

N° d'ordre : 334

50376
1989
61



50376
1989
61

THÈSE

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

par

Patrick KOWALEWSKI

**ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR
MICROSPECTROMETRIE RAMAN DE RESONANCE.
REALISATION DE COMPOSES MODELES :
mu-OXO FERRIPORPHYRINES**



0300113625

Soutenue le 21 Avril 1989 devant la Commission d'Examen

MM.	D.	CAMUS	Président
Mme	G.	CHOTTARD	Rapporteur
MM.	M.	LUTZ	Rapporteur
	C.	BREMARD	Examinateur
	M.	DELHAYE	Examinateur
	F.	PETIT	Examinateur
	J.C.	MERLIN	Examinateur
	S.	MOREAU	Examinateur

Applications

L'éventail des applications de l'effet Raman, s'étend depuis les travaux fondamentaux sur la symétrie des molécules et des cristaux jusqu'à l'analyse in situ d'échantillons biologiques ou de matériaux industriels. Ses atouts majeurs sont fondés sur la possibilité d'analyse non destructive, d'une quantité très faible d'échantillon (par voie purement optique) et sur la richesse des informations moléculaires qu'il apporte. Grâce au développement d'instruments très performants, la spectrométrie Raman participe maintenant à de nouveaux domaines d'applications analytiques fondés sur l'identification des espèces moléculaires à partir des spectres vibrationnels. Les applications les plus courantes concernent l'analyse physico-chimique et la détermination des structures et des conformations de molécules polyatomiques en phase liquide ou solide.

L'analyse, par spectrométrie Raman, et surtout par microspectrométrie Raman est employée pour une grande variété de matériaux dont ceux répertoriés ci-dessous :

Roches	Polymères	Verres	Composés Biologiques
Minéraux	Matériaux Composites	Matériaux Amorphes	Circuits Intégrés

sous différents états et formes :

Gaz	Liquide	Poudre	Cristal	Couche Mince
-----	---------	--------	---------	--------------

sous différents environnements

Solution (eau,...)	Température (-250 °C - 600 ° C)	Pression (0 - 30 GPa)	Champ électrique et magnétique
------------------------------	--	--------------------------------------	---

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	3
<u>CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	9
I.- <u>GENERALITES</u>	13
1. Nomenclature et structure	13
2. Les métalloporphyrines	18
II.- <u>LES PORPHYRINES DE FER</u>	20
1. Stéréochimie	20
2. Hémoglobine	26
3. Les espèces μ -oxo	40
4. Les modèles choisis	50
<u>CHAPITRE II : SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE DES</u> <u>PORPHYRINES DE FER</u>	53
I.- <u>LA PORPHYRINE DEMETALLEE</u>	57
1. Les spectres expérimentaux	58
2. Interprétation des spectres	61
II.- <u>LA METALLOPORPHYRINE</u>	69
1. Méthode des combinaisons linéaires d'orbitales moléculaires appliquées aux métalloporphyrines	69
2. Influence du métal sur le spectre UV-visible	71
3. Spectres d'absorption des complexes μ -oxo	73

<u>CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE RAMAN DES COMPOSES μ-OXO DES PORPHYRINES DE FER</u>	77
I.- <u>SPECTRES RAMAN D'UNE METALLOPORPHYRINE</u>	82
1. Dénombrément théorique	82
2. Attribution des modes normaux de vibration	83
3. Paramètres influençant le spectre de vibration d'une métalloporphyrine	87
II.- <u>SPECTRES RAMAN DES COMPOSES MODELES: (TPPFe)₂O , (DPDFe)₂O</u> ..	89
1. Attribution des modes du squelette porphyrine	90
2. Attribution des modes de vibration de la liaison μ -oxo	102
3. Bandes indicatrices de structure	117
4. Les profils d'excitation	122
<u>CHAPITRE IV : ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR MICROSPECTROMETRIE RAMAN</u>	137
I. - <u>ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR SPECTROMETRIE RAMAN</u>	141
1. Le problème d'une telle analyse	141
2. Spectres Raman du pigment malarique	143
II. - <u>ETUDE D'UN MODELE D'ASSOCIATION DE PORPHYRINES EN MILIEU AQUEUX</u>	152
1. Principe de ce modèle	152
2. Analyse d'une bille de gel par microspectrométrie Raman	154
III. - <u>LA STRUCTURE DU PIGMENT MALARIQUE</u>	158
<u>CONCLUSION</u>	163
<u>ANNEXE EXPERIMENTALE</u>	167
I.- <u>TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES</u>	170
II.- <u>SYNTHESES ET CARACTERISATION DES COMPOSES MODELES</u>	178
III.- <u>LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES</u>	182
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	183

INTRODUCTION

Le paludisme reste de nos jours, une des pathologies dominantes des pays du tiers monde. Cette maladie parasitaire est due à un protozoaire, Plasmodium, dont une des phases du développement se déroule au niveau de l'hématie. Le cliché ci-dessous, obtenu par microscopie électronique, présente cette phase du développement du parasite qui se fait au détriment du constituant majeur du globule rouge : l'hémoglobine.



G: globule rouge, H: hémoglobine, P: parasite, V: vacuole, Pg: pigment malarique

Cette photographie met en évidence une structure pseudo-cristalline, appelée pigment malarique constituée de petits granulés rassemblés dans la vacuole. A ce jour, la structure moléculaire ainsi que le rôle physiologique exact de celui-ci ne sont pas connus.

Notre étude a eu pour but d'apporter des éléments nouveaux sur la structure moléculaire du pigment à l'aide d'une technique appropriée qui nous permet de nous placer dans des conditions proches du in vivo.

Un tel problème ne peut se résoudre en utilisant les techniques classiques d'analyse (RMN, UV, IR etc...) à cause de l'hétérogénéité de l'échantillon, en effet, le pigment est en présence de parasite, d'hémoglobine et de nombreux résidus protéiques. Le choix de la technique à adopter s'est fait sachant qu'elle devait concilier les notions suivantes : microanalyse, spécificité, sensibilité. L'examen d'un frottis de globules rouges parasités montre que le pigment est facilement identifiable à des grains noirs et donc qu'un des constituants de celui-ci est un chromophore absorbant dans le domaine du visible. Cette évidence nous a donc incité à utiliser une technique spectroscopique optique.

La spectroscopie Raman de résonance est à priori la technique de choix car elle permet de concilier les points cités précédemment et nécessaires à cette étude.

- L'existence de microsonde à effet Raman permet d'envisager une étude à l'échelle microscopique.
- L'effet Raman de résonance, qui se produit lorsque la radiation laser excitatrice coïncide avec une bande d'absorption du composé à étudier, assure non seulement la spécificité (chaque composé possède des bandes d'absorption caractéristique) mais aussi d'analyser de très petites quantités.

Bien qu'aucune étude ne soit reportée sur le pigment malarique in vivo, l'extraction de celui-ci, suivie de traitements chimiques permet d'isoler la ferriprotoporphyrine IX. Seule la nature de la porphyrine est à prendre en compte car l'état physico-chimique du fer (état d'oxydation, état de spin, nature du ligand axial) sera affecté par la succession des traitements chimiques. La présence de cette porphyrine analogue à celle constituant le groupe prosthétique de l'hémoglobine, génère une difficulté d'analyse.

En effet, la présence simultanée de cette même porphyrine, impliquée dans la structure du pigment malarique et de l'hémoglobine, peut interférer en spectroscopie Raman, rendant l'analyse in vivo difficile. Nous avons préféré récupérer le pigment à partir de cultures in vitro, sans lui faire subir de

traitements chimiques. On peut ainsi, en respectant l'intégrité structurale de celui-ci, s'affranchir du problème de l'hémoglobine présente dans l'hématie.

D'autre part, le fait que la protoporphyrine IX de fer soit un des constituants du pigment malarique nous a conduit à effectuer une analyse bibliographique sur les processus de dégradation de l'hémoglobine dans lequel le cycle porphyrique est conservée. Suite à cette analyse, les composés μ -oxo ferriporphyrines, caractérisés par la présence d'une liaison Fe-O-Fe entre deux unités porphyriques, peuvent être proposés comme produit de dégradation de l'hémoglobine. Le chapitre I détaille cette analyse et rappelle les données essentielles de la chimie des μ -oxo ferriporphyrines.

Les chapitres II et III sont consacrés à la caractérisation spectroscopique de deux composés μ -oxo modèles : la μ -oxo ferritétraphénylporphyrine dont la structure cristallographique est connue, et la μ -oxo ferrideutéroporphyrine diméthylester dont la structure est proche de la protoporphyrine IX. La μ -oxo ferrideutéroporphyrine diméthylester est donc par conséquent un bon modèle pour élucider la structure moléculaire du pigment malarique.

Le chapitre IV présente les spectres Raman du pigment malarique et permet de confronter ces résultats à ceux obtenus sur les composés modèles.

L'interprétation du spectre Raman du pigment malarique ne pourra se faire par simple comparaison et nécessitera le développement d'un nouveau modèle qui permettra de mieux mimer les faits expérimentaux et qui sera exposé dans ce même chapitre.



CHAPITRE I

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - <u>GENERALITES</u>	13
1. <u>Nomenclature et structure</u>	13
2. <u>Les métalloporphyrines</u>	18
II - <u>LES PORPHYRINES DE FER</u>	20
1. <u>Séréochimie</u>	20
a). <u>Les complexes haut spin</u>	23
b). <u>Les complexes à spin intermédiaire</u>	23
c). <u>Les complexes bas spin</u>	23
2. <u>Hémoglobine</u>	26
a). <u>Structure et rôle physiologique</u>	26
1.a). Réaction d'oxydation	28
2.a). Réaction de coordination	28
b). <u>Les modèles biomimétiques</u>	30
1.b). Influence de la base azotée	34
2.b). Influence de l'environnement de la 6 ^{ème} position axiale	36
3. <u>Les espèces μ-oxo</u>	40
a). <u>Synthèse</u>	41
b). <u>Propriétés magnétiques</u>	42
c). <u>Agrégation des porphyrines de fer</u>	45
1.c). Porphyrines de fer en milieu organique	46
2.c). Porphyrines de fer en milieu aqueux	48
4. <u>Les modèles choisis</u>	50

Les porphyrines ont suscité depuis de nombreuses années un très grand intérêt. Les techniques structurales, mises à la disposition des physico-chimistes ont permis de réunir de nombreuses informations sur certains composés modèles, qui seront présentées dans ce chapitre.

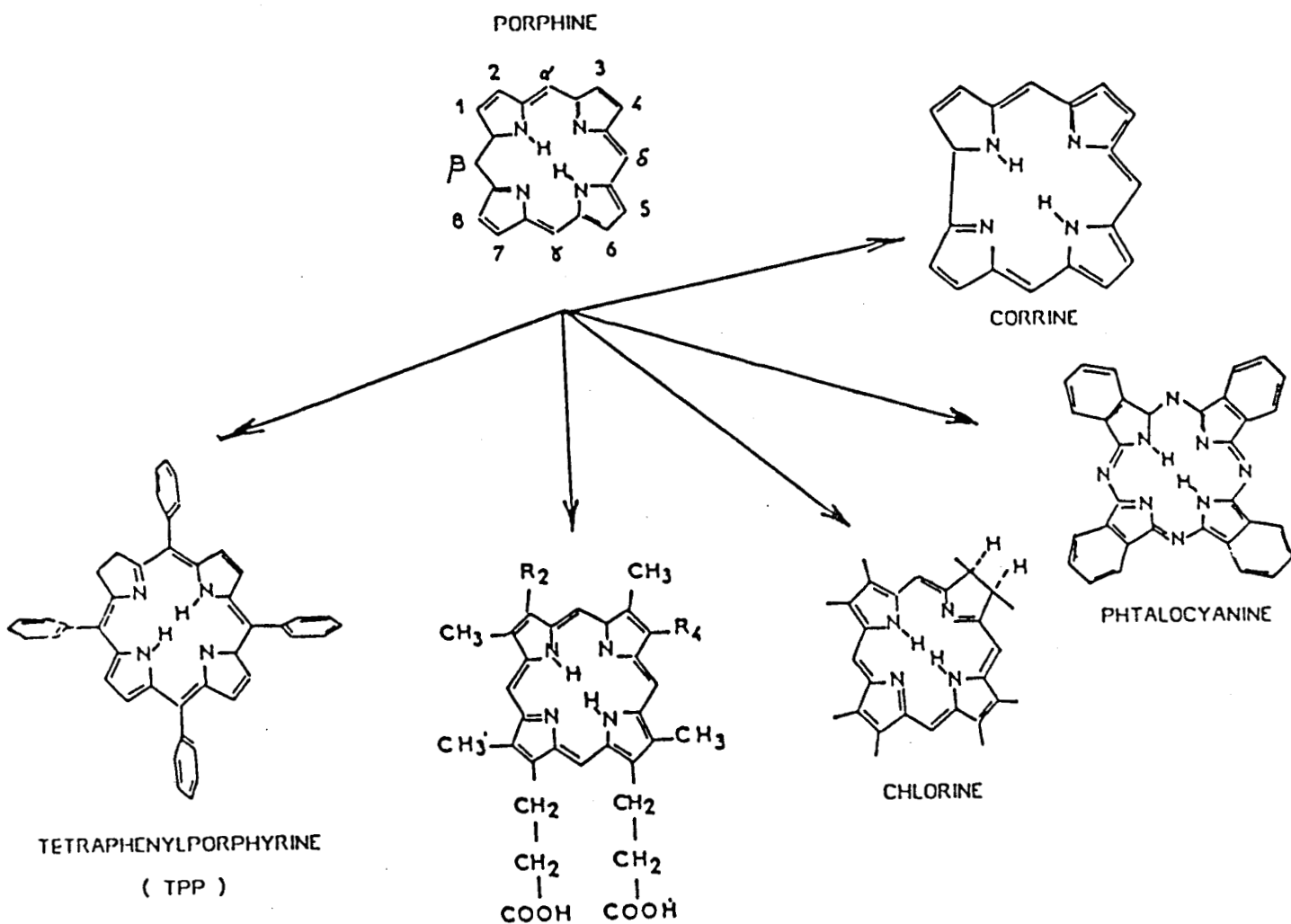
Outre la description de l'hémoglobine, la porphyrine de fer la plus connue, sera posé le problème des espèces μ -oxo des porphyrines de fer, qui ont été étudiées souvent dans le passé, non pas pour l'intérêt biologique qu'elles sont susceptibles d'évoquer, mais dans un intérêt purement chimique afin de modéliser des interactions métal - métal au sein d'un complexe organométallique.

I - GENERALITES

1). Nomenclature et structure

Les porphyrines (P) sont des molécules dont la structure de base est constituée de quatre noyaux pyrroliques reliés entre eux par des ponts méthines (figure 1). Les porphyrines, rencontrées dans les domaines biologiques et géologiques se distinguent de la porphine par substitution des hydrogènes périphériques 1 à 8. La nomenclature de tels composés dépend de la nature des substituants. La tétraméthyl 1,3,5,8 - divinyle 2,4 - dipropionato 6,7 porphine, nommée protoporphyrine IX (PP IX), est un représentant de la famille des porphyrines que l'on rencontre dans le milieu biologique. Les dérivés s'obtiennent en substituant uniquement les positions 2 et 4. La figure 1 présente ces différentes molécules, en précisant les abréviations utilisées dans ce travail.

Outre la substitution des atomes d'hydrogène sur les atomes pyrroliques, il est possible de substituer les hydrogènes en position méso ($\alpha, \beta, \delta, \delta'$) par d'autres groupements. Citons par exemple la mésotétraphénylporphyrine (TPP) dans laquelle



PORPHYRINES NATURELLES

	R_2	R_4	
Deutéroporphyrine	H	H	DP
Protoporphyrine	- CH - CH ₂	- CH - CH ₂	PP
Mésoporphyrine	- CH - CH ₃	- CH ₂ - CH ₃	MP
Porphyrine A	- CHOH - C ₁₄ H ₂₉	- CH - CH ₂	
Porphyrine A ₂	- CH ₂ - CH	- CHOH - CH ₃	
Porphyrine C	$ \begin{array}{c} - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \text{COO}^- \\ \text{NH}^- \end{array} \end{array} $	$R_4 = R_2$	

Figure 3 : Porphyrines et dérivés macrocycliques voisins

les hydrogènes sont substitués par des noyaux benzéniques, qui est une molécule synthétique largement utilisée dans la chimie des porphyrines. Les positions méso sont aisément substituables, on peut ainsi obtenir des porphyrines avec des propriétés physico-chimiques très différentes selon la nature des substituants.

Citons enfin, trois dérivés macrocycliques, qui peuvent s'apparenter aux porphyrines que sont :

- les chlorines, obtenues par réduction du cycle pyrrolique
- les phthalocyanines, dans lesquelles les groupes pyrroles sont reliés par un atome d'azote
- les corrines, caractérisées par l'absence d'un carbone méso

Les types de molécules représentées en figure 1, ont une caractéristique commune : leurs propriétés acido-basiques. La présence ou l'absence d'atomes d'hydrogène sur les noyaux pyrroliques permet d'obtenir différentes espèces que sont :

- la base libre
- la forme mono ou dicationique : fixation d'1 ou de 2 atomes d'hydrogène, notée PH^+ et PH_2^+
- la forme mono ou dianionique : perte d'1 ou de 2 atomes d'hydrogène, notée P^- et P^{2-}

Il est aisé de comprendre l'importance de la forme dianionique, car la porphyrine sous cette forme est tout à fait apte à jouer le rôle de ligand en chimie de coordination par insertion d'un atome métallique en son centre.

Les données structurales qui caractérisent le noyau tétrapyrrolique sont nombreuses. Malgré la symétrie importante de ces molécules, elles présentent certaines particularités. Le tableau I met en évidence les données cristallographiques de certains de ces composés tétrapyrroliques sous forme de base libre [1,2,3].

		Porphine		MPDE		PPDE		TPP	
		[1]		[2]		[3]		[1]	
		amino	imino	amino	imino	amino	imino	amino	imino
$N-C_a$	(A)	1,380	1,374	1,365	1,366	1,367	1,370	1,351	1,349
C_a-C_b	(A)	1,431	1,452	1,438	1,457	1,441	1,452	1,444	1,432
C_b-C_b	(A)	1,365	1,345	1,368	1,359	1,360	1,355	1,364	1,362
$N-C_a-C_b$		125,5°	125,0°	125,3°	124,7°	125,4°	124,4°	126,3°	125,8°
$N-C_a-C_b$		107,9°	109,8°	107,5°	110,9°	106,9°	110,9°	108,2°	109,2°
$C_b-C_a-C_m$		126,9°	125,1°	127,2°	124,4°	127,7°	124,8°	124,5°	124,6°
$C_a-C_m-C_a$		127,1°		127,7°		128,1°		125,2°	
$N-N$	(A)	4,112		4,077		4,055		4,108	
$NH-NH$	(A)	2,41		2,05	2,26	—			
écart au plan moyen	(A)	0,025		0,070		0,074		\pm 0,38	

Tableau I : Données cristallographiques de porphyrines bases libres

Les paramètres structuraux ne sont pas notablement affectés par la nature des différents groupements en position 1 à 8 comme le montre la comparaison des angles et des distances inter-atomiques pour la porphine, la mésoporphyrine IX diméthylester (MPDE) et la protoporphyrine IX diméthylester (PPDE). Il est à remarquer que pour ces dernières, il peut exister une isomérisation structurale due à la présence des groupements périphériques disposés de façon asymétrique. Dans chacun des cas, le même isomère (1) a été caractérisé à l'état solide, certainement favorisé à cause de l'encombrement des noyaux imino et amino (figure 2).

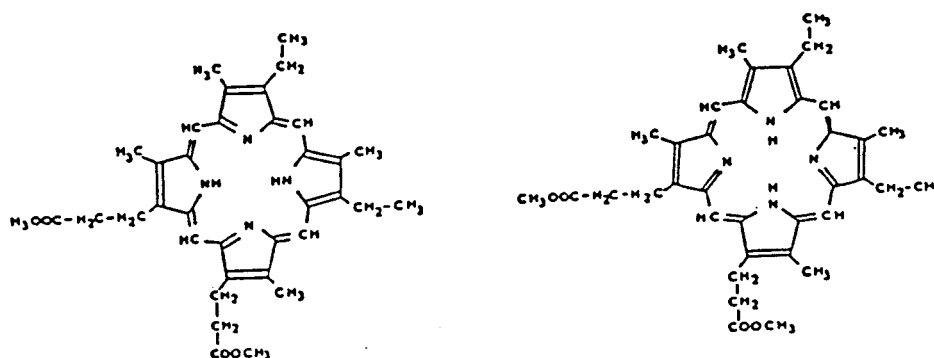


Figure 2 : Isomères à l'état solide

Dans le cas de dérivés substitués en méso, on pourrait s'attendre à l'absence d'un tel problème dû à la très grande symétrie de la molécule. Pourtant la structure RX de la TPP a mis en évidence que les noyaux benzéniques ne sont pas à la perpendiculaire du plan décrit par les 24 atomes du noyau pyrrolique (angle proche de 85°) [1]. L'existence de cet angle introduit une isomérisie qui a été mise en évidence en solution [3].

Bien entendu, la caractéristique de ces molécules est la pseudo planéité du noyau tétrapyrrolique. Dans le cas de la PPDE ou la DPDE, le plus grand déplacement est de l'ordre de $0,07\text{\AA}$ par rapport au plan moyen de la molécule alors que dans la TPP, la distance est un peu plus importante, ($0,38\text{\AA}$), localisée sur les carbones méso [1]. Une étude sur les écarts à la planéité dans ces porphyrines a montré que la porphine (ainsi que la TPP) a une conformation centrosymétrique avec les noyaux pyrroliques alternativement au-dessus et en-dessous du plan du macrocycle, alors que dans le cas de DPDME ou PPDME la conformation est plus complexe. Dans ces molécules les noyaux pyrroliques sont inclinés dans le même sens conférant une structure bombée à la molécule.

Ces résultats permettent de montrer que le noyau porphyrique a une structure rigide. En effet, les déformations dans le plan conduisant à une modification des distances inter-azotes centraux sont énergiquement moins favorables que celles perpendiculaires au plan. Ainsi certains composés présenteront une structure légèrement plissée ou bombée.

L'estérification des groupements propioniques et la présence de groupements saturés de nature différente sur le noyau tétrapyrrolique ne provoquent pas de grosses modifications géométriques. Par contre, le cas est peut-être différent, lorsque des groupements susceptibles de se conjuguer au cycle sont introduits. Dans le cas de la TPP, les cycles benzéniques sont quasi perpendiculaires au cycle porphyrique ainsi la conjugaison avec le cycle est minimale. Cette observation est renforcée par la longueur de la liaison entre le carbone méso (C_m) et le premier carbone benzénique (C_{benz}) qui est de l'ordre $1,496\text{\AA}$, caractéristique d'un caractère σ prononcé [1]. Quant à la protoporphyrine IX qui présente deux vinyles susceptibles de se conjuguer au cycle tétrapyrrolique, ils approchent de la planéité avec le coeur plus que le font les groupements éthyles dans la MPDE. Cependant des interactions entre les protons vinyliques

et l'atome d'hydrogène méso d'une part, et avec les groupements méthyles voisins d'autre part, font que les substituants vinyliques sont hors du plan. Le schéma 1 représente ci-dessous les distances moyennes, mettant en évidence le caractère σ de la liaison C_b-C et π de la liaison $C-C$



Schéma 1 : Les vinyliques dans la protoporphyrine IX

Excepté dans les régions spécifiques des différents substituants, il n'y a pas de différences profondes entre les diverses molécules. Ce résultat semble contredire les résultats spectroscopiques et la réactivité de telles substitutions.

2). Les métalloporphyrines

Le cycle pyrrolique peut, après la perte de ses deux protons centraux, coordonner un ion métallique conduisant à une métalloporphyrine. Si de plus, cette molécule est associée à une protéine, on parlera de métalloprotéine. Pour une valence de l'ion métallique différente de deux, il prend un ou plusieurs contre ions assurant ainsi l'électroneutralité.

Les métalloporphyrines (ainsi que les composés dérivés métallocorrines, métallochlorines) sont des pigments très répandus dans le milieu naturel. Le tableau II donne quelques exemples :

Va	métalloporphyrine	milieu minéral	pétrole (poison de catalyseur d'hydrotraitement)
Fe	métalloporphyrine	milieu animal	hémoglobine, myoglobine
Co	métallocorrine	milieu animal	vitamine B 12
Mg	métallochlorine	milieu végétal	chlorophylle

Tableau II : Métalloporphyrines dans le milieu naturel

Pour comprendre l'intérêt porté à l'étude de certaines de ces molécules, il est bon de revenir sur le rôle respectif de celles-ci.

Les hétéroprotéines sont des protéines qui contiennent des amino-acides (cas des holoprotéines) et d'autres composés organiques ou inorganiques appelés groupement prosthétique de la protéine. Les cytochromes, l'hémoglobine, sont des hétéroprotéines dans lesquelles le groupe prosthétique est un noyau porphyrinique ayant en son centre un atome de Fe, appelé couramment hème (d'où le nom hémoprotéine). L'hème constitue généralement le site actif de ces molécules, c'est-à-dire l'endroit où se déroule la réaction propre à l'hémoprotéine considérée. Sa spécificité est due non seulement à la nature de la porphyrine constituant le groupement prosthétique mais aussi à la nature même de la protéine qui joue un rôle protecteur en protégeant le site actif de réactions annexes, en l'enfermant dans une cage hydrophobe (ex : hémoglobine). A titre indicatif, le tableau III donne pour différentes hémoprotéines la porphyrine associée à l'hème.

Protoporphyrine	hémoglobine, myoglobine, cytochrome b, cytochrome P ₄₅₀
Porphyrine C	cytochrome C
Porphyrine A	cytochrome A
Porphyrine A ₂	cytochrome A ₂

Tableau III : Porphyrines associées aux hémoprotéines

Enfin, il convient de citer rapidement les différents rôles physiologiques de ce type de molécules qui sont présentées de façon succinctes dans le tableau IV et qui expliquent les nombreux travaux menés sur ces molécules.

Cytochrome C	migration d'e ⁻ par l'intermédiaire du groupe Fe ^{II} /Fe ^{III}
Hémoglobine	transfert d'O ₂ de la chaîne respiratoire aux muscles
Myoglobine	fixation de l'O ₂ apporté par l'hémoglobine au niveau des muscles

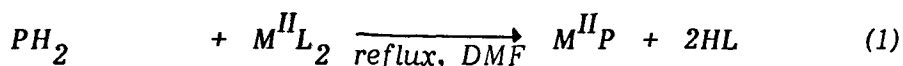
Tableau IV : Rôle des hémoprotéines

La chlorophylle qui n'est pas une hémoprotéine, mais dont le noyau est constitué par une chlorine, proche structuralement du noyau porphyrinique, joue un rôle important dans le monde végétal puisqu'elle est l'agent indispensable pour la photosynthèse (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique).

L'objet de notre étude étant d'analyser le pigment malarique, résidu de dégradation de l'hémoglobine, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux porphyrines de fer, caractéristiques des groupes prosthétiques de l'hémoglobine et de ses analogues.

II - LES PORPHYRINES DE FER

L'insertion d'un atome métallique dans une porphyrine est aisée. Une voie de synthèse généralisée a été mise au point par Adler et Longo qui permet d'obtenir la métalloporphyrine à partir de l'ion métallique sous forme de sel divalent et de la porphyrine désirée sous forme de base libre. La réaction suivante résume la voie de synthèse et souligne le potentiel de cette méthode en indiquant les métalloporphyrines pouvant être obtenues [5].



protoporphyrine	sel de Zn, V
deutéroporphyrine	sel de Cu, Co
tétraphénylporphyrine	sel de Fe

Les paramètres physico-chimiques de la métalloporphyrine ainsi obtenue, dépendent non seulement de la nature de la porphyrine mais aussi de l'ion métallique. En particulier l'atome de fer présentant différents degrés d'oxydation et de spin, l'insertion de celui-ci pourra conduire à des porphyrines, aux propriétés très différentes. C'est d'ailleurs cette dualité (nombre d'oxydation, valeur de spin) qui confère aux porphyrines de fer un rôle essentiel en biologie.

1. Stéréochimie des porphyrines

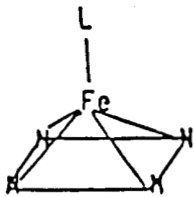
L'atome de fer peut exister sous 2 états de valence stable Fe^{II} et Fe^{III} . Ces deux degrés d'oxydation conduiront à la synthèse respective de

ferroporphyrines et de ferriporphyrines. L'état de valence Fe^{II} permet les trois états de spin, haut spin ($S=2$), spin intermédiaire ($S=1$), bas spin ($S=0$), notés respectivement HS, SI, BS, alors que l'état de valence Fe^{III} permet les trois états de spin $5/2$, $3/2$, $1/2$ (HS, SI, BS). Des modèles de ferri et ferroporphyrines, dans lesquels le fer se trouve à l'état HS, IS, BS, sont cités en figure 3. La stéréochimie du complexe, la nature du (des) ligands et le nom de la porphyrine de fer sont indiqués sur la figure 3. Ces données résultent de structures obtenues par RX ([6] à [12]). Le tableau V donne différents paramètres structuraux qui seront évoqués ci-dessous.

	nom du composé	$C_t - Fe$	$Fe - N$	$Fe - L$	$C_t - N$
III Fe	HS CIPPF _e	0,475 (3)	2,062 (3)	2,218 (2)	2,007 (3)
	CH ₃ O(PPDE)Fe	0,455 (3)	2,073 (4)	1,842 (4)	2,022 (3)
	IS TPPeClO ₄	0,270 (4)	1,997 (5)	2,025 (4)	1,989 (5)
	BS (Im) ₂ TPPFe	0	1,989 (5)	1,957 (4) 1,991 (4)	1,989 (5)
	HS (2CH ₃ Im) ₂ TPPFe	0,420 (2)	2,086 (3)	2,160 (2)	2,044 (3)
Fe ^{II}	IS TPPe	0	1,972 (4)	-	1,972 (4)
	BS (pip) ₂ TPPFe	0	2,004 (3)	2,127 (3)	2,004 (3)

Tableau V : Données cristallographiques de porphyrines de fer

HS

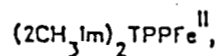


[6] L = OCH₃, méthoxoprotoporphyrine IX diméthyl ester,

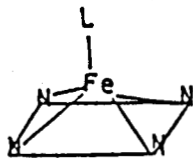


[7] L = Cl, chloroprotoporphyrine IX, ClPPFe^{III}

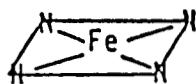
[8] L = 2 méthyl imidazole, diméthylimidazole TPP



SI

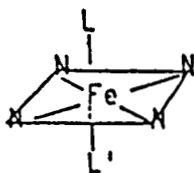


[9] L = OClO₃, perchlorate TPP, (TPPFe^{III})ClO₄



[10] -----, TPP, TPPFe^{II}

BS



[11] L = L' = imidazole, bisimidazole TPP, [Im₂(TPPFe^{III})]⁺

[12] L = L' = pipéridine, bispipéridine TPP, (pip)₂TPPFe^{II}

Figure 3 : Stéréochimie des porphyrines de fer

a). Les complexes haut spin

La ferriporphyrine adoptera une structure pyramidale. En effet, le rayon ionique du Fe^{III} dans la configuration HS étant supérieur au rayon du coeur d'une porphyrine non contrainte [13], celui-ci se situera hors du plan du noyau tétrapyrrolique. Généralement la distance qui sépare l'atome de Fe et le centre du macrocycle, nommée $C_t - Fe$, est caractéristique de ces espèces. Elle est comprise en moyenne entre 0,45Å et 0,48Å.

La ferroporphyrine adoptera la même structure que la ferriporphyrine HS. Cependant, on pourrait s'attendre à une augmentation de la distance $C_t - Fe$, due à l'augmentation de la densité électronique dans les couches d ($1e^-$ supplémentaire). Le tableau prouve cependant le contraire. En effet, il est à remarquer que la distance $C_t - Fe$ est inférieure d'environ 0,03Å dans les complexes Fe^{II} HS que dans les complexes Fe^{III} HS. Cette proximité de l'atome de fer induit deux phénomènes que sont l'extension du cycle (traduit par l'augmentation de la liaison Fe - N) et une structure bombée. Le premier phénomène peu favorable à cause de la rigidité du cycle (voir paragraphe I -1) s'accompagne de l'inclinaison des noyaux pyrroliques. La structure RX du 2méthylimidazole Fe^{II} TPP, a mis en évidence que le plan formé par les 4 azotes (P_N) et les atomes de C (P_C) ne sont pas superposables. La distance $P_N - P_C$ est de l'ordre de 0,13Å alors que généralement cette distance est inférieure à 0,05Å dans les ferroporphyrines HS. [8]

b). Les complexes à spin intermédiaire

Avec un choix judicieux de ligands, on peut s'attendre à obtenir des complexes à spin intermédiaire. La $(TPPFe)^+OCL_3^-$ [12] est un exemple de ferriporphyrine qui se caractérise par une valeur intermédiaire de la distance $C_t - Fe$ de l'ordre de 0,27Å.

La FeTPP est un exemple de ferroporphyrine à spin 1 caractérisée par une structure parfaitement plan carrée.

c). Les complexes bas spin

Dans ce type de complexe, l'atome de Fe est confondu ou peu éloigné du centre C_t du coeur porphyrinique dû à un rayon ionique du fer beaucoup plus faible.

Outre ce phénomène, on peut s'attendre à voir les liaisons Fe-N moins importantes dues à la compacité électronique de l'atome de Fe dans ces conditions.

La $((Im)_2TPPFe)^+Cl^-$, est un modèle de ferriporphyrine BS. L'atome de fer est situé légèrement au-dessus du plan déterminé par les atomes d'azote (0,009Å). D'autre part, la distance moyenne Fe - N (1,989Å) est significativement plus courte que ceux des complexes HS. Ces deux faits expérimentaux confirment les hypothèses, énoncées ci-dessus, cependant une anomalie apparaît. En effet, les deux noyaux imidazoles dans cette molécule ne sont pas équivalents. Les distances Fe - N sont de 1,957Å et 1,991Å. Ceci s'explique par la différence d'orientation des 2 noyaux imidazoliques par rapport au plan P_N : l'un se situe dans un plan bissecteur au plan défini par $N_{por}FeN_{por}$, alors que l'autre est obtenu par rotation d'un angle de 45°. La différence de longueur de liaison s'explique par l'interaction stérique existant entre le H imidazolique avec l'azote porphyrique (figure 4).

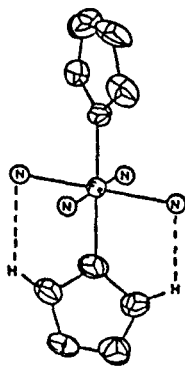


Figure 4 : Interaction stérique entre un ligand et le noyau tétrapyrrolique

Les ferroporphyrines sont centrosymétriques. En effet, la $(pip)_2TPPFe^{II}$ présente une distance Fe - C_t nulle et une distance Fe - L de l'ordre de 2,127Å. Cette valeur très élevée indique une forte interaction stérique entre le cycle porphyrinique et les H pipéridiques.

Bien qu'une classification méthodique ait été adoptée pour présenter la stéréochimie des porphyrines de fer, il existe des cas particuliers qui ne s'y intègrent pas.

Nous ne citerons que deux exemples.

* La bischloro3-pyridine octaéthylferriporphyrine qui peut adopter différentes géométries selon la température. Il existe un équilibre thermique de spin qui conduit, à basse température, à une forme bas spin et à température ambiante à une forme mal définie, appelée mixte (5/2 - 3/2) [14].

* La bisquo-ferritétraphénylporphyrine est l'exception la plus intéressante [15]. En effet, dans cette molécule, le fer est à l'état HS et cependant adopte une conformation centrosymétrique. Il est coordonné à 2 molécules d'eau, chacune d'elles liée par liaison hydrogène à un ion perchlorate et à l'atome d'oxygène du THF (solvant de cristallisation). Cette molécule se caractérise par une distance Fe - N (ou C_t - N) de 2,045Å, très importante par rapport aux dérivés ferri BS classiques, et par l'absence d'une structure bombée (le plus grand écart par rapport à la planéité est de 0,034Å). Cette structure démontre que sous certaines conditions, le noyau tétrapyrrolique est susceptible de s'agrandir.

Ce dérivé est très important car il sera évoqué dans les mécanismes d'agrégation des porphyrines dans l'eau (paragraphe II - 3).

En conclusion, la multiplicité de spin des ferroporphyrines et des ferriporphyrines de fer conduit à différentes structures. Ces géométries dépendent non seulement du nombre mais surtout de la nature des coordinats axiaux. On peut s'étonner de l'orientation particulière de ceux-ci par rapport au plan porphyrique (ex : imidazole dans la (Im)₂TPPFe) ainsi que de la présence favorisée d'un isomère dans le cas des bases libres. Ces faits expérimentaux sont certainement le reflet de contraintes exercées au sein du cristal qui se traduisent par des arrangements spatiaux favorisés. Ainsi, les caractéristiques de la porphyrine de fer à l'état solide pourront être différentes de celles qu'elle présente en solution. Ainsi, la comparaison spectroscopique à l'état solide et liquide sera indispensable pour percevoir les interactions d'une unité porphyrique à une autre.

Le point le plus important à souligner sur la stéréochimie des porphyrines de fer est certainement le fait que la transition d'un état de spin à un autre s'accompagne d'un déplacement de l'ion métallique vers le centre de la porphyrine et vice versa (à une exception près). C'est cette commutativité de spin qui confère aux porphyrines de fer un rôle si important dans les processus réactionnels de certaines hémoprotéines comme par exemple l'hémoglobine.

2. L'hémoglobine

a). Structure et rôle physiologique

L'hémoglobine est une protéine oligomérique dont la structure a été proposée suite à l'étude en RX de Perutz [16]. Cette biomolécule est constituée de quatre sous unités, deux à deux identiques désignées par $\alpha\beta$ et $\alpha\beta$. Chacune de ces unités comprend une chaîne polypeptidique (les chaînes α et β possèdent respectivement 141 et 161 aminoacides) et un groupement prosthétique qui est la protoporphyrine IX de fer.

Les chaînes α et β sont maintenues entre elles par des contacts non polaires ainsi que par des interactions de type électrostatique et des liaisons hydrogènes. Cependant, il est à souligner que les interactions sont minimales entre chaînes de même nature et maximales entre les chaînes de nature différente. Ainsi la structure quaternaire de l'hémoglobine, obtenue par cohésion des 4 sous unités est généralement écrite sous la forme $(\alpha\beta)(\alpha\beta)$.

Sur chacune des unités α, β se situe la protoporphyrine IX de fer qui est liée à la chaîne peptidique par un acide aminé. Il s'agit d'une histidine (nommée histidine proximale ou F_8) dont le noyau imidazolique coordonne l'atome de fer.

Une autre histidine, appelée histidine distale, se situe à la verticale du site porphyrique, comme le montre la figure 5.

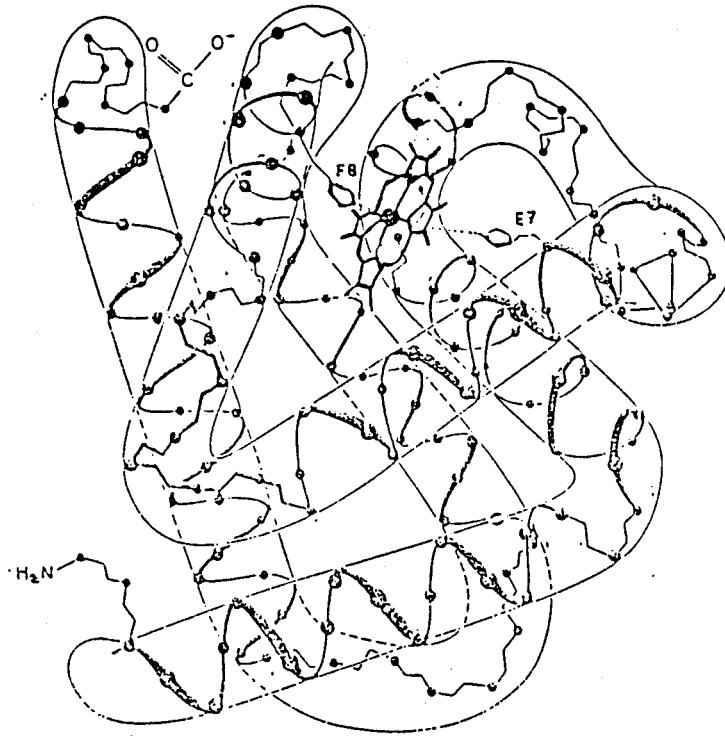
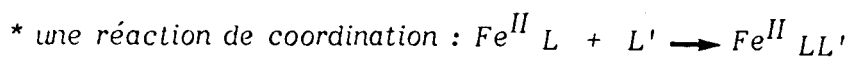
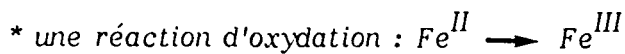


Figure 5 : Une chaîne de l'hémoglobine

Dans cet état présenté ci-dessus, l'atome de fer à une coordinance de 5 avec, pour ligand axial, une base azotée (imidazole). Dans cette structure, le fer est à l'état II dans un état haut spin HS. La porphyrine de fer, dans cet état physico-chimique au sein de l'hémoglobine, est appelé hème.

L'atome de fer peut subir non seulement des changements de coordinance (multiplicité de spin) mais aussi de degré d'oxydation. Ces faits permettent d'émettre deux hypothèses quant aux possibilités réactionnelles d'une telle espèce.



1.a). Réaction d'oxydation

Les réactions d'oxydation de l'hémoglobine conduisent à des produits appelés méthémoglobine. Le fer est alors au degré III et a pour nombre de coordinance 6. La structure stéréochimique du complexe obtenu dépendra du pouvoir du 6^{ème} ligand axial. Le tableau VI suivant indique quelques exemples:

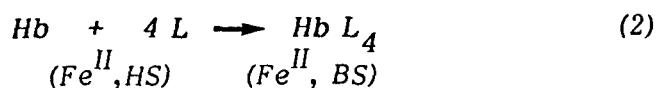
ligand	Nom du complexe
Cl^-	Chlorométhémoglobine
F^-	Fluorométhémoglobine
CN^-	Cyanométhémoglobine
N_3^-	Azidométhémoglobine

Tableau VI : dérivés ferri de l'hémoglobine

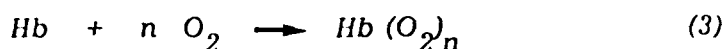
L'hémoglobine, qui est sous forme ferrique, a perdu ses propriétés fonctionnelles qui ne peuvent se manifester que par une réaction de coordination.

2.a). Réaction de coordination

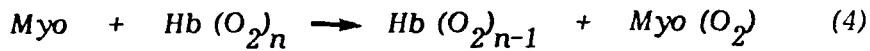
L'hémoglobine, qui possède 4 noyaux tétrapyrroliques, possèdent 4 sites vacants en position axiale du fer. On peut donc écrire une réaction du type:



Une telle réaction peut être mise en évidence en étudiant l'affinité de l' O_2 pour l'hémoglobine. En effet l'hémoglobine, où le Fe est à l'état II, en HS, appelé usuellement désoxyhémoglobine, peut fixer une ou plusieurs molécules d'oxygène. L'oxyhémoglobine (HbO_2) ainsi obtenue peut elle aussi à son tour perdre les molécules d' O_2 impliquant une réversibilité de la réaction (2). On peut donc écrire :



Ce processus réactionnel est mis en évidence par le fait suivant. L'hémoglobine oxygénée (rouge vif) devient désoxygénée (rouge violacé) au niveau des tissus et repart par la voie veineuse vers le système pulmonaire où elle se recharge en oxygène. L'oxygène ainsi apporté au niveau des tissus est fixé par la myoglobine (Myo) selon la réaction (4).



Cette réaction met en évidence les différences structurales de ces 2 molécules. Alors que l'hémoglobine est une molécule tétramère (2 chaînes, 2 chaînes avec 4 noyaux porphyriques), la myoglobine est une monomère, constituée d'une seule chaîne polypeptidique et ne contient qu'un seul site porphyrique. La stœchiométrie de la réaction (4) est ainsi expliquée.

On pourrait s'attendre à ce que l'hémoglobine et la myoglobine aient la même affinité vis-à-vis de la molécule d'oxygène sachant que dans l'hémoglobine les 4 sites porphyriques sont très éloignés les uns des autres permettant à l'hémoglobine de fixer une molécule d' O_2 de façon équivalente sur chacun des sites. Cette réaction (5) peut s'écrire sous la forme :



En définissant le taux de saturations S par : $S = \frac{(m\text{O}_2)}{(m) + P_{(\text{O}_2)}}$, il est aisé

d'obtenir S en fonction de $P_{(\text{O}_2)}$ par l'expression :

$$S = \frac{K}{1 + KP_{(\text{O}_2)}}$$

La figure 6 représente les variations de S en fonction de $P_{(\text{O}_2)}$

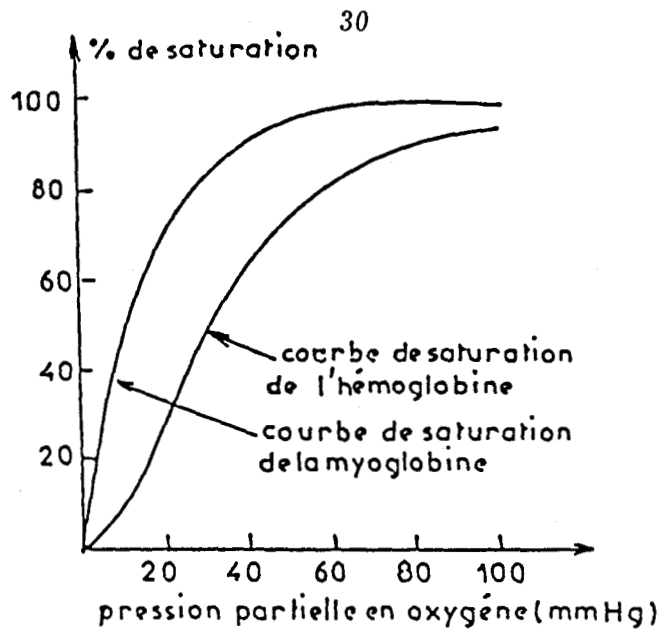


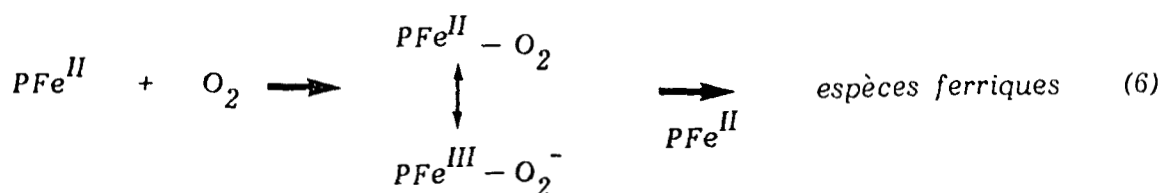
Figure 6 : Courbes de saturation par l'oxygène de l'hémoglobine et la myoglobine

Alors que la courbe présente l'allure hyperbolique attendue pour la myoglobine, la courbe de l'hémoglobine présente une allure sigmoïde, démontrant ainsi que les sites ne sont ni totalement indépendants, ni totalement dépendants. Ceci peut se traduire en disant qu'une molécule partiellement oxygénée a plus de chance de fixer une molécule d'O₂ que n'en a une molécule complètement déligandée. Ce phénomène caractéristique de certaines protéines est appelé phénomène de coopérativité.

Après ce bref aperçu du rôle physiologique de l'hémoglobine, on peut s'étonner de voir que la présence d'un oxydant tel que l'oxygène ne conduise pas à une structure ferrique irréversible. C'est pour cette raison que de nombreux travaux ont été menés pour mimer l'activité physiologique de l'hémoglobine.

b). Les modèles biomimétiques

Les ferriporphyrines de synthèse décrites précédemment conduisent généralement à une ferriporphyrine de façon irréversible quand elles sont exposées à l'air.



Complexe dioxo

La réaction (6) indique que l'oxydation ne peut avoir lieu que si le complexe dioxo est mis en présence d'une ferroporphyrine.

Le problème posé par la nature de la liaison, $Fe - O_2$, dans les hémoprotéines peut être appréhendé par la spectroscopie IR. En effet, la vibration $\nu_{O - O}$ dans l'hémoglobine est de l'ordre de 1107 cm^{-1} , voisine de celle que l'on trouve dans des composés du type O^{2-} , de l'ordre de 1100 à 1150 cm^{-1} [18]. Ainsi peut-on assimiler la liaison $Fe^{II} - O_2$ à une liaison du type $Fe^{III} - O_2^-$ (cette notion sera renforcée par les résultats obtenus en spectroscopie Raman dans le chapitre 4).

On peut s'étonner cependant, que l'hémoglobine en présence d'un agent oxydant tel que l'oxygène ne conduise pas à une espèce ferrique irréversible. La réaction ci-dessus indique que le complexe ferrique ne peut être atteint que si le complexe $PFeO_2$ est mis en présence d'une autre ferroporphyrine. Or, la structure RX de l'hémoglobine a mis en évidence que les sites hémiques sont très éloignés les uns des autres, chacun étant enfermé dans une cage hydrophobe créée par la chaîne qui les supportent. [17].

Les premiers travaux ont eut pour but de stabiliser un complexe dioxo. Dans cet objectif, des substituants volumineux sont placés sur la périphérie du cycle porphyrine, pour empêcher l'accès au coeur central de ligands axiaux trop gros et pour faciliter l'accès de petits ligands tel que l'oxygène. De plus ce modèle, "picket fence", stabilise le complexe dioxo en empêchant stériquement l'approche de 2 sites métalliques. La mésotétra ($\alpha\beta\alpha\alpha$) pivaloyl amidophényle fut un des premiers modèles qui permis de fixer réversiblement l' O_2 [19]. La structure représentée figure 7 permet de se rendre compte de l'encombrement stérique généré par la substitution des noyaux phényles.

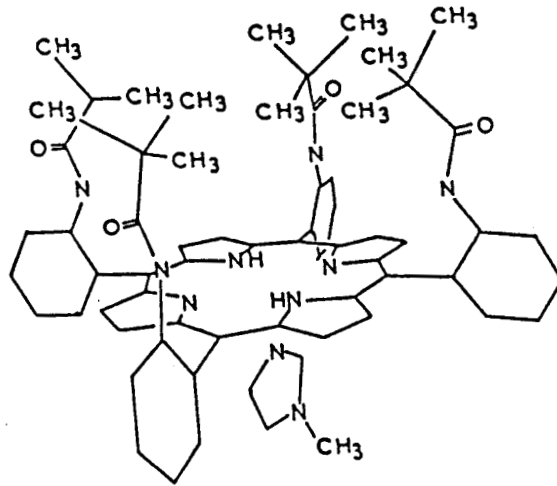
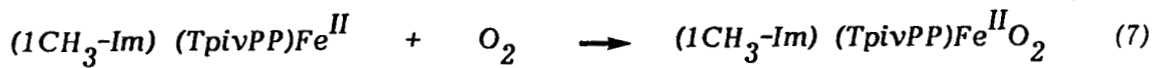


Figure 7 : Le modèle "picket fence"

La (1 méthyl imidazole) (TpivPP) Fe obéit à une équation du type :



D'autres modèles par la suite, dérivés de celui-ci, ont été synthétisés, particulièrement ceux avec des domes, "capped model", tels que celui représenté en figure 8.

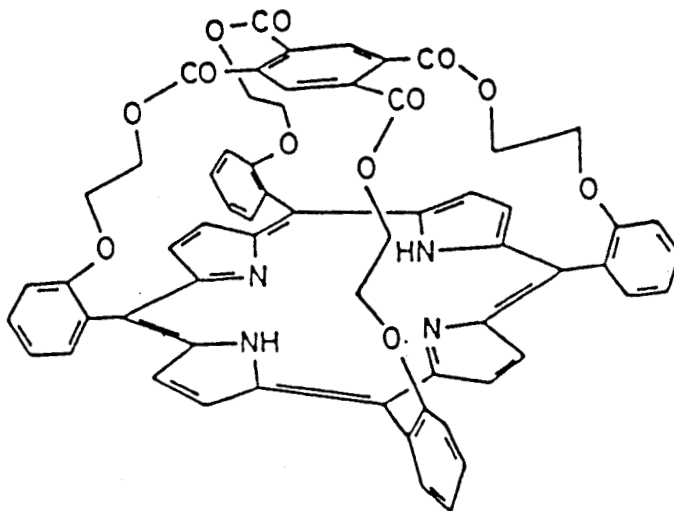


Figure 8 : Le modèle domé - "capped model"

Bien que ces composés fixent réversiblement l'oxygène, le composé dioxo présente une mauvaise stabilité dans le temps. En effet, celle-ci dépend de la concentration en base azotée. En l'absence d'un excès de base, le complexe dioxo a une durée de vie relativement courte conduisant à une espèce ferrique irréversible. Le mécanisme réactionnel présenté ci-dessus permet de mettre en valeur l'importance de l'excès de base (schéma 2).

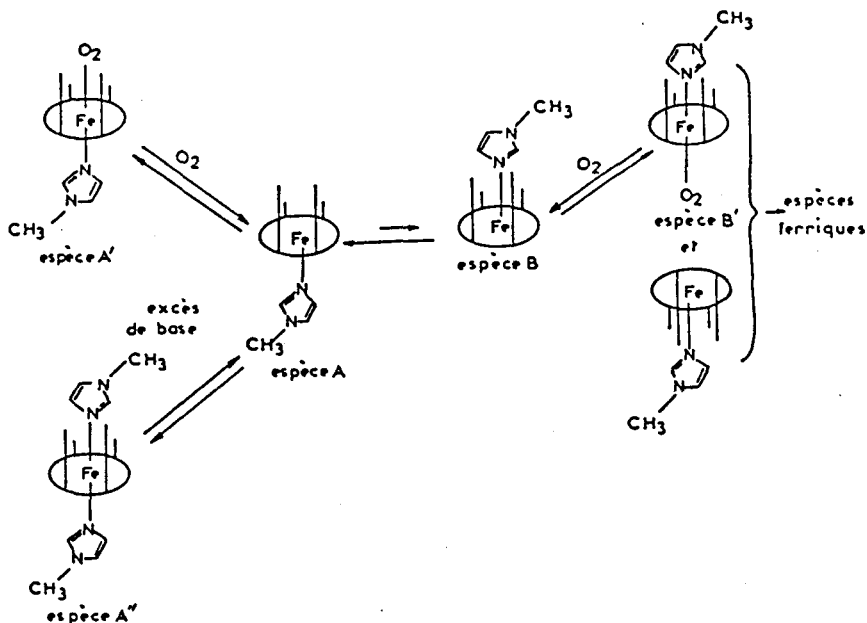


Schéma 2 : Mécanisme de fixation de l'O₂ par un composé biomimétique

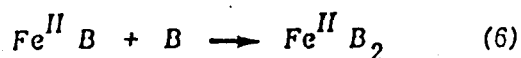
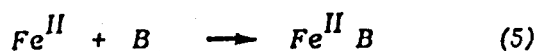
L'excès de base permet d'être sûr de saturer la position non protégée et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation de A''. Le schéma 2 permet de plus, de comprendre l'instabilité dans le temps du complexe dioxo A' conduisant toujours à l'espèce ferrique C, par oxydation du complexe dioxo B', peu stable à cause du non encombrement stérique autour de l'O₂.

Ainsi, ces travaux ont suscités deux voies de recherche, afin d'élucider le rôle de :

- * la base azotée
- * l'environnement physico-chimique de la 6^{ème} position de coordination

1.b). Influence de la base azotée

Ces études tendent à s'intéresser au rôle de l'histidine proximale et par la même, de la protéine au sein de la molécule. Un composé ferroporphyrine à 5 ou 6 coordinats sera obtenu selon l'interaction stérique entre la base azotée B et le coeur porphyrinique. Les 2 réactions suivantes peuvent être écrites :



En utilisant des bases telles que la méthyl imidazole, la pyridine, l'obtention d'une espèce $\text{Fe}^{\text{II}} \text{B}_2$ est prépondérante ($K_6 \gg 10K_5$) [20]. Cependant, en augmentant l'interaction stérique entre la base et la ferroporphyrine, seule la réaction (5) a lieu (ex : la 2 méthyl imidazole).

L'utilisation de modèle tel que la T pivPPFe^{II} ne conduit qu'à l'espèce 5. Outre la possibilité de faire varier l'interaction stérique en substituant des groupements méthyls sur l'imidazole, on peut par utilisation d'un "piquet", créer une liaison covalente entre l'atome métallique du coeur porphyrinique et l'imidazole tel que celui présenté en figure 9, ("tailed picket fence") [21].

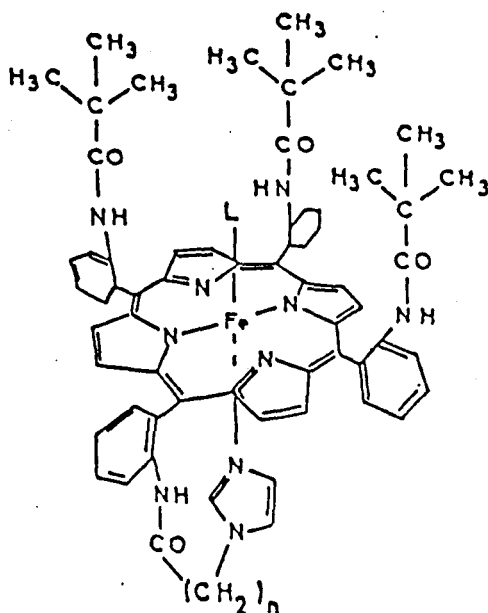


Figure 9 : Le modèle "tailed picket fence"

Les composés, cités ci-dessus, forment des complexes dioxo, cependant l'encombrement stérique se répercute sur l'affinité de l' O_2 . La substitution du 1 CH_3Im produit une diminution d'un facteur 10 de l'affinité de l' O_2 . De même, le passage de la 2 CH_3Im à la 1,2 CH_3Im diminue de nouveau d'un facteur 10 l'affinité [22]. Ainsi l'encombrement stérique autour du noyau imidazolique peut défavoriser la fixation d' O_2 .

Ces phénomènes observés permettent de suggérer une explication quant à la coopérativité de l'hémoglobine. En effet, la fixation d'oxygène s'accompagne d'une transition d'un état de spin élevé à un spin faible et corrélativement d'un déplacement de l'ion ferreux vers le centre du groupe prosthétique. L'imidazole et donc l'histidine proximale, accompagnera le déplacement du fer. Ainsi cette déformation à courte distance induira des tensions au niveau de la chaîne protéique et donc provoquera une interaction à longue distance se traduisant par une variation des distances imidazoles-hèmes des 3 autres sites. Si cette variation diminue les interactions stériques, la fixation d'une nouvelle molécule d' O_2 sera aisée. Cette hypothèse semble renforcée par les études récentes menées sur l'influence de l'orientation des noyaux imidazoliques par rapport à la porphyrine [23].

Cependant, ces modèles, bien qu'ils permettent d'avoir une vision plus précise du mécanisme de fixation de l'oxygène par l'hémoglobine, ne rendent pas compte de certaines propriétés. En particulier, la stéréochimie des complexes carbonylés est très différente entre les modèles synthétiques et les hémoprotéines alors que pour les complexes dioxo il y a coïncidence parfaite (schéma 3).

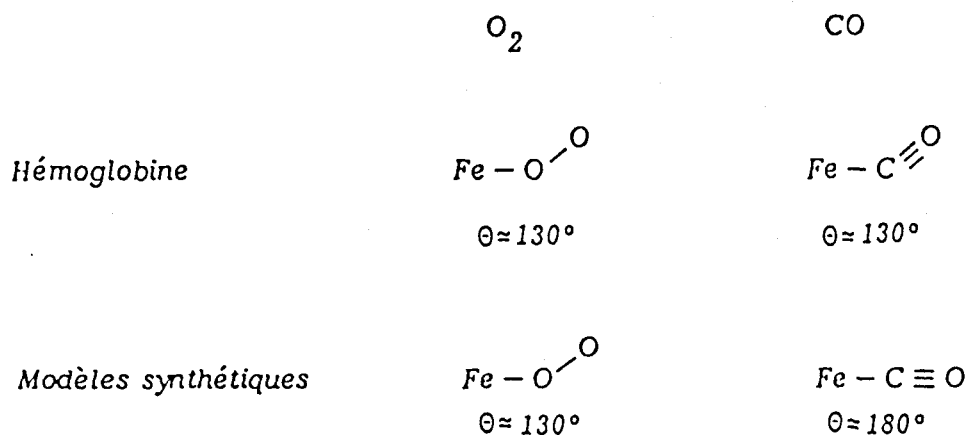


Schéma 3 : Représentation des stéréochimies de l'hémoglobine et des modèles synthétiques avec l' O_2 et le CO

Cette différence a conduit les chimistes à s'intéresser à l'environnement physico-chimique de la 6^{ème} position de coordination et ainsi d'appréhender le rôle joué par l'histidine distale.

2.b). Influence de l'environnement physico-chimique de la 6^{ème} position de coordination

Afin de privilégier une orientation coudée de la molécule CO, un encombrement stérique est réalisé en créant un lien, "strap model", sur le coeur porphyrrique [24]. La création d'une liaison covalente transversale au noyau tétrapyrrolique permet ainsi de modéliser la stéréochimie de la fixation de CO (figure 10). Le modèle domé, présenté auparavant (figure 8) ne permet pas de mimer cette réalité et, démontre ainsi l'importance de la longueur de la chaîne covalente.

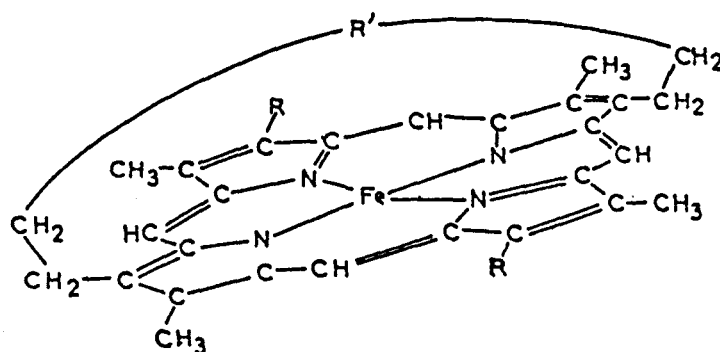


Figure 10 : Le modèle à lien - "strap model"

De plus, en jouant sur la nature de la chaîne, sera modifié, non seulement l'encombrement stérique mais aussi la polarité de la poche créée [25]. En présence d'une chaîne où les premiers éléments sont des groupements amides, l'affinité pour l'O₂ est augmentée. Ce fait expérimental permet de confirmer l'hypothèse décrite précédemment quant à la nature de la liaison Fe - O₂. En effet, en écrivant sous forme de dipole cette liaison, $Fe^{II\delta+} - O_2^{\delta-}$, elle peut être stabilisée par une fonction amide (figure 11).

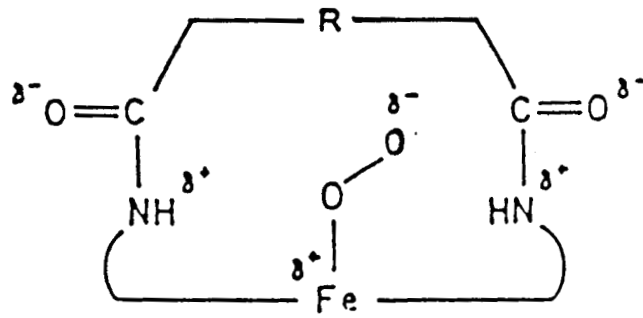


Figure 11 : Stabilisation de la liaison $Fe - O_2$ par une fonction amide

Ceci permet de rendre compte du rôle de l'histidine distale qui permet de stabiliser la forme oxy, due à la nature même de la liaison $Fe - O_2$.

Cependant, bien que ces modèles permettent d'obtenir des composés carbonylés semblables aux hémoprotéines, l'encombrement stérique créé dans ces molécules fait que les affinités pour le CO ou l' O_2 sont très inférieures aux hémoprotéines.

La solution finale proposée par Momentau en 1988 [20] en synthétisant un modèle s'inspirant du "strap model" et du "picket fence", est présentée en figure 12.

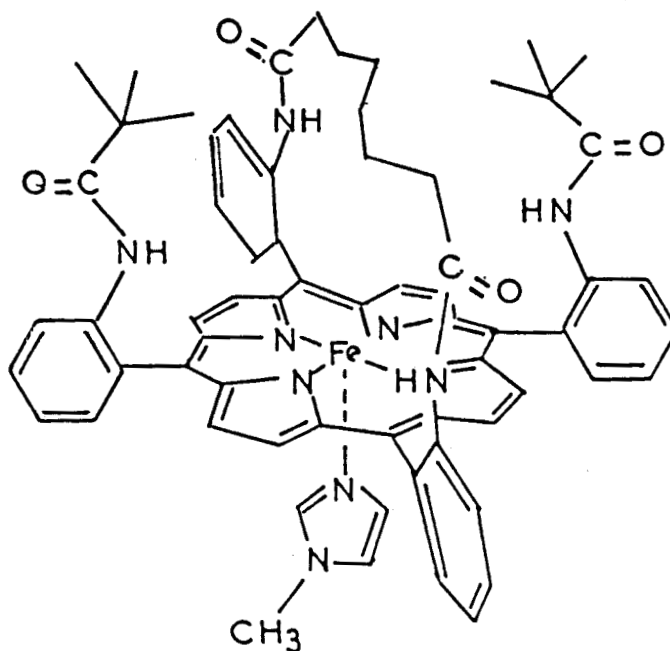


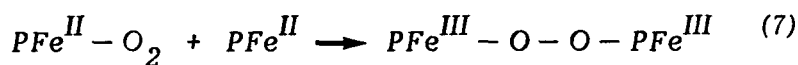
Figure 12 : Composé modèle s'inspirant du "strap model" et du "picket fence model"

La boucle diamide interdit l'accès au fer et les 2 piquets pivaloyls empêchent tout déplacement latéral du lien. Ce composé permet non seulement d'améliorer les affinités respectives de l'O₂ et du CO mais aussi de respecter les géométries observées dans le cas des hémoprotéines.

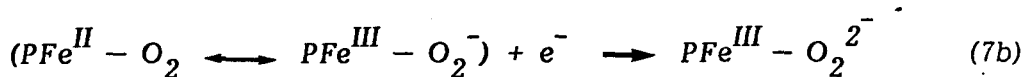
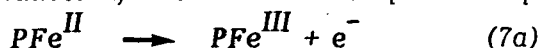
Outre l'utilité des modèles synthétiques, pour comprendre le rôle physiologique de l'hémoglobine, ils ont permis de caractériser des intermédiaires réactionnels provenant de la réaction de dégradation des complexes dioxo. L'identification de 2 espèces a pu être réalisée.

* les complexes peroxy

Ils sont synthétisés de la façon suivante :



Ces complexes caractérisés par RMN [26], Raman [27], ne sont stables qu'à basse température. La réaction (7) doit être comprise comme une réaction d'oxydo réduction, mise en évidence par les équations (7a) et (7b).



Le dérivé péroxy peut être le premier composé ferrique intervenant dans l'oxydation du complexe dioxo (voir réaction 6 et schéma 2). Les équations (7a) et (7b), démontrent l'importance jouée par la protéine au sein de l'hémoglobine en éloignant les sites hémiques les uns des autres, conservant ainsi le rôle fonctionnel de chacun.

Dans le cas où la porphyrine est trop encombrée, l'unité peroxy est peu stable et conduit au dérivé oxo.

* les complexes oxo

Ils sont obtenus suite à la réaction suivante où P représente une porphyrine encombrée :



Ces composés isolés à basse température peuvent être stabilisés par la présence de base azotée. Des informations structurales ont pu être obtenues

sur ces composés à l'aide de différentes techniques spectroscopiques (RMN [28], Raman [29]).

Ils présentent un intérêt énorme car ils sont proposés comme intermédiaires réactionnels dans le mécanisme physiologique des cytochromes (réaction d'oxydo-réduction).

En conclusion, le schéma 4 suivant résume les différentes réactions que peut subir une ferroporphyrine en précisant, quand il y a lieu, l'espèce biologique.

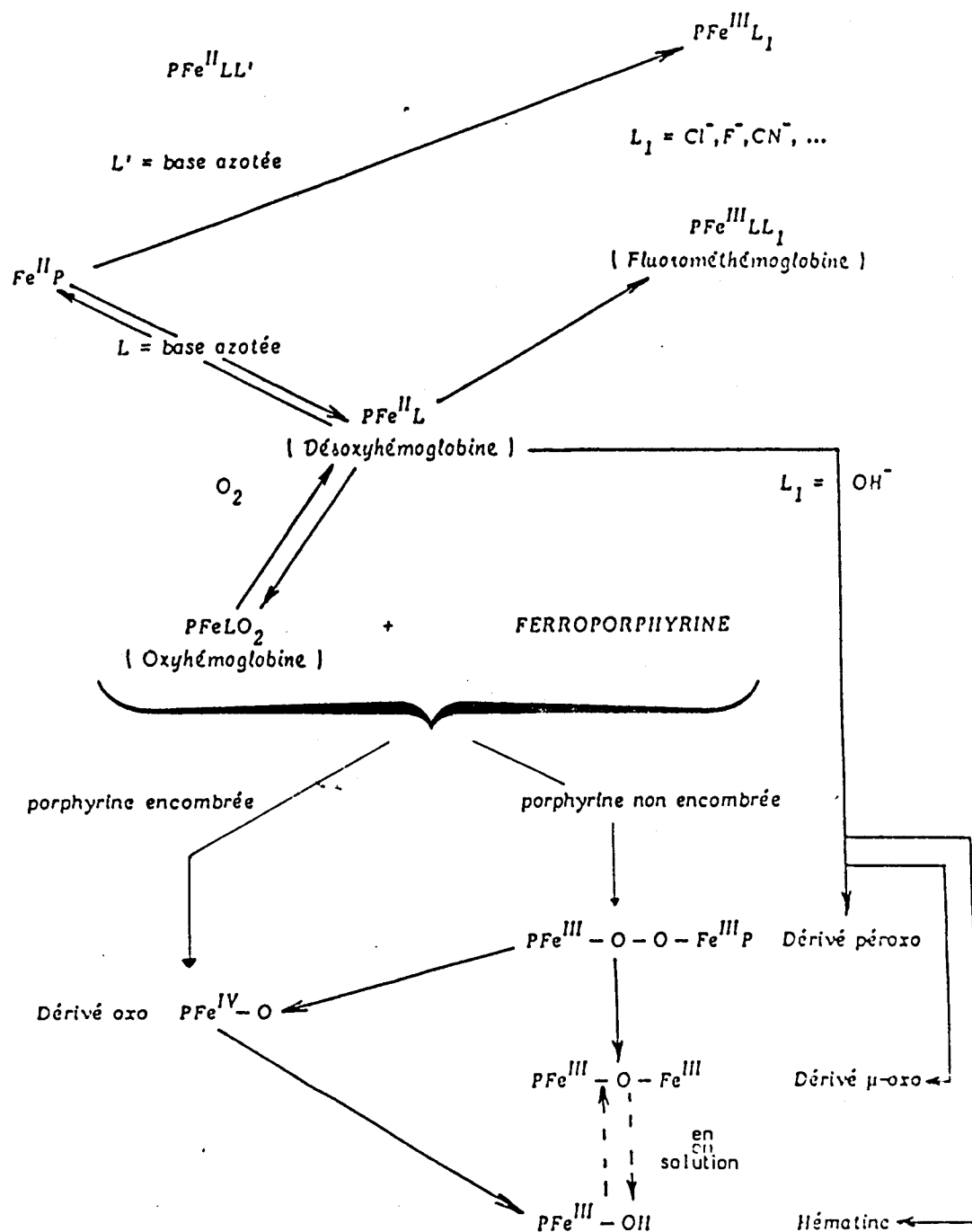


Schéma 4 : Réactions possibles pour une ferroporphyrine

La nécessité d'utiliser des ferroporphyrines synthétiques, beaucoup plus élaborées que ne l'est la ferroprotoporphyrine IX, pour mimer l'activité biologique de l'hémoglobine démontre l'importance jouée par la protéine. En effet, par exemple la substitution d'un seul acide aminé conduit à une hémoglobine non fonctionnelle (ex : hémoglobine S). Ainsi, même une dégradation au niveau protéique, pourra se traduire au niveau de l'hème de l'hémoglobine par l'obtention d'un dérivé ferrique irréversible selon un processus réactionnel représenté sur le schéma 4.

3. Les espèces μ -oxo

Les métalloporphyrines sont des molécules susceptibles de s'agréger, selon des modes d'interactions très différents. Un de ces modes est la création d'une liaison de covalence mettant en jeu l'ion(s) métallique(s) de deux (ou plusieurs unités) porphyrines. L'existence d'une liaison de covalence mettant les deux ions métalliques de 2 unités porphyrines est appelée composé μ , la nature de la liaison définissant la nomenclature de l'espèce obtenue.

Dans le cadre des porphyrines de fer, le composé μ -oxo est le plus répandu, caractérisé par une liaison $Fe - O - Fe$ (figure 13).

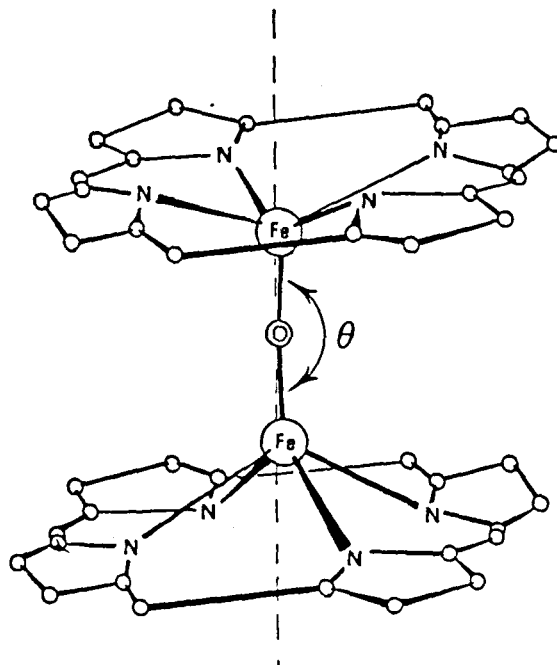


Figure 13 : Un complexe μ -oxo

Outre les composés μ -oxo, il existe des composés μ carbido et μ nitrido caractérisés par la présence d'une liaison Fe - C - Fe et Fe - N - Fe respectivement qui seront cités dans ce travail.

Le dimère μ -oxo des ferriporphyrines, longtemps suggéré comme produit final de réaction d'hydrolyse de sel porphyrinique halogéné, fut mis en évidence à l'état solide par obtention d'une structure RX [30], la $(TPPFe)_2O$. Cette structure est caractérisée par un déplacement du Fe hors du plan de l'ordre de 0,5Å indiquant une structure haut spin (paragraphe II - 1). Une donnée importante de ces composés est l'angle (Θ), \widehat{FeOFe} , qui confèrera selon sa valeur, des propriétés particulières aux dérivés μ -oxo. En effet, de nombreux complexes μ -oxo de fer pentacoordonnés ont été caractérisés avec des angles différents pour des ligands qui peuvent être l'EDTA, etc... [31].

Bien que l'obtention de ces espèces à l'état solide soit bien maîtrisée, la chimie en solution aqueuse de telles espèces pose des problèmes qui seront évoqués par la suite.

a). Synthèse des composés μ -oxo

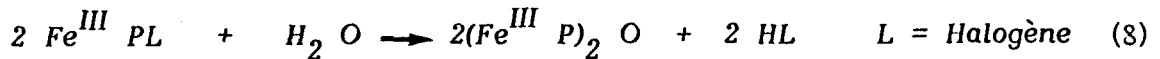
Différentes voies de synthèse s'offrent quant à l'obtention de telles espèces qui sont :

* soit une oxydation de la ferroporphyrine

** soit une réaction de métathèse

* le complexe μ -oxo peut être le dérivé final d'un schéma d'auto oxydation d'une ferroporphyrine en présence d' O_2 (ou d'eau). Sans précautions, tous les systèmes du type Fe - O_2 conduisent à la longue par oxydation irréversible aux dérivés ferriques. Cependant, si la porphyrine possède un encombrement stérique suffisant, la formation du peroxy et à fortiori du μ -oxo est impossible. Le schéma 4 présente les voies de dégradation suivies, selon la nature de la porphyrine. Dans des modèles très complexes, les étapes peroxy et μ -oxo sont éludées pour conduire au dérivé le plus simple : l'hématine. Dans celui-ci, le fer est coordonné à un ion hydroxy OH^- .

** les réactions de métathèse sont spécifiques à l'obtention du dimère porphyrinique :



La réaction est catalysée par présence d'un excès de base (ou d'acide) qui déplace l'équilibre dans le sens 1 (ou 2). Cette méthode peut être appliquée non seulement en milieu aqueux mais aussi en milieu organique (réaction biphasique). Cependant, l'écriture d'une telle réaction suggère que l'on passe par un intermédiaire du type hématine, $\text{PFe}^{\text{III}} - \text{OH}$; l'existence ou non de cette espèce est à l'origine de nombreuses controverses dans la littérature. Les travaux récents menés sur les modèles biomimétiques ont permis d'isoler, une telle espèce (3), levant ainsi l'indétermination.

Avant toute chose, nous allons expliciter une des propriétés physico-chimiques, caractéristique de ces complexes, qui est leur propriété magnétique.

b). Propriété magnétique des complexes μ -oxo

Placé dans un champ magnétique, la plupart des substances, acquièrent de façon réversible des propriétés d'aimantation. La susceptibilité magnétique χ_m est le rapport entre l'intensité d'aimantation et le champ magnétique. On distingue alors des substances diamagnétiques et paramagnétiques selon que leur susceptibilité magnétique soit négative ou positive respectivement. Alors que le diamagnétisme est toujours présent, le paramagnétisme est lié à l'existence d'un moment angulaire (d'origine orbitale ou (et) de spin), résultat de la présence d'électrons non appariés. L'absence de contribution d'origine orbitale permet d'obtenir la formule classique ci-dessous :

$$\chi_m = \frac{Ng^2\beta^2}{3KT} (S + 1) S$$

Plus généralement on introduit le moment effectif par $\mu_{\text{eff}} = g S(S + 1)$ ou

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{3KT}{N\beta} \chi_t = 2,84 \chi_t \quad [31], [33]$$

La valeur de χ_m est obtenue par l'expérience au moyen d'appareil (Balance de Evans, Faraday, etc...), en fonction de la température.

En fonction de la stéréochimie du complexe métalloporphyrine, l'état de

spin est déterminé et la formule ci-dessus permet de prévoir sa valeur théorique. Le tableau VI permet de voir l'anomalie présentée par les complexes μ -oxo.

Fe^{II}	$S = 2$	$\mu_{Bthéorique} = 4,9 \mu_B$	$2 MeImFeTPP$	$5,2 \mu_B$	[3]
Fe^{III}	$S = 5/2$	$\mu_{Bthéorique} = 5,92 \mu_B$	$FeTPPCl$	$T = 299K$ $5,95 \mu_B$	[4]
				$T = 195K$ $5,89 \mu_B$	
				$T = 77K$ $5,81 \mu_B$	
			$DPDEFcCl$	$5,94 \mu_B$	[3]
			$(FeTPP)_2O$	$T = 294K$ $1,85 \mu_B$	[4]
				$T = 195K$ $1,27 \mu_B$	
				$T = 77K$ $0,68 \mu_B$	

Tableau VI : Données magnétiques des porphyrines de fer

Alors que l'expression exprimée ci-dessus permet de rendre compte des moments magnétiques des espèces ferriporphyrines tel que $Fe^{III}Cl$, $Fe^{III}CH_3O$, un fort écart est observé dans le cas des dimères μ -oxo. La forte variation du moment magnétique en fonction de la température est caractéristique de l'interaction entre les deux atomes métalliques, nommée couplage antiferromagnétique.

Une théorie a été élaborée permettant de rendre compte de ce phénomène, basée sur l'interaction spin-spin d'un site avec un autre. La solution s'obtient en mécanique quantique, non plus en utilisant le champ magnétique seul de la mesure, mais en ajoutant une contribution propre à l'espèce (H spin-spin) sous la forme

$$H = H_0 + H \text{ spin-spin} \quad \text{avec} \quad H \text{ spin-spin} = - 2 J S_1 S_2 \quad [31],[33]$$

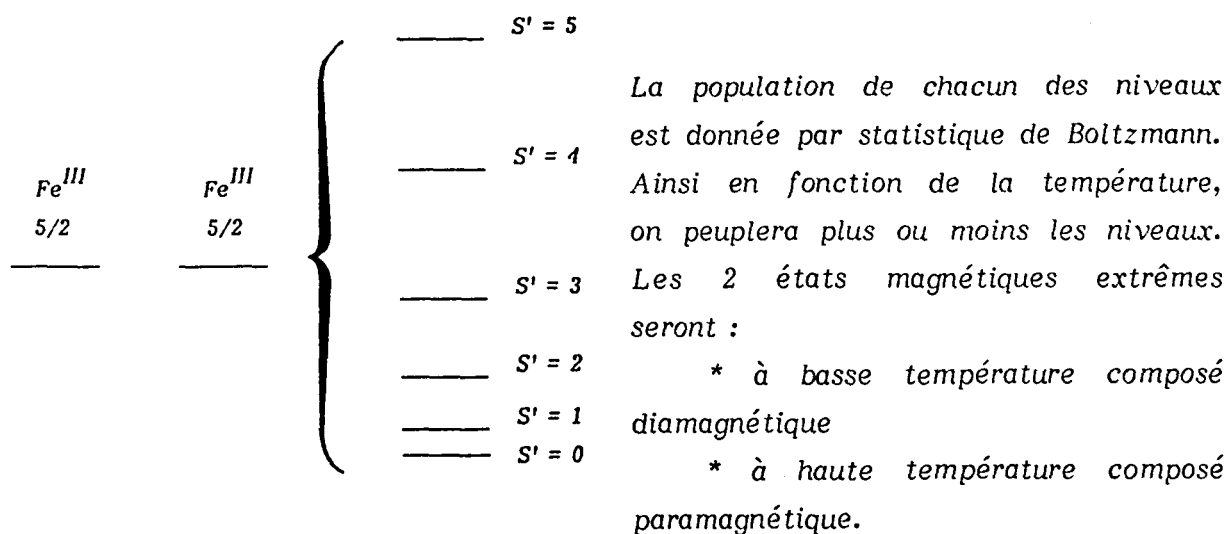
Le modèle conduit à définir S' états de spin :

$$S' \text{ variant de } S_1 + S_2 \text{ à } S_1 - S_2$$

Les énergies sont données par la relation :

$$E(S') = - J [S'(S'+1) - S_1(S_1+1) - S_2(S_2+1)]$$

Dans les complexes μ -oxo, S_1 et S_2 ont pour valeur $5/2$ (voir II - 1), ce qui conduit au diagramme suivant :



Le tableau VII indique la population de chacun des niveaux pour une température $T = 300K$, qui représentera la température à laquelle les études spectroscopiques seront faites.

$S' = 0$	57,3 %	
$S' = 1$	34,7 %	$J = - 125 \text{ cm}^{-1}$
$S' = 2$	7,7 %	$T = 300K$
$S' = 3$	0,3 %	$k = 0,695 \text{ cm}^{-1} \text{ K}^{-1}$
$S' = 4$	négligeable	
$S' = 5$	négligeable	

Tableau VII : Population des niveaux magnétiques dans le complexe μ -oxo

Les valeurs de J , déterminées expérimentalement varient entre 100 cm^{-1} et 150 cm^{-1} pour différents complexes μ -oxo. Ces résultats permettent de montrer que l'on ne pourra assimiler ces espèces à deux unités porphyriques isolées. L'occupation des niveaux 0,1,2 (en extrême limite le niveau 3) conduira à un domaine d'énergie de l'ordre de 600 cm^{-1} .

Ce phénomène permet :

* de comprendre l'absence de spectre RPE à basse température

* d'interpréter les spectres RMN qui se caractérisent par des déplacements chimiques par exemple :

- dans les modèles dérivés de la TPP : les H pyrroliques sont voisins de 14 ppm alors que dans les complexes paramagnétiques HS des ferriporphyrines ils se situent à 80 ppm [32]

- dans les modèles dérivés de la PP : les H méso sont voisins de 10 ppm alors que dans les complexes paramagnétiques HS des ferriporphyrines ils se situent à 60 ppm [33]

* de mettre en évidence la présence d'impuretés paramagnétiques

Il est à noter que cette technique peut permettre de détecter de l'eau, qui est soit coordonnée par liaison hydrogène à l'atome d'oxygène, soit de détecter de l'eau en position transaxiale. Ces 2 phénomènes se traduisent par une élévation du moment magnétique [34].

c). Agrégation des porphyrines de fer

De nombreuses études ont été menées pour appréhender les mécanismes d'agrégation au sein des métalloporphyrines, aussi bien en milieu aqueux qu'en milieu organique. En effet, ces molécules sont susceptibles de s'agréger selon des modes d'interactions bien différents que l'on peut classer de la manière suivante :

- les interactions dues au métal
 - . création de liaison covalente entre porphyrines
- les interactions dues à la porphyrine
 - . interaction $\Pi-\Pi$ importante dans les solvants organiques
 - . interactions hydrophobes qui régissent les associations en milieu aqueux

Dans le cas des porphyrines de fer, l'espèce μ -oxo est généralement évoquée par tous les travaux, menés sur le thème de l'agrégation. Cependant,

de ceux-ci, émergent des conclusions sujettes à discussion. Un éclairage nouveau est survenu grâce à l'étude des modèles biomimétiques qui ont permis d'isoler des espèces nouvelles en milieu organique permettant d'interpréter les phénomènes en milieu aqueux.

1.c). Porphyrines de fer en milieu organique

Il est évident que toute diminution de concentration entraînera simultanément une diminution des interactions $\Pi - \Pi$. Cette interaction mise en évidence en RMN, sur des bases libres se traduit par la formation de dimères pour des concentrations supérieures à $10^{-3} M$ (3).

Le facteur déterminant qui régit l'association est l'encombrement stérique, point commun avec les nombreux complexes biomimétiques synthétisés. Une étude récente [35], a permis de caractériser l'espèce hématine et (ou) μ -oxo selon la substitution des noyaux benzéniques, suite à une réaction de métathèse. Le tableau VIII suivant résume les résultats obtenus dans cette étude.

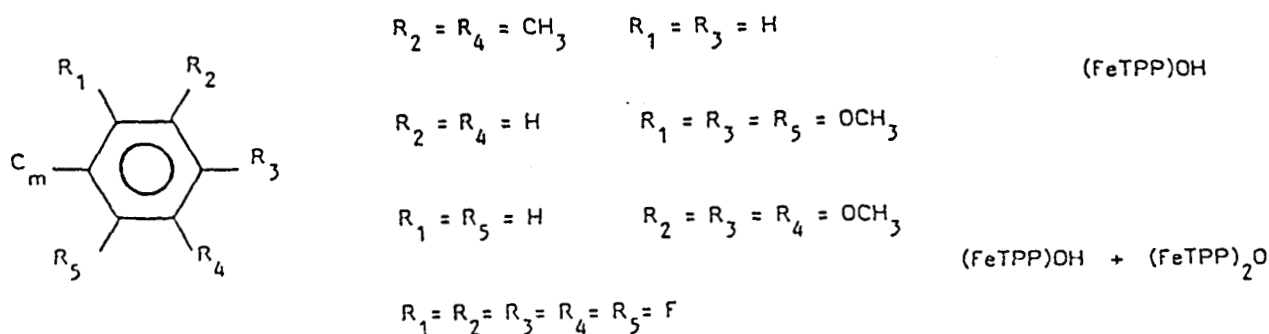


Tableau VIII : Influence de l'encombrement stérique sur la formation du complexe μ -oxo

L'espèce hydroxy peut être caractérisée par diverses techniques. Les plus significatives sont :

* La RMN : absence de couplage antiferromagnétique se traduisant par la présence des H pyrroliques à 80 ppm

* Susceptibilité magnétique : moment effectif indépendant de la température voisin de $5,7\mu_B$

* Infrarouge : présence de la raie ν_{OH} à 3600 cm^{-1} , caractéristique du groupement hydroxo, se déplaçant à 2700 cm^{-1} après échange isotopique ($^{16}\text{O}, ^{18}\text{O}$)

L'influence de la nature des groupements est évidente sur le schéma 5 ci-dessous mettant en évidence les interactions stériques que devraient entraîner la formation μ -oxo. Ce résultat permet de soupçonner que l'énergie nécessaire à la rotation des phényles doit être très importante.

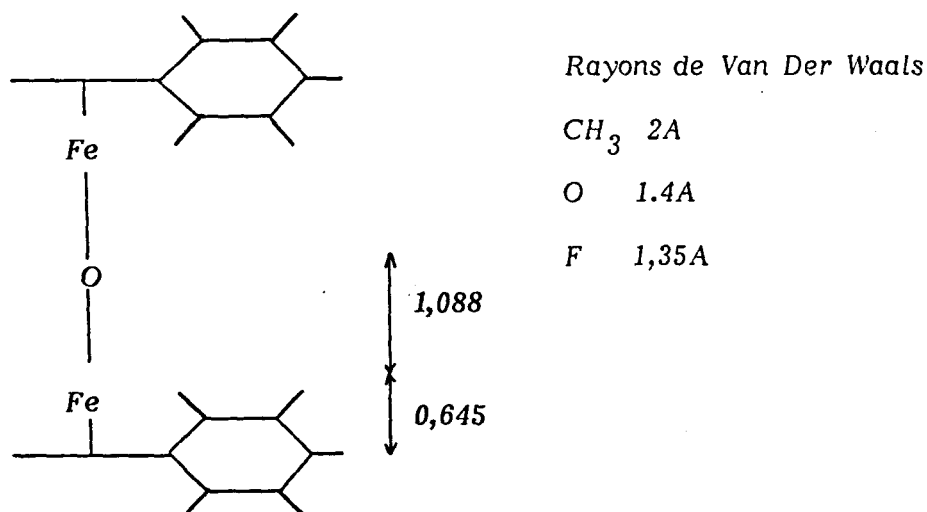


Schéma 5 : Interaction stérique créée par substitution sur les noyaux phényles

Un complexe hydroxy a été caractérisé dans le cas d'une substitution méso par des noyaux anthracènes, qui peut de plus fixer un noyau imidazolique pour donner une molécule modélisant l'hydroxyméthémoglobine [32]. Dans ce cas, l'atome de fer, lié à l'histidine et à un ligand hydroxy, est au degré III. Il faut savoir que l'espèce hydroxy des porphyrines de fer semble peu stable à cause de la forte acidité du proton hydroxy (conjugaison du cycle pyrrolique), ce qui explique l'intérêt porté à la caractérisation d'une telle espèce.

Ainsi, ces études récentes ont permis de montrer que la réaction de métathèse s'accompagne de la formation rapide du complexe hydroxy, suivi de la formation du complexe μ -oxo plus ou moins rapide en fonction de l'encombrement stérique.

2.c). Porphyrines de fer en milieu aqueux

Les porphyrines physiologiques sont stables en milieu basique grâce à la présence de groupements propioniques. Elles précipitent sous forme de sel à $\text{pH} = 4$. Les porphyrines synthétiques sont rendues solubles grâce à des substitutions sur le noyau benzénique : SO_3^{2-} [36], CO_2^- [37].

En solution aqueuse, deux phénomènes seront simultanés : d'une part la stabilité de l'espèce moléculaire en fonction des conditions physico-chimiques, d'autre part, la formation de micelles due à l'hydrophobie du noyau tétrapyrrolique. Aucun mécanisme d'agrégation n'est proposé à ce jour en milieu aqueux. Cependant, à partir des nombreux travaux effectués, des résultats généraux peuvent être présentés.

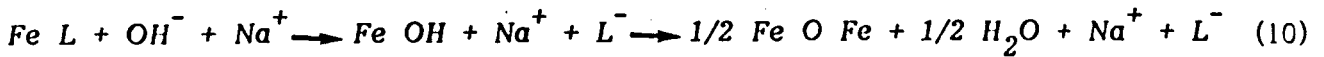
* Influence de la concentration : pour des concentrations inférieures à 10^{-6} M, une forme monomère serait présente alors qu'une forme dimère, voire tétramère, est proposée pour des concentrations supérieures sans préciser la nature du motif élémentaire [38].

* Influence de la force ionique : plus elle augmente, plus l'agrégation est favorisée. Phénomène expliqué par l'interaction cation - groupement hydrophiles de la porphyrine (COO^-) [39].

* Influence du pH : le pH permet de distinguer 2 formes prépondérantes (existence d'un point isobestique en spectroscopie UV, études Mössbauer [40], [41]).

Ces résultats bien que généraux sont susceptibles de varier en fonction de la nature du cycle porphyrinique. L'influence du pH sur la nature des espèces en solution constitue le point central des travaux dans ce domaine. C'est pourquoi, nous ne présenterons pas une liste exhaustive des équilibres acido-basiques, obtenus pour différentes porphyrines solubles en milieu aqueux. Il faut savoir cependant, qu'un schéma unique simple ne peut rendre compte des équilibres acido-basiques pour différentes porphyrines de fer (DPFe^{III} [42], PPFe^{III} [42], $\text{TPPCO}_2^- \text{Fe}^{\text{III}}$ [37], $\text{TPPSO}_3^- \text{Fe}^{\text{III}}$ [36]).

En particulier, l'écriture d'une réaction du type :



permet de rendre compte des points isobestiques observés dans le cadre de la PPFe^{III} [42], et de modèles synthétiques [36]. Cependant, les dosages acido-basiques mettent en évidence des espèces intermédiaires qui ne peuvent être expliquées que par la fixation d'eau de solvation (schéma 6).

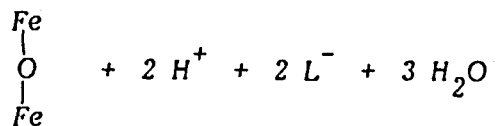
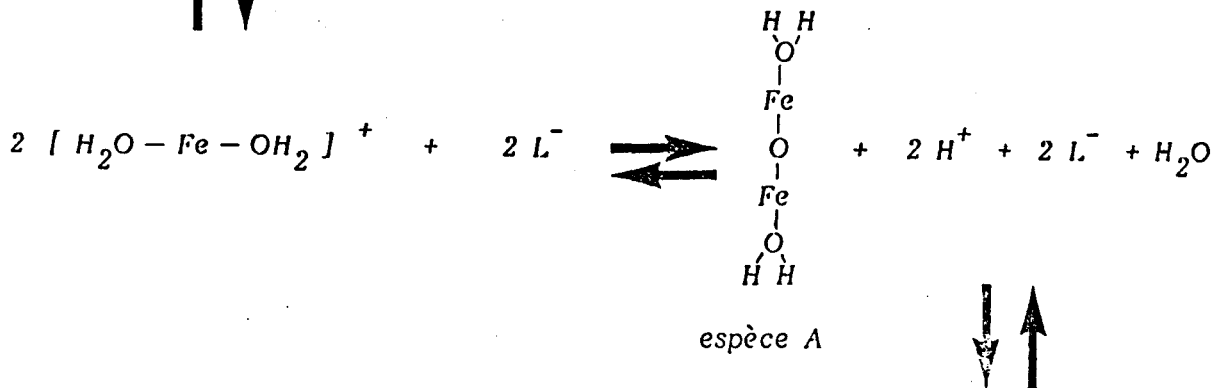
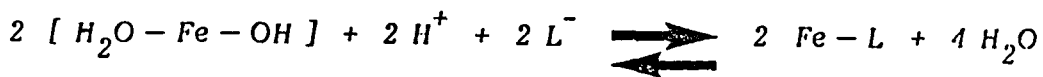


Schéma 6 : Réactions possibles en milieu aqueux pour une ferriporphyrine

La différenciation d'une espèce bisquo par rapport à une espèce libre peut se faire sur la base de mesures magnétiques (voir paragraphe II - 3.b). En particulier, l'espèce A est proposée dans le cas de la TPPSO_3^{2-} , sur la valeur du moment effectif, trouvé en solution ($\mu_{\text{eff}} = 3,02$ à 40°C) plus élevé que pour des μ -oxo non solvatés [43]. Un tel mécanisme est d'autant plus probable qu'une espèce analogue à la molécule 3 a été caractérisée à l'état solide [15].

La mise en solution aqueuse d'une porphyrine de fer, dans un milieu basique conduit donc à un équilibre du type (réaction 10) en fonction du pH

Cet équilibre est modulé par la nature même de la porphyrine qui peut influencer non seulement sur l'espèce moléculaire (forme solvatée ou non), mais aussi sur les bornes acido-basiques d'existence de l'une ou l'autre des espèces.

4. Les modèles choisis

Deux espèces stables à température ambiante que sont l'hématine et le μ -oxo peuvent constituer des produits finaux de dégradation de l'hémoglobine, comme l'indique le schéma 4. La protoporphyrine IX qui est le cycle porphyrinique du groupe prosthétique de l'hémoglobine, est peu encombrée stériquement. Ceci laisse supposer que la formation du dérivé μ -oxo ne soit pas particulièrement défavorisée. Cette analyse nous conduit donc à postuler l'existence de la μ -oxo protoporphyrine IX de fer dans le pigment malarique.

Il nous faut caractériser cette espèce μ -oxo à l'aide de la spectroscopie Raman de façon à disposer d'une technique analytique pour identifier l'espèce moléculaire présente au sein de l'échantillon biologique. Pour ce faire, nous avons étudié le modèle synthétique, la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$, pour lequel on dispose de nombreuses informations (structure RX [30], etc...). Ce modèle est comparé à la μ -oxo protoporphyrine IX diméthylester de fer $(\text{PPDEFe})_2\text{O}$. Cette dernière molécule, dont on ne dispose d'aucune donnée structurale, diffère du modèle naturel susceptible d'intervenir dans le problème biologique par la présence des groupements méthylés sur les chaînes propioniques. Le choix de travailler sur la forme estérifiée pour des commodités de manipulation (synthèse, isolement) s'est fait sachant que :

* L'influence géométrique créée par la substitution d'atomes d'H par des CH_3 est minime sur les caractéristiques structurales du coeur porphyrinique.

* Nous éludons les problèmes d'agrégation, liés à l'hydrophobie du coeur tétrapyrrolique.

La dernière remarque est à ce stade, certainement la plus restrictive de notre étude, compte tenu du fait que le pigment malarique est en milieu aqueux, au niveau du globule rouge.

Les fonctions vinyliques, présentes dans la $(PPD\text{Fe})_2\text{O}$, montrent une certaine réactivité (possibilité d'oxydation, etc...). Afin d'examiner l'influence de tels groupements, la μ -oxodeutéroporphyrine diméthyl ester de fer, $(DPD\text{Fe})_2\text{O}$, a été étudiée. La deutéroporphyrine, caractérisée par la présence d'atomes d'hydrogène en position 2 et 4 (figure 1), est synthétisée par fusion solide d'un mélange de chlorohémine et de résorcinol [44].

Les molécules μ -oxo sont préparées, à partir des dérivés chlorés respectifs, par réaction de métathèse en milieu biphasique (chloroforme - solution basique). Bien que généralement une autre méthode, dérivée de la réaction de métathèse, est adoptée par d'autres auteurs qui consiste à éluer le dérivé chloré sur alumine basique [36], nous avons choisi la première méthode car elle permet la synthèse de composé isotopique.

CHAPITRE II

*SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE
DES PORPHYRINES DE FER*

I - <u>LA PORPHYRINE DEMETALLEE</u>	57
1. <u>Les spectres expérimentaux</u>	58
2. <u>Interprétation des spectres</u>	61
a). <u>Symétrie et énergie des orbitales π</u>	61
b). <u>Le modèle à quatre orbitales</u>	64
c). <u>Influence des groupements conjugués</u>	67
II - <u>LA METALLOPORPHYRINE</u>	69
1. <u>Méthode des combinaisons linéaires d'orbitales moléculaires</u>	
<u>appliquées aux métalloporphyrines</u>	69
2. <u>Influence du métal sur le spectre UV-visible</u>	71
3. <u>Spectres d'absorption des complexes μ-oxo</u>	73

Les porphyrines et les métalloporphyrines sont des composés qui présentent une coloration très intense. Celle-ci est due à la présence d'un système électronique fortement conjugué qui conduit à la possibilité de réaliser de nombreuses transitions électroniques dans le domaine du proche U.V. et du visible. Depuis les années 1960, de nombreux travaux théoriques ont eu pour but de tenter l'interprétation de ces spectres.

Nous nous proposons dans ce chapitre de rappeler les résultats essentiels de ces calculs théoriques qui permettent d'approcher la compréhension des spectres UV-visible des porphyrines bases libres, des métalloporphyrines et des métalloporphyrines complexées.

I - LA PORPHYRINE DEMETALLEE

Les électrons de valence des atomes constituant le cycle tétrapyrrolique peuvent être différenciés selon qu'ils appartiennent à des orbitales moléculaires σ ou π , ou qu'ils conservent leur caractère atomique (orbitales n).

Les orbitales σ , formées par le recouvrement d'orbitales hybridées sp^2 , sont situées dans l'axe interatomique. Les électrons σ sont fortement liés et ne seront plus évoqués dans ce chapitre car le domaine spectral des transitions auxquelles ils participent, ne coïncide pas avec le domaine du proche UV et du visible. Les doublets électroniques ne participant pas à des liaisons subsistent dans la forme base libre P sur les azotes pyridiniques. Ils occupent des orbitales non liantes qui pointent vers le centre du cycle (Figure 14a)

Le passage de la forme base libre à la forme anionique ou cationique, P^{2-} ou PH_2^{2+} , conduit à une augmentation de symétrie du système. Le passage du groupe de symétrie moléculaire D_{2h} (base libre) à D_{4h} (P^{2-} ou PH_2^{2+}) se traduit par l'apparition de nouveaux axes de symétrie : axe C_4 (z) (rotation de $\pi/4$ autour de l'axe z), axe C_2' (rotation de $\pi/2$ autour de l'axe joignant deux carbones méso), etc... Le choix des axes adoptés dans cette discussion est indiqué sur la figure 14.

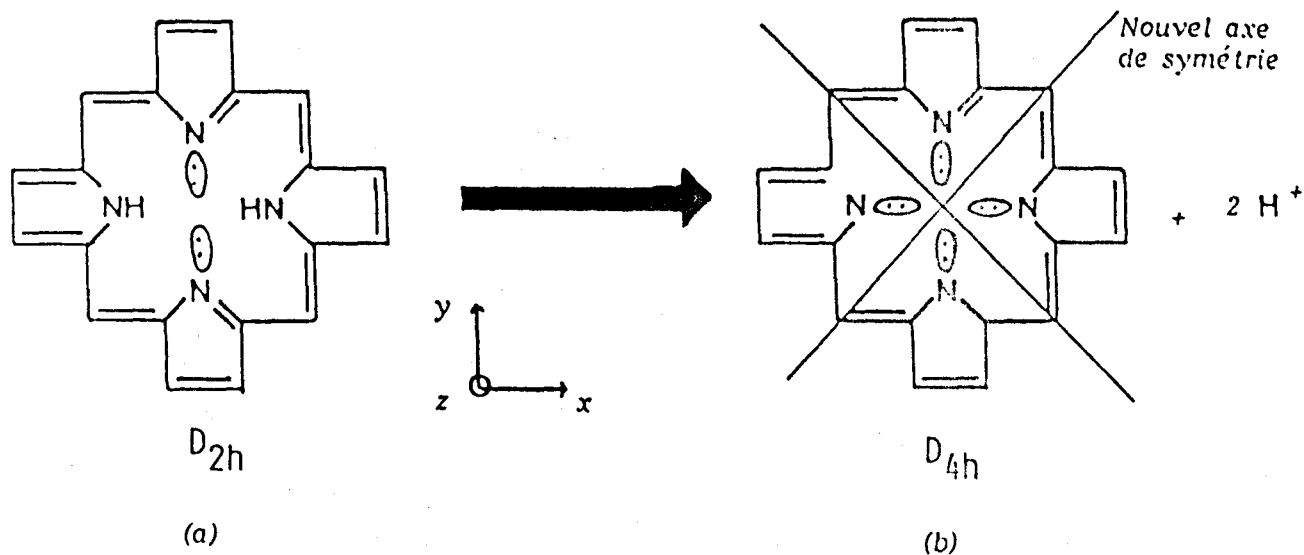


Figure 14 : Symétries moléculaires dans les porphyrines

1. Les spectres expérimentaux

La figure 15 représente les différents spectres d'absorption UV-visible des différentes bases libres qui ont été utilisées au cours de ce travail.

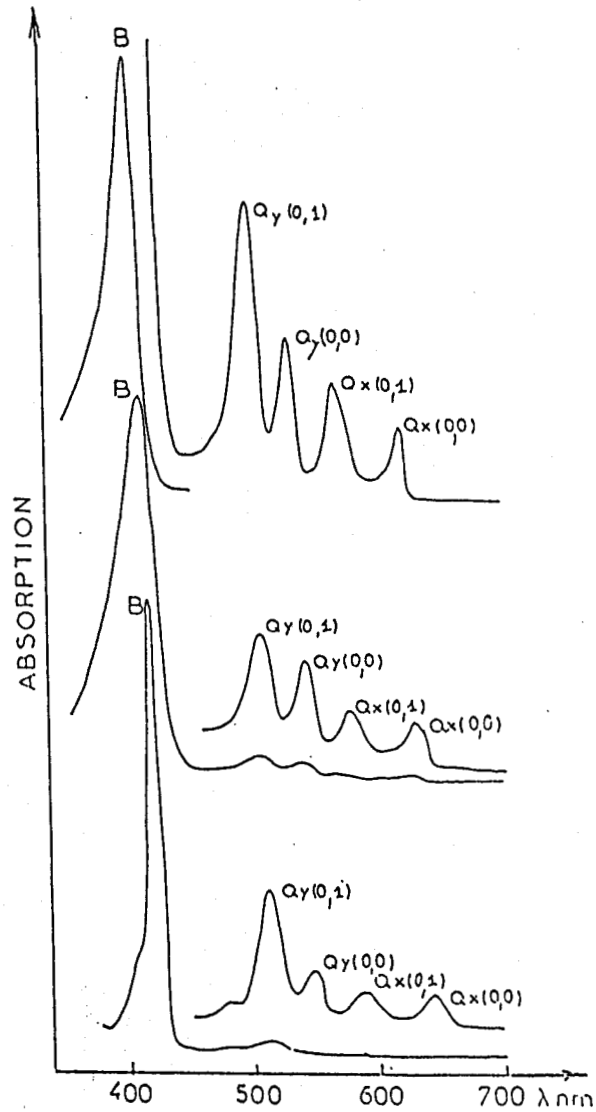


Figure 15 : Spectres d'absorption UV-visible de bases libres

Les spectres présentent des caractéristiques communes que l'on peut classer de la façon suivante :

- système B : Une bande très intense ($\epsilon \approx 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{l. mole}^{-1}$), appelée bande de Soret, notée B (ou γ), qui se situe dans le domaine 380-430 nm. Elle est plus ou moins large selon la nature du cycle tétrapyrrolique.

- système Q : 4 bandes, appelées Q et notées $Q_x(0,0)$, $Q_x(0,1)$, $Q_y(0,0)$, $Q_y(0,1)$ de l'infra-rouge à l'UV, qui possèdent des intensités relatives variables en fonction de la porphyrine. Dans tous les cas, elles restent faibles par rapport à l'intensité de la bande B ($\epsilon \approx 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{l. mole}^{-1}$)

Dans le cas d'une molécule porphyrine, possédant une structure D_{4h} , les systèmes B et Q conservent leur distinction en intensité. Cependant le système Q est simplifié car il n'est constitué que de 2 bandes notées α (ou Q_0) et β (ou Q_v)

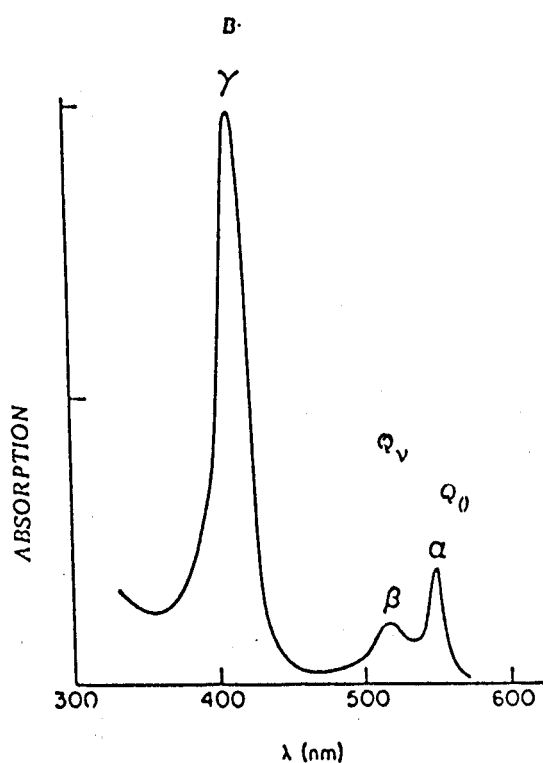


Figure 16 : Spectre schématisé d'un composé en symétrie D_{4h} ; PH_2^{2+} , P^{2-}

Le tableau IX résume les observations faites à partir des spectres présentés figure 15. Il met en évidence le déplacement bathochromique des bandes d'absorption observé lorsque l'on a substitué des groupements susceptibles de se conjuguer (vinyles, noyaux benzéniques) au noyau porphyrine.

Deutéroporphyrine	$\lambda = 399$ $\epsilon = 175$	$\lambda = 495$ $\epsilon = 13,4$	$\lambda = 525$ $\epsilon = 10,1$	$\lambda = 565$ $\epsilon = 8,21$	$\lambda = 618$ $\epsilon = 4,9$
Protoporphyrine	$\lambda = 407$ $\epsilon = 171$	$\lambda = 505$ $\epsilon = 14,3$	$\lambda = 540$ $\epsilon = 11,8$	$\lambda = 575$ $\epsilon = 7,8$	$\lambda = 626$ $\epsilon = 5,3$
TPP	$\lambda = 418$ $\lambda' = 421$ $\epsilon' = 18,7$	$\lambda = 513$ $\lambda' = 517$ $\epsilon' = 21,2$	$\lambda = 548$ $\lambda' = 552$ $\epsilon' = 9,2$	$\lambda = 587$ $\lambda' = 591$ $\epsilon' = 6,4$	$\lambda = 643$ $\lambda' = 648$ $\epsilon' = 5,1$

λ , λ' en nm - ϵ , ϵ' en $10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{l. mole}^{-1}$

(λ , ϵ) en solution dans CHCl_3 à température ambiante

(λ' , ϵ') en solution dans CS_2 à température ambiante

Tableau IX : Données spectroscopiques de porphyrines bases libres

2. Interprétation des spectres

Les transitions électroniques sont associées aux orbitales π présentes dans les porphyrines. Celles-ci peuvent être déterminées par des modèles relativement simples à cause de la très grande symétrie du noyau tétrapyrrolique.

a) Symétrie et énergie des orbitales π

Les orbitales moléculaires π , construites par des combinaisons linéaires d'orbitales atomiques (méthode C.L.O.A.), sont antisymétriques par rapport au plan de la molécule (σ_h). En traitant le problème en symétrie D_{4h} (figure 14.b), la table des caractères de ce groupe permet de déterminer la symétrie des orbitales π : on ne trouve le caractère -1 pour la réflexion par rapport au plan σ_h que pour les représentations irréductibles que sont A_{1u} , A_{2u} , B_{1u} , B_{2u} , E_g . Les orbitales π posséderont nécessairement la symétrie de l'une de ces représentations.

Le nombre d'électrons π à considérer (et donc le nombre d'orbitales atomiques) est de 26 qui se répartissent de la façon suivante : 20 p_z des carbones à $1e^-$, 2 sp^2 des azotes à $1e^-$, 2 sp^2 des azotes à $4e^-$. Le schéma 7.a représente le classement en énergie et la symétrie des orbitales obtenues par Longuet-Higgins [45] en utilisant la méthode de Hückel simplifiée. Dans ce calcul l'atome d'azote est assimilé à l'atome de carbone.

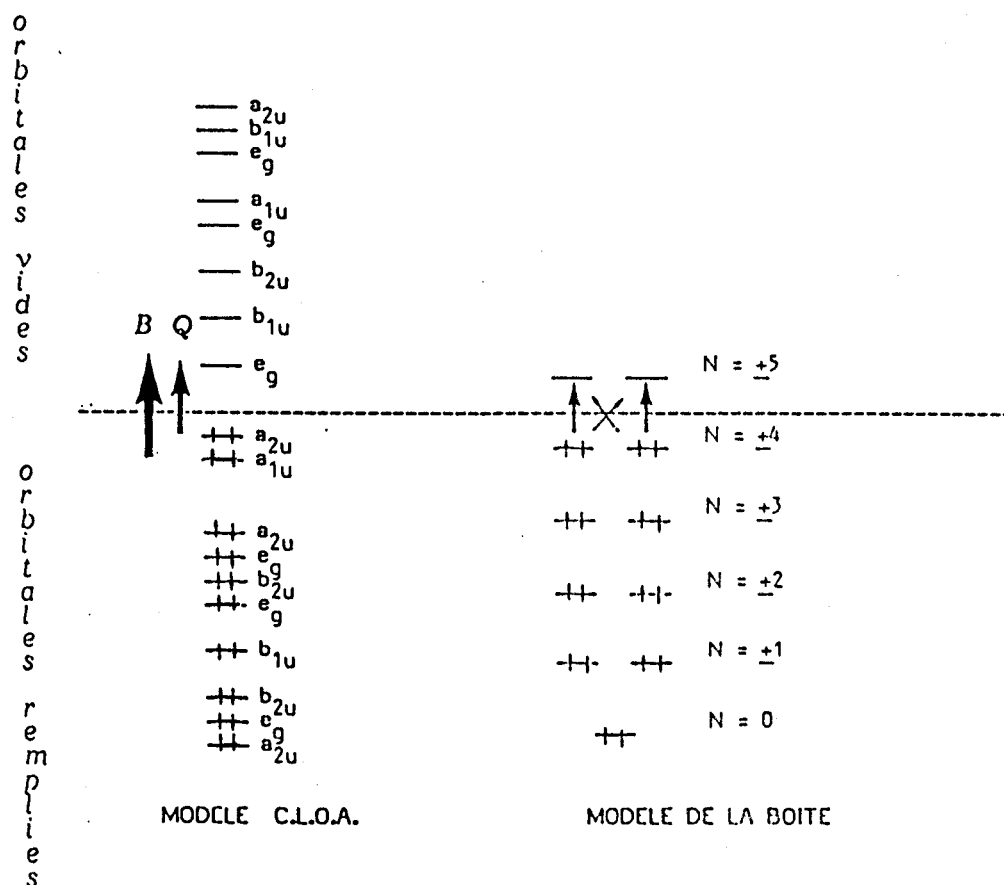


Schéma 7 : modèles électroniques pour les porphyrines sous forme PH_2^{2+} ou P^{2-}

Ce modèle permet d'expliquer la présence de 2 bandes B et Q, calculées à 469nm et 689nm respectivement. Elles sont associées respectivement aux transitions $a_{1u} \rightarrow e_g$ et $a_{2u} \rightarrow e_g$ conduisant à 2 états excités ($a_{1u}e_g$) et ($a_{2u}e_g$), de même symétrie E_u . Les orbitales, impliquées dans ces transitions, sont représentées sur la figure 17.

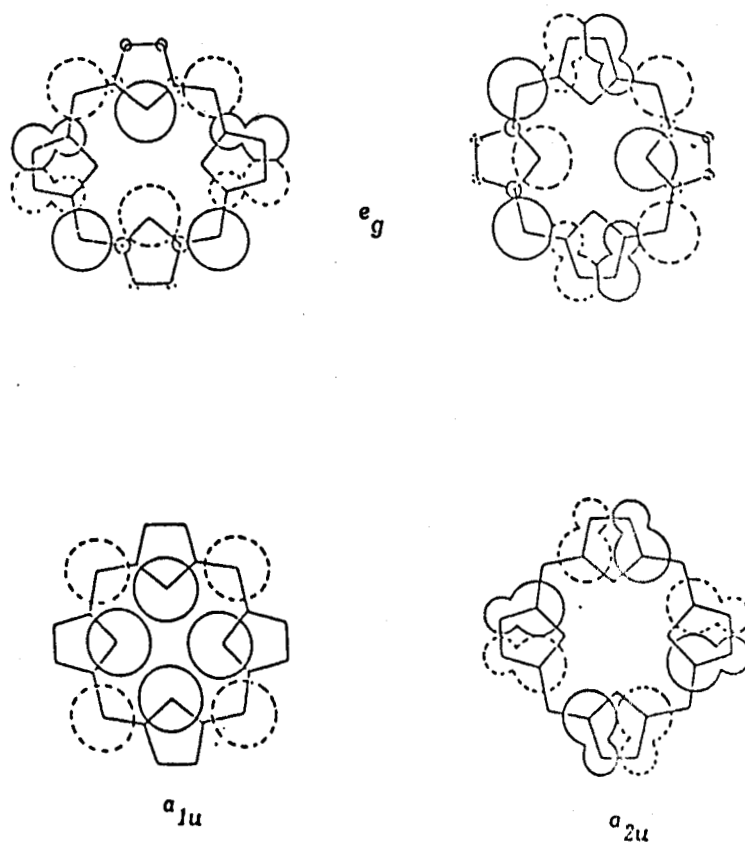


Figure 17 : Orbitales impliquées dans les transitions électroniques B et Q

De plus ce modèle permet d'interpréter les 2 bandes situées dans l'UV (260nm et 340nm), appelées L et N, attribuées aux transitions $a_{2u} \rightarrow e_g$ et $b_{2u} \rightarrow e_g$ respectivement. Pourtant le modèle C.L.O.A. qui prévoit deux états (B,Q) de même probabilité et donc d'intensité d'absorption équivalente est en désaccord avec l'expérience : $\epsilon_{\text{Soret}} \gg \epsilon_Q$ (figure 16).

Cette différence d'intensité peut être expliquée en utilisant le modèle dit de "l'électron libre dans la boîte" [46], dans lequel les électrons π sont associés à des fonctions d'onde du type $\psi = f(r) e^{+iN\theta}$, où N désigne le nombre quantique et $f(r)$ et la fonction définissant la géométrie de la boîte qui peut être, suivant le problème étudié, circulaire, rectangulaire, etc... Le modèle de la boîte circulaire se justifie dans le cas des porphyrines P^{2-} ou PH_2^{2+} si on examine la figure 14. En effet, 9 doubles liaisons suffisent à décrire la conjugaison en couronne du cycle porphyrinique. Cette approximation est renforcée par le caractère éthylénique des liaisons C_b-C_b (paragraphe I-1). L'énergie de chacune des orbitales est fonction de N^2 et conduit à la répartition électronique représentée schéma 7b. La transition électronique mettra en jeu les niveaux d'énergie ayant pour nombres quantiques

associés $N = \pm 4$ et $N = \pm 5$. Le calcul permet de montrer que la variation du nombre quantique ΔN , conduit à une transition permise si $\Delta N = \pm 1$, interdite si $\Delta N = \pm 9$. Ce modèle conduit donc à l'existence de deux transitions (l'une intense, l'autre interdite) pour une même énergie.

Ainsi la comparaison des deux modèles, cités ci-dessus, suggère donc que les particularités en intensité et en énergie d'absorption observées dans les spectres des porphyrines ne s'expliquent que par une dégénérescence accidentelle des niveaux a_{1u} et a_{2u} . La quasi égalité des énergies des orbitales a_{1u} et a_{2u} conduira à :

- 2 bandes B et Q présentant des absorptions distinctes (modèle C.L.O.A.)
- une bande fortement permise (B), une quasi interdite (Q) (modèle de la boîte)

L'analogie entre ces deux modèles se situe dans le décompte des plans nodaux (densité électronique nulle). En effet, alors que les orbitales π (a_{1u} , a_{2u}) ont 4 plans nodaux ($N=4$), les orbitales e_g ont 5 plans nodaux ($N=5$), en omettant le plan de la molécule qui est par définition un plan nodal (les plans nodaux sont indiqués sur la figure 17).

Le modèle de Gouterman, rend compte des observations théoriques faites précédemment et est connu dans la littérature sous le nom de modèle à quatre orbitales [47].

b) Le modèle à quatre orbitales

Le calcul effectué par Gouterman qui permet d'obtenir la dégénérescence accidentelle des niveaux a_{1u} et a_{2u} s'est fait en distinguant les atomes d'azote des atomes de carbone. Dans ce modèle les bandes d'absorption UV-visible ne peuvent plus être attribuées à des transitions où un électron est excité d'une orbitale à une autre. Pour des raisons géométriques, Gouterman définit deux nouveaux états à partir des quatre configurations élémentaires [($a_{1u} e_{gx}$), ($a_{2u} e_{gx}$), ($a_{1u} e_{gy}$), ($a_{2u} e_{gy}$)] : un état fortement permis d'énergie élevée B et un état Q quasi interdit de plus basse énergie. Du traitement mathématique complexe, l'interaction de configuration (IC) est sans doute le paramètre le plus important car il quantifie la séparation énergétique des niveaux B et Q. Ce paramètre pourra influencer le spectre de la façon suivante :

- * si a_{1u} , a_{2u} sont exactement dégénérés ($CI=0$), la bande Q (0,0) disparaît (modèle de la boîte)
- * si a_{1u} , a_{2u} sont quasi dégénérés, le rapport I_B/I_Q diminue (modèle de Gouterman)
- * si a_{1u} , a_{2u} ont des énergies très distinctes (CI très grand), les bandes B et Q sont d'égale intensité (modèle C.L.O.A.)

Ces considérations permettent d'interpréter les observations faites sur les intensités respectives des bandes B et Q. En effet, lorsque l'on effectue une substitution symétrique sur le noyau porphyrine, les orbitales e_g seront affectées de la même façon et donc conserveront les mêmes énergies.

Au contraire, une substitution, même symétrique, affectera distinctivement a_{1u} ou a_{2u} de la façon suivante : la présence d'un groupement susceptible d'augmenter la délocalisation électronique diminuera l'énergie de l'orbitale considérée. Par exemple :

- * Le rapport I_B/I_Q diminue entre la porphine et la 1,2,3,4,5,6,7,8, méthyle porphyrine car la présence des groupements alkyles donneurs augmente l'énergie de a_{2u} sans modifier l'énergie de a_{1u} (les 2 électrons π qui appartiennent à l'orbitale a_{2u} ont une probabilité nulle de se trouver au niveau des carbones C_b et donc ne seront pas affectés par la modification électronique provoquée par cette substitution locale). La diminution de l'intensité de la bande de Soret traduit donc le fait qu'une telle substitution conduit à un état dans lequel a_{1u} et a_{2u} sont quasi dégénérées.
- * Les spectres des phtalocyanines mettent en évidence deux systèmes B et Q d'égale intensité, traduisant une levée de dégénérescence totale des orbitales a_{1u} et a_{2u} . En effet, la substitution des carbones méso par des atomes d'azote (plus électronégatif) abaisse fortement l'énergie de a_{2u} . Ce fait expérimental démontre la validité du modèle C.L.O.A. à partir de cette analyse bibliographique et des observations expérimentales que nous avons pu effectuer.

Ainsi, nous pouvons proposer une explication quant à la variation des intensités observées pour la PPDE, DPDE et la TPP :

- la substitution méso par des noyaux benzéniques affectera l'orbitale a_{2u} et non l'orbitale a_{1u}

- les groupements vinyliques dans la PPDE, ainsi que la substitution dissymétrique des C_b (PPDE, DPDE) devraient affecter a_{1u} et non a_{2u} .

On peut cependant s'étonner de la similitude des spectres de la TPP, la PPDE, la DPDE, qui sont traités en symétrie D_{4h} alors que l'écart à cette symétrie s'observe de la façon suivante dans chacun des composés :

- substitution dissymétrique et structure bombée (voir 1^{er} chapitre I-1) dans le cas de la PPDE et de la DPDE

- écart des positions méso par rapport au plan moyen (voir 1^{er} chapitre I-1) pour la TPP.

Il faut en conclure que de telles substitutions ne sont pas suffisamment importantes pour lever la dégénérescence. Au contraire, la présence de 2 protons sur les azotes conduit à une structure D_{2h} (figure 17 - 1) et se traduit par l'apparition de deux composantes $Q_x(0,0)$ et $Q_y(0,0)$. Dans ce cas, l'orbitale e_{gx} est élevée en énergie et non e_{gy} . De même l'orbitale a_{2u} sera affectée et non l'orbitale a_{1u} . Une telle levée de dégénérescence, qui est aussi prévue par la table de corrélations $D_{4h} \rightarrow D_{2h}$ [48] ($a_{1u} \rightarrow a_u$, $a_{2u} \rightarrow b_{1u}$, $e_g \rightarrow b_{2g}$, b_{3g}) devrait conduire à un système à 4 composantes $B_x(0,0)$, $B_y(0,0)$, $Q_x(0,0)$, $Q_y(0,0)$. Le modèle est sans doute imparfait car il ne permet pas d'expliquer la non ou la moins importante levée de dégénérescence de l'état B.

Au phénomène électronique, se superpose le phénomène vibrationnel qui se caractérise dans le spectre par des bandes dénommées, $Q_x(0,1)$ et $Q_y(0,1)$, dans le cas des bases libres et Q_v dans le cas des porphyrines P^{2-} ou PH_2^{2+} . Le tableau suivant donne les différences d'énergie entre les niveaux vibrationnels.

	$\Delta Q_x(0,1) - \Delta Q_x(0,0)$	$\Delta Q_y(0,1) - Q_y(0,0)$
DPDE	1518 cm^{-1}	1124 cm^{-1}
PPDE	1531 cm^{-1}	1111 cm^{-1}
TPP	1432 cm^{-1}	1273 cm^{-1}

Tableau X : Valeurs des niveaux vibrationnels déterminées à partir des spectres UV-visible des porphyrines bases libres.

Une différence notable apparaît entre les porphyrines physiologiques et la TPP, qui laisse sous entendre que les géométries des états excités engendrés par une absorption Q_x ou Q_y sont très différentes. D'autre part, l'écart entre la bande $Q(0,0)$ et Q_y est voisin de 1300 cm^{-1} (cet écart vibrationnel correspond à l'élongation des liaisons C - C et C - N). L'absorption électronique s'accompagne de changements géométriques faisant intervenir les liaisons C-C et C-N. L'existence de plusieurs liaisons C-C (C_a-C_m , C_a-C_b , etc...), au sein du macrocycle porphyrine, conduit à l'existence de différentes valeurs d'absorptions vibrationnelles, ce qui explique l'asymétrie de la composante $Q_x(0,1)$, observée à température ambiante. Il en est de même pour la bande B appelée Q_y car plusieurs modes vibrationnels sont impliqués dans la structure de celle-ci et on observe en fait que l'enveloppe de ceux-ci.

c) Influence des groupements conjugués

Bien que la présence de groupements conjugués disposés symétriquement (ex : TPP) ou asymétriquement (ex : vinyles dans la PPDE) ne lève pas la dégénérescence des orbitales a_{1u} et a_{2u} , elle stabilise l'énergie des états excités et provoque un déplacement du spectre vers le rouge.

Les calculs cités précédemment permettent d'obtenir la répartition électronique dans l'état fondamental.

	$C_{\text{més}}o$	C_a	C_b	N
Longuet [45]	0,96	1,07	1,08	1,22
Ohno [49]	0,95	0,95	1,03	1,6
Gouterman [50]	0,911	0,901	0,932	1,923

Tableau XI : Répartition électronique dans l'état A_{1g}

Le résultat obtenu par Gouterman, suite à son calcul à 4 orbitales est certainement le plus proche de la réalité car il permet de comprendre que :

- les sites $més$ o soient des sites électrophiles donc facilement substituables par les noyaux benzéniques

- les sites C_b soient eux aussi, dans une moindre mesure, substituables par des groupements alkyles donneurs, des vinyles, etc...

Nous pouvons en déduire que ce résultat sous entend une possible conjugaison de certains groupements avec le noyau tétrapyrrolique, ce qui est en contradiction avec les résultats de la radiocristallographie (chapitre 1 paragraphe 1). Cependant il nous est possible de rendre compte de ce phénomène à la vue de la représentation des orbitales e_g et a_{1u} et a_{2u} (figure 17).

En adoptant le modèle C.L.O.A., les transitions $a_{1u} \rightarrow e_g$ (B) et $a_{2u} \rightarrow e_g$ (Q) s'accompagnent pour la première d'une augmentation de la densité électronique sur les positions $més$ o et pour la deuxième d'une augmentation de la densité électronique sur les atomes C_b pyrroliques. L'obtention de tels états excités, résultat de telles transitions, sera stabilisée par la présence de groupements susceptibles d'augmenter cette délocalisation électronique. Une telle explication devrait se traduire expérimentalement par :

- un déplacement bathochromique des bandes Q_x et Q_y pour la PPDE
- un déplacement bathochromique de la bande de Soret pour la TPP.

Nos résultats (tableau IX) démontrent que les bandes B et Q sont affectées approximativement du même déplacement. Ainsi, notre analyse met en évidence le défaut du modèle C.L.O.A. et confirme le modèle de Gouterman dans lequel chacun des états B et Q sont construits à partir des deux états ($a_{1u}e_g$) et ($a_{2u}e_g$)

II - LA METALLOPORPHYRINE

L'insertion du métal au centre du noyau tétrapyrrolique conduit à une molécule possédant une symétrie moléculaire D_{4h} (en assimilant les substituants périphériques ou méso à des groupements ponctuels).

Les spectres obtenus dans le cas des porphyrines de nickel (Ni^{2+}), de magnésium (Mg^{2+}), de zinc (Zn^{2+}) et de fer (Fe^{2+} , ex ferrocyclochrome), ou la structure est voisine de la symétrie D_{4h} , sont similaires à celui présenté en figure 16 si ce n'est une variation en longueur d'onde des maxima et des coefficients d'extinction molaire, en fonction de la nature du métal.

Les spectres d'absorption UV-visible des complexes de coordination peuvent être interprétés par la théorie des combinaisons linéaires entre orbitales du coordonné et orbitales de l'atome métallique. Ces dernières à considérer sont généralement les orbitales 3d (d_{xz} , d_{yz} , $d_{x^2-y^2}$), 4s et 4p (p_x , p_y , p_z)

1. Méthode des combinaisons linéaires d'orbitales moléculaires appliquées aux métalloporphyrines

Les symétries des orbitales d du fer sont représentées sur la figure 18, en conservant le repère choisi en figure 14.

Les orbitales $4s$, $4p_x$, $4p_y$, $4p_z$ appartiennent respectivement aux symétries a_{1g} , e_u , e_u et a_{2u} .

La complexation de la porphyrine par l'atome métallique se traduira par des interactions du type :

- σ : Dans le plan de la porphyrine entre les orbitales moléculaires formées à partir des orbitales sp^2 des azotes centraux et les orbitales $3d_{x^2-y^2}$, $4s$, $4p_x$, $4p_y$ du fer. L'orbitale d_{z^2} donne lieu à une faible interaction.
- π : entre les orbitales d_{xy} et d_{yz} notées $d\pi$ et les orbitales de plus basse énergie antiliante du cycle tétrapyrrolique (π^* de symétrie e_g)

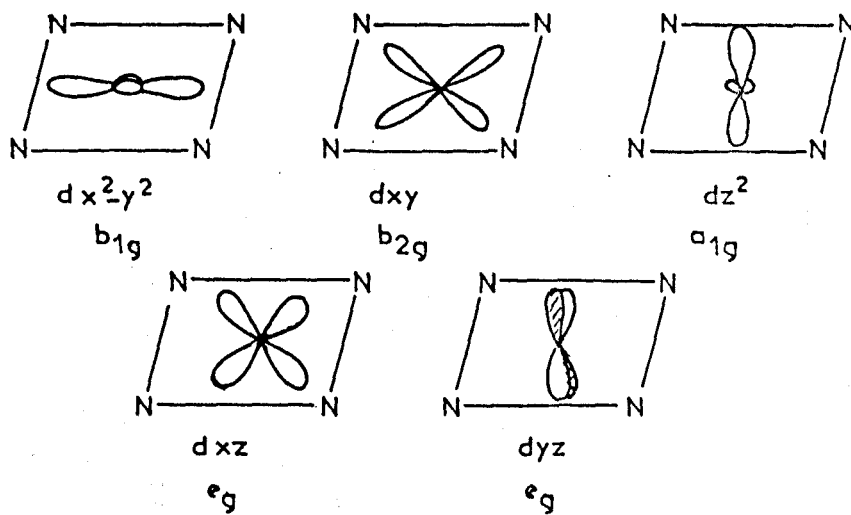


Figure 18 : Symétrie des orbitales du fer en symétrie D_{4h}

La construction des niveaux d'énergie dans une métalloporphyrine (en combinant les orbitales de même symétrie) conduit au diagramme simplifié suivant.

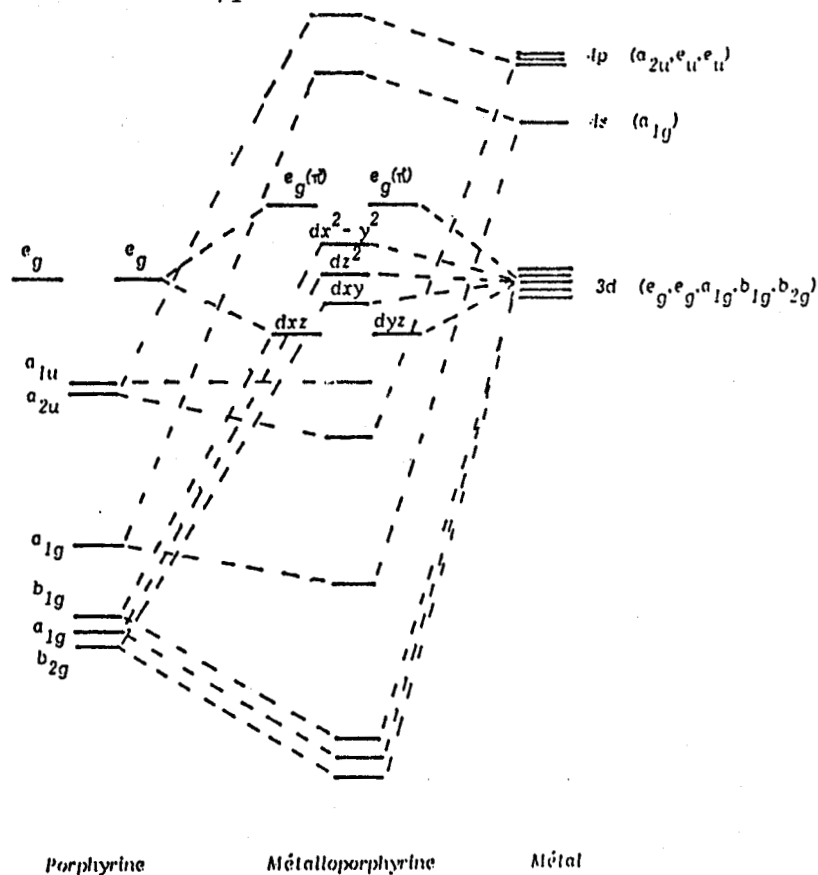


Schéma 8 : Structure électronique d'une métalloporphyrine

Le diagramme en énergie des orbitales moléculaires ne peut être établi à priori. L'obtention de celui-ci nécessite des calculs approfondis [49,50,51]. Pourtant, il est aisé de comprendre que la présence du métal n'affecte pas profondément la structure électronique du chromophore. En effet, la similitude des spectres UV-visible obtenus pour les métalloporphyrines sans ligands axiaux et les porphyrines sous forme cationique ou anionique démontrent que les orbitales d (généralement partiellement remplies) ont une énergie supérieure aux orbitales a_{1u} et a_{2u} , ne modifiant pas ainsi les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ (B,Q) du chromophore.

2. Influence du métal sur le spectre UV-visible

On devrait s'attendre à ce que l'insertion du métal au centre de la porphyrine affecte les orbitales e_{gx} , e_{gy} de façon identique et ne modifie pas l'orbitale a_{1u} (voir schéma 8). Au contraire l'orbitale a_{2u} , qui présente une densité électronique non nulle sur les atomes d'azote, doit être sensible au métal. La levée de dégénérescence entre les orbitales a_{1u} et a_{2u} n'est cependant pas suffisante pour éliminer le phénomène d'interaction de configuration : ce qui explique la

différence d'intensité de la bande B par rapport à la bande Q, bien que moins prononcée dans le cas des porphyrines non complexées.

A ce stade de la discussion, nous avons adopté le classement en énergie des orbitales a_{1u} et a_{2u} , calculé par Longuet Higgins dans la porphyrine. Ces orbitales ayant des énergies voisines, il se peut que dans d'autres porphyrines ces orbitales soient classées énergétiquement en ordre inverse. Nous pouvons dès à présent proposer un ordre quant à la position de ces orbitales. En effet, la TPPCo présente un spectre d'absorption UV-visible dans lequel la bande Q (0,0) est inexistante, indiquant ainsi que les orbitales a_{1u} et a_{2u} sont exactement dégénérées (modèle de la boîte) [52,53]. Sachant que le Co^{2+} est électro-négatif (et donc stabilisera l'orbitale a_{2u}) et que seule l'orbitale a_{2u} est affectée, nous pouvons conclure qu'au sein de la tétraphénylporphyrine l'orbitale a_{2u} a une énergie supérieure à a_{1u} . Dans le cas des porphyrines du type deutéroporphyrine le problème est plus complexe à cause de l'existence de 2 phénomènes :

- l'absence de noyaux benzéniques fait que l'orbitale a_{2u} a une énergie plus importante que dans les TPP
- la présence des groupements alkyles augmente l'énergie de l'orbitale a_{1u}

La comparaison entre la porphine et la 1,2,3,4,5,6,7,8 méthyle porphyrine nous a permis de démontrer que l'orbitale a_{1u} est d'énergie plus élevée que a_{2u} . Ainsi le deuxième phénomène sera prépondérant au niveau de la deutéroporphyrine. Notre analyse nous permet donc de mettre en évidence une différence notable entre ceux de la deutéroporphyrine et ceux de la tétraphénylporphyrine, qui se situe au niveau de l'énergie respectives des orbitales a_{1u} et a_{2u} .

Le résultat de notre analyse trouve une justification dans les observations obtenues par insertion de métaux d'électro-négativité différente, de la façon suivante :

TPP : plus l'électro-négativité augmente, plus l'orbitale a_{2u} sera stabilisée (baisse en énergie) : déplacement vers le bleu et extinction des bandes Q (modèle de la boîte : schéma 7.a et 7.b)

DPDE-PPDE :

plus l'électronégativité augmente, plus l'orbitale a_{2u} est stabilisée : déplacement vers le bleu et intensification des bandes Q (on se rapproche du modèle CLOA)

Dans le cas des métalloporphyrines, caractérisées par l'absence de ligands axiaux, la position des bandes Q et leurs intensités peuvent être relié à l'électronégativité réelle du métal. En présence des coordinats axiaux, on pourra juger de l'influence de ceux-ci sur l'atome métallique au moyen du phénomène décrit précédemment.

3. Spectres d'absorption des complexes μ -oxo

La description moléculaire présentée ci-dessus s'applique dans le cas où le métal complexant est le fer. L'état physicochimique du fer se traduira par une variation de la position en énergie et du remplissage des orbitales métalliques.

La figure 19 représente les spectres d'absorption des composés chlorés et μ -oxo de la deutéroporphyrine et de la tétraphénylporphyrine dans le chloroforme.

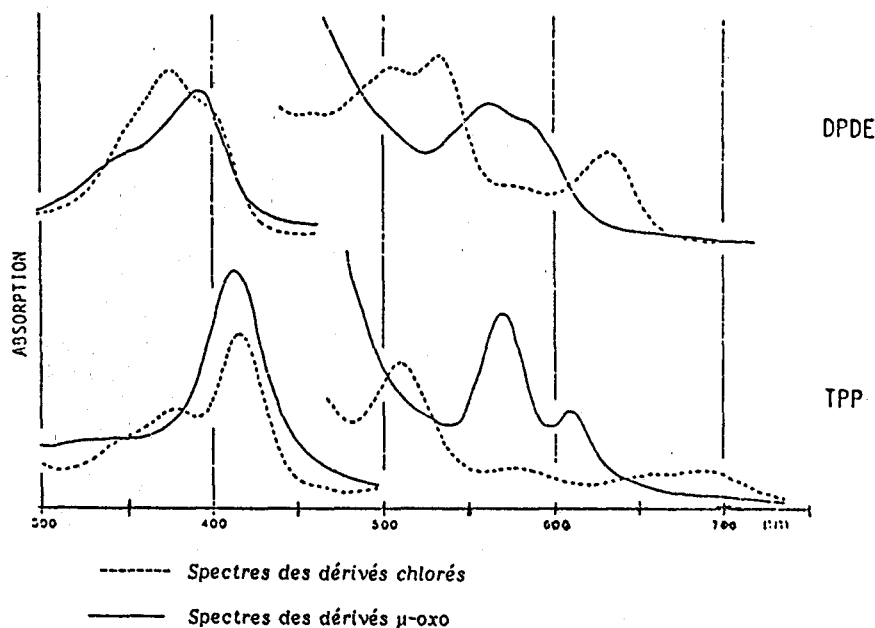


Figure 19 : Spectre d'absorption UV-visible des ferriporphyrines

Les données expérimentales sont reportées dans le tableau XII.

		B	Q			
			β	α		
$(DPDEF\text{e})_2\text{O}$	$\lambda =$	390	550	580		
	$\epsilon =$	$9,4 \cdot 10^4$	$1,56 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$		
$(PPDEF\text{e})_2\text{O}$	$\lambda =$	400	575	595		
$(TPPFe)_2\text{O}$	$\lambda =$	414	582	612		
DPDEF eCl	$\lambda =$	375	500	530	630	
	$\epsilon =$	$10,8 \cdot 10^4$	$1,76 \cdot 10^4$	$1,81 \cdot 10^4$	$1,13 \cdot 10^4$	
PPDEF eCl	$\lambda =$	385	510	540	640	
TPPFeCl	$\lambda =$	370 420	510	576	654	687

$$\epsilon_{\text{Soret}} \approx 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ l.}^{-1} \quad \epsilon_{\text{Q}} \approx 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ l.}^{-1} \text{ mole}^{-1}$$

Tableau XII : Données spectroscopiques UV-visible de ferriporphyrines (dans CHCl_3)

La comparaison des spectres des dérivés chlorés et μ -oxo met en évidence la présence de bandes supplémentaires dans le rouge. A partir de la représentation schématique de la structure électronique d'une métalloporphyrine présentée au schéma 8, ou le métal est exempt de ligand axiaux, nous pouvons proposer une explication quant à l'apparition de ces nouvelles bandes. En effet, le fait que le fer soit à l'état d'oxydation III (d^5) dans ces complexes, offre des possibilités de transition entre les orbitales π du ligand porphyrine et d du métal, ou bien entre les orbitales d du métal et π^* (e_g) de la porphyrine. De plus, la présence du ligand axial (Cl ou O) peut, d'une part, modifier l'énergie des orbitales d et donc l'énergie des transitions citées précédemment, et d'autre part, permet d'avoir des transitions du type métal \rightarrow ligand axial ou vice versa. Les nombreuses études menées sur les porphyrines ont permis de classer ces absorptions, dénommées bandes de transfert de charge qui sont résumées dans le tableau suivant :

630 - 840 nm	porphyrine → métal
590 - 630 nm	ligand → métal
510 - 580 nm	métal → ligand
410 - 510 nm	ligand → métal

Tableau XIII : Energie des bandes de transfert de charge dans les métalloporphyrines.

Il est évident que dans les espèces μ -oxo, de telles bandes sont susceptibles de trouver leur origine dans un transfert de charge du type $O^{2-} \rightarrow Fe^{III}$ et vice-versa. La similitude des spectres des composés μ -oxo (pour la PPDE, la DPDE, la TPP) et des porphyrines P^{2-} , PH_2^{2+} (figures 16 et 19) laisse supposer que celles-ci coïncident avec les bandes Q du système porphyrique. Au contraire, les bandes supplémentaires observées dans le domaine 630 - 730 nm pour les dérivés chlorés, sont certainement attribuables à des transitions du type porphyrine-métal.

- Le tableau XII permet de mettre en évidence un déplacement bathochromique lorsque l'on augmente la conjugaison, en substituant le macrocycle porphyrique par des groupements vinyles (cas de la PPDE) ou des noyaux benzéniques (cas de la TPP). L'explication proposée précédemment, pour les bases libres, reste valable dans le cas de ces composés.

- La complexité du système B et Q dans les dérivés chlorés rend difficile une proposition d'attribution. Alors que dans les dérivés μ -oxo l'attribution des composantes α et β est aisée, l'attribution du système Q est difficile dans les dérivés chlorés. En effet, on pourrait proposer que dans ces derniers, le système Q subit un déplacement vers le bleu. Un tel glissement hypsochromique serait synonyme d'une électronégativité apparente plus importante au niveau du fer (voir paragraphe I 2.b) et donc traduirait un effet donneur de l'atome de Cl, ce qui est peu probable.

- La bande de Soret présente une structure très complexe dans chacun des composés et l'on ne peut proposer dans cette étude une attribution exacte. Il est à remarquer que dans les complexes μ -oxo, le système B présente une largeur de bande très importante. Un tel phénomène ne peut trouver une explication simple quant à sa compréhension mais est certainement lié au couplage excitonique (interaction entre états électroniques excités des 2 unités porphyriques qui constituent le complexe μ -oxo).

La spectroscopie UV-visible, appliquée aux porphyrines et métalloporphyrines, met en évidence la complexité électronique du système dans de telles molécules. De plus, il est à noter que cette technique n'est pas très spécifique au niveau structural. En effet, les spectres de l'hémoglobine, du cytochrome C et des espèces μ -oxo s'apparentent au spectre schématique présenté en figure 15 alors que le Fe est respectivement à l'état d'oxydation et de coordination de II-6 , II-4 , III-5. Au contraire, l'utilisation pour ces composés de la spectroscopie de vibration (Raman et Infrarouge) nous permettra d'obtenir des informations structurales sur l'état fondamental et donc permettra de différencier les espèces citées précédemment. Cependant, il faut s'attendre à une diversité importante quant aux intensités des raies Raman de résonance, liée à la complexité du spectre d'absorption électronique.

CHAPITRE III

SPECTROSCOPIE RAMAN
DES COMPOSES μ -OXO DES PORPHYRINES DE FER

I - <u>SPECTRE RAMAN D'UNE METALLOPORPHYRINE</u>	82
1. <u>Dénombrement théorique</u>	82
2. <u>Attribution des modes normaux de vibration</u>	83
3. <u>Paramètres influençant le spectre de vibration d'une métalloporphyrine</u>	87
a). <u>La nature de la porphyrine</u>	87
b). <u>La nature du métal</u>	88
II - <u>SPECTRES RAMAN DES COMPOSES MODELES :</u> <u>(TPPFe)₂O , (DPDEFé)₂O</u>	89
1. <u>Attribution des modes du squelette porphyrique</u>	90
a). <u>Les composés de la TPP</u>	90
b). <u>Les composés de la DPDE</u>	96
2. <u>Attribution des modes de vibration de la liaison μ-oxo...</u>	102
a). <u>la liaison μ-oxo dans la (TPPFe)₂O</u>	104
b). <u>Liaison μ-oxo dans la (DPDEFé)₂O et dans la (PPDEFé)₂O</u>	110
3. <u>Bandes indicatrices de structure</u>	117
a). <u>L'état d'oxydation du fer</u>	118
b). <u>La taille du coeur porphyrique</u>	119
4. <u>Les profils d'excitation</u>	122
a). <u>Les modes du macrocycle</u>	122
b). <u>Les modes du pont μ-oxo</u>	131

La spectroscopie Raman a suscité un très vif intérêt, dans le domaine des hémoporphyrines, suite à l'obtention du spectre Raman de l'hémoglobine en 1974 par T.G. Spiro et coll. [54] Cette technique qui permet d'accéder à des renseignements sur les comportements électroniques et vibrationnels des états fondamentaux et excités était une voie nouvelle pour la compréhension des mécanismes impliquant l'hémoglobine et les hémoprotéines (coopérativité, fixation d'oxygène, etc...)

La diversité des molécules biomimétiques synthétisées et caractérisées par radiocristallographie a permis d'établir de nombreuses corrélations liant les nombres d'onde des modes normaux actifs en diffusion Raman et les paramètres structuraux. La caractéristique visuelle essentielle des métalloporphyrines est leur très forte coloration qui se traduit dans les spectres d'absorption électronique par des absorptions visibles et UV intenses. Ces absorptions permettent de bénéficier de l'effet de résonance pour des longueurs d'onde excitatrices voisines des bandes d'absorption.

Cet avantage se traduit pratiquement par la possibilité d'obtenir des spectres Raman de résonance (RR) à partir de très petites quantités de matière et d'accéder ainsi à des informations vibrationnelles et électroniques sur les états impliqués dans la transition électronique. Enfin, l'existence d'appareils adaptés aux études macroscopiques et microscopiques offre la possibilité d'étudier aussi bien des composés modèles que les microéchantillons biologiques (cellule, extrait cellulaire, etc...)

Pour l'étude envisagée au cours de ce travail, la spectroscopie Raman s'est révélée la technique de choix pour caractériser les composés modèles tant en solution qu'à l'état solide et les comparer aux spectres (RR) des microéchantillons biologiques.

A partir des composés d'une porphyrine synthétique déjà bien connus par leurs propriétés structurales, spectroscopiques et magnétiques (FeTPP)Cl et (FeTPP)₂O, l'étude spectroscopique comparative des composés homologues de porphyrines naturelles DPPE et PPDE a été entreprise. Elle permettra d'envisager l'identification chimique et l'élucidation de la structure moléculaire du chromophore du "pigment malarique".

I - SPECTRE RAMAN D'UNE METALLOPORPHYRINE

L'attribution des modes normaux de vibration actifs en diffusion Raman est effectuée à partir de techniques expérimentales mais également par comparaison avec des attributions basées sur des calculs de champ de forces effectués pour des molécules modèles. La spectroscopie d'absorption infrarouge sera mise à profit dans quelques cas particuliers pour conforter les résultats de spectroscopie Raman.

1. Dénombrement théorique

Dans le cas d'une métalloporphyrine exempte de coordinat axial (groupe de symétrie moléculaire D_{4h}) comportant 37 atomes, on dénombre 105 modes normaux de vibration. Ceux-ci peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils engendrent des déplacements atomiques dans le plan ou hors du plan.

$$\Gamma \text{ dans le plan} = 9 A_{1g} + 8 A_{2g} + 9 B_{1g} + 9 B_{2g} + 18 E_u \quad (71 \text{ modes})$$

$$\Gamma \text{ hors du plan} = 3 A_{1u} + 6 A_{2u} + 4 B_{1u} + 5 B_{2u} + 8 E_g \quad (34 \text{ modes})$$

Selon les règles de sélection, il y a mutuelle exclusion : les modes "gérade" (g) seront actifs en diffusion Raman les modes "ungerade" (u) seront actifs en absorption infrarouge. Parmi les modes Raman seul les modes A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} et B_{2g} seront sensibles au phénomène de résonance et auront des intensités significatives sur les spectres RR. En effet, les moments de transition correspondant aux absorptions électroniques B ou Q et le plan du macrocycle sont coplanaires, de même les déplacements atomiques intervenant entre l'état fondamental et les états excités sont dans le plan du macrocycle. On peut dire que les modes vibrationnels exaltés en RR miment la distortion moléculaire dans l'état excité.

Les nombreuses études RR des métalloporphyrines publiées [55, 56] montrent primo, qu'une excitation au voisinage de la bande B s'accompagne de l'exaltation des modes A_{1g} , secundo qu'une excitation au voisinage de la bande Q s'accompagne de l'exaltation des modes A_{2g} et dans un degré moindre des modes B_{1g} et B_{2g} .

La détermination de la symétrie des modes de vibration correspondant aux modes RR des composés étudiés est effectuée par la mesure des taux de dépolarisation.

Pour une symétrie idéale D_{4h} la théorie prévoit dans le cas d'une résonance stricte un taux $\rho = I_{\perp}/I_{\parallel} < 3/4$ pour les modes A_{1g} , $\rho = 3/4$ pour les modes B_{1g} et B_{2g} et $\rho > 3/4$ pour les modes A_{2g} . En pratique, les taux de dépolarisation diffèrent sensiblement des valeurs théoriques. Ces disparités peuvent avoir pour origine des écarts à la symétrie idéale D_{4h} , dues à la nature de la porphyrine ou à la nature du complexe métallique (métal hors du plan, coordinats axiaux etc...). Néanmoins les mesures de polarisation sont suffisamment précises pour distinguer les modes A_{1g} et A_{2g} des modes B_{1g} et B_{2g} qui ne peuvent être discriminés entre eux. Il est possible de lever cette indétermination en comparant les spectres polarisés de la nickelporphine (D_{4h}) et de la base libre (D_{2h}), la table de corrélation conduit à la correspondance $B_{1g} \rightarrow A_{1g}$ et $B_{2g} \rightarrow B_{1g}$. L'absence dans la base libre de modes dépolarisés B_{1g} significatifs suggère une très faible intensité en RR des modes B_{2g} dans les métalloporphyrines.

Dans le cas des composés solides, les effets de sites et de cristal seront considérés comme négligeables, ce qui sera vérifié à posteriori. L'attribution des modes de vibration actifs en RR sera effectuée dans l'hypothèse d'une symétrie idéale D_{4h} , des écarts significatifs par rapport à cette symétrie entraîneront une dénomination découlant de la corrélation entre le groupe D_{4h} et le groupe de symétrie considéré.

2. Attribution des modes de vibration

Bien que de nombreux spectres Raman de métalloporphyrines soient disponibles avant 1978, il a fallu attendre cette date pour disposer d'une attribution rationnelle des modes normaux de vibration sur la base d'un calcul de champ de force concernant la nickeloctaéthylporphyrine. Sur la base de ce travail, l'interprétation de nombreux spectres Raman de métalloporphyrines a été effectuée par analogie structurale et par échange isotopique.

Symétrie	Description en Energie potentielle (%)		NIOEP		NIPor	NiTPP
			Calc	Obs		
A _{1g}	v ₁	v(C _m -X) 100	3072	-	-	203
	v ₂	v(C _b -C _b) 60 v(C _b -Y) 19	1591	1602	1579	1572
	v ₃	v(C _a -C _m) 41 v(C _a -C _b) 35	1517	1519	1463	1470
	v ₄	v(C _a -N) 53 δ(C _a -C _m) 21	1386	1383	1380	1374
	v ₅	v(C _b -Y) 38 v(C _a -C _b) 23	1048	1025	-	-
	v ₆	v(C _a -C _b) 36 v(C _a -N) 27	809	808	1000	1004
	v ₇	δ(C _b C _a N) 20 v(C _a -C _b) 19	655	674	735	639
	v ₈	δ(C _b -Y) 57 v(C _a -C _m) 11	326	344	372	402
	v ₉	δ(C _b -Y) 23 v(C _a -C _m) 16	230	226	1070	1078
B _{1g}	v ₁₀	v(C _a -C _m) 40 v(C _a -C _b) 17	1056	1055	1054	1084
	v ₁₁	v(C _b -C _b) 57 v(C _b -Y) 16	1586	1577	1509	1504
	v ₁₂	v(C _a -N) 63 v(C _b -C _b) 13	1351	-	1350	1302
	v ₁₃	δ(C _m -X) 67 v(C _a -C _b) 22	1202	1220	1189	251
	v ₁₄	v(C _a -C _b) 31 v(C _b -Y) 30	1005	1131	-	-
	v ₁₅	v(C _b -Y) 25 v(C _a -C _b) 20	754	-	1007	994
	v ₁₆	δ(C _a NC _a) 14 v(C _b -Y) 14	741	750	735	850
	v ₁₇	δ(C _b -Y) 84	299	321	1064	1051
	v ₁₈	δ(C _a -C _m) 39 v(N-N) 34	187	168	241	238
A _{2g}	v ₁₉	v'(C _a C _m) 67 v'(C _a C _b) 18	1600	1603	1615	1550
	v ₂₀	v'(C _a N) 29 v'(C _b -Y) 24	1409	1397	1358	1230
	v ₂₁	δ'(C _m X) 53 v'(C _a C _b) 18	1281	1308	1321	-
	v ₂₂	v'(C _a N) 37 v'(C _b -Y) 26	1118	1121	1009	1016
	v ₂₃	v'(C _a C _b) 26 v'(C _b -Y) 20	1022	-	-	-
	v ₂₄	δ'(C _a =C _m) 43 δ'(C _b -Y) 29	723	739	810	620
	v ₂₅	δ'(C _a C _b C _b) 39 δ'(C _b C _a N) 17	528	-	433	-
	v ₂₆	δ'(C _b -Y) 41 δ'(C _a -C _m) 31	289	-	1143	-
B _{2g}	v ₂₇	v'(C _m II) 100	3072	-	-	-
	v ₂₈	v'(C _a C _m) 52 v'(C _a C _b) 21	1469	-	1509	1510
	v ₂₉	v'(C _a C _b) 47 v'(C _b -Y) 26	1409	1409	1379	1377
	v ₃₀	v'(C _b -Y) 49 v'(C _a N) 28	1157	1159	1007	1009
	v ₃₁	δ'(C _a -C _m) 25 δ'(C _a C _m C _a) 23	1016	-	-	-
	v ₃₂	δ'(C _b -Y) 50 δ'(C _a -C _m) 22	789	785	823	869
	v ₃₃	δ'(C _a C _b C _b) 28 v'(C _b -Y) 15	538	-	439	395
	v ₃₄	δ'(C _a C _m C _a) 25 δ'(NMN) 22	232	-	1197	1191
	v ₃₅	δ'(C _b -Y) 30 δ'(C _a -C _m) 25	182	-	201	109
	E _u (a)	v ₃₆	v(C _m -X) 100	3074	-	-
v ₃₇		v(C _a -C _m) 34 v'(C _a C _m) 24	1633	1604	-	-
v ₃₈		v(C _b -C _b) 56 v(C _b -Y) 16	1592	1557	-	-
v ₃₉		v'(C _a -C _m) 36 v'(C _a -N) 17	1498	1487	-	-
v ₄₀		v'(C _a -C _b) 30 v'(C _b -Y) 24	1454	1443	-	-
v ₄₁		v(C _a -N) 56 δ(C _a -C _m) 14	1302	1389	-	-
v ₄₂		δ(C _m -X) 59 v'(C _b -Y) 9	1277	1268	-	-
v ₄₃		v'(C _b -Y) 35 v'(C _a -N) 33	1139	1148	-	-
v ₄₄		v(C _b -Y) 29 v(C _a -C _b) 26	1079	1113	-	-
v ₄₅		v'(C _a -N) 21 v'(C _a -C _m) 12	1007	993	-	-
v ₄₆		v'(C _b -Y) 30 δ'(C _a -C _m) 20	895	924	-	-
v ₄₇		v(C _b -Y) 28 v(C _a -C _b) 20	741	726	-	-
v ₄₈		δ'(C _b -Y) 28 v(C _a -C _m) 13	620	605	-	-
v ₄₉	δ'(C _a C _b C _b) 26 δ(C _a C _m C _a) 15	548	550	-	-	
v ₅₀	δ(C _b -Y) 25 δ(C _a -C _m) 15	333	-	-	-	
v ₅₁	δ(C _b -Y) 23 v(N M N) 16	291	-	-	-	
v ₅₂	δ(C _b -Y) 41 v(N N) 31	264	287	-	-	
v ₅₃	δ'(C _b -Y) 29 δ'(C _a -C _m) 23	178	-	-	-	

(a) active en IR dans la NIOEP

Tableau XIV : Attribution de la NiOEP [57] . Comparaison avec la Niporphine, NiTPP

Le tableau XIV présente les résultats obtenus par Abe [57]. Il indique la symétrie des modes normaux de vibration, leur description en énergie potentielle ainsi que la nomenclature qui sera utilisée dans la suite de ce travail.

L'examen de ces résultats conduit à faire les remarques suivantes :

* Très peu de modes sont purs : c'est-à-dire qu'un mode normal fait intervenir simultanément plusieurs coordonnées internes. La description des modes en terme de vibration de groupe est donc très limitée. La description en coordonnées cartésiennes des modes normaux de vibration ν_4 , ν_{10} , ν_{19} , ν_{28} de symétrie respective A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} , B_{2g} permet de visualiser le déplacement des atomes (Fig 20)

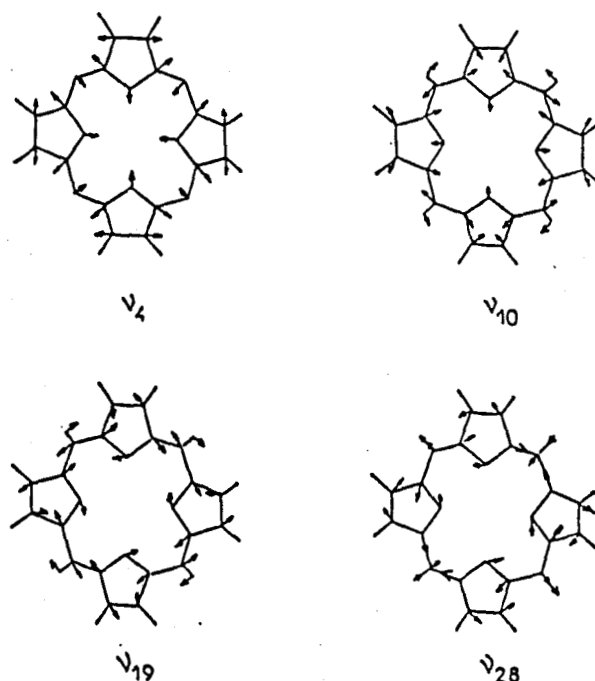


Fig. 20 : Représentation en coordonnées cartésiennes des modes ν_4 , ν_{10} , ν_{19} , ν_{28} .

L'absence de modes purs a pour conséquence que toute modification locale du squelette porphyrrique (changement de substituants en position pyrrolique (position Y), en position méso (X)) se retrouvera répercutée dans le spectre Raman.

Cependant, il sera possible d'associer par exemple le mode ν_4 principalement à l'élongation C-N (53% en énergie potentielle), le mode ν_{19} à l'élongation $C_\alpha - C_m$ (67% en énergie potentielle). Dès ce moment, il est aisé de comprendre que la moindre variation des données électroniques et structurales du coeur porphyrine se traduira par des variations des constantes de force (Dans un système conjugué une diminution de l'ordre d'une liaison s'accompagne simultanément d'une diminution de la constante de force donc de la fréquence de vibration et d'une augmentation de la longueur de liaison). En particulier, on peut s'attendre à ce que les modes quasi-purs soient des sondes pour certains des paramètres structuraux des métalloporphyrines.

* Le tableau XIV est complété par les résultats concernant la NiTPP et la Ni porphine [56].

La comparaison des résultats pour de tels composés met en évidence de nombreuses différences liées aux substitutions du type :

	NiOEP	NiTPP	Ni porphine
Position X	$-C_2H_5$	$-C_6H_5$	H
Position Y	$-C_2H_5$	$-C_6H_5$	H

L'absence de raies (trop faible intensité) caractéristiques des modes internes des groupements éthyles et leur éloignement du cycle porphyrine permet de traiter ceux-ci comme des groupements ponctuels et suggère donc que le spectre sera dominé par les modes normaux du squelette porphyrine. Néanmoins, on peut s'attendre à observer, lorsque l'on substitue les groupements alkyles, des modifications d'éventuels couplages avec les modes du cycle.

* Les modes vibrationnels, faisant intervenir le métal apparaissent en basses fréquences et généralement avec des faibles intensités. La caractérisation analytique du métal ne pourra se faire qu'indirectement, par son influence sur le noyau tétrapyrrolique. La nature du métal aura de plus une influence sur le spectre électronique et donc sur l'intensité des raies Raman.

3. Paramètres influençant le spectre de vibration d'une métalloporphyrine

a). La nature de la porphyrine

Le tableau XIV met en évidence les différences qui surviennent lorsque l'octaéthylporphyrine est remplacée par la porphine ou la tétraphénylporphyrine au sein du complexe organométallique de nickel [56]. Il est possible de penser que les modes impliquant les atomes C_b pour la porphine et les carbones C_m pour la TPP soient fortement affectés par rapport à la NiOEP.

* Influence des substituants pyrroliques : position Y

La substitution du groupement éthyle par un atome d'hydrogène modifie énormément le spectre de vibration (ex : ν_9 etc...). La faible activité des modes liés aux groupements CH en RR, explique l'absence de ces modes dans le tableau XIV. Comme nous l'avions constaté précédemment, les raies caractéristiques des groupements éthyles ne sont pas observées. Cette remarque s'applique généralement à tous les substituants alkyles (CH_3 , C_2H_5 , C_3H_8 , ...) ainsi qu'aux groupements propioniques (estérifiés ou non). Cependant, certains substituants en position 2 et 4 (tels que $-CHO$, $CO-CH_3$, ...) peuvent être caractérisés dans le spectre Raman grâce à une plus grande section efficace des modes Raman de ces groupements [58]. Enfin des groupements susceptibles de se conjuguer tels que les vinyles dans la PP ont été caractérisés dans le spectre Raman mais présentent néanmoins une intensité faible. Toutefois, il demeure une controverse quant à l'attribution des modes internes de tels groupements qui sera explicitée ultérieurement [59-60].

* influence des substituants méso : position X

La substitution la plus classique des positions méso par des cycles benzéniques conduit à la TPP. Comme nous l'avions vu précédemment, les modifications des spectres vibrationnels sont d'autant plus importantes que l'effet de masse est sensible. Ce qui explique les différences notables entre les modes de la NiOEP et de la NiTPP, différences plus prononcées entre la Niporphine et la NiTPP. Le calcul récent de Gladkov et Solovyov permet de montrer que les modes de vibration des noyaux benzéniques sont très peu affectés par addition sur le cycle porphyrinique [61].

b). La nature du métal

L'influence du métal sur le spectre Raman trouvera son origine dans les deux phénomènes suivants :

- * Une modification de la structure électronique du complexe induira des variations d'intensité des raies Raman.
- * Une modification des paramètres structuraux du complexe induira des variations en nombre d'onde des raies Raman.

Il est impossible de dissocier ces 2 phénomènes, quant à leur effet sur le spectre d'une métalloporphyrine comme le démontre le résultat de Shelnutt [62]. Celui-ci a montré que les variations en fréquence des modes ν_3 , ν_{10} , et ν_{19} suivent l'électronégativité du métal lorsque l'on substitue l'atome métallique par du Ni, Co, Cu, Zn, Mg (électronégativité décroissante) pour une même porphyrine. Par exemple, pour l'OEP, le mode ν_{10} varie de 1660 cm^{-1} à 1610 cm^{-1} en allant du Ni au Mg. Nous avons vu dans le chapitre II, que l'électronégativité du métal influençait la conjugaison de celui-ci avec le noyau tétrapyrrolique, par recouvrement entre une orbitale vide p ($4p_z$, schéma 8) du métal et une orbitale a_{2u} (π) du ligand. La diminution en énergie de cette orbitale (délocalisation de la charge de l'orbitale a_{2u}) se traduit par une augmentation des énergies de liaison du ligand porphyrinique et devrait donc entraîner une augmentation de certaines constantes de forces. Sachant d'une part que l'orbitale a_{2u} (π) a sa densité électronique principalement sur les carbones méso et les azotes pyrroliques et que d'autre part, l'analyse en coordonnées normales (présentée auparavant) démontre que les modes ν_3 , ν_{10} , ν_{19} sont associés essentiellement à une élévation $C_\alpha - C_m$ la corrélation non linéaire trouvée précédemment entre le métal et les modes ν_3 , ν_{10} , ν_{19} est expliquée et la position en nombre d'onde de ceux-ci reflète la stabilisation de l'orbitale a_{2u} .

On pourrait espérer dans un but analytique, que la nature du métal puisse être estimée à l'examen de certains modes vibrationnels. Cependant, les complexes cités ci-dessus sont exempts de coordinats axiaux. La présence d'un (ou de deux) ligand (s) axial (ux) influencera énormément le spectre Raman. La coordination du ligand axial s'effectue par l'intermédiaire du recouvrement d'une orbitale pleine du

ligand avec l'orbitale d_{z^2} mais également par la rétrocoordination des orbitales d_{xz} et d_{yz} sur les orbitales vacantes π^* du ligand. Par synergisme, les variations des densités électroniques sont répercutées sur les orbitales π^* du coeur porphyrrique et donc sur les constantes de force et en définitive sur les fréquences de vibration.

Ainsi non seulement la nature de la porphyrine mais aussi la nature du métal, peuvent être déterminées à l'examen du spectre Raman. Ces déterminations se feront indirectement en utilisant certains modes spécifiques des changements structuraux et (ou) électroniques de la molécule. Outre l'étude en fréquences, les disparités d'intensité entre les complexes porphyrriques permettront d'élucider la structure du complexe étudié par l'analyse des profils d'excitation dans le voisinage des bandes d'absorption électronique B et Q .

II - SPECTRES RAMAN DES COMPOSES MODELES : $(TPPFe)_2O$, $(DPDEFe)_2O$

En dépit de nombreuses études qui ont été menées sur les métalloporphyrines, peu d'entre-elles se sont intéressées aux espèces dimères pontées par ligands axiaux. Pourtant ces composés sont susceptibles d'être de très bons modèles non seulement pour apprécier l'aptitude qu'a le noyau tétrapyrrolique à se déformer (liée aux contraintes stériques qui peuvent exister entre les deux unités) mais aussi pour mimer l'interaction électronique qui peut avoir lieu entre les deux unités. C'est pourquoi il est nécessaire pour chaque famille de porphyrine étudiée (TPP, DPDE) de comparer les spectres des monomères (dérivé chloré) et dimères (μ -oxo).

Les spectres RR de ces composés seront dominés par les modes liés aux déformations planes du coeur porphyrrique. Cependant, l'abaissement de symétrie provoqué par la présence d'un ligand axial (ex : Cl) ou bien par la dissymétrie de la substitution du coeur tétrapyrrolique (ex : DPDE), active certains modes vibrationnels dans le plan de symétrie E_u (tableau XIV). On peut s'attendre aussi à pouvoir caractériser d'autres modes, qui ne sont pas attribuables au cycle porphyrrique lui-même, mais qui font intervenir le ligand axial et le métal. C'est pourquoi, nous allons présenter d'une part les modes liés au squelette porphyrrique et d'autre part, les modes vibrationnels liés à la présence de la liaison axiale et plus particulièrement de la liaison μ -oxo.

1. Attribution des modes du squelette porphyrrique

a). Les composés de la TPP

Les figures 21, 22 représentent les spectres de la $(TPPFe)_2O$, en solution et à l'état solide ainsi que les spectres du dérivé chloré obtenus par une excitation B ($\lambda_{exc} = 457,9nm$). De plus un spectre de $(FeTPP)_2O$, comparé à celui du dérivé chloré, est représenté en figure 23 ($\lambda_{exc} = 514,5nm$). Nous avons reporté dans le tableau XV, les nombres d'onde observés sur les spectres RR des dérivés étudiés.

L'attribution proposée, reprend les résultats de Spiro qui avait étudié de façon très précise le spectre de la $(TPPFe)_2O$ ainsi que les composés deutérés correspondants [63]. Notre étude, qui se distingue de celle de Spiro, car effectuée en phase solide, nous a permis de mettre en évidence plusieurs modes vibrationnels, peu intenses, non observés par celui-ci :

* une série de 4 bandes d'intensité faible qui se situent à 1124 cm^{-1} , 720 cm^{-1} , 572 cm^{-1} et 335 cm^{-1}

* une raie relativement intense par excitation Q vers 1368 cm^{-1} .

Notre étude, ne nous permet pas de donner une attribution exacte des modes situés vers 1124 cm^{-1} , 720 cm^{-1} , 572 cm^{-1} et 335 cm^{-1} . Remarquons cependant que les trois derniers ont été également observés dans les complexes μ -carbido [64] et μ -nitrido [65] de la TPP et sont associés à des modes symétriques. Le calcul en coordonnées normales, effectué par Gladkov, a montré que le mode situé à 390 cm^{-1} est associé à une déformation angulaire $C_m - C_{benz} - C_{benz}$, dans le cas où les noyaux benzéniques sont perpendiculaires au plan porphyrrique. Cette raie se déplace vers 337 cm^{-1} (valeur calculée) dans le cas de la rotation d'un noyau benzénique (calcul fait avec un angle de 45°). La présence simultanée des modes à 390 cm^{-1} et 335 cm^{-1} dans chacun des complexes étudiés indique que les noyaux benzéniques ne sont pas tous perpendiculaires au plan porphyrrique. Ce résultat est en accord avec les résultats de la structure RX de la $(TPPFe)_2O$ [36] et est une donnée structurale nouvelle pour la $TPPFeCl$. Le mode dépolarisé, observé vers 1368 cm^{-1} par excitation Q, fut mentionné par Chottard G. [66] et peut être attribué par analogie au mode ν_{28} de la NiOEP, associé principalement à une

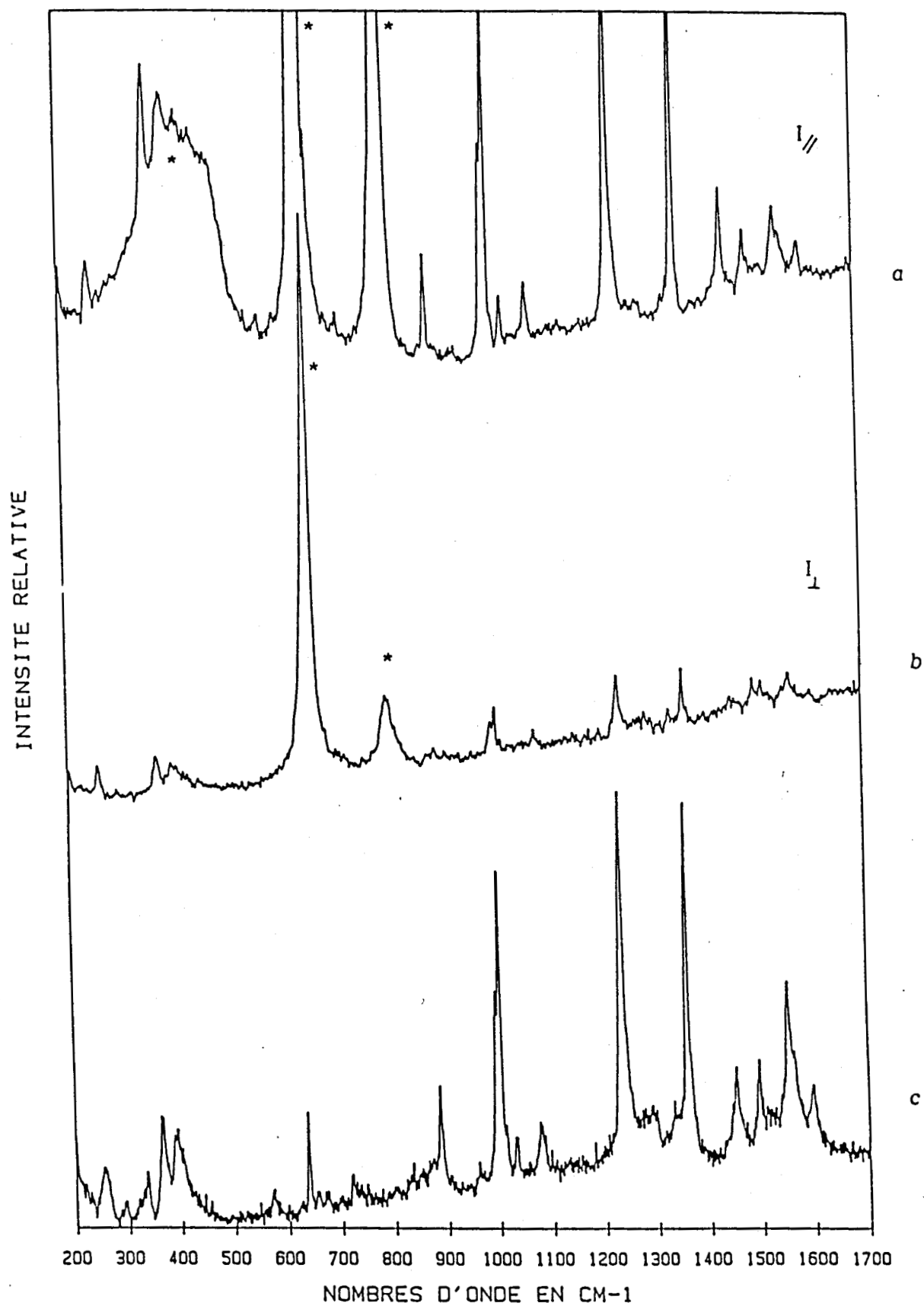


Figure 21 : Spectres Raman de la $(TPPFe)_2O$ à 457,9 nm (Résolution 5cm^{-1})

a , b : en solution dans CS_2 (raie de CS_2 : *)

c : solide dans KBr

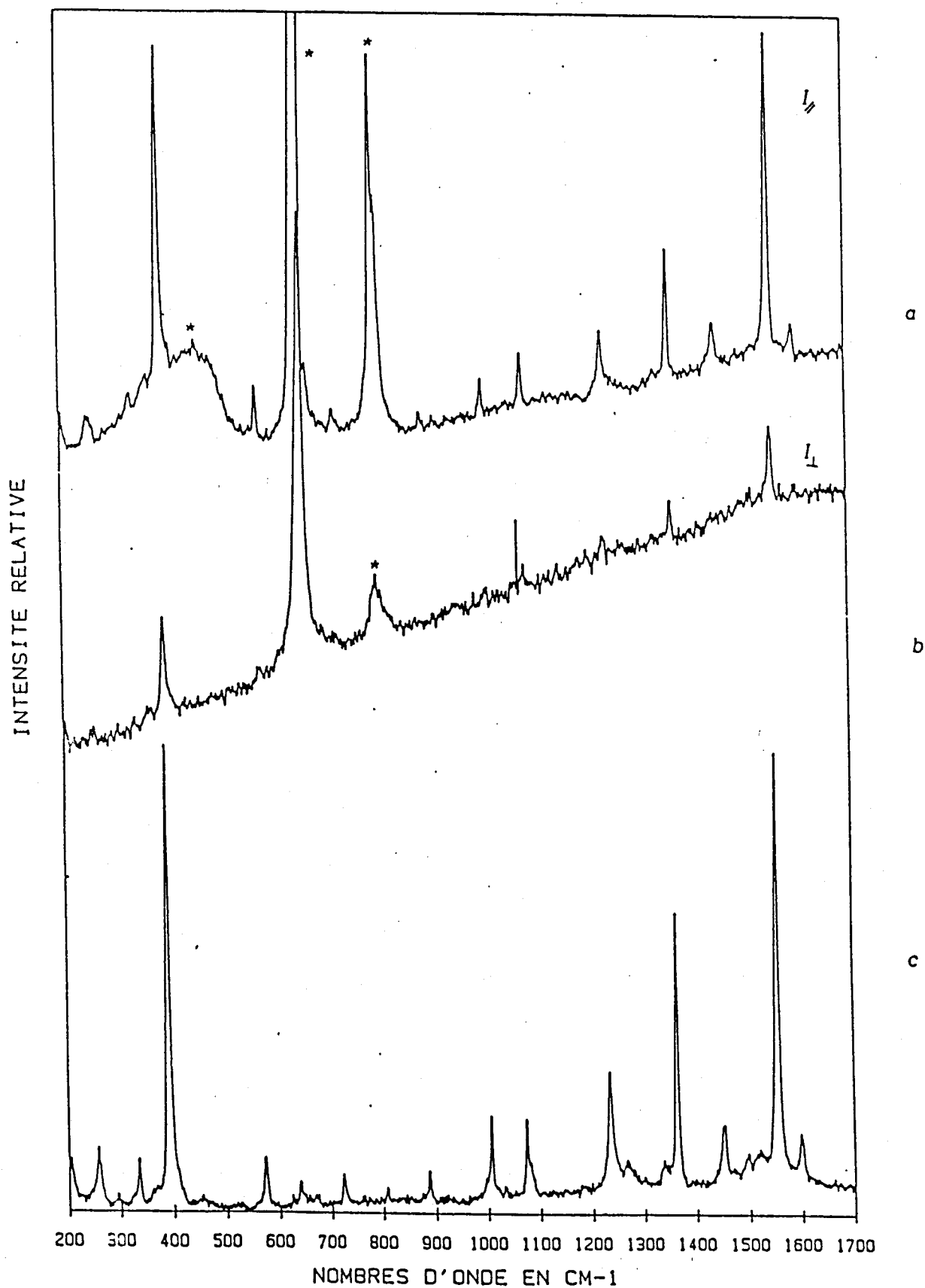


Figure 22 : Spectres Raman de la TPPFeCl à 457,9 nm (Résolution : 5 cm⁻¹)

a , b : en solution dans CS₂ (raie de CS₂ : *)

c : en solide dans KCl

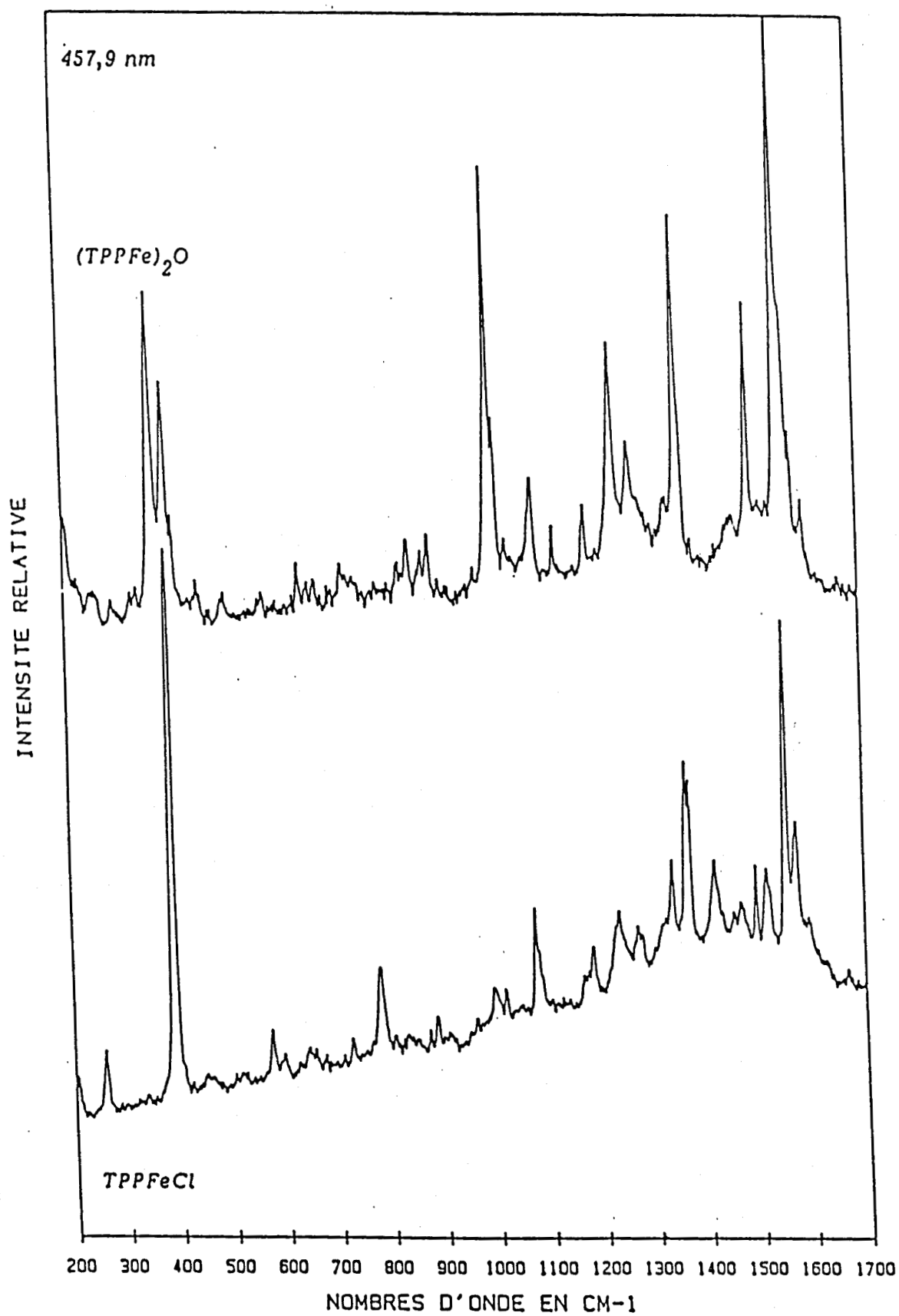


Figure 23 : Spectres de la $(TPPFe)_2O$ (solide dans KBr) et de la $TPPFeCl$ (solide dans KCl)

(TPPEFe) ₂ O	(TPPFe)Cl	Symétrie	Attribution
1599	1596	A _{1g}	phényle
1579	1574*		
1565	1568*	B _{1g}	$\nu(C_a-C_m)$
1555	1555	A _{1g}	$\nu(C_b-C_b) + \delta(C_b-H)$
1520	1520	A _{2g}	$\nu(C_a-C_m)$
1498	1496	B _{1g}	$\nu(C_b-C_b)$
1452	1454	A _{1g}	$\nu(C_a-C_b) + \delta(C_b-H)$
1368*	1371	B _{2g}	$\nu(C_a-C_b)$
1362	1364	A _{1g}	$\nu(C_a-N) + \delta(C_b-H)$
1335	1338	A _{2g}	$\nu(C_a-C_b), \delta(C_b-H)$
1269	1266		$\nu(C_a-N)$
1237	1234		phényle
	1229*	A _{2g}	$\nu(C_a-N)$
1184	1185*	B _{1g}	$\nu(C_a-C_b)$
1124			
1085	1078 Δ	B _{1g}	$\delta(C_b-H)$
1034	1032	-	phényle
1016	1013	B _{2g}	$\delta(C_b-H)$
1006	1006	A _{1g}	$\nu(C_a-C_n)$
1000	996	-	phényle
889	887	A _{1g}	δ_s (noyau)
876			δ_{as} (Fe-O-Fe)
850	851*	B _{1g}	δ_s (noyau)
831	836*		
718	724		
638	639	-	phényle
572	573		
392	391	A _{1g}	$\delta(C_m C_{benz} C_{benz})$
368			ν_s (Fe-O-Fe)
335	334	A _{1g}	$\delta(C_m C_{benz} C_{benz})$
290	292	B _{1g}	
254	257	B _{2g}	déformation du noyau porphyrrique
197	205		

* excitation Q 567,1 nm

 Δ excitation 488,0 nmTableau XV : Attribution des dérivés chlorés et μ -oxo de la ferritétraphénylporphyrine

déformation C_a-C_b .

L'étude de ces composés met en évidence des modes internes associés à des déformations symétriques du benzène. Les raies caractéristiques de ces groupements peuvent être déduites du spectre Raman d'un benzène monosubstitué ou du biphényle. L'attribution proposée par Spiro [63] fut confirmée par une étude systématique menée sur des dérivés de la TPP [67] et par le calcul de champ de force de la CuTPP [61]. Signalons cependant, que de l'attribution originale que seul un mode fut réattribué : celui à 886 cm^{-1} (polarisé). En effet, celui-ci disparaissait du spectre lorsque les noyaux benzéniques étaient deutérés et avait donc été attribué naturellement à un mode du cycle benzénique bien que celui-ci ne présente pas de bande polarisée dans cette région. Il fut attribué par la suite à une déformation symétrique du cycle porphyrrique [67].

Enfin, de cette étude comparative entre composé chloré et μ -oxo, il faut retenir deux points importants qui sont :

- Pas d'interaction intermoléculaire à l'état solide :

L'examen des figures 21 et 22 démontre que les spectres en solution et à l'état solide sont analogues. Le plus grand écart en fréquence ne dépasse pas 3 cm^{-1} . Ainsi peut-on affirmer que les interactions moléculaires dans ces composés susceptibles de se traduire soit par des changements géométriques du coeur porphyrrique ou des liaisons avec les ligands (voir exemples d'anomalies structurales cités dans le chapitre 1) sont négligeables.

- Analogie structurale entre la TPPFeCl et la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$:

Le tableau XV met en évidence l'analogie qui existe entre les spectres des composés chlorés et μ -oxo. En particulier, la coïncidence des fréquences vibrationnelles, dans le domaine $1000\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$ dominé par les vibrations liées à la structure porphyrrique (élongation C-C, C-N), souligne la similitude structurale de l'entité porphyrrique qui existe entre la TPPFeCl et la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$. Cependant la distinction très marquée en intensité, traduit la présence d'états électroniques excités très différents dans les deux complexes. On peut dire que le rôle joué par le ligand Cl ou O est analogue sur l'état fondamental mais que les états électroniques générés par la substitution Cl, O sont très différents.

Nous pouvons affirmer enfin, que l'association des deux unités monomères dans le composé μ -oxo ne crée pas de contrainte au niveau des cycles porphyriques. Ceci était prévisible compte tenu de la distance (5,2 Å) qui sépare les deux unités porphyriques [30].

b). Les composés de la DPDE

Avant d'entreprendre l'étude vibrationnelle de ces composés, nous nous sommes assurés de la nature exacte de la porphyrine par RMN après démétallation des composés métalliques (annexe expérimentale). Les spectres Raman de la (DPDEF₂O) et du (DPDEF₂Cl) sont obtenus à l'état solide et liquide (solvant CS₂) en utilisant une excitation B et Q et sont représentés sur les figures 24, 25, 26.

Comme prévu, le spectre RR est dominé par des raies dans un domaine de fréquences élevées (1000 cm⁻¹ - 1700 cm⁻¹) attribuables aux vibrations planes du squelette porphyrique. Cependant un certain nombre de raies en basses fréquences sont aussi observées dont quelques-unes seront attribuées à des modes vibrationnels hors du plan. L'attribution proposée dans le tableau XVII a été établie par analogie avec le calcul théorique mené sur la NiOEP [57] et par comparaison avec des études qui mentionnaient des composés analogues [58,59,68,69].

Cette attribution est confirmée par les mesures du taux de dépolarisation qui sont présentées sur les figures 24 et 25 respectivement pour le dérivé μ -oxo (à $\lambda_{exc} = 457,9$ nm) et le dérivé chloré ($\lambda_{exc} = 530,8$ nm). Les mesures effectuées dans ce travail permettent de caractériser :

- * les modes totalement symétriques (A_{1g}) qui sont polarisés et donnent naissance à des raies intenses par excitation B : le mode à 1375 cm⁻¹ attribuable principalement à une vibration symétrique C_a-N
- * les modes (B_{1g} , B_{2g}), qui présentent un taux de dépolarisation voisin de 0,75. La distinction B_{1g} , B_{2g} ne repose que sur l'attribution d'Abe [57] : le mode à 1626 cm⁻¹ (ν_{10}) visible quelque soit la radiation excitatrice utilisée, est associé principalement à une vibration C_a-C_m .
- * Les modes anormalement polarisés, observés par une excitation Q, tel que le

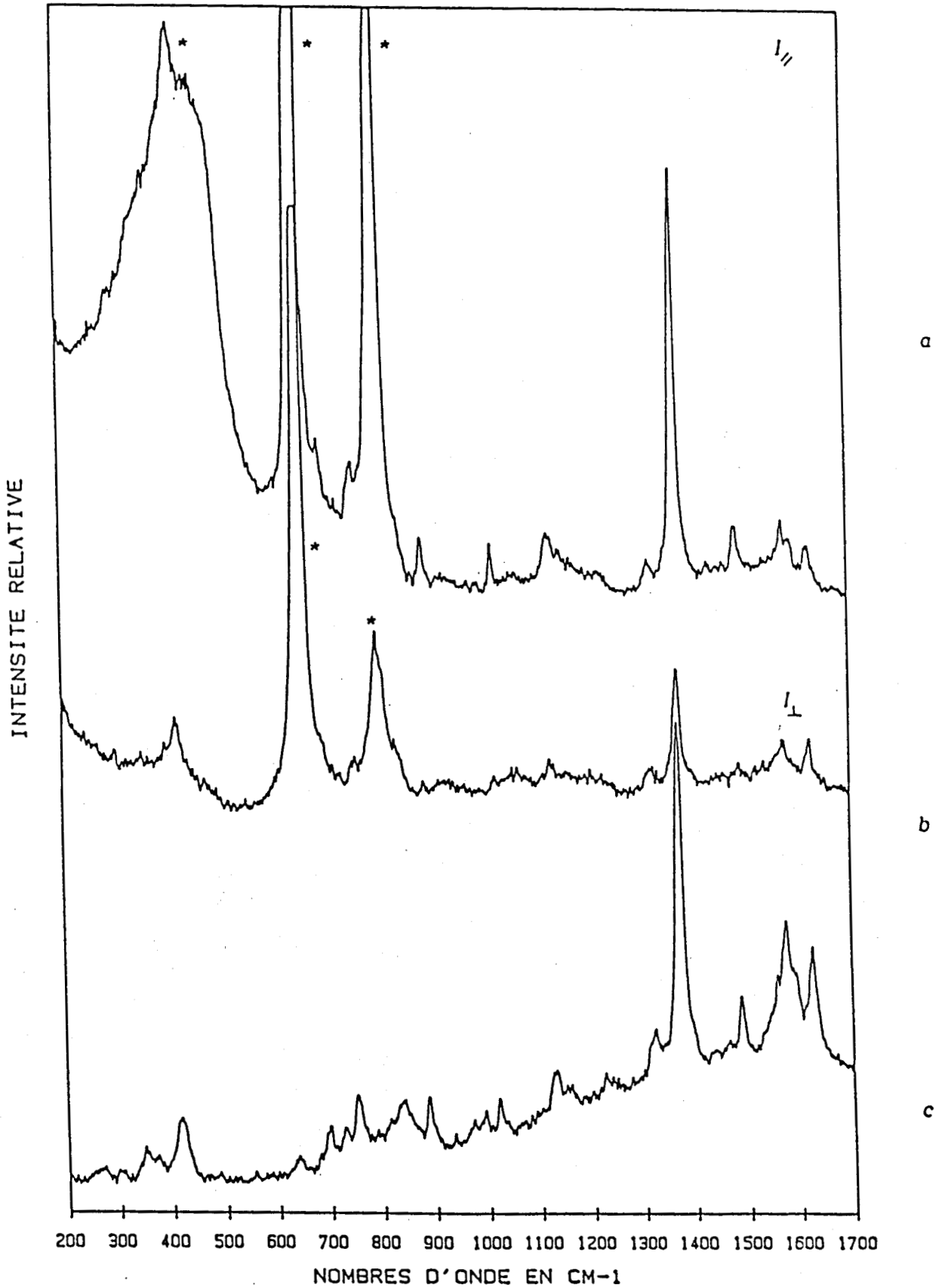


Figure 24 : Spectres Raman de la $(DPDEFē)_2O$ à 457,9 nm (Résolution 5 cm^{-1})
 a , b : en solution dans CS_2 (raie de CS_2 : *)
 c : en solide dans KBr

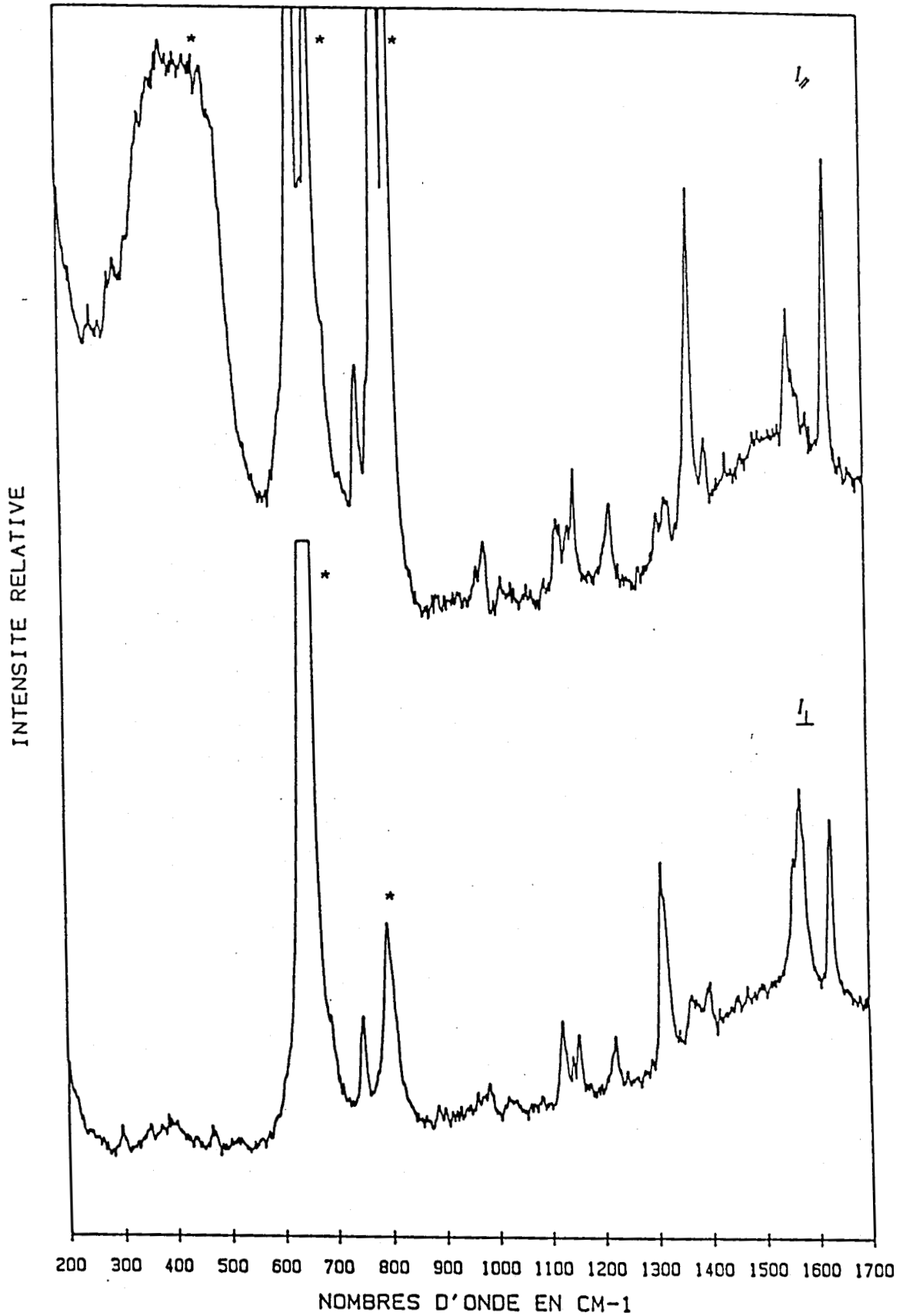


Figure 25 : Spectres Raman de la DPDEFCl à 530,2 nm , en solution dans CS_2 (raie de CS_2 : *)

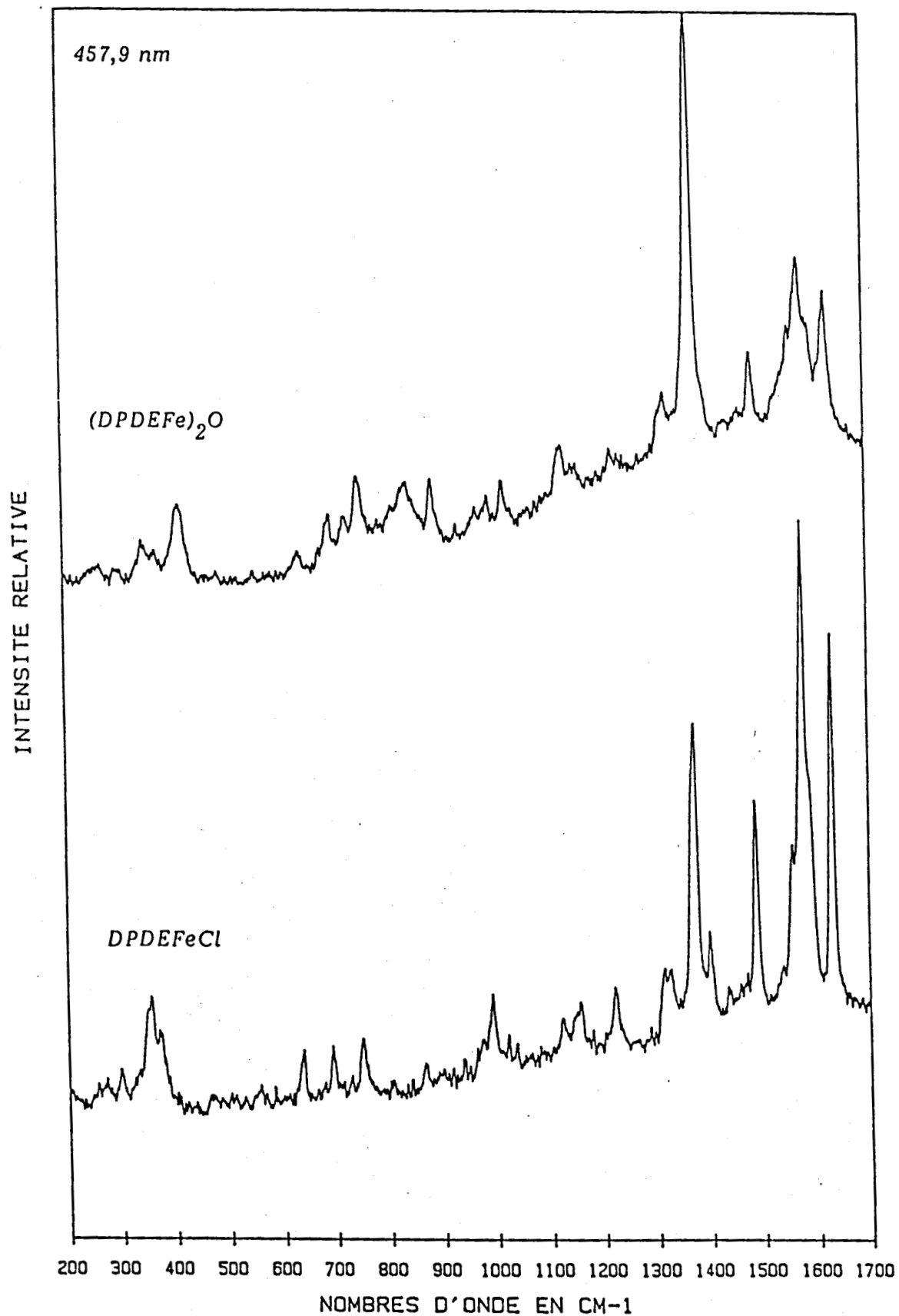


Figure 26 : Spectres Raman de la (DPDEFē)₂O (solide dans KBr) et de la DPDEFēCl (solide dans KCl) - Résolution 4 cm⁻¹

$(DPDEF\text{e})_2\text{O}$		$(DPDEF\text{e})\text{Cl}$	Symétrie	Attribution	Caractère principal
solide (a)	solution (a)	(b)			
1626	1625	1631	dp	B_{1g}	ν_{10} $C_a C_m$
1586	1589	1588		E_u	ν_{37} $C_b C_b$
1577	1577	1575	p	A_{1g}	ν_2 $C_b C_b$
no		1574	ap	A_{2g}	ν_{19} $C_a C_m$
1558		1561	dp	B_{2g}	ν_{11} $C_b C_b$
no		1530	nd	E_u	ν_{38}
1490	1487	1489	p	A_{1g}	ν_3 $C_a C_n$
1401		1402	dp	B_{2g}	ν_{29} $C_a C_b$
1372	1374	1373	p	A_{1g}	ν_4 $C_a N$
1321		1324	ap	A_{2g}	ν_{21} $C_m H$
1313	1318	1313	dp		
1221		1223	dp	B_{1g}	ν_{13} $C_m H$
1156		1154	dp	B_{2g}	ν_{30} C_b-S
1144		1145	dp		
1117	1126	1123	ap	A_{2g}	ν_{22} C_a-N
1019	1018	1019	ap	A_{1g}	ν_5 C_b-S
996		992	nd	E_u	ν_{45} $C_a N$
976		976	nd		
888	887	888	nd		
842					ν_{as} (Fe-O-Fe)
820		822	nd	A_{1g}	ν_6
751	754	750	dp	B_{1g}	ν_{16} $C_a N C_a$
734		732	nd	E_u	ν_{47} $C_a N$
695	692	694	nd	A_{1g}	ν_7 $C_b C_a N$
632		638	nd		
416	418				ν_s (Fe-O-Fe)
364		365	nd		$2\nu_{35}$
353		355	nd	A_{1g}	ν_8

nd : non déterminé - no : non observé - p : polarisé - dp : dépolarisé
 ap : anormalement polarisé

(a) $\lambda_0 = 457,9 \text{ nm}$

(b) $\lambda_0 = 530,9 \text{ nm}$

Tableau XVI : Attribution du spectre Raman de la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ et de la $DPDEF\text{eCl}$

mode situé vers 1127 cm^{-1} . La figure 25 met en évidence deux modes présentant un taux de dépolarisation très grand situé à 1572 cm^{-1} (ν_{19}) et surtout à 1313 cm^{-1} . La qualité du spectre de polarisation nous a permis de caractériser le mode ν_{19} , en observant la dissymétrie du massif obtenu dans la région $1500 \text{ cm}^{-1} - 1700 \text{ cm}^{-1}$ alors que dans le solide, il n'est pas discernable car masqué par le mode ν_2 très intense.

Bien que la symétrie moléculaire s'abaisse lorsque l'on passe de la NiOEP aux composés étudiés, on peut adopter l'attribution proposée par Abe [57] car le squelette conserve approximativement une symétrie D_{4h} . Cependant, les études spectroscopiques menées sur les composés de la NiOEP et de la NiDP [58] ou de la NiPP [59] démontrent que la substitution asymétrique de la porphyrine peut altérer les données spectroscopiques de la métalloporphyrine au travers de deux phénomènes :

- Les modes internes des substituants périphériques peuvent être visibles dans le spectre Raman,
- Les modes d'élongation et de déformation de substituants disposés de manière asymétrique peuvent se coupler avec les modes du squelette porphyrinique. En dernière limite, la substitution peut être suffisante pour activer des modes de symétrie E_u , par destruction du centre de symétrie.

Dans le cas de la DPDE, la première remarque est peu effective. En effet, seuls les modes internes des groupements propioniques seraient susceptibles d'intervenir mais ne sont jamais observés [59]. Néanmoins la nature de la DPDE induit cependant l'activité de modes de symétrie E_u , dont le plus caractéristique est présent sous forme d'épaulement vers 1588 cm^{-1} .

De notre analyse vibrationnelle, on peut faire des observations analogues à celles faites pour les composés de la TPP :

- Les spectres obtenus à l'état solide ou en solution ne diffèrent au plus que de 3 cm^{-1} , ce qui démontre que les interactions moléculaires à l'état solide peuvent être négligées pour l'état fondamental.

- La reconnaissance analytique du composé μ -oxo ne peut se faire directement à l'examen de la liste des fréquences vibrationnelles car la création de la liaison μ -oxo affecte très peu la structure porphyrrique.
- L'interaction créée par la liaison μ -oxo se situe au niveau des états électroniques excités (distinction des intensités des bandes entre le complexe chloré et μ -oxo).

2. Attribution des modes de vibration de la liaison μ -oxo

Dans notre analyse précédente, nous avons vu qu'il était relativement aisé d'attribuer les raies des spectres RR de nos composés, par analogie avec les nombreuses données bibliographiques. Cependant, l'identification du complexe μ -oxo ne peut se faire par examen de la liste des fréquences. Seules, des distinctions d'intensité des raies (figure 23) seraient une méthode de caractérisation de ce type de molécules. En particulier, les spectres de la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ et du $DPDEF\text{eCl}$, obtenus avec une excitation Soret (figure 26), mettent en évidence une intensité accrue du mode ν_3 dans le complexe μ -oxo. Cet argument a été utilisé récemment dans la littérature pour mettre en évidence le produit de dégradation de l'oxyhémoglobine en S.E.R.S. (Surface Enhancement Raman Spectroscopy) [70,71].

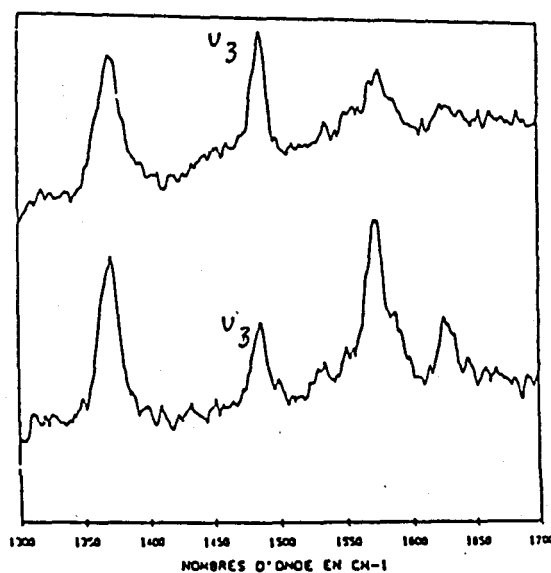


Figure 27 : Spectres de la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ (solide dans $\text{KB}\Gamma$)
et de la $DPDEF\text{eCl}$ (solide dans KCl) - $\lambda = 413,6 \text{ nm}$

Néanmoins, nous avons cherché à caractériser très précisément l'espèce moléculaire μ -oxo en identifiant les modes vibrationnels, intrinsèques d'une telle liaison. Ceux-ci peuvent être dénombrés de la façon suivante :

- une élongation symétrique, notée ν_s (Fe-O-Fe), attendue dans la région $300 \text{ cm}^{-1} - 500 \text{ cm}^{-1}$.
- une élongation asymétrique, notée ν_{as} (Fe-O-Fe), attendue dans la région $800 \text{ cm}^{-1} - 1000 \text{ cm}^{-1}$.
- une déformation angulaire, notée δ (Fe-O-Fe), attendue dans la région $100 \text{ cm}^{-1} - 300 \text{ cm}^{-1}$.

L'activité de chacun de ces modes est liée à la géométrie de la liaison Fe-O-Fe. En particulier, si l'angle θ (figure 13) est voisin de 180° , on approche d'une symétrie locale C_{4v} qui prévoit que ν_s sera active en Raman et ν_{as} sera active en IR. La baisse de symétrie permettra d'observer simultanément les deux modes à la fois en diffusion Raman et en absorption infrarouge. Le rôle joué par l'angle θ explique notre choix d'avoir comparé le spectre de la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ dont la structure cristallographique est inconnue, à celui de la $(TPPFe)_2\text{O}$ dans laquelle θ est voisin de 175° [30].

Pour attribuer ces modes dans les spectres Raman et IR, deux démarches sont possibles :

- La comparaison des spectres entre dérivé monomère et dimère.
- L'identification des modes propres au pont Fe-O-Fe par substitution isotopique, $^{56}\text{Fe} \rightarrow ^{54}\text{Fe}$ ou $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$.

L'originalité de ce travail est d'avoir synthétisé par réaction de métathèse, les composés isotopiques purs suivants : $(TPPFe)_2^{18}\text{O}$ et $(DPDE)_2^{18}\text{O}$ avec un taux d'enrichissement voisin de 100 %. Ce résultat se distingue essentiellement des travaux antérieurs par le fait que la substitution isotopique est quantitative et affecte le ligand μ -oxo lui-même.

* Les études menées en spectroscopie RR, sur les composés pontés des porphyrines [63,64] ou de macrocycles analogues [72], se sont faites en insérant l'atome de ^{54}Fe par la réaction d'Adler et Longo [5]. En particulier, l'attribution de ν_s (Fe-X-Fe) (X=O [63], X=N [65], X=C [65]) a été réalisée par cette méthode.

* Les spectres IR, qui ont permis de faire l'attribution de la déformation asymétrique ont été obtenus par auto-oxydation du composé ferreux en présence d'eau marquée à l' ^{18}O (TPP [36], DPDE [44]), avec un taux d'enrichissement moyen.

a). La liaison μ -oxo dans la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$

1.a) Résultats

La comparaison des spectres IR de ces composés, présentés en figure 28 met en évidence :

- un doublet présent pour la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$ non observé dans la TPPFeCl , à 890 cm^{-1} et 874 cm^{-1} , est la seule différence notable entre ces deux spectres (figure 28-a).
- Après échange isotopique $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$ le système des deux bandes disparaît au profit d'une bande unique (figure 28a-28b). C'est la seule modification notable entre les deux spectres IR.

De la même façon, la comparaison des spectres Raman de ces composés conduit aux observations suivantes :

- une bande intense vers 368 cm^{-1} dans le spectre de $(\text{TPPFe})_2\text{O}$, non observée dans le spectre du dérivé chloré (figure 23).
- Après échange $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$, aucun déplacement important n'est observé (figure 29a) si ce n'est un épaulement situé vers 878 cm^{-1} qui disparaît avec l'apparition concomitante d'une nouvelle raie vers 833 cm^{-1} (figure 29b).

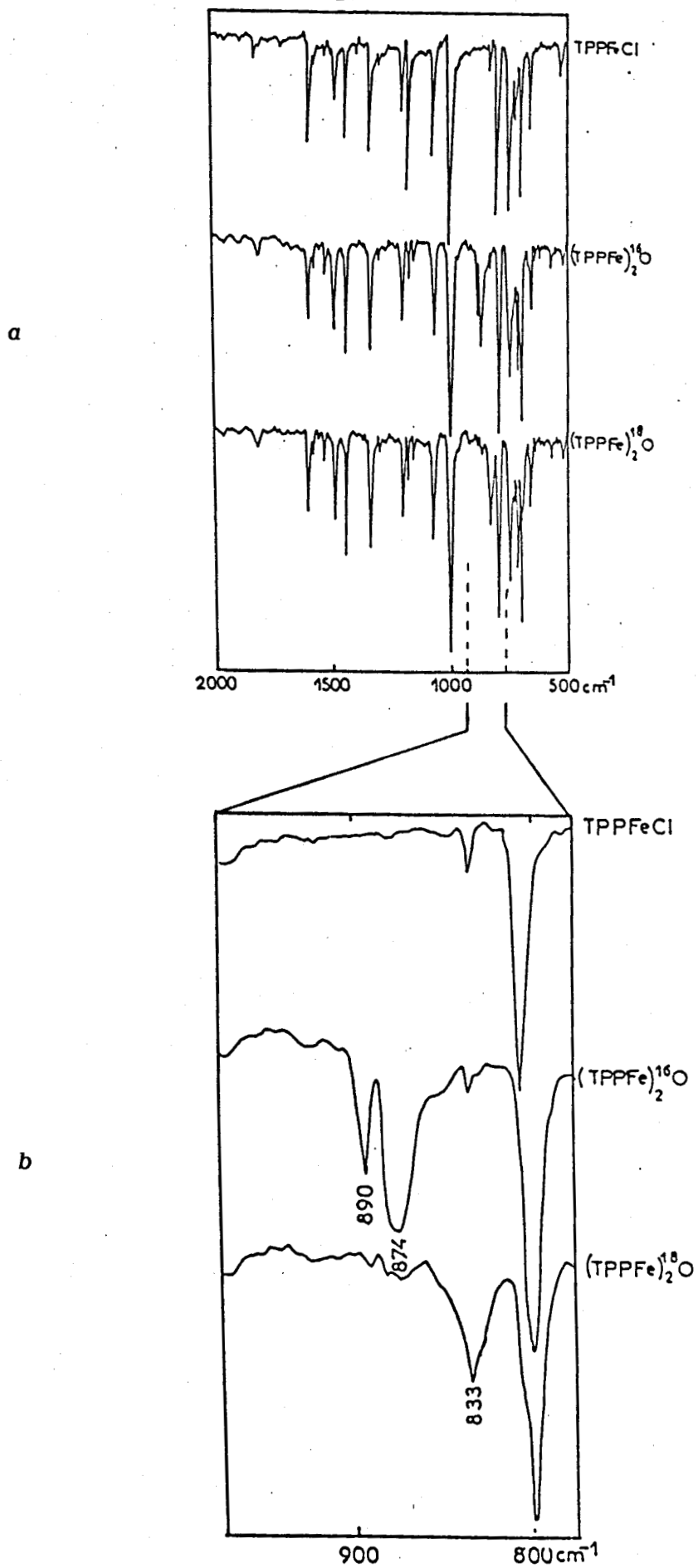
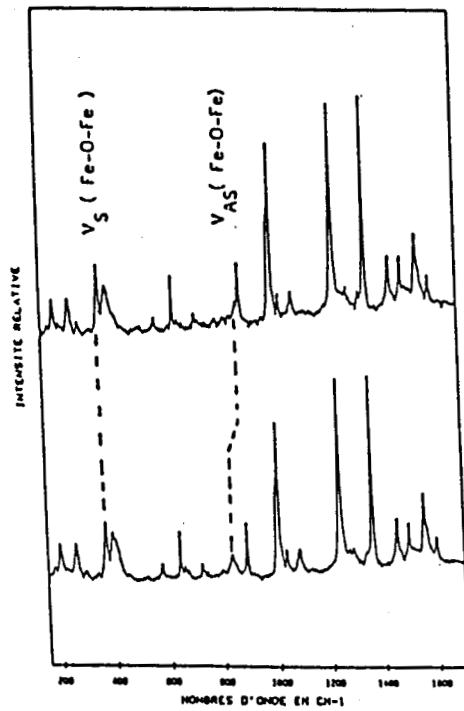


Figure 28 : Spectres IR des composés TPPFeCl , $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{16}$, $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{18}$

(a)

 $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{16}$ $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{18}$

(b)

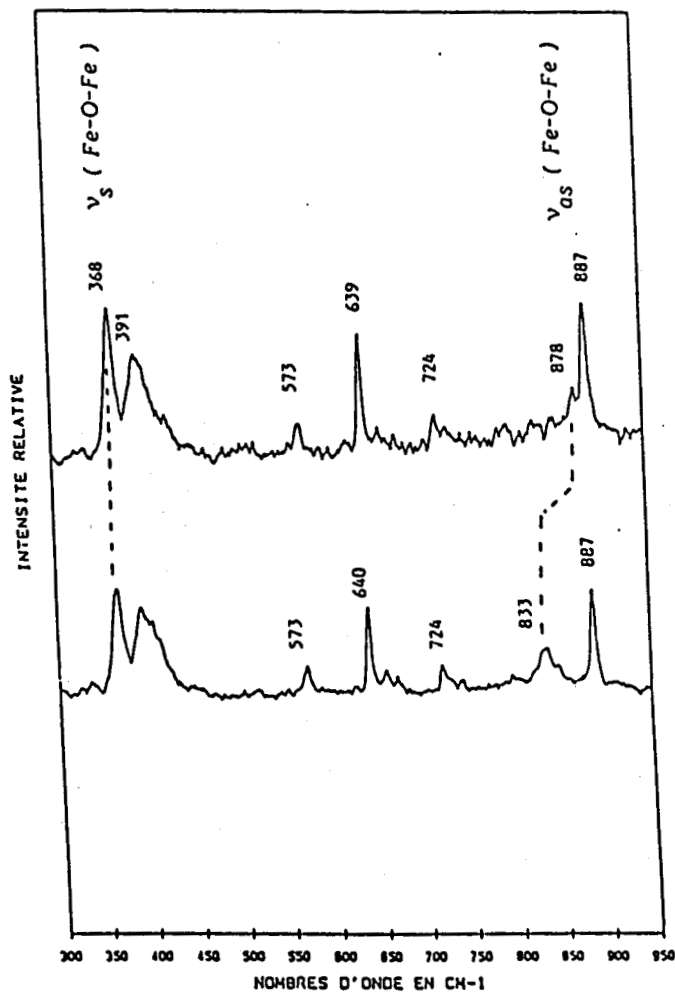
 $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{16}$ $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{18}$

Figure 29 : Spectres Raman des composés $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{16}$, $(\text{TPPFe})_2\text{O}^{18}$ -457,9 nm

- Il est à noter la faible intensité du mode situé à 878 cm^{-1} , comparée à celle du mode situé vers 368 cm^{-1} .

2.a) Discussion

Malgré le faible écart entre les nombres d'onde pour les dérivés ^{16}O et ^{18}O , la bande située vers 368 cm^{-1} est attribuable à ν_s (Fe-O-Fe). En effet, elle a été caractérisée après échange isotopique $^{54}\text{Fe} \rightarrow ^{56}\text{Fe}$ par un glissement de 5 cm^{-1} vers les basses fréquences dans un travail antérieur [63]. Par contre, l'échange isotopique $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$ a permis la caractérisation de la vibration asymétrique, ν_{as} (Fe-O-Fe), dans le spectre Raman de la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$. Ce résultat apparaît inattendu car généralement ce type de composé est traité dans la littérature en symétrie C_{4v} ($\theta = 180^\circ$). Il est à signaler qu'un écart à la symétrie C_{4v} est perçu pour une valeur de θ voisin de 175° pour la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$, par l'observation en diffusion Raman du mode ν_{as} (Fe-O-Fe), strictement inactif en symétrie C_{4v} . Réciproquement, on devrait observer dans le spectre IR de basses fréquences, une raie susceptible de correspondre à la déformation symétrique. Une raie vers 365 cm^{-1} est effectivement observée sur le spectre du composé $(\text{TPPFe})_2\text{O}$ (figure 30).

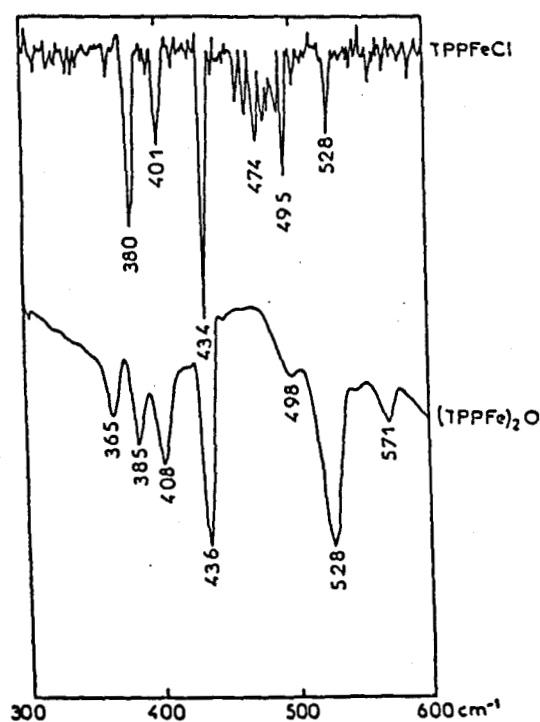


Figure 30 : Spectres IR de la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$ et du (TPPFeCl) en basses fréquences

On peut cependant s'étonner que le doublet (870 cm^{-1} , 874 cm^{-1}) observé dans le spectre IR soit affecté par l'échange isotopique. Ce phénomène a été observé également dans le cas des phtalocyanines de fer [73] et a été attribué à une résonance de Fermi. L'examen du spectre en basses fréquences, signale effectivement l'existence d'une bande intense vers 434 cm^{-1} , dont l'harmonique pourrait être en résonance avec le mode ν_{as} (Fe-O-Fe). Cette explication se justifie également par le fait que cette bande à 434 cm^{-1} existe aussi dans la TPPFeCl (figure 30) mais qu'aucune bande n'est observée dans la région 850 cm^{-1} - 920 cm^{-1} (figure 28a).

Pour les composés $(\text{TPPFe})_2\text{N}$ et $(\text{TPPFe})_2\text{C}$, dont la structure radiocristallographique du premier est connue [74], les modes antisymétriques ne sont pas observés en diffusion Raman. Cette constatation est en accord avec une symétrie locale C_{4v} et donc avec un angle très proche de 180° .

Le mode ν_s (Fe-O-Fe) est apparu insensible à la substitution $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$. Ce fait peut être expliqué par le modèle de Wing [75]. Un système d'équations simples permet d'estimer les modes ν_s et ν_{as} d'une structure C_{2v} (angle θ) du type XY_2 :

$$5,899 \cdot 10^{-7} \cdot \nu_s^2 = \left[\frac{1}{M_Y} + \frac{1}{M_X} (1 + \cos\theta) \right] \cdot (k_d + k_{\text{dd}})$$

$$5,899 \cdot 10^{-7} \cdot \nu_{\text{as}}^2 = \left[\frac{1}{M_Y} + \frac{1}{M_X} (1 - \cos\theta) \right] \cdot (k_d - k_{\text{dd}})$$

k_d , k_{dd} sont exprimées en mdyn/\AA et représentent respectivement les constantes de force d'élongation et de déformation.

Nous avons représenté sur la figure 31, la variation des fréquences ν_s ($\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe}$) et ν_{as} ($\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe}$) en fonction de l'angle θ pour des masses ponctuelles de Y différentes. En effet dans les complexes μ -oxo l'atome de fer est associé aux cycles porphyriques ce qui risque de modifier sa masse apparente.

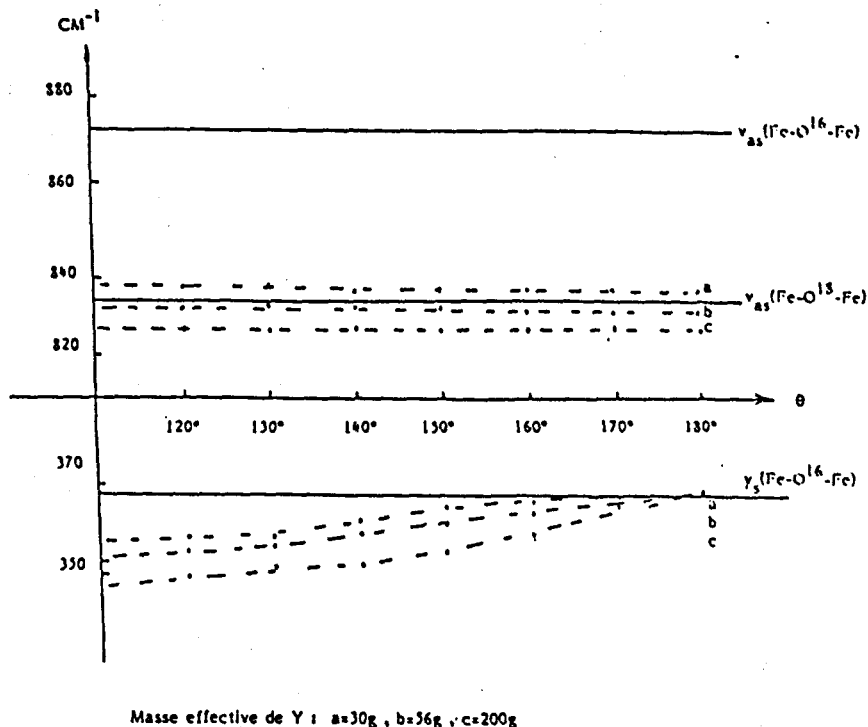


Figure 31 : Influence de la masse et de l'angle pour les modes $\nu_s(\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe})$ et $\nu_{as}(\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe})$ pour la $(\text{TPPFe})_2\text{O}$

Ces courbes permettent de rendre compte des résultats expérimentaux. Le glissement de fréquence du mode $\nu_{as}(\text{Fe-O-Fe})$ attendu pour un échange isotopique $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$ est proche de la valeur observée (3 cm^{-1}). Cette valeur est quasi indépendante de l'angle θ . Par contre le glissement de fréquence du mode $\nu_s(\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe})$ dépend de l'angle θ . Toutefois la valeur attendue ($2 \text{ à } 3 \text{ cm}^{-1}$) est faible pour des angles θ compris entre 160° et 180° et est en accord avec l'expérience. En résolvant le système d'équations, nous obtenons les valeurs suivantes : k_d égal à $3,775 \text{ m dyn/A}$ et k_{dd} égal à $0,62 \text{ m dyn/A}$.

Enfin, notre étude isotopique démontre de façon évidente :

* L'absence de complexe hématine (absence de bande infrarouge Fe-OH à 3600 cm^{-1} , glissant à 2700 cm^{-1} pour $\text{Fe-}^{18}\text{OH}$) en contradiction avec les résultats de l'étude citée en référence [76].

* Une très grande stabilité du complexe : pas d'échange observé, $^{18}\text{O} \rightarrow ^{16}\text{O}$, sur le composé isotopique qu'il soit exposé en atmosphère sèche ou humide, même après un temps relativement long (quelques semaines).

* le mode δ (Fe-O-Fe) n'est pas observé.

En conclusion, notre substitution isotopique nous a permis de démontrer que la réaction de métathèse s'accompagnait de la formation seule du complexe μ -oxo dont le spectre de vibration est caractérisé par la déformation symétrique à 368 cm^{-1} et par la déformation asymétrique vers 874 cm^{-1} .

b). La liaison μ -oxo dans la $(\text{DPDEFc})_2\text{O}$ et dans la $(\text{PPDEFc})_2\text{O}$

1.b). Résultats expérimentaux

La comparaison des spectres IR des composés DPDEFcCl et $(\text{DPDEFc})_2\text{O}$ met en évidence :

- une bande très large vers 849 cm^{-1} dans la $(\text{DPDEFc})_2\text{O}$, moins intense dans le cas du dérivé chloré.
- Par échange isotopique $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$, cette bande s'atténue au profit d'une nouvelle raie (792 cm^{-1}) qui est le seul changement significatif (figures 32a-32b).

De la même façon, la comparaison des spectres Raman de ces mêmes composés démontre :

- la présence d'une raie à 416 cm^{-1} (large), d'intensité moyenne ainsi qu'une autre bande vers 842 cm^{-1} (figure 27), non observées dans le spectre du dérivé chloré.
- Par échange isotopique $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$ la bande vers 835 cm^{-1} se déplace dans la zone $790 \text{ cm}^{-1} - 800 \text{ cm}^{-1}$ (figure 33b).

2.b). Discussion

Nous attribuons la raie à 416 cm^{-1} , à la déformation symétrique ν_s (Fe-O-Fe) par analogie avec le complexe $(\text{TPPFc})_2\text{O}$. En effet, son absence dans le dérivé chloré et sa valeur en nombre d'onde nous autorise à cette attribution. Il est aisé de démontrer que l'absence du glissement significatif de la raie à 416 cm^{-1} , après échange isotopique, par un calcul similaire à celui présenté pour la TPP sous entend que l'angle θ de cette molécule soit compris entre 150° et 180° (dans ce

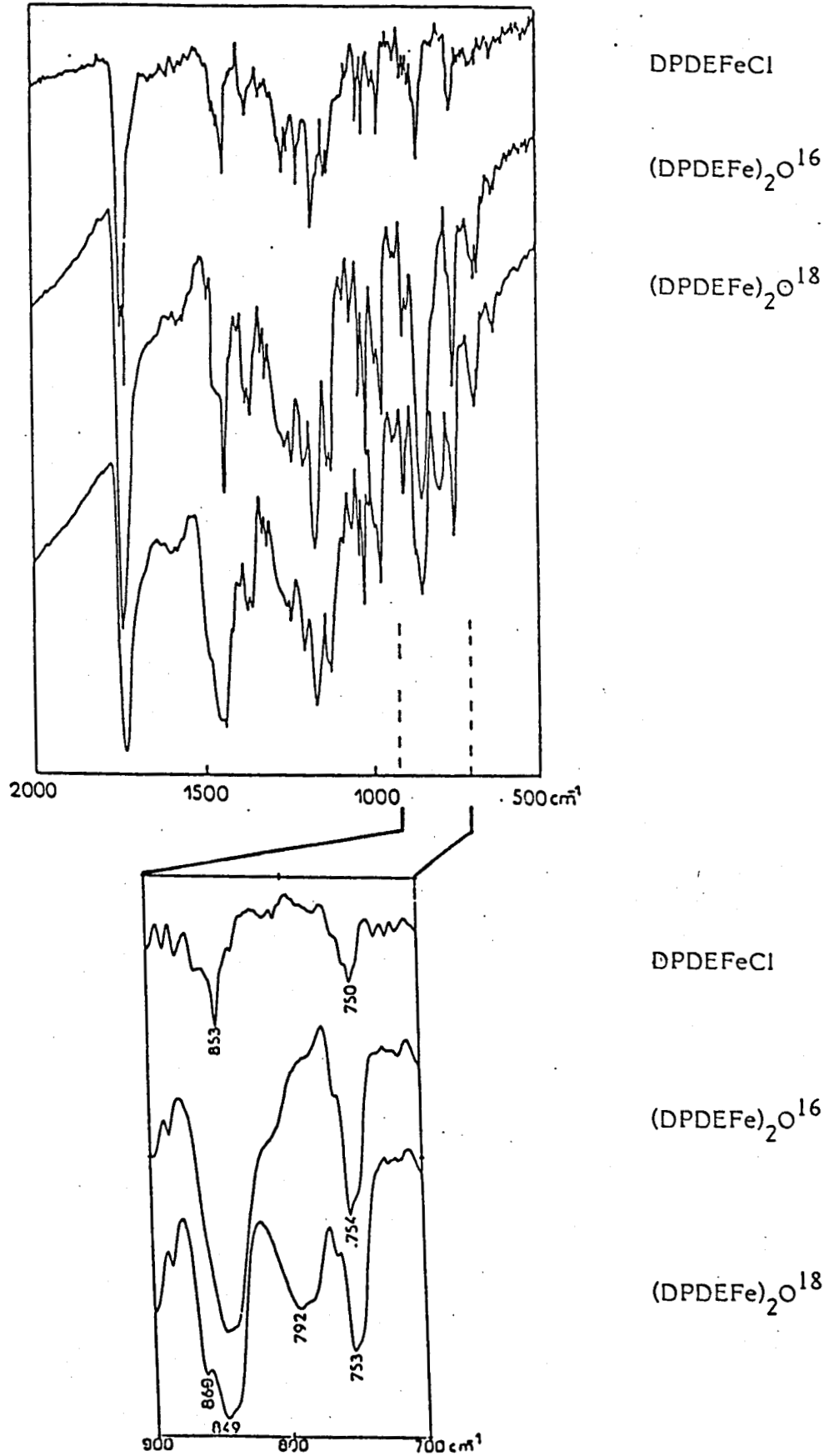


Figure 32 : Spectres IR des composés DPDEFcCl , (DPDEFc)₂O¹⁶, (DPDEFc)₂O¹⁸

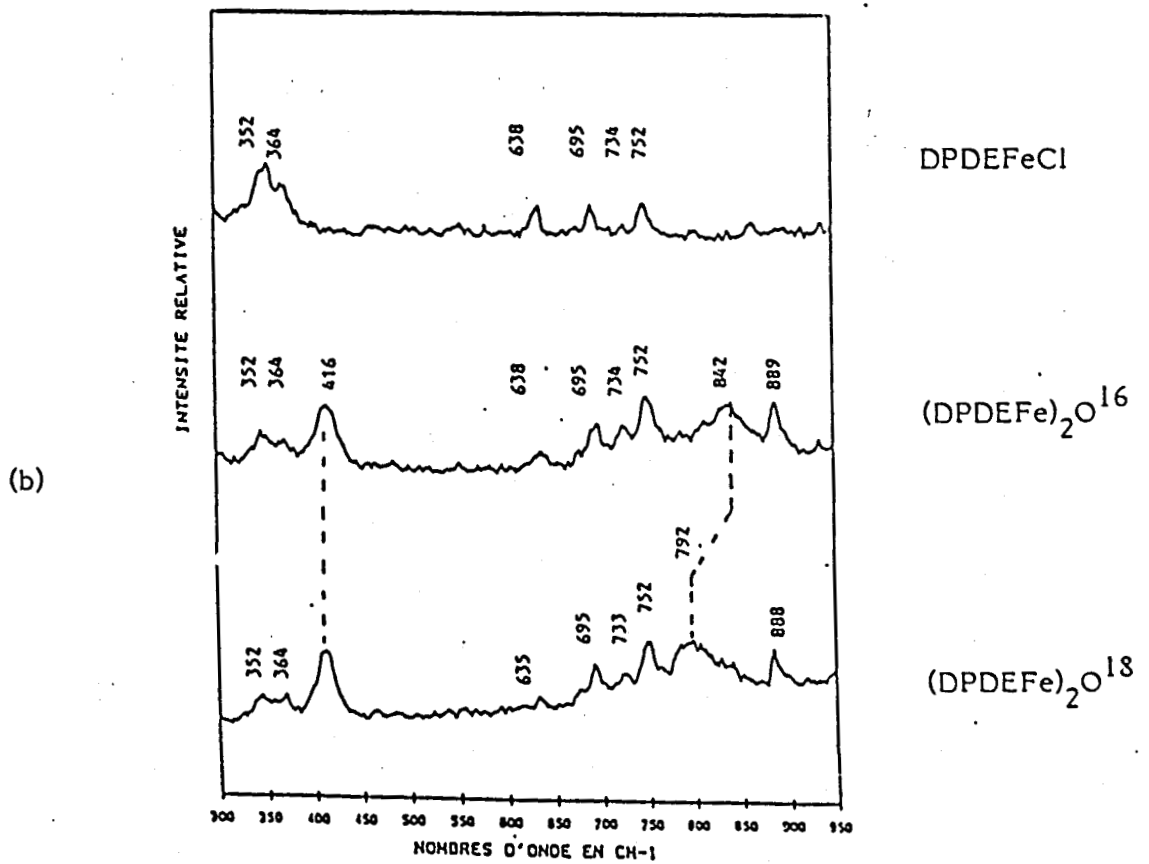
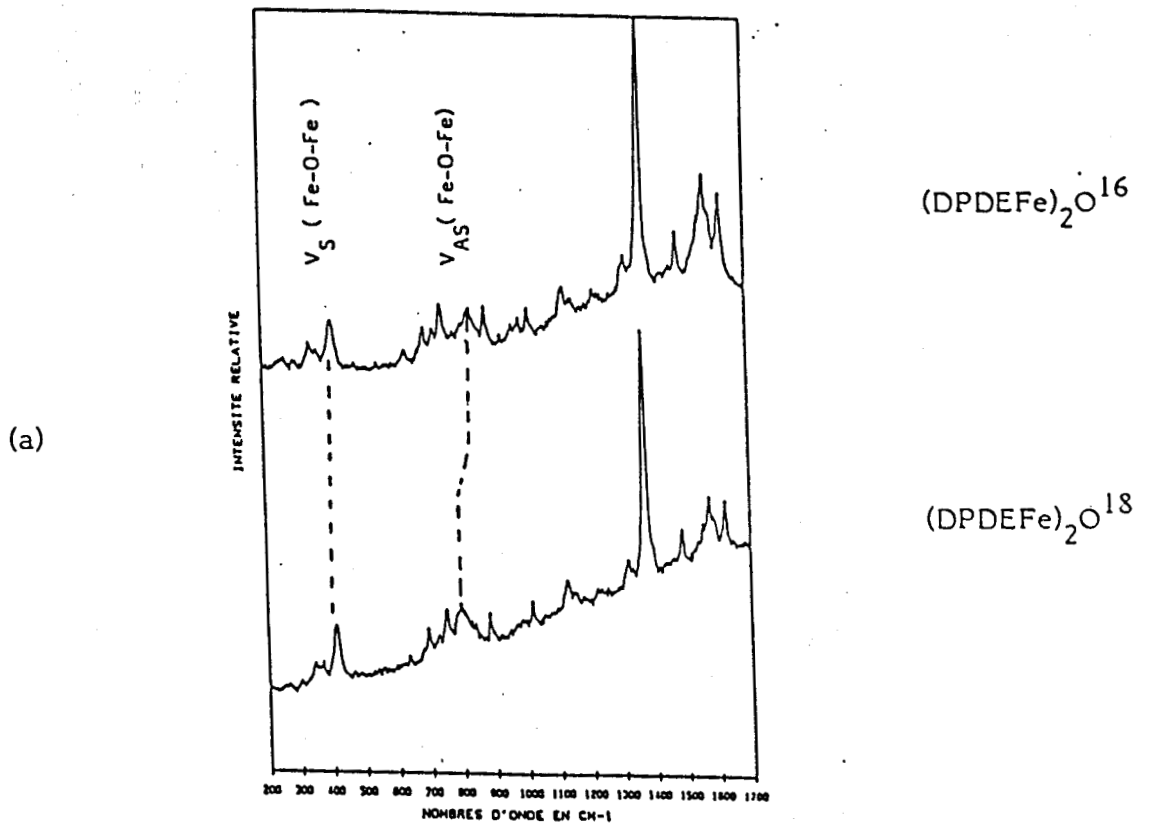


Figure 33 : Spectres Raman des composés (DPDEFē)₂O¹⁶, (DPDEFē)₂O¹⁸ - 457,9 nm

domaine quelque soit la masse ponctuelle effective considérée, le déplacement isotopique n'est pas décelable). Nous avons corrélié l'angle θ et le nombre d'onde de la ν_s (Fe-O-Fe) pour des composés μ -oxo dont les structures sont connues [77].

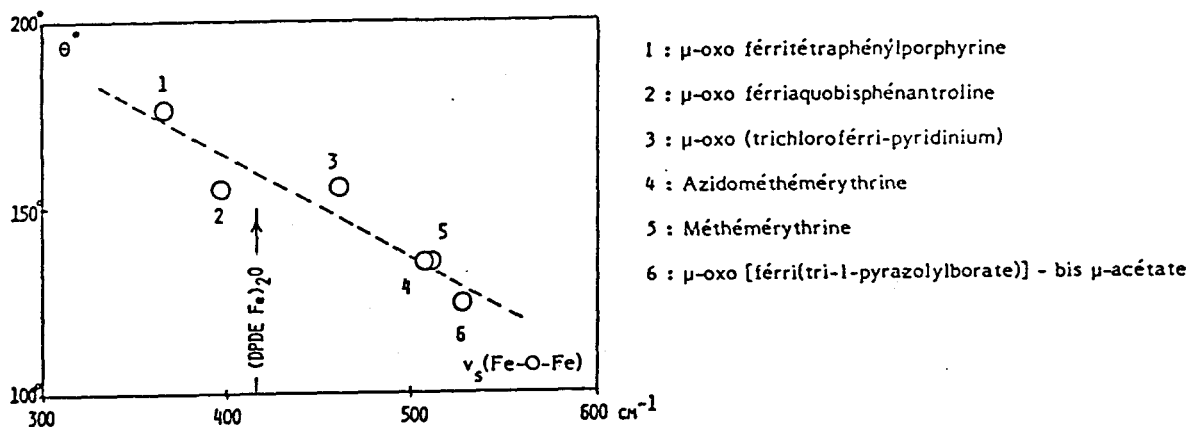


Figure 34 : Corrélation entre ν_s (Fe-O-Fe) et l'angle θ (Fe-O-Fe)

Le nombre d'onde de ν_s (Fe-O-Fe) décroît si l'angle Fe-O-Fe diminue et est indépendant de la longueur de liaison. De la valeur de 416 cm^{-1} , on détermine un angle voisin de 160° ($\pm 5^\circ$). Ce résultat se justifie de la façon suivante :

- Cette proposition d'angle est en accord avec les travaux théoriques menés par Tatsumi qui prévoit un angle de 150° pour un complexe porphyrrique μ -oxo de Fe. L'écart entre ces deux valeurs s'explique par une non prise en compte de l'interaction stérique des deux cycles porphyrriques dans le calcul théorique [78].
- La présence de substituant peu volumineux sur le cycle tétrapyrrolique, au niveau des positions méso (H) doit faciliter l'inclinaison de la liaison Fe-O-Fe, au contraire du complexe $(\text{TPPFe})_2\text{O}$ où une forte interaction stérique est générée par la présence des noyaux benzéniques en position méso.

- La valeur de l'angle permet de calculer le déplacement isotopique attendu en résolvant les équations de Wing. On obtient par le calcul les valeurs suivantes, ν_{as} ($\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe}$) à 800 cm^{-1} et ν_s ($\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe}$) à 413 cm^{-1} , qui sont en accord avec les résultats expérimentaux (792 cm^{-1} pour le ν_{as} et non observé pour ν_s car cette valeur est voisine de ν_s ($\text{Fe-}^{16}\text{O-Fe}$) à 416 cm^{-1}). De plus, ce calcul nous permet de déterminer les constantes de forces de la liaison Fe-O-Fe dans le complexe μ -oxo : $k_d = 3,86\text{ mdyn/A}$, $k_{dd} = 0,85\text{ mdyn/A}$.
- L'observation du mode asymétrique ν_{as} dans le spectre Raman confirme la structure C_{2v} de la liaison Fe-O-Fe.

Néanmoins, l'étude en basses fréquences de la $(\text{DPDEFe})_2\text{O}$ en spectroscopie IR ne permet pas de mettre en évidence de raie susceptible de correspondre à $\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$ qui devrait être observable à cause de la baisse de symétrie de ce système (figure 35)

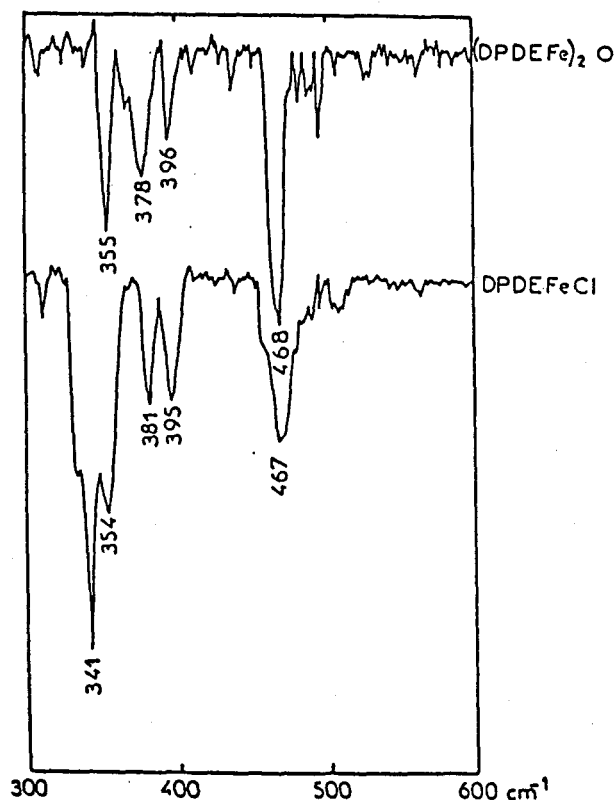


Figure 35 : Spectres IR de basses fréquences des composés DPDEFeCl et $(\text{DPDEFe})_2\text{O}$

La réaction d'échange isotopique permet de plus d'énoncer des conclusions analogues à celles faites pour la $(TPPFe)_2O$: l'absence d'un composé hématine du type Fe-OH (le facteur important est certainement l'excès de base qui conduit uniquement au dérivé μ -oxo), l'absence de structure du type bisquo, la très grande stabilité de ce composé dans le temps (aucune évolution du rapport $I_{\text{vas}}(\text{Fe-}^{18}\text{O-Fe}) / I_{\text{vas}}(\text{Fe-}^{16}\text{O-Fe})$ en atmosphère sèche ou humide après quelques semaines).

De plus, afin de juger de l'influence du squelette porphyrrique sur la liaison μ -oxo, nous avons étudié le complexe μ -oxo de la protoporphyrine diméthylester, $(PPDFe)_2O$, qui se distingue du composé de la $(DPDFe)_2O$ par la présence de vinyles en position 2 et 4 (structure vérifiée par RMN : annexe expérimentale). La comparaison des spectres Raman ne met en évidence aucune différence notable (Figure 36) ni sur le nombre d'onde de la $\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$ (voisin de 416 cm^{-1}) ni sur les intensités respectives de ces bandes.

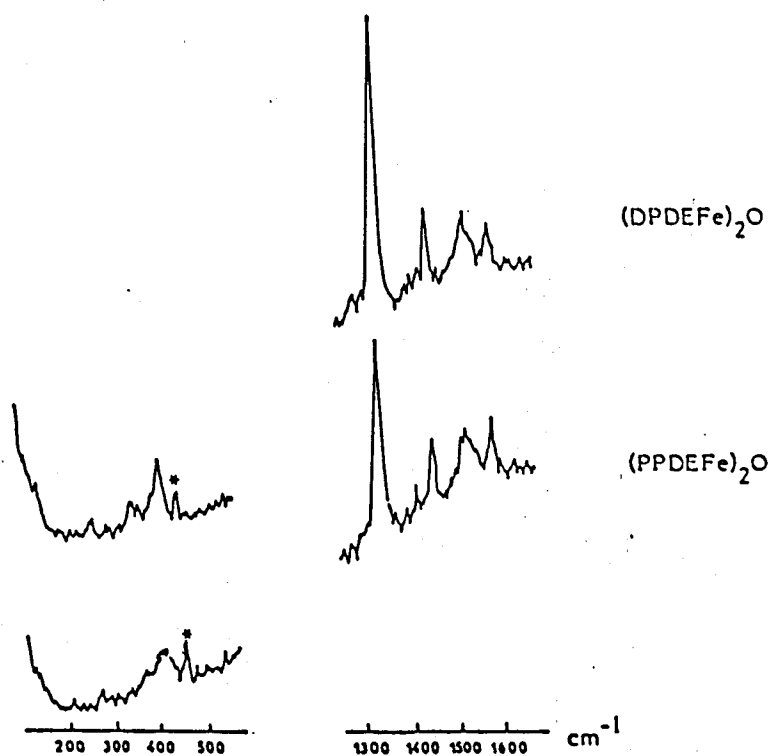


Figure 36 : Comparaison des spectres Raman de la $(PPDFe)_2O$ et de la $(DPDFe)_2O$ - $\lambda_o = 441,6\text{ nm}$ (* raie de K_2SO_4)

Cette étude comparative entre ces deux composés ne nous a pas permis de caractériser les modes des vinyles dont les deux raies caractéristiques se situent vers 1435 cm^{-1} ($\delta_s = \text{CH}_2$) et 1622 cm^{-1} ν_s (C=C) [59]. Ces raies ont une intensité très faible par rapport aux bandes du squelette porphyrinique et ne sont observées qu'en excitation B. [59]. La non observation de ces modes peut s'expliquer soit par l'oxydation locale des composés de la protoporphyrine IX en chlorine sous l'irradiation laser [79], soit à la faible participation des groupements vinyles dans le complexe μ -oxo à la délocalisation donc à la résonance.

La comparaison des spectres IR de la (PPDEFcCl) et de la $(\text{PPDEFc})_2\text{O}$ met en évidence une bande attribuable à ν_{as} (Fe-O-Fe) voisin de 895 cm^{-1} (figure 37).

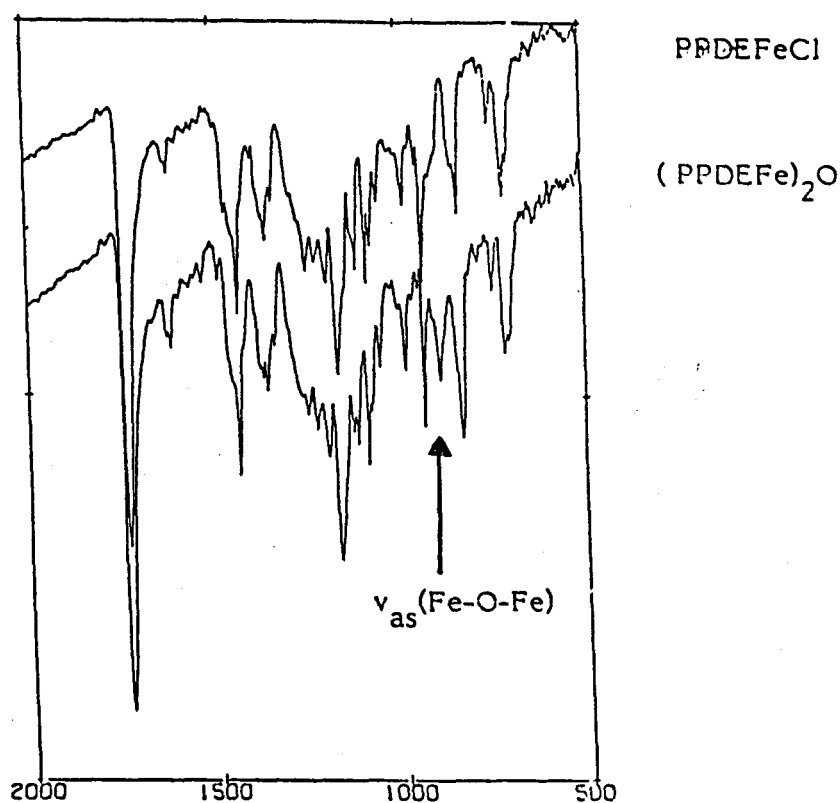


Figure 37 : Spectres IR de la PPDEFcCl et de la $(\text{PPDEFc})_2\text{O}$

La vibration asymétrique des composés présentant des groupements en position 2,4 volumineux (PPDE , MPDE , etc...) [80] est observée dans le domaine $885\text{-}930\text{ cm}^{-1}$ alors que dans la $(\text{DPDEFc})_2\text{O}$ elle se situe vers 842 cm^{-1} . Au

contraire, la vibration symétrique semble peu affectée par la nature du macrocycle. (PPDE, DPDE, ...) La variation observée pour les modes ν_{as} peut être attribuée à des interactions stériques créées par la substitution des positions 2-4, mais aussi dans une moindre mesure à un mélange d'isomères, lié à l'orientation mutuelle des macrocycles. Ce dernier effet est certainement à l'origine de la largeur anormale des bandes ν_s et ν_{as} de l'entité μ -oxo dans la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ par rapport à celles correspondantes de la TPP (l'orientation des deux unités porphyriques est déterminée par la présence des phényles).

En conclusion, notre analyse nous permet de caractériser une espèce μ -oxo de porphyrine de fer (DPDEF_e) par une bande à 416 cm^{-1} attribuable à ν_s (Fe-O-Fe) et une bande à 842 cm^{-1} attribuable à la déformation asymétrique, ν_{as} (Fe-O-Fe). Cette dernière est affectée par la substitution des positions 2,4, c'est pourquoi dans le cas d'un produit résultant de la dégradation de l'hémoglobine, il faudra s'attendre à observer cette raie à 895 cm^{-1} , caractéristique de la protoporphyrine IX, groupe prosthétique de l'hémoglobine.

3. Bandes indicatrices de structure

Les nombreuses études menées en spectroscopie Raman, ont permis de corrélérer de nombreux modes vibrationnels et des paramètres physico-chimiques de la porphyrine. En particulier, nous présenterons dans cette partie, les corrélations qui s'appliquent aux métalloporphyrines naturelles (c'est-à-dire de la famille des porphyrines substituées en 2 et 4 figure 1), dont les conclusions pourront s'appliquer à résoudre notre problème biologique. Cependant nous préciserons, quand il y a lieu, l'analogie qui peut être faite avec les molécules synthétiques porphyriques (TPP).

Deux types d'informations peuvent être extraits du spectre Raman d'une porphyrine de fer qui sont :

- le degré d'oxydation du fer.
- la dimension du coeur qui ne peut être dissociée de l'état de spin (et donc du nombre et de la nature des coordinaats axiaux).

a). L'état d'oxydation du fer

Le mode ν_4 polarisé observé de façon très intense par une excitation B, (figure 24) est attribuable à une élancement C_a-N et donc à une vibration de respiration du cycle. Les nombreuses données bibliographiques ont montré qu'il existait une dépendance importante entre le nombre d'onde de cette bande et le degré d'oxydation du métal qui se traduit de la manière suivante :

$$Fe^{II} \quad 1355 \text{ cm}^{-1} \qquad Fe^{III} \quad 1370 \text{ cm}^{-1} \qquad Fe^{IV} \quad 1380 \text{ cm}^{-1}$$

Les différences observées s'expliquent par l'interaction qui existe entre les orbitales $d\pi$ du métal et de l'orbitale e_g (π^*) du ligand porphyrinique. En effet, le Fe^{II} (d^6) possède un électron supplémentaire dans ses couches d par rapport au Fe^{III} (d^5) et par celà la rétrodonation du métal via ses orbitales $d\pi$ dans les orbitales e_g (π^*) de la porphyrine sera plus importante. L'augmentation de la densité électronique dans les orbitales e_g (π^*), qui sont antiliantes au niveau de la liaison C_a-N , se traduira par une diminution de la constante de force et donc un abaissement en fréquence.

Ainsi cette raie serait caractéristique de la densité électronique de l'orbitale e_g (π^*). Ce résultat est confirmé par l'obtention de données Raman récentes sur des radicaux anioniques ou cationiques. Par exemple, ν_4 est observé à 1379 cm^{-1} dans la CoOEP et à 1363 cm^{-1} dans $(CoOEP)^{\pm}$.

Cependant, le résultat énoncé précédemment est à moduler de la façon suivante. En effet, le mode ν_4 est observé vers 1370 cm^{-1} dans le cas d'une ferroporphyrine dans laquelle il y a un ligand axial π accepteur (CO , NO , O_2 , etc...). La présence de celui-ci, avec des orbitales π^* induit l'existence d'une compétition entre deux phénomènes, liée à une délocalisation électronique entre métal et ligand qui sont : un transfert $d\pi \rightarrow \pi^*$ (e_g) porphyrine et (ou) un transfert $d\pi \rightarrow \pi^*$ (ligand axial). La position du mode ν_4 , observé dans ces composés, indique que le deuxième phénomène est prépondérant.

Dans les composés de la DPDE, ce mode est observé à 1373 cm^{-1} et est caractéristique du degré d'oxydation Fe^{III} . De la même façon, ce mode est observé dans le spectre des dérivés TPP (tableau XV et figure 36) vers 1363 cm^{-1} . Une corrélation aussi précise que celle exposée précédemment ne peut être trouvée comme le démontre la figure 38.

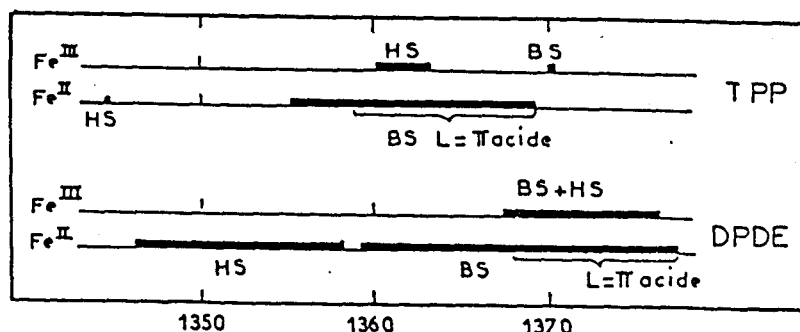


Figure 38 : Corrélation du mode ν_4 dans les porphyrines synthétiques (TPP) et naturelles (DPDE) [66]

On remarque que l'état de spin influe peu sur les dérivés naturels mais devient important dans les complexes de la TPP. On pourra juger de l'influence de ce paramètre par l'examen d'autres modes.

b). La taille du coeur porphyrrique

Les nombreux travaux menés en spectroscopie Raman, sur des porphyrines de fer de structures connues ont permis d'établir des relations entre d'autres modes vibrationnels et certaines données physicochimiques de la métalloporphyrine considérée. Le tableau suivant résume les observations qui découlent d'études systématiques [54,56,59].

ν_3	p	$C_a C_m$	Etat d'oxydation et de spin
ν_{10}	dp	$C_a C_m$	
ν_2	ap	$C_b C_b$	Etat de spin
ν_{19}	p	$C_a C_m$	
ν_{11}	dp	$C_b C_b$	Nature de la porphyrine

Les données rassemblées par la suite ont permis d'obtenir de très bonnes corrélations linéaires entre les modes de fréquences supérieures à 1450 cm^{-1} et la dimension du coeur porphyrrique, mesurée par la distance C_t-N [81]. La figure ci-dessous présente ces résultats pour différentes métalloporphyrines de fer de structure connue.

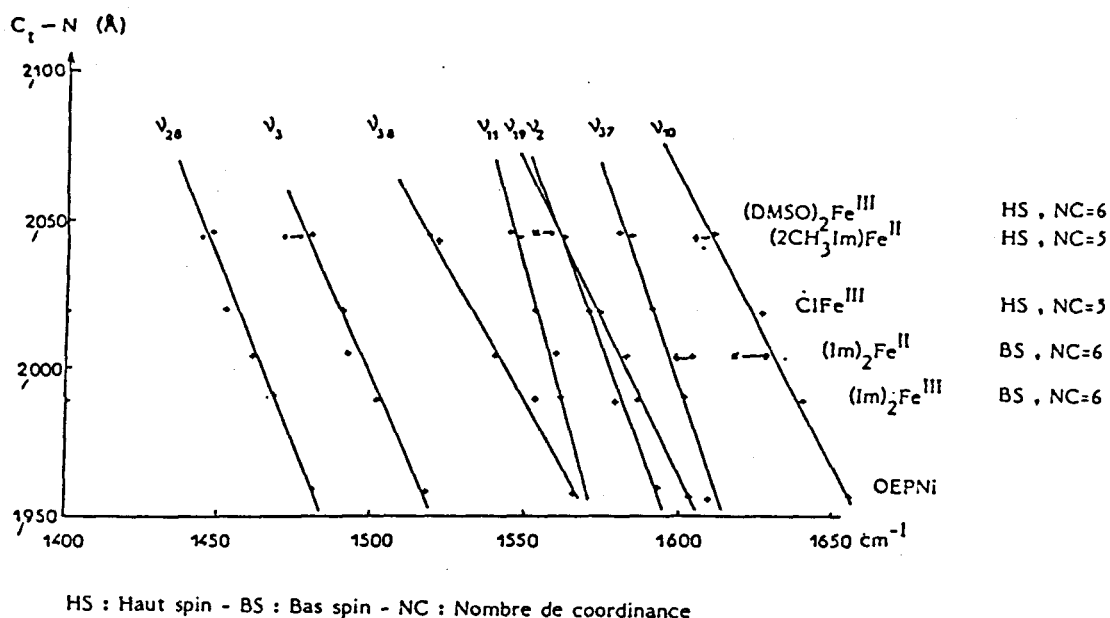


Figure 39 : Corrélation entre fréquences et taille du coeur porphyrique

Alors que l'examen de la position du mode ν_4 , permettra de déterminer l'état d'oxydation du fer, l'examen des modes de fréquences élevées permettra de déterminer la taille du coeur et par la même l'état d'oxydation et la coordinance du fer.

- Etat de spin

Selon l'état de spin, il est évident que le fer (Fe^{II} ou Fe^{III}) dans une configuration bas spin aura une taille peu importante. En effet dans ces composés, l'ion métallique aura ses orbitales d_{z^2} et $d_{x^2-y^2}$ vides et présentera une compacité électronique maximale. Au contraire, le passage à l'état haut spin se traduira par la présence d'un électron dans l'orbitale $d_{x^2-y^2}$ et donc d'une répulsion plus importante entre l'azote et le métal induisant une augmentation du coeur porphyrique. La dimension de la cavité porphyrique sera plus importante dans les dérivés haut spin (HS) que bas spin (BS).

L'examen de la figure 39 indique que ce phénomène est observé et se traduit par des variations en fréquences plus ou moins importantes. Toute variation du

coeur porphyrrique affectera essentiellement les liaisons C_a-C_m (pente de droite élevée) et dans une moindre mesure les liaisons C_b-C_b . Cependant, cet effet sera perturbé par la présence de ligands axiaux.

- nombre de coordination (NC)

La $PPFeCl$ et la $PPFe(DMSO)_2$ sont deux ferriporphyrines à l'état haut spin qui néanmoins présentent des distinctions très nettes en fréquences, liées à la présence des ligands axiaux. En effet, dans le cas d'un complexe hexacoordiné, l'atome de Fe se situera dans le plan du cycle porphyrrique (dimension du coeur maximale) alors que le cas d'un complexe pentacoordiné, l'atome de Fe se déplacera hors du plan (0,5 Å). Ce déplacement entraîne un moins bon recouvrement $d\pi - e_g (\pi^*)$ et se traduira par une contraction du cycle.

On observe des écarts aux corrélations dans le cas de la $2CH_3ImFe^{II}$ (voir → sur la figure 39). En effet, la structure du composé indique que les noyaux pyrroliques sont inclinés de 10° en direction de l'atome de fer et modifieront les liaisons C_a-C_m et donc principalement les modes ν_3 , ν_{10} et ν_{19} .

Nos résultats obtenus pour la $DPDEFcCl$ et la $(DPDEFc)_2O$ coïncident avec la dimension du coeur issu de l'hémine [7]. Notre étude confirme la structure de ces composés : Fe^{III} , haut spin. Il est à noter que seul le mode ν_{10} se retrouve systématiquement à un nombre d'onde inférieur dans le complexe μ -oxo par rapport au dérivé chloré (5 cm^{-1}). Cette légère déviation peut être attribuée à une orientation légèrement différente des noyaux pyrroliques.

De la même façon des corrélations analogues ont été faites pour les composés de la TPP [66,81,82]. Nos résultats confirment l'état de Fe^{III} et de structure HS dans nos complexes.

En conclusion, l'analogie structurale qui existe entre dérivé chloré et μ -oxo est évidente quelque soit la nature de la porphyrine considérée. Néanmoins notre étude sur la comparaison des composés μ -oxo de la TPP et de la DPDE indique une différence structurale très nette au niveau de la géométrie de la liaison μ -oxo. D'autre part, l'exaltation des modes symétriques de la liaison (Fe-O-Fe) dans ces composés est totalement différente et sera mis en évidence par l'étude des profils d'excitation.

4. Profils d'excitation

A partir de l'attribution des principaux modes de vibration actifs en diffusion Raman de résonance des composés μ -oxo de porphyrines de fer (III), il va être possible d'interpréter les profils d'excitation pour des longueurs d'onde excitatrices couvrant un large domaine spectral d'absorption électronique des composés. En effet, un profil d'excitation peut être obtenu pour chaque mode vibrationnel en reportant son intensité de diffusion en fonction de la longueur d'onde excitatrice. L'analyse des profils doit conduire à une interprétation plus fine des propriétés électroniques que les spectres d'absorption et en particulier des couplages, transition électronique - transition vibrationnelle.

De nombreux travaux font état de profils de métalloporphyrines et d'hémoprotéines, mais un nombre beaucoup plus restreint en donne une interprétation quantitative raisonnable. Ces derniers travaux, qui représentent un effort considérable pour établir des modèles théoriques de couplages vibroniques, d'interférences, etc... (Mortenser - O. Hamogone), concernent particulièrement le ferrocyclochrome C et l'oxyhémoglobine, mais en aucune façon les composés polymétalliques des porphyrines.

Les profils d'excitation des principaux modes RR ont été obtenus avec toutes les radiations disponibles expérimentalement pour les composés bimétalliques $(TPPFe)_2O$ et $(DPDEFer)_2O$ ainsi que des composés monométalliques correspondants $(TPPFe)Cl$ et $(DPDEFer)Cl$. Compte tenu du nombre limité de raies excitatrices pour le domaine de longueur d'onde étudié, nous nous sommes limités à une interprétation qualitative des profils des modes du macrocycle à partir d'un travail préliminaire de T.G. Spiro et coll. sur la $(TPPFe)_2O$. Toutefois, nous avons porté une attention particulière aux profils des modes ν_s (Fe-O-Fe) et ν_{as} (Fe-O-Fe) avec comme souci principal l'obtention de modèles pour l'élucidation de la structure moléculaire du "pigment malarique" dans son environnement biologique.

a). Profils d'excitation des modes du macrocycle

La quasi identité des fréquences vibrationnelles des modes de la porphyrine entre les composés $(TPPFe)Cl$ et $(TPPFe)_2O$ (tableau XV) d'une part et entre les

composés (DPDEF_e)Cl et (DPDEF_e)₂O (tableau XVI) d'autre part, indique que les propriétés électroniques et vibrationnelles des états fondamentaux des entités macrocycliques sont analogues dans les composés monométalliques et bimétalliques correspondants. Les interactions entre les deux unités porphyrines de fer (III) par l'intermédiaire du pont μ -oxo sont donc peu importantes à l'état fondamental. Cette faible interaction apparente à l'état fondamental ne préjuge en rien des interactions à l'état excité qui pourront être estimées dans les composés μ -oxo à partir de l'analyse comparative des spectres d'absorption électronique et des profils de résonance avec ceux des composés monométalliques correspondants.

L'intensité de la diffusion Raman $I_d(\bar{\nu}_0)$ à partir d'une radiation excitatrice $\bar{\nu}_0$ d'intensité I_0 et pour une radiation diffusée $\bar{\nu}_d$, est proportionnelle à l'expression suivante :

$$I_d(\bar{\nu}_0) \approx I_0 \bar{\nu}_d^4 \sum_{\rho, \sigma} E_{0\rho} \alpha_{\rho\sigma} E_{d\sigma}^2$$

avec $\bar{\nu}_d = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_v$, $\bar{\nu}_v$ nombre d'onde de la transition vibrationnelle $0 \rightarrow 1$ à l'état électronique fondamental, $E_{0\rho}$ le champ électrique excitateur, $E_{d\sigma}$ champ électrique diffusé. $\alpha_{\rho\sigma}$ est un élément du tenseur de diffusion, ρ et σ se réfèrent au système d'axes x , y , z de l'édifice moléculaire.

La dépendance de l'intensité diffusée en fonction de $\bar{\nu}_0$ se retrouve dans deux facteurs ; $\bar{\nu}_d^4$ qui est la loi classique de la diffusion, mais également pour le RR dans l'expression des éléments $\alpha_{\rho\sigma}$ du tenseur de diffusion.

Des expressions théoriques de $\alpha_{\rho\sigma}$ sont données dans de nombreux ouvrages [83] et mises au point bibliographiques [84,85], leur complexité dépend de la nature du problème traité : interaction de configuration, couplages vibroniques, transitions non adiabatiques, interférences, etc... Les éléments du tenseur de diffusion RR peuvent être considérés comme la somme de deux contributions dépendantes de $\bar{\nu}_0$ appelées couramment A et B. L'analogie quant à l'allure générale des profils d'excitation des spectres d'absorption électronique et des taux de dépolarisation des modes du macrocycle pour tous les composés étudiés avec les résultats publiés pour le ferrocyclochrome C [86] et de l'oxyhémoglobine [87] permet de transférer les principales conclusions de ces derniers à notre étude. En particulier les tenseurs des modes A_{1g} , B_{1g} , B_{2g} et A_{2g} ont des expressions analogues.

$$\begin{array}{cc}
 A_{1g} \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{xx} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & A_{2g} \begin{bmatrix} 0 & -\alpha_{yx} & 0 \\ \alpha_{yx} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \\
 \\
 B_{1g} \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & -\alpha_{xx} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & B_{2g} \begin{bmatrix} 0 & \alpha_{yx} & 0 \\ \alpha_{yx} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}
 \end{array}$$

Le cas le plus caractéristique est l'antisymétrie du tenseur associé au mode A_{2g} qui confère à ce mode un taux de dépolarisation anormal $\rho \sim \infty$.

Le modèle à quatre orbitales de configuration a_{1u} , a_{2u} et e_g développé dans le chapitre (II) permet de rendre compte des caractéristiques principales des profils d'excitation des modes des porphyrines en considérant une symétrie locale D_{4h} . Dans le cas des métalloporphyrines une excitation au voisinage de la bande B (Soret) provoque une diffusion Raman de résonance exprimée principalement par le terme A des éléments $\alpha_{\rho\sigma}$. Les bandes Raman A_{1g} sont alors exaltées sélectivement, il est à signaler toutefois que les modes B_{1g} et B_{2g} peuvent participer à la diffusion par effet Jahn-Teller, cet effet est en outre intimement lié à l'interaction de configuration (Chapitre II). Une excitation à une longueur d'onde voisine des absorptions Q (α , β) provoque principalement une diffusion Raman de résonance exprimée par le terme B des éléments du tenseur. Le terme B exprime principalement la diffusion relative aux modes de vibration qui couplent (vibroniquement) les transitions B et Q c'est-à-dire B_{1g} , B_{2g} et A_{2g} et dans un degré moindre A_{1g} .

Le mode A_{2g} couple les composantes B_x et B_y de la transition B ($E_u + A_{1g}$) avec les composantes Q_y et Q_x de la transition Q ($E_u + A_{1g}$) respectivement.

$$(a_{1g}0 | [A_{1g}] | \begin{array}{l} x \\ y \end{array} \begin{array}{l} | Q_x \rangle_{0-0} \langle Q_x |_{0-0} \\ | Q_y \rangle_{0-0} \langle Q_y |_{0-0} \end{array} \begin{array}{l} -a_{0-0}y \\ a_{0-0}x \end{array} \rightarrow | A_{1g} \rangle | a_{2g}1)$$

Les notations $|]$ et $|)$ sont relatives respectivement aux espaces électroniques et vibrationnels [84].

Tous les phénomènes qui compliquent l'interprétation des profils d'excitation, à savoir, interaction de configuration, couplage vibronique, transition non adiabatique, interférences électronique et vibrationnelle perturbent beaucoup les intensités relatives des maxima mais très peu les longueurs d'onde de ceux-ci sur les profils.

Les profils d'excitation des modes vibrationnels les plus caractéristiques des spectres RR du composé de $(TPPFe)Cl$ sont représentés sur la figure 40 avec le spectre d'absorption électronique. Curieusement aucune étude complète en RR n'existe pour le composé $(TTPFe)Cl$ alors que des études préliminaires existent pour $(TTPFe)_2O$ qui est souvent comparé avec $(TPPCr)Cl$. Les longueurs d'onde excitatrices disponibles expérimentalement permettent de couvrir les différentes bandes d'absorption B et Q (α , β).

D'une façon générale, les profils indiquent que les maxima d'absorption à 420 nm (23800 cm^{-1}) et 510 nm (19607 cm^{-1}) des spectres électroniques correspondent respectivement aux bandes B (0,0) et Q (0,1). La bande Q (0,0) est localisé à 530 nm (18870 cm^{-1}); cette bande très peu intense apparaît comme un simple épaulement sur le spectre électronique. Le profil du mode anormalement polarisé A_{2g} à 1333 cm^{-1} est peu exalté dans les excitations B et Q et n'a pas été représenté sur la figure 40. Le mode dépolarisé B_{1g} à 1496 cm^{-1} apparaît particulièrement dans la région Q (0,0). Les modes polarisés A_{1g} à 1555, 1364 et 391 cm^{-1} sont fortement exaltés comme prévu dans la région B (0,0). De plus, ces profils présentent des maxima dans la région Q (0,0) et Q (0,1) avec des intensités voisines qui peuvent indiquer un faible couplage vibronique par l'intermédiaire d'un mode A_{1g} . Il est à signaler que le trop faible nombre de points ne permet pas de donner une estimation des fréquences à l'état excité pour les modes A_{1g} et B_{1g} par la mesure de la différence de nombre d'onde entre Q (0,0) et Q (0,1) sur les profils

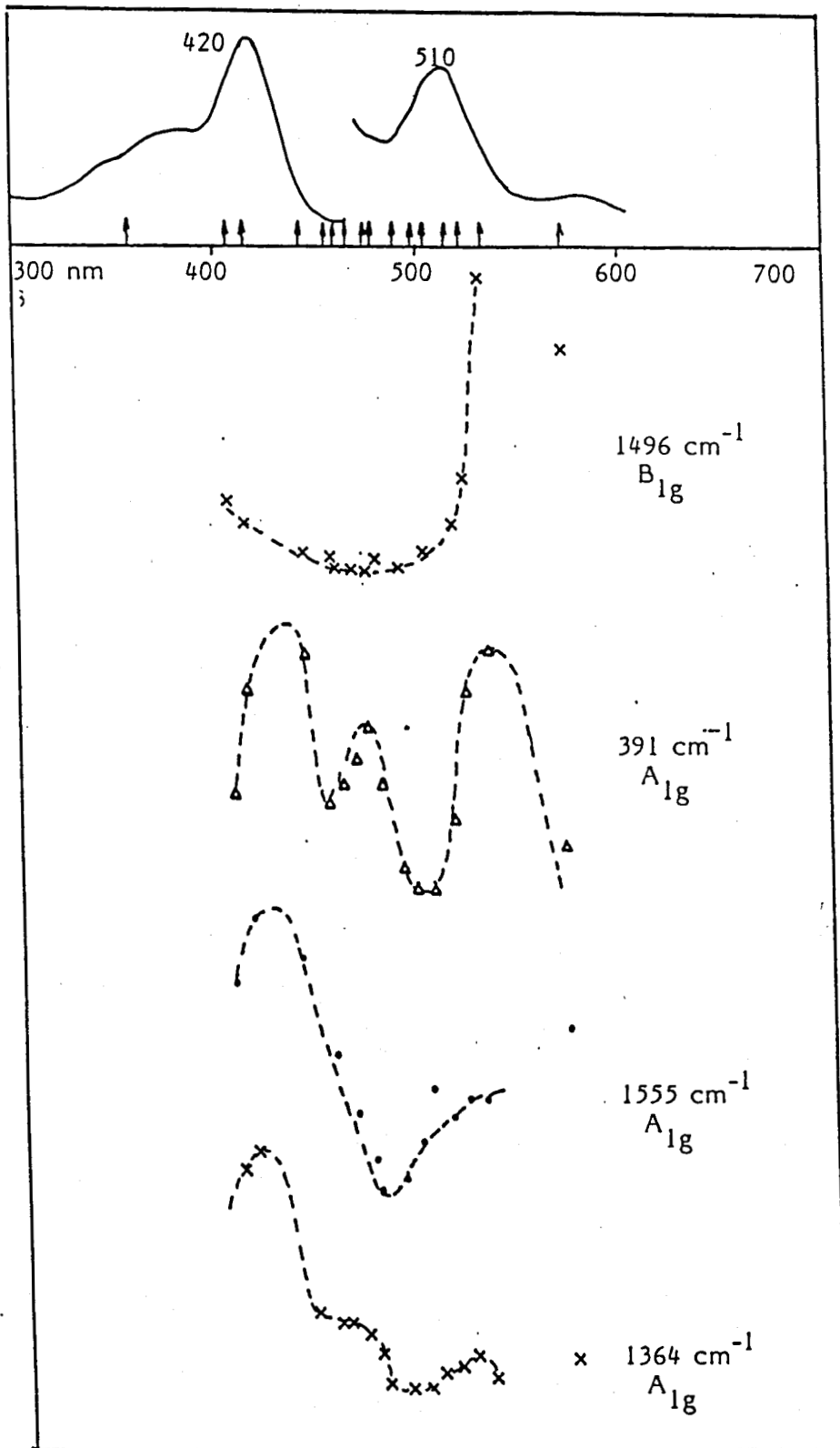


Figure 40 : Profils d'excitation de certains modes de TPPeCl

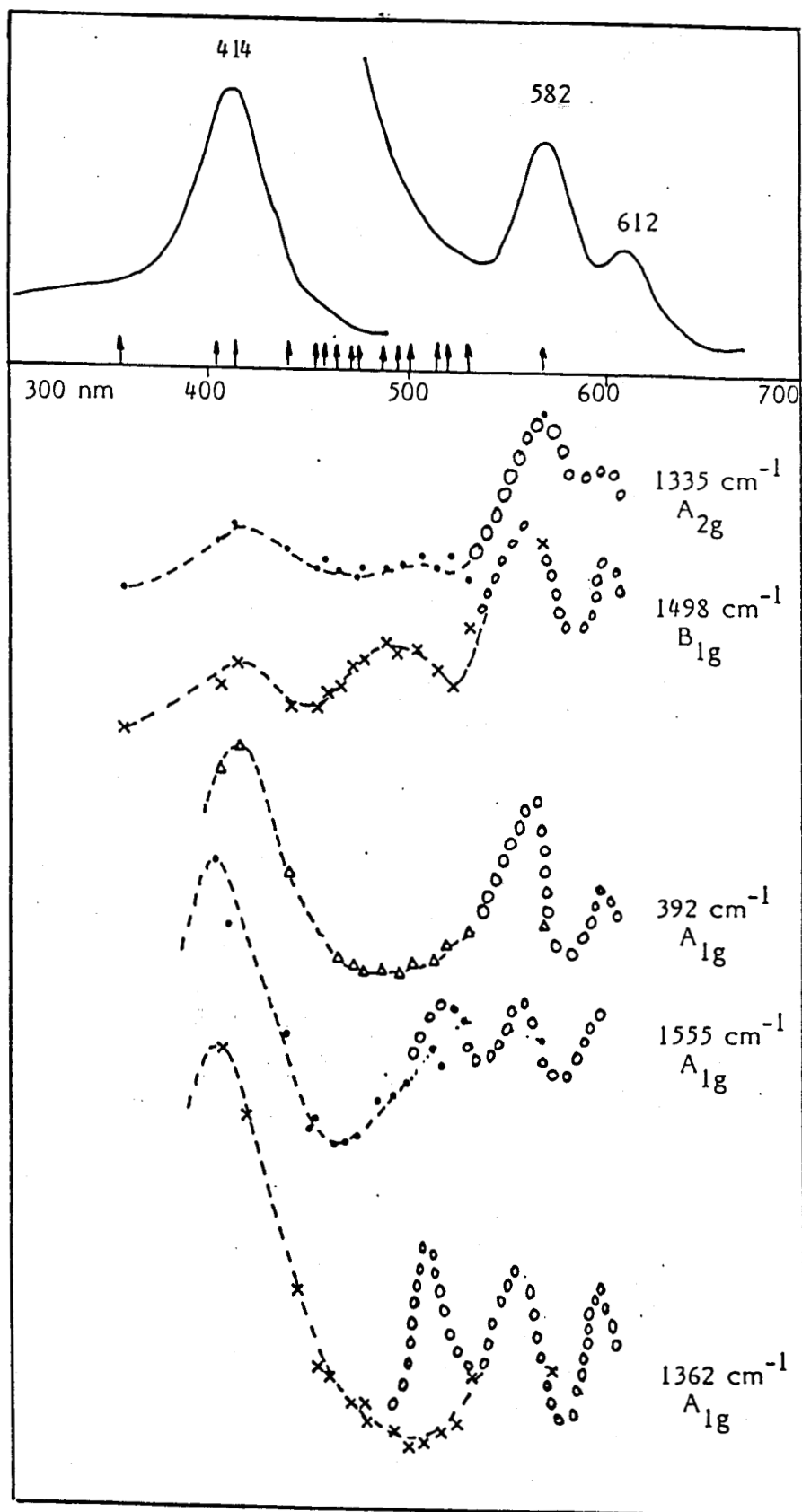


Figure 41 : Profils d'excitation de certains modes de $(\text{TPPFe})_2\text{O}$

(o : référence [63])

d'excitation. Le maximum observé sur le profil du mode A_{1g} à 390 cm^{-1} vers 480 nm ne correspond à aucune progression vibrationnelle raisonnable et peut être issu d'une absorption électronique peu intense vers 480 nm . Ce caractère est moins marqué pour les autres modes A_{1g} .

L'analyse des profils d'excitation du composé $(TTPFe)_2O$ a été effectuée d'une façon très détaillée en excitation Q par T.G. Spiro et coll. [63]. Nous avons complété les profils d'excitation dans la zone de la bande B (figure 41). Les résultats sont en première approximation, ceux attendus, les modes A_{1g} sont exaltés par excitation B (0,0) alors que les modes A_{2g} et B_{1g} sont plus intenses en excitation Q (0,0), Q (0,1) et Q (0,2). La structure des bandes d'absorption électronique du composé $(TTPFe)_2O$ est donc vérifiée, B (0,0) à 414 nm (24155 cm^{-1}), Q (0,0) à 612 nm (16340 cm^{-1}), Q (0,1) et Q (0,2).

Les profils d'excitation des modes A_{1g} ($1372, 1490\text{ cm}^{-1}$) du composé $(DPDFe)Cl$ présentent une exaltation intense par une excitation B (figure 42). L'exaltation du mode B_{1g} à 1626 cm^{-1} est peu importante pour les longueurs d'onde excitatrices au voisinage de la bande B. Comme prévu, un résultat inverse est observé en excitation Q, toutefois, le couplage vibronique permet d'activer le mode A_{1g} à 1374 cm^{-1} . La progression vibrationnelle Q (0,0) et Q (0,1) est mise en évidence pour la plupart des modes étudiés et est en accord avec le spectre d'absorption électronique B (0,0) à 400 nm (25000 cm^{-1}) et B (0,1) à 375 nm (26660 cm^{-1}), Q (0,0) à 530 nm (18880 cm^{-1}) et Q (0,1) à 500 nm (20000 cm^{-1}).

L'analyse des profils d'excitation du composé $(DPDFe)_2O$ ne permet pas de vérifier la progression vibrationnelle des spectres électroniques (figure 43). Néanmoins, nous avons pu vérifier que les modes A_{1g} sont très intenses en excitation B alors que les modes B_{1g} et A_{2g} sont exaltés essentiellement par un processus vibronique en excitation Q.

L'approximation de la symétrie locale D_{4h} pour l'entité porphyrine permet de rendre compte des principaux résultats, néanmoins un écart à cette symétrie idéale peut entraîner une levée de dégénérescence des états Q et B qui n'a pu être caractérisée.

Bien que le spectre d'absorption électronique des composés de la protoporphyrine-

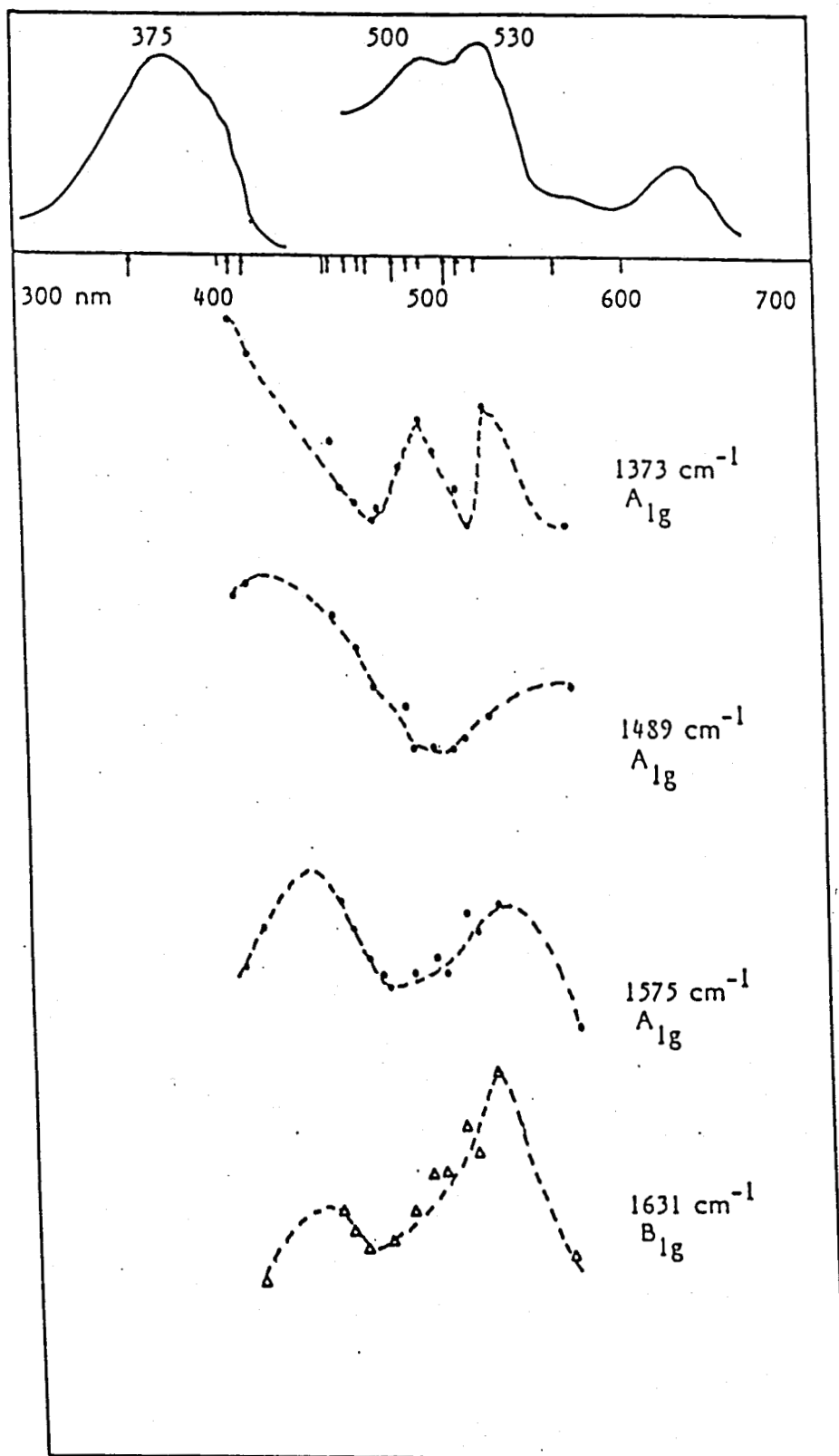


Figure 42 : Profils d'excitation de certains modes de DPDEFcI

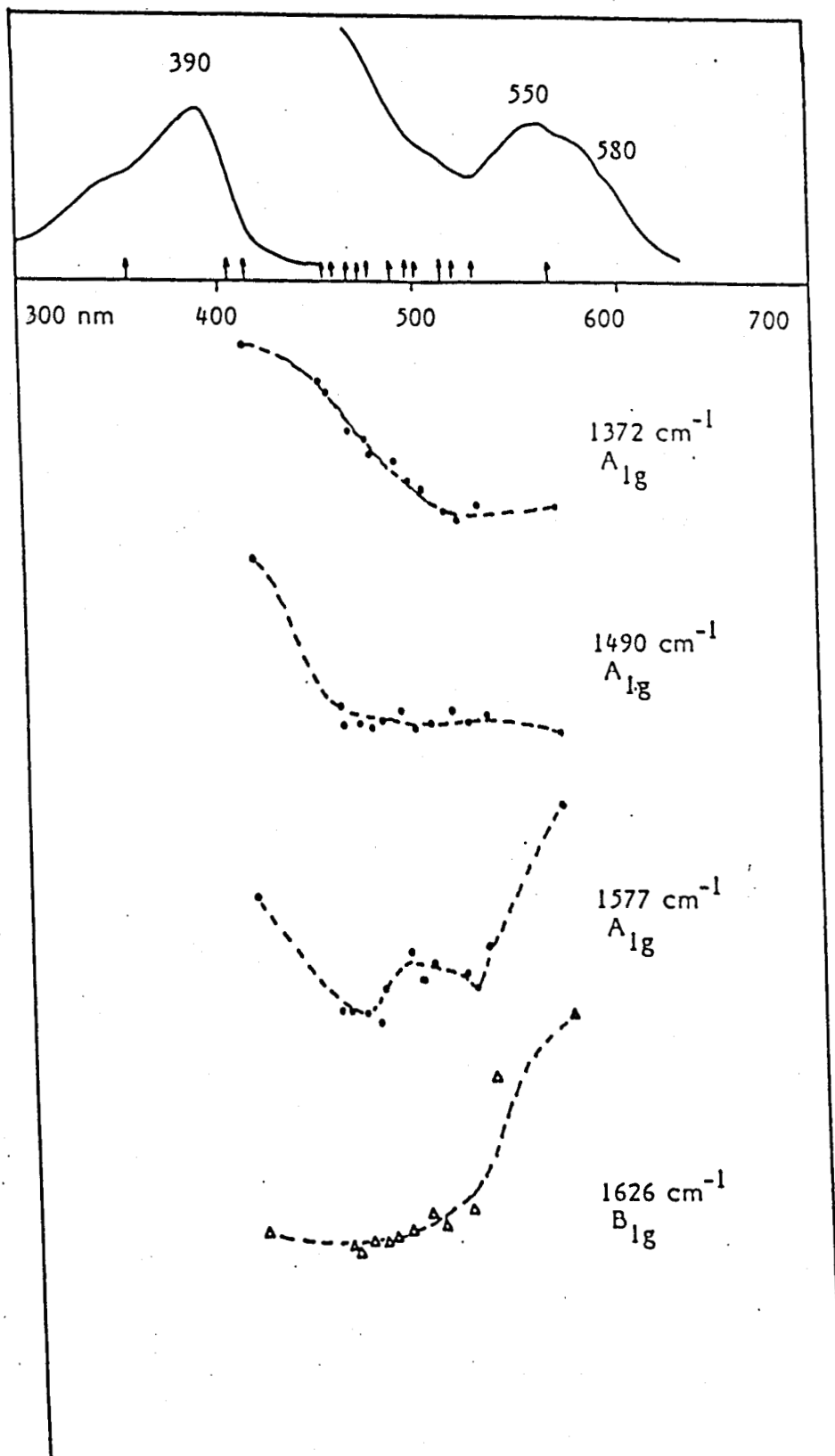


Figure 43 : Profils d'excitation de certains modes de $(DPDFe)_2O$

rine présente une différence d'environ 10 nm avec ceux de la deutéroporphyrine (DPDE) les résultats obtenus en RR pour $(PPDEF\text{e})_2\text{O}$ sont transposables directement au composé $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ quant aux excitations B et Q. Le cas de $(TPPFe)_2\text{O}$ apparaît donc comme un cas particulier.

b) Profils d'excitation des modes du pont μ -oxo

L'analogie des systèmes structuraux pour $(TTPFe)_2\text{O}$ et $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ devrait conduire à une similitude des propriétés électroniques. Or une différence fondamentale est constatée au simple examen de l'allure des profils d'excitation des modes ν_s (Fe-O-Fe) et ν_{as} (Fe-O-Fe) pour les deux composés (figure 44).

Pour le composé $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$, les modes ν_s et ν_{as} sont exaltés d'une même façon par une excitation B alors que la diffusion RR est négligeable pour ces modes par excitation Q. Un résultat inverse est constaté pour le composé $(TPPFe)_2\text{O}$. En effet, le mode ν_s est exalté de façon spectaculaire par excitation Q alors que son intensité reste tout à fait négligeable par excitation B. Le mode ν_{as} apparaît faible tant en excitation B qu'en excitation Q et son profil est inexploitable.

Des travaux antérieurs sur $(TTPFe)_2\text{O}$ ainsi que sur $(TTPFe)_2\text{N}$ et $(TTPFe)_2\text{C}$ proposent des interprétations sur l'intensité Raman des modes de vibration des ligands axiaux pontants μ , O, N et C [63,64,65]. L'excitation d'une bande de transfert de charge voisine de la bande Q, transfert de charge ligand axial \rightarrow métal ou métal \rightarrow ligand axial serait la cause de l'exaltation du mode ν_s pour le composé $(TPPFe)_2\text{O}$. Cette explication paraît improbable compte tenu du profil d'excitation ν_s qui suit le contour de la progression vibrationnelle $Q(0,0)$ et $Q(0,1)$. La coïncidence de la bande $Q(0,1)$ et de la bande de transfert de charge dans cette zone de longueur d'onde paraît suspecte eu égard au degré d'oxydation du fer III et aux résultats obtenus sur le composé $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$.

Une autre explication a été proposée, l'intensité apparemment anormale du mode ν_s (Fe-O-Fe) dans $(TPPFe)_2\text{O}$ aurait pour cause une interaction de résonance vibrationnelle entre un mode de la porphyrine exalté exclusivement en bande Q et le mode ν_s . Cette hypothèse peut être levée en utilisant la substitution $^{16}\text{O} \rightarrow ^{18}\text{O}$ qui supprime théoriquement la résonance vibrationnelle impliquant le mode

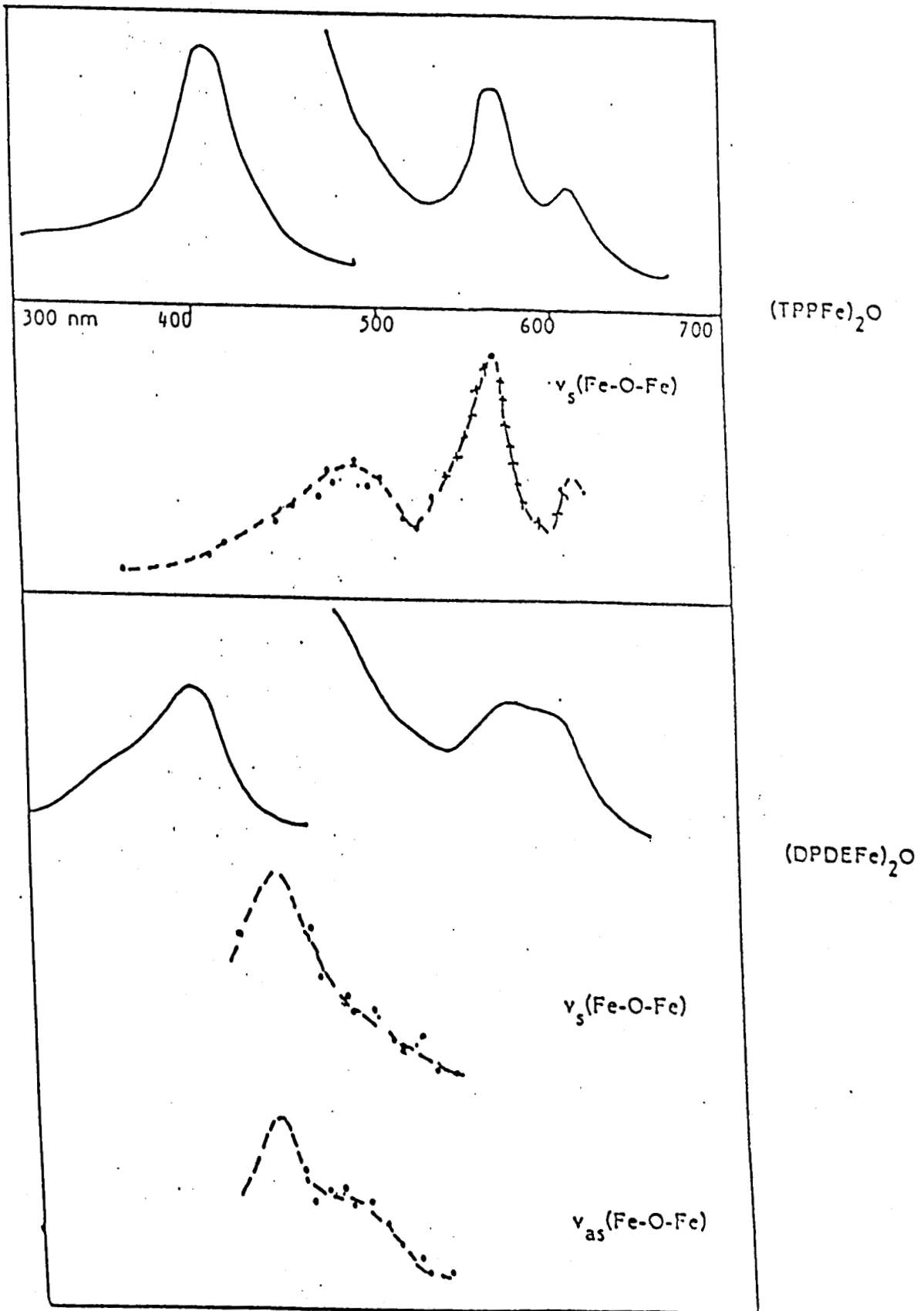


Figure 44 : Profils d'excitation des modes μ -oxo . (+ référence [63])

$\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$. Or, aucune modification significative autre que les glissements en fréquence ν_s et ν_{as} (Fe-O-Fe) n'est observée, il est à signaler toutefois un changement dans l'intensité relative des modes à 390 cm^{-1} et ν_s à 363 cm^{-1} lors de l'échange isotopique dont nous n'avons pu donner une interprétation cohérente à ce phénomène.

L'hypothèse de la symétrie locale idéale D_{4h} ou C_{4v} pour l'entité macrocyclique et C_{2v} pour le pont μ -oxo ne permet pas d'interpréter valablement les propriétés des composés μ -oxo $(\text{TTPFe})_2\text{O}$ et $(\text{DPDEF})_2\text{O}$ il faut donc considérer la symétrie réelle du complexe bimétallique dans sa totalité. Celle-ci est au mieux D_{2d} , C_s ou C_1 .

Le diagramme des orbitales moléculaires de porphyrine de fer II en symétrie locale D_{4h} et C_{4v} est donné sur la figure 45 selon le travail publié par Tatsumi et Hoffmann [77]. Un simple écart du métal hors du plan peut provoquer une inversion des niveaux. Ce diagramme est à comparer à celui donné par les mêmes auteurs pour des composés μ -oxo du fer III pour deux types de symétrie D_{2d} et C_s (figure 46). Les calculs d'orbitales moléculaires montrent que l'énergie est minimale pour un angle Fe-O-Fe d'environ 150° . Toutefois ce minimum est très large et permet d'envisager que des contraintes stériques peuvent induire un angle de 180° ce qui est effectivement observé par radiocristallographie pour $(\text{TTPFe})_2\text{O}$ $\theta = 174.5^\circ$.

Pour le composé $(\text{DPDEF})_2\text{O}$ un angle Fe-O-Fe proche de 160° est suggéré par l'étude spectroscopique au début de ce chapitre. Cette différence de structure est à notre avis la cause des allures ν_s et ν_{as} (Fe-O-Fe) dans les composés $(\text{TTPFe})_2\text{O}$ et $(\text{DPDEF})_2\text{O}$. Les variations les plus importantes dans les niveaux énergétiques entre les symétries D_{2d} et C_s concernent les niveaux e_3 et e_1 mais entraînent toutefois des mixages entre les différents niveaux qui dépendent exclusivement de leurs énergies. Il est donc concevable qu'une différence structurale dans le pont μ -oxo entraîne des mixages différents quant aux configurations électroniques impliquées dans les transitions appelées B et Q. Les différents mixages entraînent des participations différentes du ligand axial μ -oxo aux niveaux issus des niveaux a_{1u} , a_{2u} et e_g (non représentés sur la figure 46) impliqués dans les transitions B et Q.

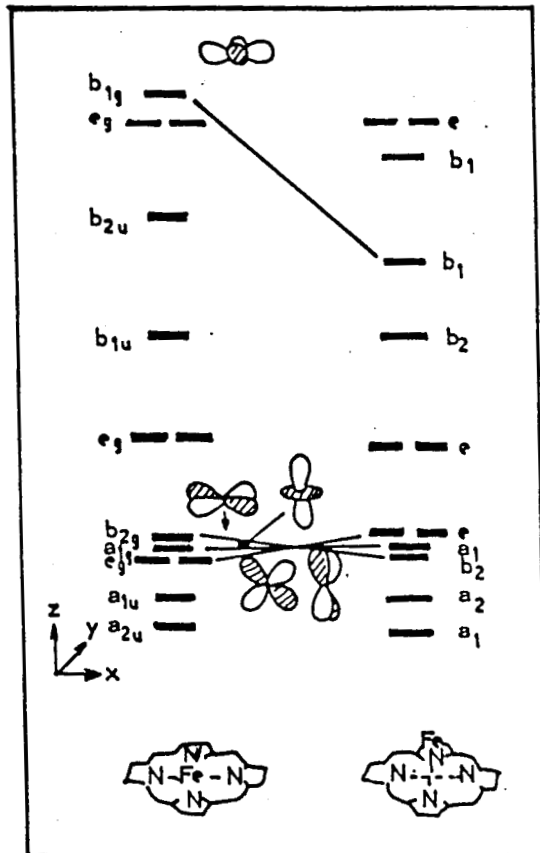


Figure 45 : Niveaux d'énergie des orbitales moléculaires dans une porphyrine de Fe^{II} . (D'après référence [77]).

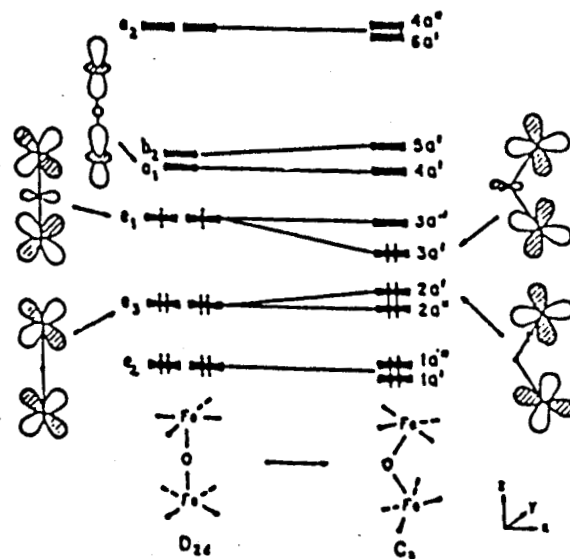
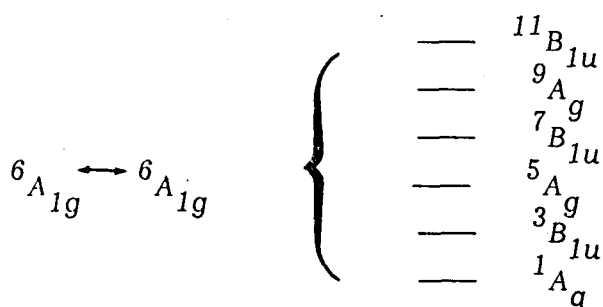


Figure 46 : Influence de l'angle θ sur les orbitales moléculaires d'un complexe μ -oxo de Fe : (D'après référence [77]) .

c). Interactions entre les deux entités porphyrines par le pont μ -oxo

Il est aisé de constater que les interactions électroniques et vibrationnelles entre les deux entités porphyrines sont faibles à l'état fondamental par la simple comparaison entre les fréquences vibrationnelles des modes actifs en RR du composé TPPFeCl et DPDEFcCl avec celles des composés (TTPFe)₂O et (DPDEFc)₂O respectivement. Toutefois une interaction antiferromagnétique spin-spin à l'état fondamental transmise par le pont μ -oxo des deux ions Fe³⁺ est mise en évidence par des mesures magnétiques à l'état solide et par des mesures de RMN en solution. L'état fondamental ${}^6A_{1g}$ de multiplicité de spin ($2S+1=6$, $S=5/2$) se couple à un autre état fondamental ${}^6A_{1g}$ pour donner 6 états dans le composé bimétallique.



qui sont peuplés selon la température et selon leur séparation en énergie. Dans le composé (TTPFe)₂O la différence d'énergie entre le niveau 1A_g et ${}^3B_{1u}$ a été trouvée de 265 cm^{-1} [87].

Cette interaction spin-spin antiferromagnétique qui n'est pas négligeable est toutefois peu ressentie au niveau des fréquences de vibration du macrocycle. La spectroscopie d'absorption électronique et les profils de RR permettent quant à elles d'estimer les différences entre les interactions à l'état fondamental A_{1g} et les interactions dans les états excités E_u transmises par le pont μ -oxo. C'est un problème compliqué qui peut toutefois être abordé pour les états excités par une démarche analogue à celle sommairement décrite pour l'état fondamental. Elle implique nécessairement une étude à température variable [88]. Il n'était pas dans notre intention d'aborder une telle étude mais de montrer plutôt la complexité des systèmes que l'on peut avoir à étudier en chimie bioinorganique. Néanmoins, on peut constater à l'examen des spectres UV-visible et des profils d'excitation des composés monométalliques d'une part et des composés polymétalliques d'autre part,

que les bandes B et Q peuvent être indicatrices des différences d'interactions entre les états fondamentaux et excitoniques, toutefois leur interprétation reste sujette à caution [71].

Une étude récente d'absorption électronique après excitation picoseconde ne permet pas de mettre en évidence les spectres d'absorption des états excités singulets invoqués dans ce travail mais plutôt des espèces issues de la conversion de l'état excité initial [90].

L'étude spectroscopique sur les composés μ -oxo des porphyrines de fer III montrent que les fréquences Raman des modes de vibration du macrocycle sont surtout caractéristiques de la nature de la métalloporphyrine mais ne permettent pas l'identification de l'espèce moléculaire. La présence de ligands axiaux peut être déterminée soit par l'observation de mode de vibration actif en RR propre aux ligands mais aussi par l'analyse des intensités relatives des modes du macrocycle en fonction de la longueur d'onde excitatrice.

Les fréquences et l'intensité relative des bandes RR peuvent être utilisées comme sondes pour identifier les espèces chimiques possédant un chromophore au sein d'une matrice non absorbante.

En particulier, les résultats obtenus sur des composés modèles pourraient permettre l'identification de composé μ -oxo de porphyrine dans des échantillons inconnus. Une illumination de l'échantillon par une radiation laser proche de l'absorption correspondant à la bande B (Soret) devrait permettre l'exaltation des modes ν_s et ν_{as} des liaisons μ -oxo conjointement avec ceux du macrocycle. Il est à signaler que les études sur les composés modèles ont été effectuées à l'aide d'une cellule tournante qui évite une dégradation photochimique sous l'impact laser ; une dismutation rapide a été observée sous irradiation pulsée pour $(TPPFe^{III})_2O$ en $Fe^{III} TPP=O$ et $Fe^{II} TPP$ [89]. Dans la suite de ce travail consacré à des microéchantillons biologiques et chimiques sous irradiation permanente en lumière focalisée, notre principal souci a été la non destruction du microéchantillon sous l'impact laser. Les précautions expérimentales utilisées sont développées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR MICROSPECTROMETRIE RAMAN

<u>I - ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR SPECTROMETRIE RAMAN.</u>	141
1. <u>Le problème d'une telle analyse</u>	141
2. <u>Spectre Raman du pigment malarique</u>	143
a). <u>Contraintes et précautions expérimentales</u>	143
b). <u>Les résultats</u>	144
1.b). <u>Spectres Raman des hématies</u>	146
2.b). <u>Spectres Raman du pigment malarique</u>	147
<u>II - ETUDE D'UN MODELE D'ASSOCIATION DE PORPHYRINES</u>	
<u>EN MILIEU AQUEUX</u>	152
1. <u>Principe de ce modèle</u>	152
2. <u>Analyse d'une bille de gel par microspectrométrie Raman</u>	154
<u>III - LA STRUCTURE DU PIGMENT MALARIQUE</u>	158

Le développement du parasite, responsable du paludisme, dans le globule rouge se fait au dépend du constituant majeur de cette cellule : l'hémoglobine. La dégradation de cette molécule conduit à la formation de grains (taille moyenne 0,2 μ m) à apparence cristalline à l'intérieur du parasite, désigné par le terme pigment malarique. Celui-ci est facilement identifiable par un simple examen en microscopie. Il se traduit par la présence de grains noirs sur un frottis d'hématies parasitées.

La spectroscopie Raman, associée à des radiations excitatrices visibles, ne nous apportera des informations que sur le chromophore absorbant dans le visible (effet de résonance). Bien que la structure du pigment malarique ne soit pas connue à ce jour, la ferriprotoporphyrine IX est proposée comme constituant majeur de celui-ci. Ainsi, l'existence simultanée du pigment malarique et de l'hémoglobine, possédant peut-être le même chromophore, a nécessité la prise de précautions afin de s'assurer que le spectre RR de l'un n'interfère pas avec celui de l'autre. Cet impératif nous a obligé à utiliser un mode opératoire assurant une contamination faible du pigment malarique par l'hémoglobine et une méthode de "purification" conservant son intégrité structurale.

II - ETUDE DU PIGMENT MALARIQUE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN

1. Le problème d'une telle analyse

Le pigment malarique est le résultat de la dégradation enzymatique de l'hémoglobine par le parasite. Les seules données qui existent dans la littérature ont été obtenues après de nombreuses réactions chimiques. En particulier, l'extraction du pigment et l'application de traitements chimiques (acidification, démétallation) permettent de mettre en évidence la présence de fer (sous forme ferrique) et d'isoler en quantité variable la protoporphyrine IX [91]. Ce résultat semble logique car d'une part le groupement prosthétique de l'hémoglobine est la protoporphyrine IX de fer et que de telles réactions ne peuvent conduire qu'au dérivé ferrique. Nous avons eu pour objectif dans cette étude de nous rapprocher le plus près de l'état in vivo.

En effet, si la même métalloporphyrine est impliquée simultanément dans la structure du pigment malarique et de l'hémoglobine, l'analyse in vivo devient difficilement envisageable à cause de l'interférence susceptible de se présenter entre le spectre Raman de l'hémoglobine et celui du pigment malarique. D'autre

part, le fait que le pigment malarique se situe à l'intérieur du globule rouge (taille voisine de 7 μm , épaisseur voisine de 1 μm) dans lequel coexiste un (ou plusieurs) parasite(s) accentue la difficulté de l'analyse *in vivo*. Cependant la spectroscopie Raman permet de contourner cette dernière difficulté. En effet, les protéines ont généralement un spectre dans le domaine de l'absorption UV et donc seule l'utilisation de radiations excitatrices U.V. permettrait d'obtenir des informations sur celles-ci [92]. Notre étude a été réalisée en n'utilisant que des radiations excitatrices visibles et c'est pourquoi les spectres Raman présentés dans ce chapitre ne seront que des spectres du chromophore visible et donc de la métalloporphyrine impliquée dans le phénomène de résonance. Les informations sur la (les) protéine(s) seront contenues dans le spectre Raman seulement si celle(s)-ci induit(sent) des changements structuraux et (ou) électroniques sur la métalloporphyrine (ex : liaison Fe - protéine via l'imidazole de l'histidine proximale, changement de coordinance (5 \rightarrow 6) lors de la fixation d'oxygène)

Pour pallier à ces difficultés, nous avons choisi de travailler sur le pigment libéré lors de cultures *in vitro* de parasites. En effet, le développement normal du parasite dans le globule rouge conduit à une multiplication du parasite dans cette cellule (en moyenne formation de 8 à 10 cellules filles) et à un éclatement du globule rouge pour libérer ces cellules dans la circulation sanguine. Au cours de ce processus, le parasite accumule le pigment malarique à l'intérieur du globule rouge dans une vacuole délimitée par une membrane, et celle-ci se retrouve ensuite dans la circulation sanguine. Il est relativement aisé de récupérer cette structure à partir des boîtes de culture du parasite et de l'utiliser comme substrat d'étude, après décantation, centrifugation et lavage à l'eau. Ceci permet d'isoler une structure pigmentaire la plus proche possible de la structure *in vivo*.

Les conditions d'analyse ainsi fixées, permettent d'envisager l'étude du pigment malarique par microspectrométrie Raman. Nous avons donc dans un premier temps comparé le spectre du pigment au spectre de l'hémoglobine dans les globules rouges (produit initial), puis comparé celui-ci aux données collectées précédemment (chapitre III) pour vérifier notre hypothèse de travail. En effet nous avons suggéré que toute altération de la chaîne protéique (et donc de l'hémoglobine) par le parasite pouvait permettre un rapprochement des sites hémiques et ainsi conduire à un dérivé μ -oxo selon un mécanisme présenté sur le schéma 4.

2. Spectres Raman du pigment malarique

La complexité du milieu dans lequel le pigment se trouve nous a imposé de nombreuses contraintes expérimentales. C'est pourquoi nous présentons rapidement la démarche adoptée pour résoudre ces difficultés avant de présenter l'ensemble de nos résultats.

a). Contraintes et précautions expérimentales

En spectroscopie Raman, la densité photonique produite à l'échantillon est très importante et peut conduire à une dégradation de l'échantillon, surtout si celui-ci présente un spectre d'absorption avec des bandes coïncidentes avec les radiations excitatrices utilisées. Ce phénomène est encore plus prononcé dans le cas de la microspectrométrie. Deux techniques d'analyse s'offrent à nous pour atténuer ce phénomène : la diminution de la température à l'échantillon par l'utilisation d'une platine réfrigérée ou bien l'immersion du produit à analyser dans un milieu bon conducteur thermique. Cette deuxième solution a été adoptée dans ce travail en utilisant un objectif à immersion à eau. Ce choix se justifie par les deux raisons suivantes ; il permettait l'observation et l'étude spectroscopique du pigment malarique directement dans son milieu (décrit précédemment) et il était possible d'examiner l'hémoglobine au niveau des hématies. Le choix de cet objectif est très important car il constitue le premier élément de la chaîne de mesure et c'est par lui qu'est collecté la lumière diffusée (et donc le signal). L'objectif adopté est l'Olympus MSPL-APO 150/1,25, suite à une étude approfondie, décrite dans l'annexe expérimentale. Celui-ci possédant une distance frontale trop courte, il ne peut donc pas être utilisé avec une lamelle couvre objet. C'est pourquoi les hématies ont été examinées en microspectrométrie Raman, après avoir été fixées au méthanol.

Le souci analytique, qui animait ce travail, nous a obligé de vérifier la reproductibilité des spectres de nos échantillons biologiques. Nous avons donc vérifié :

- La reproductibilité temporelle : stabilité sous le faisceau laser ; spectres similaires obtenus d'un lot de culture à un autre.

- La reproductibilité spatiale : spectres identiques en différents points de l'échantillon.

Il était impératif de vérifier ces critères de reproductibilité, car à cause de la faible diffusion de nos échantillons, l'obtention de spectres Raman de ceux-ci nécessitait un nombre important d'accumulations importantes avant d'obtenir un rapport signal sur bruit correct, et de détecter ainsi les bandes de faibles intensités.

b). Les résultats

La figure 47 présente le spectre d'hématies saines, comparé à celui du pigment malarique, obtenu par une excitation Q ($\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$). Dans le tableau XVIII les fréquences obtenues pour chacun de nos composés étudiés sont comparées aux données spectroscopiques Raman obtenues pour l'oxyhémoglobine (HbO_2) et la désoxyhémoglobine (Hb) [54,71,93], en dissolvant l'hémoprotéine correspondante en milieu aqueux.

HbO_2^a	Hb^a	Hématie	Pigment malarique	Attribution ^b
1640 dp	1607 dp	1642	1628	ν_{10}
1620 p	1622 p			$\nu_s(\text{C}=\text{C})$
1586 ap	1552 ap	1590	"1571"	ν_{19}
1583 p	1565 p		"1571"	ν_2
1564 dp	1546 dp	1566	1550	ν_{11}
1552 dp	1557			
1506 p	1473 p	1510	1489	ν_3
1431 dp	1427 dp	1438	"1441"	$\delta_s(=\text{CH}_2)$
1400	1397	1402	1397	ν_{29}
1377	1356 p	1374	1370	ν_4
1342 ap	1338 ap	1346	1339	ν_{21}
1305	1305	1316	1307	
1225 dp	1215 dp	1250*	1250*	ν_{13}
1173 dp	1176 dp	1170	1168	ν_{30}
1133 ap	1137 ap	1132	1123	ν_{22}
1096				
1088				
		1006	1004	
		980	970	
755 dp	760 dp	755	756	ν_{16}

a : référence [54] - * : raie large - " " : voir texte

b : voir tableau XIV

Tableau XVIII : Attribution des spectres Raman des hématies et du pigment malarique

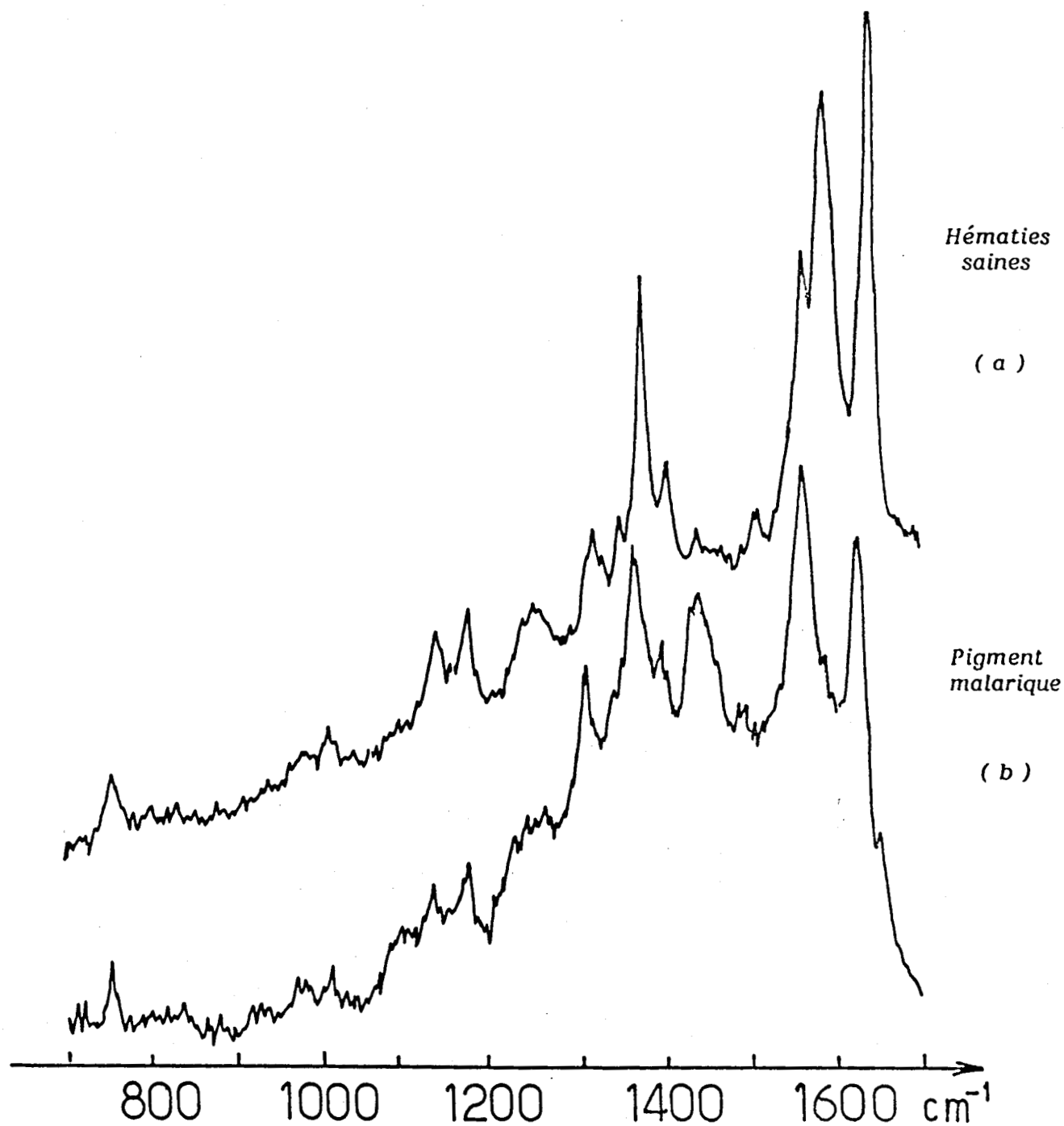


Figure 47 : Spectres Raman du pigment malarique et d'hématies saines - $\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$

(a) : $P_0 = 60 \text{ mW}$ - Nbr Accu. = 7 - Résolution = 5 cm^{-1}

(b) : $P_0 = 40 \text{ mW}$ - Nbr Accu. = 13 - Résolution = 5 cm^{-1}

L'attribution proposée dans le tableau XVIII est faite par analogie avec les composés de la littérature et l'attribution de Abe [57]. Celle du pigment malarique sera discutée par la suite.

1.b). Spectres Raman des hématies

Le spectre des hématies fixées au méthanol est tout à fait analogue à celui de l'oxyhémoglobine. Il était intéressant de comparer ces deux échantillons afin de juger de l'influence du méthanol sur le comportement de l'hémoglobine.

Le mode ν_4 , caractéristique de l'état d'oxydation du métal central est observé vers 1377 cm^{-1} dans HbO_2 . Celui-ci indique un état d'oxydation III de l'atome de fer (figure 38) et est analogue en fréquence dans les composés méthémoglobines (fluorométhémoglobine, cyanométhémoglobine, etc...) [54]. Cependant ces dernières molécules ont perdues leur propriétés fonctionnelles au contraire de HbO_2 (voir schéma 4). La position anormalement élevée du mode ν_4 s'explique simplement par la présence d'un fer II et du ligand O_2 , π accepteur. Cette valeur révèle simplement une donation préférentielle des orbitales d du fer II dans les orbitales π^* de l' O_2 plutôt que dans les orbitales e_g (π^*) du ligand porphyrinique. D'autre part, le passage de HbO_2 à Hb s'accompagne d'un changement de coordinance (6 à 5). Si l'état de spin restait le même, il faudrait s'attendre à une dimension C_t-N plus grande pour HbO_2 que pour Hb et donc une diminution en fréquence des modes supérieurs à 1459 cm^{-1} (figure 39). En fait les valeurs observées dans le cas de HbO_2 sont supérieures à celles de Hb. Un tel résultat ne peut se comprendre que par un changement d'état de spin de l'atome de fer dans ces composés. En particulier, la correspondance entre les valeurs du $2 \text{ CH}_3\text{ImFe}^{\text{II}}\text{PP}$ et de la désoxyhémoglobine permet de proposer un état HS dans ce dernier composé. Ainsi le spectre de l' HbO_2 doit être associée à une porphyrine ou l'état d'oxydation du fer est de II, dans un état BS.

L'analogie entre le spectre des hématies fixées au méthanol et de HbO_2 (la plus grande différence ne dépasse 5 cm^{-1}) nous permet d'affirmer que nous sommes en présence majoritairement d' HbO_2 (il n'y a pas d'épaulement suffisamment net vers 1356 cm^{-1} qui serait caractéristique de Hb). Ce résultat n'est pas étonnant pour les deux raisons suivantes :

* Nous sommes toujours en milieu où la teneur en oxygène dissoute est

maximale, c'est-à-dire dans le palier supérieur de la courbe de saturation de l'hémoglobine : figure 6.

- * Le traitement au méthanol n'est pas destructeur au niveau de l'hème. En particulier les liaisons Fe-histidine proximale doivent être conservées ainsi que l'éloignement des sites hémiques entre eux.

Dans la suite de notre travail nous associerons donc le spectre des hématies fixées au méthanol à celui de HbO_2 .

2.b). Spectres Raman du pigment malarique

L'examen de la figure 47 met en évidence la similitude qui existe entre le spectre de HbO_2 et celui du pigment malarique. Cette analogie démontre très rapidement et simplement que le chromophore impliqué dans la structure moléculaire du pigment malarique est une métalloporphyrine et plus précisément une porphyrine de fer. Néanmoins des distinctions évidentes apparaissent ; elles peuvent être classées de la manière suivante :

- Glissement de certaines fréquences et plus particulièrement dans la zone $1450-1700 \text{ cm}^{-1}$.
- Existence d'une raie vers 1441 cm^{-1} , d'intensité forte, qui n'a pas de correspondance immédiate dans le spectre de HbO_2 .

Ces différences nous ont permis de mettre en évidence la présence d'hémoglobine résiduelle de culture. En particulier l'interférence des spectres Raman de l'hémoglobine et du pigment malarique se manifestait par un massif non résolu dans le domaine $1500-1650 \text{ cm}^{-1}$.

Ces variations en fréquence témoignent de différences structurales survenues au niveau de l'hème après action du parasite sur l'hémoglobine. Comme nous l'avons vu précédemment au chapitre III, il est aisé d'avoir des informations sur l'état physico-chimique de l'atome de fer en analysant la position de quelques raies Raman spécifiques. En particulier, le mode ν_4 observé vers 1370 cm^{-1} , est caractéristique soit d'un état Fe^{III} , soit d'un état Fe^{II} en présence d'un ligand π .

accepteur du type CO ou O₂. Cette dernière hypothèse peut être écartée par examen des modes ν_{10} , ν_2 , ν_{11} et ν_3 . En reportant ces valeurs sur la corrélation présentée en figure 39, on détermine la dimension du coeur de la porphyrine de fer : $2,015 + A$. Cette valeur se situe dans le domaine correspondant à l'espèce ferrique avec une coordinance égale à 5. Il convient de préciser que l'attribution des modes ν_{10} , ν_2 , ν_{11} et ν_3 s'est faite à partir des spectres réalisés avec différentes excitations en sachant qu'en excitation B seul les modes polarisés (ν_2 , ν_3 , ν_4) étaient exaltés alors qu'en excitation Q seul les modes non symétriques (ν_{10} , ν_{11} , ν_{19}) sont exaltés. Cependant il ne nous a pas été possible d'attribuer clairement le mode ν_2 ou ν_{19} exalté respectivement par excitation B et Q. Nous soupçonnons une coïncidence de ces modes, phénomène classique dans le cas des dérivés ferriques HS. Seule une mesure de polarisation nous avait permis de distinguer ces 2 modes dans le cas de la DPDEFcCl (figure 25).

Cet examen très rapide du spectre Raman du pigment malarique met en évidence la présence d'une porphyrine (dont nous ne pouvons préciser actuellement la nature), complexée par un atome de fer III, dans un état HS.

Une telle structure sous entend la présence d'un ligand axial. Notre analyse bibliographique nous avait conduit à postuler l'existence d'une forme μ -oxo comme produit de dégradation de l'hémoglobine. Notre étude sur des composés modèles nous a permis de caractériser la présence d'une telle espèce moléculaire, en observant l'apparition de deux modes par excitation B, vers 416 cm^{-1} [$\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$] et 890 cm^{-1} [$\nu_{as}(\text{Fe-O-Fe})$], si la porphyrine impliquée dans le complexe μ -oxo est la protoporphyrine IX. Il suffisait donc d'obtenir le spectre Raman du pigment malarique avec une excitation B et d'observer les domaines de fréquences cités précédemment. Cependant cette détermination structurale directe n'a pu être obtenu sur le pigment malarique pour les raisons suivantes :

- L'étude du domaine vers 400 cm^{-1} , n'a pas permis de mettre en évidence une raie attribuable à $\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$. Il est aisé de comprendre que, bien que nous nous soyons placés dans les conditions optimales pour cette analyse (maximum du profil d'excitation), cette caractérisation analytique était difficile à cause de la faible intensité de ce mode (facteur 7 avec le mode ν_4 : figure 26-36).

- Pour la même raison, le mode ν_{as} n'a pu être détecté, d'autant plus qu'au problème d'intensité absolue s'ajoute un problème de résolution spectrale. En effet, de nombreux modes apparaissent dans ce domaine et on observe une enveloppe assez large.

Ainsi il ne nous a pas été possible de vérifier l'hypothèse du complexe μ -oxo directement. Cependant, notre analyse menée par spectroscopie Raman sur des composés modèles μ -oxo nous a permis de constater qu'une des caractéristiques de ces molécules est l'intensité du mode ν_3 observé par une excitation B. L'examen du spectre excité avec la radiation 413,1nm n'a pu être obtenu à cause de la dégradation rapide de l'échantillon sous le faisceau laser certainement due à la forte absorption des résidus protéiques au niveau de celui-ci. Néanmoins le spectre avec une radiation moins énergétique (457,9nm) a été réalisé et est présenté figure 48.

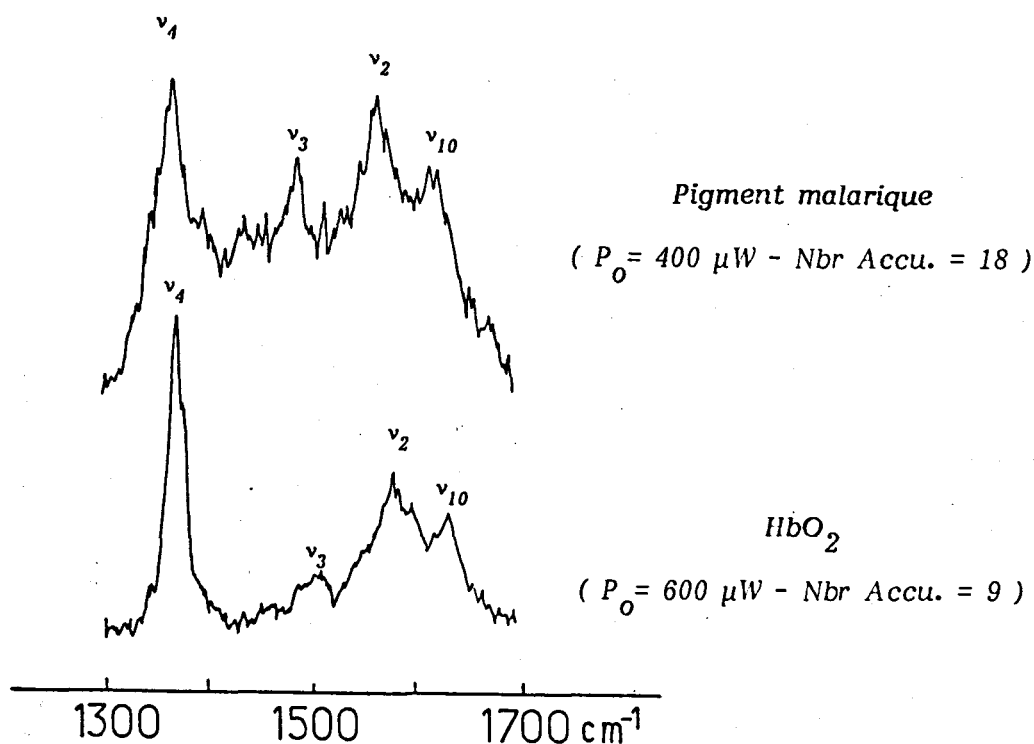


Figure 48 : Spectres du pigment malarique et de HbO_2 - $\lambda_{exc} = 457,9$ nm

Ce spectre met en évidence l'intensité du mode ν_3 et corrobore ainsi le fait que le pigment malarique est bien une porphyrine de fer, ou celui-ci est à l'état

$Fe^{III}\text{-HS}$ (ν_4 , ν_{10} , ν_2) engagé dans une entité $\mu\text{-oxo}$.

Cependant, bien que le spectre Raman du pigment malarique soit compris comme un spectre caractéristique d'une $\mu\text{-oxo}$ ferriporphyrine, une raie non prévue par l'étude des composés $\mu\text{-oxo}$ modèles $[(PPDFe)_2O]$, $(DPDFe)_2O$ apparaît vers 1441 cm^{-1} . Son intensité est importante en excitation Q (figure 47) et pratiquement nulle en excitation B. Un tel profil d'excitation est confirmé par le spectre Raman enregistré avec une radiation intermédiaire, $488,0\text{ nm}$ (figure 49).

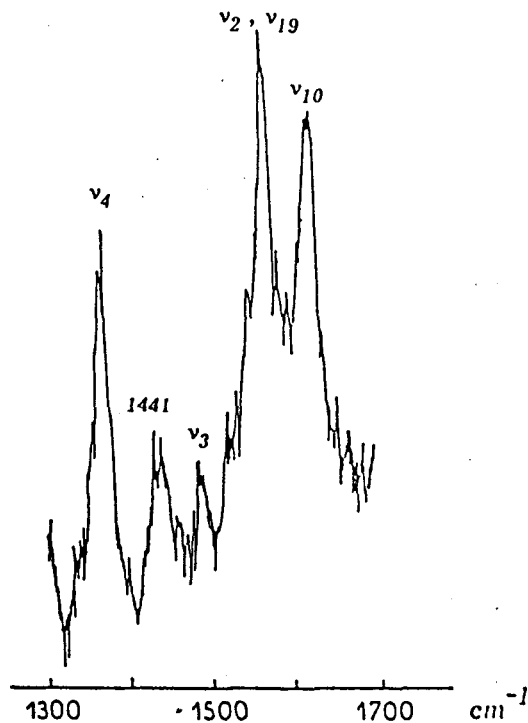


Figure 49 : Spectre du Pigment malarique - $\lambda_{exc} = 488,0\text{ nm}$
($P_0 = 600\text{ }\mu\text{W}$ - Nombre d'accumulations : 13)

Un tel processus d'exaltation ne peut être attribué qu'à un mode non totalement symétrique (chapitre III-III.4). Il est à signaler que dans la littérature sur les métalloporphyrines étudiées par spectroscopie Raman, une telle raie n'est jamais reportée.

La présence de ce mode est donc caractéristique de la structure même de la porphyrine au niveau du pigment malarique. La non application directe de nos résultats sur nos molécules modèles met en évidence que d'autres paramètres doivent intervenir dans le problème biologique. En effet notre étude chimique sur des composés modèles se distinguent du problème biologique par les deux faits suivants :

- Le pigment malarique est immergé en milieu aqueux (milieu physiologique).
- Le pigment est en présence de débris protéiques dont on sait qu'il n'interviendront que s'il existe une interaction entre ceux-ci et la ferri-porphyrine impliquée dans la structure du pigment.

Afin de juger de l'influence du milieu aqueux sur le spectre d'un composé porphyrique, nous avons dissous de l'hémine en milieu aqueux alcalin (pH=13), obtenant ainsi majoritairement le composé μ -oxo correspondant. Le spectre obtenu dans les mêmes conditions d'excitation que le pigment malarique ne met en aucun cas en évidence un mode vers 1441 cm^{-1} (figure 50).

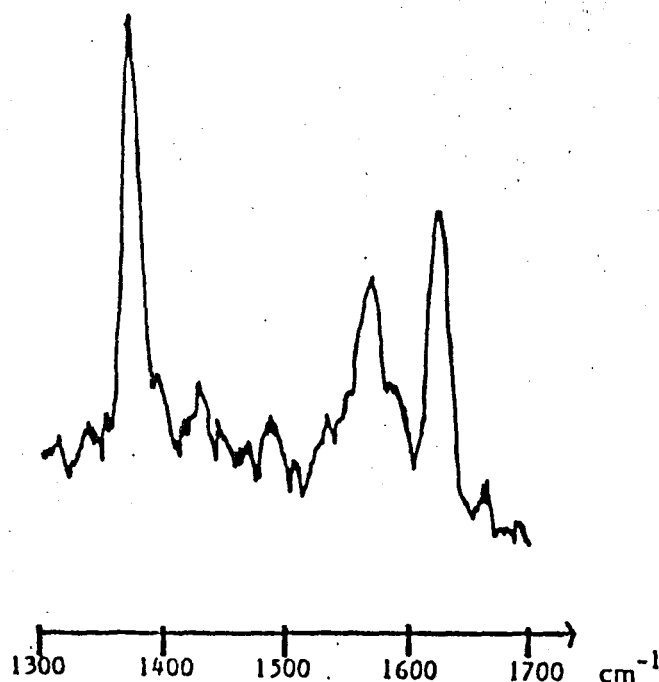


Figure 50 : Hémine en solution aqueuse - pH = 13 - $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$

Dans une telle manipulation, nous travaillons à une concentration voisine de 10^{-4} M , et donc dans des conditions physiques très différentes de celles du pigment malarique. En effet, les clichés obtenus en microscopie électronique laissent suggérer une structure pseudo-cristalline du pigment. C'est pourquoi nous avons développé un nouveau modèle, capable de mimer la situation existante dans le milieu biologique.

II - ETUDE D'UN MODELE D'ASSOCIATION DE PORPHYRINES EN MILIEU AQUEUX

Une des particularités du noyau tétrapyrrolique est son hydrophobie. Il est connu qu'en dissolvant de telles molécules en milieu aqueux, elles s'orienteront les unes par rapport aux autres pour former une structure micellaire stable. Nous avons voulu appréhender l'influence d'une telle organisation en milieu aqueux, sur le spectre Raman et avons synthétisé un modèle permettant de mimer ce phénomène.

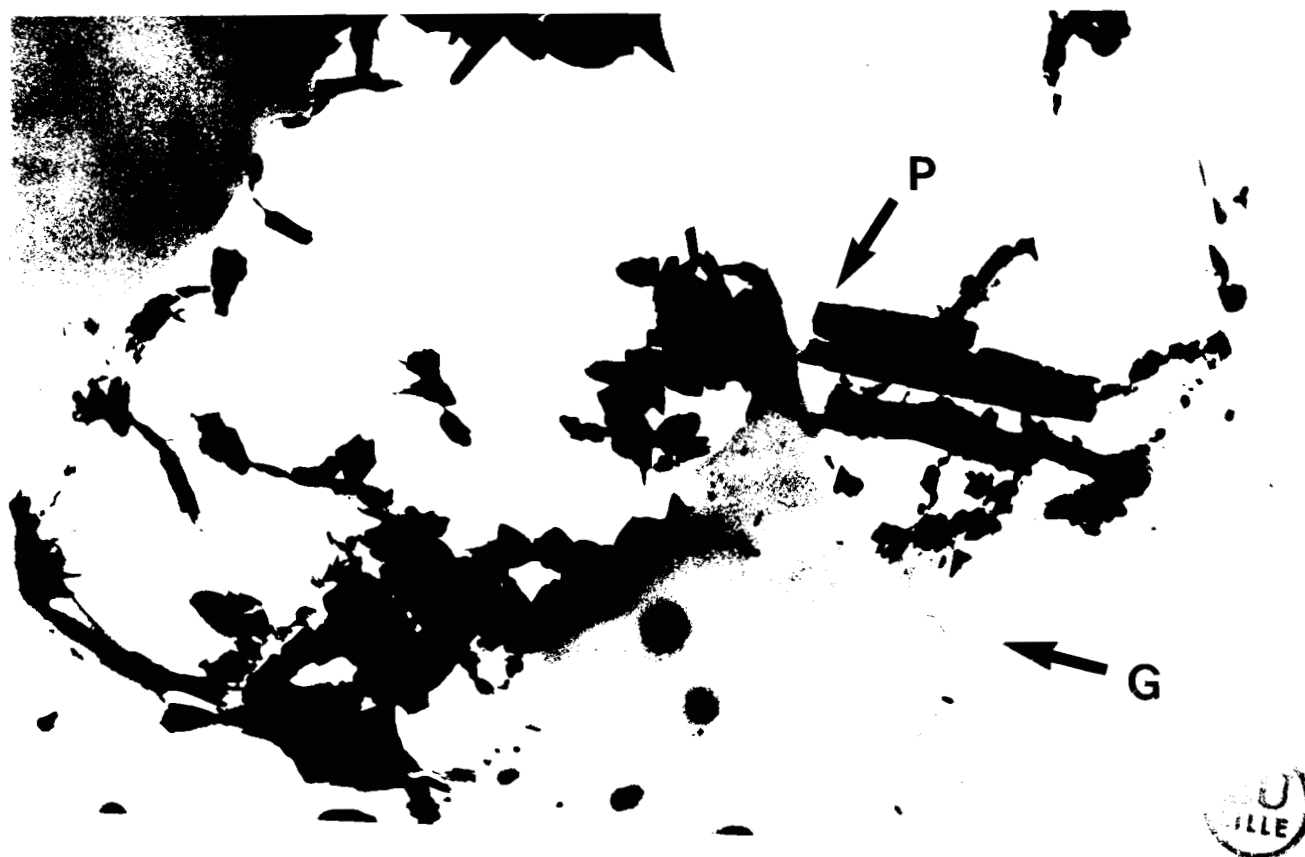
1. Principe de ce modèle

Le principe de ce modèle est basé sur une hypothèse quant à la structure du pigment malarique : un empilement d'unités μ -oxo porphyriques, maintenus par interaction hydrophobe et probablement associé avec des protéines.

L'idée est donc de réaliser un arrangement pseudo-cristallin des porphyrines en amorçant cet arrangement à partir d'une première porphyrine fixée sur un support solide, puis de lui associer par liaison hydrophobe uniquement des unités μ -oxo porphyriques.

La présence dans les porphyrines naturelles de fonction propioniques permet d'envisager la création d'une liaison covalente avec un support, via par exemple une liaison peptique. Celle-ci ne peut être réalisée que si le support présente une fonction amine. Nous avons choisi comme support des billes d'agarose sur lesquelles il est aisé de créer une fonction amine (voir annexe expérimentale). Ce choix est judicieux car l'examen d'une bille (diamètre moyen de 100 μ m) même après greffage du bras diaminohexane (fonction amine) ne présente aucun spectre Raman détectable sous nos conditions. La fixation finale de la porphyrine se fait par réaction avec la carbodiimide.

Afin de pouvoir transposer les résultats de ce modèle au problème biologique, nous avons choisi la protoporphyrine IX de fer (hémine) qui est le groupement prosthétique de l'hémoglobine. L'élution d'une solution d'hémine sur le système décrit précédemment conduit à un polymère de porphyrine de fer. L'observation en microscopie électronique d'une bille de gel ainsi traité met en évidence des petits cristallites à la surface de celle-ci (figure 51).



G : gel d'agarose - P : porphyrine - 0.5 μ m

Figure 51 : Observation par microscopie électronique d'une bille de gel

Une telle association n'est observée que si la liaison porphyrine-support a été réalisée, démontrant ainsi l'origine d'un tel phénomène : interaction hydrophobe.

Les conditions opératoires de la préparation du gel sont telles (milieu basique) qu'il est raisonnable de penser que d'une part les unités moléculaires qui interviennent sont des complexes μ -oxo, d'autre part, que l'association se fait par interaction hydrophobe entre unités μ -oxo. La figure 52 représente le schéma d'un tel système.

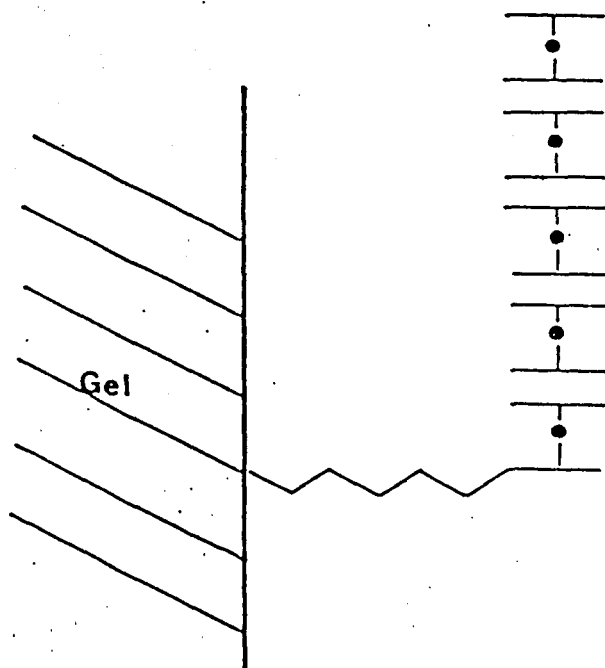


Figure 52 : Schéma du modèle d'association par interactions hydrophobes

La microspectrométrie Raman était dès lors, la technique de choix pour analyser non seulement la nature exacte du motif élémentaire intéressant dans cette association mais de voir sa répercution sur les données structurales et ou électroniques de ce motif.

2. Analyse d'une bille de gel

L'analyse en microspectrométrie Raman, se fait en observant une bille de gel, immergée en milieu aqueux grâce à l'objectif utilisé pour l'analyse du pigment. L'obtention de spectre Raman sur un tel échantillon, témoigne de l'adaptabilité de cette technique à résoudre notre problème. En effet, un calcul très simplifié permet d'estimer que la quantité de matière analysée par cette technique de microanalyse est très inférieure au microgramme.

La figure 53 représente le spectre d'une bille de gel, comparé à celui de la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ et de HbO_2 , obtenu avec une radiation excitatrice à 457,9 nm, en basses fréquences.

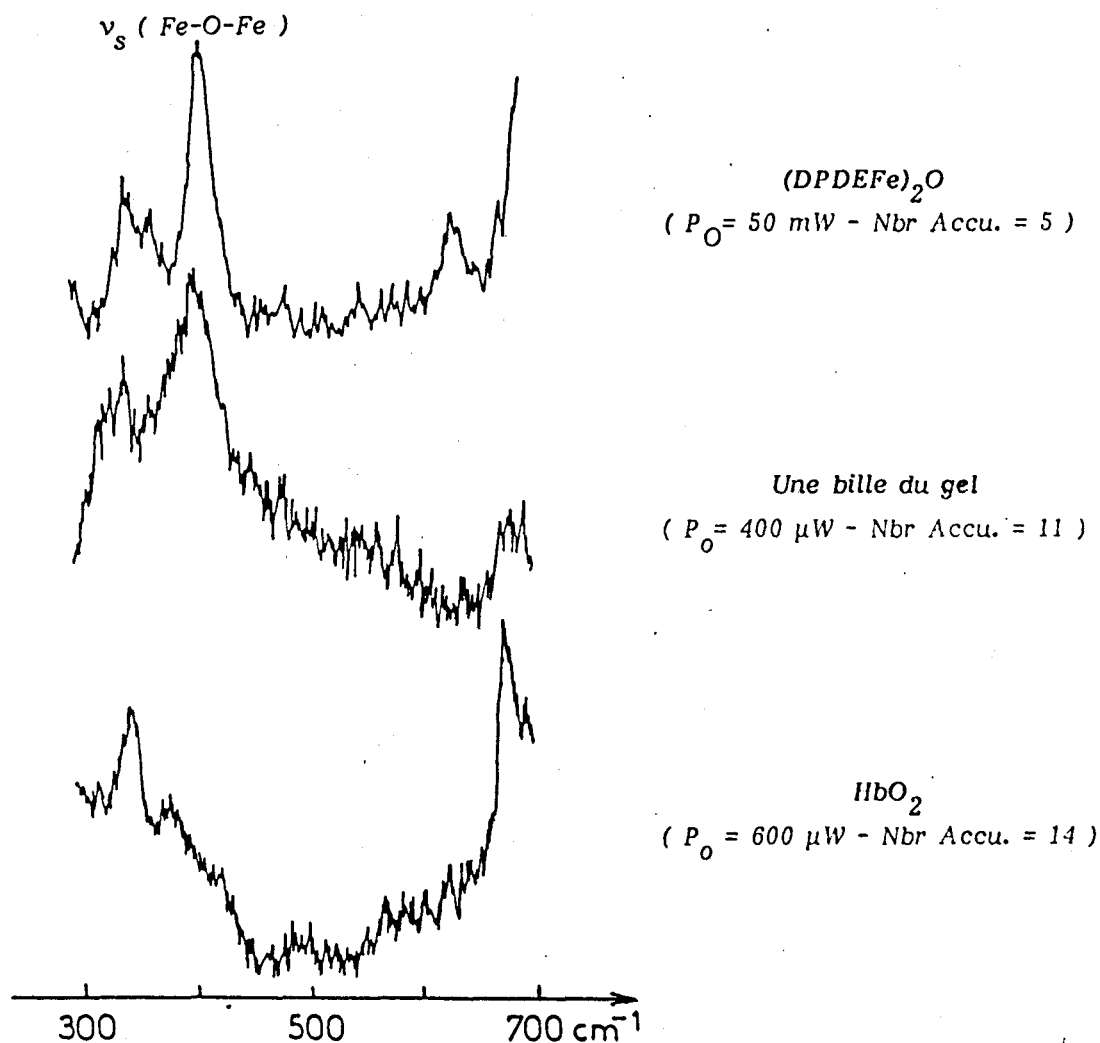


Figure 53 : Spectres d'une bille de gel, d'hématies, de la (DPDEFē)₂O .
 $\lambda_{exc} = 457,9$ nm

L'analogie du spectre de la bille et de la (DPDEFē)₂O est flagrante et met donc en évidence la présence du mode à 416 cm⁻¹, caractéristique d'un mode de vibration ν_s associé à une liaison Fe-O-Fe. L'attribution est renforcée par le fait que cette bande disparaît sous excitation Q et suit donc le profil attendu dans un complexe μ -oxo de porphyrines naturelles (chapitre III).

La figure 54 présente les spectres d'une bille de gel et de HbO₂ obtenues par une excitation B (413,1 nm), pour le domaine 1300-1700 cm⁻¹. L'analyse du spectre de la bille permet de déterminer les valeurs des modes ν_2 , ν_3 , ν_4 respectivement à 1570, 1489 et 1373 cm⁻¹. Ceux-ci sont caractéristiques d'une structure ferrique haut spin (le raisonnement est analogue à celui mené pour le pigment malarique).

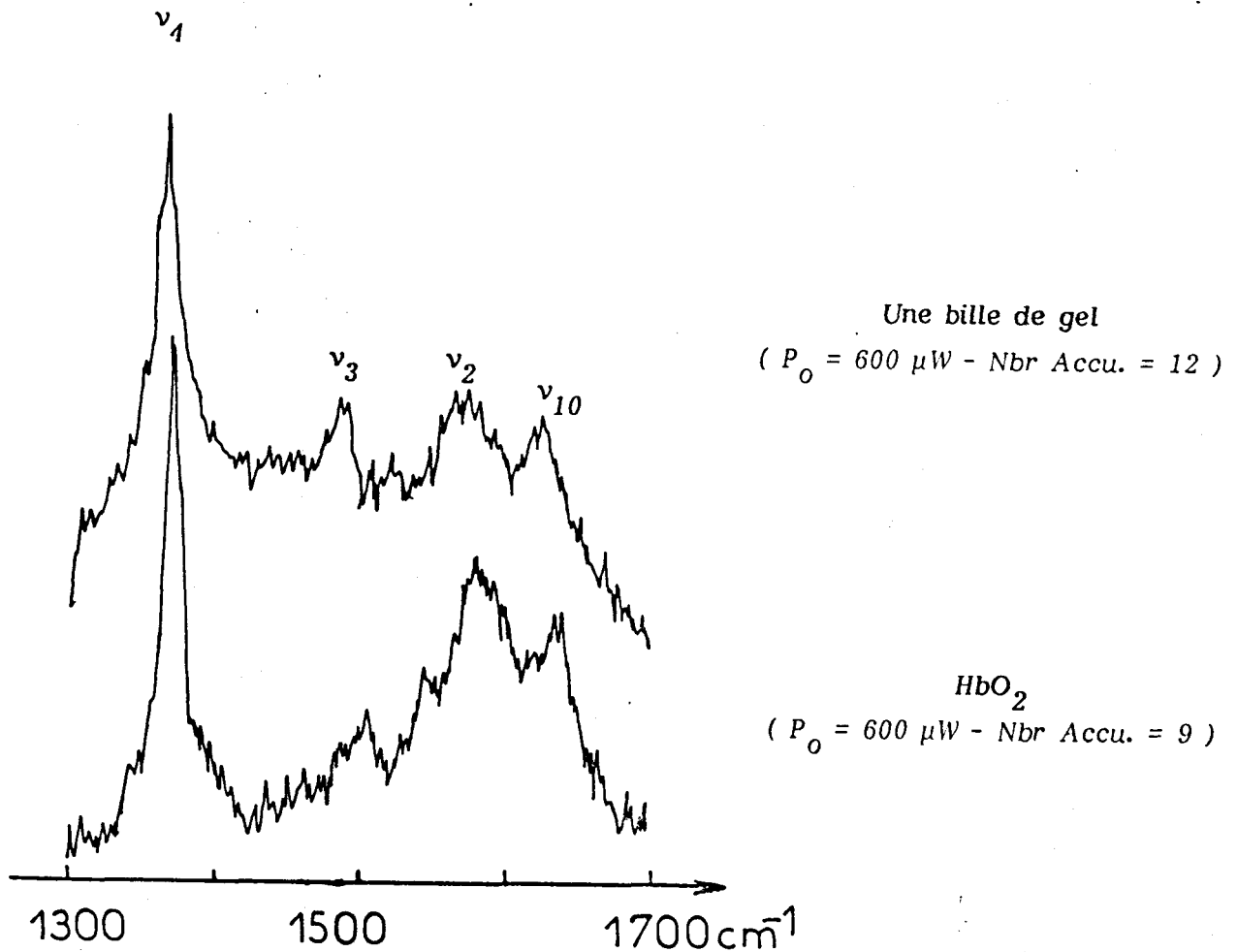


Figure 54 : Spectres d'une bille de gel et d'hématies - $\lambda_{\text{exc}} = 413,1 \text{ nm}$

Le spectre d' HbO_2 sert de témoin, et permet de se rendre compte des variations entre une structure BS-Fe^{II} avec une structure $\text{HS-Fe}^{\text{III}}$. En effet, les modes ν_2 , ν_3 , ν_4 sont observés vers 1575, 1490, 1375 cm^{-1} . Un dernier élément qui confirme la structure μ -oxo au niveau du motif élémentaire dans le gel est l'intensité du mode ν_3 . En effet nous avons mentionné qu'avec une excitation B, ce mode était exalté (voir figure 27) et c'est le cas en examinant la figure 54.

Ainsi très rapidement, la microspectrométrie Raman nous permet d'affirmer la présence d'un μ -oxo dans ce gel. Aucun fait marquant n'est observé dans le spectre Raman par l'utilisation de radiations excitatrices dans le domaine B.

Cependant, nous obtenons de nouvelles informations sur la métalloporphyrine en étudiant le spectre de la bille de gel, obtenue par une excitation Q (figure 55).

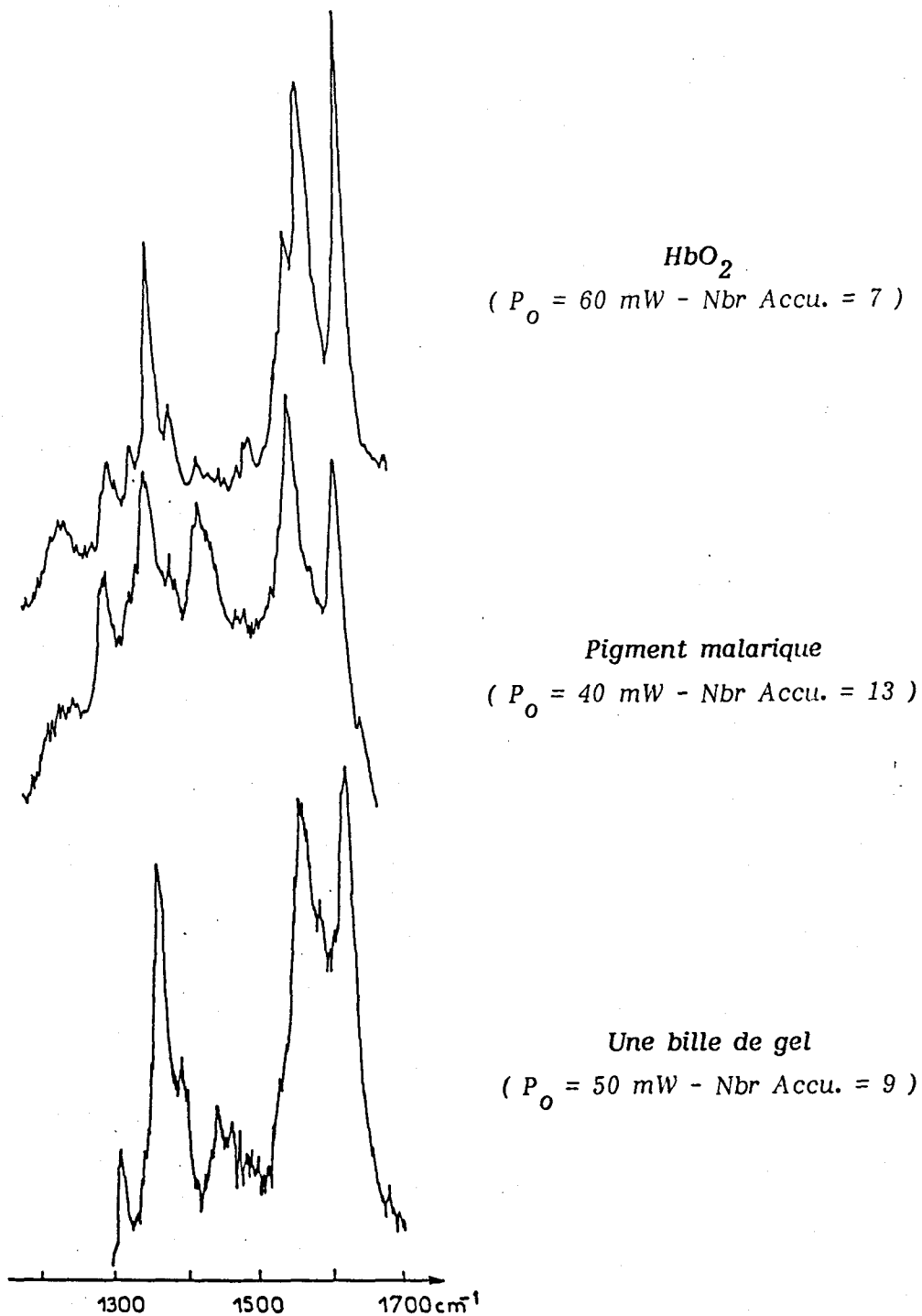


Figure 55 : Spectre d'une bille de gel comparé au spectre de HbO_2 et du pigment malarique - $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$

D'une part ce spectre met en évidence les modes ν_{10} et ν_2 , respectivement à 1628 et 1569 cm^{-1} , qui corroborent la structure ferrique haut spin ; d'autre part une raie mal résolue est observée vers 1446 cm^{-1} dont la forme et le nombre d'onde rappellent étrangement la raie observée vers 1441 cm^{-1} dans le pigment malarique.

Alors que la comparaison des spectres Raman entre les modèles synthétiques $(\text{DPDEF})_2\text{O}$, $(\text{PPDEF})_2\text{O}$ et du pigment malarique n'est pas probante, il semble que le dernier modèle développé mime mieux le spectre du pigment malarique, cependant avec une différence certaine sur l'intensité relative du mode vers 1441 cm^{-1} .

III - LA STRUCTURE DU PIGMENT MALARIQUE

A ce stade de la discussion, nous avons vu que le pigment malarique est constitué d'une porphyrine μ -oxo de fer. L'attribution du spectre Raman se fait aisément à l'aide des données présentées dans le chapitre III ainsi que les données bibliographiques sauf pour une raie, visible en utilisant une excitation Q vers 1440 cm^{-1} . Une telle raie est observée dans le modèle du gel de porphyrine avec une intensité moindre. Nous allons tenter de présenter les différentes explications qui peuvent être évoquées pour expliquer l'apparition de ce mode.

Jusqu'à maintenant nous avons associé le spectre du pigment malarique à une porphyrine de fer sans préjuger si un autre composé intervenait. Notre étude contredit les résultats obtenus suite à un travail sur le pigment malarique par spectroscopie Mössbauer dans lequel le fer est trouvé lié à une protéine et non à une porphyrine [94]. De plus, une telle entité moléculaire (Fe-protéine) se traduirait par des modes en basses fréquences (inférieures à 600 cm^{-1}). D'autre part la possibilité que cette raie soit attribuable à la présence d'un autre chromophore du type de la chlorine, est à exclure. Dans un tel cas le spectre aurait été plus compliquée (à cause de la baisse de symétrie) et les profils d'excitation complètement différents [72]. Ainsi la bande à 1441 cm^{-1} ne traduit pas la présence d'une autre espèce mais est caractéristique de la porphyrine.

L'apparition d'un mode dans le spectre d'une métalloporphyrine peut être due à des changements structuraux qui se traduisent par une baisse de symétrie

(activation de mode E_u) soit par la participation de groupements susceptibles d'intervenir dans le processus de résonance.

Les clichés obtenus en microscopie électronique témoignent de la structure organisée de la métalloporphyrine au sein du gel et du pigment. Un tel état serait susceptible d'activer de nouveaux modes. Cependant la similitude des spectres Raman des composés modèles entre l'état liquide et solide nous avait conduit à affirmer l'absence d'interactions intermoléculaires. Néanmoins des anomalies structurales sont reportées dans certaines structures radiocristallographiques de composés porphyriques [11,12]. Ce raisonnement ne peut donc expliquer la présence d'un mode que si la modification qu'entraîne l'état cristallin met en jeu un groupement susceptible d'intervenir dans le processus de résonance.

Il faut exclure toutes les modifications structurales de l'hème qui pourraient avoir lieu aux positions méso ou pyrroliques, en effet ceci semble peu réaliste du point de vue biologique. Cependant la présence des groupements propioniques est intéressante car elle permet d'envisager différents types d'interaction qui sont :

- création d'une liaison covalente entre le fer et ses fonctions : un tel composé a été synthétisé et étudié par spectroscopie RR, mais les spectres présentés dans cet article ne présentent pas d'anomalies spéciales [95].
- création d'associations via des interactions électrostatiques : plusieurs études ont traité du rôle joué par ces fonctions en milieu aqueux sur l'association d'espèces métallées ou non. En particulier Shenultt qui a étudié les uroporphyrines (fonctions propioniques sur les positions β pyrroliques) ne signalent aucune extra-bande dans les spectres Raman de ces composés [96].

On peut donc penser qu'il ne faut pas rechercher la solution de l'interprétation du mode à 1441 cm^{-1} par une déformation profonde du système porphyrique. En effet, nous avons vu que la simple substitution asymétrique du noyau porphyrique dans le cas de la DPDE, conduisait à l'apparition de modes supplémentaires E_u (non observés dans les complexes de la TPP), au nombre de deux ν_{37} et ν_{38} (épaulements à 1588 et 1530 cm^{-1} : figure 26). Récemment, lors d'une étude sur l'oxyhémoglobine, Smulevitch reportait l'observation d'un mode très faible vers

1550 cm^{-1} correspondant au mode ν_{39} , les modes ν_{37} et ν_{38} ne pouvant être attribués à cause de l'intensité des modes ν_2 et ν_{19} dans cette région [71]. L'examen du tableau XIV démontre qu'un mode E_u vers 1454 cm^{-1} est attendu, dénommé ν_{40} . Il n'est cependant pas raisonnable d'attribuer la raie à 1441 cm^{-1} essentiellement à ce mode E_u car un tel fait devrait être transférable entre composés analogues. En particulier, une étude récente par spectroscopie Raman sur l'hème, caractérisée par la position d'un vinyle en position 4 et d'un substituant volumineux en position 2, ne met en évidence qu'un mode E_u avec une intensité comparable à celle obtenu dans nos échantillons [97]. Ainsi le mode observé à 1441 cm^{-1} n'est probablement pas attribuable à une baisse de symétrie profonde du coeur porphyrique, causée par des substitutions sur les noyaux pyrroliques.

Une hypothèse peut être avancée concernant le rôle joué par les vinyles. En effet, les raies de ces groupements ont été caractérisés par échange isotopique dont les principales sont ν_s (C=C) voisine de 1620 cm^{-1} et δ_s (=CH) vers 1435 cm^{-1} . On pourrait donc attribuer la raie observée à 1441 à la déformation symétrique CH des vinyles. Cependant ces modes sont généralement faibles et observés uniquement avec une irradiation B dans des composés modèles ou l'hémoglobine [58,59]. En effet, l'élucidation de la structure RX de l'hémine a mis en évidence que les vinyles étaient hors du plan et donc peu conjugués au chromophore porphyrique [7]. Cependant en milieu aqueux, les fonctions vinyles peuvent être forcées de s'orienter dans le plan de la porphyrine et ainsi de participer plus à la conjugaison du système. Un tel argument a été proposé par Desbois et coll. pour expliquer l'influence de la protéine sur l'orientation dans différents hémoprotéines des vinyles et donc de la conjugaison de ceux-ci [98]. Cet argument ne contredit pas nos résultats obtenus sur la $(\text{PPDEF}_e)_2\text{O}$ où nous avons signalé la faible influence de ceux-ci sur le spectre Raman, mais à l'état solide. Cette explication est certainement à l'origine du mode observé vers 1441 cm^{-1} dans le spectre du gel et contribue partiellement dans le spectre du pigment malarique.

En effet, cet argument seul ne peut justifier l'intensité du mode observé dans le cas du pigment malarique. En particulier une étude récente menée en spectroscopie Raman s'est intéressée à l'interaction entre oligoéléments et les fonctions vinyliques. Elle démontre de façon précise que la complexation du Cu(I) au niveau du vinyle provoque des glissements en fréquences mais non en intensité [99]. Ainsi un tel mécanisme d'exaltation du mode vinyle est à écarter, d'autant plus que l'étude citée précédemment ne s'est faite qu'en excitation B.

La principale différence entre les spectres des complexes μ -oxo de synthèse étudiés [(DPDEF e) $_2$ O , (PPDEF e) $_2$ O] et les échantillons en milieu aqueux est l'intensité du mode observé vers 1441 cm^{-1} . Nous avons essayé de discuter sur l'origine de celui-ci, sans trouver une explication parfaite. Bien qu'il soit possible d'envisager une participation des vinyles plus importante à la délocalisation électronique dans ce type de composés, elle n'explique pas l'intensité observée dans le cas du pigment malarique. Un dernier aspect à envisager était les possibles interactions susceptibles d'intervenir entre l'hème et les protéines dans le pigment malarique.

Pour appréhender le rôle possible joué par les protéines, on peut se référer aux données bibliographiques suivantes :

- Les porphyrines de fer sont susceptibles de former des complexes π [96].
- Les complexes μ -oxo peuvent interagir avec des systèmes conjugués par interactions π . De telles interactions sont évoquées pour la chloroquine, médicament utilisé contre la malaria [100], ou bien l'aniline [101].

Shelnutt a démontré que cette interaction se traduisait par des glissements en fréquence très faibles, des variations d'intensité très faibles. Cependant, celui-ci choisit l'urohémine car cette porphyrine est très soluble dans l'eau, à cause des 8 fonctions propioniques qui empêchent la formation du complexe μ -oxo (interaction électrostatique entre les deux cycles porphyriques). On ne peut donc en rien préjuger de l'influence du complexe π, π dans le cas d'une espèce μ -oxo à la vue du spectre Raman. En particulier la complexation aniline-(μ -oxo) ne met en évidence que l'association des porphyrines en milieu aqueux peut être modifiée par la présence de dérivés protéiques possédant un système π du type tyrosine, phénylalanine, etc... Une telle association a été d'ailleurs proposée comme mécanisme d'affinité entre la chloroquine et l'hémine en solution aqueuse [100].

Notre étude nous a permis d'obtenir des informations originales sur la structure du pigment malarique. Une structure μ -oxo peut être proposée à la vue des résultats obtenus en spectroscopie Raman, en se servant d'informations obtenues sur des composés modèles. Néanmoins, le spectre de celui-ci présente une raie supplémentaire dont l'origine de l'exaltation ne peut être déterminée de façon exacte. Une orientation des vinyles dans le plan de la molécule, des interactions avec des résidus protéiques peuvent être proposées comme origine de mécanisme d'exaltation de ce mode.

CONCLUSION

Notre étude menée sur l'analyse du chromophore constituant le pigment malarique par microspectrométrie Raman nous a conduit à étudier une famille de composés : les μ -oxo ferriporphyrines. Ces complexes peuvent être proposés comme produit de dégradation de l'hémoglobine.

L'absence de données spectroscopiques Raman sur les μ -oxo ferriporphyrines a suscité un travail approfondi sur des composés modèles. Celui-ci s'est effectué en étudiant un complexe synthétique dont la structure radiocristallographique est connue, la $(TPPFe)_2O$ et un composé de structure inconnue, la $(DPDEFc)_2O$.

Cette étude a permis de caractériser les modes vibrationnels spécifiques de l'entité moléculaire μ -oxo, ν_s (Fe-O-Fe) et ν_{as} (Fe-O-Fe), après avoir réalisé les synthèses originales des composés μ -oxo, enrichis à l' ^{18}O . Outre ces informations, des données structurales ont été obtenues dont les principales sont : dimension du coeur porphyrine (état d'oxydation, état de spin du fer), angle de la liaison Fe-O-Fe. En particulier, l'absence des substituants volumineux en position méso dans le cas du complexe $(DPDEFc)_2O$ permet à la liaison Fe-O-Fe d'adopter une structure coudée. Un angle voisin de 160° est proposé dans le cas du complexe $(DPDEFc)_2O$, significativement différent de l'angle connu au sein du complexe $(TPPFe)_2O$, égal à $174,6^\circ$.

Cette différence géométrique importante modifie profondément les propriétés électroniques de ces complexes et se traduit en spectroscopie Raman par des profils d'excitation fort différents pour les modes caractéristiques de l'entité μ -oxo. D'autre part, l'étude menée sur ces composés bimétalliques et des composés monométalliques (dérivés chlorés correspondants) met en évidence que la dimérisation n'affecte pas les paramètres structuraux de l'état fondamental mais par contre génère des différences profondes sur les états électroniques excités.

La $(PPDEFc)_2O$ dont la porphyrine est similaire au groupe prosthétique de l'hémoglobine (présence de deux fonctions vinyliques en position 2 et 4), est

comparée à la $(DPDEF\text{e})_2\text{O}$ par spectroscopie Raman, I.R., U.V. Les résultats obtenus sur cette dernière sont transposables à la $(PPDEF\text{e})_2\text{O}$. En particulier les données structurales, les profils d'excitation des modes μ -oxo, la position en nombre d'onde de $\nu_s(\text{Fe-O-Fe})$ sont similaires dans ces complexes. Seule la fréquence de la vibration $\nu_{as}(\text{Fe-O-Fe})$ semble affectée par la substitution 2-4.

Dès lors, il fut possible d'envisager l'analyse de telles structures dans des microéchantillons biologiques au moyen de la microspectrométrie Raman. En particulier l'obtention du spectre Raman du pigment malarique et son étude comparée aux données recueillies précédemment, démontre qu'une μ -oxo ferriporphyrine est impliquée dans la structure moléculaire de celui-ci.

Néanmoins, un mode vibrationnel supplémentaire est exalté dans le spectre Raman du pigment malarique qui n'a pas de correspondance dans le spectre des composés modèles. Pour mimer ce fait expérimental, une approche est proposée via la réalisation d'un modèle d'association de porphyrines en milieu aqueux. La microspectrométrie Raman démontre qu'une telle association est caractérisée par un empilement d'unités μ -oxo, maintenues par interactions hydrophobes. Le mode observé pourrait être alors compris comme la manifestation d'une orientation privilégiée des fonctions vinyliques dans un tel système.

Cependant cette explication seule est insuffisante pour interpréter le phénomène observé. En effet le pigment malarique est certes en milieu aqueux, mais aussi en présence de débris protéiques. Une interaction peut avoir lieu entre ces derniers et le pigment malarique par interaction $\pi\pi$. Le modèle développé en milieu aqueux dans ce mémoire est un point de départ pour juger de l'influence de ce phénomène. En effet, il est tout à fait envisageable de synthétiser des petits peptides possédant un système π , de les mettre en présence de ce modèle et de juger de l'influence de cette interaction sur le spectre Raman. La réalisation et l'analyse de tels systèmes via la microspectrométrie Raman est la voie future de ce travail afin de mimer parfaitement le spectre Raman du pigment malarique.

ANNEXE EXPERIMENTALE

I - <u>TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES</u>	170
1. Spectroscopie U.V.visible.....	170
2. Spectroscopie R.M.N.....	170
3. Spectroscopie I.R.....	170
4. Spectroscopie Raman.....	171
a). Echantillon macroscopique.....	171
1.a). A l'état solide.....	171
2.a). A l'état liquide.....	173
b). Echantillon microscopique.....	174
II - <u>SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COMPOSES MODELES</u>	178
1. La chloroferritétraphénylporphyrine : TPPFeCl.....	178
2. La chloroferrideutéroporphyrine diméthylester : DPDEFcCl.....	178
3. La chloroferriprotoporphyrine diméthylester : PPDEFcCl.....	178
4. Démétallation de la DPDEFcCl et de la PPDEFcCl.....	179
5. Synthèse des composés μ -oxo : (TPPFe) ₂ O , (DPDEFc) ₂ O , (PPDEFc) ₂ O.....	180
a). Synthèse normale.....	180
b). Synthèse isotopique.....	181
6. Synthèse du gel.....	181
III - <u>LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES</u>	182
1. Les globules rouges.....	182
2. Le pigment malarique.....	182

Nous décrivons dans cette annexe, les différents appareils qui nous ont permis d'obtenir les données spectroscopiques présentées dans ce travail. Nous insisterons plus particulièrement sur les spectromètres Raman et les conditions d'échantillonnage spécifiques à notre étude (forte absorption des composés, limitation des phénomènes thermiques ou photochimiques, manipulations de microéchantillons).

Les synthèses chimiques de nos composés seront décrites, en mettant un accent particulier sur la synthèse des composés μ -oxo, l'échange isotopique (^{16}O , ^{18}O) ainsi que de la préparation du gel.

Enfin, nous expliciterons les conditions expérimentales d'obtention des échantillons biologiques (hématies et pigment malarique).

I - TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

1. Spectroscopie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman UV 5240 à température ambiante, les solutions sont contenues dans une cellule en quartz de trajet optique égal à 1cm.

2. Spectroscopie R.M.N.

Les spectres R.M.N. ont été obtenus sur un spectromètre Bruker AM.400, travaillant à 400 MHz pour le proton et 100 MHz pour le carbone (^{13}C). Les spectres ont été enregistrés à température ambiante, après dissolution des échantillons dans CDCl_3 (référence T.M.S.) pour des concentrations voisines de $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$.

3. Spectroscopie I.R.

Les données IR sont obtenues à l'aide d'un spectromètre Bruker IFS 113V, à transformée de Fourier, travaillant sous vide. Les spectres en moyen infrarouge (M.I.) sont obtenus avec un détecteur M.C.T. (refroidi à l'azote), alors que les spectres en infrarouge lointain (I.L.) ont été enregistrés avec un détecteur D.T.G.S. (travaillant à température ambiante). La résolution adoptée est constante quelque

soit le domaine considéré et égal à 2 cm^{-1} . Les spectres sont obtenus après 96 accumulations dans le domaine M.I., et après 200 accumulations dans le domaine I.L. Les échantillons sont pastillés dans KBr pour la région $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ et dans le polyéthylène pour la région $600\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$.

4. Spectroscopie Raman

Deux types d'appareils ont été utilisés permettant une analyse macroscopique ou microscopique. Les radiations excitatrices sont celles d'un laser à argon ionisé (raie UV à 351,1nm et raies visibles comprises entre 457,9 nm et 514,5 nm), d'un laser à krypton ionisé (520,2 nm - 530,8 nm - 568,2 nm - 647,1 nm) et d'un laser à Hd-Cd (441,6 nm).

La forte irradiance produite par le faisceau laser au niveau de l'échantillon peut induire des phototransformations de nature chimique ou physique, ainsi qu'une destruction thermique surtout si la longueur d'onde excitatrice coïncide avec une bande d'absorption de l'échantillon comme dans le cas des métalloporphyrines. Nous indiquerons les précautions prises pour minimiser ces phénomènes.

a). Echantillon macroscopique

Les spectres Raman de ce type d'échantillons ont été obtenus avec un appareil Dilor RT.30 à triple monochromateur.

1.a). Etat solide

Pour éviter les problèmes de dégradation, les métalloporphyrines sont diluées dans une matrice de KBr dans le cas des composés μ -oxo ou de KCl pour les dérivés chlorés dans une proportion de 3 % en masse de produit. Cette dilution permet de minimiser l'absorption du faisceau laser et la réabsorption de la lumière diffusée. De plus, afin de diminuer le temps d'illumination de l'échantillon, nous avons utilisé le système du disque tournant. Le KBr ou KCl, finement broyé avec l'échantillon, est introduit puis aggloméré par pression ($4T/\text{cm}^2$) au fond d'une gorge circulaire comme indiqué sur le schéma suivant :

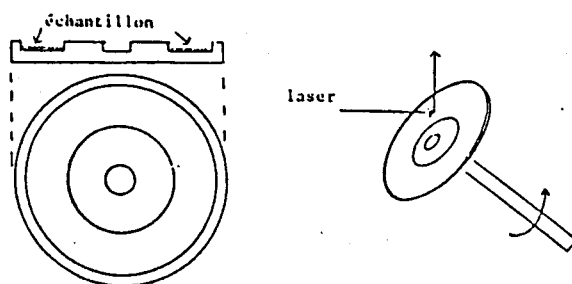


Figure 58 : Schéma du disque tournant

Pour déterminer les profils d'excitation des différents échantillons, un composé non absorbant, présentant une raie dont l'intensité sera prise comme référence interne doit être introduit avec l'échantillon. Nous avons choisi le K_2SO_4 qui présente une raie intense à 981 cm^{-1} , c'est-à-dire dans un domaine où les échantillons ne présentent pas de raies de diffusion. Le K_2SO_4 , introduit dans la proportion de 30 % est finement broyé avec le KBr (ou le KCl) et l'échantillon. Pour une longueur d'onde d'excitation (λ_0) et une raie Raman donnée observée à $x\text{ cm}^{-1}$, nous calculons la valeur $K_x(\lambda_0)$ qui représente le rapport d'intensité corrigé pour la raie Raman considérée. L'expression de $K_x(\lambda_0)$ est donnée par :

$$K_x(\lambda_0) = (I_x/I_{981})_{\text{exp}} \cdot [R(\lambda_{981})/R(\lambda_x)] \cdot (\lambda_x/\lambda_{981})^4 \cdot [A(\lambda_{981})/A(\lambda_x)]$$

$$\lambda_x = \lambda_0 + 10^7/x \quad , \quad \lambda_{981} = \lambda_0 + 10^7/981 - \lambda_x \quad , \quad \lambda_{981} \text{ en nm}$$

* $(I_x / I_{981})_{\text{exp}}$ est le rapport d'intensité mesuré

* $R(\lambda_{981})$ et $R(\lambda_x)$ sont des termes correctifs prenant en compte la réponse du détecteur et la transmission du monochromateur aux nombres d'onde x et 981 cm^{-1} . La fonction R est déterminée après avoir enregistré le spectre d'un mélange ternaire (K_2SO_4 , KNO_3 , KCN) présentant des raies caractéristiques à 981 , 1050 , 2070 cm^{-1} .

Après avoir pris comme référence l'intensité de la raie de K_2SO_4 avec la radiation excitatrice à 488 nm , les autres points de la courbe $R = f(\lambda)$ sont

déterminés par interpolation linéaire à l'aide des rapports I_{1050} / I_{981} et I_{2070} / I_{981} .

* Le rapport $\lambda_x^4 / \lambda_{981}^4$ correspond à la correction de la loi en diffusion en v^4 .

* le terme $A_{(\lambda_x)} / A_{(\lambda_{981})}$ prend en compte l'absorption de l'échantillon à λ_x et λ_{981} .

Ce terme n'a pas pu être déterminé avec exactitude. Cependant l'obtention de spectres à différentes concentrations a montré que les intensités relatives étaient conservées. Ce fait expérimental témoigne soit de la faible absorption, soit de la quasi égalité d'absorption pour les longueurs d'onde λ_x et λ_{981} , par notre échantillon. C'est pourquoi ce dernier facteur est négligé et pris égal à 1.

2.b). Etat liquide

L'enregistrement des spectres des échantillons en solution demande les mêmes précautions que pour l'étude des solides. Il s'agit de bien contrôler à la fois les phénomènes d'absorption et les échauffements provoqués par le faisceau laser. Une concentration voisine de $5 \cdot 10^{-3} M$, c'est-à-dire inférieure à la concentration optimale que l'on peut estimer pour de tels composés, ainsi que l'utilisation d'une cellule tournante permet de s'affranchir des phénomènes indésirables produits par le laser.

Après dissolution des dérivés μ -oxo dans $CHCl_3$ et exposition au faisceau laser, une modification des spectres d'absorption UV-visible a été observée, sans doute produite par une réaction photochimique. Au contraire, aucune modification n'a été observée en utilisant CS_2 comme solvant d'analyse.

En spectrométrie Raman, la mesure de polarisation peut s'effectuer de deux manières différentes :

- modifier la polarisation du faisceau excitateur et faire l'analyse globale de la lumière diffusée.
- maintenir constante la direction de polarisation du faisceau laser et effectuer l'analyse de la lumière diffusée suivant les deux directions.

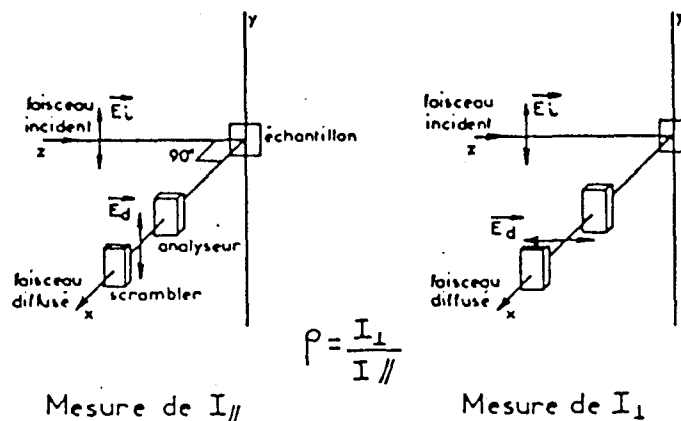


Figure 59 : Détermination du taux de dépolarisation

C'est cette dernière solution que nous avons utilisée en plaçant un analyseur devant la fente d'entrée du spectromètre. De plus un dépolariseur ("Scrambler") est placé derrière l'analyseur et permet de s'affranchir des problèmes de polarisation liés aux pièces optiques du monochromateur.

b). Echantillon microscopique

Les spectres des échantillons microscopiques ont été obtenus sur la microsonde Raman M.O.L.E. [102,103]. Le schéma de base de cet instrument (figure 60) comporte un microscope optique classique, un filtre optique à réseaux holographiques concaves et d'un système de détection monocanale.

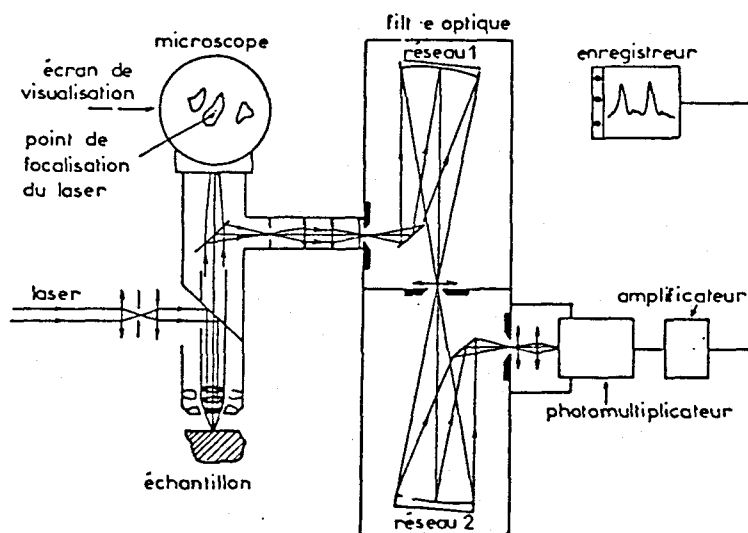


Figure 60 : Schéma de la M.O.L.E.

L'objectif du microscope focalise le faisceau laser sur l'échantillon et recueille la lumière diffusée qui est analysée par le filtre optique puis détectée par le photomultiplicateur.

Les problèmes de dégradation de l'échantillon sont plus importants en microspectrométrie Raman qu'en Raman conventionnel. La possibilité de focaliser le faisceau laser sur une très petite tache voisine du micron, provoque une densité photonique très élevée. De plus il n'est pas possible, sous l'objectif du microscope de procéder à un renouvellement rapide des molécules par utilisation de cellules à circulation ou tournantes. Les techniques utilisant la déflexion du laser dans le champ du microscope ne sont pas applicables si l'échantillon est hétérogène. Une estimation des phénomènes thermiques qui apparaissent quand une particule absorbante est irradiée par un laser, est difficile voire impossible. Elle nécessiterait une parfaite connaissance de la géométrie, des coefficients d'absorption, de la concentration et des propriétés thermiques (chaleur spécifique, conductivité thermique) de l'échantillon. Ces données ne sont pas toujours disponibles cependant, il est évident qu'un mauvais contact thermique et un support ou un milieu d'imprégnation de faible conductivité thermique peut conduire à une forte augmentation de température.

Pour pallier à ces phénomènes, l'utilisation d'un objectif à immersion d'eau est une possibilité car l'eau, très bon conducteur thermique, permet de diminuer localement la température de l'échantillon. Ce choix est d'autant plus adapté à notre étude que nos échantillons microscopiques (biologiques ou chimiques) à analyser sont en milieu aqueux. Nous avons donc entrepris dès lors, une série de tests sur des objectifs à immersion afin d'optimiser ce paramètre de la chaîne de mesure.

Cet objectif doit satisfaire à diverses conditions dont les principales sont énoncées ci-dessous :

- * Il ne doit pas présenter ni de fluorescence intrinsèque, ni de signal (ux) Raman. Ces phénomènes peuvent avoir comme origine la nature ou le traitement des pièces optiques constituant l'objectif.

* Il doit avoir une forte ouverture numérique afin de pouvoir collecter le maximum de signal sachant que le flux lumineux ϕ entrant dans le spectromètre peut être décrit par la relation

$$\phi = K \cdot P_o \cdot O^2 \quad (I) \quad \begin{array}{l} K : \text{constante caractéristique de l'échantillon} \\ P_o : \text{puissance à l'échantillon} \\ O : \text{ouverture numérique} \end{array}$$

* Il doit avoir un grossissement important afin de visualiser de très petites zones d'analyses.

A ces conditions peuvent s'ajouter, l'existence d'une correction de planéité pour avoir une image nette de la préparation ainsi qu'une correction achromatique suffisante pour avoir une bonne qualité photographique.

Trois objectifs à immersion disponibles sur le marché ont été testés. Les caractéristiques de ceux-ci sont indiquées ci-dessous.

Marque	Longueur de tube	Grossissement	Ouverture	Correction de lamelle
GOMO (1)	170	85	1	OUI
LEITZ	170	100	1,2	OUI
OLYMPUS	0	150	1,25	NON

(1) objectif URSS (Leningrad) OM-43 π

Nous avons testé la fluorescence et (ou) la présence de raies Raman, propres à l'objectif en examinant le spectre Raman d'une goutte d'eau déposée sur un miroir pour différentes radiations. La figure 60 représente les spectres obtenus à 514,5 nm ($P_o = 300$ mW).

Cette étude met en évidence que seul l'objectif Olympus ne présente ni diffusion Raman (raie pour l'objectif Gomo vers 950 cm^{-1}), ni émission de fluorescence (cas du Leitz).

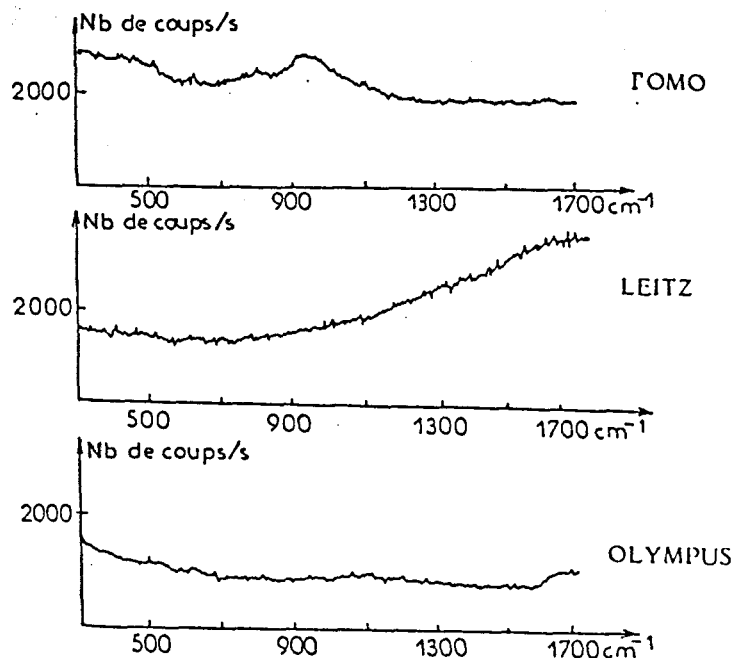


Figure 60 : Test de fluorescence et de Raman des objectifs

Afin d'évaluer l'influence de l'ouverture numérique de chaque objectif sur le rapport signal sur bruit (S/B), des mesures sont effectuées en un même point d'une lame de silicium, en examinant la raie caractéristique de celui-ci à 520 cm^{-1} . En effet, dans les mêmes conditions d'analyse (même échantillon, même puissance P_0), la formule (1) prévoit que la variation du rapport S/B d'un objectif à un autre est proportionnelle au carré de l'ouverture numérique. Le tableau ci-dessous résume nos résultats :

	Expérimental	Théorique
$(S/B)_{Leitz} / (S/B)_{Tomo}$	1,5	1,44
$(S/B)_{Olympus} / (S/B)_{Tomo}$	2,3	1,56

Alors qu'il y a un bon accord pour les mesures réalisées avec l'objectif Leitz, une valeur expérimentale très supérieure est observée pour l'objectif Olympus. Ce gain de S/B témoigne de la bonne adaptabilité de celui-ci à la M.O.L.E. En effet, l'optique d'couplage microscope-spectromètre de la M.O.L.E. est prévu pour un objectif corrigé à l'infini, ce qui est le cas de l'objectif Olympus.

L'objectif Olympus MSPL APO150/1,25WI a donc été choisi pour notre étude. Il a été utilisé avec de l'eau milli Q. Les conditions de puissance du laser indiquées sur nos figures seront non pas celles à l'échantillon (la distance frontale est trop courte pour faire une mesure), mais celles mesurées au niveau du révolver du microscope, c'est-à-dire avant l'objectif.

II - SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COMPOSES MODELES

1. La chloroferritétraphénylporphyrine : TPPFeCl

1g de TPPH₂ (Fluka) et 400mg de chlorure ferreux (Prolabo), FeCl₂.4H₂O , sont dissous dans 85 ml de DMF. Le mélange est mis à reflux à 130°C-140°C pendant une heure. Le résidu solide, obtenu après évaporation du DMF est chromatographié sur colonne de silice (70-230mesh-50g) en utilisant CHCl₃ pour éliminer la base libre résiduelle. Ceci fait, on élue par addition de méthanol (5% puis 10% dans CHCl₃). Le produit recueilli est dissous dans 200 ml de CHCl₃ et mélangé avec 200 ml d'une solution d'HCl (1N). On s'est assuré qu'un tel traitement ne conduise pas à une démétallation partielle en C.C.M. La TPPFeCl est recueillie après lavage jusqu'à neutralité, séchage sur MgSO₄ et évaporation de la phase chloroformique. Le produit est séché sous vide à 60°C.

UV : 370 nm - 420 nm - 510 nm - 576 nm - 654 nm - 687 nm (CHCl₃)

2. Synthèse de la chloroferrideutéroporphyrine diméthylester : DPDEFcCl

4g de chlorohémine (Aldrich) et 12g de résorcinol (Aldrich) sont intimement mélangés et placés au four à 220°C pendant 15 minutes. On laisse le mélange se refroidir jusqu'à température ordinaire puis on le lave avec 200 cc d'éther éthylique pour éliminer l'excès de résorcinol. Le mélange est dissous dans 500 cc de méthanol, auquel on ajoute 25 ml de H₂SO₄ (36N). On laisse reposer une nuit, à température ordinaire, le mélange. Celui-ci est jeté sur la glace et neutralisé par du bicarbonate. Le produit obtenu après extraction au chloroforme, lavage jusqu'à neutralité de cette phase, séchage sur MgSO₄ , et chromatographié deux fois sur silice (130g) en éluant avec du chloroforme puis un mélange chloroforme-méthanol (99%-1%).

UV : 375 nm - 500 nm - 530 nm - 630 nm (CHCl₃)

IR : $\nu(\text{Fe-Cl})$: 344 cm⁻¹

3. Synthèse de la chloroferriprotoporphyrine diméthylester : PPDEFcCl

2g d'hémine (Aldrich) sont dissous dans 300 ml de méthanol et 15 ml de

H_2SO_4 (36N). Le mode opératoire est le même que celui décrit précédemment pour l'estérification de la deutéroporphyrine.

UV : 385 nm - 510 nm - 540 nm - 640 nm

IR : $\nu(Fe-Cl)$: 341 cm^{-1}

4. Démétallation de la DPDEFcCl et de la PPDEFcCl

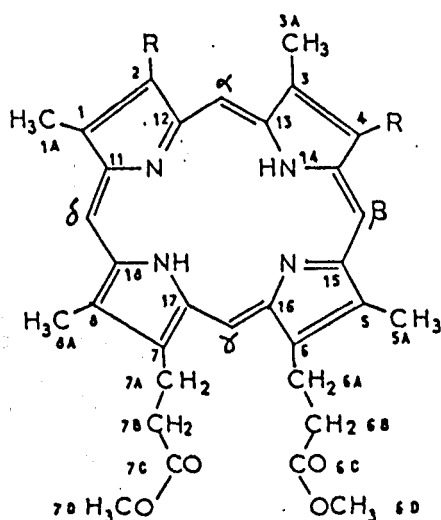
150 mg de porphyrine de fer sont dissous dans 1,5 ml de pyridine. La solution est reprise par 15 ml de chloroforme et 15 ml de méthanol, à laquelle on ajoute 3 g de sulfate ferreux ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$). On agite sous courant gazeux d' HCl pendant 3/4 heure. La solution est neutralisée par un mélange eau-ammoniaque (90%-10%). Le résidu à sec, obtenu après évaporation, est chromatographié sur colonne de silice (40g) en utilisant les systèmes suivants : 10ml de C_6H_6 - 40ml de $C_6H_6 / CHCl_3$ (90%-10%) - 60ml de $C_6H_6 / CHCl_3$ (50%-50%).

UV : - DPDE 394 nm - 495 nm - 525 nm - 565 nm - 618 nm

- PPDE 408 nm - 508 nm - 546 nm - 577 nm - 630 nm

RMN : $R_2 = R_4 = H$ DPDE

$R_2 = R_4 = -CH=CH$ PPDE



^1H DPDE : 1A,3A : 3,35-3,41 ; 2A,4A : 8,79-8,92 ; 5A,8A : 3,43-3,53 ;
6A,7A : 4,17-4,2 ; 6B,7B : 3,13-3,15 ; 6D,7D : 3,60-3,61 ;
 $\alpha, \beta, \nu, \delta$: 9,70-9,72-9,75 ; N-H : -4,36

PPDE : 1A,3A : 3,45-3,46 ; 2A,4A : 8,18-8,13 ; 2B,4B : 6,13-6,30 ;
5A,8A : 3,53-3,54 ; 6A,7A : 4,32 ; 6B,7B : 3,23 ; 6D,7D : 3,64 ;
 $\alpha, \beta, \nu, \delta$: 9,88-9,99 ; N-H : -4

^{13}C DPDE : 1,3-2,4-5,8-6,7 : 139,8-128,4-136,3-138,2 ; 11 à 18 : 144(large) ;
 $\alpha, \beta, \nu, \delta$: 99,9-99,1-96,7-95,6 ; 1A,3A : 13,5 ; 5A,8A : 11,4 ;
6A,7A : 21,7 ; 6B,7B : 36,9 ; 6C,7C : 173,4 ; 6D,7D : 51,6

PPDE : 1,2,3,4,5,6,7,8 : 137,8-137,3-139,2 ; 11 à 18 : 144(large) ;
 $\alpha, \beta, \nu, \delta$: 98,7-98,3-97,2-96,6 ; 1A,3A : 12,7 ; 2A,4A : 130,4 ;
2B,4B : 120,3 ; 5A,8A : 11,7 ; 6A,7A : 21,8 ; 6B,7B : 36,5 ;
6C,7C : 173,8 ; 6D,7D : 51,8

5. Synthèse des composés μ -oxo : $(\text{PPDFe})_2\text{O}$, $(\text{DPDFe})_2\text{O}$, $(\text{TPPFe})_2\text{O}$

a). Synthèse normale

200mg de chloroferriporphyrine sont dissous dans 60ml de chloroforme, 50ml d'une solution aqueuse de KOH (25% massique) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1/2 heure à température ordinaire. L'extrait solide est recueilli après lavage, séchage sur MgSO_4 et évaporation de la phase chloroforme.

	$(\text{PPDFe})_2\text{O}$	$(\text{DPDFe})_2\text{O}$	$(\text{TPPFe})_2\text{O}$
UV (CHCl_3)	400nm-575nm-595nm	390nm-550nm-580nm	414nm-582nm-612nm
IR $\nu_{\text{as}}(\text{Fe-O-Fe})$	895 cm^{-1}	849 cm^{-1}	890 cm^{-1} - 874 cm^{-1}

b). Synthèse isotopique

La préparation de soude enrichie par l' ^{18}O , se fait par insertion de sodium dans de l'eau marquée à l' ^{18}O . La préparation de la soude se fait sous atmosphère d'argon sec, en présence de P_2O_5 . Il faut veiller à bien rincer le sodium par de l'éther éthylique, préalablement séché sur tamis moléculaire, afin d'éliminer toute trace d'huile susceptible de générer un fond de fluorescence en spectroscopie Raman. Le dérivé μ -oxo s'obtient par réaction de la soude Na^{18}OH (150mg de Na sont mis dans 2g d'eau H_2^{18}O) sur le dérivé chloré, sous atmosphère d'argon sec. Le chloroforme utilisé a été préalablement dégazé et passé sur alumine basique. La fin de réaction est suivie en UV par disparition de la bande du dérivé chloré à 630 nm.

	$(\text{TPPFe})_2^{18}\text{O}$	$(\text{DPDEFc})_2^{18}\text{O}$
IR	833 cm^{-1}	792 cm^{-1}
UV	analogue aux composés à l' ^{16}O	

c). Synthèse du gel

a) Fixation de l'hématine

L'hématine est liée au Sépharose 4B (pharmacia) par l'intermédiaire d'un bras (hexane diamine -1,6) selon le protocole de Olsen [104].

L'agarose activé par CNBr (1,5g) est incubé en présence de diaminohexane (0,5g) dans un tampon bicarbonate de sodium (10 ml ; 0,2M ; pH = 10) pendant 15mn à 4°C. Après lavage, le gel est mis en suspension dans le DMF (20ml) puis additionné d'une solution d'hématine (12,5mg) dans le DMF (7,5ml). Enfin, on ajoute la carbodiimide [Ethyl - 1 (diméthylamino - 3 propyl) - 3 carbodiimide] (320mg) dans un mélange DMF H_2O (1/1). Le pH est maintenu à 4,7. Après 18 heures, la réaction est arrêtée en ajustant le pH à 7,5 et le gel soigneusement lavé avec du DMF puis du tampon phosphate (0,1M ; pH=7).

b) Préparation de l'empilement

1g de gel sec est repris dans 20ml de tampon phosphate (pH=7,4). Une solution d'hématine (5mg dans 1ml de soude 0,01N) est ajoutée à la suspension précédente, agitée doucement pendant 1/2 heure. Le gel est filtré, lavé jusqu'à pH constant et conservé dans un tampon phosphate (pH=7).

III - LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

1. Les globules rouges

Les hématies, obtenues suite à des prélèvements de sang, sont fixées au méthanol sur une lame de verre. Elles sont analysées ensuite, directement en microspectrométrie Raman, par immersion en milieu aqueux (eau milli Q). Les conditions opératoires seront spécifiées sur chacun des spectres car celles-ci dépendent énormément de la radiation excitatrice utilisée.

2. Le pigment malarique

Le pigment malarique, résidu de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite est obtenu à partir de culture de Plasmodium Falciparum in vitro

L'isolat FCR₃ est entretenu in vitro selon la méthode de Trager et Jensen [105]. Cet entretien est effectué à l'aide de globules rouges O⁺, en milieu de culture RPMI 1640 - HEPES (25mM) - NaHCO₃ (28,5mM) - Gentamycine (10mg/l) additionné de 10 % de sérum humain A⁺. Les cultures sont placées à 37°C en atmosphère 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂.

Les cultures sont réalisées dans des flacons de 30ml à un hématocrite de 3 % lorsque la parasitémie atteint 10 %, le milieu de culture est récolté et centrifugé. Le culot obtenu à 2000g, est lavé 3 fois à l'eau Milli Q et conservé congelé à -80°C (10mg de résidu par boîte).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hamor M.J., Hamor J.A., Hoard J.L. : *J. Am. Chem. Soc.*, 86-1938-(1964)
- [2] Little R.G., Ibers J.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 97-5363-(1975)
- [3] Caughey W.S., Ibers J.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 99-6639-(1977)
- [4] Tulinsky A. : *Ann. NY. Acade. Sci.*, 47-(1973)
- [5] Adler A.D., Longo F. : *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 32-2443-(1970)
- [6] Hamor M.J., Hamor J.A., Caughey W.S., Hoard J.L. : *J. Am. Chem. Soc.*, 87-2312-(1965)
- [7] Koenig D.F. : *Acta. Cryst.*, 18-666-(1965)
- [8] Hoard J.L., Scheidt W.R. : *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.A.*, 70-3929-(1973)
- [9] Scheidt W.R., Kastner M.E., Mashiko T., Reed A.C. : *J. Am. Chem. Soc.*, 100-666-(1978)
- [10] Collman J.P., Hoard J.L., Kim N., Lang G., Reed C.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 97-2676-(1975)
- [11] Countryman R., Collins D.M., Hoard J.L. : *J. Am. Chem. Soc.*, 91-5166-(1969)
- [12] Radonovich L.J., Bloom A., Hoard J.L. : *J. Am. Chem. Soc.*, 94-2073-(1972)
- [13] Scheidt W.R., Reed A.C. : *Chem. Rev.*, 81-543-(1981)
- [14] Scheidt W.R., Geiger D.K., Hayes R.G., Lang G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 105-2625-(1983)
- [15] Scheidt W.R., Cohen I.A., Kastner M.E. : *Biochem.*, 18-3546-(1979)
- [16] Perutz : *Nature*, 228-226-(1970)
- [17] Jones R.D., Summerville D.A., Basolo F. : *Chem. Rev.*, 796-139-(1979)
- [18] Melson G.A. : "Coordination chemical of macrocyclic compounds", 621-(1979)
- [19] Collman J.P., Gagne R.R., Habert T.R., Marcham J.C., Reed C.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 95-7868-(1973)
- [20] Momentau M., Scheidt W.R., Eigenbrot C.W., Reed C.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 110-1207-(1988)
- [21] Collman J.P., Brauman J.I., Doxsee K.M. : *J. Am. Chem. Soc.*, 102-4182-(1980)
- [22] Jameson G.B., Molinaro F.S., Ibers J.A., Collman J.P., Brauman S.I., Rose E., Suslick K.S. : *J. Am. Chem. Soc.*, 109-3224-(1980)

- [23] Scheidt W.R., Chipman D.M. : *J. Am. Chem. Soc.*, 108-1163-(1986)
- [24] Collman J.P., Brauman J.I., Doxsec K.M., Sessler J.L., Morris R.M., Gilson Q.H. : *Inorg. Chem.*, 22-1427-(1983)
- [25] Traylor T.G., Koga N., Dearduff L.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 107-6504-(1984)
- [26] Balch A.L., Chan Y.W., Cheng R.J., La Mar G.N., Latos - Grazynski L., Renner M. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, 106-7779-(1984)
- [27] Paeng I.R., Shiwaku H., Nakamdo K. : *J. Am. Chem. Soc.*, 110-1995-(1988)
- [28] Balch A.L., La Mar G.N., Latos-Grazynski L., Renner M.W., Thannabal V. : *J. Am. Chem. Soc.*, 107-3003-(1985)
- [29] Schappacher M., Chottard G., Weiss R. : *J. Chem. Society. Chem. Commun.*, 93-(1986)
- [30] Hoffman A.B., Collins D.M., Day V.W., Hoard J.L. : *J. Am. Chem. Soc.* 94-3620-(1972)
- [31] Murray K.S. : *Coord. Chemist. Review*, 12-1-(1974)
- [32] Felton R.H., Harel Y. : *J. Chem. Society. Chem. Commun*, 206-(1984)
- [33] Janson J.R., Katz : *The Porphyrins, Volume IV*-20-(1978)
- [34] Landrum J.L., Grumett D., Haller K.J., Scheidt W.R., Reed C.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 103-2640-(1981)
- [35] Cheng R.J., Grazynski L.L., Balch. A. : *Inorg. Chem.*, 21-2412-(1982)
- [36] Fleisher E.B., Palmer J.M., Srivastava T.S., Chatterjee A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 93-3162-(1971)
- [37] Stong J.D., Hartzell R. : *Bioinorg. Chem.*, 5-219-(1976)
- [38] Shibata K., Inada Y. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 9-323-(1962)
- [39] Blauer G., Zvilichovsky G. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 127-749-(1968)
- [40] Silver J., Lukas B. : *Inorg. Chim. Acta.*, 78-219-(1983)
- [41] Miller J.R., Taves J.A., Silver J. : *Inorg. Chim. Acta.*, 138-205-(1987)
- [42] Brown S.B., Dean T.C., Jones P. : *Biochem. J.*, 117-733-(1970)
- [43] Cohen I.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 91-1980-(1969)
- [44] Sadasivan N., Eberspaecher H.I., Fuchsman W.H., Caughey W.S. : *Biochem.*, 534-(1969)
- [45] Longuet-Higgins H.C., Rector C.W., Platt J.R. : *J. Chem. Phys.*, 18-1174-(1950)
- [46] Simpson W.T. : *J. Chem. Phys.*, 17-1218-(1949)
- [47] Gouterman M. : *J. Chem. Phys.*, 30-1139-(1959)

- [48] Rousseau D.L., Bauman R.P., Porto S.P.S. : *J. Raman Spectrosc.* 10-281-(1981)
- [49] Ohno K., Tanabe Y., Sasaki F. : *Theoret. Chim. Acta.*, 1-378-(1963)
- [50] Zerner M., Gouterman M., Kobayashi H. : *Theoret. Chim. Acta*, 6-363-(1966)
- [51] Gouterman M. : *J. Mol. Spectrosc.*, 6-138-(1961)
- [52] Gouterman M., Hanson L.K., Khalil G.E., Buchler J.W., Dolphin D. Rohbock K., Dolphin D. : *J. Am. Chem. Soc.*, 97-3142-(1975)
- [53] Spellane P.J., Gouterman M., Antipas A., Kim S., Liu Y.C. : *Inorg Chem.*, 19-386-(1980)
- [54] Spiro T.G., Streckas T.C. : *J. Am. Chem. Soc.*, 96-388-(1974)
- [55] "Spectroscopy of biological systems" Vol 13- Chap. 7-(1986) édité par Clark R.J.H., Hester R.E.
- [56] Spiro T.G. : "Biological applications of Raman spectroscopy", Ed : Wiley-Interscience, Vol 3-(1987)
- [57] Abe M., Kitagawa T., Kyogoku Y. : *J. Chem. Phys.*, 69 4526 (1978)
- [58] Willems D.L., Bocian D.F. : *J. Am. Chem. Soc.*, 106-880-(1984)
- [59] Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., la Mar G.N. : *J. Am. Chem. Soc.*, 104-4345-(1982)
- [60] Sarkar M., Verma A.L. : *J. Raman Spectrosc.*, 17-407-(1986)
- [61] Gladkov L.L., Solovyov K.M. : *Spectrosc. Lett.*, 19-905-(1986)
- [62] Shelnut J.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 105-774-(1983)
- [63] Burke J.M., Kinkaid J.R., Spiro T.G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 100-6077-(1978)
- [64] Bocian D.F., Hofmann J.A. : *Inorg. Chem.*, 23-1177-(1984)
- [65] Bocian D.F., Schick G.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 105-1830-(1983)
- [66] Chottard G., Battioni P., Battioni J.P., Lange M., Mansuy D. : *Inorg. Chem.*, 20-1718-(1981)
- [67] Stein P., Ulman A., Spiro T.G. : *J. Phys. Chem.*, 88-365-(1984)
- [68] Choi S., Spiro G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 105-3683-(1983)
- [69] Mitchell M.L., Li X.Y., Kinkaid J.R., Spiro T.G. : *J. Phys. Chem.*, 91-4690-(1987)
- [70] Hester R.E., Groot J. : *J. Phys. Chem.*, 91-7-(1986)
- [71] Smulevich G., Spiro T.G. : *J. Phys. Chem.*, 89-5168-(1985)
- [72] Boldt N.J., Bocian D.F. : *J. Phys. Chem.*, 192-581-(1988)

- [73] Ercolani C., Giordani M., Murray K.S., Pennesi G., Rossi G. : *Inorg. Chem.*, 23-1972-(1986)
- [74] Scheidt W.R., Summeville D.A., Cohen I.A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 98-6623-(1976)
- [75] Wing R.M., Callahan K.P. : *Inorg. Chem.*, 8-871-(1969)
- [76] Fielding L., Eaton G.R., Eaton S.S. : *Inorg. Chem.*, 24-2309-(1985)
- [77] Plowman E.P., Loehr T.M., Loehr S.T. : *J. Am. Chem. Soc.*, 106-4051-(1984)
- [78] Tatsumi K., Hoffman R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 103-3328-(1981)
- [79] Anderson L.A., Loehr T.M., Chang C.K., Marck A.G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 107-182-(1985)
- [80] Keeffe D.H., Barlow C.H., Smythe G.A., Fuchsman W.H., Caughey W.S. : *Bioinorg. Chem.*, 5-125-(1975)
- [81] Pathasarthi N., Hansen C., Yamaguchi S., Spiro T.G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 109-3865-(1987)
- [82] Stong J.D., Spiro T.G., Kubaska R.J., Shupack S.I. : *J. Raman Spectrosc.* 9-312-(1980)
- [83] Sonnich Mortensen O., Hassing S. : "Advances in infrared and Raman Spectroscopy", vol. 6 -Chap. 1-(1980), édité par Clark R.G.H. and Hester R.E..
- [84] Hamaguchi H. : "Advances in infrared and Raman Spectroscopy", vol. 12 - Chap. 6-(1985) édité par Clark R.G.H. et Hester R.E.
- [85] Clark R.G.H., T.G. Dines : *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 25-131-(1986)
- [86] Schweitzer - Stenner R., Dreybrodt W. : *J. Raman Spectrosc.*, 16-111-(1985)
- [87] Zgierski M.Z. : *J. Raman Spectrosc.*, 19-23-(1988)
- [88] Helms G.H., Ter Haar L.W., Hatfield W.E., Harris D.L., Jayaroy K., Toney C.E., Gold A., Mewborn T.D., Pemberton G.R., : *Inorg. Chem.*, 25-2334-(1986)
- [89] Rieson H., Güdel H.U. : *Inorg. Chem.*, 25-3566-(1986)
- [90] Guest C.R., Straub K.D., Hutchinson G.A., Rentzepis P.M. : *J. Am. Chem. Soc.*, 110-5276-(1988)
- [91] Chou C.A., Chevli R., Fitch C.D. : *Biochem.*, 19-1543-(1980)
- [92] Harada I, Takeuchi H. : "Spectroscopy of Biological Systems", Vol. 13 - Chap.3-(1986), édité par Clark R.J.H. et Hester R.E.
- [93] Spiro T.G., Burke J.M. : *J. Am. Chem. Soc.*, 98-5482-(1976)
- [94] Bauminger E.R., Yagon A., Ofer S. Ginsburg H. : *Hyperfine Interact.*, 15/16-885-(1983)

- [95] Mitchell M.L., Campbell D.H., Traylor T.G., Spiro T.G. : *Inorg. Chem.*, 24-967-(1983)
- [96] Shelnutt J.A. : *Inorg. Chem.*, 22-2535-(1983)
- [97] Choi S, Lee J.J., Wei Y.H., Spiro T.G. : *J. Am. Chem. Soc.*, 105-3692-(1983)
- [98] Desbois A., Mazza G., Stetzkowski F., Lutz M. : *Biochem. Biophys. Acta.* 785-148-(1984)
- [99] Sibett S.S., Loehr T.M., Hurst J.K. : *Inorg. Chem.*, 25-307-(1986)
- [100] Moreau S., Perly B., Chachaty C., Deleuze C. : *Biochem. Biophys. Acta.*, 107-116-(1985)
- [101] Adams P.A., Adams C., Baldwin D.A. : *J. Inorg. Biochem.*, 28-441-(1986)
- [102] Delhaye M., Dhamelincourt P. : *J. Raman Spectroc.*, 3-33-(1975)
- [103] Dhamelincourt P. : *Thèse d'Etat-Lille*-(1979)
- [104] Olsen K. : *Anal. Biochemi.*, 109-250-(1980)
- [105] Trager W., Jensen J.B. : *Science*, 193-673-(1976)

