classification, a, b ou c, a pour origine la bande d'absorption (bande  $\alpha$ ) à la longueur d'onde la plus élevée (Fig. 2.6).

Les cytochromes b et c ont comme groupe prosthétique la protoporphyrine IX, associée à un atome de fer, habituellement appelée hème. Dans le cytochrome b, l'hème n'est pas lié par covalence à la protéine, alors qu'il l'est dans le cytochrome c par des liaisons thioéther avec la protéine. Ces liaisons sont formées par l'addition des groupes sulfhydryles de deux résidus cystéine de la chaîne polypeptidique aux groupes vinyles en position 2 et 4 de l'hème.

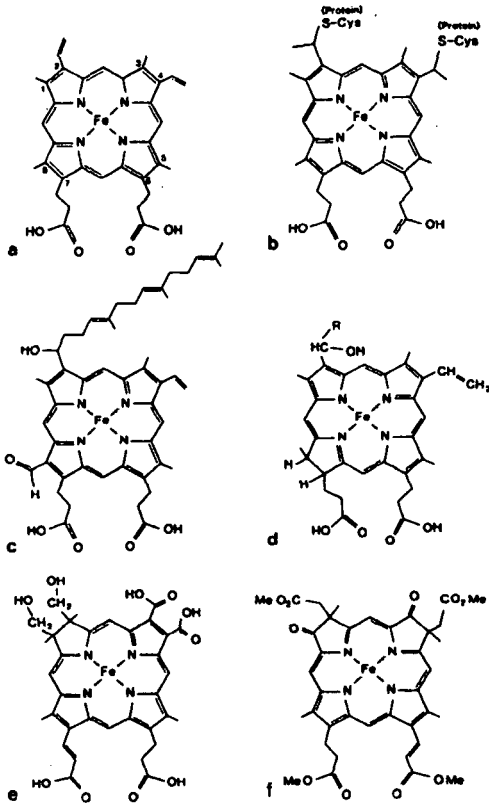


Fig. 2.1 Différents types d'hèmes du cytochrome. a: hème b; b: hème c; c hème a. Les hèmes d, e et f ne sont pas prouvés [20].

Le cytochrome a possède un groupe prosthétique ferroporphyrinique différent appelé hème a. Par rapport à l'hème du cytochrome c, un groupe formyle remplace un des groupes méthyles et une chaîne hydrocarbonée remplace un des groupes vinyles.

Des sous-classifications comme cytochrome  $c_2$ , cytochrome  $c_3$ , cytochrome  $c_{551}$  et cytochrome c' sont souvent rencontrés dans la littérature. Par exemple, cytochrome  $c_2$  et  $c_3$  se rapportent à l'historique de la découverte (d'abord le cytochrome c, puis  $c_2$ , etc...). Cytochrome  $c_{551}$  est la nouvelle classification recommandée par l'Union Internationale de Nomenclature Biochimique, l'indice indiquant la longueur d'onde de la bande  $\alpha$  du spectre visible pour la forme réduite de la protéine. Enfin cytochrome c' est le nom généralement donné aux cytochromes c high-spin.

Sur la base des séquences d'acides aminés, une division des cytochromes c en plusieurs classes est possible dont les caractéristiques des trois principales sont:

**Classe I** L'hème est localisé au voisinage du N terminal de la chaîne polypeptidique. Il y a 80 à 130 acides aminés par hème. Les cinquième et sixième sites de coordination occupés respectivement par un ligand méthionine et un ligand histidine. Cette classe comprend les cytochromes c d'origine mitochondriale.

**Classe II** L'hème est localisé au voisinage du C terminal de la chaîne polypeptidique. Il y a 100 à 130 acides aminés par hème. Les cinquième et sixième sites de coordination sont occupés par des ligands histidines.

**Classe III** Ce sont les cytochromes c possédant plusieurs groupes héminiques. Il y a 30 à 40 acides aminés par hème. Les cinquième et sixième sites de coordination sont occupés par des ligands histidines.

Le cytochrome c est présent dans tous les organismes qui ont des chaînes respiratoires mitochondriales: végétaux, animaux et micro-organismes eucaryotes. Une caractéristique frappante est que la protéine varie peu quelle que soit son origine; elle présente toujours la même structure tridimensionnelle et les mêmes propriétés chimiques et physiques. Par

conséquent, bien que la description générale qui suit concerne d'abord le cytochrome c extrait du cœur de cheval, elle est valable dans l'ensemble pour tous les cytochromes c de la classe I.

## 2.3. Structure

Le cytochrome c extrait du cœur de cheval est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 104 acides aminés et d'un groupe héminique lié par covalence aux cystéines 14 et 17 de la chaîne polypeptidique. L'hème est constitué d'une protoporphyrine et d'un atome de fer dont l'état d'oxydation est +II ou +III selon que la protéine est réduite ou oxydée (ferro- ou ferricytochrome c).

La protoporphyrine est formée de quatre noyaux pyrroles liés par des ponts méthényles pour former un noyau tétrapyrrolique sur lequel viennent se fixer huit substituants: quatre méthyles, deux vinyles et deux propionates. Ces substituants peuvent être disposés de quinze façons différentes mais dans les systèmes biologiques n'existe qu'un isomère appelé protoporphyrine IX (Fig. 2.1a). L'atome de fer se lie aux quatre azotes au centre du noyau protoporphyrinique [22].

### 2.3.1. Structure cristalline

La protéine est grossièrement sphérique avec un diamètre de 34 Å (Fig. 2.2). Le groupe héminique se trouve dans une poche formée par la chaîne polypeptidique. L'atome de fer se trouve dans le plan de la protoporphyrine et ses cinquième et sixième sites de coordination sont occupés respectivement par l'atome d'azote du résidu histidine 18 et par l'atome de soufre du résidu méthionine 80. Les acides aminés en contact avec l'hème sont majoritairement hydrophobes alors que ceux à la surface de la protéine sont plutôt chargés et donc hydrophiles (Fig 2.3). La surface est la partie la plus mobile de la protéine. Les résidus lysines sont surtout positionnés autour du coin exposé de l'hème et sur les côtés droit et gauche de la protéine alors que les carboxylates sont situées devant et derrière la molécule. Les lysines semblent particulièrement mobiles car peu sont définies

par rayons X. Les acides aminés 1 à 47 sont du même côté que l'histidine 18 (côté droit de la protéine) tandis que les acides aminés 48 à 91 sont du même côté que la méthionine 80 (côté gauche de la protéine). Les acides aminés 92 à 104 reviennent vers le côté droit.

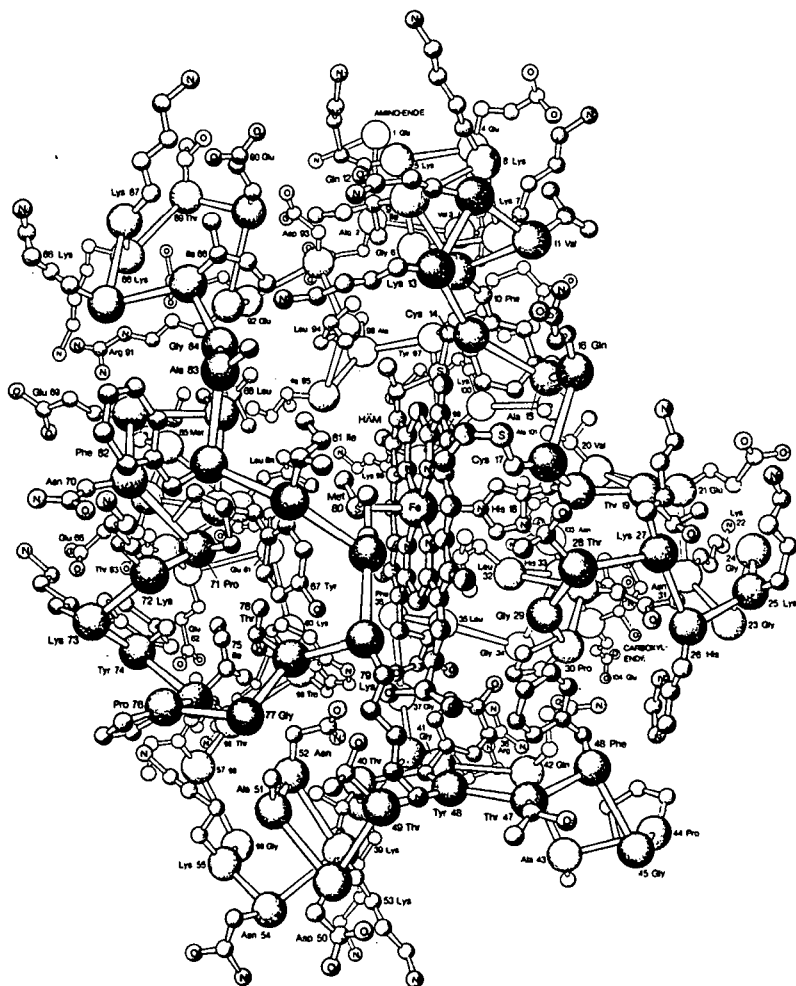


Fig. 2.2 Structure du cytochrome c du cœur de cheval [23].

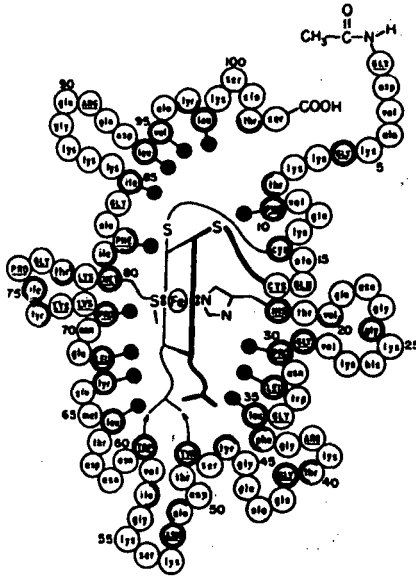


Fig. 2.3 Les résidus acides aminés sont classés en trois groupes selon leur degré d'exposition de leur chaîne latérale sur l'extérieur (ici cytochrome c du thon): exposé (cercle normal), partiellement exposé (cercle demi-gras) ou caché (cercle gras) [17].

La structure tridimensionnelle du cytochrome c montre que le côté de l'hème formé des cycles pyrroliques 2 et 3 (Fig. 2.1) et portant le groupe méthyle-5 est moins bien protégé par la chaîne polypeptidique et que l'environnement immédiat a une densité de charge positive. C'est donc un site potentiel pour le transfert d'électron. Une autre caractéristique de la structure est qu'elle présente deux canaux ou tunnels qui conduisent de la surface de la protéine au centre héminique. L'un se trouve du côté gauche, délimité par la boucle que forme la chaîne polypeptidique des acides aminés 55 à 75, l'autre se trouve du côté droit et est composé des acides aminés 10 à 20 et 90 à 100. Ces deux canaux sont formés par des restes plutôt hydrophobes dont certains, aromatiques (Trp 59, Tyr 67 et Tyr 74 pour le

canal gauche; Phe 10 et Tyr 97 pour le canal droit), pourraient permettre l'accès d'un petit réactif oxydoréducteur et le transfert d'électron. Un mécanisme a d'ailleurs été proposé mais il ne correspond pas aux observations expérimentales et a été abandonné.

La structure du cytochrome c change lorsque la molécule passe de l'état oxydé à l'état réduit. Les changements les plus importants sont que la structure dans son ensemble est plus compacte et le groupe héminique est par conséquent moins accessible au monde externe. Les modifications essentielles se situent dans la boucle formée des acides aminés thréonine 47 à triptophane 59, à la base de l'hème et la région au-dessus de la méthionine 80 à gauche de l'hème.

### **2.3.2. Structure en solution aqueuse**

Les nombreuses et différentes études spectrales du cytochrome c en solution ont montré que la structure tridimensionnelle de la protéine est la même en solution aqueuse dans les conditions physiologiques que celle du cristal. On parle alors de la forme native du cytochrome c. L'environnement héminique est modifié en fonction de la température et du pH mais ces modifications n'ont que peu d'influences sur le squelette de la chaîne polypeptidique. Cette observation a été faite pour d'autres protéines héminiques et se résume ainsi: la poche héminique est une région relativement labile à l'intérieur d'un squelette protéinique plutôt fixe.

Il existe un équilibre entre la forme native et des formes localement ou complètement dépliées. Ces formes dépliées sont présentes en petite quantité dans les conditions physiologiques mais semblent ne jouer aucun rôle dans la fonction du cytochrome c.

## **2.4. Propriétés**

### **2.4.1. Potentiel normal d'oxydoréduction**

Le potentiel standard pour les cytochromes c de la classe I se situe à quelques exceptions près entre 150 et 500 mV et est sensible à la variation de

pH et à la force ionique. Ce n'est pas le cas du cytochrome c du cœur de cheval dont le potentiel normal de + 260 mV est stable sur un relativement grand domaine jusqu'à pH = 8 (Fig. 2.4) et est peu sensible à la force ionique.

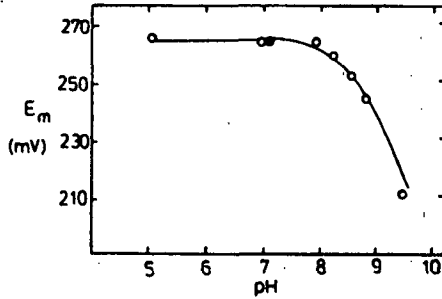


Fig. 2.4 Variation du potentiel normal en fonction du pH [18].

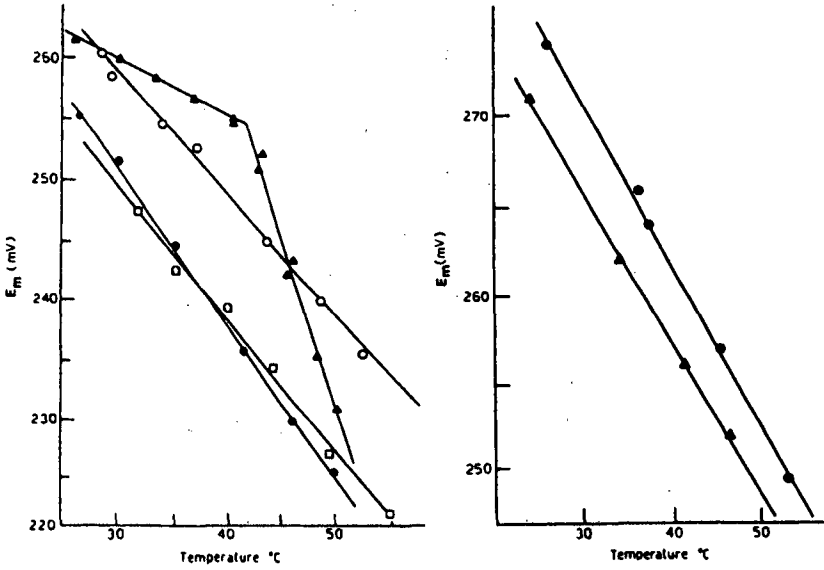


Fig. 2.5 Influence des ions en solution ( $o$ ,  $F^-$ ;  $\blacktriangle$ ,  $Cl^-$ ;  $\bullet$ ,  $Br^-$ ;  $\square$ ,  $I^-$ ; concentration des halogénures: 0,1M), de la température et du solvant (gauche:  $H_2O$ , droite:  $D_2O$ ) sur le potentiel standard [18].

La Figure 2.5 montre l'influence des ions en solution, de la température et du deutérium sur le potentiel standard. La variation du potentiel en fonction de la nature isotopique du solvant laisse supposer que l'eau joue un rôle très important dans la stabilisation de ce potentiel. Ceci peut être très important puisque le réactif inorganique donneur ou accepteur d'électron doit pénétrer la sphère d'hydratation de la protéine afin d'atteindre la distance minimale pour le transfert d'électron.

## 2.4.2. Propriétés spectrales

Dans les conditions physiologiques, la solution de cytochrome c du cœur de cheval présente trois bandes d'absorption à 551, 522 et 415 nm pour la forme réduite et trois bandes d'absorption à 695, 530 et 400 nm pour la forme oxydée (Fig. 2.6).

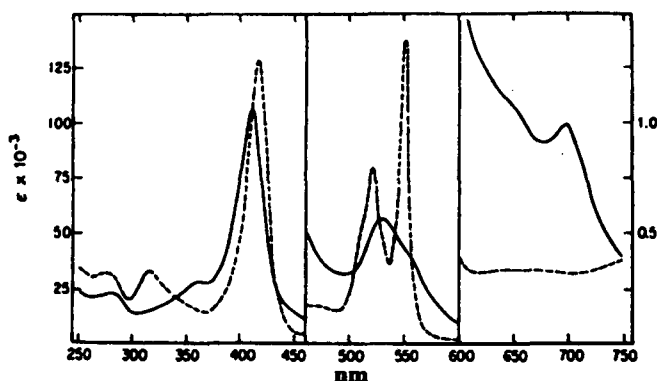


Fig. 2.6 Spectre UV/VIS du cytochrome c oxydé (---) et réduit (—). L'échelle verticale pour le cadre central est égal à vingt fois l'échelle de droite [18].

La bande à 695 nm a été passablement étudiée. Elle est caractéristique de la classe I des cytochromes c et est sensible à l'état conformationnel de la protéine (Fig.2.7). Le fait que la rupture de la liaison Fe-méthionine 80

coïncide avec la disparition de cette bande et que tous les cytochromes possédant un ligand méthionine (classe I, classe II et cytochrome  $b_{562}$  de *E. Coli*) présentent cette bande suggère que cette absorption à 695 nm (ou proche de 695 nm) est propre à la coordination de la méthionine. Cependant, si la présence de cette bande peut signifier la méthionine comme ligand, son absence ne signifie pas que la méthionine n'est pas coordonnée. En effet, à une température de 50 °C, cette bande n'est pas observée mais des mesures RMN ont montrées que la méthionine était quand même coordonnée.

### 2.4.3. Influence du pH et de la température

De très nombreuses études spectroscopiques en solution aqueuse ont montré que l'environnement hémique est très sensible aux variations de pH (Fig. 2.7) et de température (Fig. 2.8) et que le ferricytochrome c est plus sensible que le ferrocycytochrome c à ces variations.

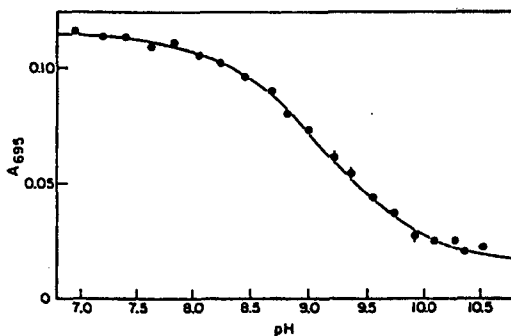


Fig. 2.7 Variation de la bande à 695 nm en fonction du pH [24].

La forme réduite est stable jusqu'à 95 °C (pH = 6). La forme oxydée subit une première modification conformationnelle à 53 °C et une seconde aux alentours de 82 °C d'après des mesures de dispersion rotatoire et de dichroïsme circulaire [25]. Comme nous l'avons déjà vu, la bande à 695 nm



Ces travaux ont été confirmés mais on sait maintenant qu'il existe beaucoup plus d'isomères de la protéine aux pH extrêmes. L'état III pour le ferricytochrome c et l'état II pour le ferrocyclochrome c correspondent aux formes physiologiques ou natives de la protéine; le fer est low-spin pour les deux états d'oxydation.

L'état V du ferricytochrome c ressemble beaucoup à l'état III du ferrocyclochrome c où la protéine semble être grandement dépliée. Pour la forme réduite, la liaison Fe-méthionine 80 se rompt à un pH > 12.

La transition III  $\longrightarrow$  II dans le ferricytochrome c est complexe, fait intervenir deux ou trois protons et est un ensemble d'équilibres entre plusieurs formes de la protéine. Dans l'état II, le fer est high-spin et est en contact avec le solvant. Il semble que la liaison Fe-histidine 18 est rompue, une molécule d'eau venant occuper ce sixième site de coordination; ou alors, ce sont les cinquième et sixième sites de coordination qui sont occupés par des molécules d'eau [19].

L'état IV du ferricytochrome c, appelée forme alcaline, est stable et de forme globulaire; l'atome de fer est à l'état low-spin. Son existence est démontrée par sa non-réductibilité avec l'ascorbate [29, 30]. Toutes les méthodes spectroscopiques utilisées ont confirmé que la transition de l'état III à l'état IV était un changement de structure dans la protéine dû à la substitution du ligand méthionine 80 sur l'atome de fer. La nature du nouveau ligand n'est pas connue sinon que l'atome coordonné doit être un azote. Il peut s'agir d'une histidine ou d'une lysine. Les différentes études penchent en faveur d'une lysine, mais laquelle ?

Des études spectroscopiques du cytochrome c du cheval à pH = 9-11 ont révélées que la forme alcaline n'est pas une espèce moléculaire simple; il y a au moins deux isomères [31]. Les différences de structure entre ces différentes formes alcalines ne sont pas connues mais leurs proportions varient en fonction du cytochrome. Il semble cependant que l'une des espèces est en grand excès par rapport à l'autre (ou les autres) et est donné comme étant le type IV du ferricytochrome c.

Toutes les méthodes utilisées montrent que la transition de la forme native à la forme alcaline est caractérisée par un équilibre avec une constante qui varie selon l'origine de la protéine (Tableau 2.1). Diverses

mesures cinétiques montrent que cet équilibre est plus complexe et que la valeur mesurée est une constante apparente composée d'une constante de dissociation ( $pK_H = 11$ ) couplée à un équilibre conformationnel avec un  $pK_c = -2$  (Fig. 2.9).

Tableau 2.1 Constantes apparentes de l'équilibre entre les formes native et alcaline pour différents cytochromes c [21].

Protéine		modification chimique	pK apparent	$K_c$	$pK_H$
Cheval		cytochrome c	9.0	124	11
Cheval		cytochrome c	TNP-Lys 13	8.1	
Cheval		cytochrome c	CDNP-Lys 13	8.2	
Cheval		cytochrome c	CDNP-Lys 86	8.7	
Cheval		cytochrome c	CDNP-Lys 87	8.75	
Cheval		cytochrome c	CDNP-Lys 72	9.3	
Homme		cytochrome c		9.5	
Homme		cytochrome c	TNP-Lys 13	9.1	
Singe		cytochrome c		8.7	
Rat		cytochrome c	Tyr 67	9.5	
			Phe 67	10.7	
<i>C. oncopelti</i>		cytochrome c-557		8.6	119
<i>E. Gracilis</i>		cytochrome c-558		10.0	
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Thr 102	8.6	244
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Cys 102	8.3	460
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Gly <sup>82</sup>	7.8	22
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Ser <sup>82</sup>	8.0	16
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Ile <sup>82</sup>	7.0	200
<i>S. cerevisiae</i>	iso-1	cytochrome c	Leu <sup>82</sup>	7.0	200
<i>R. rubrum</i>		cytochrome c <sub>2</sub>		9.1	
<i>Rm. vanielii</i>		cytochrome c <sub>2</sub>		9.1	
<i>R. molischianum</i>	iso-1	cytochrome c <sub>2</sub>		7.3	
<i>R. molischianum</i>	iso-2	cytochrome c <sub>2</sub>		8.5	
<i>R. fulvum</i>	iso-1	cytochrome c <sub>2</sub>		6.9	
<i>R. fulvum</i>	iso-2	cytochrome c <sub>2</sub>		8.4	
<i>Ps. aeruginosa</i>		cytochrome c-551		11.0	

pK : Constante d'équilibre apparent

$K_c$  : Constante d'équilibre entre la forme native déprotonée et la forme alcaline (Fig. 2.9)

$pK_H$  : Constante de dissociation (Fig. 2.9)

TNP : trinitrophényle

CDNP : carboxydinitrophényle

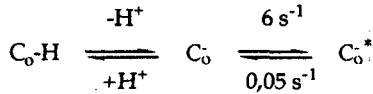


Fig. 2.9 Équilibre entre l'état III et l'état IV; les espèces  $C_0\text{-H}$  et  $C_0$  possèdent un ligand méthionine axial mais pas  $C_0^*$ , qui correspond à l'état IV du ferricytochrome c [21].

Assez de mesures ont été faites pour confirmer que la transition alcaline obéit à l'équation de la *Figure 2.9*. Mais on ne sait pas pourquoi le pK apparent change d'un cytochrome à l'autre. En comparant les résultats du *Tableau 2.3*, il ressort que le cytochrome c humain présente la plus grande stabilité.

Au pH physiologique, de petites quantités de la forme IV du ferricytochrome c peuvent exister [24]. Ceci a été confirmé par des mesures RMN qui montrent que le spectre du ferricytochrome c à pH = 7 ressemble à un mélange des formes de l'état natif et de l'état alcalin.

## 2.5. Rôle biologique

Les cellules aérobies ont besoin d'énergie pour vivre. La principale source d'énergie des cellules est la respiration, c'est-à-dire l'oxydation enzymatique des molécules combustibles par l'oxygène. Les réactions chimiques nécessaires à la production d'énergie ont lieu dans les mitochondries qui sont des organites présents dans le cytoplasme de toutes les cellules aérobies (*Fig. 2.10*). Leur rôle est de mettre en réserve, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie libérée par l'oxydation enzymatique des molécules nutritives [22, 32, 33, 34].

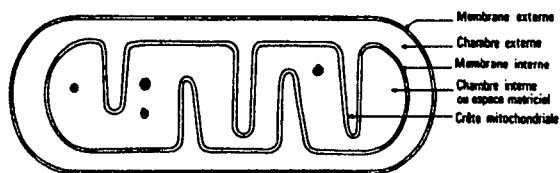


Fig. 2.10 Schéma d'une mitochondrie [32].

Les mitochondries ont deux systèmes membranaires: une membrane externe et une membrane interne ample et hautement repliée. La membrane interne est repliée en une série de crêtes internes appelées cristae. Ainsi, il y a deux compartiments dans les mitochondries: l'espace intermembranaire entre les membranes externe et interne, et la matrice, qui est entourée par la membrane interne.

Les aliments cellulaires, sucres ou hydrates de carbone, acides gras et acides aminés sont oxydés dans la matrice des mitochondries par un cycle de réactions appelé cycle de Krebs. Ils y sont introduits sous une forme unique, l'acétyl coenzyme A, à laquelle ils accèdent par des dégradations préalables. L'acétyl coenzyme A introduit le groupe acétyl dans le cycle de Krebs où il y est transformé en deux molécules de  $\text{CO}_2$ , huit protons et huit électrons. Les huit électrons libérés sont acceptés par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et le flavine adénine dinucléotide (FAD) qui sont réduits respectivement en NADH et  $\text{FADH}_2$ .

Les électrons sont ensuite transférés du NADH ou du  $\text{FADH}_2$  jusqu'à l'oxygène moléculaire  $\text{O}_2$  par un ensemble de complexes que l'on appelle chaîne respiratoire (Fig. 2.11). La chaîne respiratoire se situe dans la membrane interne des mitochondries et est constituée de divers transporteurs d'électrons tels que flavines, complexes fer-soufre, quinones et cytochromes.

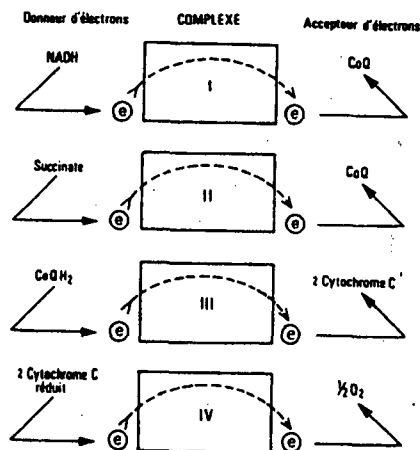


Fig. 2.11 Schéma de la chaîne respiratoire [32].

Le complexe I est l'enzyme NADH-Q réductase qui est constitué d'au moins seize chaînes polypeptidiques et de deux types de groupes prosthétiques, le flavine mononucléotide et de complexes FeS.

Le complexe II est le complexe succinate-Q réductase qui est constitué de l'enzyme succinate déshydrogénase et d'une protéine FeS.

Le complexe III est le complexe QH<sub>2</sub>-cytochrome c réductase qui est formé des cytochromes b et c<sub>1</sub> et d'une protéine FeS.

Le complexe IV enfin est le complexe cytochrome c oxydase qui contient les cytochromes a et a<sub>3</sub>.

Le cytochrome c, comme la coenzyme Q<sub>10</sub>, est un transporteur d'électrons mobile dans la membrane mitochondriale interne. Il transporte l'électron du complexe III au complexe IV.

Les électrons du NAD réduit sont transportés successivement par les complexes I, III et IV tandis que ceux du FAD réduit passent par les complexes II, III et IV. L'énergie libérée au cours du transfert d'une paire d'électrons à travers le complexe I, III ou IV permet chaque fois la synthèse d'un ATP (Fig. 2.12).

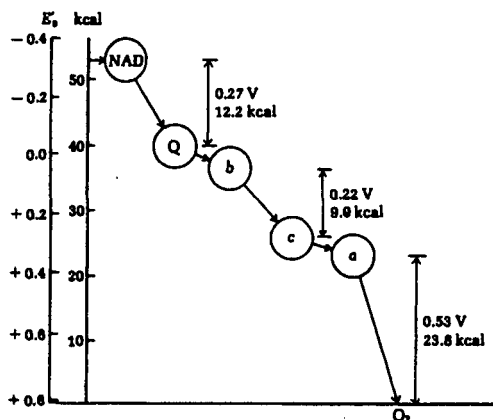


Fig. 2.12 Énergie libérée au cours du passage d'une paire d'électrons à travers la chaîne respiratoire [34].

## 2.6. Réactions de transfert d'électron

L'étude des réactions d'oxydoréduction en solution aqueuse entre deux complexes de métaux de transition a permis de définir deux mécanismes de transfert d'électron: le mécanisme sphère externe et le mécanisme sphère interne [35].

Dans un mécanisme sphère interne, le transfert d'électron est précédé de la substitution d'un ligand, provenant d'un des réactifs, dans la sphère de coordination de l'autre partenaire pour former une espèce binucléaire. Les deux centres métalliques sont ainsi liés par un ligand pontant et transfèrent l'électron par ce pont.

Dans un mécanisme sphère externe, les sphères de coordination de chacun des centres métalliques demeurent intactes pendant le transfert d'électron. Marcus a développé un modèle mathématique de ce mécanisme qui permet de calculer la constante de vitesse du transfert d'électron entre deux espèces 1 et 2; cette constante est donnée par la relation:

$$k_{12} = \sqrt{k_{11} \cdot k_{22} \cdot K_{12} \cdot f_{12}}$$

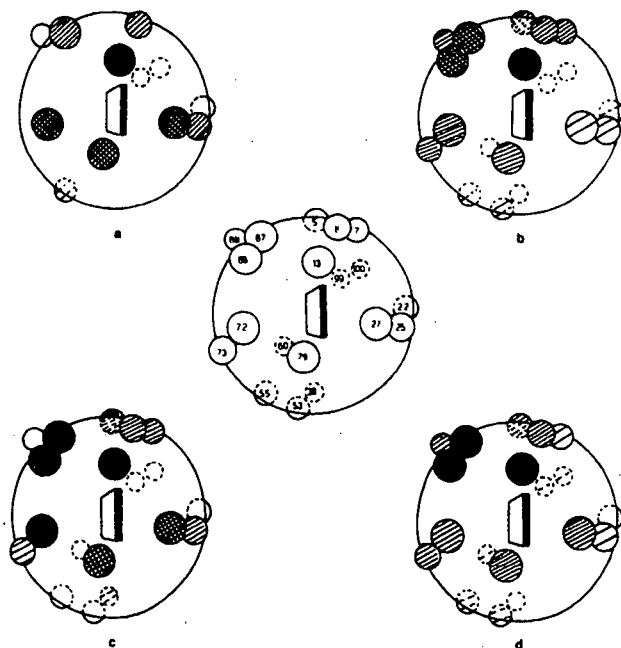
où  $k_{11}$  et  $k_{22}$  sont les constantes d'auto-échanges des espèces 1 et 2,  $K_{12}$  la constante d'équilibre pour la réaction de TE entre les espèces 1 et 2 et  $f_{12}$  une constante généralement proche de l'unité.

Il est plus difficile d'appliquer ces modèles aux réactions impliquant des protéines car ces dernières ne sont pas vraiment comparables aux complexes métalliques souvent utilisés. La chaîne polypeptidique protège le centre redox de l'extérieur et empêche le contact direct avec le ion métallique du complexe réactif inorganique. Par conséquent, c'est généralement le mécanisme sphère externe qui est supposé dans les réactions de transfert d'électron entre des protéines et des complexes métalliques. Cependant, certaines réactions ont lieu selon un mécanisme sphère interne, telle la réduction du ferricytochrome c par l'hexaaquo-chrome(II), dans la mesure où le chrome vient se fixer directement sur une région à la surface de la protéine [36].

L'application de la théorie de Marcus pour le transfert d'électron entre le cytochrome c et de petits complexes métalliques inorganiques cationiques a montrée une bonne corrélation entre la constante de vitesse mesurée expérimentalement et celle calculée. Pour les complexes anioniques, la corrélation est moins bonne, parfois même mauvaise, ce qui peut s'expliquer par le fait que la protéine n'utilise pas le même site de réaction que dans sa réaction d'auto-échange [37]. D'autre part, l'existence de plusieurs sites de réaction sur la protéine rend le modèle général du transfert d'électron (*Chapitre 1*) trop simple. La connaissance du ou des sites de réaction de la protéine est donc une nécessité pour améliorer le modèle de Marcus et plusieurs études ont d'ailleurs été faites dans ce but.

Le modèle de transfert d'électron avec des protéines implique l'existence de sites de réaction. Un site de réaction est une région tridimensionnel à la surface de la protéine où le transfert d'électron peut avoir lieu. La géométrie imposée par les chaînes latérales des acides aminés voisins et les charges de ces chaînes latérales font que ce site doit être stéréospécifique afin de permettre l'approche des réactifs physiologiques du cytochrome c uniquement. Les sites d'interaction du cytochrome c pour ses complexes physiologiques ont été déterminés par un grand nombre de techniques [17, 18]. Les différentes études montrent que les deux partenaires physiologiques

interagissent aux mêmes endroits sur la protéine, l'un étant la partie supérieure du coin exposé de l'hème.



**Fig. 2.13** Sites de liaison sur le cytochrome c pour différents partenaires physiologiques; plus le site est sombre, plus l'interaction est importante (a: Cytochrome  $b_5$ ; b: Cytochrome c oxydase; c: Cytochrome c peroxydase; d:  $QH_2$ -cytochrome c réductase). Le schéma central représente la localisation des différentes lysines [18].

D'autres partenaires physiologiques ont été utilisés, en particulier le cytochrome  $b_5$  et la cytochrome c peroxydase dont les structures sont connues par diffraction par rayons X, ce qui a permis d'étudier les structures possibles des complexes précurseurs par modélisation sur ordinateur. Des études expérimentales sont en accord avec ces modèles. Des mesures ont également été faites avec des cytochromes modifiés chimiquement. La

Figure 2.13 résume ce qui est connu sur les sites de réaction du cytochrome c avec des partenaires physiologiques.

Les réactions de transfert d'électron du cytochrome c avec ses partenaires physiologiques sont très complexes et les manipulations sont souvent délicates. C'est pourquoi, des mesures ont été faites avec des systèmes plus simples pour étudier la fonction de transporteur d'électron du cytochrome c.

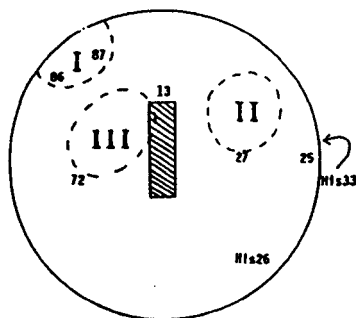
Parmi ces systèmes simples, on trouve des molécules organiques, comme l'acide ascorbique, des catechols et des quinols, mais surtout de nombreux complexes oxydoréducteurs métalliques. Toutes ces mesures ont montré que le transfert d'électron devait avoir lieu sur le coin exposé de l'hème et que le solvant ainsi que la distribution asymétrique des charges à la surface du cytochrome jouent un rôle très important. La protéine a une charge globale fortement positive estimée à +8 et +9 pour respectivement les formes réduite et oxydée. De plus, à cause de ces charges, la réaction est aussi influencée par la présence d'espèces chargées.

Les structures des complexes précurseurs du cytochrome c avec  $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$ ,  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ,  $[\text{Fe}(\text{dtpa})]^{2-}$  et  $[\text{Fe}(\text{nta})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^-$  ont été définies par méthodes RMN et les complexes précurseurs du cytochrome c avec  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_5(4\text{-NH}_2\text{py})]^{2-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{imid})]^{2-}$  et  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$  ont été définies par des études cinétiques de dérivés du cytochrome c modifiés chimiquement. Les deux méthodes sont en bon accord pour la structure des complexes communs aux deux méthodes et ont permis de définir trois sites de réaction possible [18, 38] (Fig. 2.14).

Le site 1 se situe au-dessus de la protéine sur la gauche de l'hème, si l'on regarde la face frontale de la protéine (Fig. 2.2), et comprend les acides aminés Met 65 et Thr 89; les lysines 5, 86 et 87 peuvent participer comme groupes liants. C'est le site préférentiel pour les partenaires physiologiques. Le site 2 se situe à droite de l'hème et comprend les acides aminés Val 11, Ala 15, Thr 19 et les lysines 7, 25 et 27. Enfin, le site 3 est localisé à gauche de l'hème et comprend les acides aminés Ile 81, Phe 82 et Ala 83; les lysines 13, 72 et 86 peuvent participer comme groupes liants.

Les sites 1 et 3 ont une affinité plus importante pour les réactifs anioniques que le site 2; en revanche, ce dernier semble réagir préférentiel-

lement avec le complexe  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ , au contraire des sites 1 et 3, à cause de la présence du glutamate 21.



**Fig. 2.14** Représentation des trois sites possibles de réaction (zones pointillées). Les numéros des lysines qui peuvent intervenir pour la fixation des réactifs oxydoréducteurs sont indiqués [38].

Il faut cependant rester prudent sur l'existence de trois sites distincts. En effet, la surface protéinique est caractérisée par une certaine mobilité des chaînes latérales des acides aminés. En particulier, la chaîne latérale des lysines, qui montre une grande flexibilité conformationnelle et intervient dans la formation du complexe précurseur, mesure 10 Å lorsqu'elle est complètement étirée. Ces observations ne rendent pas impossible le fait qu'un réactif puisse migrer à la surface de la protéine.

Cette idée est d'ailleurs développée dans un travail récent [39]. Ces pseudo-sites formeraient en fait une région d'une certaine surface qui favoriserait la fixation du partenaire; le rôle des lysines seraient d'orienter le partenaire pour faciliter le transfert d'électron. Les arguments en faveur de ce modèle sont d'une part que la probabilité de rencontre entre le cytochrome c et ses partenaires physiologiques est beaucoup plus grande puisque les réactifs n'ont pas besoin d'avoir une orientation spécifique et d'autre part que ce modèle explique mieux la reconnaissance de plusieurs partenaires physiologiques.

### 3. Synthèse des ligands

#### 3.1. Généralités

Discuter de la stéréosélectivité dans une réaction de TE entre deux réactifs signifie discuter la réactivité de l'un en fonction de sa structure par rapport à l'autre. La condition principale pour ce genre d'études est donc de connaître parfaitement la structure des réactifs.

Dans ce sens, l'utilisation du cytochrome c est intéressante dans la mesure où cette protéine transporteur d'électron est une des plus étudiées et sans doute des mieux connues. Mais comme nous l'avons vu au chapitre précédent, cette protéine est loin d'être parfaitement connue.

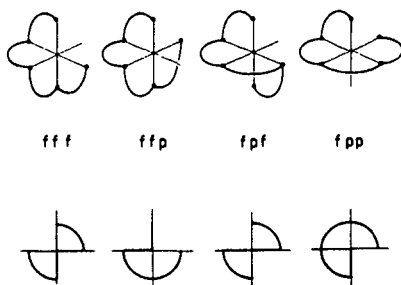


Fig. 3.1 Les quatre possibilités de coordination d'un ligand pentadenté autour d'un centre métallique [40].

Les complexes réducteurs utilisés dans ce travail sont formés à partir de ligands dérivés de la bis[3-carboxy-2-azapropyl]-2,6-pyridine (Fig. 1.1). Ces ligands sont pentadentés linéaires et présentent une symétrie  $C_2$  qui impose une configuration fpp ( $f$  = facial,  $p$  = périphérique) (Fig. 3.1) [40]. Sur la base de spectres CD et RMN et par la détermination de la structure par diffraction de rayons X, la configuration absolue a été déterminée pour les complexes de cobalt (III) [40, 41, 42, 43]. Pour tous les ligands à l'exception du malmp, la

formation du complexe est stéréospécifique. Pour les ligands (SS)-alamp et (SS)-promp, la configuration absolue est  $\Lambda$ -exo, et pour (RR)-alamp et (RR)-promp,  $\Delta$ -exo.

Cette spécificité observée dans la formation du complexe inerte de cobalt(III) permet d'admettre que les complexes labiles de fer(II) ou cobalt(II) possèdent la même configuration absolue.

### 3.2. Synthèse du promp et de l'alamp

Les ligands N,N'-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)bis[(R)- ou (S)-proline] ((R,R)- ou (S,S)-promp) et N,N'-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)bis[(R)- ou (S)-alanine] ((R,R)- ou (S,S)-alamp) sont synthétisés et purifiés selon le mode opératoire utilisé par Sauvain [7].

### 3.3. Synthèse du phemp

Les deux énantiomères du N,N'-[pyridinediyl-2,6]bis(méthylène)-bis[(R)- ou (S)-phénylalanine] ((R,R)- ou (S,S)-phemp) sont synthétisés à partir du bis(bromométhyl)-2,6-pyridine et de l'acide aminé (R)- ou (S)-phénylalanine (Fluka, puriss), par analogie au mode opératoire pour le promp. Le schéma réactionnel de la synthèse est donné à la Figure 3.2.

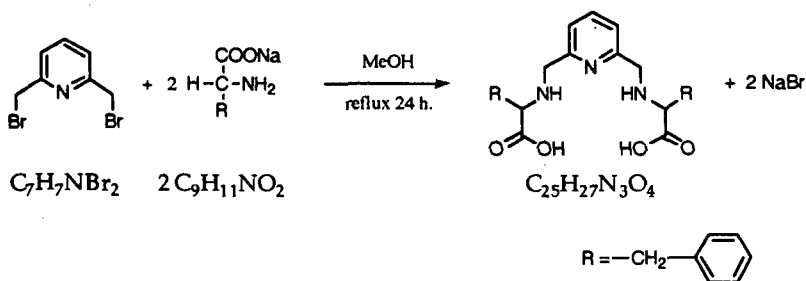


Fig. 3.2 Schéma réactionnel de la synthèse du ligand phemp.

7 g de (S)- ou (R)-phénylalanine sont dissous dans 25 ml de NaOH 1,7M. Le sel sodique de l'acide est récupéré par évaporation rotative et séché une nuit sur silicagel. Il est alors dissous dans 200 ml de méthanol distillé.

Le mélange réactionnel est amené à pH = 9,5 (solution 4M de NaOH dans du méthanol) et chauffé à reflux (~ 80 °C). Une solution de 5 g de bis(bromométhyl)-2,6 pyridine dissous dans 80 ml de méthanol distillé est alors ajoutée goutte à goutte, le pH étant maintenu à 9,5. L'adjonction terminée, le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 heures puis le solvant est éliminé par évaporation rotative.

Le solide, dissous dans 500 ml de NaOH 0,1M, est versé dans 1 l d'eau. La solution est chauffée à 70 °C et acidifiée doucement (pompe pérestaltique) avec HCl 2M jusqu'à pH = 4. Le mélange est refroidi une nuit à température ambiante puis filtré (verre fritté P3). Le solide obtenu est lavé avec respectivement de l'eau et du méthanol puis séché une nuit sur silicagel. Les deux énantiomères du phemp sont ainsi recristallisés plusieurs fois jusqu'à ce que le pouvoir rotatoire mesuré ne change plus. La quantité de produit pur obtenu est 3 g; rendement:  $\eta = 37,5\%$ .

### 3.4. Analyse du phemp

#### 3.4.1. CCM

L'analyse par chromatographie sur couche mince se fait dans les conditions suivantes: plaque Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck; solvant: butanol/acide acétique/eau 12:6:6; les plaques sont révélées en lumière ultraviolette (254 nm) et à la ninhydrine.

L'analyse du produit brut ainsi que celui obtenu après la première recristallisation révèle des traces d'acide aminé ( $R_f = 0,68$ ) en plus du phemp ( $R_f = 0,75$ ); à partir de la deuxième recristallisation, seul le spot attribué au phemp est révélé.

### 3.4.2. IR

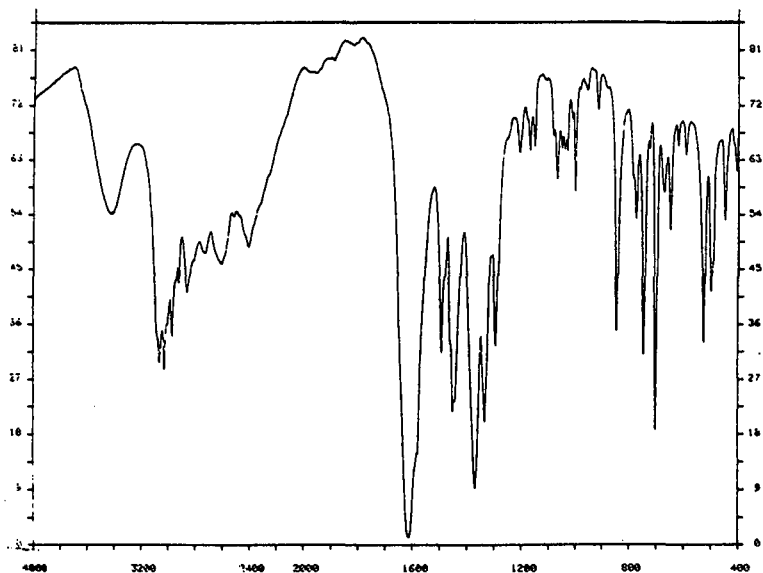


Fig. 3.3 Spectre IR du ligand SS-phemp (pastille KBr).

### 3.4.3. Rotation optique

Tableau 3.1 Rotation optique pour les deux énantiomères du ligand phemp.

$\lambda$ (nm)	RR-phemp (c = 0,526, NaOH 0,1M)	SS-phemp (c = 0,526, NaOH 0,1M)
589	+ 2,85	- 2,70
578	+ 2,95	- 2,28
546	+ 2,76	- 2,47
436	+ 1,43	- 1,71
365	- 2,95	+ 2,76

### 3.4.4. RMN

Le spectre est enregistré dans D<sub>2</sub>O/NaOD. Le témoin standard DSS donne des signaux à 0,6 PPM, 1,6 PPM et 2,9 PPM; ce dernier est confondu avec le signal dû aux CH<sub>2</sub> (d). Le pic intense à 4,85 PPM est celui de l'eau. L'attribution des pics est donné dans le *Tableau 3.2*.

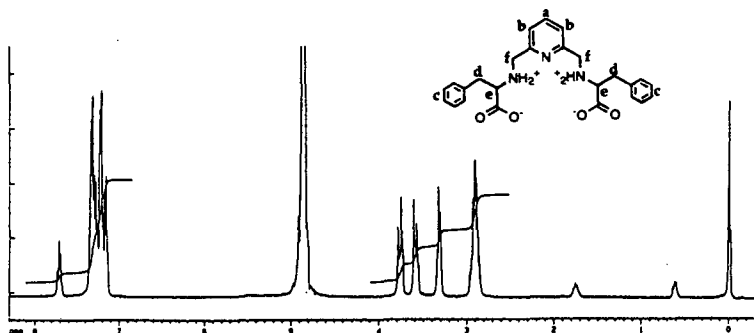


Fig. 3.4 Spectre RMN du ligand SS-phemp.

Tableau 3.2 Attribution des signaux RMN.

PPM	Intégral	Attribution
2,91 (m)	4	CH <sub>2</sub> (d)
3,33 (t)	2	CH (e)
3,58-3,79 (q)	4	CH <sub>2</sub> (f)
7,16-7,33 (m)	12	CH (b et c)
7,70 (t)	1	CH (a)

## 3.5. Titration du phemp

### 3.5.1. Constantes de dissociation du phemp

Les constantes d'acidité du phemp sont déterminées par titration potentiométrique. A cause de la faible solubilité du phemp, il est dissous en milieu alcalin avant d'être titré avec HCl à l'aide d'un potentiographe.

Nous avons effectué cinq mesures indépendantes: trois fois le (SS)-phemp et deux fois le (RR)-phemp. Pour chaque mesure, nous avons effectué deux titrations. La *Figure 3.5* donne un exemple de courbe de titration obtenue. Les constantes de dissociation ont été déterminés graphiquement à demi-titration, par la méthode de Schwarzenbach [44] et à l'aide d'un programme informatique. Les valeurs moyennes des  $pK_a$  sont données dans le *Tableau 3.3*.

#### Mode opératoire

Les solutions à titrer sont préparées ainsi: 0,0434 g ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol) de ligand sont dissous dans 50 ml d'une solution de NaOH 0,01M; 10 ml de  $KNO_3$  1M sont ajoutés et la solution est amenée à 100 ml avec de l'eau.

25 ml de cette solution ( $1 \cdot 10^{-5}$ M;  $\mu = 0,1$ ) sont introduits dans une cuve de titration thermostatée à 25 °C; un courant d'azote y barbote pendant 15 min puis la solution est titrée avec une solution de HCl 0,3M.

### 3.5.2. Constante de stabilité du complexe [Fe(phemp)]

Nous avons effectué six mesures indépendantes: deux fois le (SS)-phemp et quatre fois le (RR)-phemp. Pour chaque mesure, nous avons effectué deux titrations. La *Figure 3.5* donne un exemple de courbe de titration obtenue. La constante de stabilité, dont la valeur moyenne est donnée dans le *Tableau 3.3* est déterminée à l'aide d'un programme informatique.

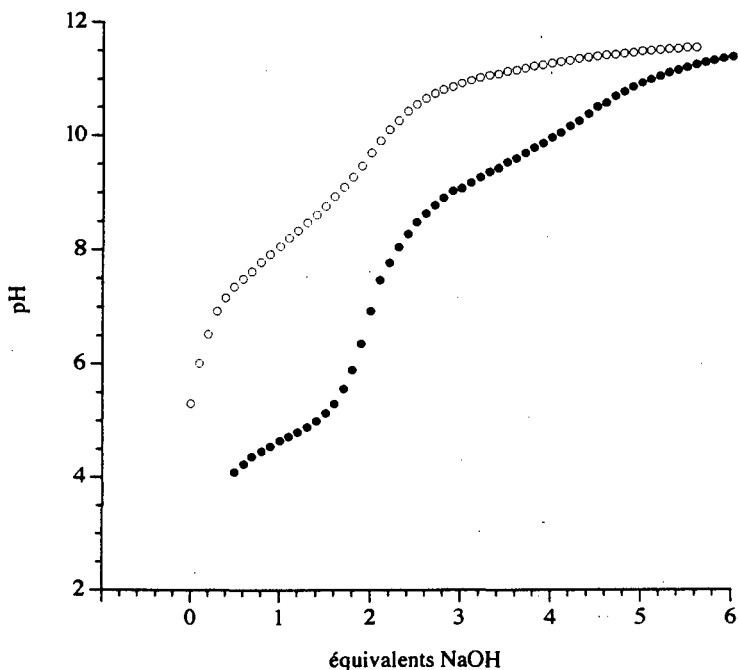


Fig. 3.5 Exemple de courbe de titration du phemp (o) et du complexe  $[Fe(phemp)]$  (●).

### Mode opératoire

0,133 g ( $3 \cdot 10^{-4}$  mol) du ligand (RR)- ou (SS)-phemp sont dissous dans 30 ml de NaOH 0,024M. A cette solution sont ajoutés 10 ml de  $KNO_3$  1M, 40 ml d'eau et 10 ml d'une solution de sel de Mohr  $3 \cdot 10^{-2}$ M dans HCl 0,012M. Le pH est ajusté à 7 si nécessaire et le volume de la solution est amené à 100 ml avec de l'eau.

25 ml de cette solution ( $3 \cdot 10^{-3}$ M;  $\mu = 0,1$ ) sont introduits dans une cuve de titration thermostatée à 25 °C; un courant d'azote y barbote pendant 15 min; 5 ml de NaOH 0,024M sont alors rapidement ajoutés et la solution est titrée avec une solution de HCl 0,4M (durée de la titration: 5 min.).

**Tableau 3.3** Comparaison des constantes de dissociation du ligand phemp avec les autres ligands [7] et comparaison des constantes de stabilité du complexe de fer(II) avec ces différents ligands.

	glymp	alamp	valmp	promp-HCl	phemp
PK <sub>a1</sub>	8,16 ± 0,05	8,24 ± 0,02	8,03 ± 0,04	9,33 ± 0,03	<b>7,39 ± 0,03</b>
PK <sub>a2</sub>	9,24 ± 0,05	9,06 ± 0,02	9,13 ± 0,02	10,02 ± 0,04	<b>8,74 ± 0,06</b>
log β	10,19 ± 0,04	9,75 ± 0,07	10,23 ± 0,05	12,68 ± 0,03	<b>9,71 ± 0,11</b>

### 3.5.3. Discussion

Si l'on compare les constantes de dissociation de la phénylalanine libre ( $pK_1 = 1,8$  et  $pK_2 = 9,1$ ), on constate que la substitution du reste méthyle pyridine sur la fonction amine abaisse le  $pK_a$  de cette dernière; cette observation est déjà faite pour les autres ligands [7] et s'explique par un affaiblissement de la densité électronique sur l'azote provoqué par un effet - E du noyau aromatique.

Lors de la titration du ligand comme du complexe, un précipité blanc est observé à partir d'un pH inférieur à 4,5. Cette précipitation nous a passablement gênée pour la titration du complexe de fer(II) (Figure 3.5) et la constante de stabilité (Tableau 3.3) peut être sujet à discussion comme le montre d'ailleurs l'erreur sur sa valeur. Pour toutes les titrations, nous avons fixé une limite arbitraire à  $pH = 4,5$  pour déterminer les constantes.

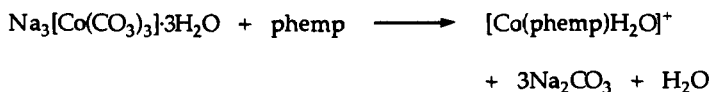
L'étude des courbes de titration du complexe de fer(II) montre un premier saut après deux équivalents qui correspond à la neutralisation des deux protons provenant du ligand. Cependant, après ce point, la courbe de titration ne rejoint pas celle du ligand.

L'ajout de 10 ml de NaOH 0,024M juste avant de titrer nous permet de voir (Figure 3.5) qu'il faut encore trois ou quatre équivalents pour que la courbe de titration rejoigne celle du ligand seul. Cependant, ici le problème de la précipitation de l'hydroxyde de fer(II) intervient.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces déprotonations supplémentaires sont d'une part la rupture de la coordination des carboxylates sur le métal au profit de molécules d'eau qui seraient ionisées et d'autre part la déprotonation de la molécule d'eau coordonnée en sixième position. Il est connu que la chimie en solution des complexes formés avec des ligands polyaminocarboxylates est particulièrement complexe [18] et qu'il existe souvent un équilibre entre plusieurs formes.

### 3.6. Synthèse du complexe [Co(phemp)H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

Le complexe [Co((RR)- ou (SS)-phemp)H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> est obtenu par réaction du Na<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O avec le ligand (RR) ou (SS)-phemp, par une méthode analogue à celle utilisée par Pousaz [45]. Le tricarbonatocobaltate de sodium trihydrate est synthétisé selon le mode opératoire donné à la référence [46].



2,8 g de tricarbonatocobaltate de sodium trihydrate et 0,3 g de charbon actif sont ajoutés à une suspension de 5,1 g de (SS)- ou (RR)-phemp dans 100 ml d'eau. Le mélange, dont le pH est maintenu entre 5 et 6 par adjonction d'acide acétique, est chauffé deux jours sous forte agitation à 50 °C. Une coloration rouge apparaît et le précipité dû au ligand disparaît. Le charbon actif est filtré sur buchner et la solution est chromatographiée sur une colonne Sephadex SP-C 25. Une partie du mélange réactionnel ne se fixe pas et est élué avec de l'eau. La fraction retenue, qui correspond au complexe [Co(phemp)H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, est éluée avec une solution de KNO<sub>3</sub> 0,1%.

Le solvant est éliminé par évaporation rotative et le complexe est dissous dans de l'éthanol afin d'éliminer la grande partie du sel en excès. Après filtration, l'alcool est éliminé par évaporation rotative et le précipité est redissous dans un peu d'eau et mis au frigo. Seulement une petite fraction du [Co(phemp)H<sub>2</sub>O]NO<sub>3</sub> recristallise et les analyses sont faites sur le précipité brut à l'exception du spectre RMN.

### 3.7. Analyse du $[\text{Co}(\text{phemp})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$

#### 3.7.1. VIS

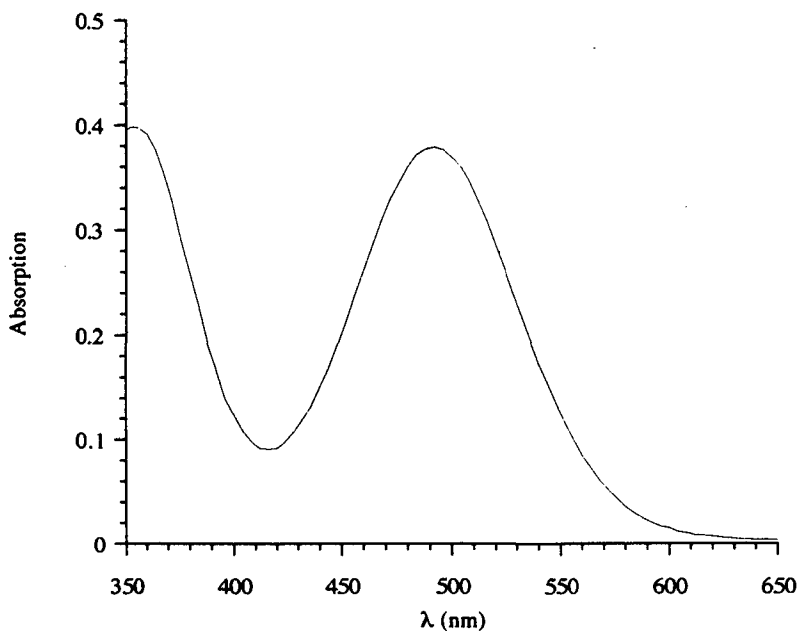


Fig. 3.6 Spectre visible du complexe  $[\text{Co}((\text{ss})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$   
( $\lambda_{\text{max}} = 492 \text{ nm}$ ).

#### 3.7.2. RMN

Le spectre est effectué dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Le témoin standard DSS donne des signaux à 0,6 PPM, 1,6 PPM et 2,9 PPM. Le pic intense à 4,85 PPM est celui de l'eau. L'attribution des pics est donné dans le *Tableau 3.4*.

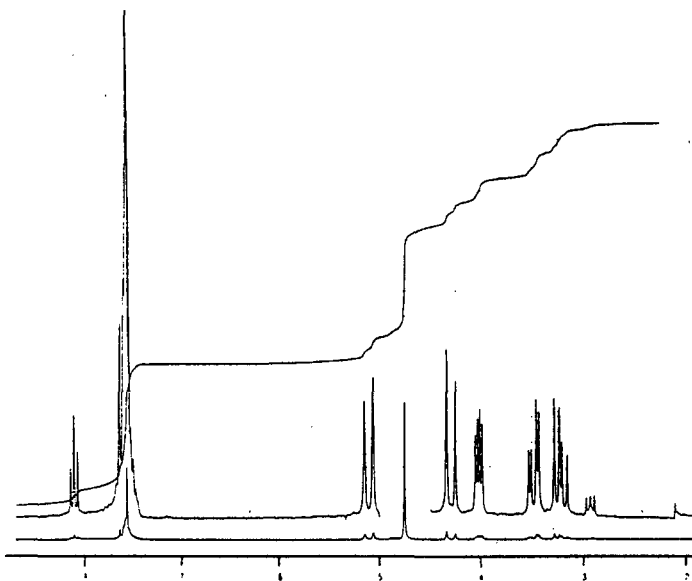


Fig. 3.7 Spectre RMN du complexe  $[\text{Co}((\text{ss})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ .

Tableau 3.4 Attribution des signaux RMN.

PPM	Intégral	Attribution
3,28-3,45 (m)	4	$\text{CH}_2$ (d)
4,03 (q)	2	CH (e)
4,3 (d)	2	$\text{CH}_{(1)}$ (f)
5,1 (d)	2	$\text{CH}_{(2)}$ (f)
7,55 (m)	12	CH (b et c)
7.63	2	NH
8,10 (t)	1	CH (a)

### 3.8. Spectres CD

Les spectres CD des complexes de cobalt (III) de même configuration ( $\Lambda$  ou  $\Delta$ ) montrent un spectre CD comparable [41, 43]. Par conséquent, il est possible d'attribuer une configuration absolue sur la base de cette mesure. La Figure 3.5 montre les spectres CD pour les complexes  $[\text{Co}((\text{RR})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]^+$  et  $[\text{Co}((\text{SS})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]^+$ .

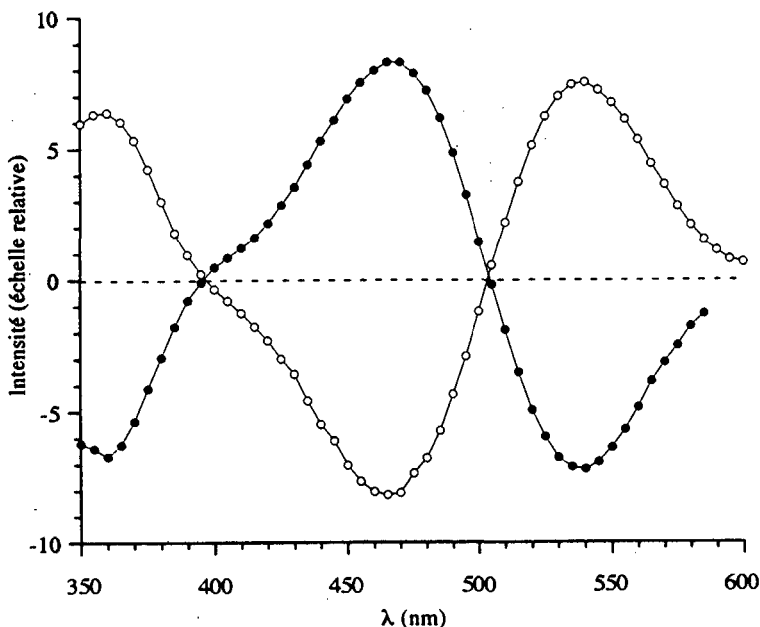


Fig. 3.8 Spectres CD des complexes de cobalt (III); ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ).  
 $\alpha$ :  $\Delta$ -[Co((RR)-promp)]<sup>+</sup>     $\bullet$ :  $\Lambda$ -[Co((SS)-promp)]<sup>+</sup>

Ces spectres CD sont semblables à ceux des complexes de cobalt(III) formés à partir des ligands (SS)- ou (RR)-alamp, valmp et promp; pour ce dernier, la forme  $\Lambda$ -exo est prouvée par la structure obtenue par diffraction aux rayons X [7]. Puisque ces ligands présentent un effet Cotton positif ou négatif vers 475 nm selon que la chiralité est respectivement S ou R au

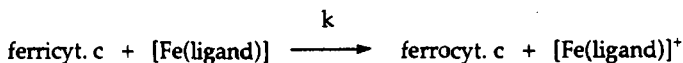
niveau du carbone asymétrique, il est donc possible d'attribuer la configuration absolue  $\Lambda$ -exo au complexe  $[\text{Co}((\text{SS})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]^+$  et la configuration absolue  $\Delta$ -exo au complexe  $[\text{Co}((\text{RR})\text{-phemp})\text{H}_2\text{O}]^+$ .

## 4. Mesures cinétiques

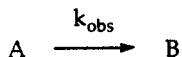
### 4.1. Traitement des données

#### 4.1.1. Modèles cinétiques

Le mécanisme simplifié du transfert d'électron entre le complexe réducteur [Fe(ligand)] et le ferricytochrome c s'écrit:



Dans les conditions du pseudo-premier ordre, le complexe réducteur est toujours en excès d'au moins dix fois par rapport à la protéine et sa concentration peut donc être considérée comme constante pendant la réaction. Le mécanisme de TE est ainsi du type d'une réaction irréversible d'ordre 1:



où  $k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{Fe(ligand)}]$ . La loi de vitesse s'écrit:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_{\text{obs}}[A]$$

Après intégration:

$$[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)$$

Avec la loi de Lambert-Beer,  $D = \epsilon \cdot l \cdot [A]$ :

$$V = (V_0 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t) + V_{\infty}$$

où  $V$  est le signal électrique mesuré, proportionnel à l'absorption  $D$ ,  $V_0$  le signal initial et  $V_{\infty}$  le signal à la fin de la réaction. Cette expression est l'équation mathématique de la courbe expérimentale attendue. Pour les cinétiques où la deuxième réaction est négligeable, les valeurs de  $V$ ,  $V_{\infty}$  et  $(V_0 - V_{\infty})$  ont été déterminées par régression non-linéaire à l'aide du programme *Kaleidagraph*.

La représentation graphique de  $\ln(V-V_\infty)$  en fonction du temps  $t$  doit donner une droite dont la pente est égale à  $-k_{obs}$  et l'ordonnée à l'origine  $\ln(V_0 - V_\infty)$ . La Figure 4.1 montre un exemple de cinétique obtenue pour la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$  dans l'eau à 25 °C ainsi que la courbe théorique calculée sur quatre demi-vies et la Figure 4.2 la représentation graphique  $\ln(V-V_\infty)$  en fonction du temps  $t$ , où  $V_\infty$  a la valeur trouvée pour la courbe théorique.

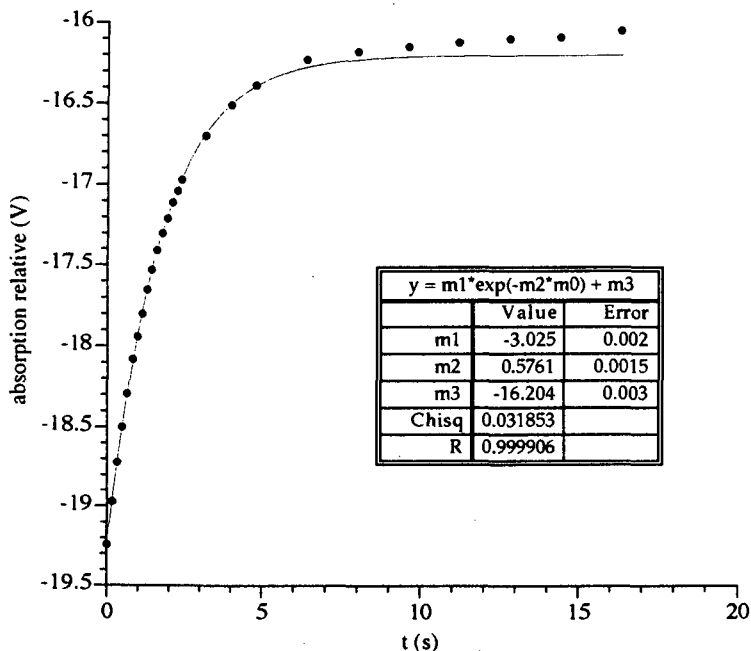


Fig. 4.1 Cinétique de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$  dans l'eau à 25 °C. Le tableau indique le résultat de la régression non-linéaire pour la fonction  $y$ ;  $m0$  est la variable temps;  $m1$ ,  $m2$  et  $m3$  sont les trois valeurs recherchées qui correspondent respectivement à  $(V_0 - V_\infty)$ ,  $k_{obs}$  et  $V_\infty$  (voir texte); Chisq est la somme quadratique moyenne et R le coefficient de corrélation.

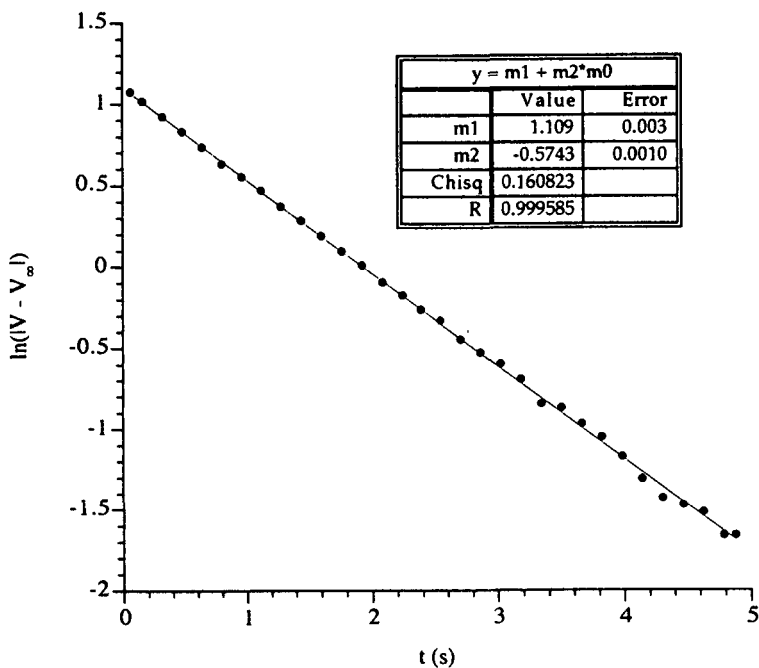
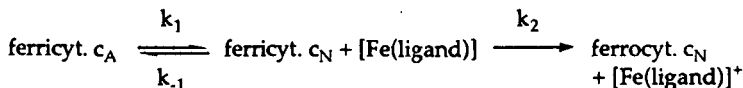


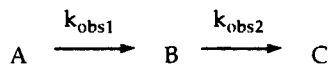
Fig. 4.2 Représentation graphique  $\ln(V - V_{\infty})$  en fonction du temps. Le tableau indique le résultat de la régression linéaire pour la fonction y; m1 et m2 correspondent respectivement à  $\ln(V_0 - V_{\infty})$  et  $-k_{obs}$  (Fig. 4.1).

Si maintenant l'on considère l'équilibre entre la forme native (ferricyt.  $c_N$ ) et la forme alcaline (ferricyt.  $c_A$ ) du ferricytochrome en admettant que la forme alcaline ne soit pas réductible, le mécanisme de transfert d'électron simplifié s'écrit:



Dans le cas où  $k_1$  et  $k_{-1} < k_2$ , la cinétique est biphasique. La première réaction, rapide, consiste à la réduction de la forme native et est caractérisée

par la constante de vitesse  $k_2$ ; la deuxième réaction, lente, est due au changement conformationnel de la protéine et peut être caractérisée par la constante de vitesse  $k_{obs1} = k_1 + k_{-1}$ . De plus, comme la concentration du réactif réducteur est beaucoup plus grande que celle de la protéine, elle peut être considérée comme constante et le mécanisme de transfert d'électron est du type de deux réactions consécutives non-réversibles d'ordre 1:



où  $k_{obs2} = k_2 \cdot [Fe(ligand)]$ . Les lois de vitesses s'écrivent:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_{obs1} \cdot [A] \quad \text{et} \quad \frac{d[B]}{dt} = k_{obs1} \cdot [A] - k_{obs2} \cdot [B]$$

Après intégration et en tenant compte de l'équation de Lambert-Beer, la forme mathématique de la courbe cinétique expérimentale est trouvée comme devant être égale à:

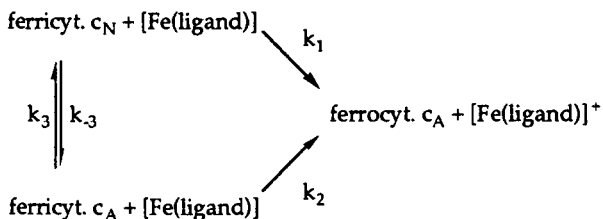
$$V = \alpha \cdot \exp(-k_{obs1} \cdot t) + \beta \cdot \exp(-k_{obs2} \cdot t) + V_{\infty}$$

avec les constantes  $\alpha$  et  $\beta$  égales à:

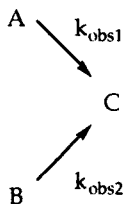
$$\alpha = \frac{(\epsilon_B - \epsilon_A) \cdot k_{obs1} + (\epsilon_A - \epsilon_C) \cdot k_{obs2}}{k_{obs2} - k_{obs1}} [A]_0 \quad \text{et} \quad \beta = \frac{(\epsilon_C - \epsilon_B) \cdot k_{obs1} \cdot [A]_0}{k_{obs2} - k_{obs1}}$$

$\epsilon_A$  et  $\epsilon_B$  sont respectivement les coefficients d'absorption molaire des formes alcaline et native du ferricytochrome c et  $\epsilon_C$  celui de la forme réduite;  $[A]_0$  est la concentration initiale de la forme alcaline de la protéine.

Si la forme alcaline est aussi réductible, le mécanisme de transfert d'électron s'écrit:



Puisque le réactif réducteur [Fe(ligand)] est en excès par rapport à la protéine, sa concentration peut donc être considérée comme constante pendant la réaction; de plus, si la vitesse de l'établissement de l'équilibre entre les formes native et alcaline est considérée comme négligeable, le mécanisme de transfert d'électron est du type de deux réactions parallèles non-réversibles d'ordre 1:



où  $k_{obs1} = k_1 \cdot [Fe(ligand)]$  et  $k_{obs2} = k_2 \cdot [Fe(ligand)]$ . Les lois de vitesse s'écrivent:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_{obs1} \cdot [A] \quad \text{et} \quad \frac{-d[B]}{dt} = k_{obs2} \cdot [B]$$

Après intégration et en tenant compte de l'équation de Lambert-Beer, la forme mathématique de la courbe cinétique expérimentale est trouvée comme devant être égale à:

$$V = \alpha \cdot \exp(-k_{obs1} \cdot t) + \beta \cdot \exp(-k_{obs2} \cdot t) + V_{\infty}$$

avec les constantes  $\alpha$  et  $\beta$  égales à:

$$\alpha = (\epsilon_A - \epsilon_C) \cdot l \cdot [A]_0 \quad \text{et} \quad \beta = (\epsilon_B - \epsilon_C) \cdot l \cdot [B]_0$$

$\epsilon_A$  et  $\epsilon_B$  sont respectivement les coefficients d'absorption molaire des formes alcaline et native du ferricytochrome c et  $\epsilon_C$  celui de la forme réduite;  $[A]_0$  est la concentration initiale de la forme native de la protéine,  $[B]_0$  celle de la forme alcaline;  $l$  est la longueur de la cuve de mesure.

Dans les deux cas, la forme mathématique de la courbe cinétique est identique. Les coefficients  $\alpha$  et  $\beta$  ne sont cependant pas identiques et, d'autre part, si la forme alcaline du ferricytochrome c est réductible, alors la constante de vitesse observée de la réduction,  $k_{obs}$ , doit être proportionnelle à la concentration de complexe [Fe(ligand)].

Pour les cinétiques où la deuxième réaction n'est pas négligeable, les valeurs de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_{obs1}$ ,  $k_{obs2}$  et  $V_{\infty}$  ont été déterminées par régression non-linéaire à l'aide du programme *Kaleidagraph*. La Figure 4.3 montre un exemple de cinétique obtenue pour la réduction du ferricytochrome c par le complexe [Fe((RR)-promp)] dans l'eau en présence de 20% d'éthanol absolu à 30 °C et la courbe théorique calculée.

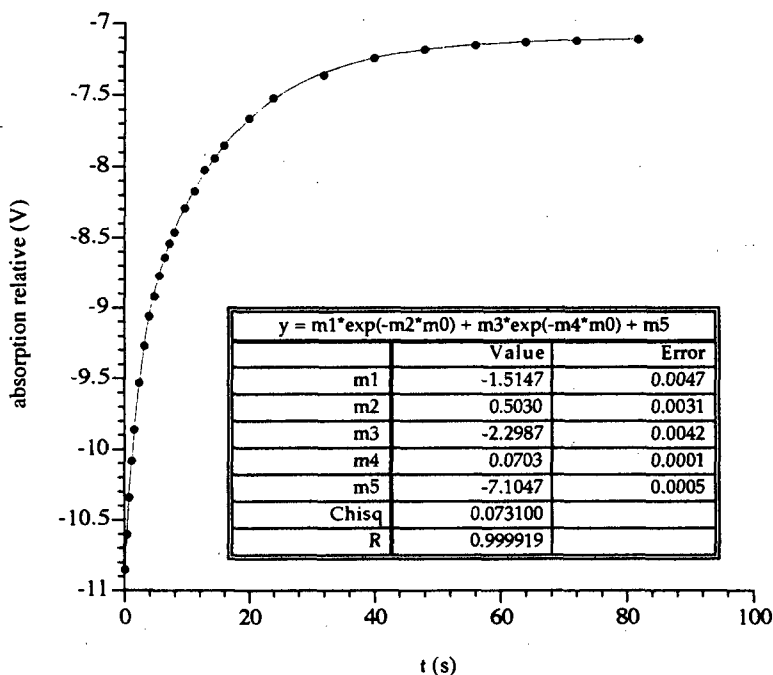


Fig. 4.3 Cinétique de la réduction du ferricytochrome c par le complexe [Fe((RR)-promp)] en présence de 20% d'éthanol à 30 °C. Le tableau indique le résultat de la régression non-linéaire pour la fonction y; m1, m2, m3, m4 et m5 sont les cinq valeurs recherchées qui correspondent respectivement à  $\alpha$ ,  $k_{obs1}$ ,  $\beta$ ,  $k_{obs2}$  et  $V_{\infty}$  (voir texte et Fig. 4.1).

#### 4.1.2. Détermination de la constante de vitesse

Quel que soit le modèle cinétique, si la réaction de réduction de la protéine est du pseudo-premier ordre, la constante de vitesse mesurée  $k_{\text{obs}}$  est égale à:

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{Fe}(\text{ligand})]$$

Par conséquent, une représentation graphique de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe réducteur donne une droite dont la pente vaut  $k$ .

#### 4.1.3. Détermination des enthalpie et entropie d'activation

La théorie des états de transition dit que la vitesse d'une réaction chimique peut être formulée en fonction de son complexe activé. La relation entre la vitesse de réaction et les paramètres énergétiques d'activation est donnée par l'équation d'Eyring:

$$k = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}\right)$$

où  $k$  est la constante de vitesse,  $k$  la constante de Boltzmann,  $h$  la constante de Planck,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température exprimée en Kelvin.

Une représentation graphique de  $\ln \frac{k}{T}$  en fonction de  $\frac{1}{T}$  donne une droite de pente égale à  $-\frac{\Delta H^\ddagger}{R}$  et dont l'ordonnée à l'origine vaut  $\ln \frac{k}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$ .

## 4.2. Partie expérimentale

### 4.2.1. Préparation des solutions

Toutes les solutions sont purgées à l'argon et maintenues sous atmosphère inerte durant toute la durée des mesures.

#### Préparation du tampon Tris

Un milieu tamponné à  $\text{pH} = 7,5$  a été choisi à cause du ligand phemp. En effet, en raison de la faible solubilité de ce ligand, il est impossible de préparer une solution de complexe de fer(II) en présence d'un excès de ligand. Avec un rapport métal - ligand 1:1, c'est à ce  $\text{pH}$  que le complexe est formé pratiquement à 100%. D'autre part, certains problèmes de solubilité du complexe disparaissent à  $\text{pH} = 7,5$ .

Le volume nécessaire ( $\sim 200$  ml) d'une solution de HCl 0,2M est ajouté à 250 ml d'une solution 0,2M de tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (Fluka, puriss p.a.;  $\text{pK}_a = 8.1$ ) pour obtenir une solution tampon  $\text{pH} = 7,5$  et de force ionique  $\mu = 0,1$ . Le tampon est préparé fraîchement pour chaque série de mesures avec de l'eau bidistillée et dégazée, pure ou mélangée à un certain pourcentage d'alcool absolu, et conservé sous argon.

#### Préparation de la solution de ferricytochrome c

La protéine, d'origine commerciale (Fluka, 80%<sub>CE</sub>,  $\text{PM} = 13000$ ), est employée tel quel sans aucune purification. La solution de protéine est toujours préparée de la même manière: le ferricytochrome c est pesé précisément dans un ballon jaugé de 50 ml et dissous dans le tampon. Avant chaque série de mesures cinétiques, un spectre visible de la solution de protéine est enregistré afin de contrôler sa concentration et sa pureté. Après les mesures, un nouveau spectre avec le reste de solution est enregistré. Toutes les mesures montrent d'une part une légère dénaturation de la protéine durant la journée et d'autre part que la concentration de la solution est égale aux indications du fabricant.

### Préparation du complexe

Dans un ballon jaugé de 100 ml, les quantités nécessaires de sel de Mohr (Merck, pro analysi) et de ligand sont pesées précisément pour avoir des concentrations d'environ  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$  ou  $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$  en fer(II) et  $4,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$  ou  $9 \cdot 10^{-3} \text{M}$  en ligand. Sous atmosphère d'argon, les deux substances sont dissoutes dans le tampon, le pH ajusté à 7,5 par ajout de quelques gouttes d'une solution de NaOH 1M et le volume de la solution est complété à 100 ml avec le tampon Tris.

Les solutions de concentration inférieure sont préparées par dilution de la solution la plus concentrée avec le tampon Tris.

A cause de la faible solubilité du phemp, le complexe [Fe(phemp)] doit être préparé différemment et il n'est pas possible d'avoir un excès de ligand par rapport au métal. Une solution  $3 \cdot 10^{-2} \text{M}$  de sel de Mohr dans HCl 0,1M est préparée. Dans un ballon jaugé de 100 ml, la quantité nécessaire de phemp pour avoir une concentration  $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$  est pesée précisément. Sous argon, la substance est dissoute dans 40 ml de NaOH 0,1M; 10 ml de la solution de sel de Mohr sont alors ajoutés, le pH est ajusté à 7,5 par ajout de quelques gouttes d'une solution de NaOH 1M et le volume est complété à la jauge avec le tampon. Dans ces conditions, la force ionique est toujours de 0,1.

### Vérification de la pureté des ligands synthétisés

Les spectres CD des complexes de cuivre formés avec les énantiomères d'un ligand donné sont enregistrés. Les solutions sont préparées à partir d'une quantité toujours identique d'un énantiomère donné et d'un excès toujours identique de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Vu la sensibilité de la méthode, la symétrie parfaite des spectres des énantiomères d'un complexe donné doit signifier que les deux isomères optiques ont la même pureté.

#### **4.2.2. Conditions expérimentales**

Toutes les cinétiques sont mesurées dans les conditions du pseudo-premier ordre. La concentration en complexe est au moins dix fois supérieure à celle de la protéine. Pour chaque série de mesures, la même solu-

tion de protéine est utilisée pour les deux énantiomères du complexe donné. Ainsi, les conditions réactionnelles sont les mêmes pour chaque énantiomère et les résultats peuvent être comparés.

Pour chaque complexe étudié, au moins quatre séries de mesures sont effectuées, deux pour étudier l'influence de la variation de concentration du complexe à 25 °C et deux pour étudier l'influence de la température dans un domaine allant de ~ 0 °C à 50 °C.

Toutes les cinétiques sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre stopped-flow (High Tech SF-3L) en suivant la variation de l'absorption à la longueur d'onde  $\lambda = 550$  nm. Au moins cinq injections sont effectuées pour chaque condition. Les données sont visualisées et enregistrées sur ordinateur à l'aide du programme *Dcrunch 2*.

## 5. Réduction du cytochrome c dans l'eau

### 5.1. Généralités

Les constantes de vitesse et les paramètres d'activation calculés pour la réaction de réduction du ferricytochrome c par les complexes de fer(II) formés avec les ligands alamp, promp ou phemp sont donnés dans le *Tableau 5.1*. Toutes les constantes de vitesses ont été calculées sur quatre demi-vies.

La courbe cinétique donnée à la *Figure 4.1* montre que la réaction est biphasique. La première partie de cette courbe correspond à une cinétique du pseudo-premier ordre comme le montre la linéarité de la représentation graphique des  $k_{obs}$ , calculées sur quatre demi-vies, en fonction de la concentration de complexe (*Fig. 4.2*). La deuxième partie de la courbe, plus marquée à des températures élevées, correspond à une réaction beaucoup plus lente qui est discutée au chapitre 7.

Une représentation d'Eyring des mesures en fonction de la température montre une linéarité plus ou moins bonne jusqu'à 45 °C. Les paramètres d'activation ont donc été calculés sur le domaine de température allant de ~ 0 °C à 45 °C.

Même avec un faible barbotage d'argon, les solutions de [Fe(phemp)] font énormément de bulles qui se transforment au cours de la journée en une espèce de légère mousse verdâtre. Il s'agit peut-être de la précipitation de fer(II) sous forme d'hydroxyde, ce qui signifie que la concentration en complexe doit diminuer. D'ailleurs les mesures effectuées en fin de journée ne sont plus utilisables. Par conséquent, les résultats obtenus avec le complexe [Fe(phemp)] sont à manipuler avec précaution car ils sont entachés d'une certaine erreur comme le montre les droites qui ne passent pas par zéro.

## 5.2. Réduction par le complexe [Fe(promp)]

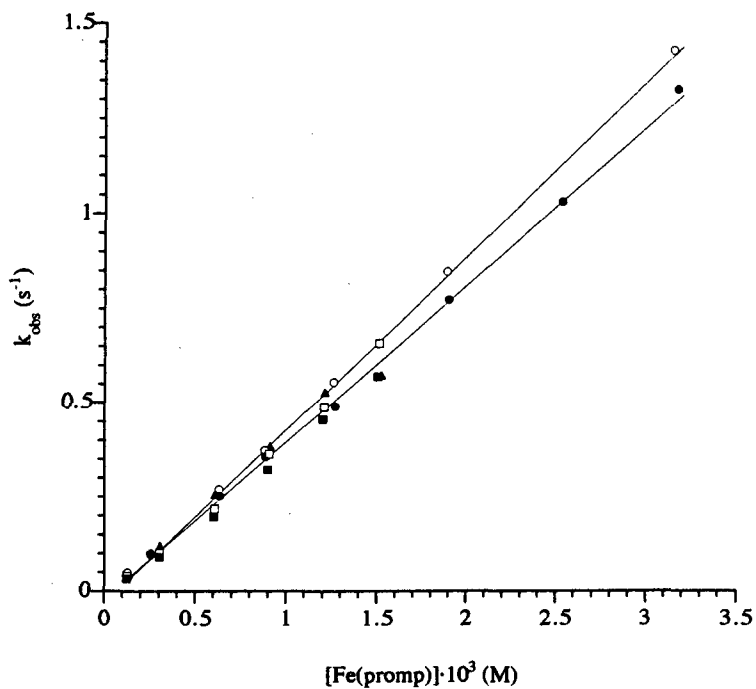


Fig. 5.1 Variation de  $k_{obs}$  en fonction de la concentration du complexe [Fe(promp)] à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ).

- ▲  $\Lambda$ -[Fe((SS)-promp)]  $c_{yt.c} = 1,27 \cdot 10^{-5} M$
- $\Delta$ -[Fe((SS)-promp)]  $c_{yt.c} = 1,32 \cdot 10^{-5} M$
- $\Lambda$ -[Fe((SS)-promp)]
- $\Delta$ -[Fe((SS)-promp)]  $c_{yt.c} = 1,32 \cdot 10^{-5} M$
- $\Lambda$ -[Fe((SS)-promp)]

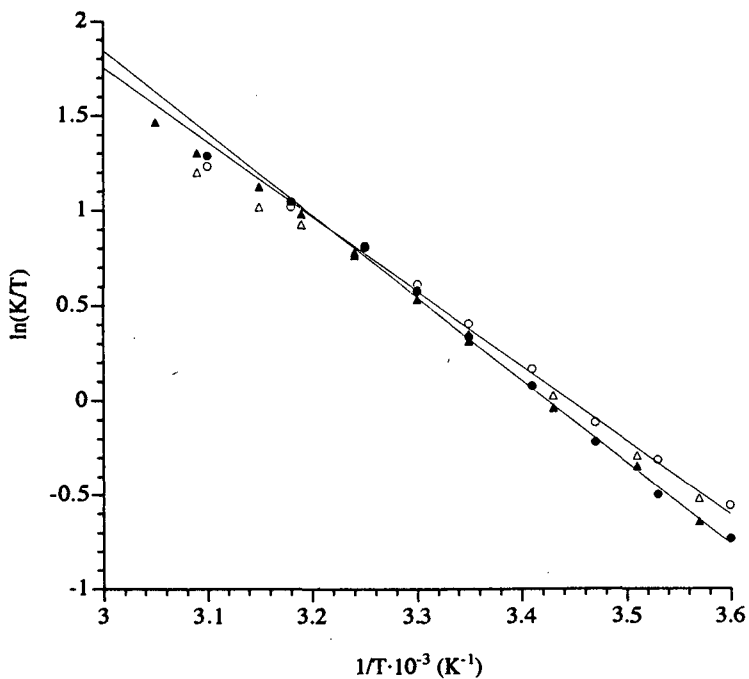


Fig. 5.2 Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe [Fe(promp)] ( $\mu = 0,1$ ).

- ▲  $c_{\text{[A-Fe((RR)-promp)]}} = 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$        $c_{\text{cyt c}} = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- ▲  $c_{\text{[A-Fe((SS)-promp)]}} = 1,52 \cdot 10^{-3} \text{ M}$        $c_{\text{cyt c}} = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- $c_{\text{[A-Fe((RR)-promp)]}} = 1,52 \cdot 10^{-3} \text{ M}$        $c_{\text{cyt c}} = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- $c_{\text{[A-Fe((SS)-promp)]}} = 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$        $c_{\text{cyt c}} = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

### 5.3. Réduction par le complexe [Fe(alamp)]

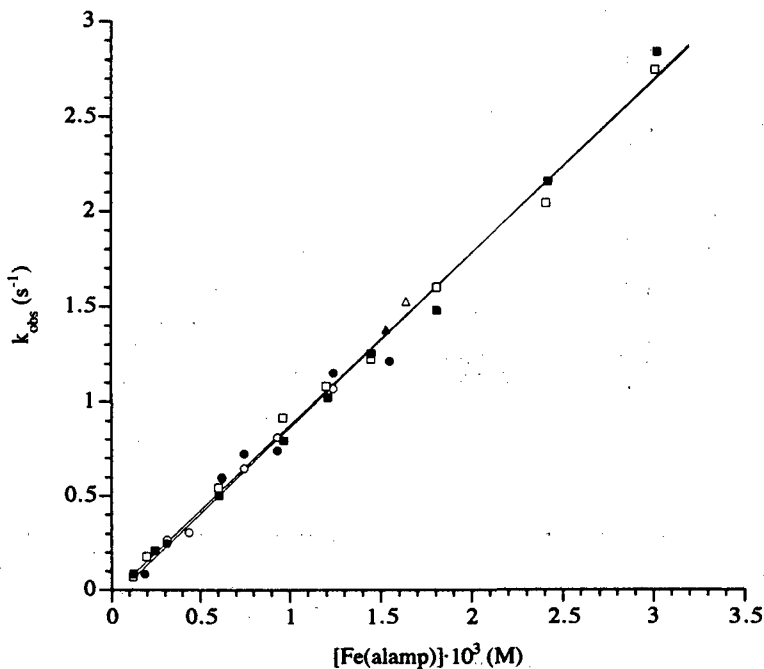


Fig. 5.3 Variation de  $k_{obs}$  en fonction de la concentration du complexe [Fe(alamp)] à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ).

$\blacktriangle$   $\Lambda$ -[Fe((RR)-alamp)]  $c_{\text{cyl. c}} = 1,32 \cdot 10^{-5} M$

$\blacktriangle$   $\Lambda$ -[Fe((SS)-alamp)]

$\circ$   $\Delta$ -[Fe((RR)-alamp)]  $c_{\text{cyl. c}} = 1,24 \cdot 10^{-5} M$

$\bullet$   $\Lambda$ -[Fe((SS)-alamp)]

$\square$   $\Delta$ -[Fe((RR)-alamp)]  $c_{\text{cyl. c}} = 1,28 \cdot 10^{-5} M$

$\blacksquare$   $\Lambda$ -[Fe((SS)-alamp)]

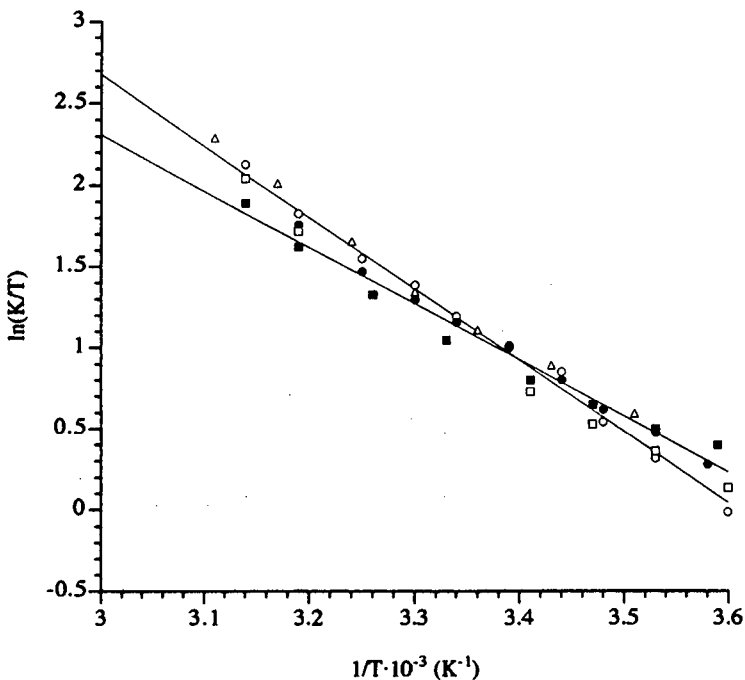


Fig. 5.4 Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[Fe(alamp)]$  ( $\mu = 0,1$ ).

- ▲  $c_{[A-Fe((RR)-alamp)]} = 1,54 \cdot 10^{-3} M$        $c_{\text{cyt c}} = 1,34 \cdot 10^{-5} M$
- $c_{[A-Fe((RR)-alamp)]} = 1,22 \cdot 10^{-3} M$        $c_{\text{cyt c}} = 1,27 \cdot 10^{-5} M$
- $c_{[A-Fe((SS)-alamp)]} = 1,22 \cdot 10^{-3} M$
- $c_{[A-Fe((RR)-alamp)]} = 1,41 \cdot 10^{-3} M$        $c_{\text{cyt c}} = 1,23 \cdot 10^{-5} M$
- $c_{[A-Fe((SS)-alamp)]} = 1,41 \cdot 10^{-3} M$

## 5.4. Réduction par le complexe [Fe(phemp)]

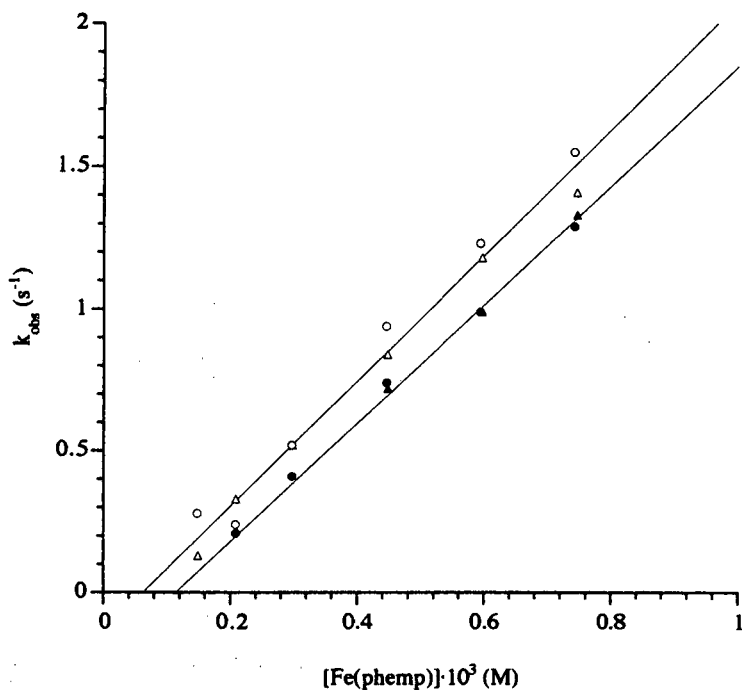


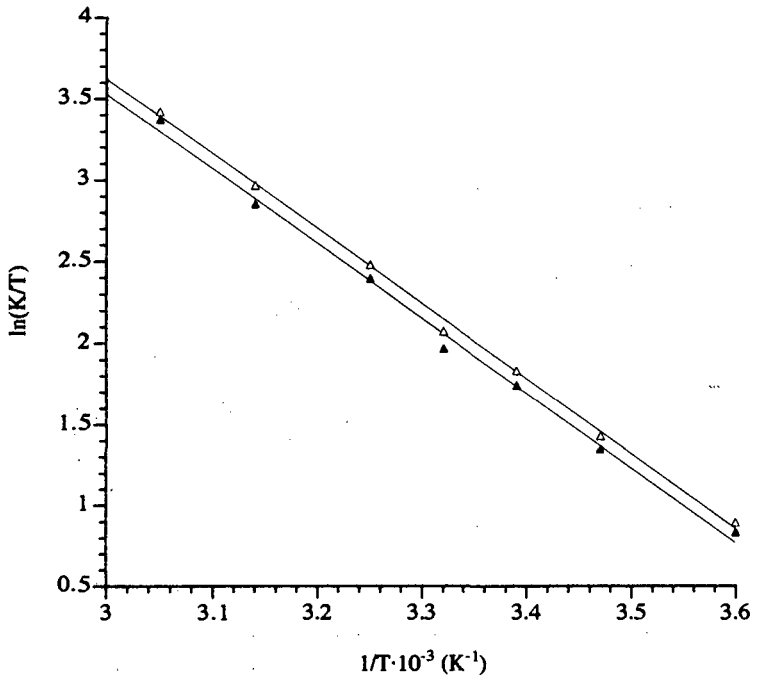
Fig. 5.5 Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe [Fe(phemp)] à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ; tampon phosphate; pH = 7).

▲  $\Lambda$ -[Fe((RR)-phemp)]  $c_{\text{cyt.c}} = 0,87 \cdot 10^{-5} \text{M}$

▲  $\Lambda$ -[Fe((SS)-phemp)]

○  $\Delta$ -[Fe((RR)-phemp)]  $c_{\text{cyt.c}} = 0,93 \cdot 10^{-5} \text{M}$

●  $\Lambda$ -[Fe((SS)-phemp)]



**Fig. 5.6** Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  ( $\mu = 0,1$ ; tampon phosphate;  $\text{pH} = 7$ ).

▲  $C_{[\text{A-Fe}(\text{RR-phemp})]} = 0,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

$C_{\text{cyt c}} = 0,93 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

▲  $C_{[\text{A-Fe}(\text{SS-phemp})]} = 0,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

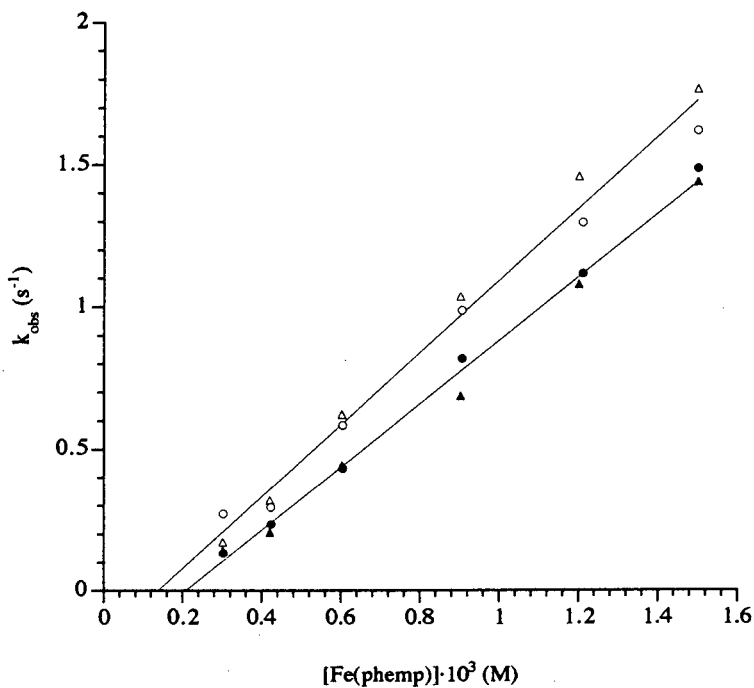
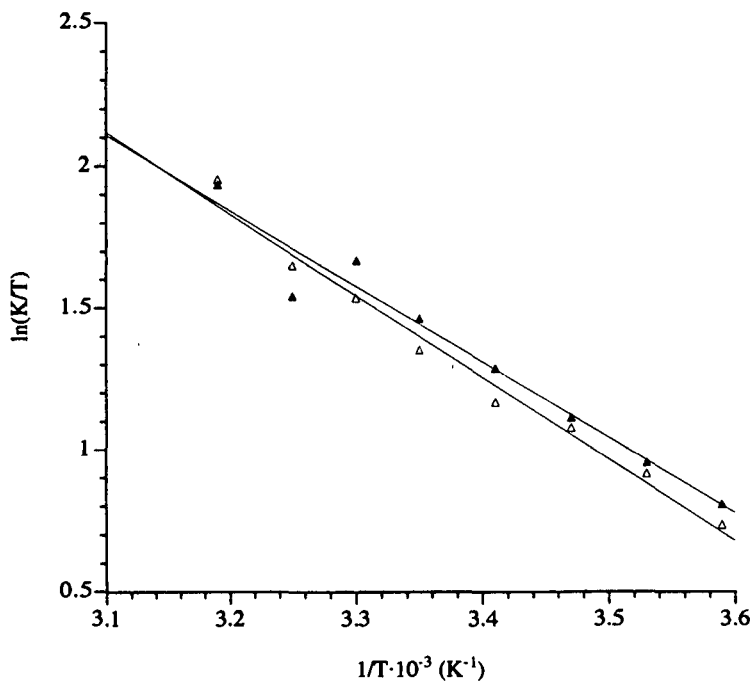


Fig. 5.7 Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  à 25 °C. ( $\mu = 0,1$ ; tampon Tris;  $\text{pH} = 7$ ).

- ▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-phemp})]$   $c_{\text{cyt } c} = 1,70 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- ▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-phemp})]$
- $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-phemp})]$   $c_{\text{cyt } c} = 1,70 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-phemp})]$

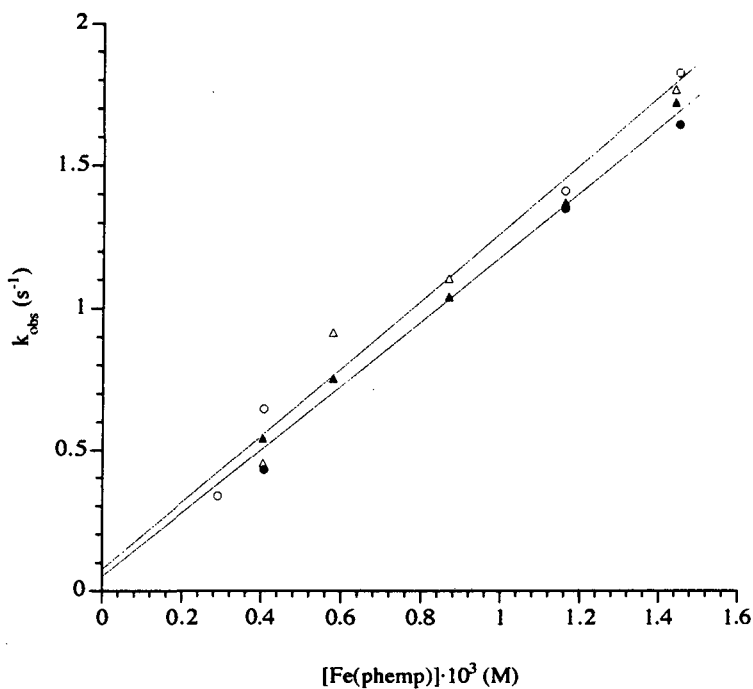


**Fig. 5.8** Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  ( $\mu = 0,1$ ; tampon Tris;  $\text{pH} = 7$ ).

▲  $c_{[\text{A-Fe}(\text{RR-phemp})]} = 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

$c_{\text{cyt c}} = 1,73 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

▲  $c_{[\text{A-Fe}(\text{SS-phemp})]} = 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$



**Fig. 5.9** Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ; tampon Tris; pH = 7,5).

- ▲  $\Lambda$ -[Fe((RR)-phemp)]  $c_{\text{cyt c}} = 1,28 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- ▲  $\Lambda$ -[Fe((SS)-phemp)]
- $\Delta$ -[Fe((RR)-phemp)]  $c_{\text{cyt c}} = 1,26 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $\Lambda$ -[Fe((SS)-phemp)]

## 5.5. Discussion

La représentation graphique de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration de complexe est toujours linéaire, ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une réaction du pseudo-premier ordre. Dans le cas du phemp, pour les mesures à  $\text{pH} = 7$  avec le tampon phosphate ou le tampon Tris, la droite ne passe pas par 0. Ce comportement peut être attribué au fait que le complexe n'est pas formé quantitativement à ce  $\text{pH}$ . D'ailleurs, ce comportement disparaît à  $\text{pH} = 7,5$  où la différence observée est comprise dans l'erreur.

Malgré l'imprécision des mesures, les constantes de vitesse calculées sont quand même significatives pour montrer un comportement nettement différent pour le complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  (Tableau 5.1). Alors que ce complexe présente les substituants les plus volumineux, des groupes benzyles, qui devraient empêcher une bonne approche de la protéine et donc augmenter la distance de transfert d'électron, il réagit plus rapidement que les autres complexes. Les raisons sont sans doute qu'il réagit à un site différent des autres complexes mais aussi que les groupes benzyles peuvent interagir avec certains résidus hydrophobes et favoriser ainsi l'interaction entre le complexe et la protéine.

Une autre observation importante est que la constante de vitesse pour la réduction du cytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  est deux fois plus grande dans le tampon phosphate que dans le tampon Tris. Ce comportement est également observé par Sakaki [11] pour l'oxydation du ferrocyclochrome c par le complexe  $[\text{Co}(\text{bipy})_3]^{3+}$  où la constante de vitesse dans le tampon phosphate est aussi le double de celle dans le tampon Tris. Il est connu que le phosphate se lie au cytochrome c sur le devant de la protéine près du coin exposé de l'hème [18]. Il se fixe sur des résidus lysines, ce qui a pour conséquence de diminuer la charge du site de transfert d'électron, de le rendre moins polaire, mais aussi de rompre des liaisons hydrogènes dans la protéine, ce qui la rendrait plus flexible, en particulier au niveau de sa crevasse hémique. Cette flexibilité, liée à une plus grande hydrophobicité favoriserait l'approche d'un réactif lui-même à caractère hydrophobe comme le complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$ .

Tableau 5.1 Constantes de vitesse, stéréosélectivité et paramètres d'activation pour la réduction du ferricyochrome c par des complexes de fer(II) optiquement actifs.

Complexe	$k^a)$ [ $10^2 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	$\Delta H^\ddagger$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\ddagger$ [J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta \Delta H_{A-A}^\ddagger$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta \Delta S_{A-A}^\ddagger$ [J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	$T \Delta \Delta S_{A-A}^\ddagger$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta$ -[Fe(alamp)] <sup>b)</sup>	9,0 ± 0,2	36,5 ± 0,9	-66 ± 3	+ 7,7	+ 26	+ 7,75
$\Lambda$ -[Fe(alamp)] <sup>b)</sup>	9,1 ± 0,2	28,8 ± 1,0	-92 ± 3			
$\Delta$ -[Fe(promp)] <sup>b)</sup>	4,58 ± 0,07	31,5 ± 0,7	-89 ± 2	-4,4	-15	-4,47
$\Lambda$ -[Fe(promp)] <sup>b)</sup>	4,15 ± 0,07	35,9 ± 0,5	-74 ± 2			
$\Delta$ -[Fe(phemp)] <sup>b)</sup>	11,9 ± 0,7	-	-			
$\Lambda$ -[Fe(phemp)] <sup>b)</sup>	11,3 ± 0,7	-	-			
$\Delta$ -[Fe(phemp)] <sup>c)</sup>	12,7 ± 0,5	23,9 ± 1,2	-106 ± 4			
$\Lambda$ -[Fe(phemp)] <sup>c)</sup>	11,1 ± 0,3	22,1 ± 1,9	-111 ± 7			
$\Delta$ -[Fe(phemp)] <sup>d)</sup>	22,1 ± 0,9	38,3 ± 0,8	-52 ± 3			
$\Lambda$ -[Fe(phemp)] <sup>d)</sup>	20,9 ± 0,5	38,2 ± 1,1	-54 ± 4			

<sup>a)</sup> à 25 °C; <sup>b)</sup> tampon Tris pH = 7,5; <sup>c)</sup> tampon Tris pH = 7,0; <sup>d)</sup> tampon phosphate pH = 7,0.

Pour les autres complexes, la constante de vitesse du deuxième ordre est deux fois plus grande pour la réaction avec le complexe [Fe(alamp)] qu'avec le complexe [Fe(promp)]. A priori, cette différence est logique puisque le ligand promp a des substituants plus volumineux que le ligand alamp; par conséquent, le complexe [Fe(alamp)] devrait mieux s'approcher de la protéine et la distance de transfert d'électron être plus courte. Cette hypothèse n'est cependant pas confirmée par la différence faible entre les enthalpies d'activation des deux complexes. Par contre, les potentiels d'oxydoréduction des deux complexes, 80 mV pour [Fe(alamp)] et 170 mV pour [Fe(promp)] dans le tampon phosphate [7], peuvent expliquer en partie la différence de réactivité puisque le complexe formé avec le ligand alamp est meilleur réducteur que celui formé avec le complexe promp. D'autre part, des mesures de stéréosélectivité lors de la réduction du complexe [Co(promp)im]<sup>+</sup> (im = imidazole) et les complexes [Fe(alamp)] et [Fe(promp)] semblent indiquer un mécanisme de transfert d'électron différent [47]. Par conséquent, cette différence des vitesses pourrait aussi être attribuée à des sites de transfert d'électron différents: dans la région de la surface de la protéine favorable au transfert d'électron, les complexes [Fe(alamp)] et [Fe(promp)] viennent s'imbriquer avec des orientations différentes. Cette hypothèse est renforcée par l'inversion des  $\Delta\Delta H_{\Delta-\Lambda}^\ddagger$  et  $\Delta\Delta S_{\Delta-\Lambda}^\ddagger$  (Tableau 5.1) pour les deux complexes (voir plus loin).

Une stéréosélectivité est observée pour les deux complexes [Fe(alamp)] et [Fe(promp)]. Aucun phénomène de saturation n'est observé et par conséquent il est impossible de dire si la reconnaissance chirale intervient lors de la formation du complexe précurseur ou lors du transfert d'électron lui-même.

La stéréosélectivité mesurée varie en fonction de la température comme le montre la représentation graphique  $\ln(k_A/k_\Lambda)$  en fonction de  $1/T$  (Fig. 5.10). Cette représentation montre clairement une inversion de la stéréosélectivité à partir de la température  $T_i$  qui est approximativement 25 °C pour le complexe [Fe(alamp)] et 30 °C pour le complexe [Fe(promp)].

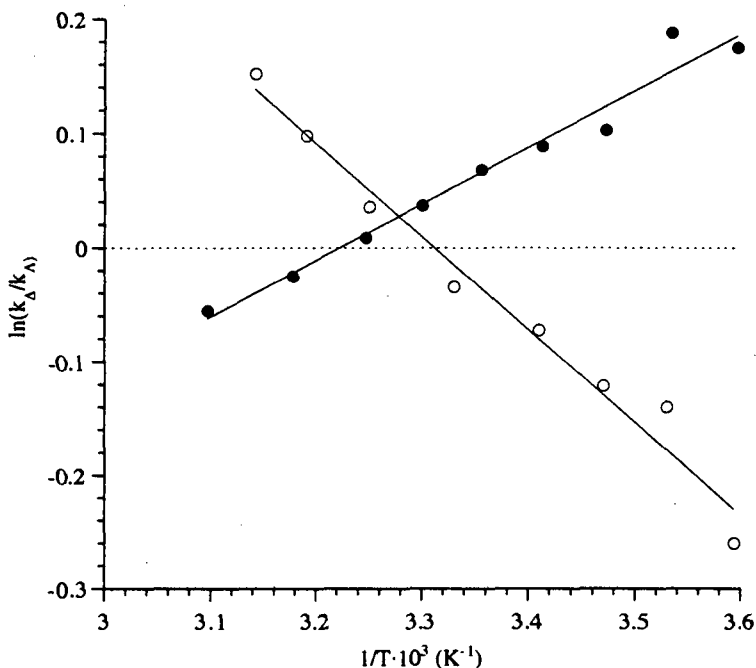


Fig. 5.10 Stéréosélectivité en fonction de la température pour la réduction du cytochrome c par les énantiomères des complexes [Fe(alamp)] (o) et [Fe(promp)] (●).

Ces mesures avec le cytochrome c confirment les observations déjà faites pour les réactions avec la plastocyanine et la ferredoxine [7, 8, 9, 48] que la stéréosélectivité doit dépendre du phénomène de compensation entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation. Ce phénomène de compensation est mis en évidence par une représentation graphique  $\Delta H^\ddagger = f(\Delta S^\ddagger)$  qui est linéaire; car plus la valeur de  $\Delta H^\ddagger$  augmente, plus celle de  $\Delta S^\ddagger$  augmente. (Fig. 5.11).

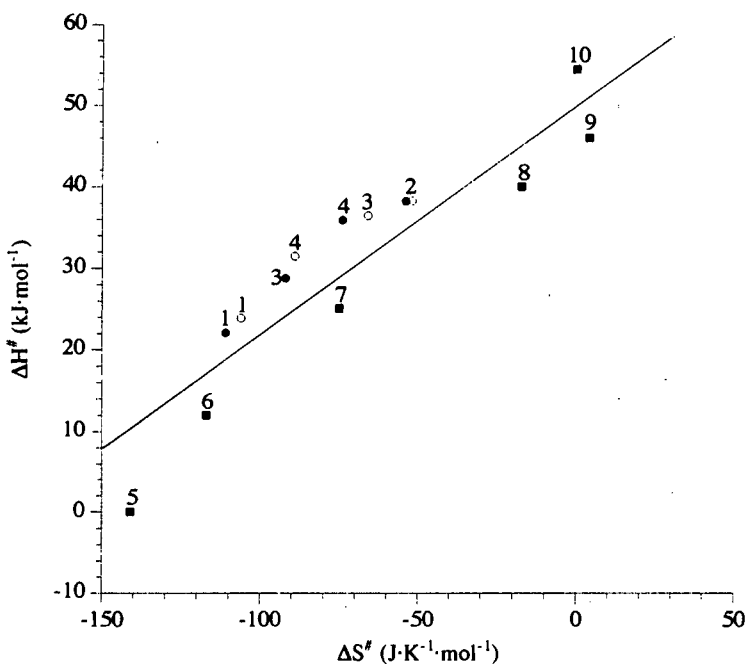


Fig. 5.11 Représentation isocinétique pour la réduction du ferricytochrome c par différents réactifs.

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 1 ○: Δ-[Fe(phemp)]                  | 1 ●: Λ-[Fe(phemp)] (Tris)                                  |
| 2 ○: Δ-[Fe(phemp)]                  | 2 ●: Λ-[Fe(phemp)] (phosphate)                             |
| 3 ○: Δ-[Fe(alamp)]                  | 3 ●: Λ-[Fe(alamp)]   |
| 4 ○: Δ-[Fe(promp)]                  | 4 ●: Λ-[Fe(promp)]   |
| 5: [Co(sep)] <sup>2+</sup> [5]      | 6: [Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup> [18] |
| 7: [Fe(edta)] <sup>2-</sup> [49]    | 8: Ferredoxine [48]  |
| 9: Cytochrome c <sub>551</sub> [35] | 10: Azurine [35]   |

La Figure 5.11 montre que les réducteurs neutres (au-dessus de la droite) et chargés (au-dessous de la droite) suivent ce comportement linéaire mais ne s'alignent pas sur la même droite, ce qui peut s'expliquer par un site de réaction différent dû à des interactions différentes avec la protéine.

Dans une réaction de transfert d'électron sphère externe, l'enthalpie d'activation  $\Delta H^\ddagger$  contient l'énergie nécessaire pour amener les réactifs proches les uns des autres, afin de permettre le transfert d'électron, et l'énergie nécessaire pour rompre la couche de solvation des réactifs. L'entropie d'activation  $\Delta S^\ddagger$  contient les contributions dues au réarrangement des molécules de solvant.

Pour de nombreuses réactions de transfert d'électron impliquant des complexes inorganiques ou des métalloprotéines, de charge ou de nature chimique différentes, il a été observé un phénomène de compensation entre la variation de l'enthalpie d'activation et de l'entropie d'activation. Ce comportement vient du fait que plus un réactif s'approche de la protéine et plus il a d'interactions avec elle, ce qui perturbe beaucoup plus la couche d'hydratation et se traduit par une entropie d'activation moins négative.

Lorsque ce modèle est appliqué aux réactifs énantiomères, le phénomène de compensation doit être une conséquence de la différence d'énergie des états de transition des diastéréoisomères due à des interactions chirales entre les espèces réactives. Par conséquent, pour un couple d'énantiomères donné, le réactif caractérisé par le  $\Delta H^\ddagger$  le plus grand s'approche le plus près et s'imbrique mieux sur le site de réaction de la protéine. Ce comportement est appelé reconnaissance chirale.

La reconnaissance chirale ne doit pas être confondue avec la stéréosélectivité; c'est un phénomène microscopique qui est discuté au niveau moléculaire. La stéréosélectivité est un phénomène macroscopique qui résulte des propriétés globales du système.

La stéréosélectivité est définie par le rapport des constantes de vitesse  $k_A/k_B$  qui se traduit en terme énergétique par une énergie libre d'activation  $\Delta G^\ddagger$  différente pour les énantiomères d'un complexe donné; elle peut donc aussi être exprimée sous la forme:

$$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}^{\#} = \Delta G_{\Delta}^{\#} - \Delta G_{\Lambda}^{\#}$$

où  $\Delta G_{\Delta}^{\#}$  et  $\Delta G_{\Lambda}^{\#}$  sont respectivement les énergies libres d'activation pour la réaction de réduction du ferricytochrome c par l'isomère  $\Delta$  et l'isomère  $\Lambda$ . Selon que la stéréosélectivité est en faveur du complexe  $\Delta$  ou  $\Lambda$ , le signe de  $\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}^{\#}$  est négatif ou positif puisque  $\Delta G^{\#}$  est plus petit pour l'énantiomère réagissant le plus rapidement.

$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}^{\#}$  est lui-même défini comme étant égal à :

$$\Delta\Delta G_{\Delta-\Lambda}^{\#} = \Delta\Delta H_{\Delta-\Lambda}^{\#} - T\Delta\Delta S_{\Delta-\Lambda}^{\#}$$

Par conséquent, la stéréosélectivité dépend des différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation, mais aussi de la température à laquelle elle est mesurée. Les études faites dans le département du Professeur K. Bernauer ont montré qu'effectivement la stéréosélectivité n'est pas toujours en faveur de l'énantiomère pour lequel la reconnaissance chirale est la meilleure.

Les mesures faites avec la plastocyanine et la ferredoxine ont montré que, pour une paire d'énantiomères et une protéine donnés,  $\Delta\Delta H^{\#}$  et  $\Delta\Delta S^{\#}$  ont toujours le même signe, justement à cause de la compensation  $\Delta H^{\#}/\Delta S^{\#}$ . La même observation est faite avec le cytochrome c dans ce travail. La conséquence de ce signe identique est qu'à partir d'une certaine température  $T_i$ , la stéréosélectivité est inversée et n'est donc pas toujours en faveur de l'énantiomère pour lequel la reconnaissance chirale est la meilleure. Expérimentalement, cela correspond à un croisement des courbes d'Eyring à cette température d'inversion  $T_i$ . D'ailleurs, à la température  $T_i$ , plus aucune stéréosélectivité n'est observée; la reconnaissance chirale est totalement compensée par la contribution de l'entropie d'activation:  $\Delta\Delta H^{\#} = T\Delta\Delta S^{\#}$ .

Le signe des  $\Delta\Delta H_{\Delta-\Lambda}^{\#}$  et  $\Delta\Delta S_{\Delta-\Lambda}^{\#}$  (Tableau 5.1) est inversé pour les deux complexes, ce qui signifie que la reconnaissance chirale est en faveur de l'isomère  $\Delta$  pour le complexe [Fe(alam)] mais en faveur de l'isomère  $\Lambda$  pour le complexe [Fe(promp)]. Cette inversion de la reconnaissance chirale peut surprendre puisque les deux réactifs présentent une même chiralité et des structures chimiques très similaires. Le même comportement a été observé pour la réaction de transfert d'électron entre la plastocyanine et des

complexes de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Co}^{\text{II}}$  formés avec des ligands identiques [7, 8]. Ce comportement pourrait indiquer que la réaction de transfert d'électron entre les métalloprotéines et les complexes métalliques n'a pas lieu sur un même site; le mot site englobe la région à la surface de la protéine où le réactif oxydoréducteur vient s'imbriquer mais aussi l'orientation de ce dernier.

## 6. Influence de l'alcool sur la réduction du cytochrome c

### 6.1. Généralités

L'étude de l'influence de l'alcool sur la réduction du cytochrome c est intéressante puisque certaines réactions montrent une augmentation de la stéréosélectivité. En effet, comme cela a déjà été dit au *Chapitre 1*, Sakaki et collaborateurs ont observé une augmentation sensible de la stéréosélectivité avec l'accroissement de la concentration d'éthanol pour l'oxydation du ferrocyclochrome c par le complexe Tris(acétylacétonato)cobalt(III) [10]. Les auteurs expliquent leurs observations par l'influence de l'alcool sur la conformation de la protéine. L'éthanol diminue la polarité du solvant, ce qui induit une ouverture de la crevasse héminique et facilite donc l'approche des réactifs sur le coin exposé de l'hème. Puisque les réactifs s'approchent mieux de la surface de la protéine, la reconnaissance chirale va jouer un rôle plus important.

Les constantes de vitesse et les paramètres d'activation calculés pour la réaction de réduction du ferricytochrome c par les complexes de fer(II) formés avec les ligands phemp et promp en présence de différentes concentrations d'alcool sont donnés dans le *Tableau 6.1* et le *Tableau 6.2* respectivement. Les constantes de vitesses ont été calculées sur quatre demi-vies pour les réactions où le solvant contenait jusqu'à 10% d'éthanol. Pour les concentrations plus importantes en alcool, les constantes de vitesses pour la première réaction peuvent être calculées sur quatre demi-vies jusqu'à 25 °C. Pour les températures supérieures, le modèle des deux réactions parallèles ou consécutives doit être utilisé.

Les paramètres d'activation ont été calculés sur le domaine de température où la représentation d'Eyring est linéaire, domaine qui diminue avec l'augmentation de la concentration d'alcool.

L'utilisation de l'éthanol fait disparaître les problèmes rencontrés avec le ligand phemp dans l'eau. Cependant, la baisse de polarité du solvant rend le complexe [Fe(phemp)] moins soluble. Il faut donc travailler avec des solu-

tions très diluées et les mesures en présence de plus de 10% d'alcool n'ont plus de signification.

## 6.2. Réduction par le complexe [Fe(promp)]

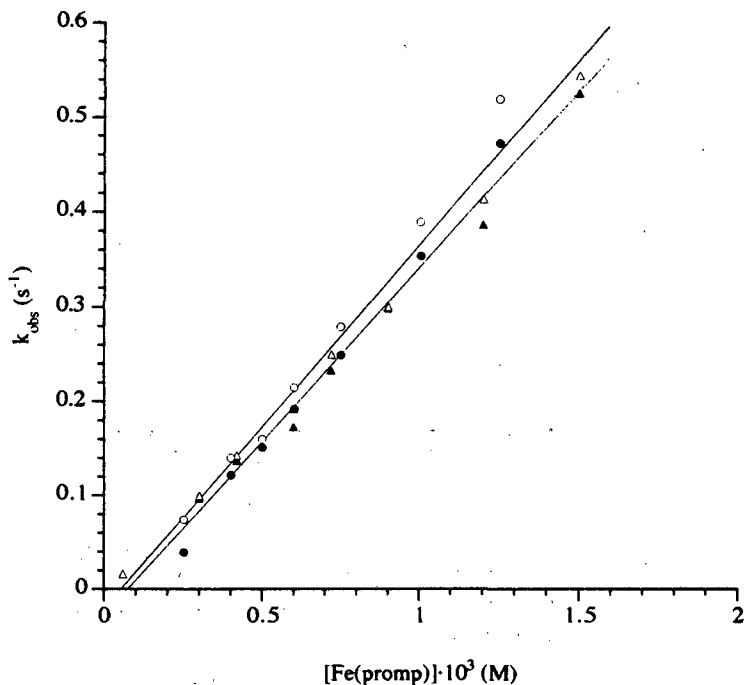


Fig. 6.1 Variation de  $k_{obs}$  en fonction de la concentration du complexe [Fe(promp)] à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 5% EtOH.

▲  $\Delta$ -[Fe((RR)-promp)]  $c_{\text{cyl.c}} = 1,23 \cdot 10^{-5} \text{M}$

▲  $\Lambda$ -[Fe((SS)-promp)]

○  $\Delta$ -[Fe((RR)-promp)]  $c_{\text{cyl.c}} = 1,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$

●  $\Lambda$ -[Fe((SS)-promp)]

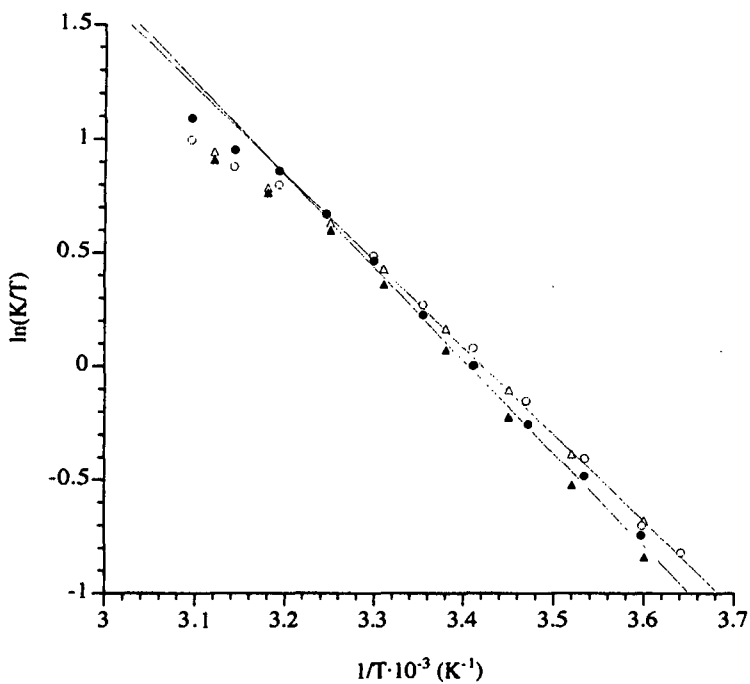
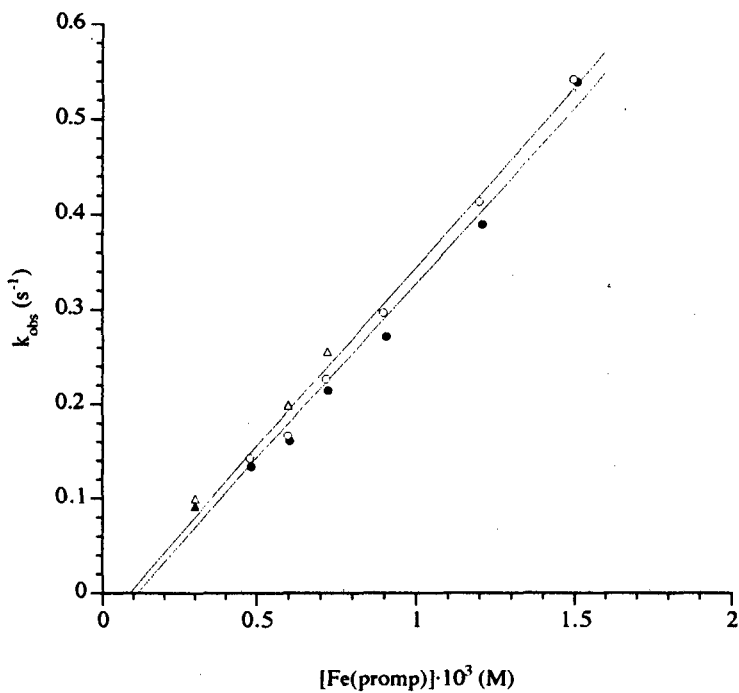


Fig. 6.2 Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe [Fe(promp)] ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 5% EtOH.

- |  |  |
|--|--|
| ▲ $c_{[\Lambda\text{-Fe}(\text{RR})\text{-promp}]} = 1,52 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | $c_{\text{cyt } c} = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ |
| ▲ $c_{[\Lambda\text{-Fe}(\text{SS})\text{-promp}]} = 1,51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |  |
| ○ $c_{[\Delta\text{-Fe}(\text{RR})\text{-promp}]} = 1,26 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  | $c_{\text{cyt } c} = 1,19 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ |
| ● $c_{[\Lambda\text{-Fe}(\text{SS})\text{-promp}]} = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |  |



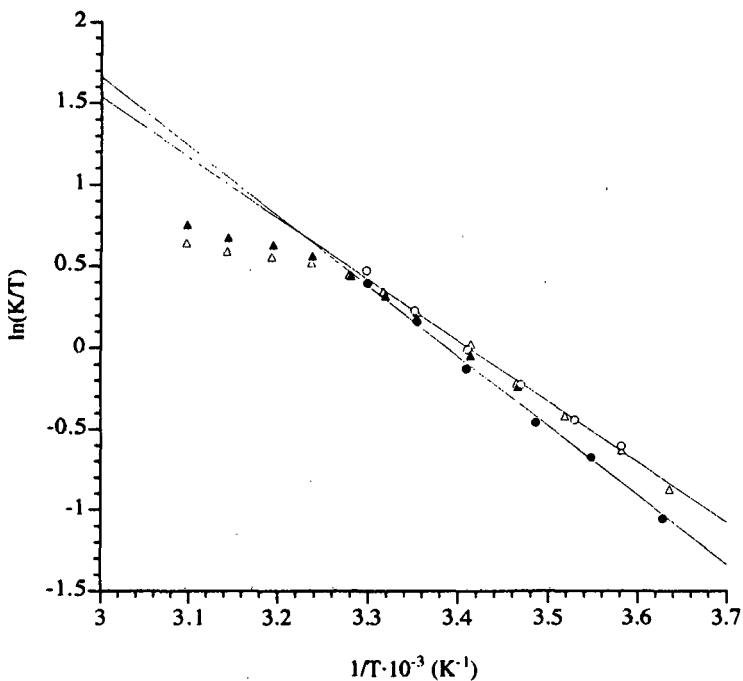
**Fig. 6.3** Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{promp})]$  à  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 10% EtOH.

▲  $\Delta$ - $[\text{Fe}(\text{RR})\text{-promp}]$   $c_{\text{cyl.c}} = 1,22 \cdot 10^{-5}\text{M}$

▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}(\text{SS})\text{-promp}]$

○  $\Delta$ - $[\text{Fe}(\text{RR})\text{-promp}]$   $c_{\text{cyl.c}} = 1,18 \cdot 10^{-5}\text{M}$

●  $\Lambda$ - $[\text{Fe}(\text{SS})\text{-promp}]$



**Fig. 6.4** Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[Fe(promp)]$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 10% EtOH.

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| ▲ $c_{[A-Fe(RR)-promp]} = 1,38 \cdot 10^{-3} M$ | $c_{cyt.c} = 1,19 \cdot 10^{-5} M$ |
| ▲ $c_{[A-Fe(SS)-promp]} = 1,39 \cdot 10^{-3} M$ |                                    |
| ○ $c_{[A-Fe(RR)-promp]} = 1,29 \cdot 10^{-3} M$ | $c_{cyt.c} = 1,28 \cdot 10^{-5} M$ |
| ● $c_{[A-Fe(SS)-promp]} = 1,31 \cdot 10^{-3} M$ |                                    |

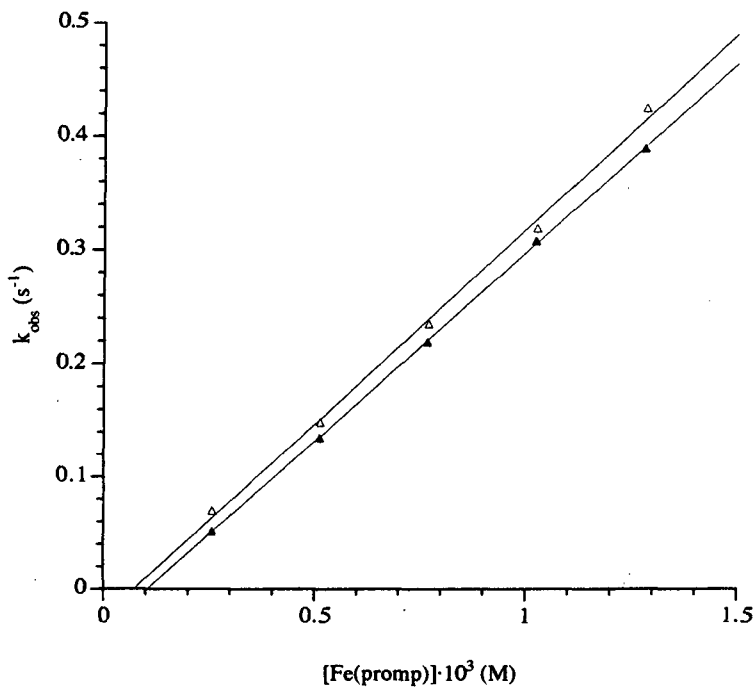
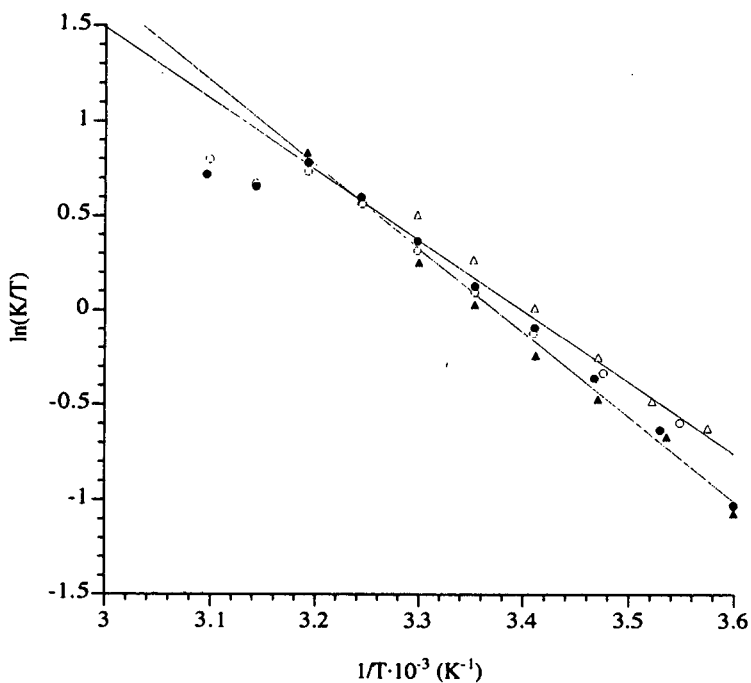


Fig. 6.5 Variation de  $k_{obs}$  en fonction de la concentration du complexe  $[Fe(promp)]$  à  $25^\circ C$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 15% EtOH.  
 $\Delta$   $\Delta$ - $[Fe((RR)-promp)]$   $c_{yt.c} = 1,25 \cdot 10^{-5} M$   
 $\blacktriangle$   $\Lambda$ - $[Fe((SS)-promp)]$



**Fig. 6.6** Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}(\text{promp})]$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 15% EtOH.

- |   |   |
|---|---|
| ▲ $C_{[\text{A-Fe}(\text{RR})\text{-promp}]} = 1,36 \cdot 10^{-3} \text{M}$ | $C_{\text{cyt. c}} = 1,30 \cdot 10^{-5} \text{M}$ |
| ▲ $C_{[\text{A-Fe}(\text{SS})\text{-promp}]} = 1,28 \cdot 10^{-3} \text{M}$ |   |
| ○ $C_{[\text{A-Fe}(\text{RR})\text{-promp}]} = 1,28 \cdot 10^{-3} \text{M}$ | $C_{\text{cyt. c}} = 1,30 \cdot 10^{-5} \text{M}$ |
| ● $C_{[\text{A-Fe}(\text{SS})\text{-promp}]} = 1,30 \cdot 10^{-3} \text{M}$ |   |

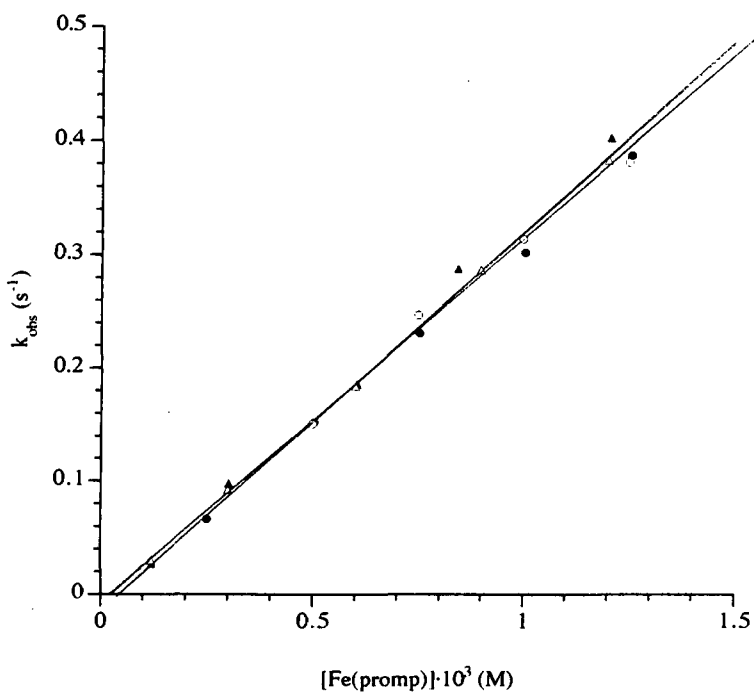


Fig. 6.7 Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{promp})]$  à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 20% EtOH.

- ▲  $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-promp})]$   $c_{\text{cyl.c}} = 1,20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- ▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$
- $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-promp})]$   $c_{\text{cyl.c}} = 1,19 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$

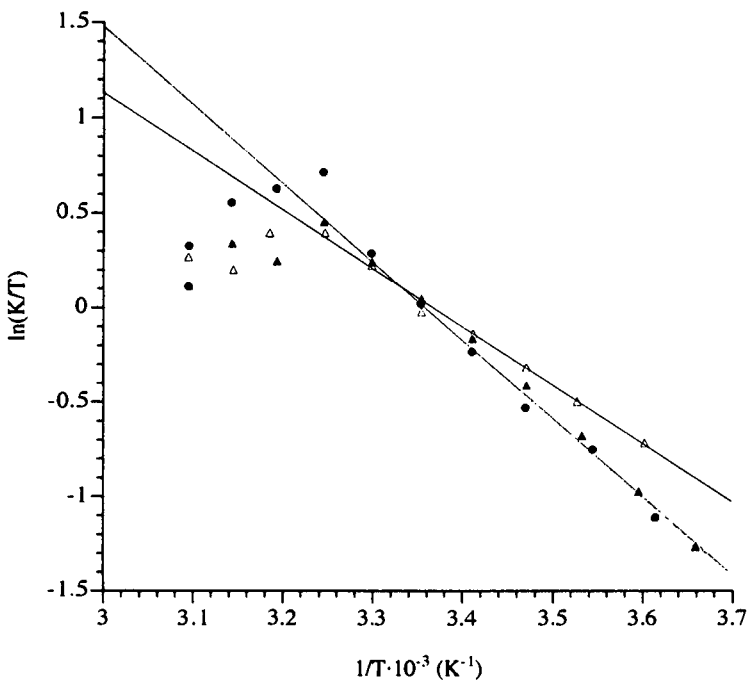


Fig. 6.8 Représentation d'Eyring de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[Fe(promp)]$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 20% EtOH.

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| ▲ $c_{[A-Fe((RR)-promp)]} = 1,28 \cdot 10^{-3} M$ | $c_{cyt.c} = 1,19 \cdot 10^{-5} M$ |
| ▲ $c_{[A-Fe((SS)-promp)]} = 1,25 \cdot 10^{-3} M$ |                                    |
| ○ $c_{[A-Fe((RR)-promp)]} = 1,30 \cdot 10^{-3} M$ | $c_{cyt.c} = 1,28 \cdot 10^{-5} M$ |
| ● $c_{[A-Fe((SS)-promp)]} = 1,28 \cdot 10^{-3} M$ |                                    |

### 6.3. Réduction par le complexe [Fe(phemp)]

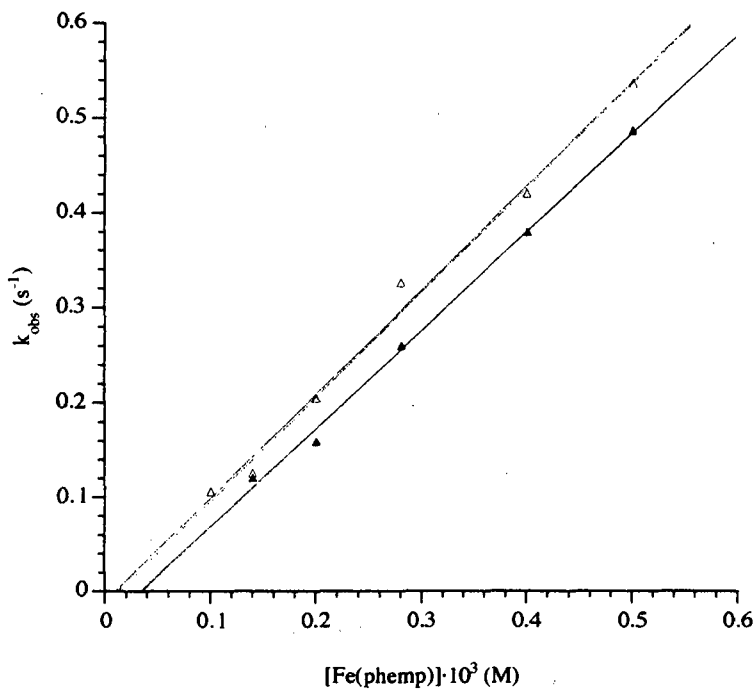
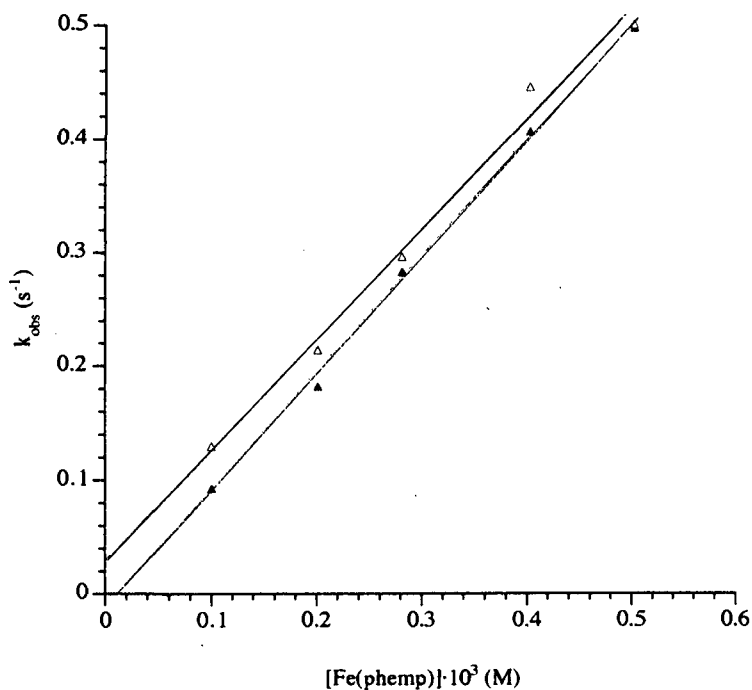


Fig. 6.9 Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe [Fe(phemp)] à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 5% EtOH.

▲ Δ-[Fe((RR)-phemp)]  $c_{\text{cyl. c}} = 1,24 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

▲ ▲-[Fe((SS)-phemp)]



**Fig. 6.10** Variation de  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{phemp})]$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 10% EtOH.  
 ▲  $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-phemp})]$   $c_{\text{cyl.c}} = 1,27 \cdot 10^{-5}\text{M}$   
 ▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-phemp})]$

## 6.4. Discussion

L'éthanol ne modifie pas le caractère pseudo-premier ordre de la réaction. Par contre, il a une influence sur la conformation de la protéine et augmente le caractère biphasique de la cinétique (Fig. 4.3). Cette influence est discutée au *Chapitre 7*.

La représentation d'Eyring pour les cinétiques mesurées ne montre pas une linéarité sur tout le domaine de température étudié et plus la concentration en alcool est élevée, plus la linéarité cesse à une température basse (respectivement environ 45 °C et 35 °C en présence de 0% et 20% d'éthanol).

Une explication pour cette cassure pourrait être le changement de spin que subit le fer(III) à température élevée (*Chapitre 2*). Comme l'ont montré des mesures RMN [26], dans l'eau et jusqu'à 50 °C, il n'y a pas rupture de la liaison Fe-méthionine; la disparition de la bande à 695 nm observée en spectroscopie visible vient du déplacement de celle-ci vers des longueurs

Tableau 6.1 Influence de l'éthanol sur les constantes de vitesse pour la réduction du ferricytochrome c par le complexe [Fe(phemp)].

% éthanol	[Fe(phemp)]	$k^a$ [ $10^3 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ ]
0	$\Delta$ -	$1,19 \pm 0,07$
	$\Lambda$ -	$1,13 \pm 0,04$
5	$\Delta$ -	$1,10 \pm 0,05$
	$\Lambda$ -	$1,03 \pm 0,04$
10	$\Delta$ -	$0,97 \pm 0,06$
	$\Lambda$ -	$1,02 \pm 0,03$

<sup>a)</sup> à 25 °C.

Tableau 6.2 Influence de l'éthanol sur les constantes de vitesse, la stéréosélectivité et les paramètres d'activation pour la réduction du ferrityochrome c par le complexe [Fe(promp)].

% éthanol	[Fe(promp)]	$k^a)$ [10 <sup>2</sup> ·M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$\Delta H^\ddagger$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\ddagger$ [J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta H^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta\Delta S^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$ [J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	$T\Delta\Delta S^\ddagger_{\Delta-\Lambda}$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]
0	$\Delta$ -	4,58 ± 0,07	31,5 ± 0,7	-89 ± 2	-4,4	-15	-4,47
5	$\Lambda$ -	4,15 ± 0,07	35,9 ± 0,5	-74 ± 2	-2,2	-7	-2,09
10	$\Delta$ -	3,85 ± 0,15	31,7 ± 0,3	-89 ± 1	-4,5	-15	-4,47
	$\Lambda$ -	3,69 ± 0,12	33,9 ± 0,6	-82 ± 2			
	$\Delta$ -	3,77 ± 0,15	31,1 ± 0,9	-92 ± 4			
	$\Lambda$ -	3,68 ± 0,20	35,6 ± 1,0	-77 ± 4			
15	$\Delta$ -	3,32 ± 0,02	31,2 ± 1,4	-92 ± 5	-5,7	-19	-5,66
	$\Lambda$ -	3,42 ± 0,10	36,9 ± 0,8	-73 ± 3			
20	$\Delta$ -	3,33 ± 0,09	25,7 ± 0,8	-112 ± 3	-8,7	-30	-8,94
	$\Lambda$ -	3,21 ± 0,06	34,4 ± 0,7	-82 ± 2			

a) à 25 °C.

d'onde plus basses où elle est camouflée par la bande à 530 nm. Au-dessus de cette température, la rupture a lieu et l'atome de fer se révèle être à l'état high-spin.

Certes, l'erreur sur les points situés dans le domaine non linéaire est assez importante principalement parce que la forme native de la protéine est faible par rapport à la forme alcaline et les erreurs sur les constantes de vitesses observées sont importantes. Mais la cassure est aussi observée pour la deuxième réaction (voir *Chapitre 7*) et aux mêmes températures. D'autre part, certaines mesures révèlent une modification de l'état de spin en présence de différents dénaturants [25].

L'observation importante en regardant les résultats (*Tableau 6.1* et *Tableau 6.2*) est que la constante de vitesse diminue lorsque la concentration en alcool augmente. Cependant, l'étude des paramètres d'activation ne permet pas de discuter ce phénomène en termes énergétiques puisque la variation des paramètres d'activation en fonction du pourcentage d'alcool est faible et est recouverte par l'erreur expérimentale.

Avec des complexes chargés, c'est le phénomène contraire qui est observé. Sakaki et collaborateurs [11] observent une augmentation de la vitesse d'oxydation du ferrocyclochrome c par le complexe  $[\text{Co}(\text{bipy})_3]^{3+}$  avec l'augmentation de la concentration en alcool. La constante de vitesse de la réduction du ferricytochrome c par le complexe  $[\text{Fe}(\text{edta})]^{2-}$  augmente également en présence d'éthanol [50]. Dans les deux cas, la constante de vitesse double pratiquement lorsque la concentration en éthanol passe de 0% à 20%.

L'augmentation de la constante de vitesse pour des complexes chargés peut s'expliquer facilement par des effets de charge. La baisse de polarité du solvant augmente ces effets et favorise l'approche des réactifs chargés et la formation du complexe précurseur.

Pour des complexes neutres comme  $[\text{Fe}(\text{promp})]$ , de tels effets n'existent pas. L'association du complexe avec la protéine doit provenir d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogènes. La baisse de polarité du solvant affaiblit les interactions dues aux ponts hydrogènes et par conséquent l'association des réactifs pourrait être affaiblie. Cependant, l'éthanol

rompt aussi des liaisons hydrogènes dans la protéine, ce qui entraîne des modifications dans la structure de cette dernière. Ces modifications doivent influencer le potentiel d'oxydoréduction de la protéine, qui est très sensible au milieu (*Chapitre 2*), et pourraient expliquer la diminution de la vitesse de la réaction.

D'après les représentations graphiques  $\ln(k_D/k_A)$  en fonction de  $1/T$  obtenues pour la réduction du ferricytochrome c en fonction de la concentration en éthanol, il semble que la stéréosélectivité soit plus faible en présence de 5% d'alcool avant de croître à nouveau. Exprimé autrement, ceci signifie que les différences entre les enthalpie d'activation et entropie d'activation pour les deux énantiomères sont plus petites en présence de 5% d'éthanol avant d'augmenter avec l'accroissement d'alcool (*Fig. 6.11 et Fig. 6.12*).

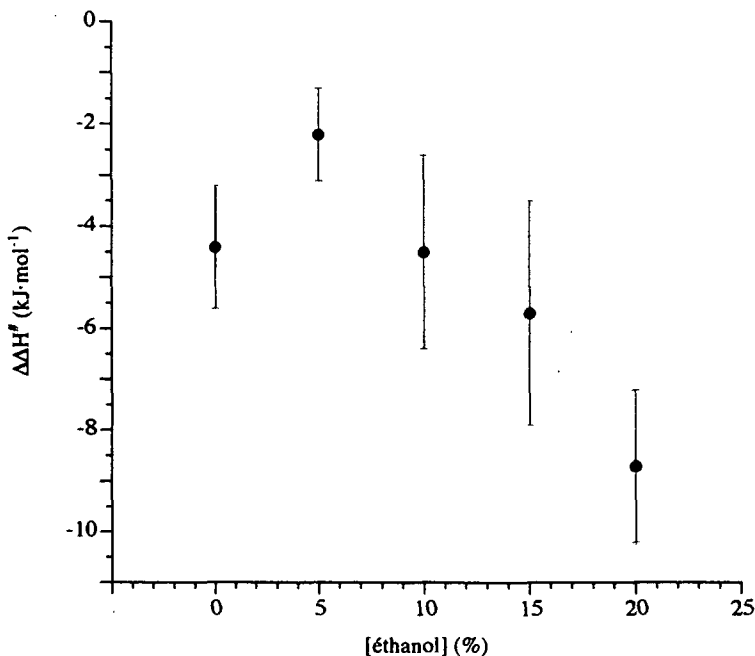


Fig. 6.11 Variation de  $\Delta\Delta H^\ddagger$  en fonction de la concentration en éthanol.

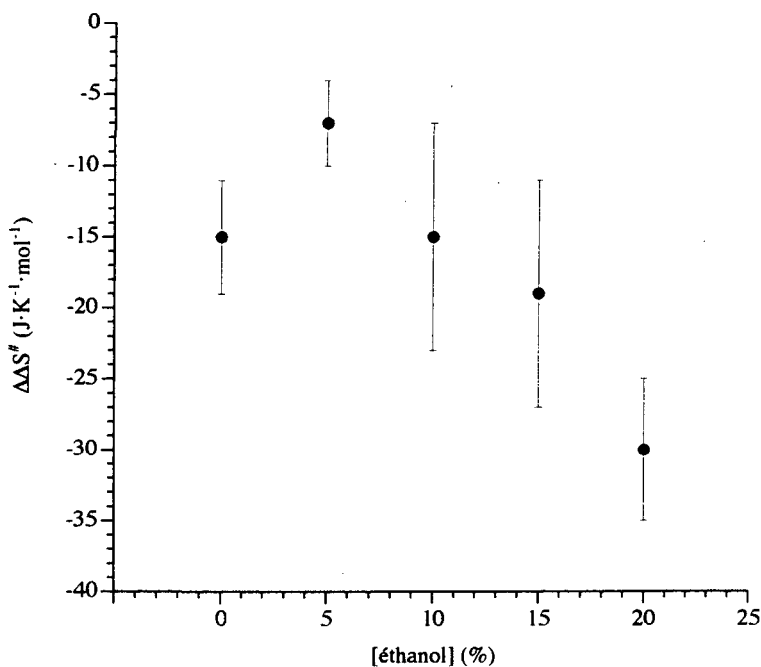


Fig. 6.12 Variation de  $\Delta\Delta S^\ddagger$  en fonction de la concentration en éthanol.

Mais, à cause de la faible variation des paramètres d'activation, cette observation est à prendre avec précaution comme le montre d'ailleurs les barres d'erreur (Fig. 6.11 et Fig. 6.12). Cependant, ce comportement présente une certaine analogie aux résultats de Sakaki [11] qui observe une augmentation de la stéréosélectivité pour son complexe neutre de cobalt(III) avec le ligand acétylacétone entre 15 et 40% d'alcool. Pour une raison de solubilité, il n'a pas de mesures avec des concentrations plus faibles en alcool. Pour son complexe chargé, il observe une variation de l'excès énantiomérique très compliquée en fonction de la concentration d'éthanol et qui dépend aussi du tampon utilisé.

## 7. Deuxième réaction

### 7.1. Influence de l'éthanol sur le cytochrome c

Comme cela a déjà été discuté au *Chapitre 2*, le cytochrome c en solution est très sensible à son environnement: pH, température, force ionique. Des mesures spectroscopiques dans le visible montrent que l'éthanol a une influence sur la structure du ferricytochrome c (Fig. 7.1) mais pas sur celle du ferrocycytochrome c (Fig. 7.2).

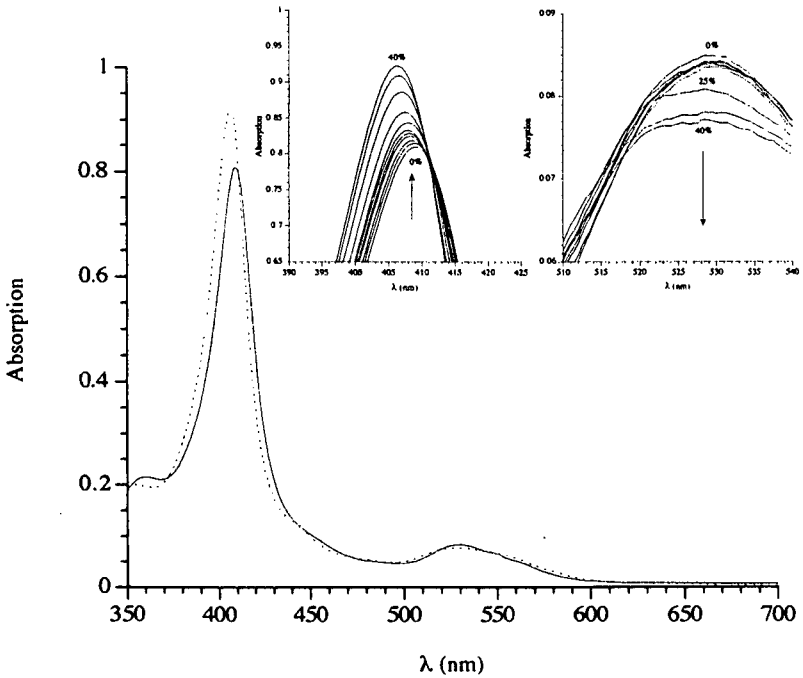


Fig. 7.1 Spectre visible du ferricytochrome c dans l'eau (—) et en présence de 40% d'éthanol (---).

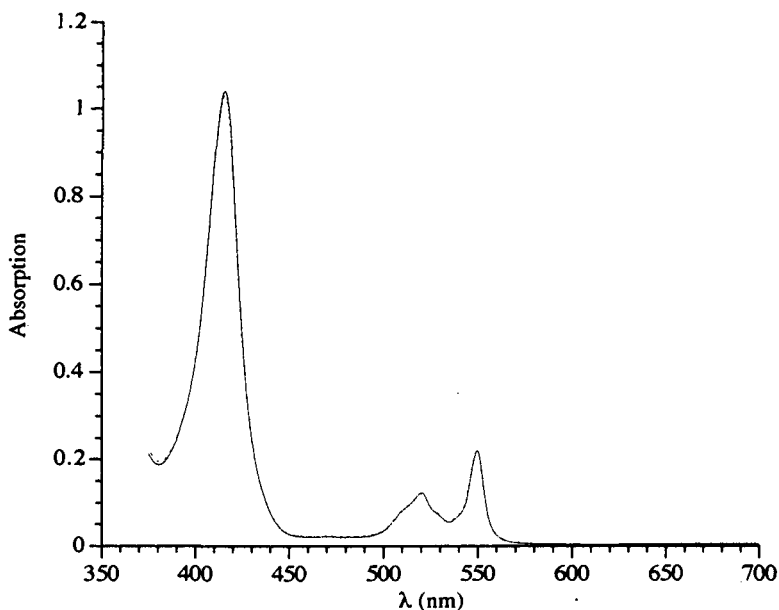


Fig. 7.2 Spectre visible du ferrocytochrome c dans l'eau (—) et en présence de 40% d'éthanol (---).

L'absorption vers 360, 410 et 530 nm indique que le ferrocytochrome c subit une modification à partir de 20% d'éthanol (Fig. 7.1). Au-dessous de cette concentration, seule la bande vers 410 nm indique une perturbation en deux étapes de la protéine. Un comportement similaire a été observé par spectroscopie visible et par dichroïsme circulaire en présence d'urée et est expliqué comme une perturbation de l'état de spin de la protéine [25].

L'absorption à 695 nm pour la forme oxydée baisse avec l'augmentation de la concentration en alcool (Fig. 7.3). Cette observation est faite pour plusieurs dénaturants [26, 51]; il semble que plus le dénaturant est apolaire et plus l'absorption baisse rapidement [30, 52].

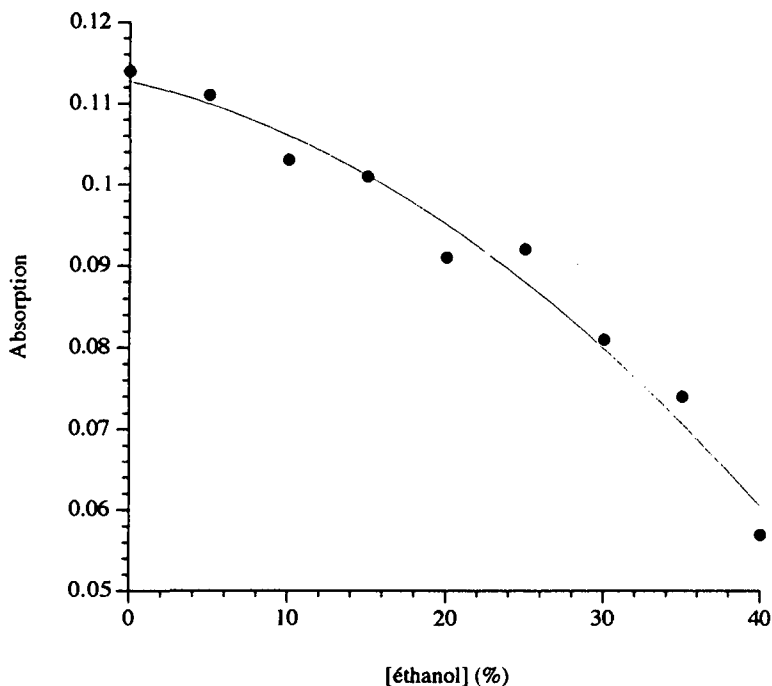


Fig. 7.3 Absorption à 695 nm du ferricytochrome c en fonction de la concentration en éthanol.

## 7.2. Etude cinétique de la deuxième réaction

La deuxième réaction est difficile à mesurer en raison de sa faible proportionnalité par rapport à la première. Elle est bien observable à partir de concentrations en éthanol supérieures à 10%.

Toutes les cinétiques mesurées révèlent un caractère biphasique. La deuxième réaction est attribuée à la forme alcaline de la protéine qui est relativement bien connue et a déjà été discutée au *Chapitre 2*. Dans l'eau et à température ambiante, la deuxième réaction est peu marquée et varie entre

3 et 6% du changement total d'absorption. Cette valeur est en accord avec les mesures faites sur la variation de la bande d'absorption à 695 nm en fonction du pH [30]: par rapport au pH physiologique, l'absorption diminue de 4% à pH = 7,5; elle diminue de presque 50% à pH = 9. L'importance de la deuxième réaction croît avec l'augmentation de la température.

La forme alcaline est également réductible puisque la constante de vitesse observée augmente avec la concentration du réducteur (Fig. 7.4). La constante de vitesse bimoléculaire pour la réduction de la forme alcaline

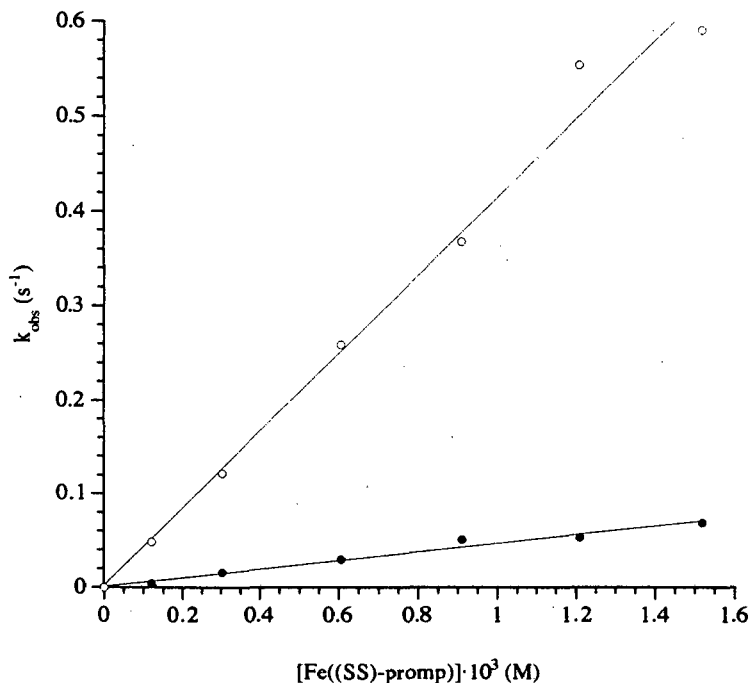


Fig. 7.4 Variation de  $k_{\text{obs}}$  pour la réduction du ferricytochrome c natif (o) et alcalin (●) en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$  à 25 °C ( $\mu = 0,1$ ).

( $45 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) est environ dix fois plus faible que celle pour la réduction de la forme native ( $418 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La réduction de la forme alcaline a aussi été observée par le complexe  $[\text{Fe}(\text{edta})]^{2-}$  [49]. En revanche, la forme alcaline n'est pas réduite par l'ascorbate [29] ou par le complexe  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  [53].

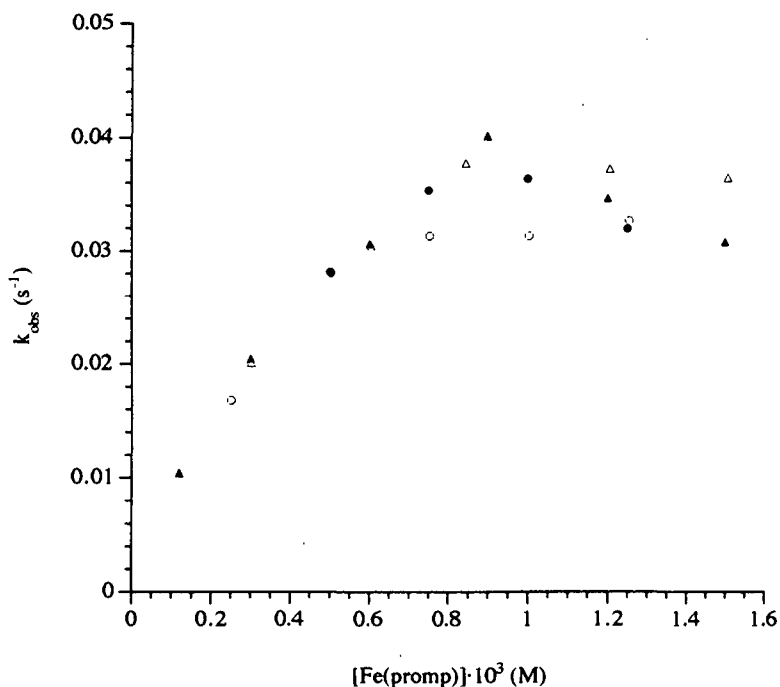


Fig. 7.5 Variation de  $k_{\text{obs}}$  pour la deuxième réaction en fonction de la concentration du complexe  $[\text{Fe}(\text{promp})]$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 20% EtOH.

- ▲  $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-promp})]$   $c_{\text{cyt. c}} = 1,20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- ▲  $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$
- $\Delta$ - $[\text{Fe}((\text{RR})\text{-promp})]$   $c_{\text{cyt. c}} = 1,19 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- $\Lambda$ - $[\text{Fe}((\text{SS})\text{-promp})]$

Si la variation de la constante de vitesse observée est linéaire dans l'eau (Fig. 7.4), un phénomène de saturation est par contre observée en présence d'éthanol. (Fig. 7.5). Cependant, un traitement de Michaelis-Menten sur ces courbes ne donne pas une représentation graphique linéaire, ce qui laisse supposer que le mécanisme qui se déroule est plus compliqué.

Sur le domaine linéaire, les constantes de vitesse observées,  $k_{obs}$ , semblent rester identiques à celles mesurées en absence d'alcool.

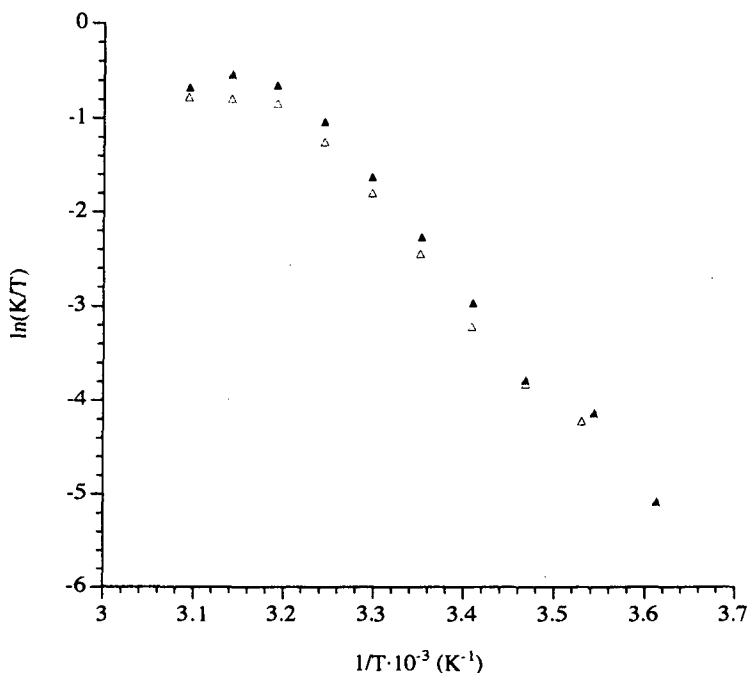


Fig. 7.6 Représentation d'Eyring pour la deuxième réaction de réduction par le complexe  $[Fe(promp)]$  ( $\mu = 0,1$ ); solvant: 20% EtOH.

$$\blacktriangle c_{[A-Fe((RR)-promp)]} = 1,30 \cdot 10^{-3} M$$

$$c_{\text{cyl. c}} = 1,28 \cdot 10^{-5} M$$

$$\blacktriangle c_{[A-Fe((SS)-promp)]} = 1,28 \cdot 10^{-3} M$$

La constante de vitesse pour la deuxième réaction croît avec la température. En présence de 20% d'éthanol, la représentation d'Eyring montre une bonne linéarité sur le domaine de température allant de 10 à 35°C (Fig. 7.6). Sans alcool, le domaine linéaire est très restreint, allant de 25 à 40 °C; au-dessous de 25 °C, la deuxième réaction est trop peu marquée pour être significative.

Il est intéressant de remarquer que les deux réactions présentent une cassure de la linéarité dans la représentation d'Eyring à la même température: environ 35 °C en présence de 20% d'éthanol, 45-50°C en absence d'alcool. Ceci est déjà discuté au *Chapitre 6* et s'explique sans doute par une perturbation de l'état de spin de la protéine.

Pour résumer, nos mesures expérimentales permettent de voir un comportement biphasique qui est accentué en présence d'éthanol. L'alcool augmente certainement la présence de la forme alcaline, comme le suggère la diminution de l'absorption à 695 nm, mais provoque aussi des modifications dans la structure de la protéine (diminution des ponts hydrogènes, flexibilité accrue, ouverture de la crevasse héminique) qui modifient son potentiel normal et sa réactivité. De plus, la température influence également la protéine en perturbant l'état de spin du fer. Par conséquent, trop de paramètres sont modifiés en présence d'éthanol pour pouvoir discuter raisonnablement l'influence de ce dernier sur la deuxième réaction.

## 8. Conclusions

Une stéréosélectivité est observée lors de la réduction du ferricytochrome c par des complexes de fer(II) optiquement actifs formés à partir des ligands phemp, alamp et promp donnés à la *Figure 1.1*. Cette stéréosélectivité est fonction du complexe réducteur utilisé et est influencée par la reconnaissance chirale et par la température. Une inversion de la stéréosélectivité est observée en fonction de la température. La stéréosélectivité observée peut être discutée en terme de compensation entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation.

L'éthanol réduit la vitesse de réduction du ferricytochrome c, ce qui montre que le solvant joue un rôle important dans la réaction de transfert d'électron. L'influence de l'alcool sur la stéréosélectivité est cependant difficile à discuter même si cette dernière semble augmenter avec l'accroissement de la concentration en éthanol.

Enfin, la cinétique de réduction est biphasique due sans doute à l'équilibre entre deux isomères du cytochrome c; les deux formes protéiniques sont réductibles.

Ce travail renforce l'hypothèse selon laquelle la stéréosélectivité peut être expliquée par une compensation différente entre l'enthalpie d'activation et l'entropie d'activation pour les deux énantiomères; ce phénomène a déjà été observé et discuté lors de la réduction de la plastocyanine et l'oxydation de la ferredoxine par des complexes oxydoréducteurs formés les mêmes types de ligands (*Fig. 1.1*). Il est évident que des mesures avec d'autres protéines, dont la fonction n'est pas forcément le transfert d'électron, et également avec d'autres complexes optiquement actifs (formés avec d'autres types de ligands) permettront une meilleure discussion de cette hypothèse.

Il faut aussi remarquer que le travail avec des protéines est délicat, en particulier en ce qui concerne la détermination des paramètres d'activation. En raison de la fragilité de la protéine, le domaine de température étudié est relativement restreint (50 °C maximum dans notre cas) pour la détermi-

nation des paramètres d'activation. Ceci est d'autant plus regrettable que les différences des paramètres d'activation,  $\Delta\Delta H^\ddagger$  et  $\Delta\Delta S^\ddagger$ , sont faibles et par conséquent l'erreur sur les mesures représente un facteur non négligeable. De plus, comme dans ce domaine a lieu l'inversion de la stéréosélectivité, les différences entre les constantes de vitesse observées pour les deux énantiomères sont également faibles.

## 9. Bibliographie

- [1] B. Vennesland, *Topics in Current Chemistry*, Vol. 48 p. 39-66, Springer-Verlag, Berlin 1974.
- [2] R.A. Scott, A.G. Mauk, H.B. Gray, *J. Chem. Education*, **62**, 932 (1985).
- [3] L.S. Dollimore, R.D. Gillard, I.H. Mather, *J. Chem. Soc. Dalton*, 518 (1974).
- [4] F.A. Armstrong, A.G. Sykes, *J. Am. chem. Soc.*, **100**, 7710 (1978).
- [5] H.E. Toma, R.A. Murakami, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, L33 (1984).
- [6] K. Bernauer, J.-J. Sauvain, *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 353 (1988).
- [7] J.-J. Sauvain, Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel 1990.
- [8] L. Verardo, Thèse de Doctorat en préparation.
- [9] K. Bernauer, M. Monziona, P. Schürmann, V. Viette, *Helv. Chim. Acta*, **73**, 346 (1990).
- [10] S. Sakaki, Y. Nishijima, H. Koga, K. Ohkubo, *Inorg. Chem.*, **28**, 4061 (1989).
- [11] S. Sakaki, Y. Nishijima, K. Ohkubo, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1143 (1991).
- [12] R.A. Marusak, T.P. Shields, A.G. Lappin, *Advances in Chemistry Series: Electron Transfer in Biology and the Solid State*, Vol. 226 p. 237-252, American Chemical Society, Washington 1990.
- [13] J.T. Ficke, J.R. Pladziewicz, E.C. Sheu, A.G. Lappin, *Inorg. Chem.*, **30**, 4282 (1991).
- [14] J.R. Pladziewicz, M.A. Accola, P. Osvath, A.M. Sargeson, *Inorg. Chem.*, **32**, 2525 (1993).

- [15] W.S. Caughey, *Inorg. Biochem.*, **2**, 797 (1973)
- [16] H.A. Harbury, R.H.L. Marks, *Inorg. Biochem.*, **2**, 902 (1973)
- [17] G.R. Moore, Z.-X. Huang, C.G.S. Eley, H.A. Barker, G. Williams, M.N. Robinson, R.J.P. Williams, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **74**, 311 (1982).
- [18] G.R. Moore, C.G.S. Eley, G. Williams, *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Vol. 3 p. 1-96, Academic Press, London 1984.
- [19] J.L. Dreyer, *Experientia*, **40**, 653 (1984).
- [20] G.R. Moore, G.W. Pettigrew, *Cytochromes c: Biological Aspects*, Springer-Verlag, Berlin 1987.
- [21] G.R. Moore, G.W. Pettigrew, *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlin 1987.
- [22] L. Stryer, *La Biochimie*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris 1985.
- [23] G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss, H.A. Harper, *Physiologische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin 1979.
- [24] L.A. Davis, A. Schejter, G.P. Hess, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2624 (1974).
- [25] Y.P. Myer, *Biochemistry*, **7**, 765 (1968).
- [26] A. Schejter, P. George, *Biochemistry*, **3**, 1045 (1964).
- [27] R.J.P. Williams, G.R. Moore, P.E. Wright, *Biological Aspects of Inorganic Chemistry*, p. 369-401 John Wiley & Sons, New York 1977.
- [28] H. Theorell, Å. Åkesson, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1812 (1941).
- [29] C. Greenwood, G. Palmer, *J. Biolog. Chem.*, **240**, 3660 (1965).
- [30] M.T. Wilson, C. Greenwood, *Eur. J. Biochem.*, **22**, 11 (1971)
- [31] X. Hong, D.W. Dixon, *FEBS*, **246**, 105 (1989).
- [32] M. Maillet, *Biologie Cellulaire*, Masson, Paris 1985.

- [33] P. Volfin, *La Recherche en biologie moléculaire*, Chap. 6 p. 101-132, Editions du Seuil, Paris 1975.
- [34] D.E. Metzler, *Biochemistry*, Academic Press Inc., New York 1977.
- [35] S. Wherland, H.B. Gray, *Biological Aspects of Inorganic Chemistry*, p. 289-368, Wiley, New York 1977.
- [36] J.K. Yandell, D.P. Kay, N. Sutin, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1131 (1973).
- [37] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985).
- [38] P.L. Drake, R.T. Hartshorn, J. McGinnis, A.G. Sykes, *Inorg. Chem.*, **28**, 1361 (1989).
- [39] G. McLendon, *Electron-Transfer Reactions in Metalloproteins: Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 27 p. 183-198, Ed. H. Sigel, New York 1991.
- [40] K. Bernauer, P. Pousaz, *Helv. Chim. Acta*, **67**, 796 (1984).
- [41] K. Bernauer, P. Pousaz, J. Porret, A. Jeanguenat, *Helv. Chim. Acta*, **71**, 1339 (1988).
- [42] H. Stoeckli-Evans, L. Brehm, P. Pousaz, K. Bernauer, H.-B. Bürgi, *Helv. Chim. Acta*, **68**, 185 (1985).
- [43] K. Bernauer, H. Stoeckli-Evans, D. Hugi-Cleary, H.J. Hilgers, H. Abdel-Khalek, J. Porret, J.-J. Sauvain, *Helv. Chim. Acta*, **75**, 2327 (1992).
- [44] G. Schwarzenbach, A. Willi, R.O. Bach, *Helv. Chim. Acta*, **30**, 1303 (1947).
- [45] P. Pousaz, Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel 1982.
- [46] H.F. Bauer, W.C. Drinkard, *Inorganic Synthesis*, **8**, 202 (1966).
- [47] J.-H. Hilgers, Thèse de Doctorat en préparation.
- [48] K. Bernauer, *Electron-Transfer Reactions in Metalloproteins: Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 27 p. 265-289, Ed. H. Sigel, 1991.

- [49] H.L. Hodges, R.A. Holwerda, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3132 (1974).
- [50] F. Stauffer, *Travaux pratiques avancés de chimie inorganique*, Neuchâtel 1993.
- [51] B.R. Sreenathan, C.P.S. Taylor, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **42**, 1122 (1971).
- [52] C. Greenwood, M.T. Wilson, *Eur. J. Biochem.*, **22**, 5 (1971).
- [53] K.G. Brandt, P.C. Parks, G.H. Czerlinski, G.P. Hess, *J. Biolog. Chem.*, **241**, 4180 (1966).