

N° d'ORDRE : 494

50376

1990

61

40368

50376

1990

61

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

par

Kamel CHERIFI

SYNTHÈSE D'OLIGOPEPTIDES SOUFRES ET ETUDE DE LEUR COMPLEXATION PAR DES CATIONS METALLIQUES



Soutenue le 16 février 1990 devant la Commission d'Examen

A. GARNIER-SUILLEROT

Présidente et Rapporteur

A. TARTAR

Rapporteur

P. DECOCK

Examinateur

H. KOZLOWSKI

Examinateur

A. LABLACHE-COMBIER

Examinateur

C. LOUCHEUX

Examinateur

A mes Parents,

En hommage affectueux et reconnaissant
pour leurs sacrifices et leur confiance.

A Renia, ma femme

En reconnaissance de son dévouement, de sa
patience et en témoignage de ma profonde affection.

A toute ma Famille

A tous ceux qui me sont chers

Je voudrais évoquer avec émotion et regret la mémoire de *Madame Brigitte DECOCK*, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, prématurément disparue en Novembre 1988. Madame DECOCK m'a donné le thème de ce travail, elle a guidé mes premiers pas dans la Recherche et a su me faire partager son enthousiasme.

Témoignage de Ma Reconnaissance.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois où Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX, Directeur du Laboratoire, a bien voulu m'accueillir.

Je remercie,

Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, pour avoir suivi mon travail et donné ses conseils lors de la rédaction de celui-ci. Son enthousiasme et sa totale confiance ont été pour moi une incitation de tous les jours et un encouragement constant pour mener à bien ce travail.

Madame A. GARNIER, Professeur à l'Université de Paris XIII, de bien avoir voulu juger ce travail et de présider le jury de cette thèse.

Monsieur A. TARTAR, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille, d'avoir bien voulu être rapporteur et participer au jury. Je lui exprime ma gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à mon travail et de participer au jury.

Monsieur P. DECOCK, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, pour avoir porté un

grand intérêt à ce travail et d'y avoir apporté critiques et conseils.

Monsieur H. KOZLOWSKI, Professeur à l'Université de Wroclaw (Pologne) pour les conseils et l'aide qu'il m'a prodigués et la constante assistance qu'il m'a apporté tout au long de mon travail. L'intérêt et la persévérance qu'il a manifestés ont contribué à l'élaboration et à la réalisation de cette thèse.

Je remercie **Monsieur I. SOVAGO**, Professeur à l'Université Lajos Kossuth à Debrecen (Hongrie) pour la réalisation des études potentiométriques.

Je remercie également les camarades de Laboratoire qui m'ont apporté leur soutien et plus particulièrement **J.F. GALEY** et surtout **S. DJEMIL**.

Je remercie encore **Madame M. SENA**, pour la dactylographie soignée, **Madame A.M. CAZE**, pour ses conseils et son aide à la réalisation des schémas, **Mesdames L. SAINLEGER** et **N. MOLET** pour l'impression et la mise en page de ce mémoire.

Je remercie enfin tous ceux qui m'ont aidé dans ce travail et dont je ne saurais citer tous les noms ici.

SYNTHESE D'OLIGOPEPTIDES SOUFRES ET ETUDE DE LEUR COMPLEXATION PAR DES CATIONS METALLIQUES

INTRODUCTION

CHAPITRE I

I - PRINCIPES GENERAUX DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE

A/ Protection des fonctions	6
1°/ Protection de la fonction COOH terminale	6
a) Les esters d'alkyles	6
b) Les esters benzyliques	7
2°/ Protection de la fonction N-terminale	7
a) Le groupe benzyloxycarbonyle (Z)	7
b) Le groupe tertibutyloxycarbonyle (tBoc)	9
3°/ Protection des thiols dans la synthèse peptidique	10
a) Préparation des thioéthers.	10
b) Les autres groupes protecteurs des thiols	14
B/ Méthodes de couplage	18
1°/ Synthèse par la méthode aux anhydrides mixtes.	18
2°/ Synthèse par la méthode à la DCCI	19
a) Méthode directe	20
b) Méthode aux esters actifs.	20
C/ Les différents types de synthèses	22
1°/ Phase liquide	22
2°/ Synthèse en phase solide	23
D/ La racémisation	25
E/ Techniques Analytiques	27

F/ Purification	27
II - DESCRIPTION DES SYNTHESSES	
A/ Schéma général	28
B/ Synthèse des produits de départ	32
1°/ Préparation du S-Triphenylmethyl-L-Cysteine	32
2°/ Préparation du Boc B.Trityl-Cys, du Boc-Ala et du Boc-Phe	32
3°/ Préparation de l'ester actif du Boc S.Trityl-L-Cys, du Boc-Ala et du Boc-Phe	33
4°/ Couplage	33
5°/ Coupure du groupe Boc	34
6°/ Coupure du triphénylméthyl par l'argent	34
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - Chapitre I	36

CHAPITRE II

A/ RAPPELS THEORIQUES	40
I - ETUDE THEORIQUE DES TRANSITIONS ELECTRONIQUES DES CHROMOPHORES DU LIGAND	40
1°/ Le chromophore amide	40
2°/ Le chromophore acide	41
3°/ Le chromophore amine	41
4°/ Les chromophores soufrés	42
5°/ Le chromophore aromatique	42
II - ETUDE THEORIQUE DES TRANSITIONS ELECTRONIQUES DANS LES COMPLEXES METALLIQUES.	43
1°/ Transition électronique du métal	43
2°/ Transitions électroniques par transfert de charge	47
III - SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE.	49
IV - DICHROISME CIRCULAIRE	50
V - ETUDE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.)	54
VI - LA POTENTIOMETRIE	57
1°/ Généralités	57
2°/ Applications aux peptides et à leurs complexes.	59
3°/ Principe du calcul des constantes de stabilité	63
4°/ Partie expérimentale	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - Chapitre II	66

CHAPITRE III

INTRODUCTION	68
A/ GENERALITES	69
B/ ALA-CYS et PHE-CYS	70
C/ ALA-ALA-CYS	106
D/ CYS-ALA-ALA-CYS	120
E/ CYS-ALA-CYS	135
CONCLUSION	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - Chapitre III	152

CHAPITRE IV

INTRODUCTION	154
A/ GENERALITES	155
B/ ALA-CYS et PHE-CYS	160
C/ ALA-ALA-CYS	181
D/ CYS-ALA-CYS ET CYS-ALA-ALA-CYS	192
CONCLUSION	211
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - Chapitre IV	212

CHAPITRE V

INTRODUCTION	213
ETUDES DES COMPLEXES DU ZINC (II), COBALT (II) et CADMIUM (II)	214
CONCLUSION	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - Chapitre V	226
CONCLUSION	227

INTRODUCTION

ainsi accéder à des phénomènes fondamentaux, indécélables expérimentalement sur une protéine originale. Les di-, tri-, tétra-peptides constituent un modèle acceptable pour une première approche.

Les premiers travaux ont concerné les peptides Cys-Gly, Gly-Cys et Gly-Gly-Cys (14). On a observé que la complexation de la cystéine avec Ni(II), le dipeptide Cys-Gly donne un complexe de type Ni_2A_4 (A est le dianion cystéine) alors que le dipeptide Gly-Cys forme un complexe NiA_2H_2 . Quant au tripeptide Gly-Gly-Cys, il donne un complexe octaédrique $NiAH$ et un complexe plan $NiAH_2$. La complexation de ces peptides avec le palladium (II) a permis de confirmer l'existence de bandes de transfert de charge S Pd(II).

Pour compléter cette étude, la stratégie du travail que nous avons mené comporte les étapes successives suivantes :

1 - Choix des systèmes peptidiques soufrés modèles à synthétiser pour obtenir les renseignements structuraux désirés. Nous avons choisi : Ala-Cys et Phe-Cys pour étudier le rôle de la chaîne latérale du premier acide aminé dans la complexation puis Ala-Ala-Cys afin de comprendre le rôle d'une chaîne peptidique plus longue dans la complexation, enfin des peptides modèles des métallothionéines : Cys-Ala-Cys et Cys-Ala-Ala-Cys.

2 - Synthèse en phase homogène de ces cinq peptides où l'on s'est particulièrement penché sur la protection et déprotection de la fonction thiol ; puis caractérisation des produits obtenus.

3 - Etude spectroscopique des complexes ; nous avons pour cela choisi les métaux suivants : nickel (II) et palladium (II) pour lesquels on a utilisé la spectroscopie électronique, le dichroïsme circulaire et la R.M.N. à haut champ (400 MHz).

4 - Etude potentiométrique pour déterminer les constantes de stabilité des complexes et leur distribution en fonction du pH. Ces études ont non seulement été menées avec Ni(II) et Pd(II) mais aussi avec le Zinc (II), le Cobalt (II) et le Cadmium (II) pour lesquels une étude comparative a été effectuée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

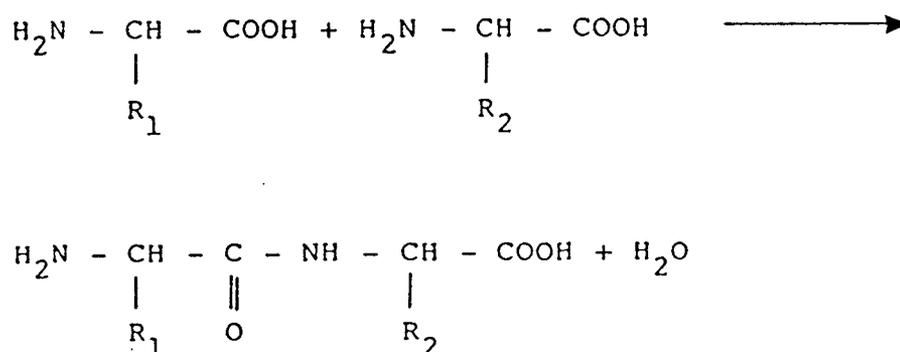
- (1) B.A. AVERILL et W.H. ORME JOHNSON
Metal ions in Biol. Systems Vol. 7 p 127 (1978)
- (2) E.I. SOLOMON, K.W. PENSFIELD et D.E. WILCOX
Structure and bonding 53, 1 (1983)
- (3) D.L. TENNENT et D.R. Mac MILLIN
J.A.C.S. 101, 2307 (1979)
- (4) B. SARKAR
Chemica Scripta 21, 101 (1983)
- (5) A.L. ZWILLING et K.W. KOHN
Pharmacologie principles of Cancer Treatment
Chabner B. (Ed.) pp 309-339 (1982)
W.B. Saunders Co, Philadelphia Pa
- (6) B. ROSENBERG, L. VAN CAMP, J.E. TROSKO et V.H. MANSOUR
Nature 222, 385 (1969)
- (7) B.L. VALLE in *Metallothionein*, J.H.R. Kägi and M. Nordberg, eds,
19, Birkhäuser, Basel, (1979)
- (8) A. HATA, H. TSUNOO, H. NAKAJIMA and M. KIMURA, *Toxicol. Lett.*,
1978, 2, 45
- (9) A. MURASAGI, C. WADA and Y. HAYASHI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 103, 1021
- (10) A. MURASAGI, C.W. NAKAGAWA and Y. HAYASHI,
J. Biochem., 1984, 86, 137
- (11) E. GRILL, E.L. WINNACHKER and M.H. ZENK
Science, 1985, 230, 674
- (12) K.C. TAYLOR, L.G. ALBRIGO and C.D. CHASE,
J. Am. Soc. Hort. Sci., 1988, 113, 407
- (13) A.B. TOMSETT and D.A. THURSMAN, *Plant, Cell and Environment*,
1988, 11, 383
- (14) Damien FICHEUX, *Thèse Université de Lille I*, 1986

CHAPITRE I

PRINCIPES GENERAUX DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE

I - PRINCIPES GENERAUX DE LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

La synthèse peptidique consiste à faire réagir deux molécules d'acide aminé $H_2N-CH(R)-COOH$ en formant une liaison amide $-CO-NH-$, selon le schéma suivant :



A l'état libre, les acides aminés existent sous forme de zwitterions $H_3N^+-CH(R)-COO^-$ et sont très peu réactifs. Tout le problème consiste donc, d'une part à protéger la (ou les) fonction(s) qui ne doit (doivent) pas réagir, et d'autre part à activer la fonction (carboxyle ou aminée) impliquée dans la formation de la liaison amide.

Trois étapes sont donc nécessaires pour la formation de la liaison amide :

- ♣ la protection des fonctions non réactives,
- ♣ le couplage lui-même, qui nécessite l'activation des fonctions acide ou amine et la présence d'agent de couplage,
- ♣ la déprotection de tous les groupements du peptide formé, suivie de purifications.

A/ PROTECTION DES FONCTIONS

Elle est nécessaire pour neutraliser la réactivité des fonctions n'intervenant pas directement dans le processus de la formation de la liaison peptidique. Elle permet d'éviter la polycondensation des acides aminés due à leur caractère au moins bifonctionnel. Ceci est obtenu par introduction de groupes protecteurs. Ces derniers doivent présenter certaines caractéristiques, à savoir :

- facilité d'introduction,
- sélectivité d'élimination,
- bonne stabilité vis-à-vis des agents de couplage.

1° / PROTECTION DE LA FONCTION COOH TERMINALE

Dans la plupart des cas, la protection carboxylique intervient par la formation d'ester d'alkyle ou de benzyle (1,2,3).

a) Les esters d'alkyles

Ils sont préparés par des méthodes classiques :

- estérification par l'alcool correspondant en présence d'acide chlorhydrique anhydre (4) ou de chlorure de thionyle (5),
- à partir du diazométhane en solution dans l'éther pour la préparation d'esters méthyliques (6,7).

La déprotection se fait par saponification dans l'acétone, le méthanol ou le dioxanne à température ambiante ou à 0°C.

b) Les esters benzyliques

Ils sont obtenus par estérification de l'acide aminé par l'alcool benzylique en présence de catalyseurs acides dont les plus importants sont :

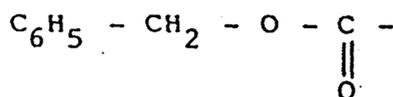
- l'acide paratoluène sulfonique (8)
- l'acide benzène sulfonique (9)
- l'acide polyphosphorique (10,11) en tant qu'agent de deshydratation et qui déplace l'équilibre de la réaction.
- HCl gazeux
- le chlorure de Thionyle.

La déprotection peut se faire, comme pour les esters d'alkyles par saponification, ou plus aisément par hydrogénolyse catalytique en présence de palladium fixé sur charbon. C'est ce dernier mode de déprotection qui fait l'intérêt de l'ester benzylique, car la saponification présente parfois un risque de racémisation (12).

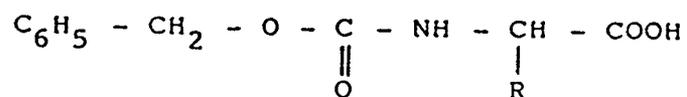
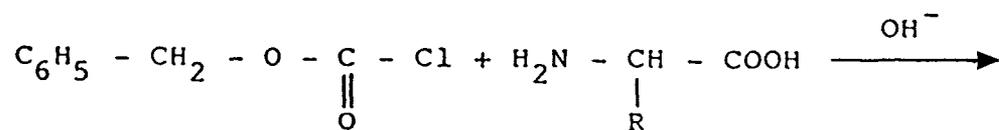
2° / PROTECTION DE LA FONCTION N—TERMINALE

Il existe de nombreux groupes protecteurs de la fonction amine décrits dans la littérature (1,2,3). Ne seront exposés ici que les deux que nous avons employés.

a) Le groupe benzyloxycarbonyle (Z)



Il a été introduit par Bergmann et Zervas (13) en faisant réagir du chlorure de benzyloxycarbonyle sur l'acide aminé suivant le schéma réactionnel suivant (14) :

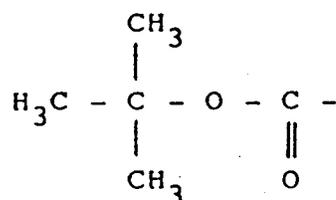


Le chlorure de benzyloxycarbonyle est lui-même obtenu par action de phosgène sur l'alcool benzylique :



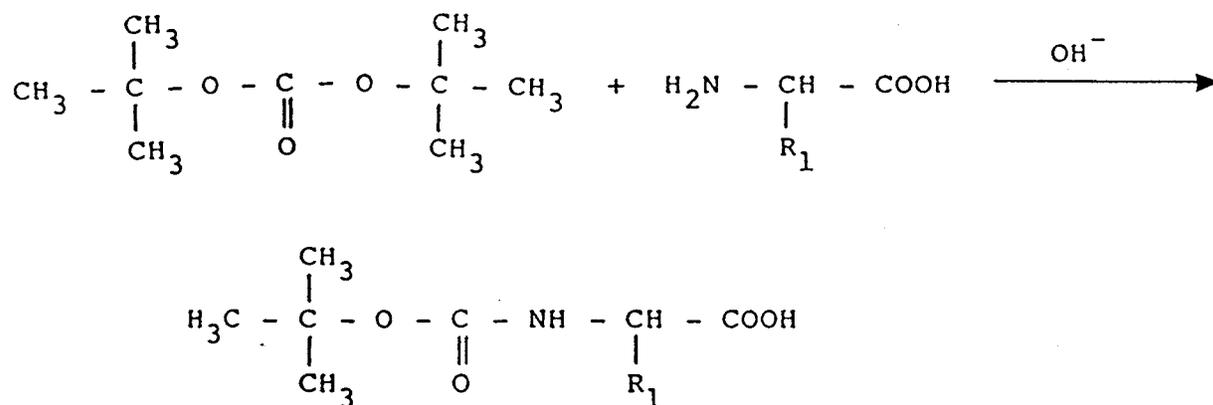
La déprotection de la fonction amine peut se faire soit par action de HBr dans l'acide acétique (15), soit par hydrogénolyse catalytique sur palladium/charbon 10%.

b) Le groupe tertibutyloxycarbone (tBoc)



Il a été introduit en synthèse peptidique par Mac Kay, Albertson, Anderson et Mac Gregor (16,17,18).

La fonction amine terminale de l'acide aminé est facilement protégée par réaction avec le di-tert-butyl carbonate en milieu basique (19,20,21) :



La déprotection se fait par l'acide chlorhydrique 4N dans le dioxane à 0°C (22), par l'acide chlorhydrique normal dans l'acide acétique (23), par l'acide trifluoroacétique (24) ou par le complexe BF₃/éther (25).

Ce groupe est très stable à l'hydrogénolyse et s'avère être un excellent complément du groupe benzyloxycarbone qui, lui, est stable dans les conditions de coupure du Boc.

3° / PROTECTION DES THIOLS DANS LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

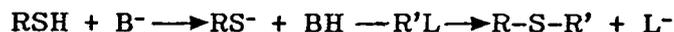
L'importance de la cystéine et de la cystine dans les polypeptides naturels, comme sites actifs et dans la stabilisation conformationnelle, a entraîné la nécessité de développer la synthèse et la déprotection des groupes protecteurs de thiols. Bien qu'elle n'ait pas toujours été utilisée (26), la protection du soufre durant la synthèse peptidique est fortement recommandée à cause du haut degré de nucléophilie de l'atome de soufre et de la facilité d'oxydation des thiols en disulfure. Beaucoup de synthèses ont porté sur des peptides soufrés comportant des ponts disulfures et ont entraîné leurs auteurs à pratiquer une protection sélective des groupes thiolés. Les groupes les plus couramment utilisés sont les thioéthers dont nous étudierons la préparation et les différentes méthodes de déprotection. Parmi les autres groupes utilisés, les thiazolidines avec notamment le groupe acétamidométhyl et les dérivés sulfénylés nous ont paru être les plus intéressants. Nous parlerons enfin de deux groupes dont l'utilisation semble diminuer les thioacétals et les thioesters.

a) Préparation des thioéthers.

Depuis les travaux de Du Vigneaud (27), les thioéthers sont devenus les groupes protecteurs les plus utilisés. Ils sont généralement préparés par substitution nucléophile dans laquelle l'atome de soufre sert de nucléophile.

Ces réactions réclament :

■ *Soit un catalyseur basique pour générer un ion sulfure plus nucléophile :*



La S-benzyl cystéine (28) et la S-paraméthoxybenzylcystéine ont ainsi été préparées par alkylation du sel de sodium.

■ **Soit un catalyseur acide pour générer un cation qui réagit avec le thiol :**



Nous avons choisi cette méthode pour la synthèse de la S-triphénylméthyl-L-cystéine en utilisant le triphénylméthanol pour générer le cation et l'acide trifluoroacétique (29) ou le trifluorure de bore complexe d'éther (31) comme catalyseur. L'action de l'acide sur des alcools, des oléfines ou des halogénures conduit en fait à la synthèse d'un carbocation qui réagit sur le thiol pour conduire au produit protégé (28).

La S-tertiobutyl cystéine a été synthétisée soit avec l'acétate de tertibutyle soit avec l'isobutène (30). Dans le cas des thioéthers préparés à partir de cations très stabilisés comme le trityle, la réaction conduit à une coupure importante acidocatalysée.

Dans cette réaction, les conditions d'équilibre (32) sont atteintes rapidement et la réaction doit être menée à terme soit par évaporation d'un acide volatil (TFA ou HBr) soit par diminution de la concentration d'acide.

■ **Déprotection Sodium/Amine, Sodium/Ammoniac**

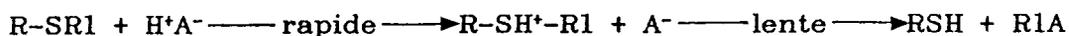
La coupure réductrice des liaisons carbone soufre a été durant de nombreuses années avec l'utilisation du benzyle comme groupe protecteur, le principal procédé de déprotection dans la synthèse de peptides soufrés.

Les thioéthers du type S-trityl, S-benzhydryl et S-benzyl sont coupés par les combinaisons sodium/amine pour donner des thiols (33). Cette méthode est utilisée sans changement significatif dans la synthèse peptidique depuis sa création (33).

La mise en oeuvre assez délicate et la réduction par le sodium, peu sélective, nous ont amenés à éliminer cette méthode. En outre, des réactions secondaires se produisent lorsque le temps de déprotection du peptide est prolongé (34).

■ Déprotection par les acides

La coupure des thioéthers par voie acide peut se faire soit par réaction directe :



ou par l'intermédiaire d'un ion carbonium :



Bien que les deux types de réactions soient connus, la seconde semble être la plus représentative (35).

Le déblocage des groupes thioéthers par un acide se fait en trois étapes : la première, rapide de formation de l'acide conjugué, la seconde, lente déterminant la vitesse de déprotection en formant l'ion carbonium et la troisième où l'ion carbonium réagit soit irréversiblement avec un cation fixateur, soit réversiblement avec la base conjuguée comme dans l'équation ci-dessus ou avec un nucléophile ajouté (36).

L'utilisation de cation fixateur comme le phénol et l'anisole dans la déprotection du benzhydryle permet une augmentation notable du rendement de la réaction, alors que dans la déprotection acidocatalysée du trityle, cela a peu d'effet sur le rendement de la coupure.

Ces résultats peuvent être attribués à la très grande stabilité du cation trityle comparée à celle du benzhydryle (33).

Les thioéthers d'alkyle ne sont pas touchés par les coupures acides sauf le t.butyle qui est coupé quantitativement par un acide fort en présence de cation fixateur (37).

La S-benzyl-cystéine est, elle aussi, inerte aux acides comme l'acide trifluoroacétique ou l'acide bromhydrique dans l'acide acétique mais le groupe benzyle est coupé par HF en présence d'anisole.

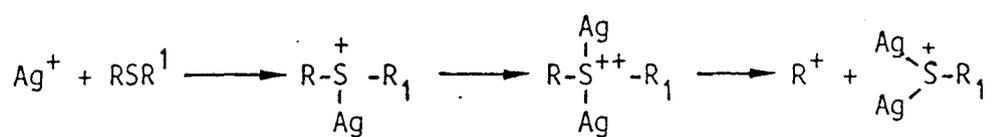
Dans les mêmes conditions, les groupes paraméthoxybenzyle et benzhydryle sont coupés plus rapidement du fait de la stabilité de leurs ions.

La coupure de nombreux groupes protecteurs a été effectuée avec l'acide trifluoroacétique en présence de phénol en améliorant largement le rendement de la réaction (33).

■ Coupure par les métaux lourds

L'affinité du soufre comme accepteur de métal est connue depuis longtemps et lui a valu son appellation de mercaptan. Pearson (38) considère que les thiols et les métaux donnent des réactions "douces".

Saville (39) a étudié la solvolysé de plusieurs thioéthers d'allyle avec le nitrate d'argent et conclu que deux ions Ag^+ sont nécessaires dans la réaction de déprotection :



Elle est plus attractive car la précipitation des sulfures la rend irréversible. De plus, la simplicité de sa mise en oeuvre et sa sélectivité sont des atouts supplémentaires. Elle a permis dans nos synthèses une purification du peptide en éliminant tous les éléments non soufrés.

Le trityle, le diphenylméthyle et le benzhydryle ont été les plus étudiés pour la déprotection. Le trityle a même pu être coupé sans toucher le groupe benzhydryle (40-41).

La démétallation des sulfures d'argent ou de mercure peut s'obtenir par action de l'acide chlorhydrique (42) pour donner un précipité de chlorure d'argent ou du sulfure d'hydrogène (43) pour donner le sulfure d'argent.

b) Les autres groupes protecteurs des thiols

■ *Les thiazolidines et leurs dérivés*

Ces protections sont peu utilisées mais l'utilisation de l'acétamidométhyle s'est développée dans certaines synthèses (44,60) ; la déprotection se fait par le mercure.

Les groupes thiozolidines donnent des rendements de 30 à 70% alors que le groupe acétamidométhyl (Acm) donne 95% de rendement (33).

L'acétamidométhyl est assez couramment utilisé par exemple pour la synthèse de modèles proches des métallothionéines (45) de même que pour des séquences de la ribonucléase A.

La déprotection n'a pu se faire qu'avec une solution aqueuse d'acide acétique à 50% en présence d'ion mercurique avec un peptide contenant huit motifs cystéine (46).

L'Acm peut donner directement des disulfures par action de l'iode ou des thiocyanogènes (1).

■ *Les thioesters et leurs dérivés*

Cette série de groupes protecteurs comprend en plus des alkyl et arylthioesters, les alkyloxycarbonyls (ROCOSR1), les alkylthiocarbamates (R-NH-CO-SR1) et les dithiocarbamates (RSCOSR1).

La réaction des mercaptans avec les acides acétique et benzoïque donnent seulement 15% de thioester ce qui a conduit à les préparer par action soit des halogénures d'acide, soit des anhydrides sur le thiol.

Le problème essentiel de la S-aryl et de la S-alkoxy-carboxy-L-cystéine, est la migration $S \rightarrow N$ acyle qui résulte de la présence d'une amine libre sur le résidu (30).

Ce type de problème a été rencontré lors de la préparation mais aussi lors des réactions de couplage aussi bien en phase liquide qu'en phase

solide. La synthèse et l'utilisation du groupe éthylcarbamoyl par contre n'a pas posé ce type de problème.

Les thioesters sont facilement déprotégés par réaction du sodium dans l'ammoniaque liquide.

En fait, ces groupes se coupent facilement par action basique comme le S-benzoyl par action de la soude 0,2N (26) mais de sérieuses réactions secondaires peuvent se produire : les composés contenant la cystine conduisent après déprotection à un mélange de polymères (47). Cette labilité aux bases est un problème supplémentaire lors de la synthèse peptidique.

La coupure acide du groupe benzoyl est faible avec HBr dans l'acide acétique ou l'acide trifluoroacétique en présence de phénol (48) alors que le groupe paraméthoxybenzyloxycarbonyl est coupé par le TFA à température ambiante et HBr 0,2N dans l'acide acétique (49).

Les métaux lourds ont aussi été utilisés. Le groupe benzoyl a été coupé aussi bien par l'argent (I) et le mercure (II) que par le cuivre (II) et le plomb (II) (33). L'étude de l'hydrolyse de différents éthylthiobenzoates parasubstitués montre que l'argent et le mercure sont plus efficaces que l'ion hydroxonium et que l'argent fait intervenir un système bimoléculaire alors que le mercure réagit unimoléculairement.

■ *Les thioacétals*

Les dérivés sont préparés avec un bon rendement soit par catalyse acide soit par catalyse basique. Seulement on obtient dans certains cas un mélange de diastéréoisomères (33).

Les coupures acides ont été essayées mais n'ont pas été utilisées par la suite car le rendement était faible.

■ *Les sulfényles et leurs dérivés*

On retrouve dans ces composés entre autres les sulfonates, les disulfures et certains métaux lourds qui servent pour la protection des thiols lors de la synthèse peptidique.

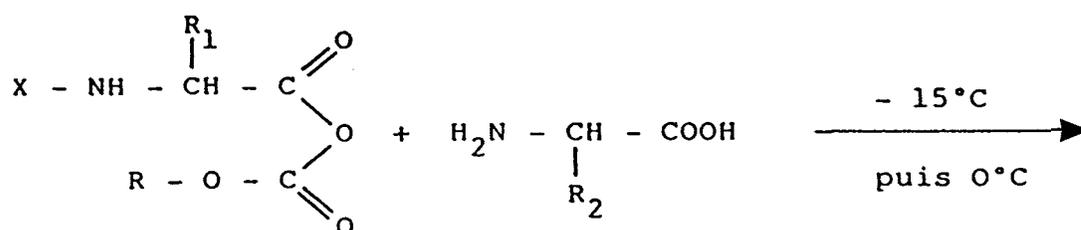
Les groupes aryle, éthyle et t.butyle sont facilement utilisables. Ils sont très stables aux conditions de la synthèse peptidique et sont récupérés en présence de mercaptans comme le mercaptoéthanol (34).

COMPOSES	Utilisation	Coupure	Acide	Na/NH ₃	Métaux lourds	Basique
: Thioéthers	:	:	:	:	:	:
: Alkyls	: --	:	:	:	:	:
: Aryls	: ++	:	: +	: +	: +	: -
:	:	:	:	:	:	:
: Thiazolidines	:	:	:	:	:	:
: $\begin{array}{c} \text{CR}_2-\text{S} \\ \quad \diagdown \\ \text{CR}_2 \\ \quad / \\ \text{CR}_2-\text{NH} \end{array}$: -	:	: -	: -	: -	: -
:	:	:	:	:	:	:
: S-acétamidométhyl	: ++	:	: +	: -	: +	: -
:	:	:	:	:	:	:
: Thioesters	:	:	:	:	:	:
: RO- : RNH- : RS- : $\left. \begin{array}{l} \text{RO-} \\ \text{RNH-} \\ \text{RS-} \end{array} \right\} \text{CO-SR}$: +	:	: +	: +	: +	: -
:	:	:	:	:	:	:
: Thioacétals	:	:	:	:	:	:
: RS-CH ₂ -O-R	:	:	:	:	:	:
: RS-CH ₂ -S-R	: -	:	: -	: -	: +	: -
:	:	:	:	:	:	:
: Sulfényles	:	:	:	:	:	:
: R-S-SO ₃ ⁻	: +	: (a)	: -	: +	: +	: -
: R-S-S-R'	: +	: (a)	: -	: +	: +	: -
:	:	:	:	:	:	:

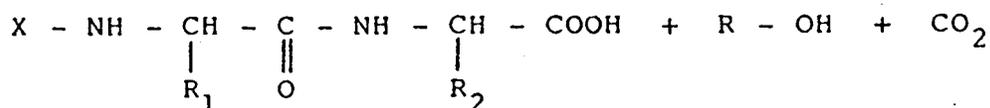
(a) déprotection possible avec les mercaptans.

TABEAU I : RECAPITULATIF DES PROTECTIONS EN THIOLES EN SYNTHÈSE PEPTIDIQUE ET DE LEURS METHODES DE DEPROTECTION ; ++ très utilisé, + utilisé, - et -- peu ou pas utilisé.

Ces résultats nous poussent à utiliser de préférence la protection par les groupes aryls ainsi que par le S-acétamidométhyl.



X est un groupe protecteur.



Cette méthode présente plusieurs intérêts :

- faible taux de racémisation à condition que certaines précautions soient prises (travailler à basse température, éviter les excès de triéthylamine)
- rapidité d'obtention des peptides
- inutilité de la protection de la fonction C-terminale du second acide aminé.

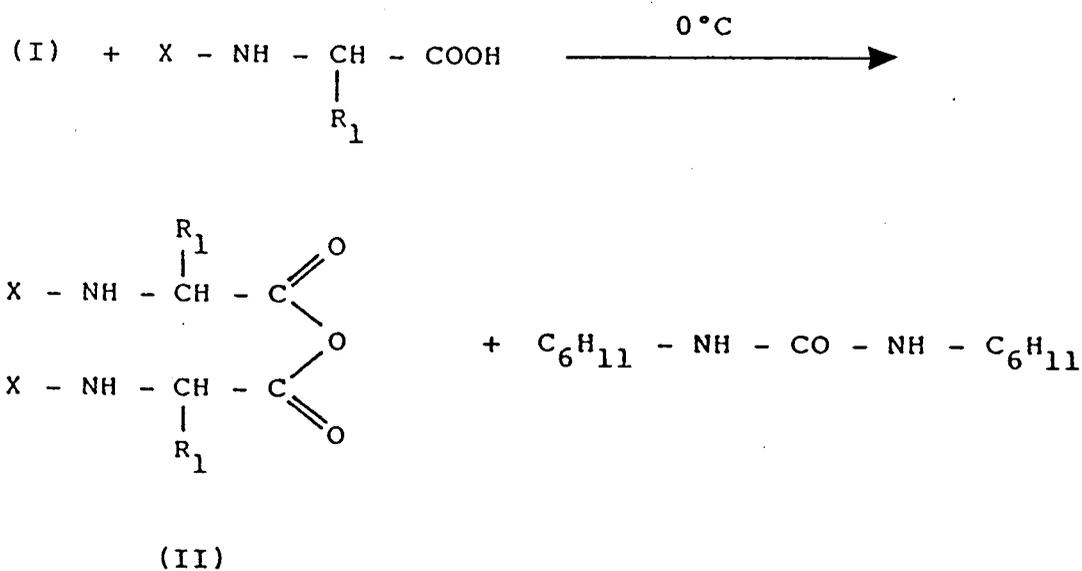
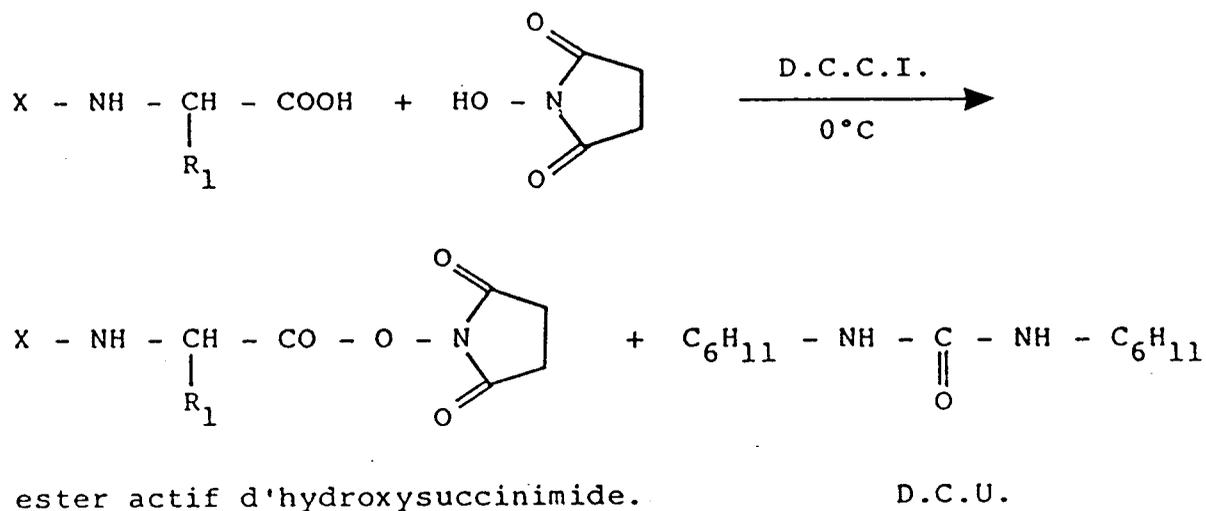
2° / SYNTHÈSE PAR LA MÉTHODE À LA DCCI

Elle a été introduite par Sheelan et Hess en utilisant le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) comme agent d'activation pour former la liaison peptidique.

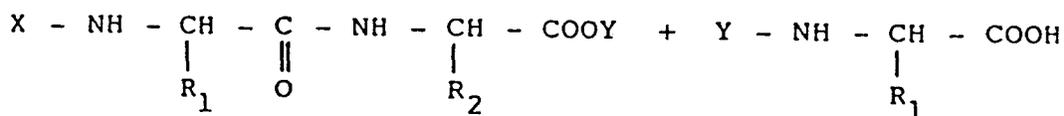
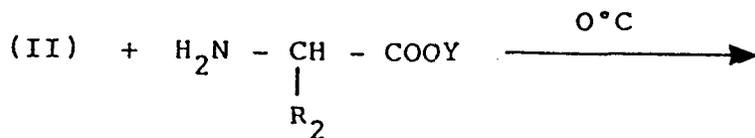
Cette méthode, impliquant la formation d'un intermédiaire réactif de la fonction carboxylique, est basée sur l'augmentation de la réactivité de cette fonction acide par un accroissement du caractère électrophile de l'atome de carbone du carbonyle.

le plus utilisé est le N-hydroxysuccinimide (55). Le couplage nécessite deux étapes :

■ Formation de l'ester actif



■ Aminolyse de l'ester actif par un second acide aminé



X et Y sont des groupements protecteurs.

L'hydroxysuccinimide régénéré est éliminé par lavage à l'eau alors que le peptide est extrait par un solvant organique. Cette méthode apporte plusieurs avantages notamment la pureté des produits obtenus et le travail avec un second acide aminé non protégé sur sa fonction C-terminale libre comme pour les méthodes aux anhydrides mixtes.

C/ LES DIFFERENTS TYPES DE SYNTHESSES

1° / PHASE LIQUIDE

Toutes ces méthodes de couplage, de protection et de déprotection sont utilisées dans la synthèse en phase liquide. C'est la méthode la plus simple à mettre en oeuvre car elle ne nécessite aucun appareillage particulier.

Les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince. Après chaque réaction, les peptides sont extraits par un solvant organique. Les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par des lavages acides et basiques. Ils sont ensuite purifiés par chromatographie sur gel perméable.

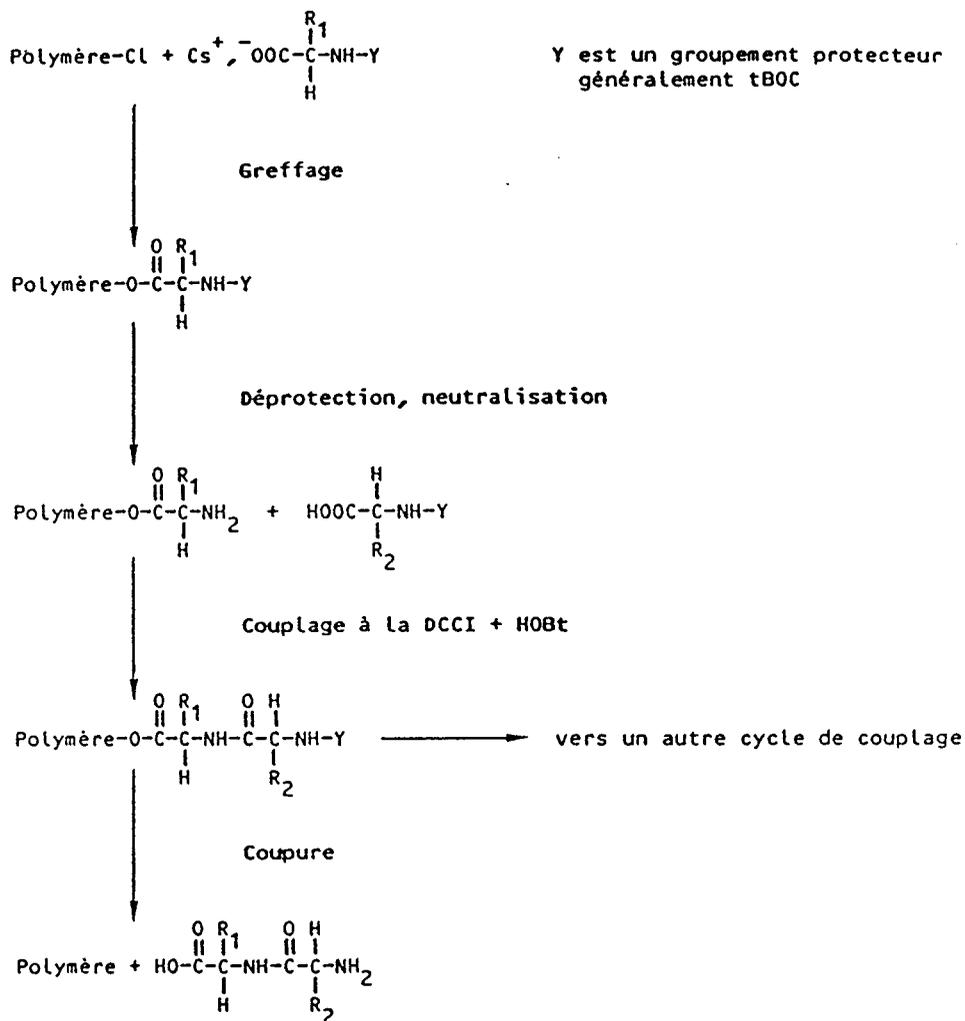
Cette méthode permet la préparation de quantités importantes et donne une bonne pureté des produits finaux grâce aux purifications intermédiaires.

Néanmoins, elle reste longue à effectuer et les étapes de cristallisation sont parfois difficilement réalisables.

2° / SYNTHESE EN PHASE SOLIDE

Cette technique a été proposée par Merrifield (56). Il a utilisé la stratégie dite "pas à pas" où le premier acide aminé est fixé par son groupe C-terminal sur un polymère insoluble formant un gel gonflé par les solvants organiques. Celui-ci est le plus souvent du polystyrène réticulé par du divinylbenzène (1 à 2%) et partiellement chlorométhylé sur lequel on greffe le premier acide aminé par réaction de son sel de césium (57).

La synthèse de Merrifield se fait par la répétition d'un cycle d'opération et se résume par le schéma suivant :



En fin de synthèse, le peptide est coupé de la résine par un traitement acide (58,59) qui s'avère délicat.

La répétitivité des étapes nécessitent l'automatisme de cette synthèse.

Les principaux avantages que représentent cette synthèse sont :

- la rapidité d'obtention des produits (environ 4 heures par cycle d'opération),

- les réactifs non couplés sont éliminés par simple lavage. Pratiquement, les couplages ne sont pas totaux, une séparation finale est donc nécessaire.

Parmi les inconvénients :

- la quantité de réactifs pour chaque couplage doit être 2 à 3 fois la quantité stoechiométrique de l'acide aminé fixé au départ, ce qui augmente sensiblement le prix de revient de la synthèse.

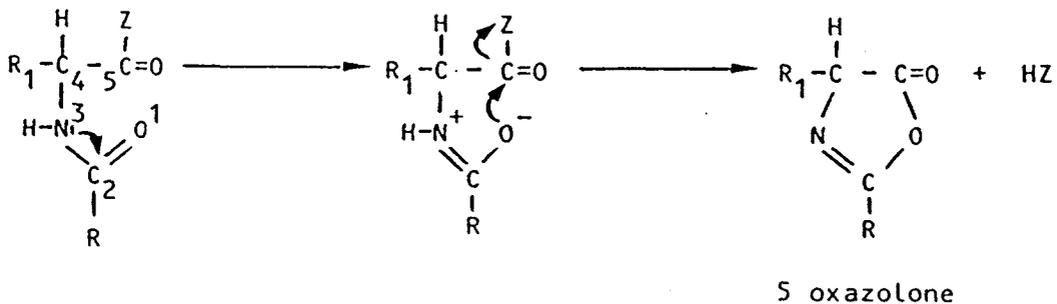
- l'achat et la mise au point de l'appareil sont coûteux,

- pour les grands peptides, de nombreux problèmes se posent lors de la séparation finale.

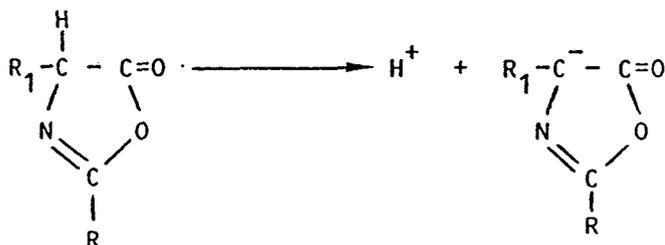
D/ LA RACEMISATION

Au cours de la mise en place ou de l'élimination d'un groupement protecteur, et surtout lors de la formation de la liaison peptidique, le carbone asymétrique risque de changer de configuration, et le peptide résultant n'est plus optiquement pur.

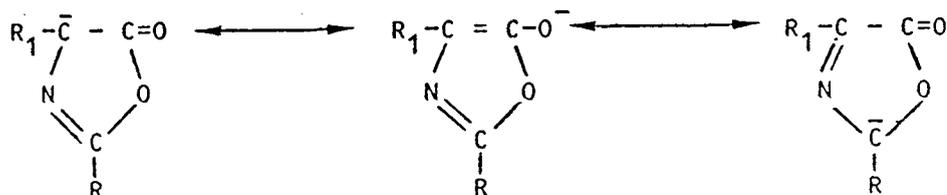
Le carbone C α s'épimérise surtout par formation intermédiaire d'une 5-oxazolone selon le schéma suivant :



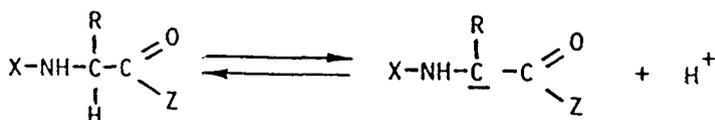
L'oxazolone formée perd un proton en présence d'une base :



On a résonance de l'oxazolone :



Le carbone asymétrique C α peut aussi s'épimériser par arrachement direct du proton lorsque la formation d'oxazolone est impossible.



Le mécanisme de racémisation est peu rencontré car il nécessite un milieu fortement basique (54).

Il faut préciser que le pourcentage de racémisation peut varier selon les conditions expérimentales. Récemment, plusieurs additifs ont été proposés pour diminuer la racémisation (54). En respectant certaines règles, la racémisation est quasiment évitée :

- travailler à basse température
- mener le couplage en milieu concentré

- utiliser un solvant non polaire

- ajouter des additifs inhibiteurs de racémisation pour la méthode au DCCI telle que le N-hydroxybenzotriazole (HOBt).

E/ TECHNIQUES ANALYTIQUES

La chromatographie sur silice en couche mince (Merk F254) a été le principal outil de contrôle de l'évolution des réactions pour les peptides protégés avec comme éluant le mélange chloroforme-méthanol-acide acétique (85/10/5).

Les peptides libres sont élués sur papier Whatman n° 1 dans le mélange ternaire pyridine-n butanol-eau (35/35/30). Les peptides thiolés sont chromatographiés sur silice en couche mince (Merck F254) avec un mélange méthanol-eau-acide acétique-pyridine (4/2/1/1) avec 0,1% de mercaptoéthanol. On révèle les chromatogrammes par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (2,5 g dans 50 ml d'éthanol) et par chauffage à 100°C.

Les peptides N protégés sont passés dans des vapeurs chlorhydriques avant la pulvérisation pour libérer la fonction amine.

F/ PURIFICATION

L'accumulation des produits secondaires, les réactions incomplètes, nécessitent une purification finale efficace. Nous avons utilisé une chromatographie sur gel perméable (Sephadex G₁₀, G₂₅).

Le principe repose sur la séparation des produits en fonction de leur différence de volume hydrodynamique. Le matériel utilisé comporte une cellule de détection à deux longueurs d'ondes (206 et 280 nm), une pompe péristaltique LKB, un collecteur de fraction (LKB 211) et un enregistreur multicanaux LKB 2089 Uvicond III.

La structure et la pureté des produits ont été vérifiées par résonance magnétique nucléaire et par analyse en acide aminés.

II - DESCRIPTION DES SYNTHÈSES

A/ SCHEMA GENERAL

Les acides aminés utilisés sont les suivants :

- ◆ l'alanine $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_3$
- ◆ la phénylalanine $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$
- ◆ la cystéine $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SH}$

L'objet de ce travail a été de synthétiser les peptides suivants :

Ala-Cys

Phe-Cys

Ala-Ala-Cys

Cys-Ala-Cys

Cys-Ala-Ala-Cys

Ces peptides feront l'objet d'une étude de complexation avec des métaux tels que le palladium, le nickel, le zinc, le cobalt et le cadmium.

Ces peptides ont été préparés classiquement en phase homogène.

Schéma de synthèse : Ala-Cys

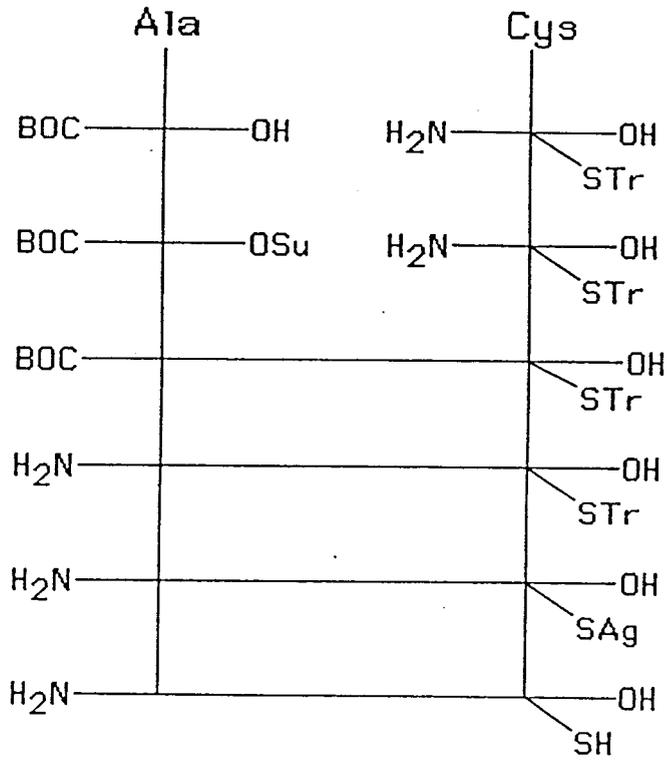


Schéma de synthèse : Phe-Cys

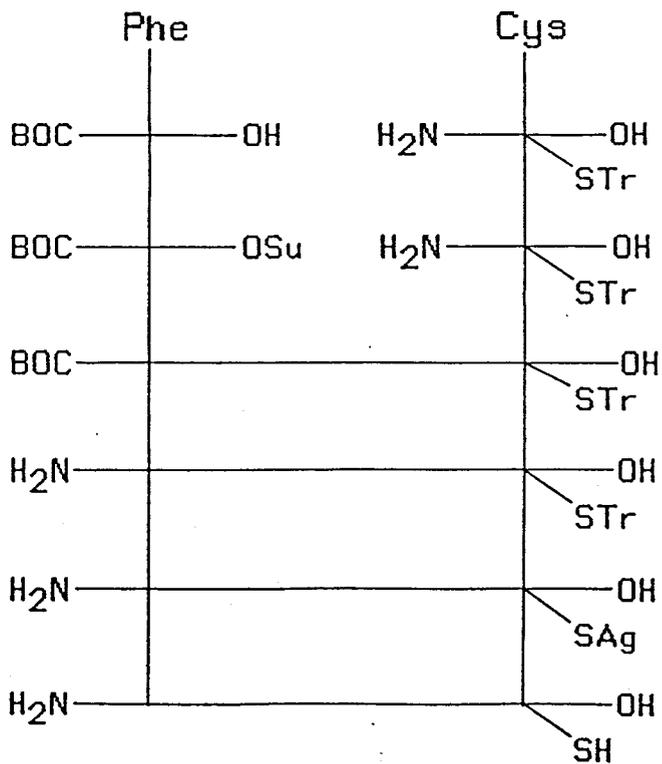


Schéma de synthèse : Ala-Ala-Cys

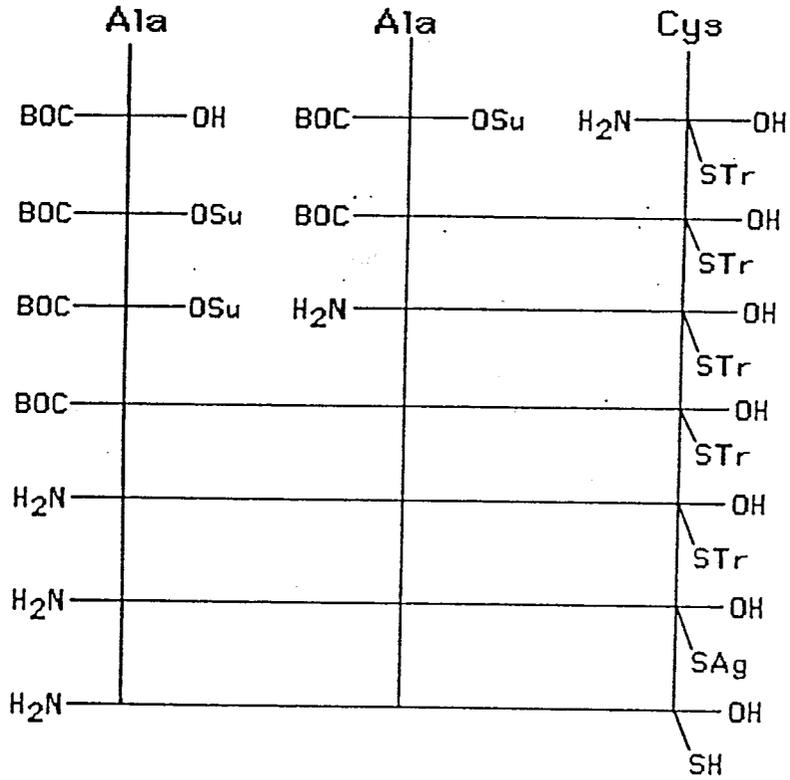


Schéma de synthèse : Cys-Ala-Cys

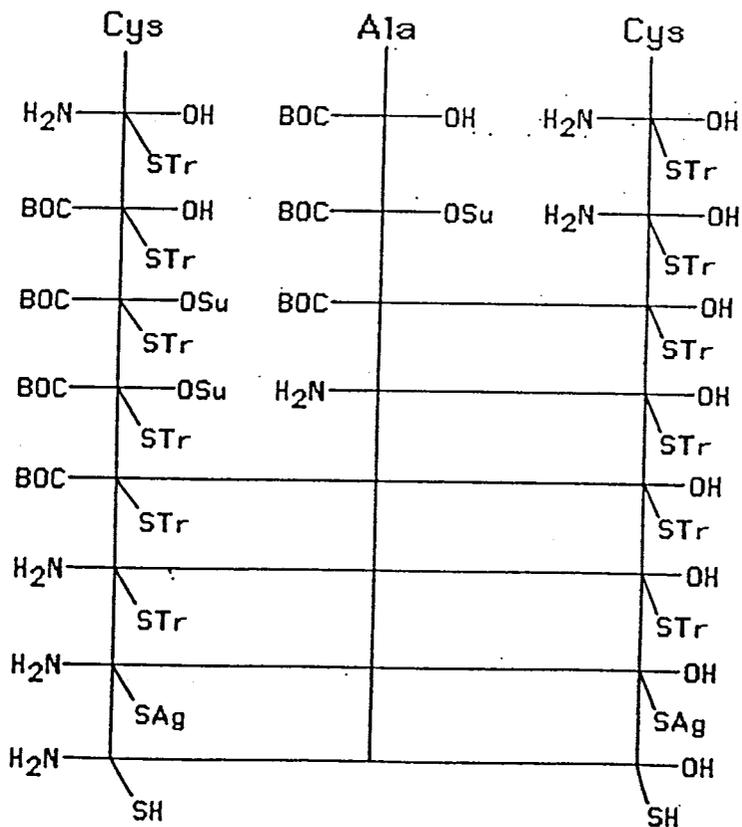
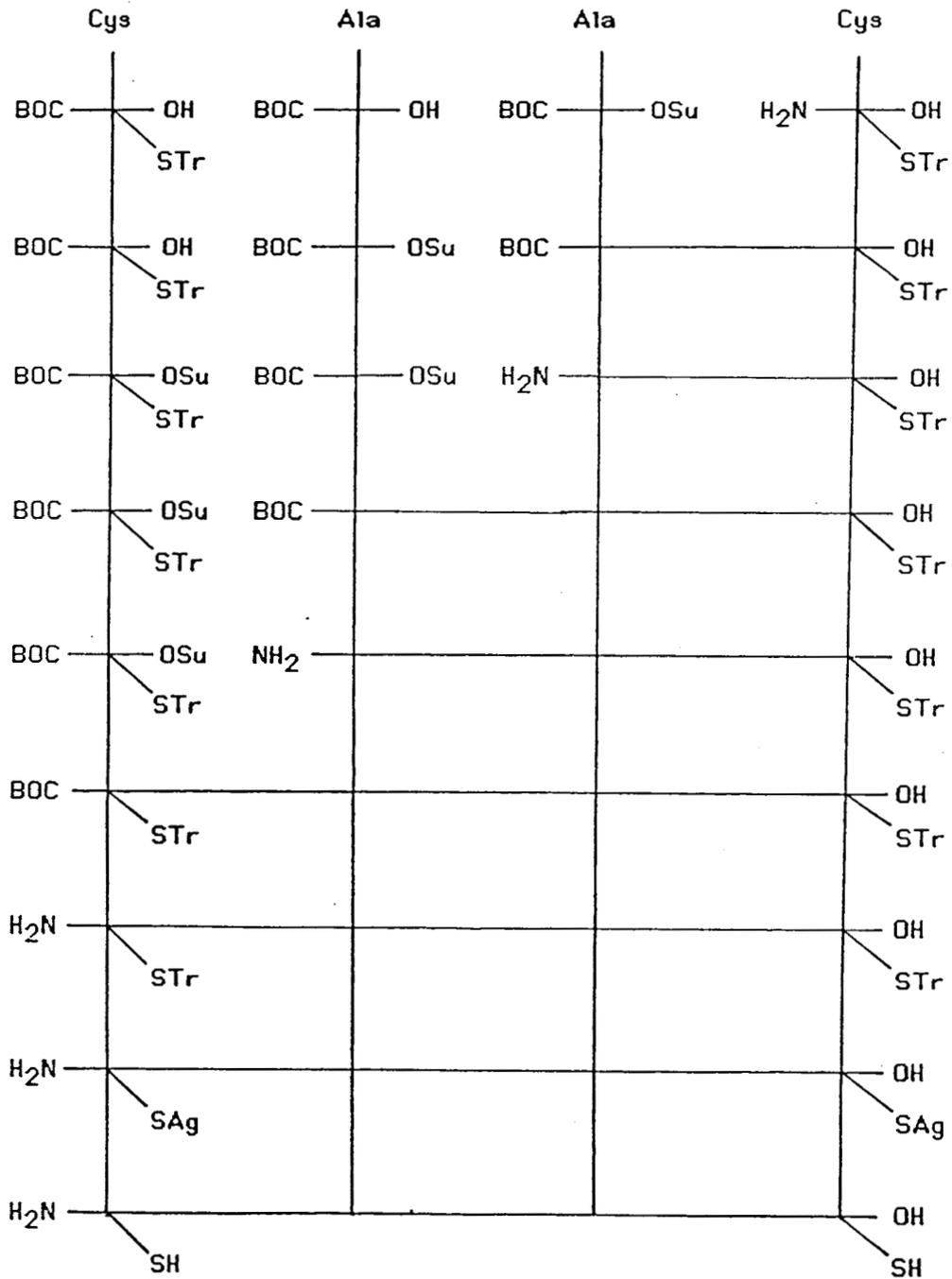


Schéma de synthèse : Cys-Ala-Ala-Cys



B/ SYNTHESE DES PRODUITS DE DEPART

1° / PREPARATION DU S-TRIPHENYLMETHYL-L-CYSTEINE (S-TRITYL-CYSTEINE)

La S-trityl cystéine est préparée par catalyse acide. On dissout le mélange de cystéine 5.10^{-3} mole (0,6 g) et de triphénylméthanol 5.10^{-3} mole (1,3 g) dans 9 ml d'acide trifluoroacétique. La solution est laissée sous agitation 30 minutes puis l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide jusqu'à l'obtention d'un résidu visqueux que l'on dissout dans 100 ml d'éther éthylique. On ajoute à la solution obtenue une solution aqueuse de 10% d'acétate de sodium jusqu'à pH7 où la S-trityl-cystéine précipite. Le précipité est ensuite filtré, lavé deux fois à l'eau puis plusieurs fois à l'éther chaud et séché sous vide.

2° / PREPARATION DU BOC S-TRITYL-CYS, DU BOC-ALA ET DU BOC PHE

Les deux Boc aminoacides sont synthétisés par la méthode au di-tert-butylidicarbonate.

On ajoute à une suspension de 0,01 mole (3,63 g) de S.trityl-cystéine dans 10 ml d'eau, 20 ml de dioxanne et 10 ml de soude 1N, 0,011 mole de di-tert-butylidicarbonate. La réaction sous agitation est démarrée dans un bain de glace, puis se déroule pendant une heure à température ambiante. Le dioxanne est ensuite évaporé et la solution aqueuse est acidifiée à pH 2-3 par l'hydrogénosulfate de potassium. Le BocC S.trityl-cystéine est extrait deux fois par l'acétate d'éthyle, lavé plusieurs fois à l'eau et séché sur sulfate de sodium. La solution est filtrée puis évaporée sous pression réduite. La poudre obtenue après évaporation est dissoute dans un peu de dichlorométhane avant d'être précipitée dans l'hexane.

3° / PREPARATION DE L'ESTER ACTIF DU BOC S-TRITYL-L-CYS DU BOC-ALA ET DU BOC-PHE

On dissout dans 20 ml de chloroforme fraîchement distillé et refroidi à -10°C (glace dans l'acétone), 0,01 mole (4,6 g) de Boc S.trityl-cystéine, 0,011 mole d'hydroxysuccinimide (1,3 g) et 0,011 mole de DCCI. On laisse la solution à -10°C durant une heure et à température ambiante 24 heures et on vérifie l'avancement de la réaction par chromatographie sur couche mince.

La réaction terminée, on filtre sur büchner et on lave avec du chloroforme la dicyclohexylurée formée. Le filtrat est lavé successivement par du bicarbonate de sodium à 5%, de l'eau, de l'acide chlorhydrique à 1%, de l'eau, puis séché sur sulfate de magnésium, filtré et évaporé sous pression réduite pour donner un résidu mousseux que l'on dissout dans un peu de dichlorométhane puis que l'on précipite dans l'hexane.

4° / COUPLAGE

La méthode utilisée est la même pour les cinq couplages suivants :

- Boc Ala ester actif avec S.trityl-cystéine
- Boc Ala ester actif avec Ala S.trityl-cystéine
- Boc S.trityl-cystéine avec Ala S.trityl-cystéine
- Boc S.trityl-cystéine ester actif avec Ala Ala S.trityl-cystéine
- Boc Phe ester actif avec S.trityl-cystéine

On dissout dans 20 ml de diméthoxyéthane 4.10^{-3} mole de BOC acide aminé ester actif. A cette solution, on ajoute une solution de 5.10^{-3} mole de triéthylamine (0,7 ml) dans 10 ml d'eau. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince et dure environ trois heures.

La solution est ensuite acidifiée jusqu'à pH3 par de l'acide citrique puis extraite deux fois par 50 ml d'acétate d'éthyle et deux fois par 50 ml d'éther éthylique. Les phases organiques sont recueillies, lavées successivement par une solution d'acide chlorhydrique à 1% et de l'eau puis séchées sur du sulfate de magnésium. La solution est ensuite filtrée puis évaporée sous pression réduite.

Le résidu est repris par un peu de dichlorométhane puis précipité dans l'hexane.

5° / COUPURE DU GROUPE BOC

Elle concerne :

- Boc Ala (S-trityl) Cystéine
- BOC Ala Ala (S-trityl) Cystéine
- BOC (S-trityl) Cystéine Ala Ala Cystéine
- BOC (S-trityl) Cystéine Ala Cystéine

5. 10^{-3} mole de BOC peptide est dissous dans 25 ml d'acide acétique. Après dissolution, on rajoute lentement 2 ml de trifluorure de bore, complexe d'éther et on laisse la solution sous agitation durant une heure. La solution est alors versée dans une solution glacée d'acétate de sodium (18 g dans 100 ml d'eau).

Le gel formé est filtré, lavé deux fois avec de l'eau et quatre fois avec l'éther éthylique. Le précipité est ensuite séché sous pression réduite.

6° / COUPURE DU TRIPHENYLMETHYL PAR L'ARGENT PUIS LE SULFURE D'HYDROGENE

On ajoute à une solution chaude saturée de $3 \cdot 10^{-3}$ mole de peptide contenant la (S-trityl) Cystéine dans le méthanol, une solution de $3 \cdot 10^{-3}$ mole (0,51 g) de nitrate d'argent et de $3 \cdot 10^{-3}$ mole (0,24 ml) de pyridine dans 10 ml de méthanol. On obtient immédiatement un précipité jaune et on laisse la solution sous agitation une heure. Le précipité est filtré, lavé trois fois par du méthanol puis séché sous vide.

Le sulfure d'argent ainsi obtenu est mis en suspension dans 10 ml de méthanol à travers lequel on fait passer un courant de sulfure d'hydrogène produit par action de l'acide chlorhydrique sur le sulfure de fer. Après 30 minutes, le précipité a pris la couleur noire du sulfure d'argent. On le filtre sur büchner et on le lave soigneusement avec du méthanol. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, repris dans un peu de méthanol et

précipité dans une solution d'éther avec 0,1% de mercaptoéthanol. Le précipité est filtré puis lavé deux fois par la solution d'éther sec à 0,1% de mercaptoéthanol sans laisser le précipité à sec.

Après le dernier lavage, le précipité est immédiatement séché dans un dessiccateur sous vide.

Compte tenu de leur relative stabilité, les peptides sont conservés à une température de -2°C .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CHAPITRE I

- (1) **BODINSKY M., KLAUSNER Y.S. et ONDETTE M.A.**
Peptides Synthesis IInd Edition. Wiley-Interscience (1976)
- (2) **GEIGER R. et KONIG W.**
The peptides Vol. 3, Chap 1
Cross E. et Meienhofer J. - Academic Press
Roweska R.W.
The Peptides Vol. 3 Chap. 2
Cross E. et Meienhofer J. - Academic Press
- (3) **WUNSCH E., DEFFNER M., DEIMER K.H., JAEGER E., STEZEL P., THAMM P. et WENDLVERGER G.**
Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl) Vol. XV (1) -
Mueller E. et als, eds. Thieme, Stuttgart.
- (4) **CURTIS Th, GOEBEL F.**
J. Prakt. Chem. 37(2), 1453 (1888)
- (5) **BRENNER M. et HUBER W.**
Helv. Chimica Acta. 36, 1109 (1953)
- (6) **GREENSTEIN J.P. et WINITZ M.**
Chemistry of the aminoacids - J. Wiley sons Eds (1961)
- (7) **CAPRINO L.A.**
J.A.C.S. 79, 98-101 (1957)
- (8) **BRAND E.**
J.A.C.S. 73, 3510 (1951)
- (9) **MILLER J.K. et WAELSCH H.**
J.A.C.S. 74, 1092 (1952)
- (10) **ESLANGER B.F. et HALL R.M.**
J.A.C.S. 76, 5781 (1954)
- (11) **CIPIERA, NICHOLES R.V.**
Chem. Ind. (London 1955, 16
- (12) **Mc LAREN J.A.**
Aust. J. Chem. 11, 360-365 (1958)
- (13) **BERGMANN M. et ZERVAS L.**
Ber. 65, 1192 (1932)
- (14) **WUNSCH E., DEFFNER M., DEIMER K.H., JAEGER E., STEZEL P., THAMM and WENDELBERGER G.**

- Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl) Vol. XV (1) Mueller E. and Als, Eds Thieme, Stuttgart.*
- (15) BEN ISHAI and BERGER A.
J. Org. Chem. 17, 1564-1570 (1952)
- (16) Mac KAY F.C. et ALBERTSON N.F.
J.A.C.S. 79, 4686 (1957)
- (17) ANDERSON G.W. et Mac GREGOR A.C.
J.A.C.S. 79, 6180 (1957)
- (18) CAPRINO L.A.
J.A.C.S. 79, 4427 (1957)
- (19) TARBELL, YAMAMOTO et POPE
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 69, 730 (1972)
- (20) BALDIN J.E., ADLINGTON, BIRCH R.M.
Tetrahedron Lett. 26, 48, 5931-34 (1985)
- (21) HOPPE SEGLET's
Physiol. Chem., 357, 1651 (1976)
- (22) STEWART J.M. and WOOLEY D.W.
Nature 206, 619 (1965)
- (23) MERRIFIELD R.B.
J.A.C.S. 86, 304 (1964)
- (24) KAPPELER H. and SCJWUZER R.
Helv. Chimica Acta 43, 1453 (1960)
- (25) GIOBEY R.G., BEACHAM L.M., MATL V.G., SMITH J.N., WILLIAMS Jr E.B., THOMAS A.M. et WOLTERS E.T.
J. Org. Chem. 36, 488 (1971)
- (26) GUSKEYT G.
The peptides Vol. 3 Chap. 3 Academic Press (1981)
- (27) Du VIGNEAUD
Chem. Soc. (London) Spec. Publ. N° 2, 49 (1955)
- (28) SIFFERT R.H. et Du VIGNEAUD V.
J. Biol. Chem. 108, 753 (1935)
C.R. Harrington et T.M. Mead
Biochem. J. 29, 1602 (1935)
- (29) PHOTOKI I., TAYLOR PAPADIMITRIOU J., SAKARELLOS C., MAZARAKIS P. et Zervas .
J. Chem. Soc. (C) 2683 (1970)
- (30) CALLAHAN F.M., ANDERSON G.W., ZIMMERMAN R.P. et J.E.
J.A.C.S. 85, 201 (1963)

- (31) *HIDKRYFR. G. et ADAMS Jr. J. B.*
J. Org. Chem., 30, 1340 (1965)
- (32) *ZERVAS L. et PHOTOKI I.*
J.A.C.S. 84, 3887 (1962)
- (33) *HISKEY G., V. R. RAO et W. G. RODES*
Prot. Groups Org. Chem. 1973, 235 Chap. 7 Protection of thiols
- (34) *ZAHN H., KANHO W. et GUTTI B.*
Z. Naturforsch 21b, 763 (1966)
- (35) *OLEH G. A., O'BRIEN D. G. et PITTMAN Jr. C. V.*
J.A.C.S. 89, 2996 (1967)
- (36) *DENO N. C., JANZELSKI J. J. et SCHRIESHEIM A.*
J.A.C.S. 77, 3044 (1955)
- (37) *SAKAKIBARA S., SHIMONISHI Y., KISHIDA Y., OKADA M. et SUGIHARA H.*
Bull. Chem. Soc. Jpn 40, 2164 (1967)
- (38) *PEARSON R. G.*
J.A.C.S. 85, 3533 (1963)
- (39) *SAVILLE B.*
J. Chem. Soc. 4062 (1962)
- (40) *ZERVAS L., PHOTOKI I., COSTAMLLLOS A. et BOROVAS D.*
J.A.C.S. 87, 4922 (1965)
- (41) *HISKEY R. G. et ADAMS Jr. J. B.*
J. Org. Chem. 31, 2179 (1966)
- (42) *HIROTSU Y., SHIBA T. et KANEBO T.*
Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2950 (1967)
- (43) *HISKEY R. G., MIZOGUSHI T. et IGETA H.*
J. Org. Chem. 31, 1188 (1966)
- (44) *VEBER D. F., MILKOWSKI T. et BENKEWALTER R. G. et HISCHEMANN R.*
Tetrahedron Letters 26, 3057 (1968)
- (45) *UYEMA N., NAKATA M. et MAKAMURA A.*
Bull. Chem. Soc. Jpn 58, 464 (1985)
- (46) *LEIUHARD G. E. et JENKS W. P.*
J.A.C.S. 88, 3982 (1966)
- (47) *HISKEY R. G., DAVIS G. W., SAFDY M. E., INUI T., UPHAM R. A. et JONES Jr. W. C.*
J. Org. Chem. 35, 1118 (1970)
- (48) *ZERVAS L., PHOTOKI I. et GHELIS. A. C. S.* 85, 1337 (1963)

- (49) *PHOTOKI I.*
J. Chem. Soc. P 2687 (1970)
- (50) *WIELAND T. et BERTHARD H.*
Ann. Chem. Liebigs
- (51) *BOISSONAS R.A.*
Helv. Chimica Acta
- (52) *VAUGHAM J.R. Jr.*
J.A.C.S. 73
- (53) *SHECHAN J.C. et HESS G.P.*
J.A.C.S. 77, 1967 (1955)
- (54) *KOENIG W. et GEIGER R.*
Chem. Ber. 103, 788 (1970)
- (55) *ANDERSON G.W., ZIMMERMAN J.E. et CALLAHAN F.M.*
J.A.C.S. 85, 3039 (1963)
- (56) *MERRIFIELD R.B.*
J.A.C.S. 85, 2149 (1963)
- (57) *GISIN B.F.*
Helv. Chimica Acta Vol.56, fax 5 n° 142-143, 1476-1482 (1973)
- (58) *STEWART J.M. et YERING S.D.*
Solid Phase Synthesis Freeman W.H. and Compagny
- (59) *BARANY G. et MERRIFIELD R.B.*
The Peptides Vol. 2 Chap 1
(Gross E. et Meinhofer J.) Academic Press.
- (60) *Damien FICHEUX, Thèse de Chimie, Université de Lille I (1986)*

CHAPITRE II

**THEORIES ET METHODES
EXPERIMENTALES**

A/ RAPPELS THEORIQUES

I - ETUDE THEORIQUE DES TRANSITIONS ELECTRONIQUES DES CHROMOPHORES DU LIGAND (1), (2)

L'absorption de la lumière par un composé organique dans l'U.V. et le visible, entraîne le passage des électrons des orbitales σ , π et n de l'état fondamental à des états excités.

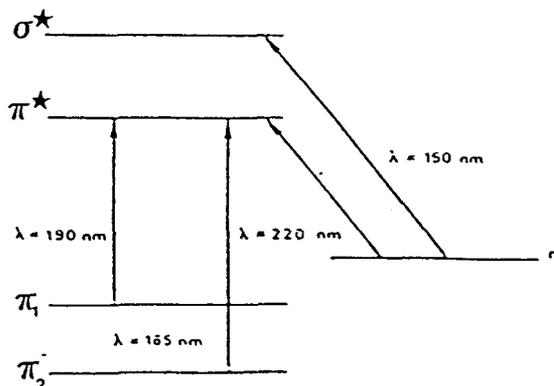
Les molécules étudiées dans notre cas contiennent les groupement chromophores suivants :

- Fonction acide
- Fonction amide
- Fonction amine
- Fonction phényl
- Fonction thiol

Les chromophores symétriques sont optiquement inactifs, mais placés dans un environnement moléculaire asymétrique, ils deviennent optiquement actifs.

1° / LE CHROMOPHORE AMIDE

Le diagramme énergétique suivant résume les différentes transitions électroniques du chromophore (3).



Dans les chromophores amide et acide, l'interaction entre les électrons non liants de l'oxygène et de l'azote et les orbitales π du groupement carbonyle a pour effet d'augmenter l'énergie de l'orbitale antiliante π^* et de séparer l'orbitale π liante en deux nouvelles orbitales π_1 et π_2 (4,5).

On distingue dans le chromophore amide, les transitions suivantes :

♦ une transition $n \longrightarrow \pi^*$ d'un électron d'une orbitale 2 py non liante de l'oxygène de la fonction amide vers l'orbitale antiliante π^* (3) ($\lambda_{\max} = 220$ nm) avec un ϵ assez faible.

♦ deux transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$:

- la transition $\pi^1 \longrightarrow \pi^*$: c'est la transition centrée à $\lambda = 190$ nm qui est plus intense.

- la transition $\pi^2 \longrightarrow \pi^*$: de plus haute énergie, elle est centrée à 160 nm et difficilement accessible expérimentalement (6).

♦ une transition $n \longrightarrow \pi^*$ est moins bien connue, elle est centrée selon les auteurs à 165 nm (7) ou à 160 nm (8).

2° / LE CHROMOPHORE ACIDE

On distingue également :

♦ une transition $n \longrightarrow \pi^*$ située vers 207 nm ; la longueur d'onde, l'intensité et le signe de l'effet cotton de cette bande d'absorption varient souvent avec le pH du milieu (9).

♦ une transition $\pi_1 \longrightarrow \pi^*$ située à 170 nm mais qui est difficilement observable.

3° / LE CHROMOPHORE AMINE

On distingue essentiellement :

♦ Une transition $n \rightarrow \sigma^*$ du doublet libre de l'azote situé vers 215 nm et se confond avec la transition $n \rightarrow \pi^*$ du chromophore amide.

4° / LES CHROMOPHORES SOUFRES (SULFHYDRYLE ET DISULFURE (10,4))

Une bande vers 200 nm est observée pour différentes molécules possédant un groupe sulfhydryle et est attribuée à la transition $n \rightarrow \pi^*$. Lors de la déprotonation du thiol, cette bande passe à 240 nm (10). Dans les spectres de disulfure, une bande centrée à 250 nm est observée avec un coefficient d'extinction molaire relativement important en milieu acide.

Une autre transition vers 190 nm a été observée sous forme d'un épaulement de la bande $n \rightarrow \pi^*$ de l'amide.

5° / LE CHROMOPHORE AROMATIQUE

La molécule de benzène possède six orbitales moléculaires de caractère π . Il y a trois transitions électroniques bien définies qui apparaissent dans le spectre du benzène entre 180 et 300 nm (30-31).

♦ Une transition (1L_b) interdite pour des raisons de symétrie qui donne naissance à une bande de faible intensité ($\epsilon = 230$) centrée à 260 nm à laquelle se trouve généralement associée une structure fine.

♦ Deux transitions appelées bandes principales ou primaires donnant deux bandes d'absorption, l'une très forte ($\epsilon = 4700$) à 197 nm et notée (1B) et l'autre située à 200 nm plus faible notée (1L_a).

L'absorption de la phénylalanine présente un maximum vers 258 nm et 190 nm.

Conclusion : D'une manière générale, il se produit un léger déplacement dans le spectre d'absorption des acides aminés lorsqu'ils sont

engagés dans le peptide par suite de la disparition des charges des groupes ionisés COO^- et NH_3^+ .

Dans une protéine, on retrouve outre les bandes caractéristiques de ses constituants, l'absorption due à la liaison peptidique. La forme et l'amplitude de la bande correspondante dépendent de la conformation de la chaîne peptidique. La conformation influence aussi la position et surtout l'intensité des bandes des acides aminés constitutifs puisque l'environnement dans lequel ils se trouvent, dépend de cette configuration.

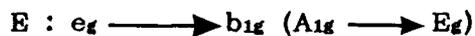
II - ETUDE THEORIQUE DES TRANSITIONS ELECTRONIQUES DANS LES COMPLEXES METALLIQUES.

1° / TRANSITION ELECTRONIQUE DU METAL

Dans l'ion métallique, les cinq orbitales d sont équivalentes. La présence de charges dues aux ligands lève cette dégénérescence des niveaux d'énergie de l'ion complexé donne une mesure de la symétrie et de son environnement. Le remplacement d'un atome par un autre produit un effet bathochrome ou hypsochrome des bandes d-d.

Le nickel (II) et le palladium (II) forment des complexes de symétrie D_{4h} de type carré plan. La dégénérescence de ce complexe donne lieu à quatre niveaux d'énergie e_g , a_{1g} , b_{2g} et b_{1g} comme le montre la figure 1.

On obtient donc trois transitions :



Cette dernière transition est interdite et ne sera donc pas observable (11).

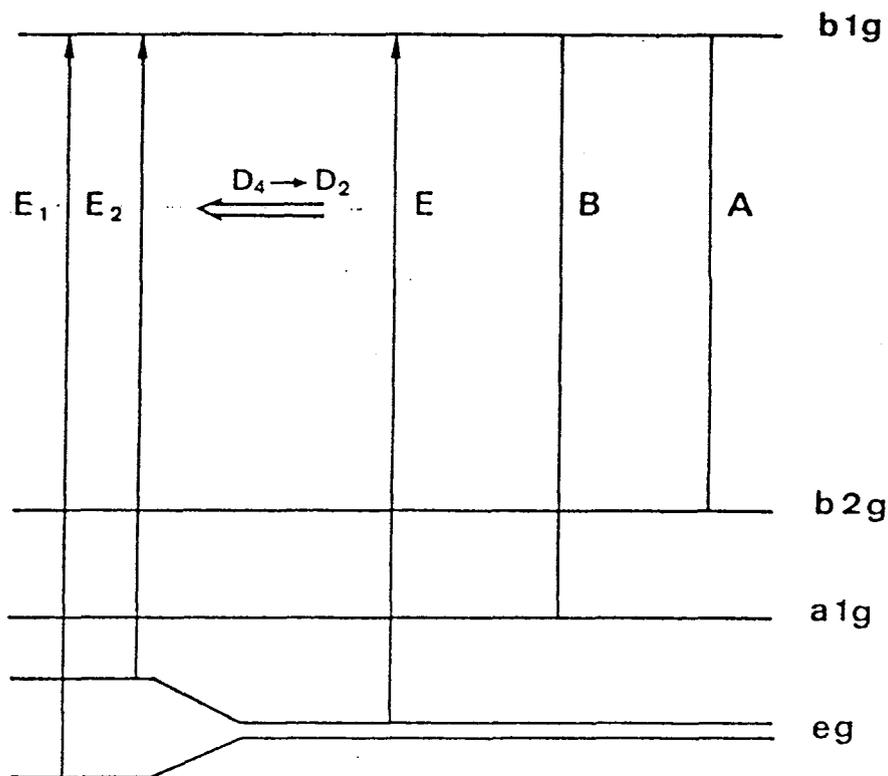


Figure 1

Transitions d-d des complexes plan-carrés

Comme on peut le voir, le passage d'une symétrie D_{4h} à D_2 entraîne une levée de dégénérescence du niveau eg donnant deux transitions E_1 et E_2 (12). La substitution du chlorure par un groupe fonctionnel entraîne une variation hypsochrome qui exprime la somme des contributions individuelles de chaque groupe participant à la complexation (13).

Les paramètres δx qui expriment cette contribution ont été évalués empiriquement par comparaison des spectres d'absorption de complexes du Pd (II) (14).

Fonction	δx (KK)
H ₂ O	6,6
Cl ⁻	5,3
S ⁻	5,3
NH ₂	8,1
N ⁻ 1er peptide	7,5
N ⁻ 2ème "	8,3
COO ⁻	9,4

TABLEAU I

Contribution des fonctions sur la valeur du maximum de la bande d-d des complexes du palladium (II).

Le palladium est le métal qui a la plus grande capacité à déprotoner une fonction amide (pK = 2,4 pour les petits peptides (15)).

Les maxima des bandes d-d du palladium sont situés entre 300 et 500 nm, ce qui les fait le plus souvent apparaître sous forme d'épaulement des bandes de transfert de charge.

La figure 2 présente les différentes dégénérescences de niveaux de l'ion libre dans les symétries rencontrées avec la complexation du nickel (II) auxquelles il ne manque que la symétrie D_{3h} caractéristique de la géométrie bipyramidale trigonale (4-16). Parmi ces géométries, les plus couramment rencontrées sont l'octaédrique, la pseudo-octaédrique (C_{4v}) (bleu-vert) et les complexes plan carrés (jaune-rouge).

Ces derniers donnent les mêmes transitions que le palladium (II) et sont principalement formés avec des ligands de forte liaison covalente ou

possédant un fort caractère de liaison π (4). Dans le cas des complexes octaédriques, les distortions géométriques ou la présence de donneurs différents détruisants la géométrie n'entraînent que peu de variations dans le spectre U.V. visible (17).

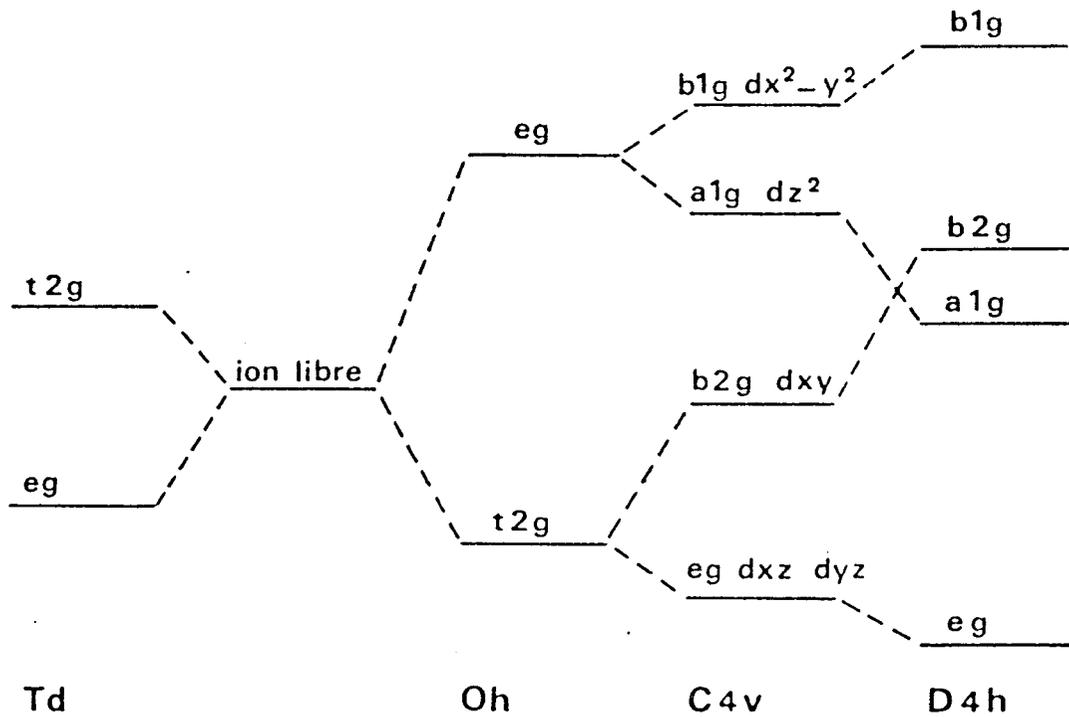


Figure 2

Eclatement des niveaux énergétiques suivant la symétrie dans le cas du nickel (II)

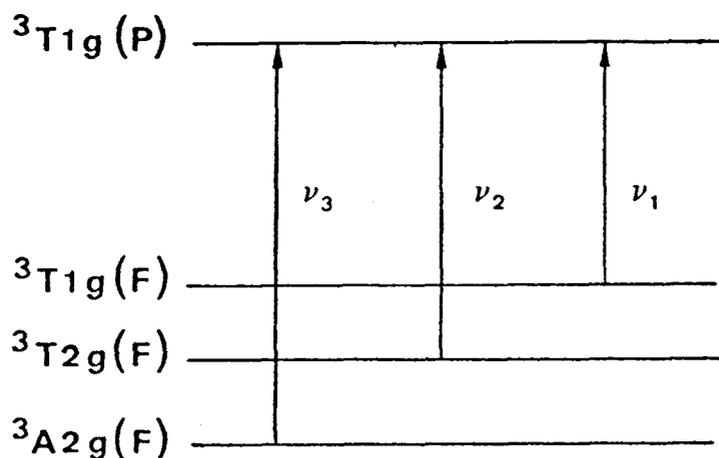
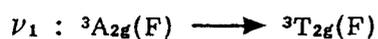


Figure 3

Transition d-d des complexes octaédriques



La transition ν_2 est magnétiquement interdite et ne sera pas visible en dichroïsme circulaire.

Dans le cas du complexe avec l'eau, la bande ν_2 est dédoublée. Avec le soufre, les complexes les plus observés sont carrés plans mais ceux-ci sont proches de la symétrie tétraédrique (18) et peuvent en avoir certaines propriétés (19). Les bandes d-d du nickel sont situées entre 350 et 1200 nm ce qui permet de les observer assez facilement et de connaître la structure du complexe dans la plupart des cas.

2° / TRANSITIONS ELECTRONIQUES PAR TRANSFERT DE CHARGE (19)

Aux transitions électroniques du métal où l'électron se déplace entre les orbitales d, s'ajoutent des transitions dans lesquelles nous avons des

transferts électroniques d'une orbitale localisée sur le ligand vers une orbitale localisée sur le métal ($L \rightarrow M$), à partir des états σ et π vers les niveaux d libres et, vice versa, ($M \rightarrow L$) à partir des niveaux d occupés du métal vers l'état π^* du ligand. Ces dernières transitions ne sont généralement pas observables sauf dans quelques cas particuliers comme celui de $Ni(CN_4)^{2-}$ (10).

Dans ce cas, la distribution de charge est différente à l'état fondamental et à l'état excité d'où l'expression "Transition de transfert de charge".

Les énergies de ces transitions sont généralement beaucoup plus élevées que celles des transitions d-d, elles se situent à l'extrême bleu de la région visible ou dans l'ultra-violet.

Toutes les transitions de transfert de charge sont permises, les bandes sont très intenses (leurs coefficients d'extinction molaire (ϵ) sont de l'ordre de 10^3 à 10^4 mole⁻¹.l.cm⁻¹).

Ce fait, associé à la différence d'énergie (longueur d'onde) permet de distinguer l'absorption due aux transferts de charges des absorptions dues aux transitions d-d pour lesquelles ϵ est généralement inférieur à 10^3 .

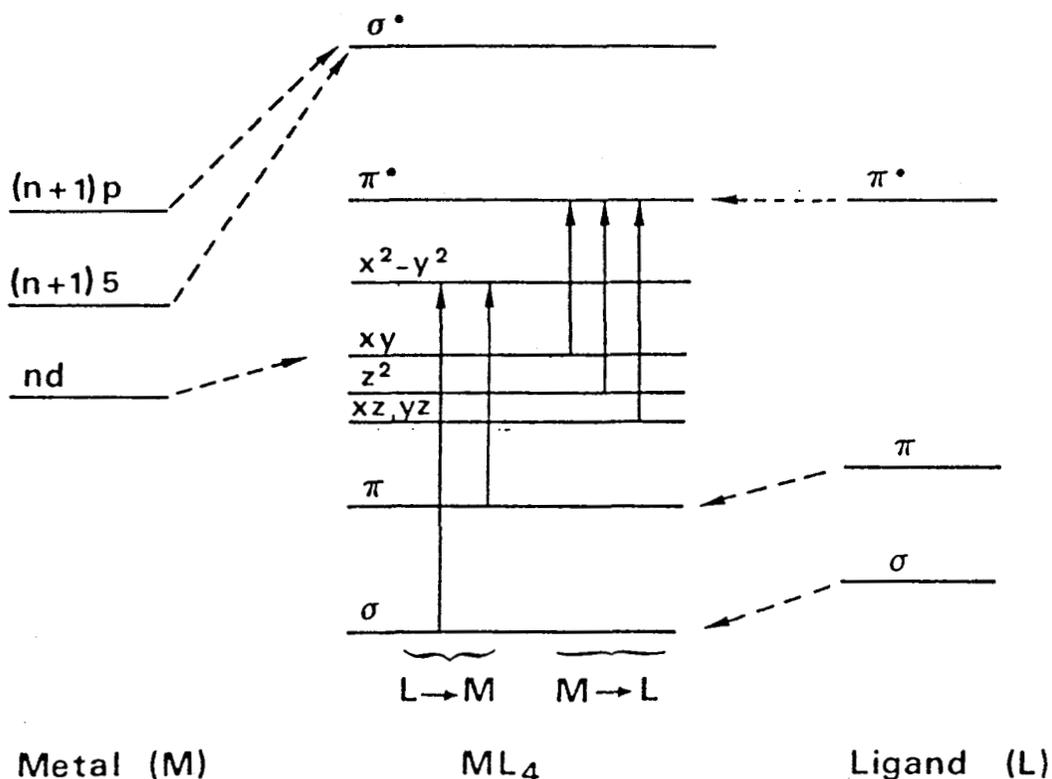


Figure 4

Transitions de transfert de charge entre un ligand et un métal.

III - SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE.

Afin d'extraire des renseignements utiles d'un spectre ultraviolet ou visible, la longueur d'onde du maximum d'absorption (λ_{max}) et son intensité doivent être mesurées avec précision. Le composé doit être dissout dans un solvant convenablement choisi, n'absorbant pas lui-même dans la région à étudier. Pour nos peptides, l'eau est un solvant idéal pour les études UV-visible.

De nombreux spectrophotomètres enregistreurs fournissent directement la courbe de l'intensité de l'absorption en fonction de la longueur d'onde.

L'intensité de l'absorption A ou densité optique est donnée par la relation :

$$A = \log I_0/I$$

où I_0 est l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière transmise.

Le coefficient d'extinction moléculaire ϵ est donné par :

$$\epsilon = A/C.l$$

où C est la concentration moléculaire et l la traversée optique en centimètres.

La mesure de ϵ n'a de sens que si la loi de Beer Lambert est respectée.

IV - DICHROISME CIRCULAIRE (21,22)

Une molécule optiquement active ou molécule chirale fait tourner le plan de polarisation d'une onde électromagnétique linéairement polarisée d'un angle α . Le pouvoir optique rotatoire d'une telle molécule est dû au fait que les deux composantes circulairement polarisées, droite et gauche, traversent le milieu optiquement actif avec des vitesses différentes, les indices de réfraction pour les deux composantes étant différents ($n_d \neq n_g$, $\alpha = \pi l / \lambda (n_d - n_g)$). Ceci se produit quand on a un environnement asymétrique d'électrons dans la molécule.

Quand la molécule optiquement active possède un chromophore, les deux composantes circulairement polarisées d'une onde électromagnétique linéairement polarisée sont différemment absorbées : $\epsilon_d \neq \epsilon_g$, il y a apparition de dichroïsme circulaire. L'extrémité du vecteur champ électrique E décrit à la sortie une ellipse.

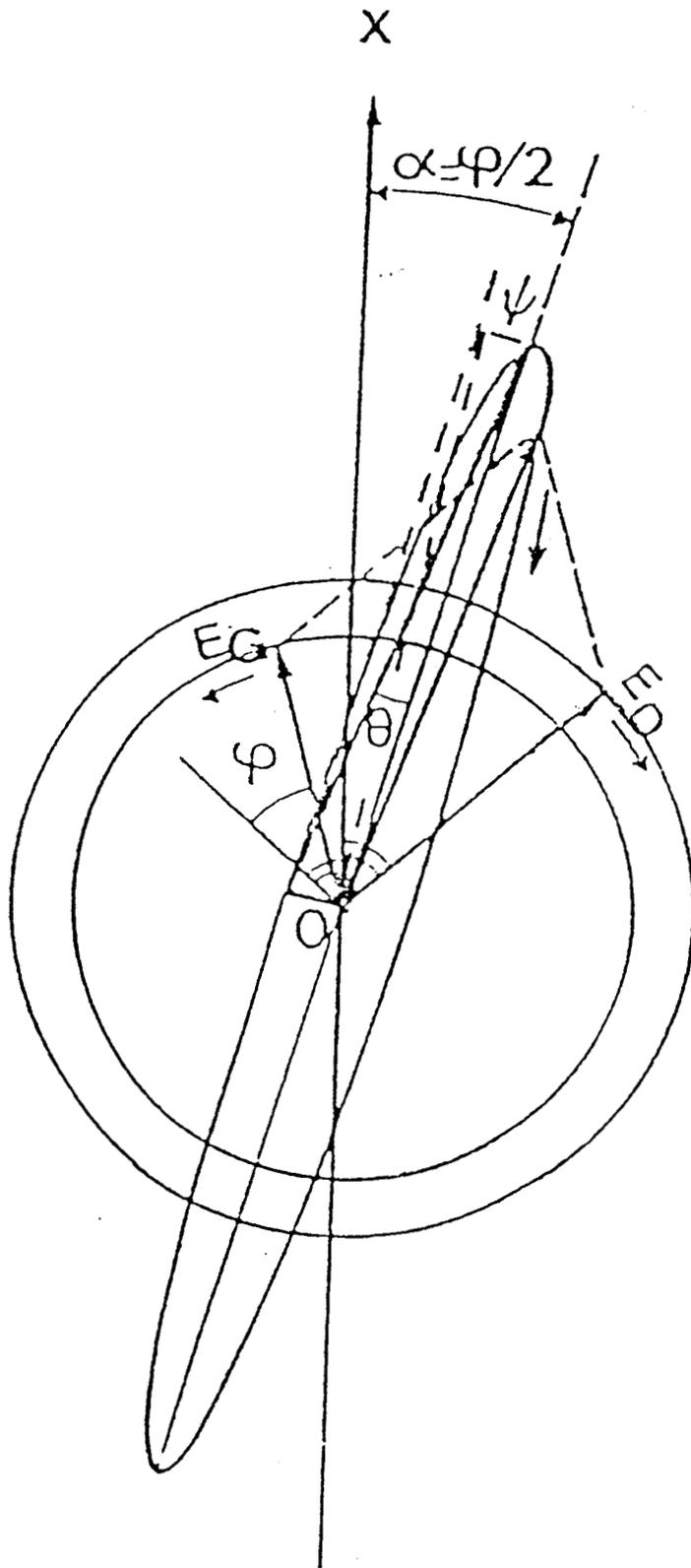


Schéma du phénomène de dichroïsme circulaire

La combinaison de l'absorption différentielle et la différence de vitesse de transmission de la lumière polarisée droite ou gauche dans la région spectrale où se manifeste une bande d'absorption optiquement active est appelée "effet cotton". Il se manifeste en dichroïsme circulaire par une variation de $\Delta\epsilon$ positive ou négative.

L'ellipticité ψ est relié aux coefficients d'absorption droit ou gauche K_G et K_D .

$$\psi = (K_G - K_D) \cdot 1/\lambda \quad \text{avec } \psi \text{ en radians}$$

$\text{tg } \psi = a/b$, a et b étant respectivement les grand et petit axes de l'ellipse.

Deux grandeurs ont été introduites pour exprimer l'ellipticité d'une solution. :

◆ l'ellipticité spécifique :

$$[\psi] = \psi / lc$$

avec ψ en degrés, l épaisseur du milieu en dm et c concentration du soluté en g/ml

◆ l'ellipticité molaire

$$[\theta] = [\psi] M / 100$$

M = masse moléculaire du soluté

Le coefficient d'absorption K est relié au coefficient d'extinction molaire par la relation :

$$K = 2,303 \lambda c / 4$$

ce qui entraîne $[\theta] = 3300 \Delta\epsilon$ (en degré $\text{cm}^2 \text{décimole}^{-1}$)

Le dichrographe fournit directement la différence de densité optique :

$$A = A_G - A_D$$

On obtient donc $\theta = 3300 M \Delta A_s / l c$

c en g/l, l en cm, $A_a - A_b$ mesurée sur le spectre en mm et S : sensibilité en mm^{-1} .

Les phénomènes d'absorption et de dichroïsme circulaire sont produits par des déplacements de charges induits par une onde électromagnétique en créant des dipôles électriques et magnétiques. La force rotationnelle r_K permet de mesurer les interactions entre un chromophore et son entourage asymétrique. Elle correspond à l'aire de la bande en dichroïsme circulaire.

L'équation de r_K , en prenant une transition située entre les états électroniques a et b est :

$$r_K = \text{Im} (a/\mu_e/b) (b/r_K \mu_m/a)$$

c'est à dire la partie imaginaire du produit scalaire des moments de transition dipolaire électrique μ_e et magnétique μ_m .

L'équation devient en prenant comme angle entre les moments magnétique (μ) et électrique (ρ) :

$$r_K = \rho \mu \cos \gamma \quad (1)$$

La transition sera active en dichroïsme circulaire si r_K est non nul.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un dichrographe JOBIN et YVON MARK III équipé d'un système d'acquisition des données couplé avec un ordinateur Apple II. Le traitement des données fournit un spectre représentant la longueur d'onde (λ) en fonction de la différence d'absorption ($\Delta\epsilon$).

Les mesures ont été effectuées avec des cellules en quartz de trajet optique 1 ; 0,1 et 0,01 cm. Les solutions ont été préparées à partir d'eau distillée. La concentration des peptides varie entre 10^{-3} et $5 \cdot 10^{-4}$ mole/l et les rapports ligand/métal sont de 1/1, 2/1 et 4/1.

Les spectres d'absorption ont été tracés avec un spectrophotomètre "CARY 219". Les cellules utilisées sont en quartz de 1 cm de longueur.

Les solutions ont été préparées dans les mêmes conditions que le dichroïsme circulaire.

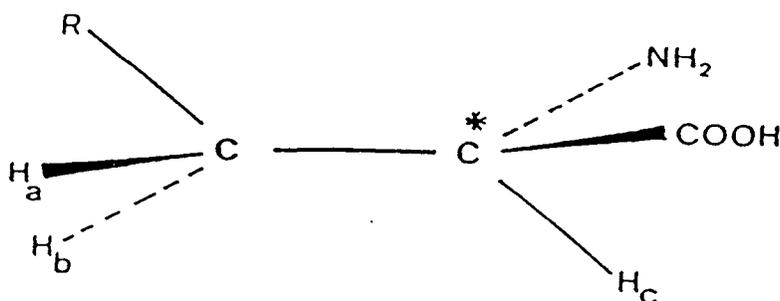
V - ETUDE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.)

La comparaison des spectres R.M.N. des peptides libres et complexés apporte beaucoup de renseignements sur les sites de complexation et la stéréochimie des complexes étudiés.

L'étude par R.M.N., lorsqu'elle est possible, permet de confirmer les hypothèses émises à partir des spectres d'absorption électroniques et de dichroïsme circulaire. En effet, la déprotonation d'une fonction par un métal tel que le Ni(II) entraîne le blindage des protons en fonction de leur proximité (23,24,25). Le déplacement chimique de ces protons permet donc de connaître le ou les centres de déprotonation.

Les acides aminés que nous avons étudiés présentent un spectre de type ABC correspondant à la résonance de l'unité CH-CH₂ du résidu cystéine. Cette unité présentant une activité optique est susceptible d'introduire le phénomène de non équivalence des protons géminés par une dissymétrie moléculaire.

En solution, un équilibre rapide s'établit entre les trois rotamères représentés ci-dessous : la rotation se faisant autour de la liaison C_α - C_β.



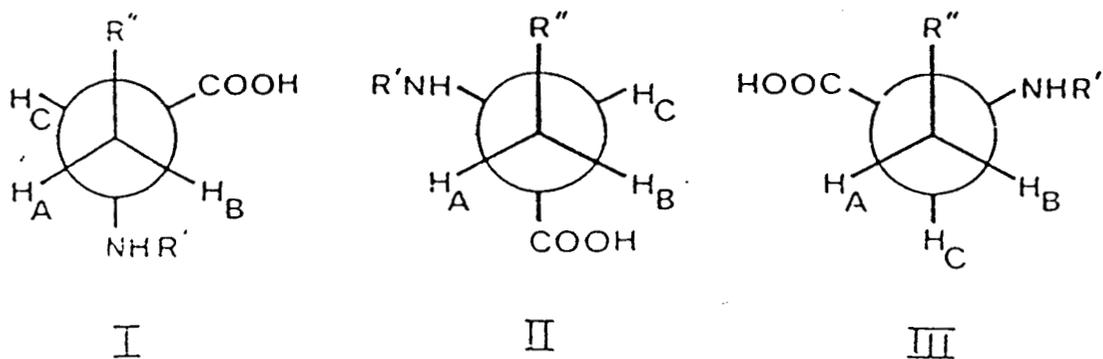


Figure 6

Notation des rotamères autour de la liaison $C_{\alpha} - C_{\beta}$

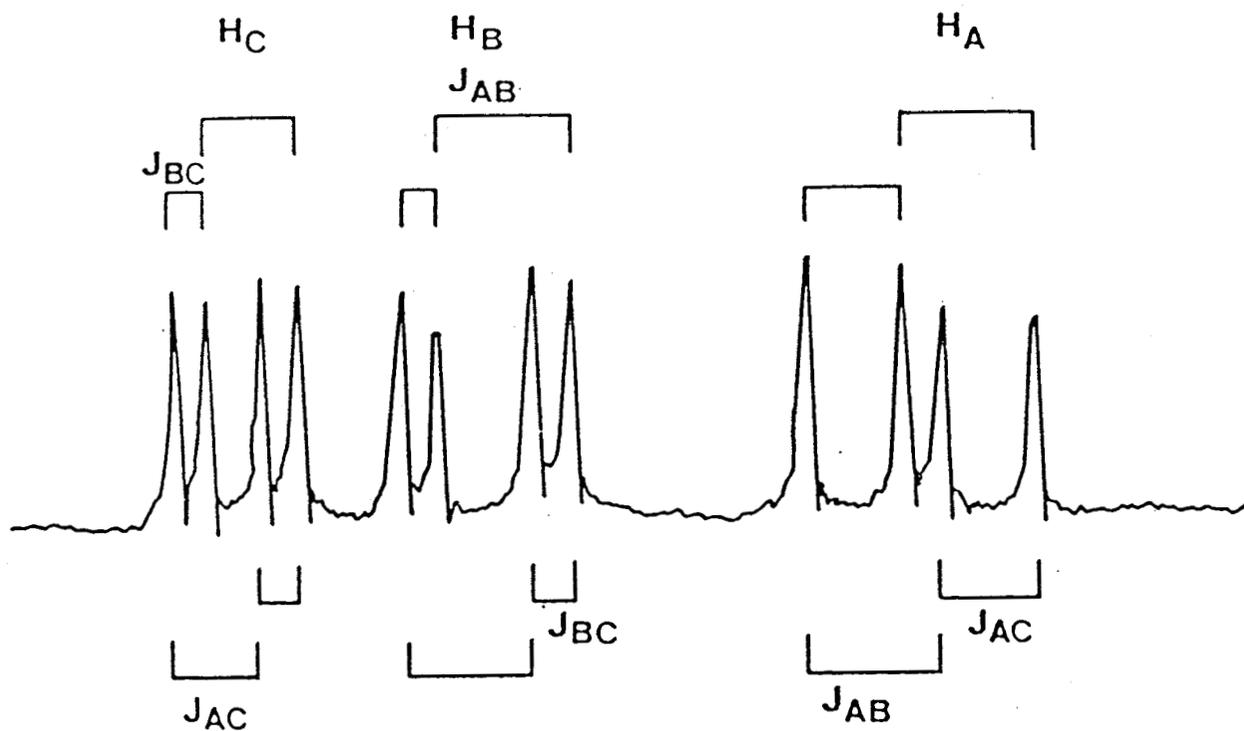


Figure 7

Spectre de type ABC

On peut déterminer les constantes de couplage et les déplacements chimiques de ces trois protons mais seuls la constante J_{AB} et le déplacement δ_C sont obtenus avec assez de précision. Les autres valeurs

étant approximatives, il est nécessaire d'utiliser une méthode de calcul pour les affiner par itération. Dans le cas du mélange des rotamères, les déplacements chimiques et les constantes de couplage représentent la moyenne de ceux-ci pour chaque rotamère (26).

Karplus a proposé une méthode d'approximation des constantes de couplage vicinales en fonction des angles de liaison CH de CH-CH₂ pour les trois rotamères (27).

L'évaluation des constantes de couplage gauche et trans permet alors de déduire la population des trois rotamères J_{AB} et J_{BC} pouvant être exprimés en fonction des fractions molaires des trois rotamères et des paramètres J_g et J_t .

Equation de Pachler :

$$J_{AB} = P_I J_g + P_{II} J_t + P_{III} J_g$$

$$J_{BC} = P_I J_t + P_{II} J_g + P_{III} J_g$$

$$J_{BC} - J_{AC} = (P_{II} - P_I) (J_t - J_g)$$

$$\text{avec } P_I + P_{II} + P_{III} = 1$$

On obtient donc les populations en fonction des constantes de couplage :

$$P_I = J_{BC} - J_g/J_t - J_g$$

$$P_{II} = J_{AC} - J_g/J_t - J_g$$

$$P_{III} = J_{BC} - J_{AC}/J_t - J_g$$

Plusieurs jeux de valeurs ont été utilisés (26,28), nous utiliserons celui de Pachler :

$$J_g = 2,56 \text{ Hz et } J_t = 13,6 \text{ Hz}$$

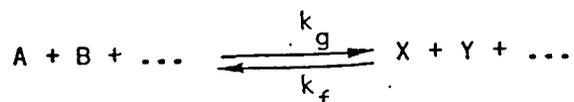
Les mesures des spectres du proton ont été effectuées sur BRUCKER AM 400. Les spectres ABX ont été traités sur HP 9826 avec les programmes LAOCN et ROTAMERE mis au point au laboratoire.

Les solutions ont été préparées dans D₂O avec comme référence le sel de sodium de l'acide 3-triméthylsilyl-1-propane sulfonique et les pH ont été ajustés avec DCl et NaOD.

VI - LA POTENTIOMETRIE

1° / GENERALITES

Une réaction chimique a lieu quand des réactifs (par exemple A,B,...) interagissent pour donner des produits (par exemple X,Y,...).



La vitesse à laquelle les réactifs interagissent dépend de la constante de vitesse de la réaction et des activités des réactifs.

$$\text{vitesse} = k_f \cdot a_A \cdot a_B \cdot \dots$$

Tandis que la réaction se fait, les activités des réactifs décroissent alors que celles des produits augmentent. La vitesse de la réaction va décroître tandis que celle de la réaction inverse va augmenter

$$\text{vitesse} = k_g \cdot a_X \cdot a_Y \cdot \dots$$

L'équilibre sera atteint quand : $k_f \cdot a_A \cdot a_B \cdot \dots = k_g \cdot a_X \cdot a_Y \cdot \dots$

$$K = \frac{k_f}{k_g} = \frac{a_X \cdot a_Y \cdot \dots}{a_A \cdot a_B \cdot \dots}$$

où K est la constante d'équilibre de la réaction.

La constante d'équilibre est donc reliée directement aux activités des réactifs et des produits à l'équilibre mais ne donne pas d'information sur le temps pris pour atteindre l'équilibre. Une connaissance de K donne seulement la proportion des produits et des réactifs après que l'équilibre soit atteint.

Donc la connaissance de K n'a un intérêt pratique que si la réaction évolue rapidement relativement à l'échelle de temps impliquée.

L'interaction d'un ion métallique M et d'un ligand L pour former un complexe métallique est un cas particulier d'équilibre chimique.

Il est généralement admis qu'une telle liaison de coordination est établie entre un doublet libre d'électrons de l'atome de ligand donneur (base de Lewis) et des orbitales vides d'énergie et de symétrie correcte d'ion métallique accepteur (Acide de Lewis). Une formation de liaison similaire a lieu entre un doublet libre d'électrons et un proton, acide de Brönsted.

Donc une dissociation acide peut être traitée de la même façon que l'inverse de la formation d'un complexe métallique. Pour éviter les confusions, il est préférable de se référer à la constante de formation de l'acide (K_F) plutôt qu'à la constante de dissociation acide K_D où $K_F = 1/K_D$. Il est intéressant de noter que $\log K_F$ est numériquement identique à pK_D ($-\log_{10}K_D$). Quand un complexe métallique est formé à partir d'un ion métallique et une ou plusieurs molécules de ligand, la constante d'équilibre est généralement appelée constante de formation ou constante de stabilité. Quand plus d'une molécule de ligand est coordonnée, le procédé se fait étape par étape, par exemple :



(Les charges sont omises pour simplifier) où K_1 et K_2 sont les constantes de stabilité successives. La constante de stabilité globale, généralement notée β_n , se réfère à la formation d'une espèce complexée particulière à partir des ions ou molécules la composant, par exemple :

$$\beta_2 = \frac{a_{ML_2}}{a_M \cdot a_L^2} = K_1 \cdot K_2 \qquad (3)$$

Des espèces plus compliquées peuvent contenir trois ou plusieurs composants différents, les complexes protonés étant les plus importants, c'est à dire $M_xL_yH_z$. La constante de stabilité globale peut maintenant être notée :

$$\beta_{xyz} = \frac{a_M^x a_L^y a_H^z}{a_M \cdot a_L \cdot a_H}$$

Les constantes de stabilité définies jusqu'à présent sont exprimées en termes d'activités, ce sont donc les constantes de stabilité thermodynamiques β^T . Si les concentrations sont utilisées à la place des activités, les "constantes" ainsi calculées seront les constantes stoechiométriques, β^S , parfois connues comme constantes de constantes de concentration β^C .

Puisque les coefficients d'activité $f_M, f_L...$ dépendent de la concentration particulière spécifiée uniquement, par exemple pour un complexe simple comme HL :

$$\beta_1^T = \frac{a_{ML}}{a_M \cdot a_L} = \frac{[ML] \cdot \gamma_{ML}}{[M] \gamma_M \cdot [L] \cdot \gamma_L} \quad (4)$$

$$\log \beta_1^T = \log \beta_1^S + \log \frac{\gamma_{ML}}{\gamma_M \cdot \gamma_L} \quad (5)$$

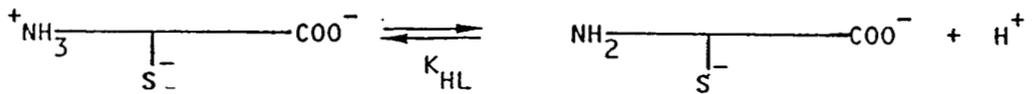
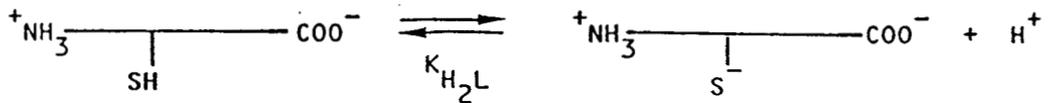
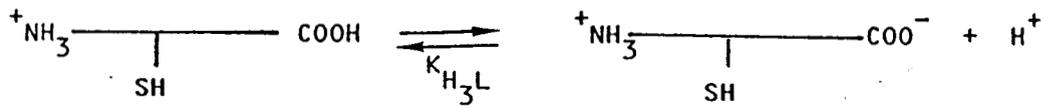
En pratique, les problèmes de l'effet du changement de concentration d'une espèce sur son coefficient d'activité est minimisé en mélangeant les réactifs avec un large excès d'électrolyte inerte comme NaClO₄. Dans ces conditions, il est raisonnable de supposer que les coefficients d'activité des réactifs resteront constants, transformant le dernier terme de l'équation (5) en une constante qui est ajoutée ou soustraite à la valeur de $\log \beta^S$.

Pour des raisons pratiques, les concentrations sont exprimées en molarité. Elles sont donc dépendantes de la température.

2° / APPLICATIONS AUX PEPTIDES ET A LEURS COMPLEXES.

Les peptides que nous avons étudiés contiennent 3 centres de protonation. L'amine NH₂ terminales, le groupe carboxylique terminal et le

groupement thiol latéral de la cystéine. Il en résulte les équilibres suivants :

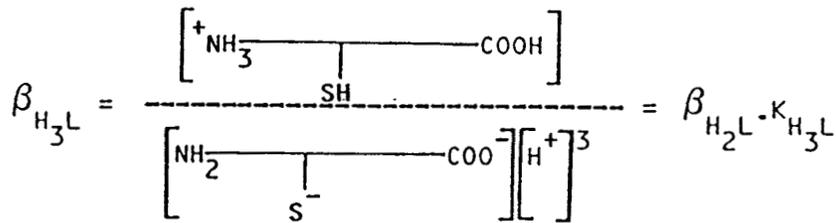
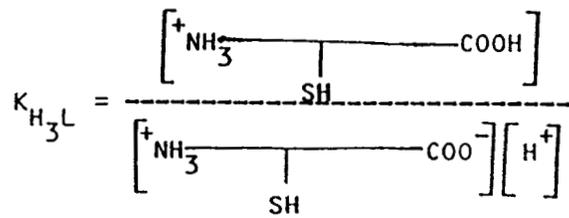


$$\beta_{\text{HL}} = K_{\text{HL}} = \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{---CH}_2\text{---S}^- \text{---COO}^-]}{[\text{NH}_2\text{---CH}_2\text{---S}^- \text{---COO}^-] [\text{H}^+]}$$

$$K_{\text{H}_2\text{L}} = \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{---CH}_2\text{---SH---COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{---CH}_2\text{---S}^- \text{---COO}^-] [\text{H}^+]}$$

$$\beta_{\text{H}_2\text{L}} = \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{---CH}_2\text{---SH---COO}^-]}{[\text{NH}_2\text{---CH}_2\text{---S}^- \text{---COO}^-] [\text{H}^+]^2} = \beta_{\text{HL}} \cdot K_{\text{H}_2\text{L}}$$

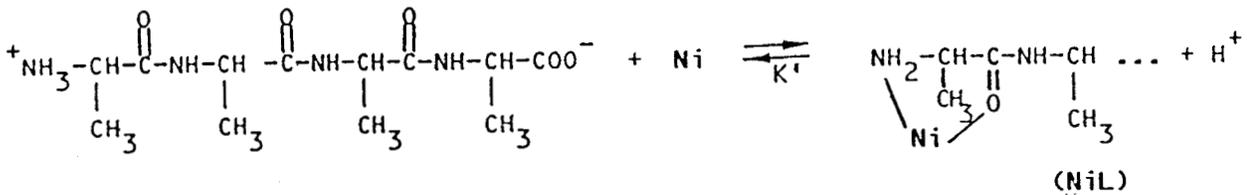
d'où $K_{\text{H}_2\text{L}} = \frac{\beta_{\text{H}_2\text{L}}}{\beta_{\text{HL}}}$ et $\log K_{\text{H}_2\text{L}} = \log \beta_{\text{H}_2\text{L}} - \log \beta_{\text{HL}}$



et $\log K_{H_3L} = \log \beta_{H_3L} - \log \beta_{H_2L}$

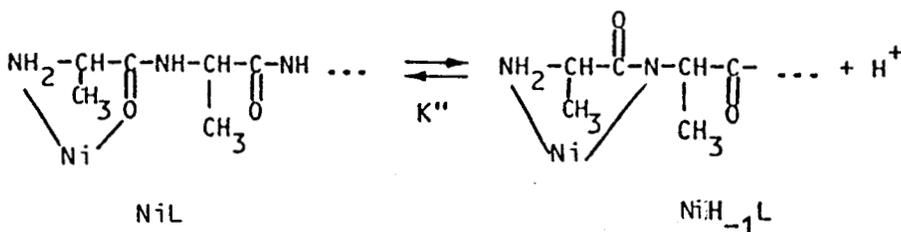
Dans le cas de complexes avec le palladium ou le nickel, les mêmes types d'équilibres peuvent être écrits.

Considérons le cas de complexes formés entre la tétraalanine et le nickel (II).



$$\beta_{NiL} = \frac{[\text{NiL}]}{[\text{Ni}][\text{L}]}$$

$$K' = \frac{[\text{Ni}][\text{LH}]}{[\text{NiL}][\text{H}^+]} = \frac{[\text{Ni}][\text{LH}][\text{L}]}{[\text{NiL}][\text{H}^+][\text{L}]} = \frac{K_{HL}}{\beta_{NiL}}$$



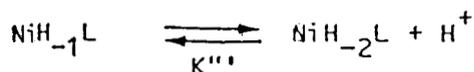
$$K'' = \frac{[Ni]}{[NiLH_{-1}][H^+]}$$

K'' est appelée constante de protonation par étape.

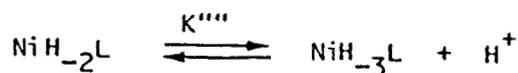
$$\begin{aligned} \beta_{NiH_{-1}L} &= \frac{[NiH_{-1}L]}{[Ni][H]^{-1}[L]} = \frac{[Ni_{-1}L][H^+]}{[Ni][L]} \\ &= \frac{[NiH_{-1}L][H^+]}{[Ni][L]} \times \frac{[NiL]}{[NiL]} = \frac{\beta_{NiL}}{K''} \end{aligned}$$

$$K'' = \frac{\beta_{NiL}}{\beta_{NiH_{-1}L}}$$

$\log K'' = \log \beta_{NiL} - \log \beta_{NiH_{-1}L}$ et ainsi de suite .



$$K''' = \frac{\beta_{NiH_{-1}L}}{\beta_{NiH_{-2}L}} \quad \text{avec} \quad \beta_{NiH_{-2}L} = \frac{[NiH_{-2}L]}{[Ni][H^+]^{-2}[L]}$$



$$K'''' = \frac{\beta_{NiH_{-2}L}}{\beta_{NiH_{-3}L}} \quad \text{avec} \quad \beta_{NiH_{-3}L} = \frac{[NiH_{-3}L]}{[Ni][H^+]^{-3}[L]}$$

Il faut noter que les constantes ainsi déterminées sont des macroconstantes. En pratiques, différentes espèces peuvent être formées en solution, correspondant à la même formule brute.

3° / PRINCIPE DU CALCUL DES CONSTANTES DE STABILITE

Lors de la titration d'une solution de peptide et d'ion métallique par la soude, pour chaque volume de soude ajouté sont connus :

- la concentration totale d'ion métallique

$$[C]_{v=0} \text{Ni}^{2+} = [C]_{v=x} \text{Ni}^{2+} \text{ libre} + [C]_{v=x} \text{Ni}^{2+} \text{ complexé}$$

où $[C]_{v=0}$ est la concentration avant addition de soude et $[C]_{v=x}$ est la concentration pour un volume X de soude ajouté.

- la concentration totale de ligand

$$[C]_{v=0} \text{lig} = [C]_{v=x} \text{ligand libre} + [C]_{v=x} \text{ligand complexé}$$

- le pH de la solution donc la concentration d'ions H^+

Il en résulte pour le calcul des constantes de stabilité un jeu d'équations contenant plus d'inconnus que d'équations pour chaque valeur de pH. On introduit alors dans le programme PSEQUAD (29) des valeurs estimées des divers constantes de stabilité. Il en résulte que le système d'équations peut être résolu par un moindre carré linéaire aboutissant à une approximation des concentrations libres de métal et de ligand.

Dans un deuxième stade, ces concentrations estimées et les valeurs de β sont alors affinées simultanément par une procédure de moindre carré non linéaire.

4° / PARTIE EXPERIMENTALE

L'apport de l'informatique dans le traitement des courbes potentiométriques a permis l'affinement des constantes obtenues et une meilleure connaissance des espèces en solution. De ce fait, la potentiométrie constitue un moyen de vérifier la validité des hypothèses faites à partir des méthodes spectroscopiques. La complexation s'accompagne le plus souvent du départ de protons, ce qui permet de suivre son évolution par pH métrie.

Après traitement des courbes de titration, les constantes de formation des espèces permettent de tracer les courbes de répartition de celles-ci en fonction du pH et ainsi de connaître la zone d'existence des espèces en solution. Les études potentiométriques ont été réalisées à l'Institut de Chimie Inorganique et Analytique de l'Université LAJOS KOSSUTH à DEBRECEN (Hongrie).

Les mesures ont été effectuées dans une cellule thermostatée à $298 \pm 0,1$ K sous atmosphère d'argon.

Les rapports ligand/métal des solutions allaient de 1 à 4 l'ion métallique se trouvant à une concentration voisine de 10^{-3} mole/litre. Un pHmètre Radiometer PHM64 équipé d'électrode de verre (Radiometer G2040B) et de calomel (Radiometer K4040) a été utilisé pour effectuer les mesures.

Une autoburette ABU13 ou ABU80 a servi à ajouter la potasse 0,1 molaire. La force ionique de la solution était stabilisée par l'utilisation d'une solution de KCl 0,2 molaire permettant ainsi de travailler avec un coefficient d'activité presque constant.

Le pHmètre a été calibré avec une solution 0,05 molaire d'hydrogénéphthalate de potassium.

Les constantes de protonation et de stabilité des complexes ont été calculées à partir des courbes de titration à l'aide du programme PSEQUAD.

A partir de ces constantes, on peut tracer des courbes de répartition des espèces qui nous permettent de visualiser les espèces en fonction du pH.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CHAPITRE II

- (1) W.F. GRATZER
"Ultraviolet Absorption Spectra of polypeptides" dans *Poly Amino acids - Vol.1* Ed. G.D. Fasman M.
- (2) M. GOODMAN, C. TONIOLO
Biopolymers 6, 1673 (1968)
- (3) W.D. CLOSSON et P. HAUG
J. Am. Chem. Soc. 86, 2384 (1964)
- (4) L. SACCONI
Trans. Met. Chem. 4, 199 (1968) Ed. M. Dekker, N.Y.
- (5) W.D. CLOSON et P. HARY
J.A.C.S. 86, 2384 (1964)
- (6) POLYAMINOACIDES - "Proteins models for conformational Studies"
Ed. G.D. Fasman, M. Dekker Inc., p 177 New York (1967)
- (7) D.L. PETERSON, W.T. SIMPSON
J. Am. Chem. Soc. 79, 2375 (1957)
- (8) W.D. URRY
J. Phys. Chem. 72, 3035 (1968)
- (9) I. LISTOWSKY, G. AVIGAD et S. ENGLARD
J. Org. Chem. 35, 1080 (1970)
- (10) D.L. COLEMAN et E.R. BLOUT
J.A.C.S. 90, 2405 (1968)
- (11) R.B. MARTIN
Met. ions in Biol. Systems 1, 129 Ed. Wiley
- (12) C.J. HAWKINS
Absolute configuration of Metal Complexes 5, 179 (1971) Ed Wiley
- (13) R. TSUCHIDA
Bull. Chem. Soc. Japan 13, 388 et 436 (1938)
- (14) B. JEZOWSKA-TREBIATOWSKA, G. FORMICKA-KOZLOWSKA et H. KOZLOWSKI
Bull. Acac. Pol. Sci. 26, 561 (1976)
- (15) H. SIEGEL et R.B. MARTIN
Chem. Rev. 82, 385 (1982)

- (16) C.J. BALLHAUSEN et A.D. LIEHR
J.A.C.S. 81, 538 (1959)
- (17) O. BOSTRUP et C.K. JORGENSEN
Acta Chem. Scand. 11, 1223 (1957)
- (18) L.L. LOHR Jr.
J.A.C.S. 100, 1093 (1978)
- (19) F.A. COTTON et G. WILKINSON
Advanced Inorganic Chemistry Ed. Wiley
- (20) H.B. GRAY
Trans. Met. Chem. 1, 239 (1965)
- (21) P. CRABBE
Applications de la dispersion optique rotatoire et du dichroïsme circulaire optique en Chimie Organique. Ed. Gauthier Villers, Paris.
- (22) F. CIARDELLI et P. SALVADORE
Optical Rotary dispersion and Circular Dichroism. Ed. Heyden
- (23) B. DECOCK-LE REVEREND, L. ANDRIANARIJAONA, C. LIVERA, L.D. PETTIT, I. STEEL, H. KOZLOWSKI
J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2221 (1986)
- (24) H. KOZLOWSKI
Inorganica Chimica Acta 31, 135 (1978)
- (25) G. FORMICKA-KOZLOWSKA, H. KOZLOWSKI, G. KUPRYSZEWSKI
Inorganica Chimica Acta, 46, 29 (1980)
- (26) K.G.R. PACHLER
Spectrochimica Acta 19, 2085 (1963) et 20, 281 (1964)
- (27) N. KARPLUS
J.A.C.S. 85, 2870 (1963)
- (28) J. FEENEY
J. Magn. Res. 21, 473 (1976)
- (29) A. GERGELY et I. NAGTPAL
Computational Methods for determination of stability constants. Ed. D. Leggett Plenum Press, N.Y. (1985)
- (30) Y.H. DYER
"Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds" Prentice-Hall Enc. (1965)
- (31) H.H. HAFTE, M. ORCHIN
"Theory and Application of ultraviolet spectroscopy" John Wiley and Sons Inc (1962)

CHAPITRE II

**THEORIES ET METHODES
EXPERIMENTALES**

CHAPITRE III

<p>ETUDE DE LA COMPLEXATION PAR LE NICKEL (II)</p>
--

**ETUDE DE LA COMPLEXATION AVEC LE
NICKEL (II) DE PEPTIDES CONTENANT
LA CYSTEINE**

INTRODUCTION

La plupart des peptides donnent avec le nickel (II) des complexes octaédriques (1,2,3). Cependant avec des résidus comme la cystéine et l'histidine, on obtient dans la plupart des cas des complexes plan-carrés (1,2,4) ou tétraédriques (5,6). La structure des complexes thiolés est difficile à établir (7,8,9,10).

Nous avons utilisé pour cela les spectroscopies d'absorption U.V. visible et de dichroïsme circulaire ainsi que la R.M.N. lorsque cela était possible.

En parallèle, une étude potentiométrique nous a permis de connaître l'importance relative et le degré de déprotonation des espèces en solution.

A/ GENERALITES

◆ TRANSITIONS D—D

Les énergies relatives des orbitales 3d dans les complexes plan carré du Ni (II) sont particulièrement difficiles à déterminer car toutes les transitions d-d sont voisines. En dichroïsme circulaire, la bande d-d caractéristique de ce type de complexe apparaît dans la région 412 à 440 nm (12,13,14,15). Cependant, il peut y avoir un déplacement de cette bande vers les faibles énergies ($\epsilon_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$) qui peut être dû à un changement d'environnement autour du métal (16).

Quant aux transitions d-d des complexes octaédriques, elles présentent deux épaulement vers 390 et 650 nm de faible ϵ et une bande qui apparaît au delà de 900 nm (12,17,18).

◆ TRANSITIONS PAR TRANSFERT DE CHARGE

Transition amide Ni (II)

Dans les complexes du Ni(II) où l'azote amide participe à la complexation, une bande de TC apparaît vers 250 à 260 nm. Cette bande est difficile à identifier. Elle peut être masquée par la présence dans cette région de la bande $n \rightarrow \pi^*$ de la fonction amide (19).

Transfert de charge amine \rightarrow Ni(II) et acide \rightarrow Ni(II)

Les complexes du Ni(II) avec les aminoacides présentent dans leurs spectres dichroïques une bande vers 220 nm. Cette bande peut être due soit à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de l'amide fortement perturbée par le voisinage du complexe, soit à des transitions de transfert de charge acide \rightarrow Ni(II) et amine \rightarrow Ni(II).

B/ ALA-CYS ET PHE-CYS

Les peptides non complexés que nous avons étudiés peuvent être tous représentés comme des ligands H_2L avec 3 centres de protonation : la fonction carboxylate terminale, la fonction thiol et la fonction N-terminale.

Les macroconstantes (pK) et microconstantes (pk) de dissociation des peptides ont pu être évalué par étude potentiométrique, les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

La déprotonation du groupe carboxylique, caractérisée par pK_1 , est très distincte de la déprotonation de la fonction thiol (pK_2) et de la fonction N-terminale (pK_3).

Par contre la déprotonation de ces deux dernières fonctions a lieu simultanément et dans ce cas la réelle acidité de ces groupes doit être évaluée par des microconstantes (pk) qui peuvent être calculées par des titrations pH métriques et spectrophotométriques.

Il apparaît que le recouvrement entre les processus de dissociation, qui est exprimé par le rapport k_2/k_3 , est relativement faible.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec Gly-Cys (20) ($k_2/k_3 = 0,09$) dans lequel la cystéine est aussi en position C-terminale (25).

Par contre avec la cystéine seule, les résultats sont tout à fait opposés ($k_2/k_3 = 1,62$).

Cette différence peut s'expliquer par l'allongement de la chaîne lors de la formation du peptide qui éloigne ainsi la fonction thiol du groupe NH_3^+ .

En accord avec ces résultats, les processus de formation des complexes peptides-Ni(II) sont totalement différents de ce que l'on peut observer avec d'autres métaux.

Les constantes de stabilité des complexes du Nickel (II) sont résumées dans le tableau II et la courbe de répartition des espèces est présentée en

figure 2. Les résultats montrent une similitude entre les systèmes étudiés : Ala-Cys et Phe-Cys, et le ligand Gly-Cys (20,26).

L'existence de l'espèce monomère $NiAH_{-1}$, représentée en figure 1 est la seule différence entre Gly-Cys et Ala-Cys ou Phe-Cys.

La présence de cette espèce monomère dans le cas de Ala-Cys et Phe-Cys peut s'expliquer par l'encombrement stérique causé par respectivement le méthyl et le phényl de la chaîne latérale.

Cette espèce peut être observée en équilibre avec l'espèce dimère : $Ni_2A_2H_{-2}$. Mais pour des pH supérieurs à 5,5 l'espèce dimère devient un complexe très stable ; ce complexe est alors la seule espèce majoritaire en solution équimolaire jusqu'à pH 11 (figure 2).

Dans le cas de ces peptides, la complexation se fait par l'amine, l'amide et le thiolate. Le dernier point de coordination est occupé par le soufre d'un autre ligand. Dans le cas où le métal et le ligand sont en rapport égal, le seul soufre pouvant intervenir est celui d'un ligand déjà complexé avec un autre nickel et on obtient un pont soufré entre les deux atomes métalliques qui donne l'espèce dimère $Ni_2A_2H_{-2}$ représentée en figure 3. Dans ce dernier complexe le second ligand est uniquement coordonné par le groupe thiol. La fonction N-terminal peut être protonée pour donner l'espèce NiA_2 que l'on peut aussi écrire $Ni(AH)(AH_{-1})$.

Ces espèces donnent lieu à un équilibre (figures 4 et 5).

La liaison dative d'un thiolate libre dans les espèces NiA_2 et NiA_2H_{-1} est plus stable que la liaison covalente du soufre dans le dimère. Les deux espèces NiA_2 et NiA_2H_{-1} ont le même type d'environnement, la déprotonation de l'amine du second ligand ne changeant rien dans la complexation. La structure des espèces est semblable : c'est à dire que l'on a une coordination avec deux soufres et deux azotes sur le nickel. Cela se traduit par deux bandes d-d dans tout le domaine de pH à 560 nm et 460 nm, à la fois pour Ala-Cys et Phe-Cys (fig 9 à 13) correspondant aux transitions A et E en dichroïsme circulaire. Dans le domaine de l'ultra-violet, on a deux transitions de transfert de charge à 320 nm ($\pi S_x \rightarrow Ni$) ; 275 nm ($\sigma S_y \rightarrow Ni$) pour le complexe Ala-Cys-Ni(II) (fig 7,8,14) ; et à 275 nm ($\sigma S_y \rightarrow Ni$) ; 255 nm ($\sigma S_z \rightarrow Ni$) pour le complexe Phe-Cys-Ni(II) (fig 15,16). Ces

transitions ont pu être identifiés grâce aux travaux de Solomon que nous exposerons dans le chapitre du palladium. On ne note aucune bande transfert de charge amide \rightarrow nickel.

L'existence de l'espèce binucléaire est confirmée par la présence d'une bande de transfert de charge à 333 nm en U.V.-visible. On trouve également à 460 nm une bande de transition d-d : elle est représentative du complexe plan carré (fig 18 à 21 et 27 à 29).

On a pu démontrer que l'intensité de ces bandes, caractérisée par leur coefficient d'extinction molaire, dépend fortement du pH lorsque le ligand est en excès (Table I). La variation de l'intensité de ces bandes est en parfait accord avec la variation de la concentration de l'espèce dimère : on a en effet un maximum à pH 7.13 $\epsilon_{460} = 454 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ et $\epsilon_{333} = 2409 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ et 80% de $[\text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_2]^{2-}$ (table 1, fig 2). L'espèce binucléaire est absente en présence d'un excès de ligand et le complexe NiA_2H_1 est formé à des pH basiques (fig 2, Tableau II).

Le spectre d'absorption d'une solution équimolaire de Ni(II) et Ala-Cys ou Phe-Cys a aussi été mesuré en fonction de la concentration totale de Ni(II) à pH 7 (Figure 32). On peut ainsi observer l'équilibre monomère-dimère et la figure 32 montre que l'intensité de la bande de transfert de charge (ϵ_{333}) due à la coordination $\text{S} \rightarrow \text{Ni}$ dépend de façon significative de la concentration en Ni(II). L'augmentation de la concentration de Ni(II) a pour effet d'augmenter l'espèce binucléaire ; à partir de concentration de Ni(II) de 4.10^{-3} mol/l l'espèce binucléaire devient majoritaire (fig 22 à 26, 30, 31).

En résonance magnétique nucléaire du proton, seuls les complexes plan carré diamagnétique peuvent être étudiés. C'est pour cette raison que nous avons comparé nos résultats des peptides libres et complexés à haut pH. Néanmoins, une étude préliminaire par R.M.N. en fonction du pH a été effectuée pour les peptides libres. Cette étude nous a permis dans un premier temps, l'attribution des pics de résonance des protons des différents résidus, dans un deuxième temps de déterminer l'évolution des constantes de couplages vicinales J_{AB} et J_{AC} calculées à partir des spectres et par conséquent, d'évaluer les populations relatives des trois rotamères.

L'étude de peptides libres en R.M.N. protonique montre une variation des déplacements chimiques en fonction du pH.

Ainsi, la déprotonation du groupe carbonyle entraîne le déplacement des signaux des protons voisins vers les champs forts. La déprotonation du groupe amino entraîne le déplacement des signaux vers les champs faibles. L'intensité de ces effets diminue le long de la chaîne, au fur et à mesure que l'on s'éloigne du groupe ionisé (Tableau III, fig 33 à 36).

Ces constatations expérimentales permettent d'envisager une méthode simple d'attribution des signaux pour de petits peptides. Ainsi, si l'on considère un dipeptide XY, où X et Y sont deux résidus d'acides aminés ; si la séquence est XY (avec $X = \text{NH}_3^+\text{RCO}$ et $Y = \text{NHR}'\text{COO}^-$), l'addition d'une base entraîne un déplacement des signaux du groupement R de X R(X) vers les champs plus forts par rapport aux signaux de R(X) avec XY sous forme de zwitterion z^\pm . Par contre, les signaux R'(Y) ne sont pas déplacés, la distance de R' au groupe ionisé étant trop importante.

Par ailleurs, l'addition d'un acide au dipeptide XY sous forme de zwitterion entraîne un déplacement des signaux de R'(Y) vers les champs faibles, ceux de R(X) n'étant pas déplacés. Si l'on inverse la séquence des résidus X et Y (c'est à dire $\text{YX} = \text{NH}_3^+\text{R}'\text{CONHR}\text{COO}^-$), les signaux de R'(Y) seront déplacés vers les champs forts par addition de base alors que les signaux de R(X) seront déplacés vers les champs faibles par addition d'acide (fig 33 à 36).

De la même façon, il est possible de déterminer la séquence des acides aminés dans un tripeptide et d'attribuer les différents signaux par l'étude des déplacements de ceux-ci en fonction du pH. Considérons l'exemple d'un tripeptide XYZ formé de trois résidus d'acides aminés X, Y et Z. Si la séquence est XYZ ($X = \text{NH}_3^+\text{RCO}$, $Y = \text{NHR}'\text{CO}$ et $Z = \text{NHR}''\text{COO}^-$), l'addition de base entraîne le déplacement des signaux de R vers les champs forts tandis que l'addition d'acide déplace les signaux de R'' vers les champs faibles. Les signaux de R' ne sont que légèrement affectés par les variations de pH, la distance entre R' et les groupements ionisables étant relativement importante. Il faut néanmoins remarquer que les signaux de R' peuvent être affectés par les changements de pH si le résidu Y possède un groupement ionisable dans sa chaîne latérale.

L'étude de peptides complexés par les métaux en milieu basique montre une déprotonation de la fonction amide par le métal qui se traduit en RMN par un déplacement du spectre vers les champs forts par rapport aux spectre du peptide libre (Tableau III).

En excès de ligand, plusieurs espèces peuvent être présentées simultanément. Le spectre RMN du complexe Ala-Cys : Ni rapport 2, à pH 10.22 montre la formation de l'espèce NiA_2H_{-1} .

En fait, le spectre RMN de cette espèce se décompose en 3 systèmes ABC de la cystéine (fig 37 et 38) :

- ◆ le système du à l'excès de ligand et dont l'octet est centré à 2.8 ppm,
- ◆ le système du peptide lié par le soufre : 2 quadruplets centrés à 2,4 ppm,
- ◆ le système du peptide lié par le soufre, l'amide et l'amine localisé à 2.1 ppm.

Dans les mêmes conditions expérimentales le complexe Phe-Cys : Ni conduit aux mêmes conclusions.

Le calcul des populations de rotamères sont encore identiques pour les deux peptides.

Pour Ala-Cys, il n'existe pas de différence entre le peptide libre et le peptide complexé : la population P_{II} est toujours majoritaire. Il en est de même pour Phe-Cys : le peptide libre ou complexé conduit toujours à une population P_{II} majoritaire. L'encombrement stérique et la complexation ne semblent donc pas modifier les proportions de rotamères (Tableau III).

Les spectres RMN des peptides complexés Ala-Cys et Phe-Cys montrent donc que l'on a en présence deux espèces de cystéine coordonnées ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus en dichroïsme, U.V.-visible et potentiométrie. Les complexes obtenus forment deux chélates à cinq chaînons d'une bonne stabilité.

Tableau I : Macroconstantes (pK) et microconstantes (pK) des ligands. T = 298 K ; I = 0.2 mol.dm⁻³ (KCl).

	Ala-Cys	Phe-Cys
pK ₁	2.90±0.02	2.98±0.02
pK ₂	7.99±0.02	7.25±0.02
pK ₃	9.52±0.02	9.61±0.02
pk ₂	9.15±0.02	8.79±0.02
pk ₃	8.02±0.01	7.26±0.01
pk ₂₃	8.36±0.02	8.07±0.02
pk ₃₂	9.49±0.02	9.60±0.02
k ₂ /k ₃	0.07	0.03

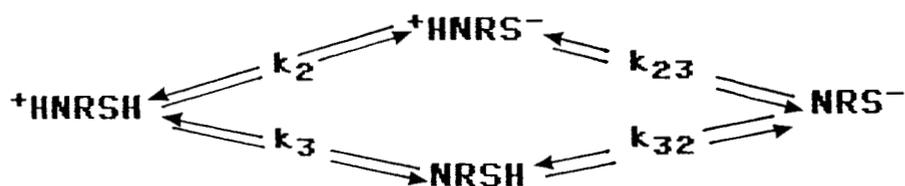
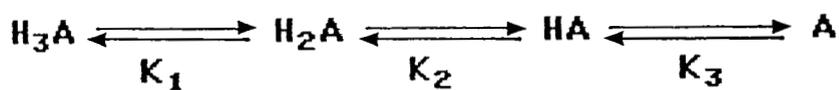


TABLEAU II : Constantes de stabilité (log β) et valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour Ala-Cys et Phe-Cys avec Ni(II).

Ligand	Espèces	Log β	Dichroïsme		Transition		
			λ	$\Delta\epsilon$			
Ala-Cys	NiAH-1	1.75 \pm 0.05					
		15.08 \pm 0.02					
	NiAzH-1	6.48 \pm 0.02	560	-0.8	d-d, A		
			460	+0.4	d-d, E		
			320	+3.5	S \rightarrow Ni, CT		
			275	-2.0	S \rightarrow Ni, CT		
			Ni ₂ AzH- ₂	7.43 \pm 0.02	550	-0.75	d-d, A
					490	-1.05	d-d, E ₁
					405	-1.5	d-d, E ₂
					355	+0.3	S \rightarrow Ni, CT
	310	+0.2			S \rightarrow Ni, CT		
	265	+0.4			N ⁻ \rightarrow Ni, CT		
	235	-0.5	S \rightarrow Ni, CT				
	Phe-Cys	NiAH-1	1.91 \pm 0.03				
6.53 \pm 0.02							
NiAzH-1		6.53 \pm 0.02	560	-1.0	d-d, A		
			460	+0.8	d-d, E		
			315	+2.4	S \rightarrow Ni, CT		
			275	-5.0	S \rightarrow Ni, CT		
			255	-4.0	S \rightarrow Ni, CT		
			Ni ₂ AzH- ₂	7.83 \pm 0.02	565	-0.4	d-d, A
					480	-1.4	d-d, E ₁
					405	-1.2	d-d, E ₂
					355	+2.5	S \rightarrow Ni, CT
					315	+3.0	S \rightarrow Ni, CT
					260	+2.5	N \rightarrow Ni, CT
					235	-6.0	S \rightarrow Ni, CT

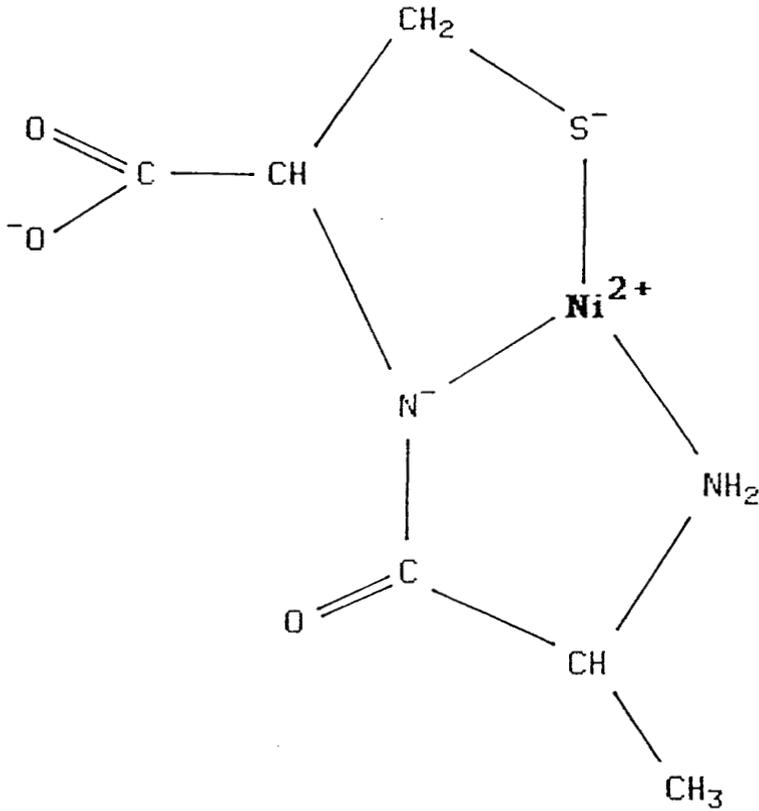


Figure 1
Structure du complexe NiAH₁
(Ala-Cys : Ni(II))

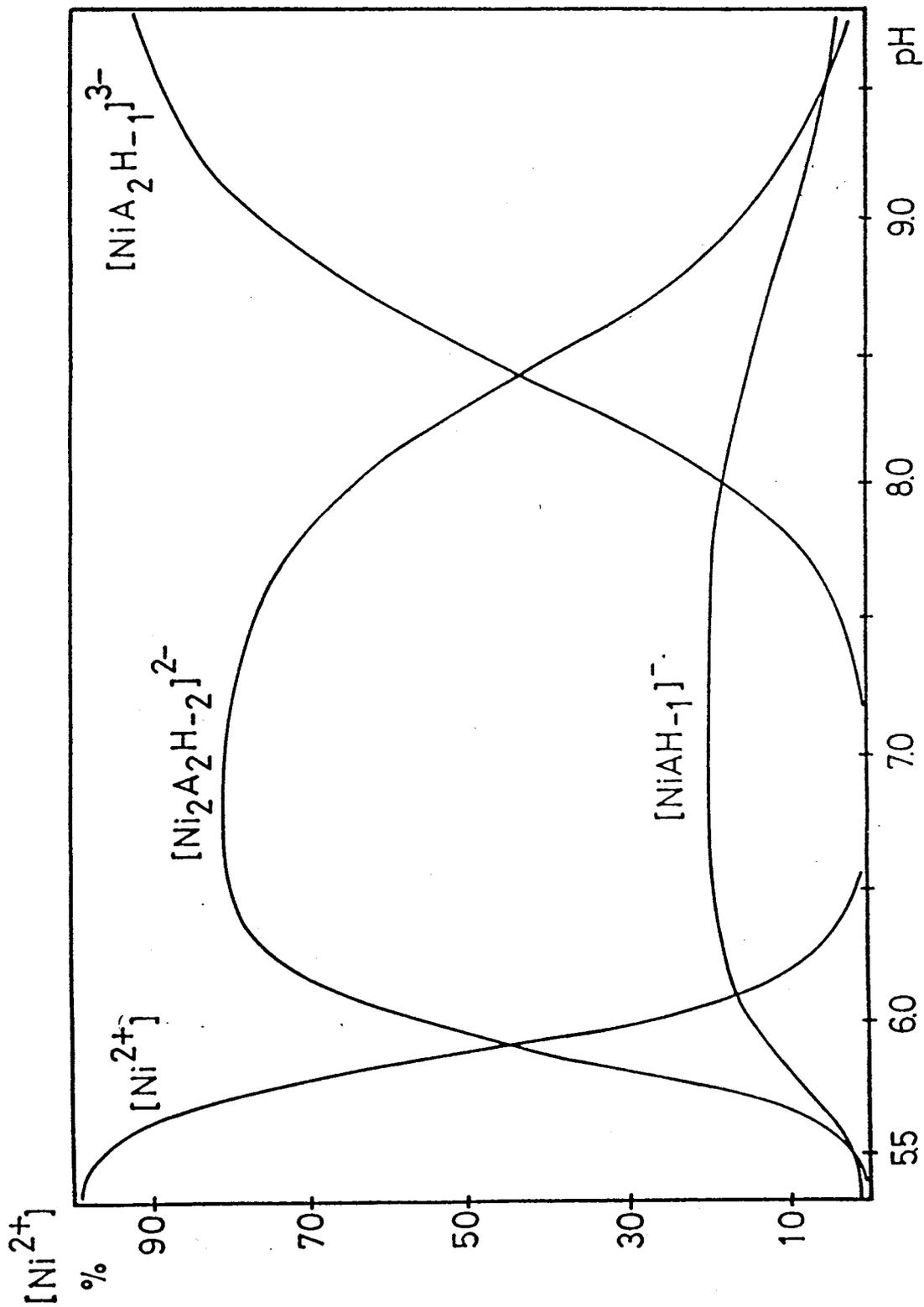


Figure 2
Courbes de répartition des espèces
Phe-Cys : Ni(II)
Rapport 2

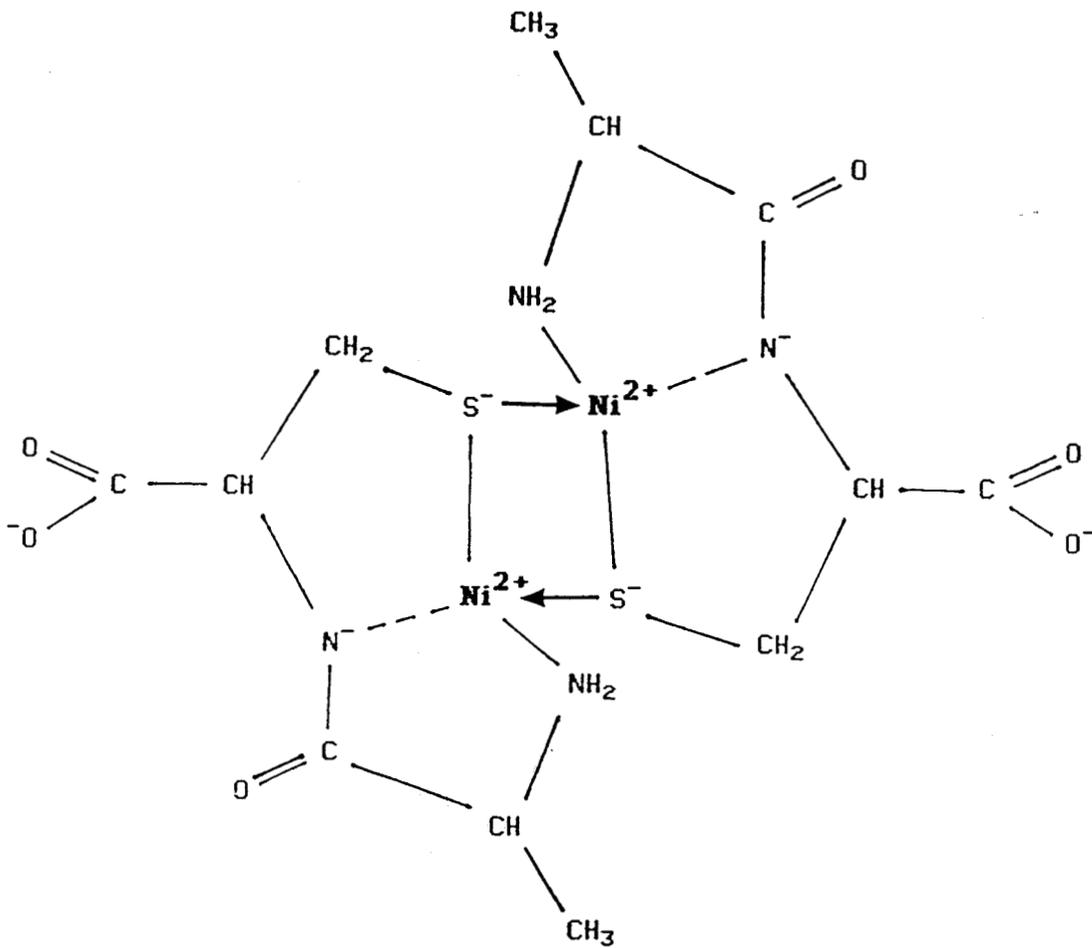
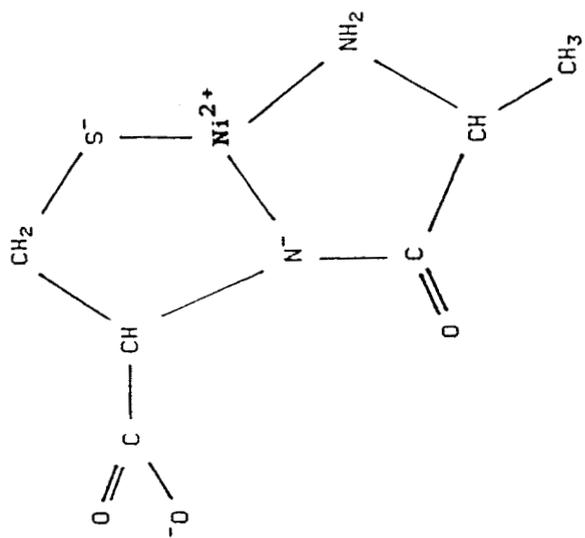
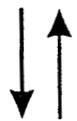
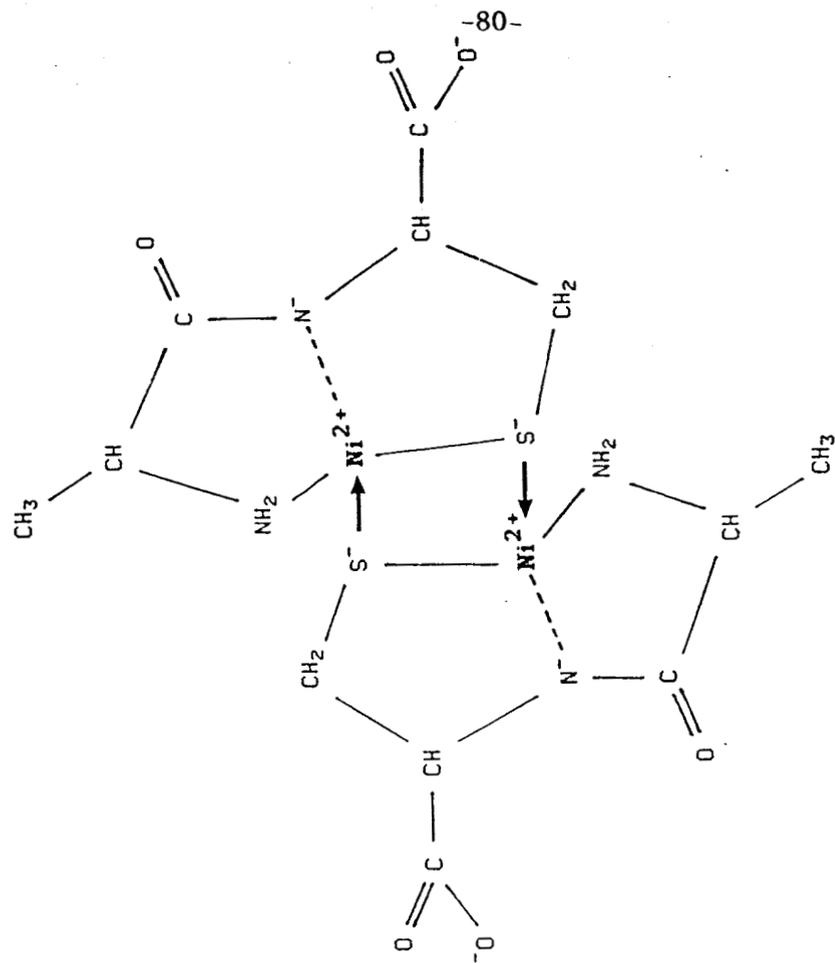


Figure 3
Structure du complexe $\text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_{-2}$
(Ala-Cys : Ni(II))



2

Figure 4
 $2 \text{ NiAH}_{-1} \rightleftharpoons \text{Ni}_2\text{A}_2\text{H}_{-2}$

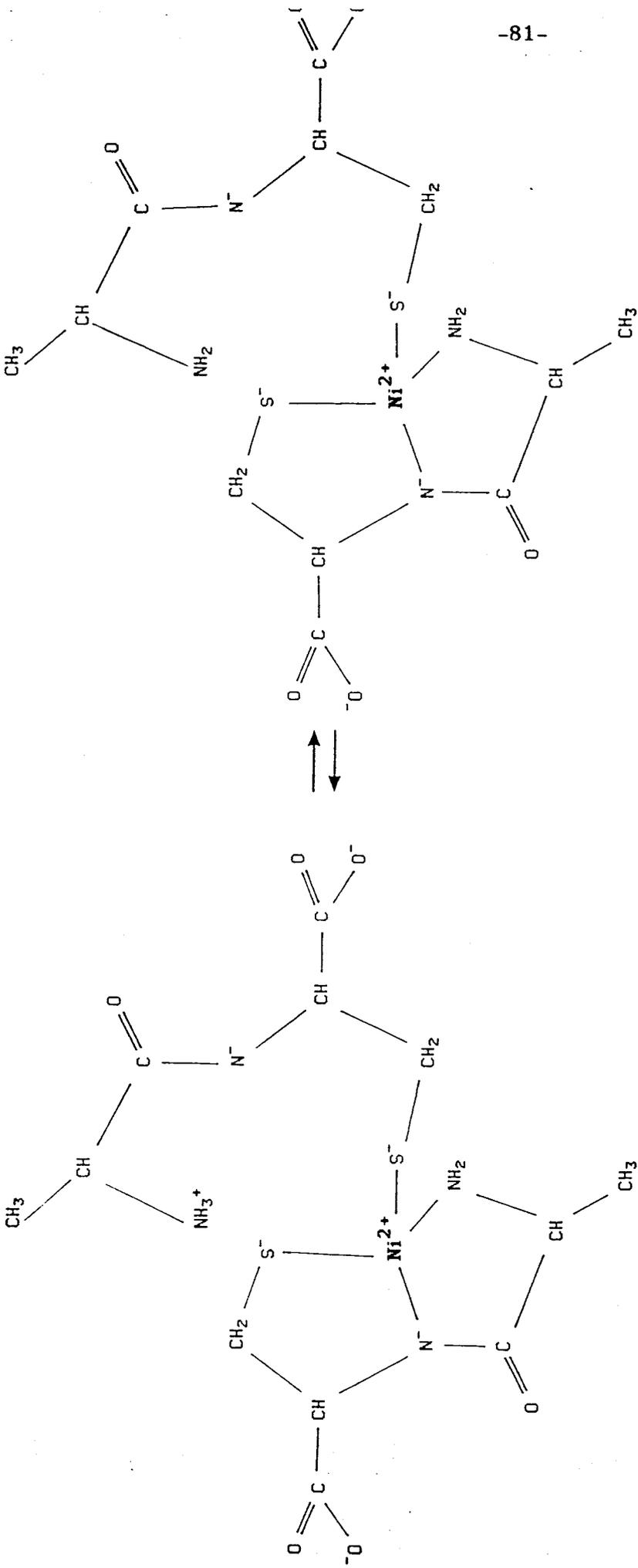


Figure 5

Structure du complexe NiA₂
(Ala-Cys : Ni(II))

NiA₂ ↔ NiA₂H₋₁

Structure du complexe NiA₂H₋₁
(Ala-Cys : Ni(II))

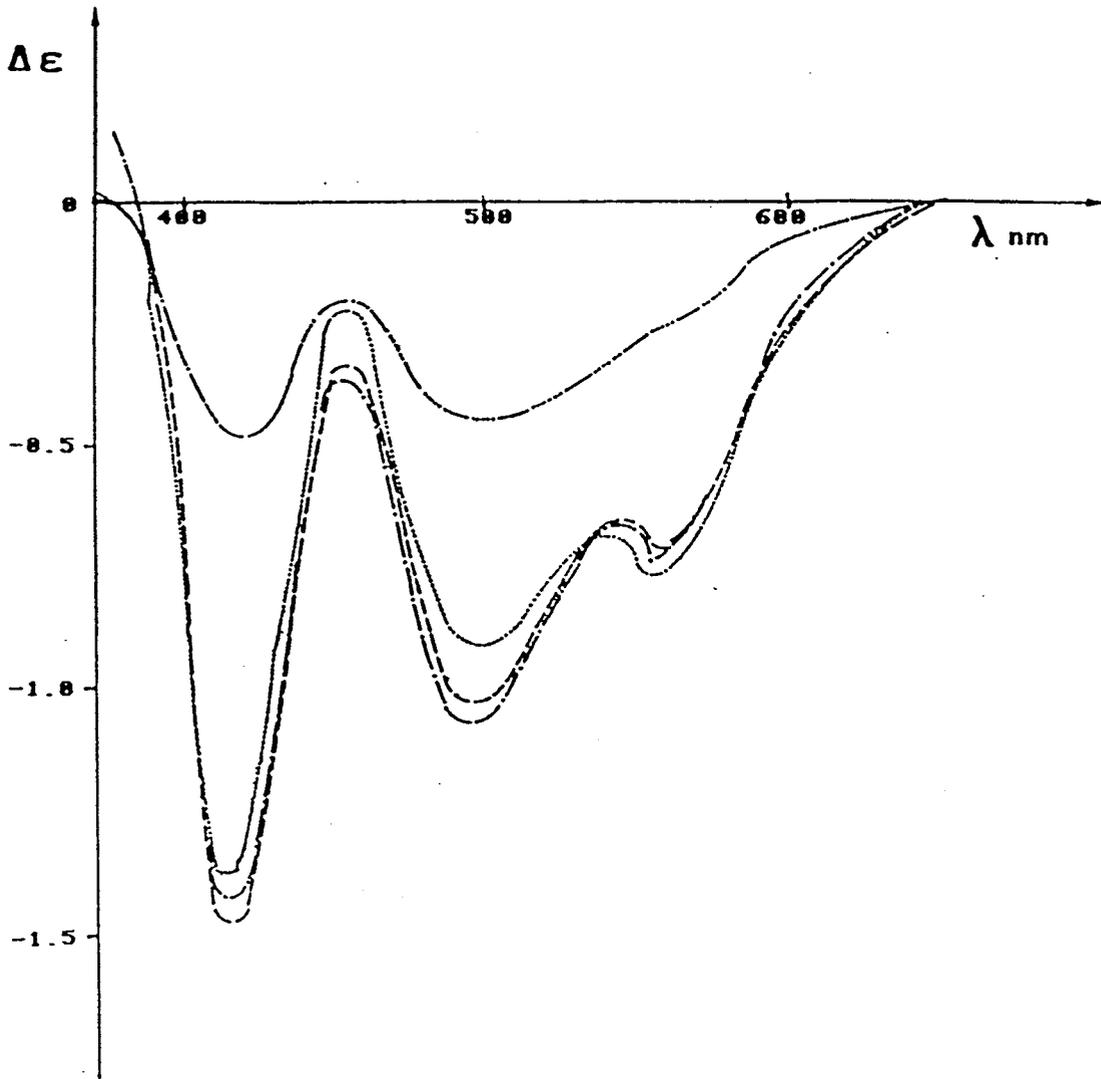


Figure 6

Spectre dichroïque visible de AlaCys avec Ni(II) rapport 1

pH	11.00
	7.56	-----
	6.24	-.-.-.-
	5.46	-----

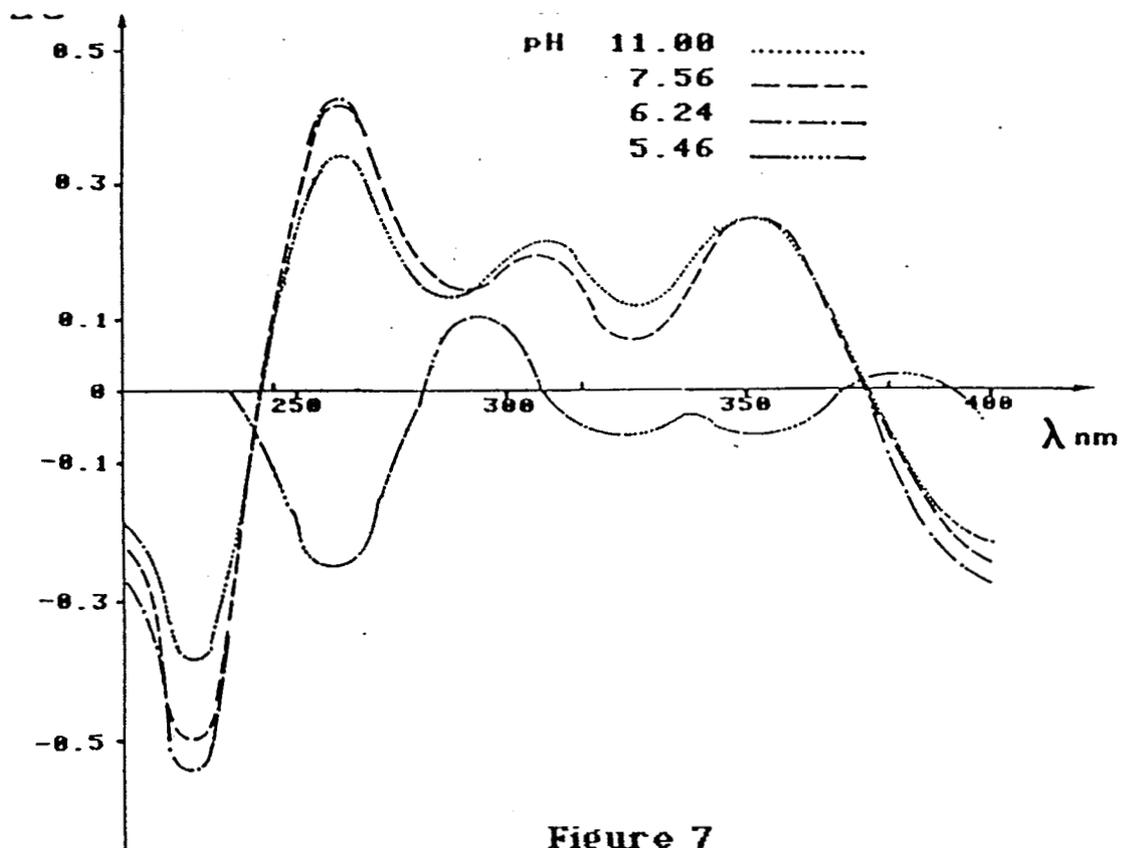


Figure 7
 Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Ni(II) rapport 1

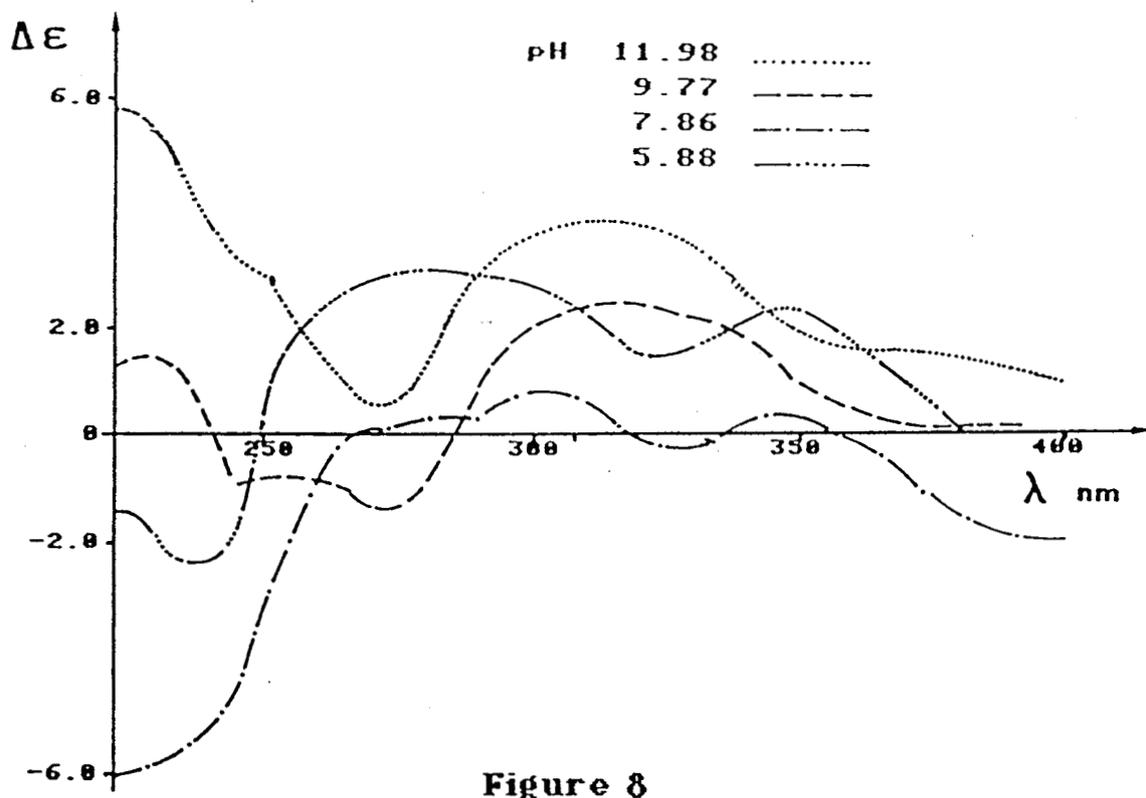


Figure 8
 Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Ni(II) rapport 2

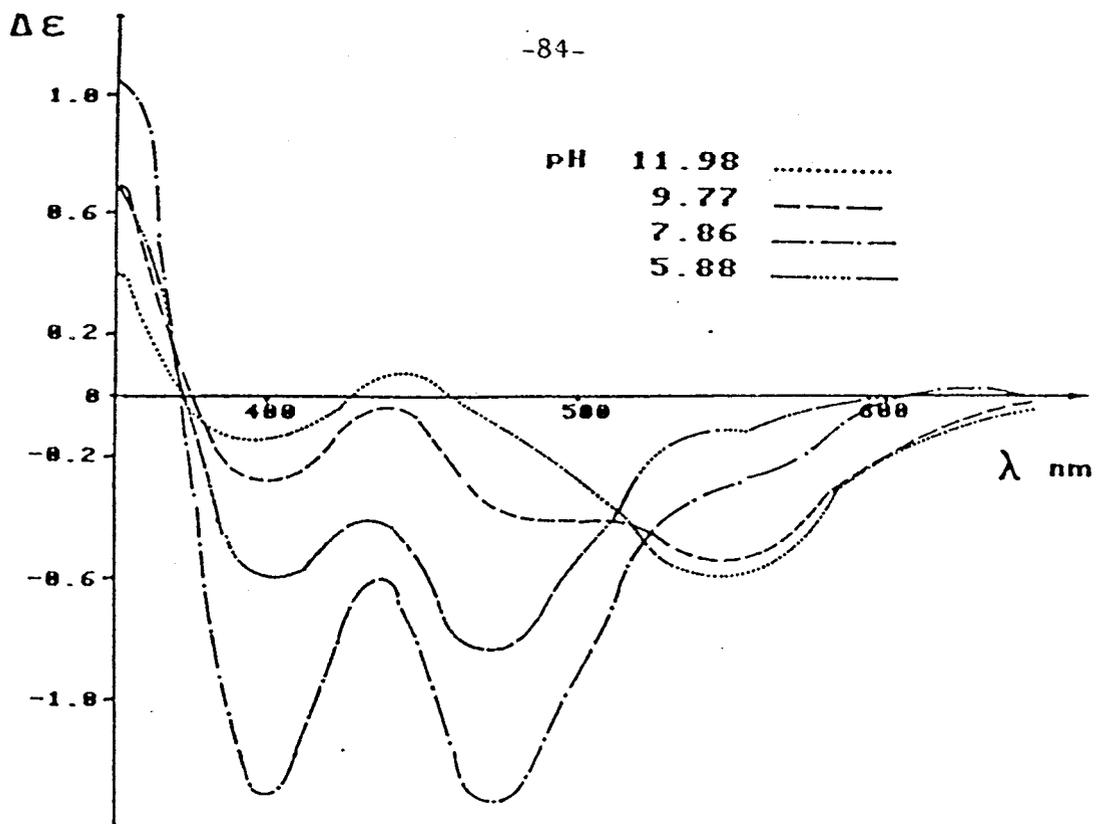


Figure 9

Spectre dichroïque visible de AlaCys avec Ni(II) rapport 2

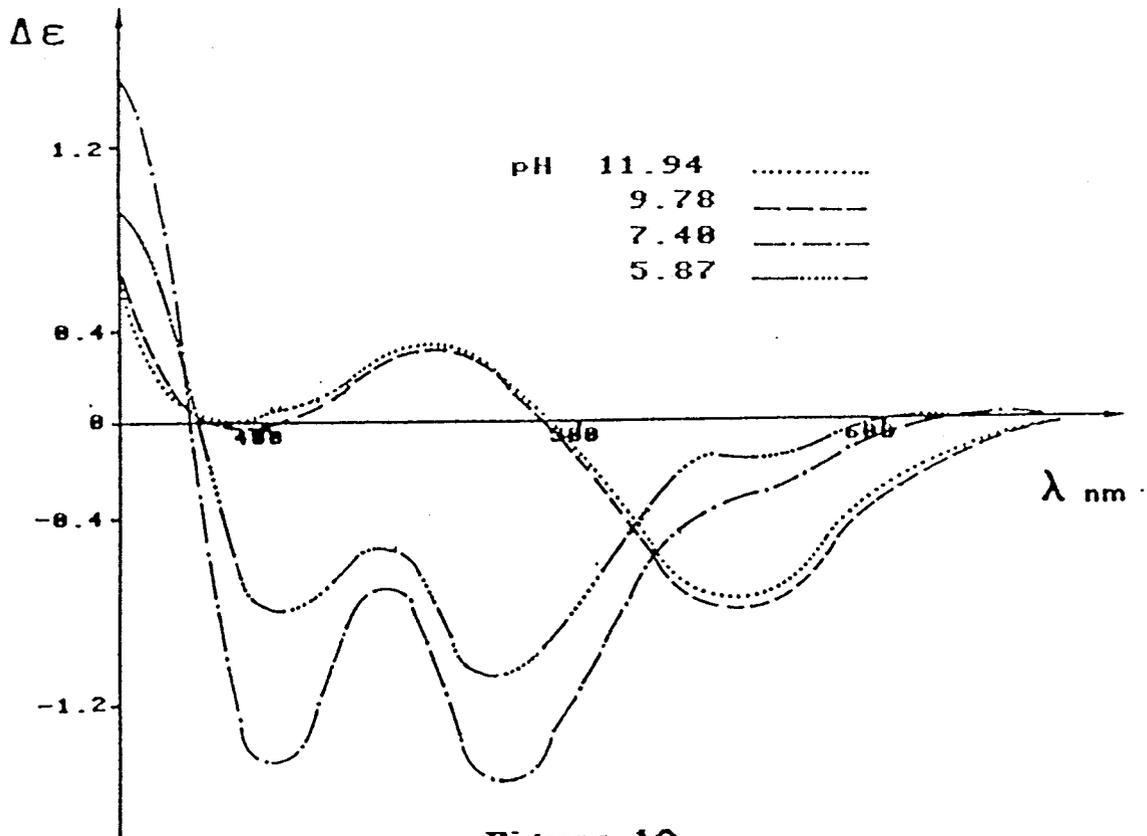


Figure 10

Spectre dichroïque visible de AlaCys avec Ni(II) rapport 4

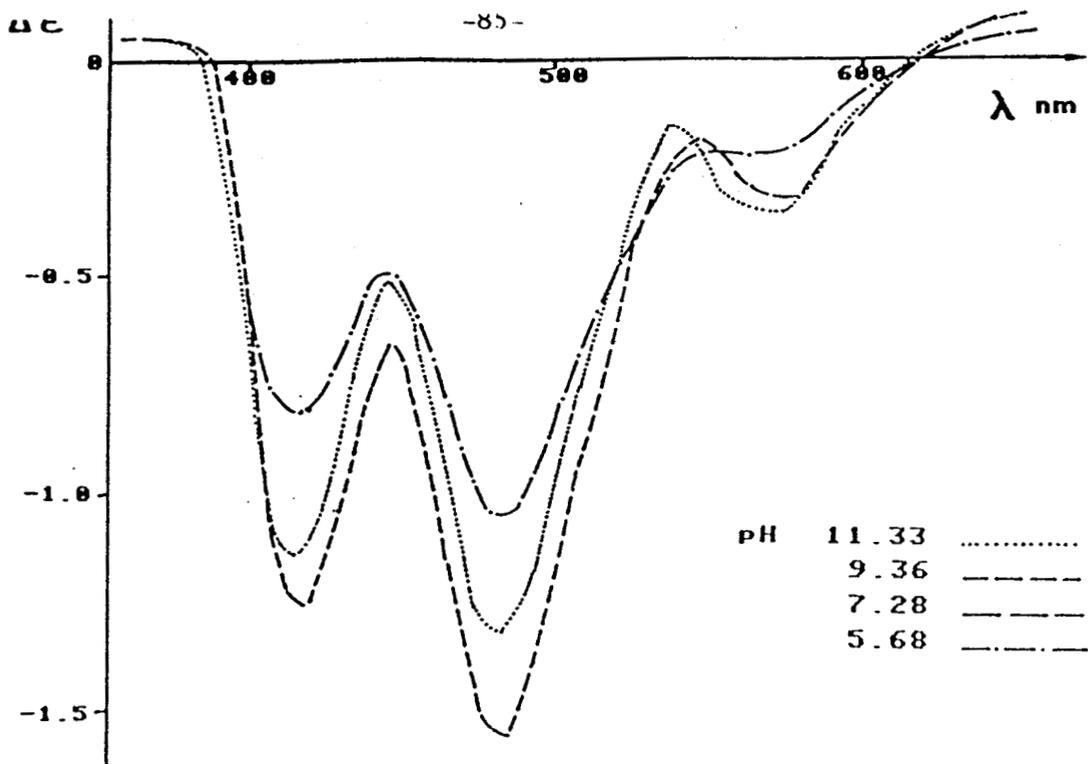


Figure 11

Spectre dichroïque visible de PheCys avec Ni(II) rapport 1

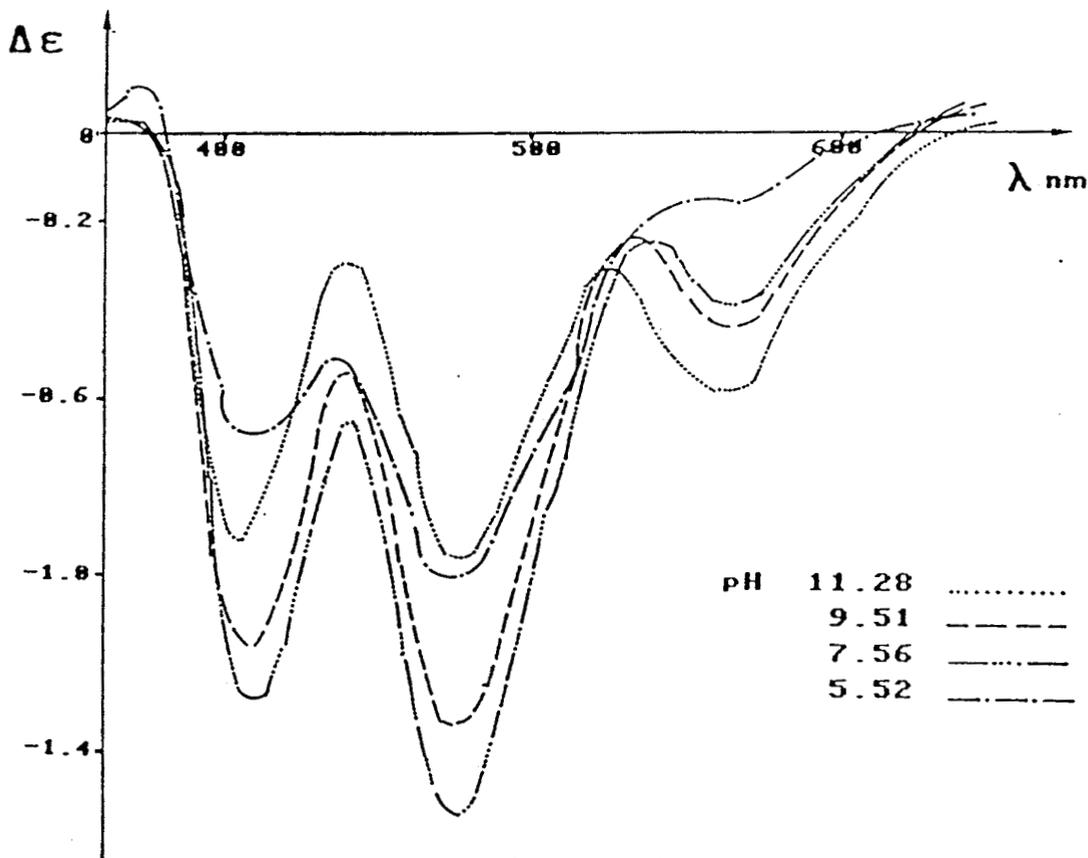


Figure 12

Spectre dichroïque visible de PheCys avec Ni(II) rapport 2

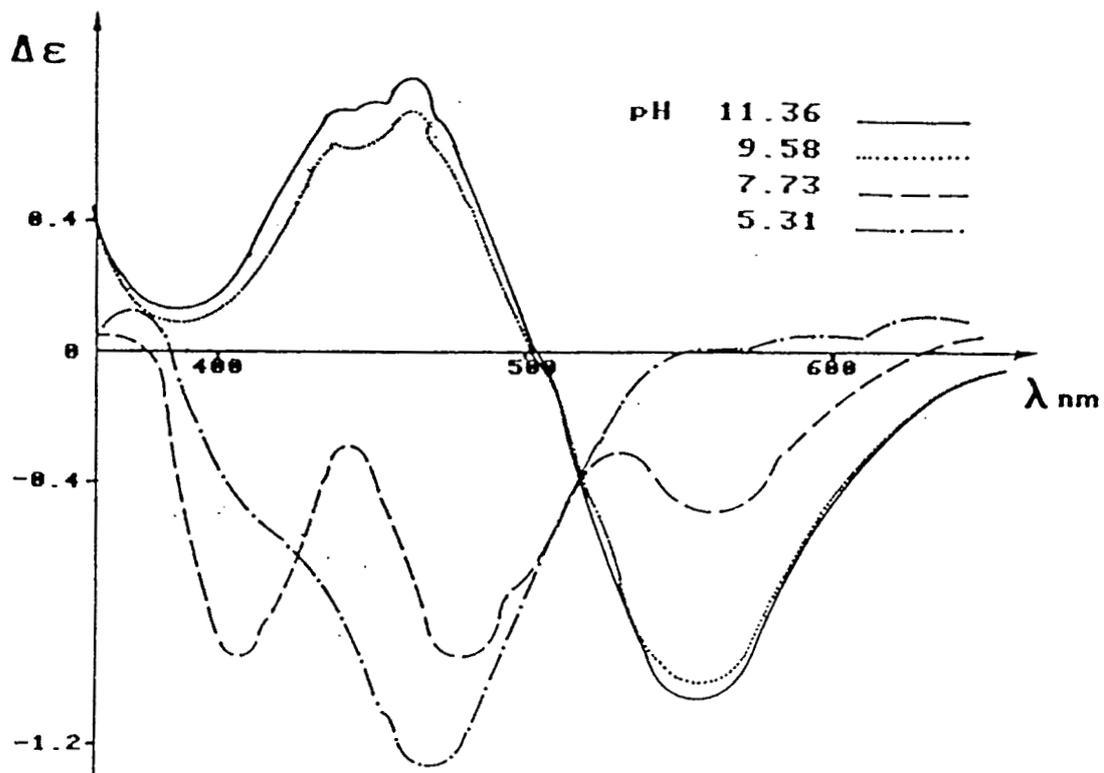
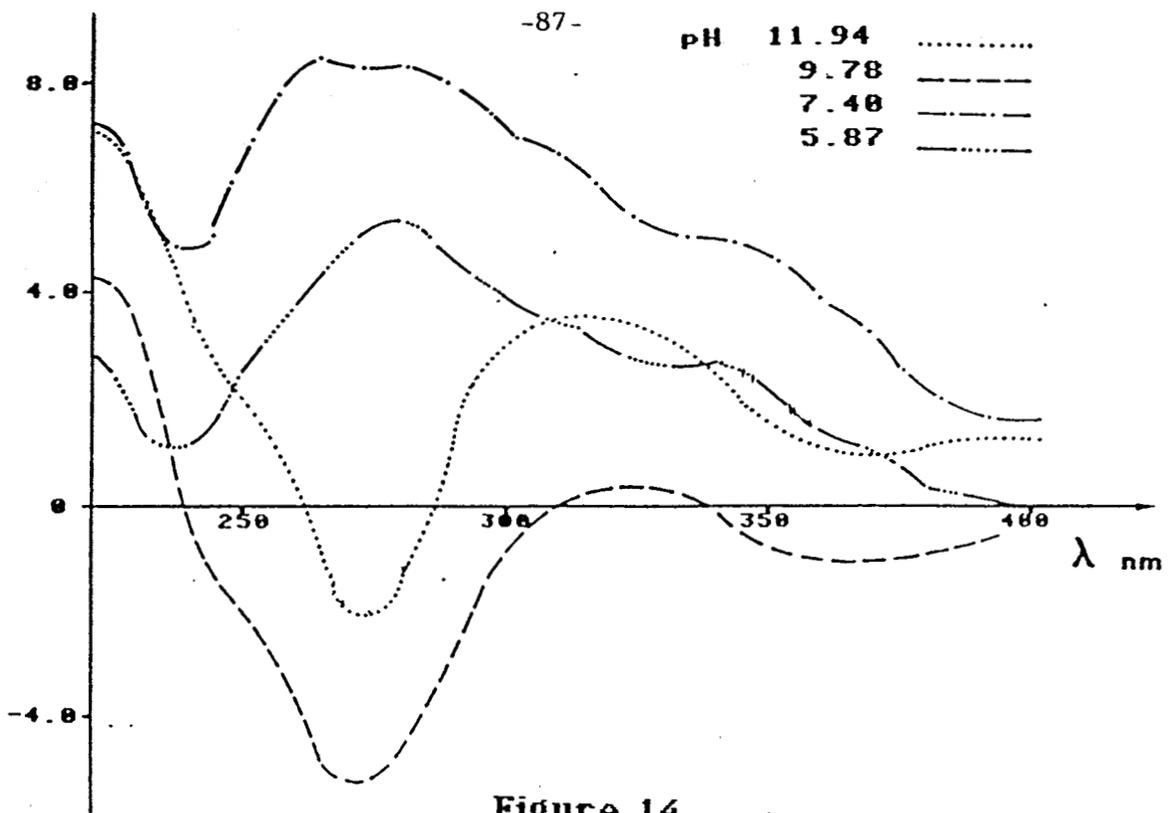
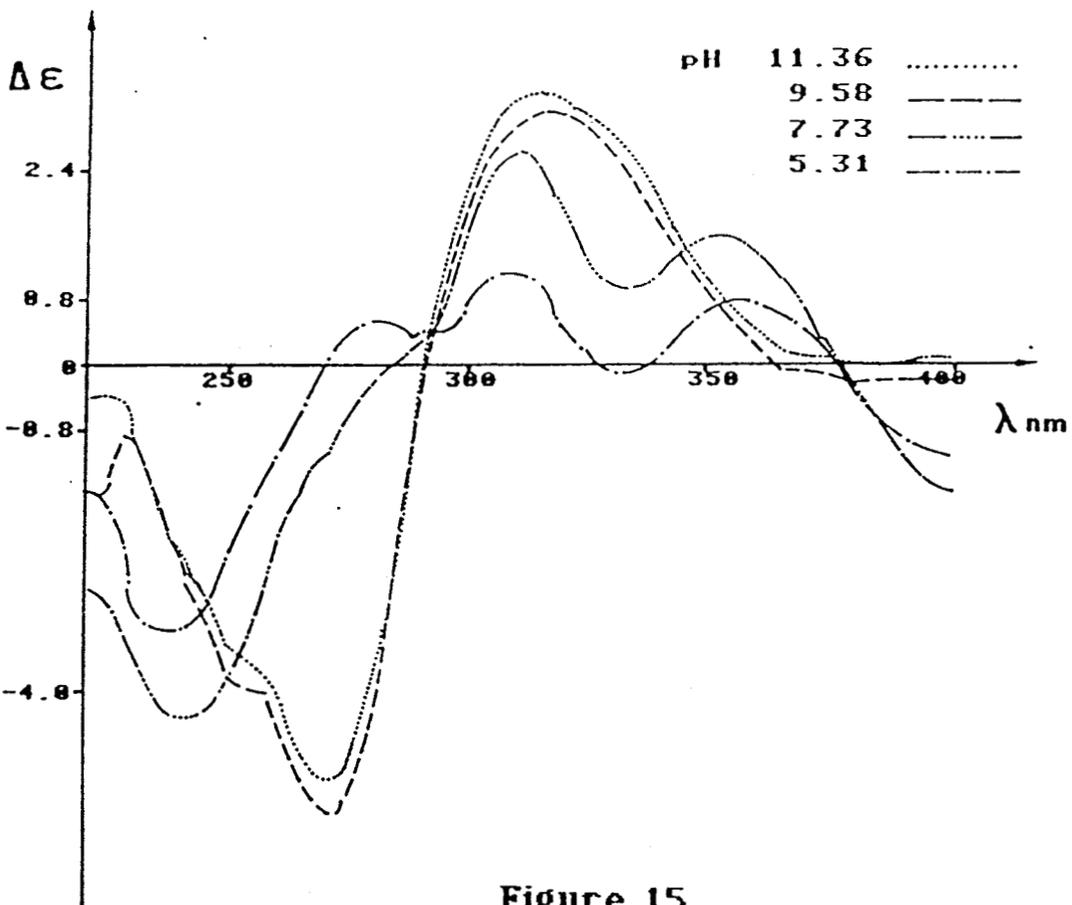


Figure 13

Spectre dichroïque visible de PheCys avec Ni(II) rapport 4



Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Ni(II) rapport 4



Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Ni(II) rapport 4

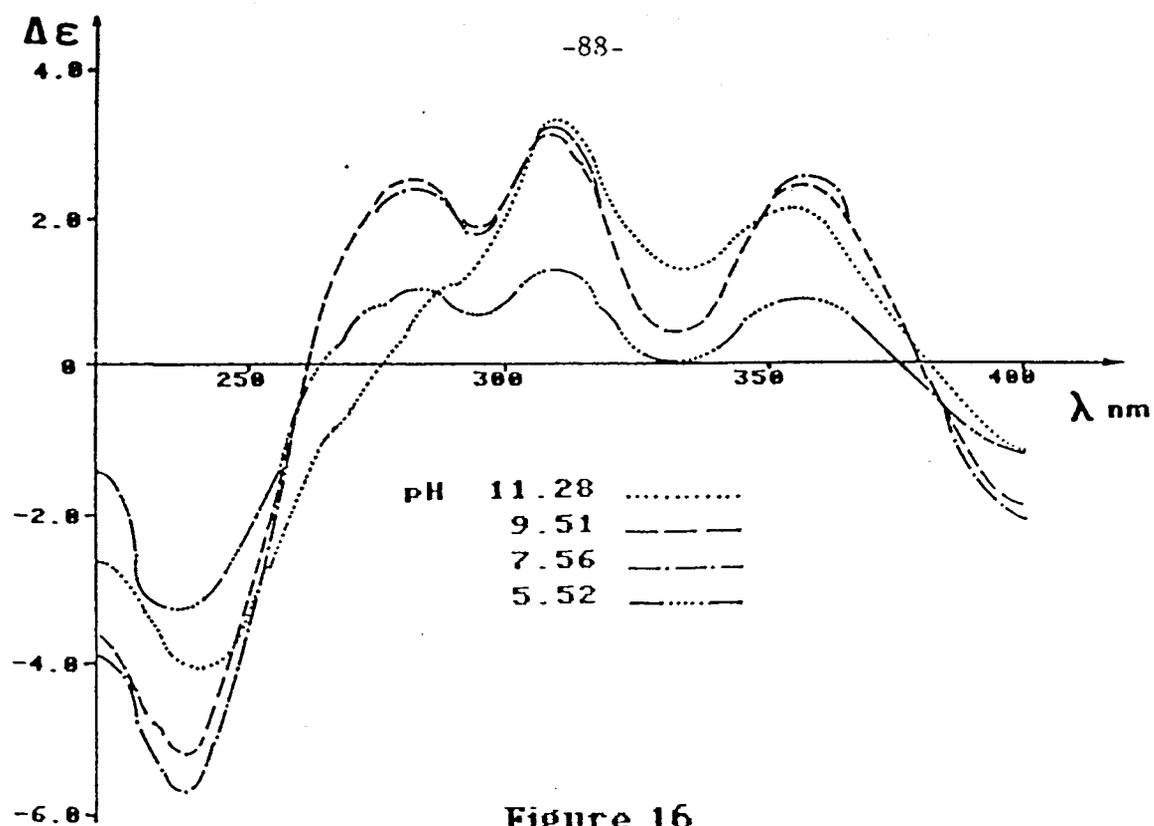


Figure 16
Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Ni(II) rapport 2

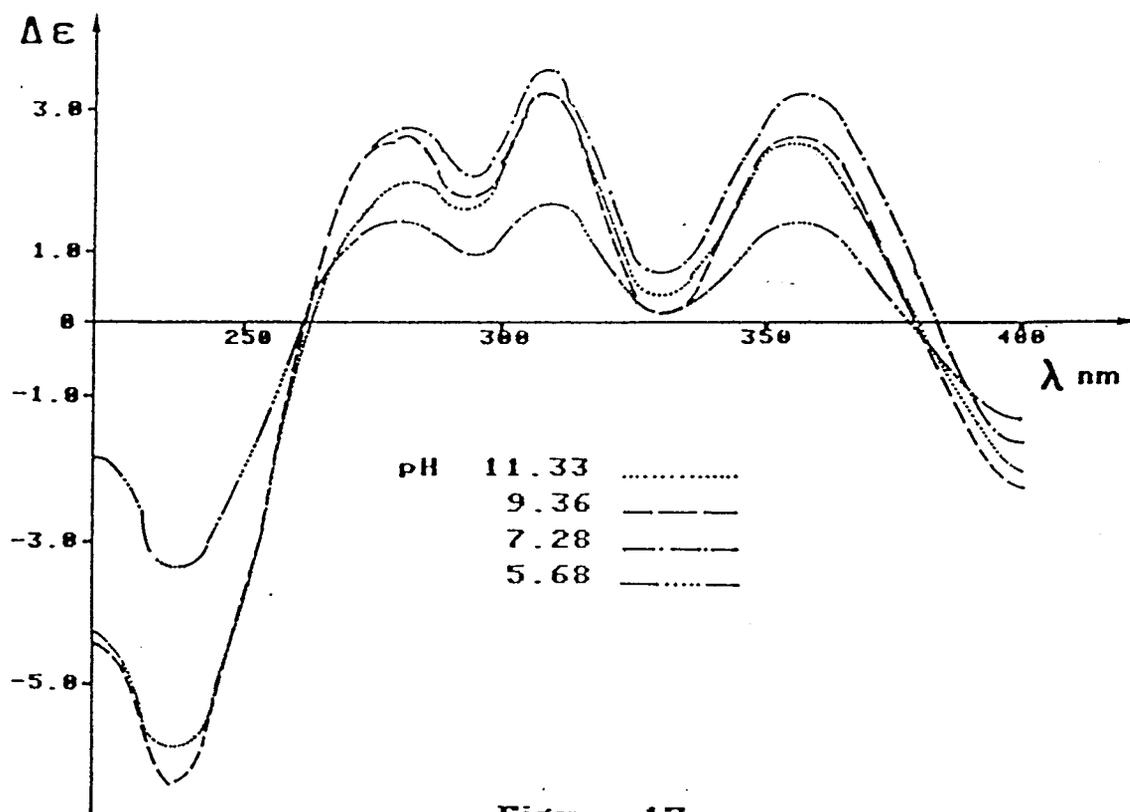
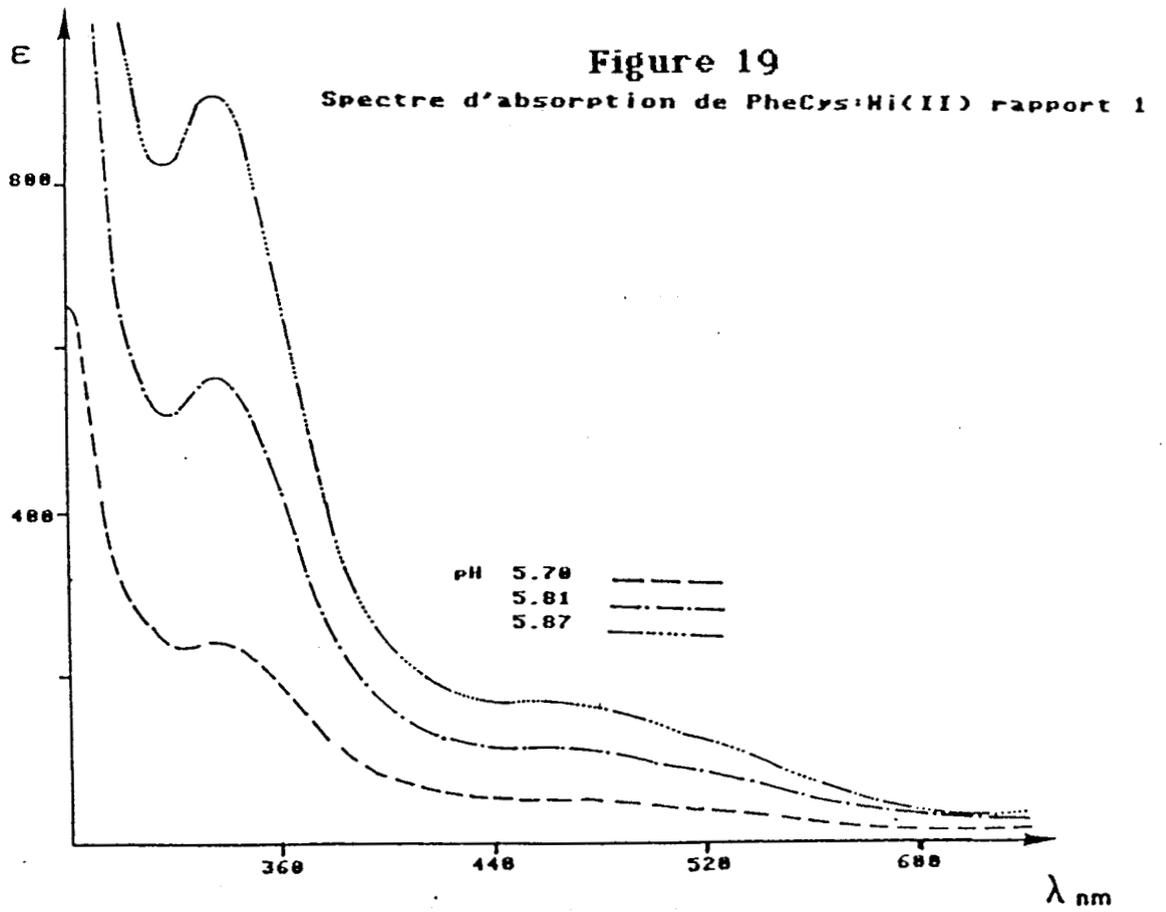
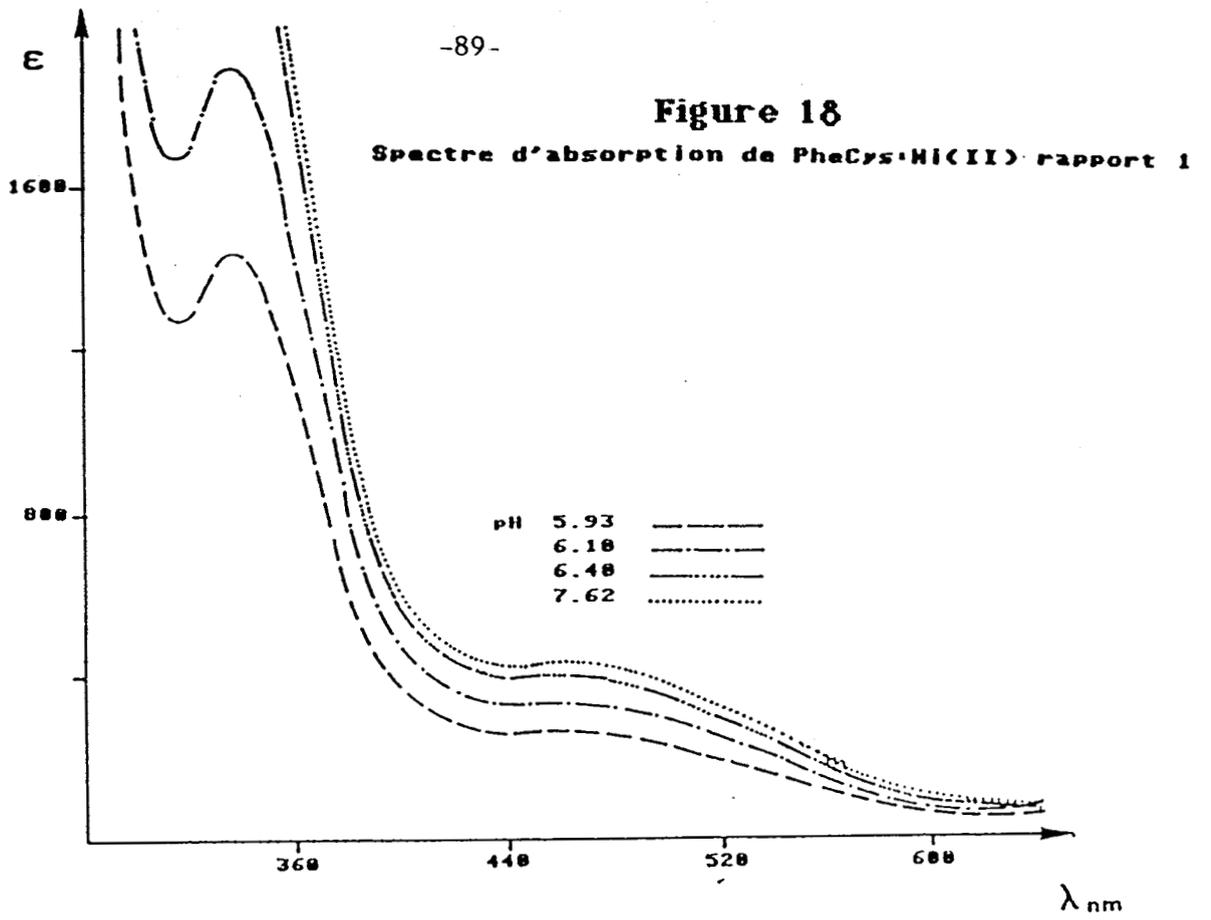


Figure 17
Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Ni(II) rapport 1



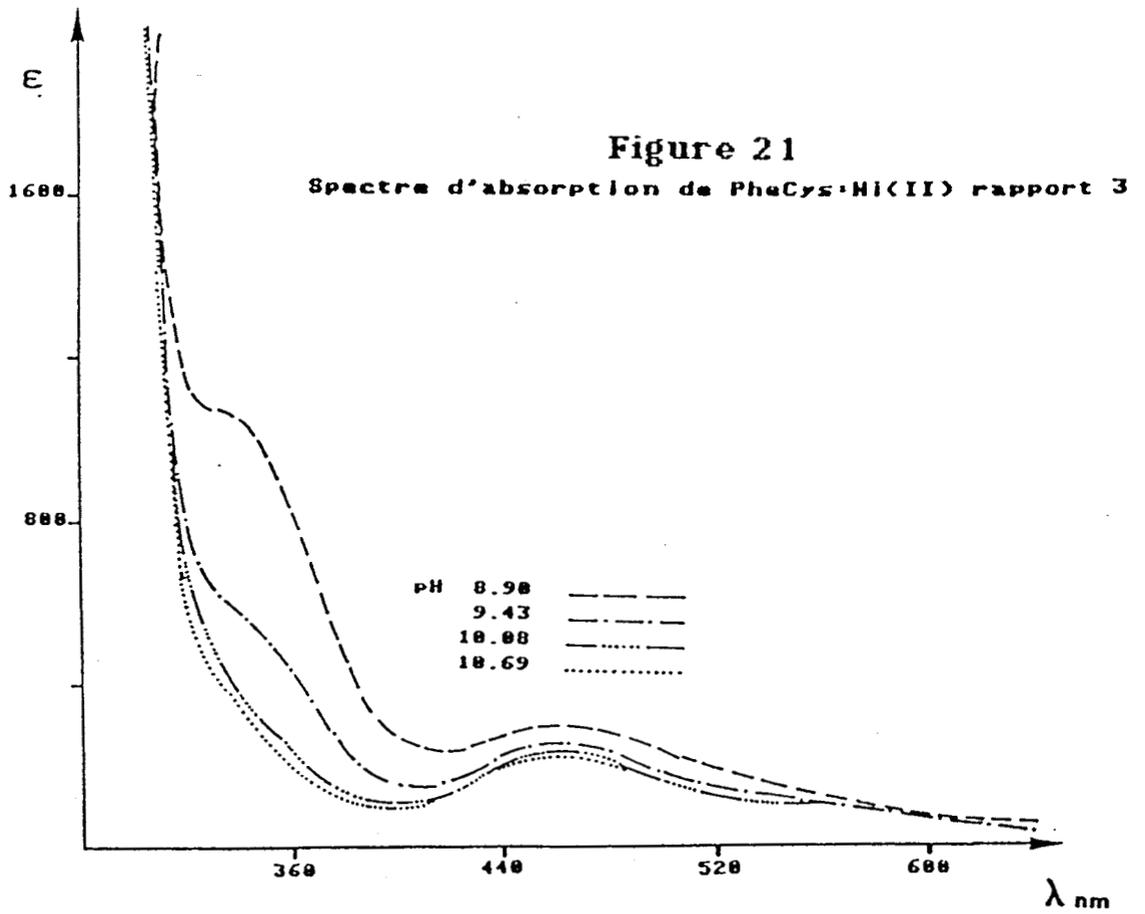
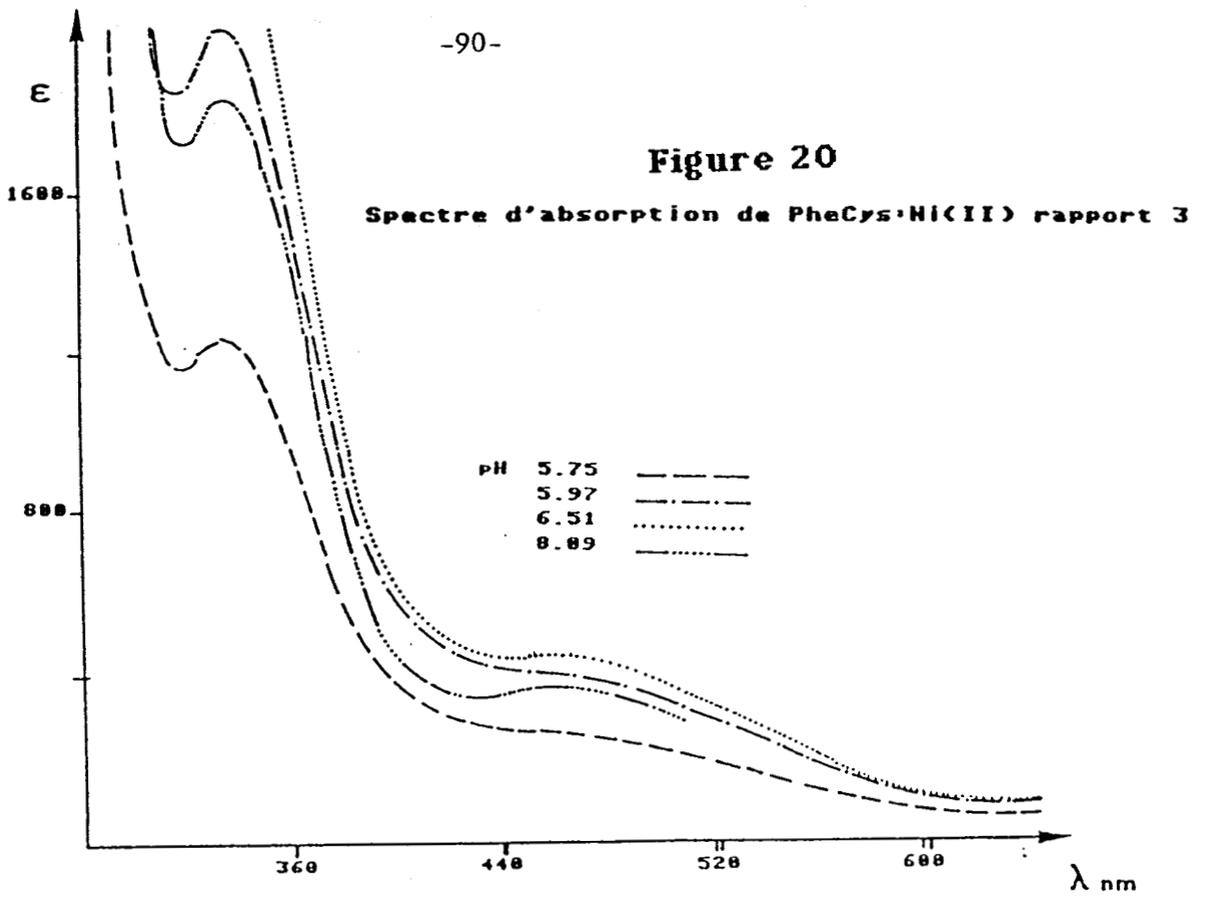


Figure 22

Spectre d'absorption de PhcCys·Ni(II) à pH 7

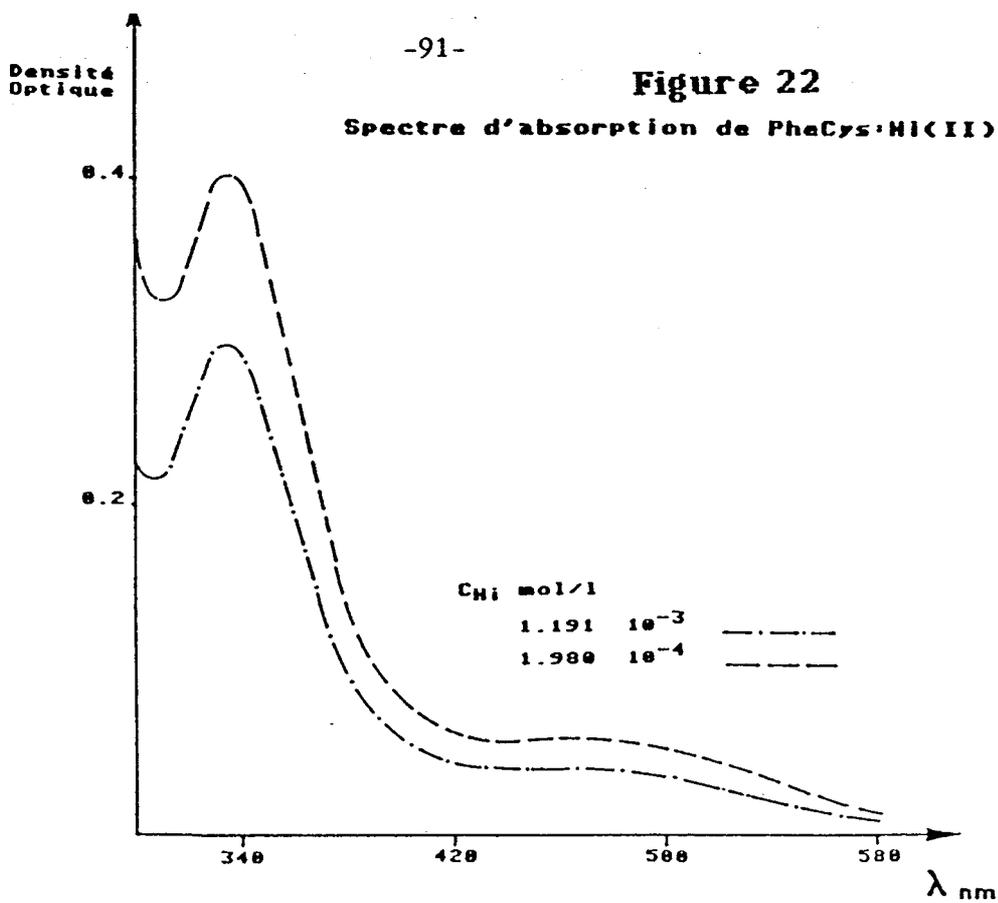
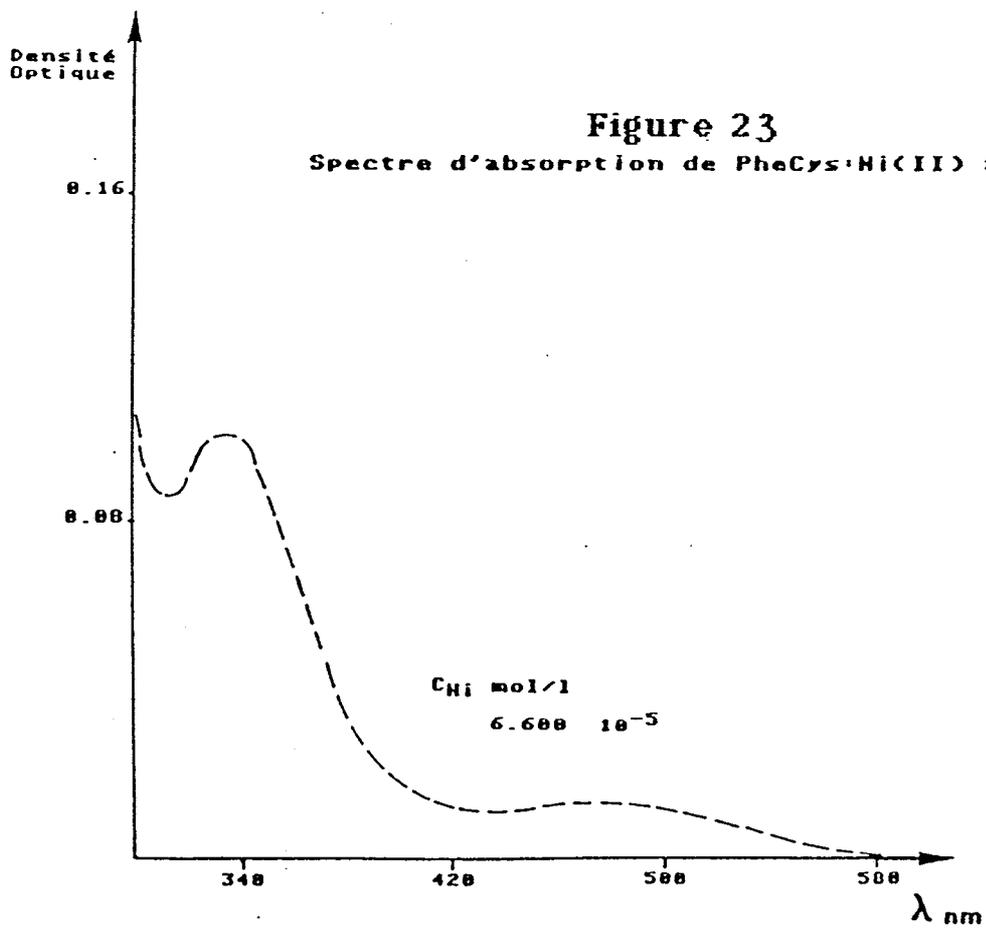


Figure 23

Spectre d'absorption de PhcCys·Ni(II) à pH 7



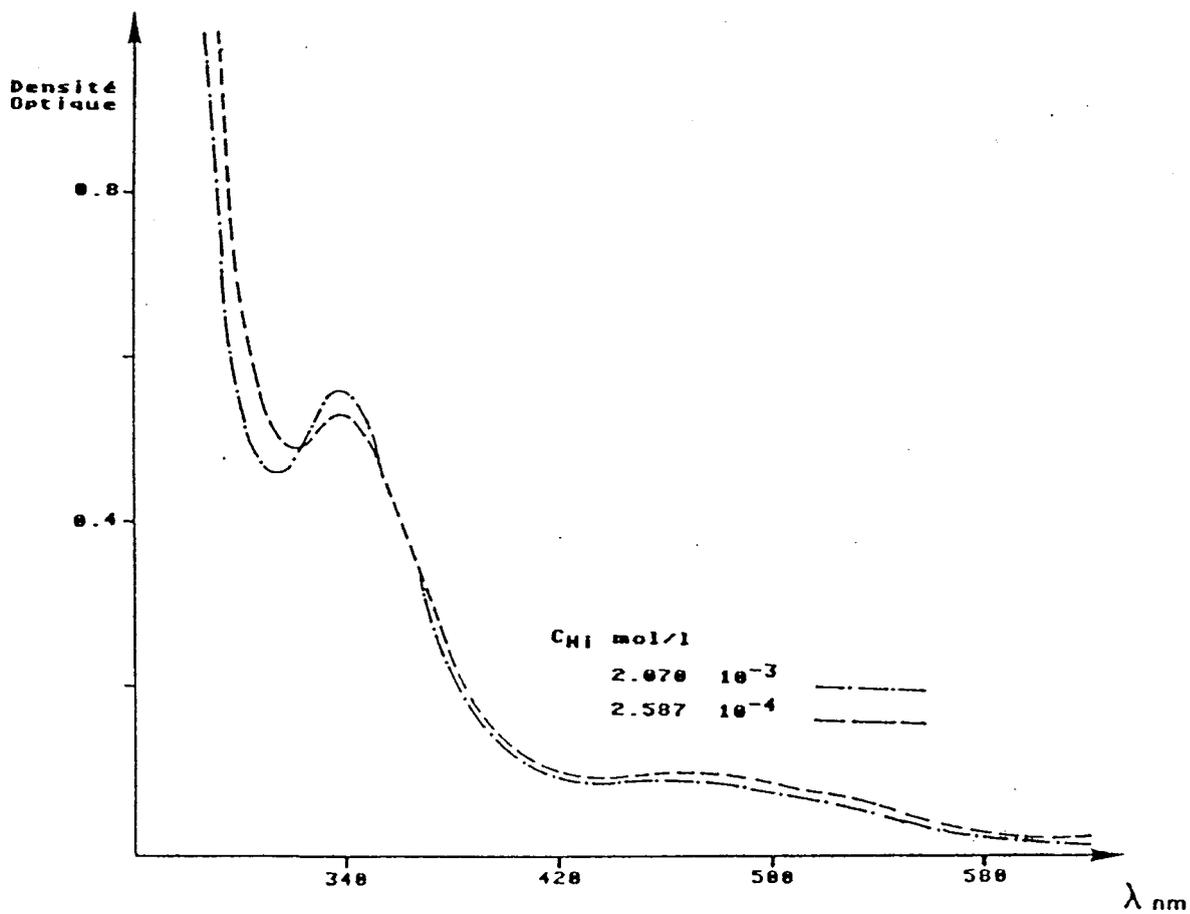
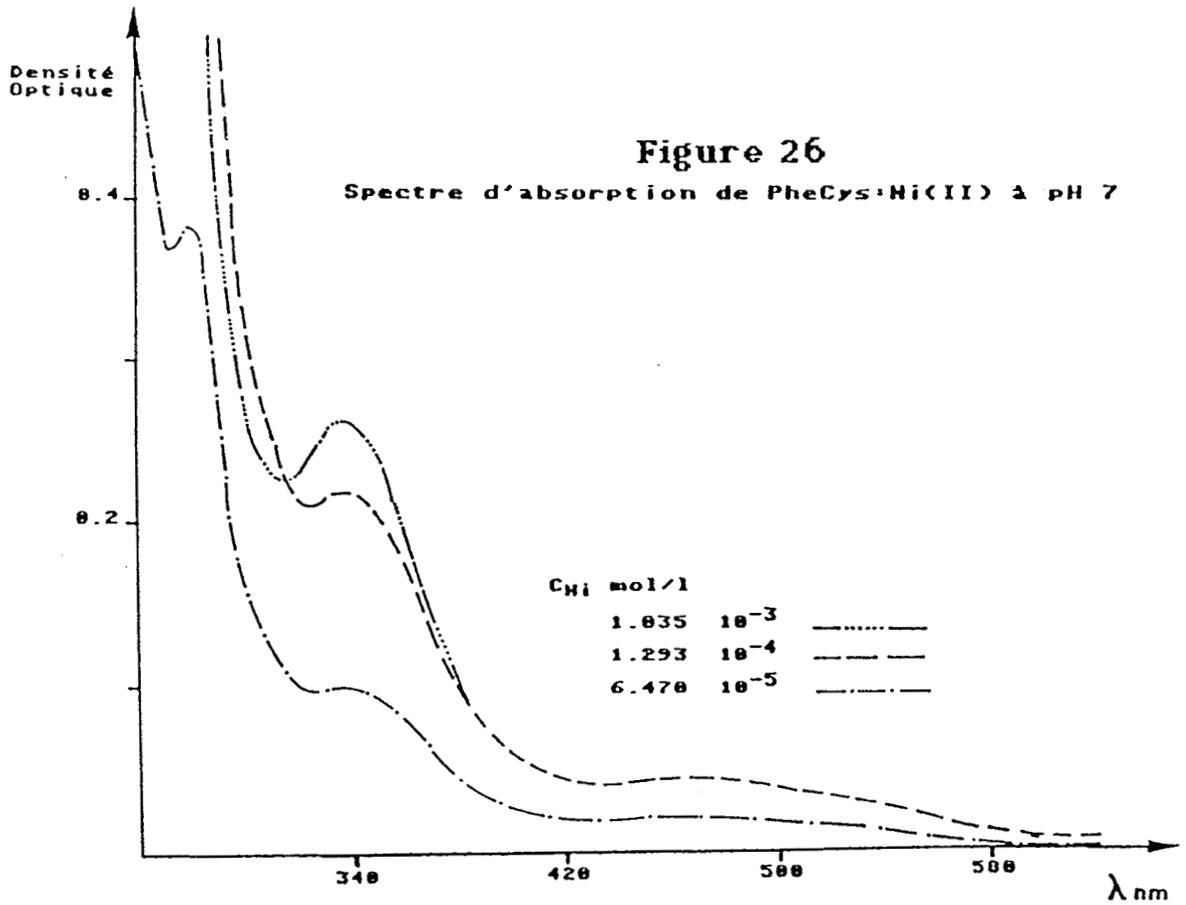
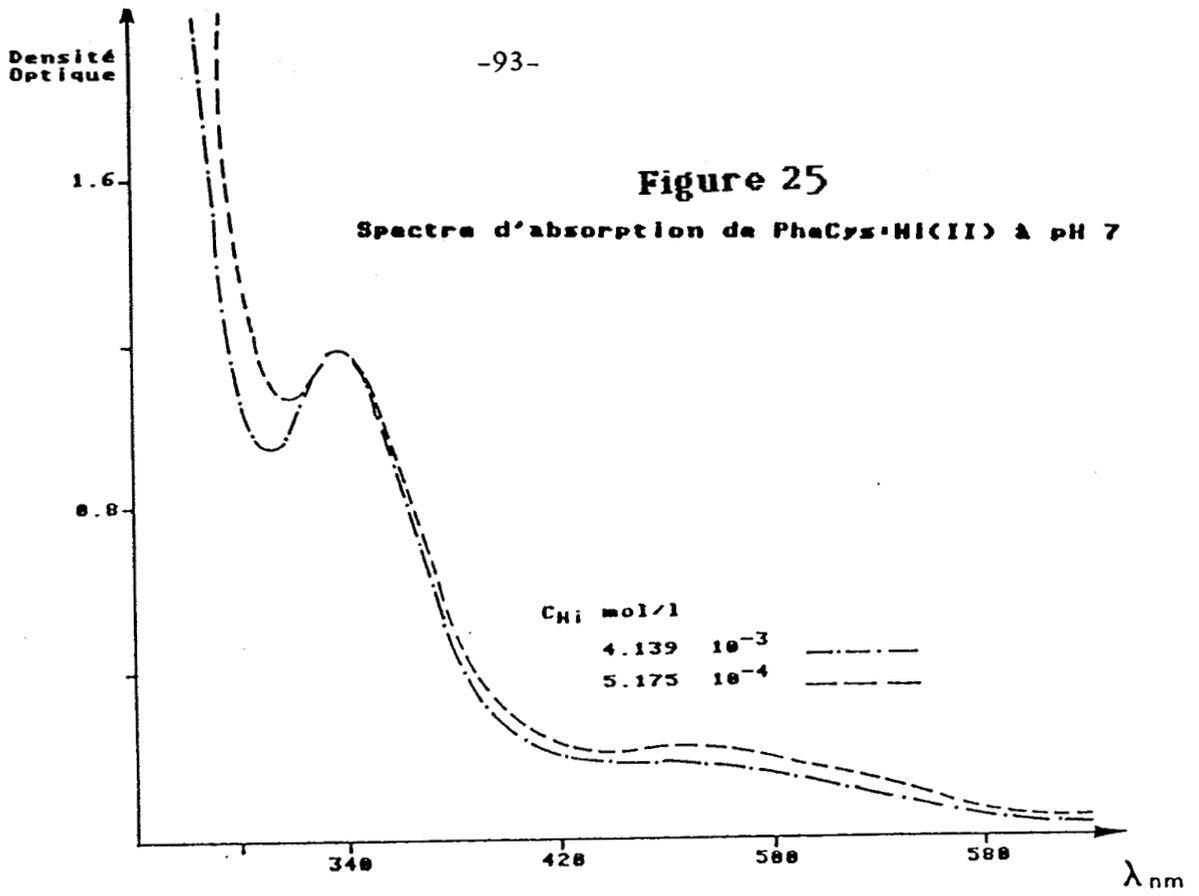
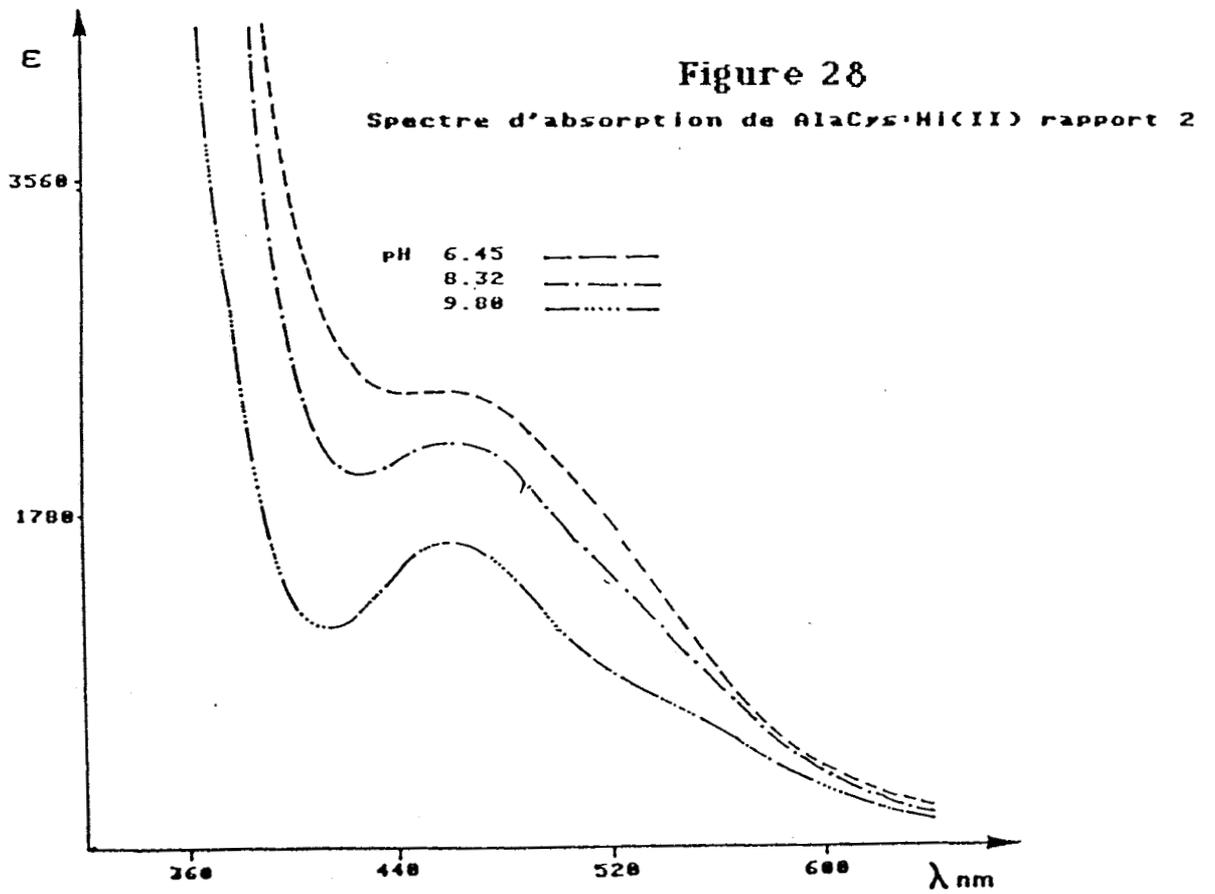
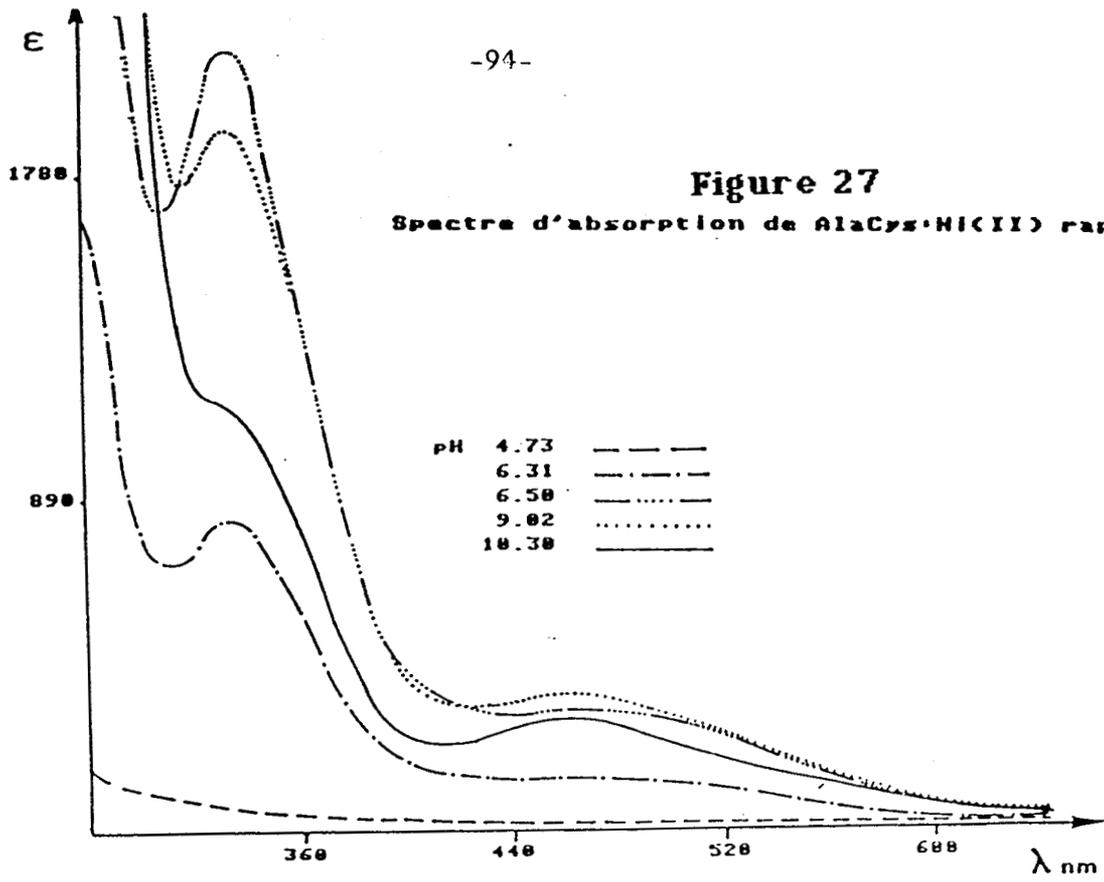


Figure 24

Spectre d'absorption de PhCys·Ni(II) à pH 7





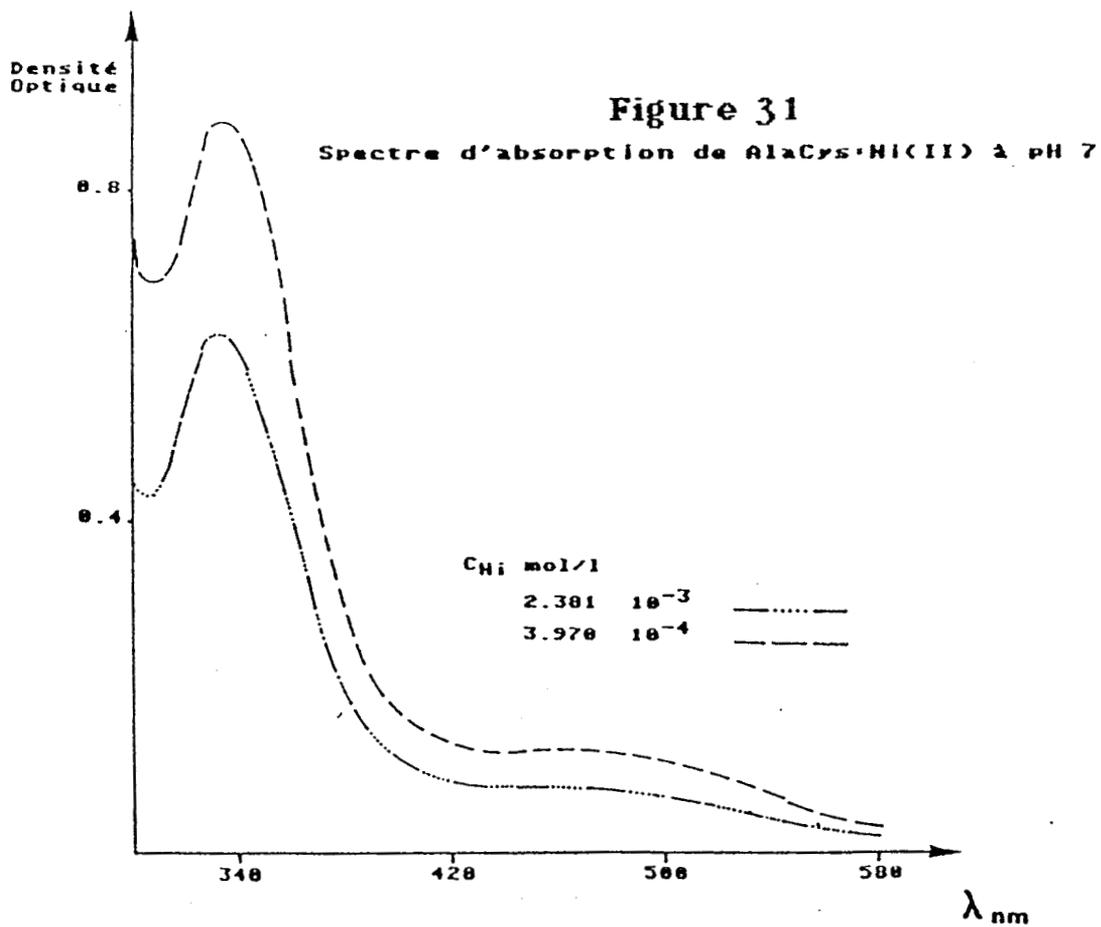
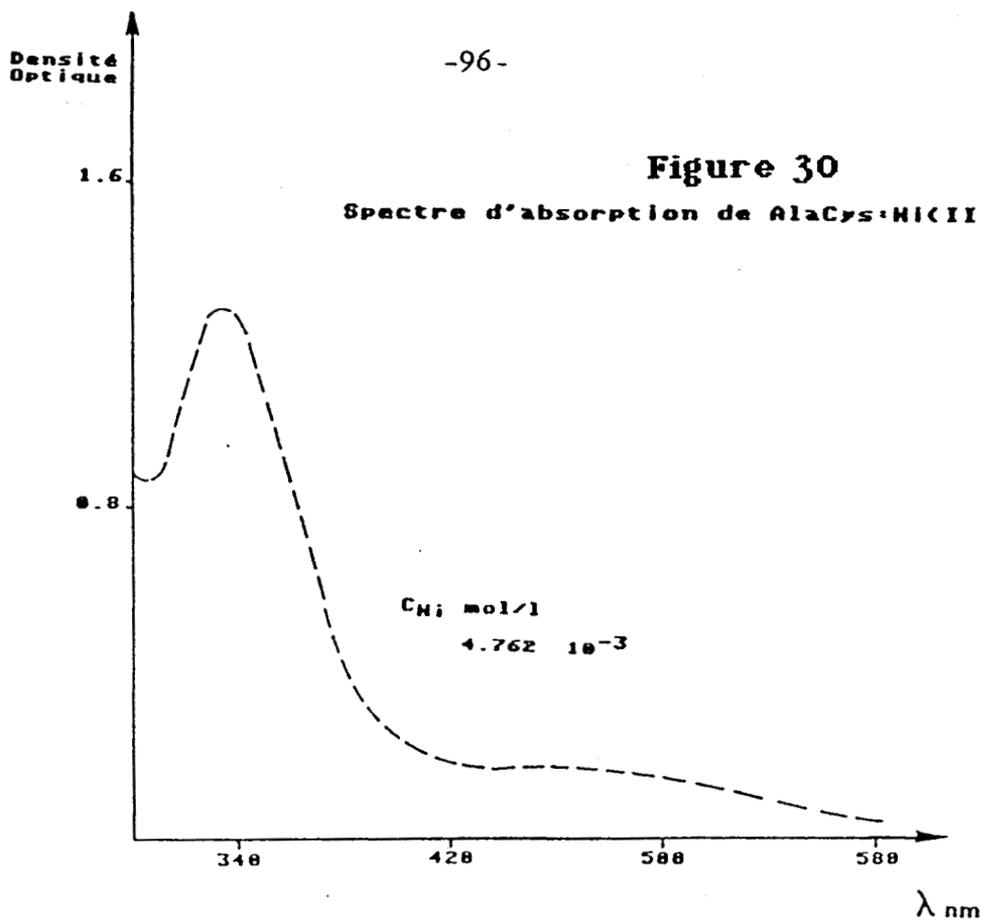


Table 1 : Coefficients d'absorption molaire du complexe Phe Cys Ni(II) en fonction du pH.

$C_{Ni} = 10^{-3}$ mol/l $C_{PheCys} = 3 \cdot 10^{-3}$ mol/l

pH	ϵ_{460}	ϵ_{333}
	dm ³ .mol ⁻¹ .cm ⁻¹	
5.50	142	610
5.75	277	1300
5.97	424	2111
6.51	478	2489
7.13	454	2409
7.61	427	2242
8.09	400	1985
8.90	326	1178
9.43	277	623
10.08	258	414

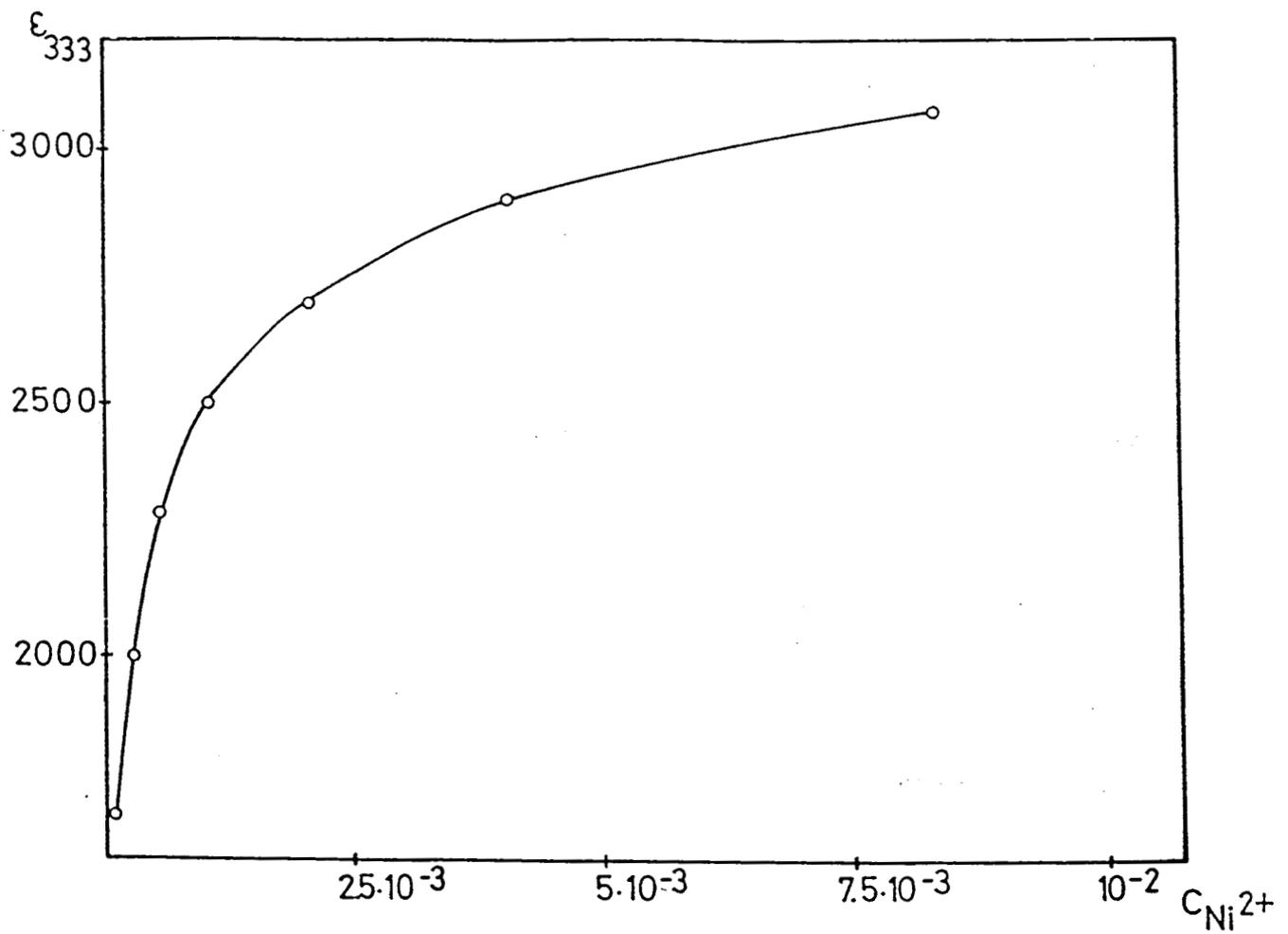


Figure 32
Variation du coefficient d'extinction molaire
en fonction de la concentration de Nickel
Phe-Cys : Ni(II)
pH 7 - Rapport 1

Tableau III : Paramètres des spectres de proton pour différents peptides thiolés et leurs complexes avec le Ni(II) (δ en ppm, J en Hz, P en %).

	pH	δ_A	δ_B	δ_C	J _{AB}	J _{AC}	J _{BC}	P _I	P _{II}	P _{III}
Ala Cys										
3.44		2.96	2.99	4.64	14.09	4.87	6.30	0.34	0.21	0.45
10.46		2.75	2.94	4.02	13.15	9.17	3.88	0.12	0.60	0.28
Ala Cys:Ni										
10.58		2.08	2.23	3.93	13.05	8.86	3.99	0.13	0.57	0.30
Phe Cys										
2.81		2.98	3.04	4.58	14.05	6.34	4.90	0.21	0.34	0.45
11.56		2.83	2.97	4.12	13.08	8.68	3.91	0.12	0.55	0.33
Phe Cys										
2.81		2.81	3.28	3.35	14.03	7.22	6.90	0.39	0.42	0.19
11.56		2.91	3.18	3.78	13.68	8.27	5.12	0.23	0.52	0.25
Phe Cys:NI										
11.20		2.06	2.58	3.89	13.18	9.24	3.70	0.10	0.61	0.29
Ala Ala Cys										
3.38		2.95	2.99	4.45	16.92	5.23	10.01	0.68	0.24	0.08
12.83		2.77	2.97	4.03	13.11	9.08	3.99	0.13	0.60	0.27
Cys Ala Cys										
5.53		3.11	3.17	4.29	14.93	5.47	5.59	0.27	0.26	0.46
Cys Ala Ala Cys										
5.77		3.14	3.21	4.66	14.36	5.94	5.34	0.25	0.22	0.53



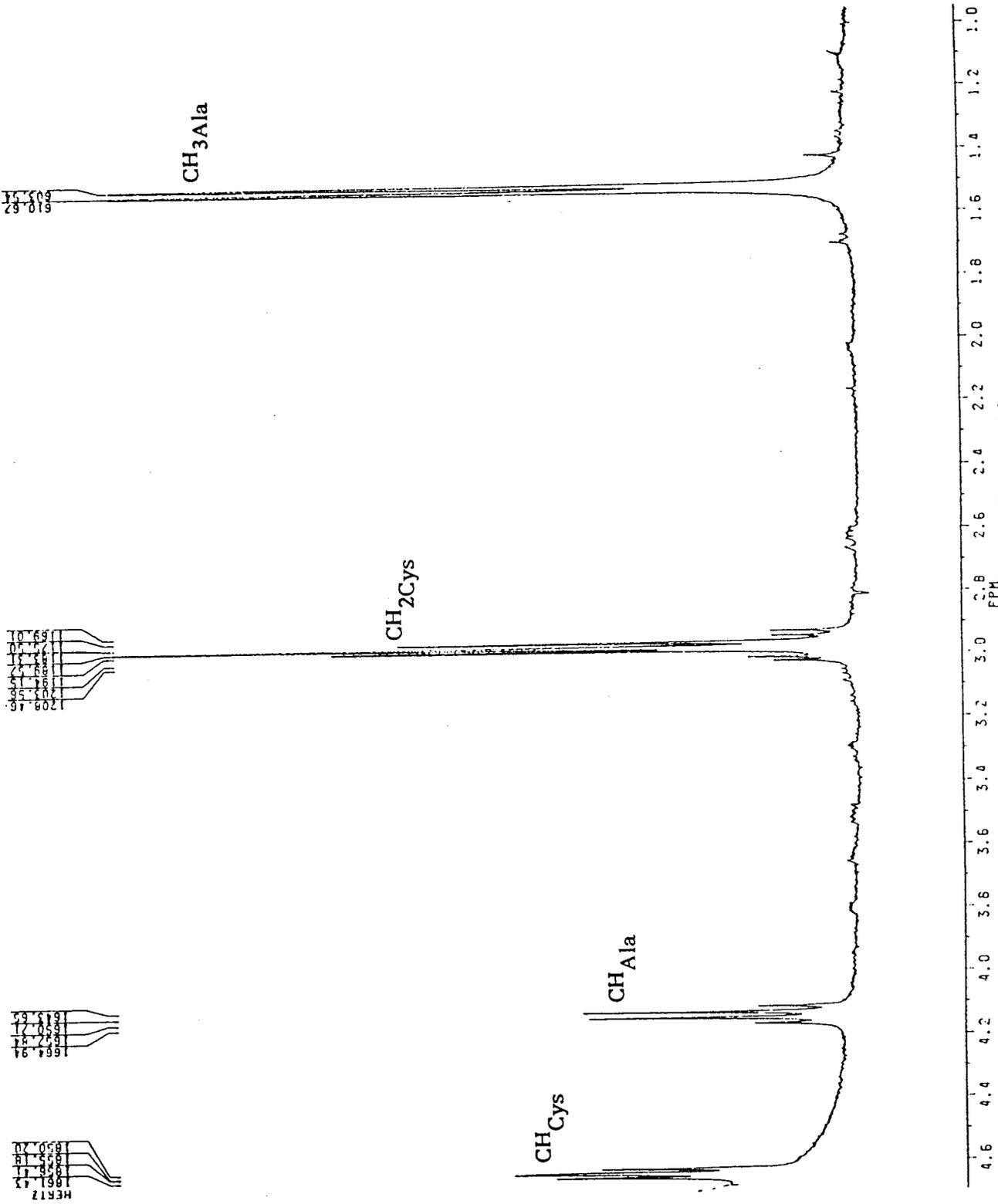


Figure 33 : Spectre R.M.N. de Ala-Cys en milieu acide

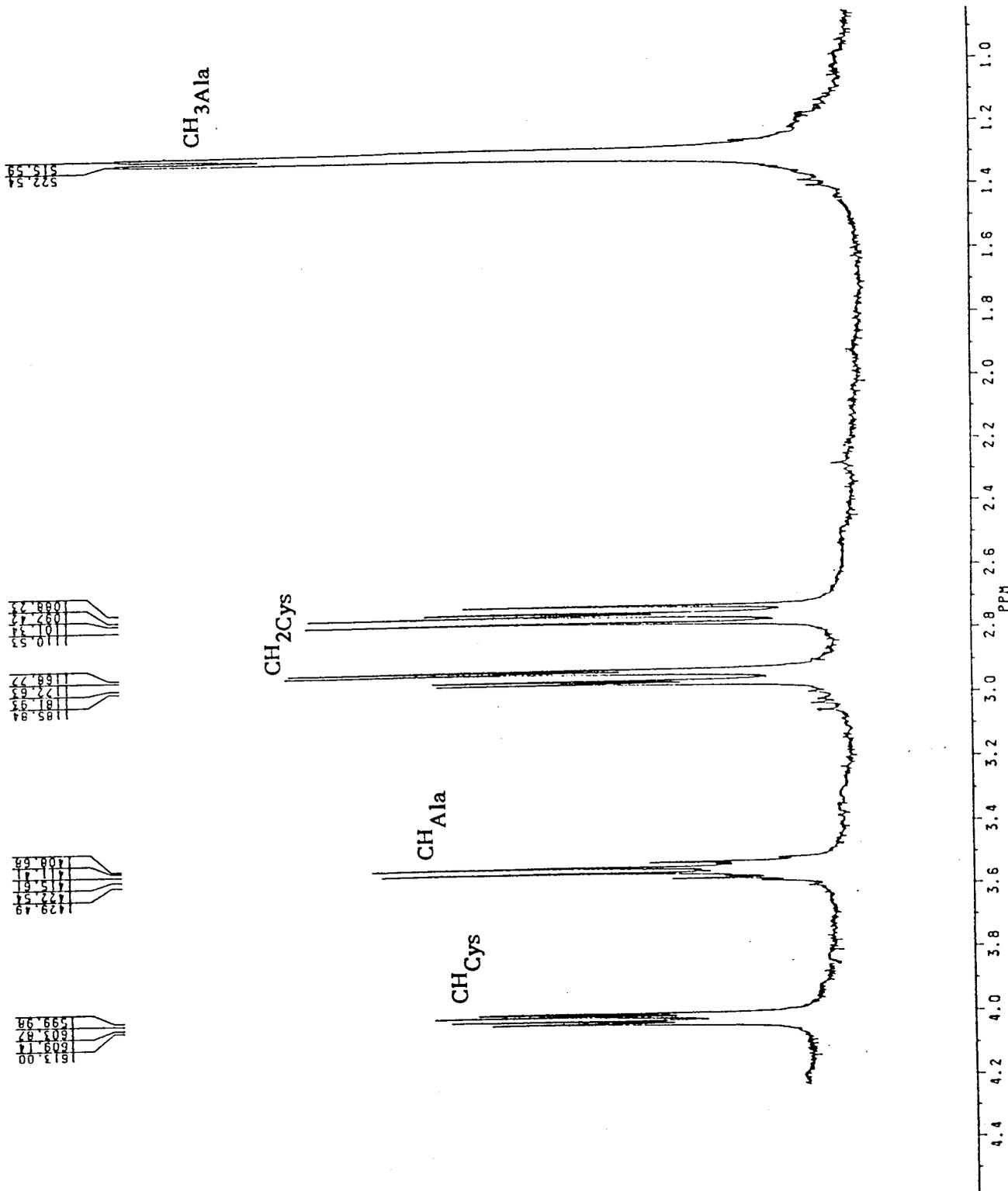


Figure 34 : Spectre R.M.N. de Ala-Cys en milieu basique

1226.46
1221.46
1212.27
1207.01
1191.41
1184.41
1180.63

1353.52
1348.60
1338.32
1332.81
1322.82
1315.51
1308.25
1301.44

1269.92
1262.73
1255.69

1632.54
1627.62
1621.74
1616.11

HERTZ

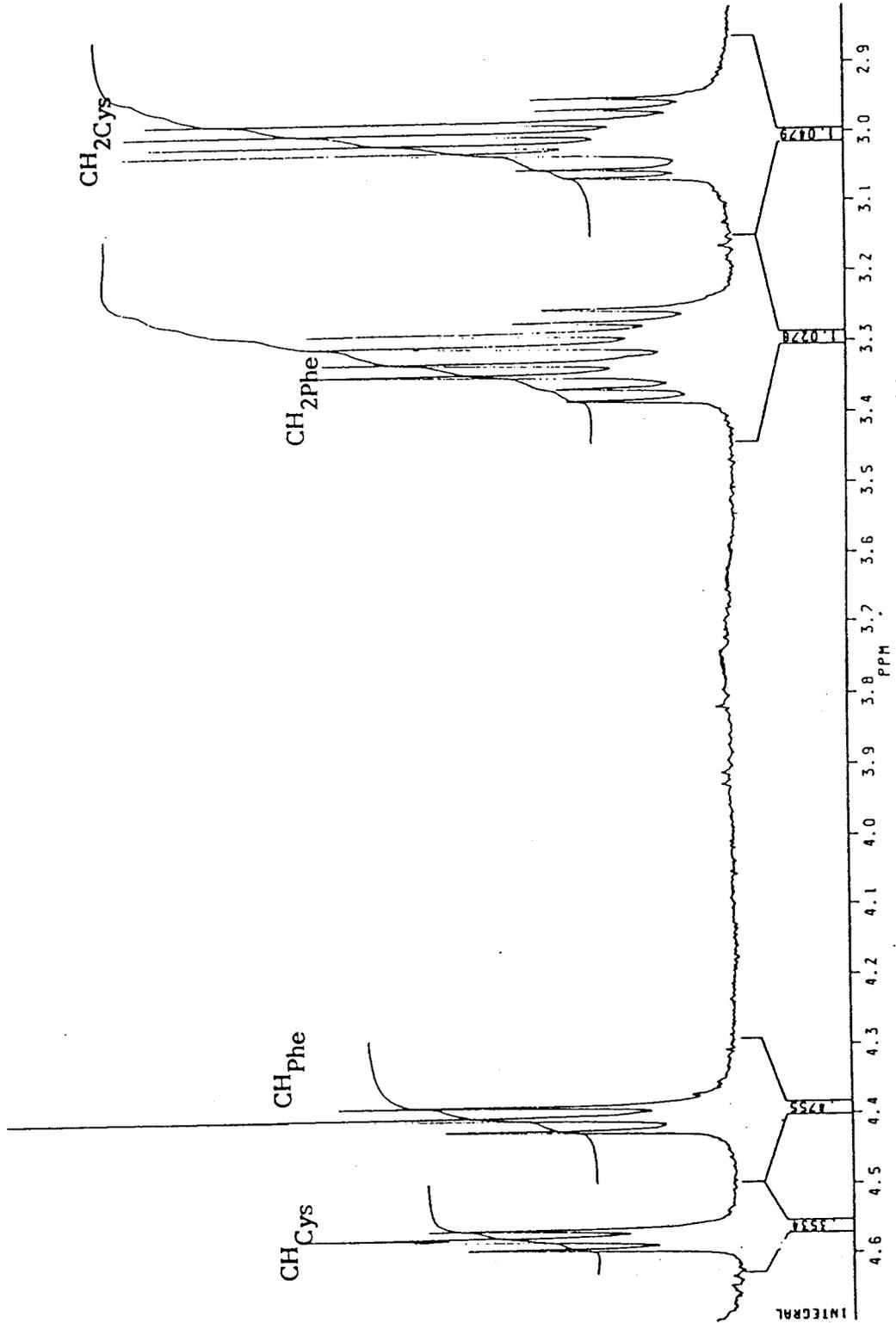


Figure 35 : Spectre R.M.N. de Phe-Cys en milieu acide

196.40	198.78	199.17	199.56	199.95	200.34	200.73	201.12	201.51	201.90	202.29	202.68	203.07	203.46	203.85	204.24	204.63	205.02	205.41	205.80	206.19	206.58	206.97	207.36	207.75	208.14	208.53	208.92	209.31	209.70	210.09	210.48	210.87	211.26	211.65	212.04	212.43	212.82	213.21	213.60	213.99	214.38	214.77	215.16	215.55	215.94	216.33	216.72	217.11	217.50	217.89	218.28	218.67	219.06	219.45	219.84	220.23	220.62	221.01	221.40	221.79	222.18	222.57	222.96	223.35	223.74	224.13	224.52	224.91	225.30	225.69	226.08	226.47	226.86	227.25	227.64	228.03	228.42	228.81	229.20	229.59	230.00	230.39	230.78	231.17	231.56	231.95	232.34	232.73	233.12	233.51	233.90	234.29	234.68	235.07	235.46	235.85	236.24	236.63	237.02	237.41	237.80	238.19	238.58	238.97	239.36	239.75	240.14	240.53	240.92	241.31	241.70	242.09	242.48	242.87	243.26	243.65	244.04	244.43	244.82	245.21	245.60	245.99	246.38	246.77	247.16	247.55	247.94	248.33	248.72	249.11	249.50	249.89	250.28	250.67	251.06	251.45	251.84	252.23	252.62	253.01	253.40	253.79	254.18	254.57	254.96	255.35	255.74	256.13	256.52	256.91	257.30	257.69	258.08	258.47	258.86	259.25	259.64	260.03	260.42	260.81	261.20	261.59	261.98	262.37	262.76	263.15	263.54	263.93	264.32	264.71	265.10	265.49	265.88	266.27	266.66	267.05	267.44	267.83	268.22	268.61	269.00	269.39	269.78	270.17	270.56	270.95	271.34	271.73	272.12	272.51	272.90	273.29	273.68	274.07	274.46	274.85	275.24	275.63	276.02	276.41	276.80	277.19	277.58	277.97	278.36	278.75	279.14	279.53	279.92	280.31	280.70	281.09	281.48	281.87	282.26	282.65	283.04	283.43	283.82	284.21	284.60	284.99	285.38	285.77	286.16	286.55	286.94	287.33	287.72	288.11	288.50	288.89	289.28	289.67	290.06	290.45	290.84	291.23	291.62	292.01	292.40	292.79	293.18	293.57	293.96	294.35	294.74	295.13	295.52	295.91	296.30	296.69	297.08	297.47	297.86	298.25	298.64	299.03	299.42	299.81	300.20	300.59	300.98	301.37	301.76	302.15	302.54	302.93	303.32	303.71	304.10	304.49	304.88	305.27	305.66	306.05	306.44	306.83	307.22	307.61	308.00	308.39	308.78	309.17	309.56	309.95	310.34	310.73	311.12	311.51	311.90	312.29	312.68	313.07	313.46	313.85	314.24	314.63	315.02	315.41	315.80	316.19	316.58	316.97	317.36	317.75	318.14	318.53	318.92	319.31	319.70	320.09	320.48	320.87	321.26	321.65	322.04	322.43	322.82	323.21	323.60	323.99	324.38	324.77	325.16	325.55	325.94	326.33	326.72	327.11	327.50	327.89	328.28	328.67	329.06	329.45	329.84	330.23	330.62	331.01	331.40	331.79	332.18	332.57	332.96	333.35	333.74	334.13	334.52	334.91	335.30	335.69	336.08	336.47	336.86	337.25	337.64	338.03	338.42	338.81	339.20	339.59	340.00	340.39	340.78	341.17	341.56	341.95	342.34	342.73	343.12	343.51	343.90	344.29	344.68	345.07	345.46	345.85	346.24	346.63	347.02	347.41	347.80	348.19	348.58	348.97	349.36	349.75	350.14	350.53	350.92	351.31	351.70	352.09	352.48	352.87	353.26	353.65	354.04	354.43	354.82	355.21	355.60	355.99	356.38	356.77	357.16	357.55	357.94	358.33	358.72	359.11	359.50	359.89	360.28	360.67	361.06	361.45	361.84	362.23	362.62	363.01	363.40	363.79	364.18	364.57	364.96	365.35	365.74	366.13	366.52	366.91	367.30	367.69	368.08	368.47	368.86	369.25	369.64	370.03	370.42	370.81	371.20	371.59	371.98	372.37	372.76	373.15	373.54	373.93	374.32	374.71	375.10	375.49	375.88	376.27	376.66	377.05	377.44	377.83	378.22	378.61	379.00	379.39	379.78	380.17	380.56	380.95	381.34	381.73	382.12	382.51	382.90	383.29	383.68	384.07	384.46	384.85	385.24	385.63	386.02	386.41	386.80	387.19	387.58	387.97	388.36	388.75	389.14	389.53	389.92	390.31	390.70	391.09	391.48	391.87	392.26	392.65	393.04	393.43	393.82	394.21	394.60	394.99	395.38	395.77	396.16	396.55	396.94	397.33	397.72	398.11	398.50	398.89	399.28	399.67	400.06	400.45	400.84	401.23	401.62	402.01	402.40	402.79	403.18	403.57	403.96	404.35	404.74	405.13	405.52	405.91	406.30	406.69	407.08	407.47	407.86	408.25	408.64	409.03	409.42	409.81	410.20	410.59	410.98	411.37	411.76	412.15	412.54	412.93	413.32	413.71	414.10	414.49	414.88	415.27	415.66	416.05	416.44	416.83	417.22	417.61	418.00	418.39	418.78	419.17	419.56	419.95	420.34	420.73	421.12	421.51	421.90	422.29	422.68	423.07	423.46	423.85	424.24	424.63	425.02	425.41	425.80	426.19	426.58	426.97	427.36	427.75	428.14	428.53	428.92	429.31	429.70	430.09	430.48	430.87	431.26	431.65	432.04	432.43	432.82	433.21	433.60	433.99	434.38	434.77	435.16	435.55	435.94	436.33	436.72	437.11	437.50	437.89	438.28	438.67	439.06	439.45	439.84	440.23	440.62	441.01	441.40	441.79	442.18	442.57	442.96	443.35	443.74	444.13	444.52	444.91	445.30	445.69	446.08	446.47	446.86	447.25	447.64	448.03	448.42	448.81	449.20	449.59	449.98	450.37	450.76	451.15	451.54	451.93	452.32	452.71	453.10	453.49	453.88	454.27	454.66	455.05	455.44	455.83	456.22	456.61	457.00	457.39	457.78	458.17	458.56	458.95	459.34	459.73	460.12	460.51	460.90	461.29	461.68	462.07	462.46	462.85	463.24	463.63	464.02	464.41	464.80	465.19	465.58	465.97	466.36	466.75	467.14	467.53	467.92	468.31	468.70	469.09	469.48	469.87	470.26	470.65	471.04	471.43	471.82	472.21	472.60	472.99	473.38	473.77	474.16	474.55	474.94	475.33	475.72	476.11	476.50	476.89	477.28	477.67	478.06	478.45	478.84	479.23	479.62	480.01	480.40	480.79	481.18	481.57	481.96	482.35	482.74	483.13	483.52	483.91	484.30	484.69	485.08	485.47	485.86	486.25	486.64	487.03	487.42	487.81	488.20	488.59	488.98	489.37	489.76	490.15	490.54	490.93	491.32	491.71	492.10	492.49	492.88	493.27	493.66	494.05	494.44	494.83	495.22	495.61	496.00	496.39	496.78	497.17	497.56	497.95	498.34	498.73	499.12	499.51	499.90	500.29	500.68	501.07	501.46	501.85	502.24	502.63	503.02	503.41	503.80	504.19	504.58	504.97	505.36	505.75	506.14	506.53	506.92	507.31	507.70	508.09	508.48	508.87	509.26	509.65	510.04	510.43	510.82	511.21	511.60	511.99	512.38	512.77	513.16	513.55	513.94	514.33	514.72	515.11	515.50	515.89	516.28	516.67	517.06	517.45	517.84	518.23	518.62	519.01	519.40	519.79	520.18	520.57	520.96	521.35	521.74	522.13	522.52	522.91	523.30	523.69	524.08	524.47	524.86	525.25	525.64	526.03	526.42	526.81	527.20	527.59	527.98	528.37	528.76	529.15	529.54	529.93	530.32	530.71	531.10	531.49	531.88	532.27	532.66	533.05	533.44	533.83	534.22	534.61	535.00	535.39	535.78	536.17	536.56	536.95	537.34	537.73	538.12	538.51	538.90	539.29	539.68	540.07	540.46	540.85	541.24	541.63	542.02	542.41	542.80	543.19	543.58	543.97	544.36	544.75	545.14	545.53	545.92	546.31	546.70	547.09	547.48	547.87	548.26	548.65	549.04	549.43	549.82	550.21	550.60	550.99	551.38	551.77	552.16	552.55	552.94	553.33	553.72	554.11	554.50	554.89	555.28	555.67	556.06	556.45	556.84	557.23	557.62	558.01	558.40	558.79	559.18	559.57	559.96	560.35	560.74	561.13	561.52	561.91	562.30	562.69	563.08	563.47	563.86	564.25	564.64	565.03	565.42	565.81	566.20	566.59	566.98	567.37	567.76	568.15	568.54	568.93	569.32	569.71	570.10	570.49	570.88	571.27	571.66	572.05	572.44	572.83	573.22	573.61	574.00	574.39	574.78	575.17	575.56	575.95	576.34	576.73	577.12	577.51	577.90	578.29	578.68	579.07	579.46	579.85	580.24	580.63	581.02	581.41	581.80	582.19	582.58	582.97	583.36	583.75	584.14	584.53	584.92	585.31	585.70	586.09	586.48	586.87	587.26	587.65	588.04	588.43	588.82	589.21	589.60	590.00	590.39	590.78	591.17	591.56	591.95	592.34	592.73	593.12	593.51	593.90	594.29	594.68	595.07	595.46	595.85	596.24	596.63	597.02	597.41	597.80	598.19	598.58	598.97	599.36	599.75	600.14	600.53	600.92	601.31	601.70	602.09	602.48	602.87	603.26	603.65	604.04	604.43	604.82	605.21	605.60	605.99	606.38	606.77	607.16	607.55	607.94	608.33	608.72	609.11	609.50	609.89	610.28	610.67	611.06	611.45	611.84	612.23	612.62	613.01	613.40	613.79	614.18	614.57	614.96	615.35	615.74	616.13	616.52	616.91	617.30	617.69	618.08	618.47	618.86	619.25	619.64	620.03	620.42	620.81	621.20	621.59	621.98	622.37	622.76	623.15	623.54	623.93	624.32	624.71	625.10	625.49	625.88	626.27	626.66	627.05	627.44	627.83	628.22	628.61	629.00	629.39	629.78	630.17	630.56	630.95	631.34	631.73	632.12	632.51	632.90	633.29	633.68	634.07	634.46	6
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---

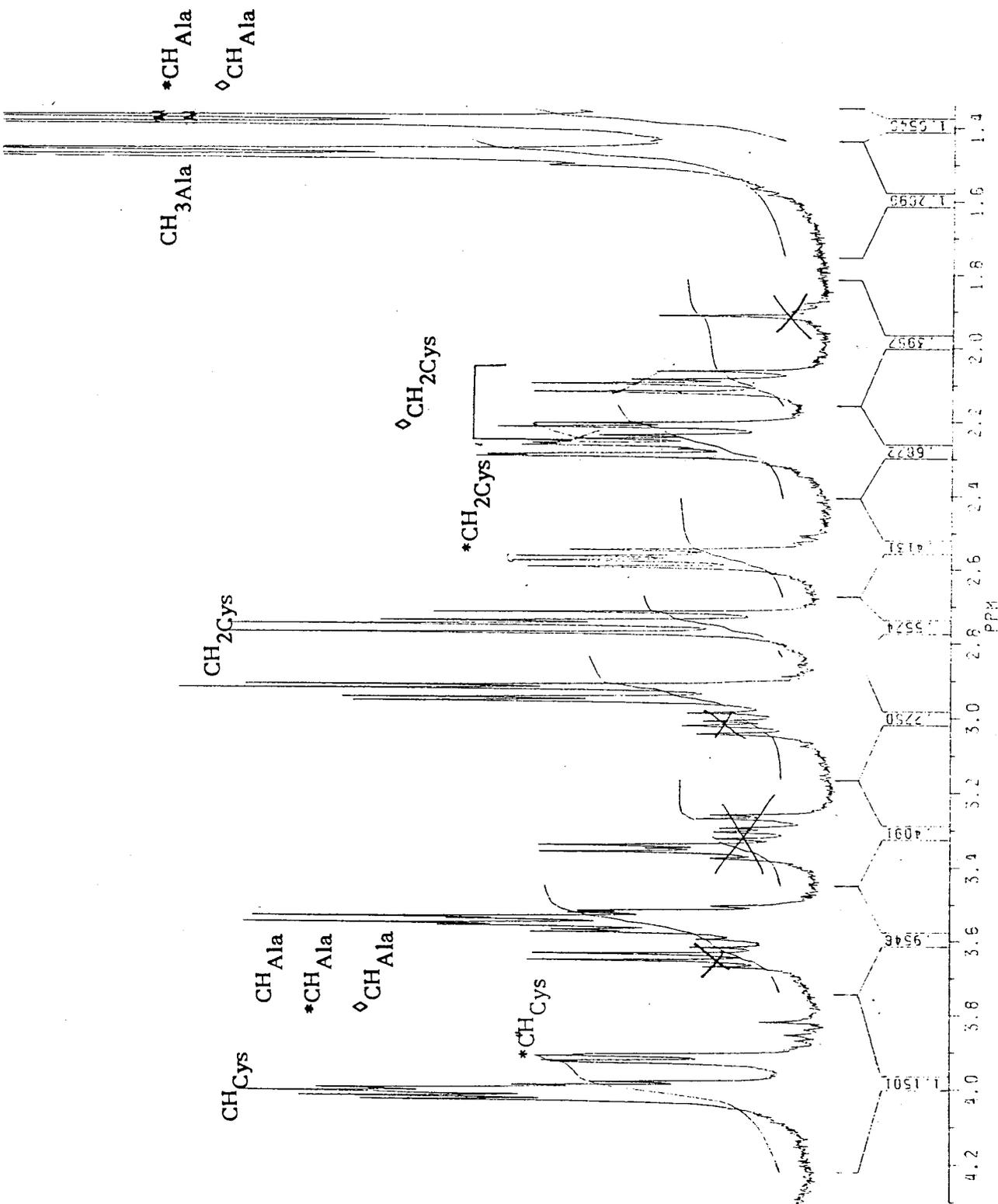


Figure 37 : Spectre R.M.N. de Ala-Cys : Ni en milieu basique

* Système lié par le soufre

\diamond Système lié par le soufre, l'amide et l'amine

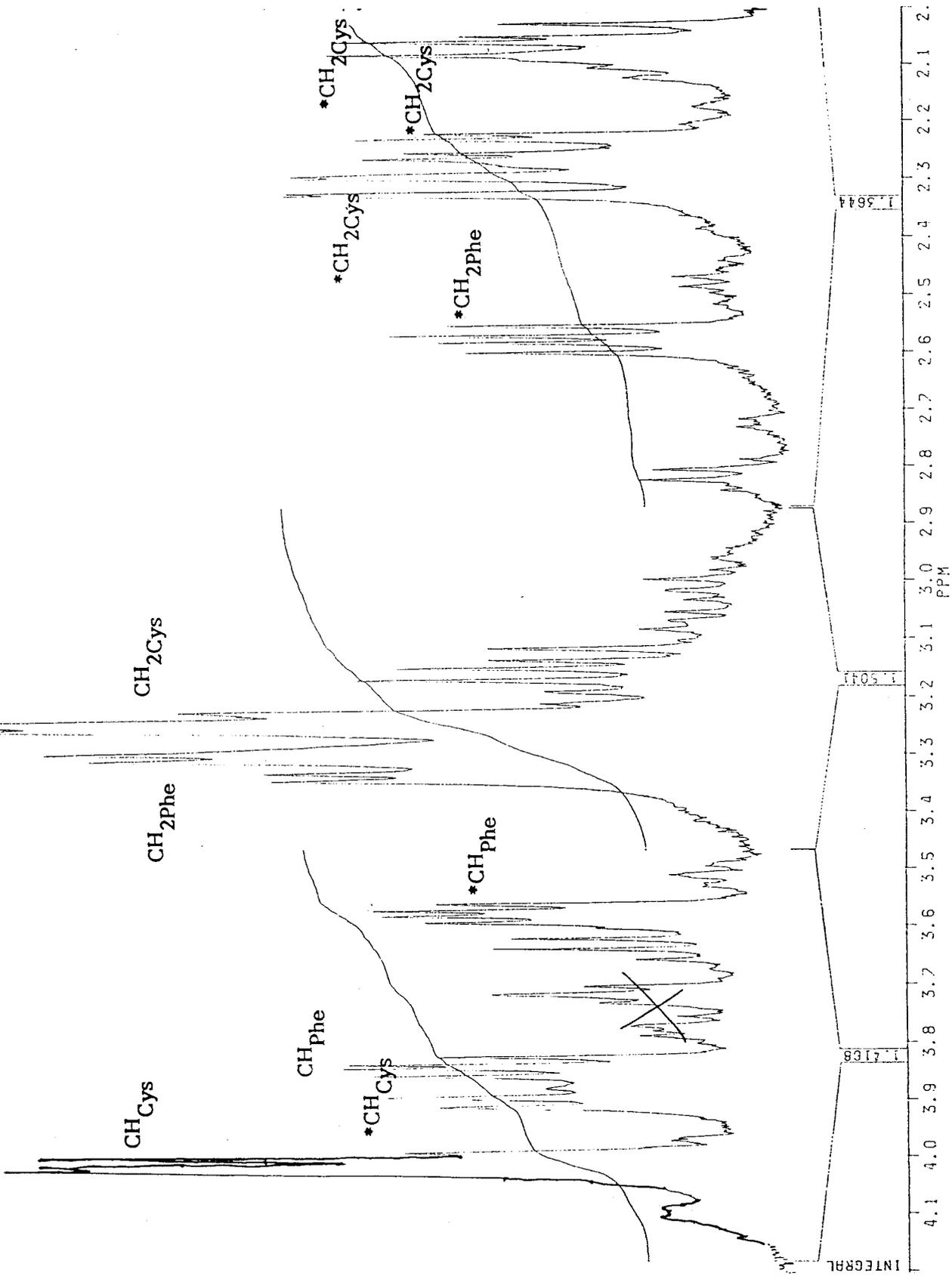


Figure 38 : Spectre R.M.N. de Phe-Cys : Ni en milieu basique
* Système complexé

C/ ALA-ALA-CYS

Les résultats obtenus pour Ala-Ala-Cys montrent que l'allongement de la chaîne peptidique par rapport à Ala-Cys ou Phe-Cys ne change pas les microconstantes de façon significative bien que l'acidité de la fonction carboxylique diminue (Tableau IV).

La spectroscopie d'absorption montre en U.V. une bande d-d à 422 nm caractéristique de l'espèce carré plan diamagnétique $NiAH_2$ (fig 46-47). Cette espèce est coordonnée par l'intermédiaire de la fonction amine terminale, deux fonctions amide et le soufre (NH_2 , CN^- , S^-).

Le spectre dichroïque est en accord avec ces résultats : on note deux bandes d-d négative à 520 et 480 nm et trois bandes de transfert de charge à 245 nm, 270 et 305 nm que l'on peut attribuer au transfert de charge de l'amide et le soufre (fig 40 à 45).

Les études potentiométriques ont fait apparaître une espèce qui se trouve sous la géométrie octaédrique car elle n'est pas visible en spectroscopie : $NiAH$. De plus sa faible stabilité ne permet pas de l'observer puisqu'elle est rapidement transformée en l'espèce $NiAH_2$ qui correspond à la déprotonation des deux amides et du thiol (Tableaux V, VI, VII).

La présence de quatre groupes fonctionnels coordinants sur le ligand interdit toute existence de complexe possédant plusieurs ligands. De plus, cette coordination donne lieu à la formation de trois chélates à cinq chaînons relativement stables (23,25).

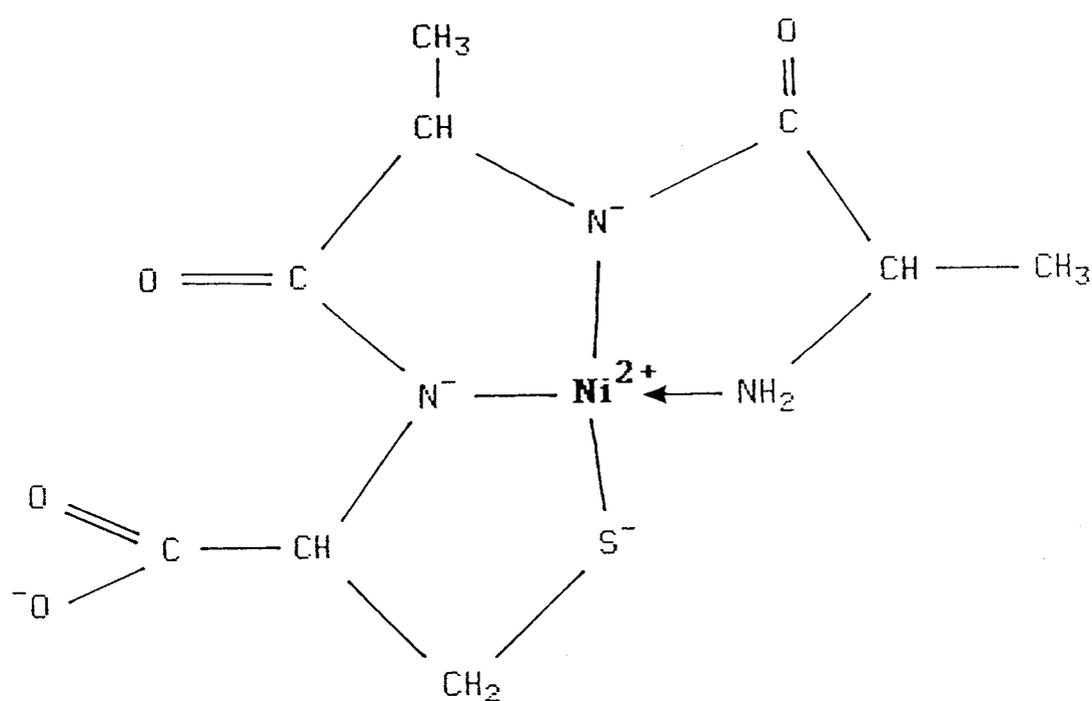


Figure 39
Structure du complexe NiAH₂
(Ala-Ala-Cys : Ni(II))

Les spectres RMN de Ala-Ala-Cys:Ni rapport 2 montre la formation de l'espèce NiAH_2 à haut pH et confirme ainsi les données dichroïques, UV-visibles et potentiométriques. De la même façon que précédemment on peut décomposer le spectre ABC de la cystéine en 2 systèmes (fig 48,49,50) :

- ◆ le système du à l'excès de ligand dont l'octet est centré à 2.8 ppm
- ◆ le système qui correspond à la déprotonation des deux amides et du thiol : c'est l'espèce NiAH_2 : octet à 2.9 ppm, elle est formée de trois chélates à cinq chaînons relativement stables.

Une bonne résolution des spectres est difficile à obtenir et de ce fait empêche le calcul des populations de rotamères.

Tableau IV : Macroconstantes (pK) et microconstantes (pk) du ligand Ala Ala Cys.

Ala-Ala-Cys	
pK ₁	3.20 ± 0.02
pK ₂	7.96 ± 0.02
pK ₃	9.73 ± 0.02
pk ₂	9.37 ± 0.02
pk ₃	7.98 ± 0.01
pk ₂₃	8.32 ± 0.02
pk ₃₂	9.72 ± 0.02
k ₂ /k ₃	0.04

TABLEAU V : Valeurs des principaux maxima en dichroïsme circulaire pour Ala Ala Cys avec Ni (II).

pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1			
11,31	525	-0.94	A
	463	-0.76	E
	307	-1.43	$S_{\pi x} \rightarrow Ni$
	271	-4.57	$S_{\sigma y} \rightarrow Ni$
	243	-1.33	$N^- \rightarrow Ni$
5.76	525	-0.05	A
	463	-0.04	E
	307	-1.90	$S_{\pi x} \rightarrow Ni$
	271	-3.05	$S_{\sigma y} \rightarrow Ni$
	243	-3.23	$N^- \rightarrow Ni$
Rapport 2			
11.79	525	-0.87	A
	463	-0.64	E
	303	+1.45	$S_{\pi x} \rightarrow Ni$
	271	-1.91	$S_{\sigma y} \rightarrow Ni$
	246	+2.59	$N^- \quad Ni$
Rapport 4			
11.53	525	-1.24	A
	463	-1.07	E
	310	-0.4	$S_{\pi x} \rightarrow Ni$
	273	-5.4	$S_{\sigma y} \rightarrow Ni$
	246	+0.1	$N^- \quad Ni$
5.60	525	-0.36	A
	463	-0.31	E
	300	+3.2	$S_{\pi x} \rightarrow Ni$
	273	+2.1	$S_{\sigma y} \rightarrow Ni$
	246	+4.4	$N^- \rightarrow Ni$

TABLEAU VI : Constantes de stabilité et valeurs dichroïques de Ala-Ala-Cys : Ni(II).

Ligand	Espèces	Log β	Dichroïsme		Transition
			λ	$\Delta\epsilon$	
Ala Ala Cys	NiAH	13.6 ± 0.2			
	NiAH ₋₂	-4.47 ± 0.04	520	-0.8	d-d, A
			480	-0.7	d-d, E
			305	+1	S → Ni, CT
			270	-2	S → Ni, CT
245	+2	N ⁻ → Ni, CT			

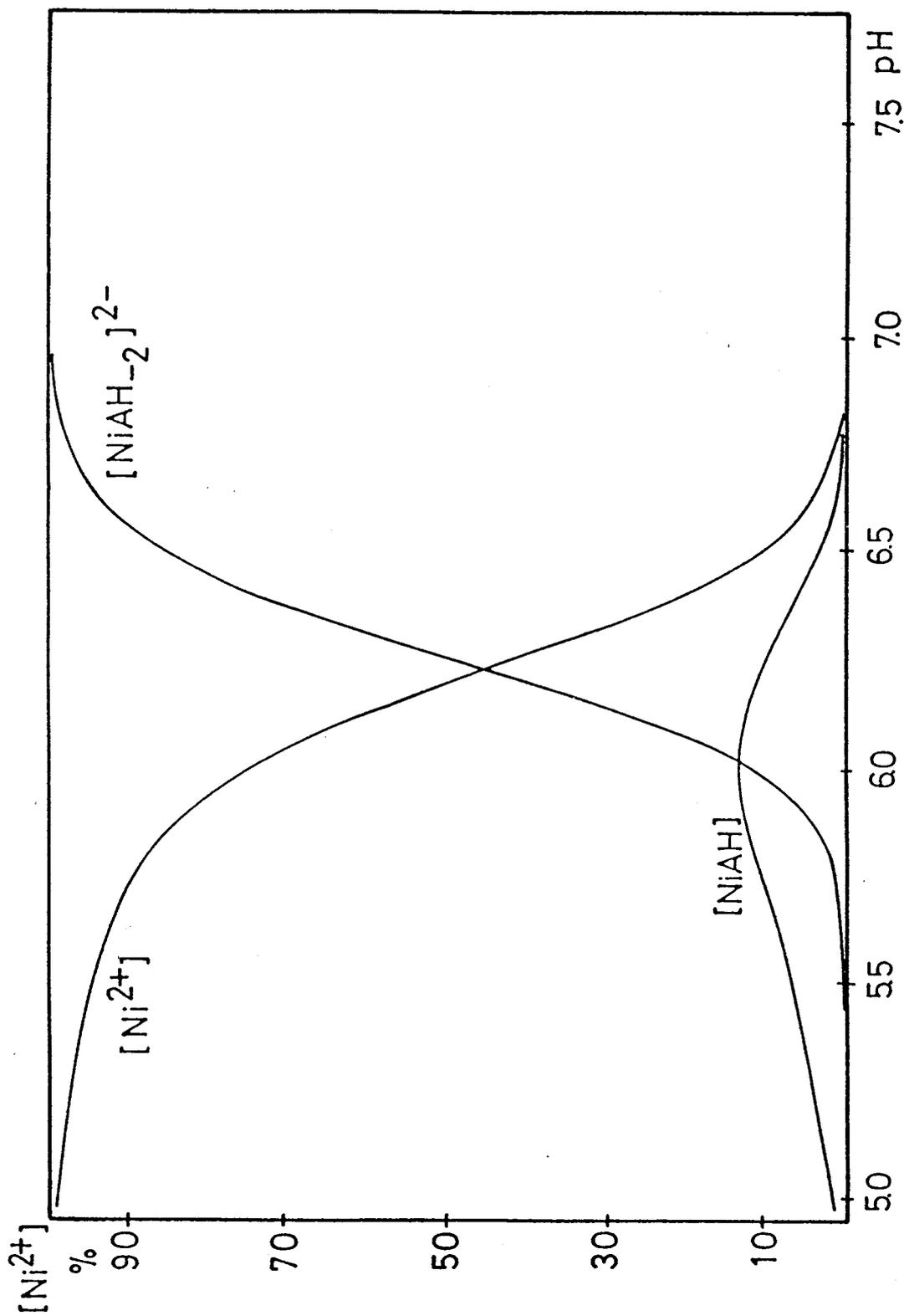


TABLEAU VII
Courbes de répartition des espèces
Ala-Ala-Cys : Ni(II)
Rapport 2

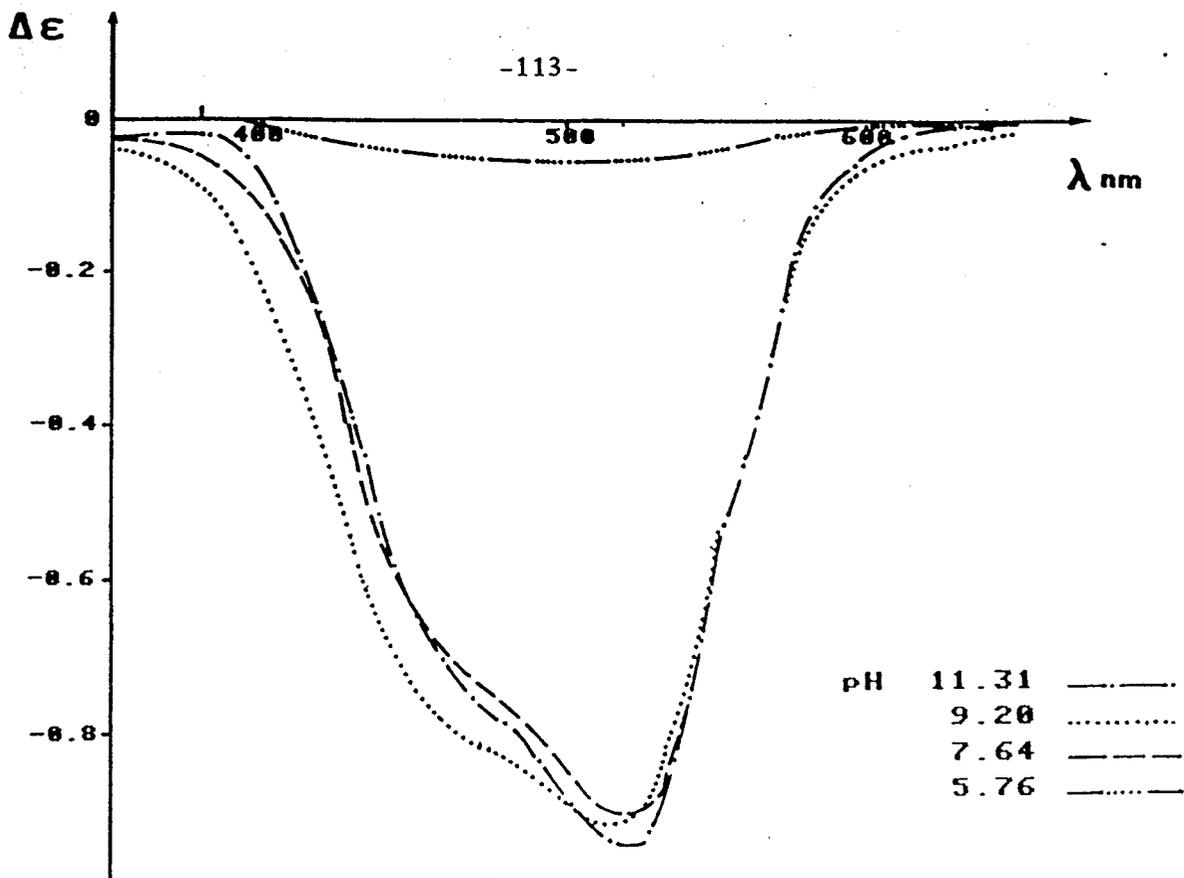


Figure 40

Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 1

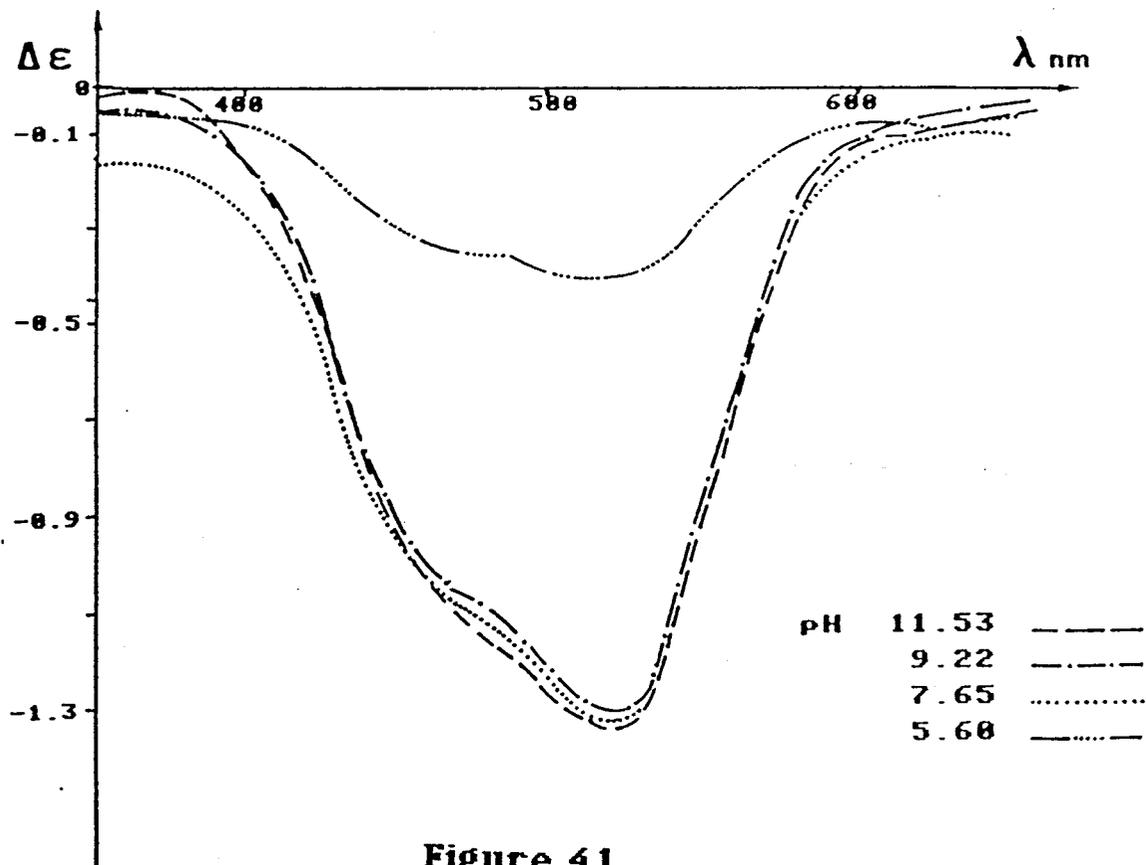


Figure 41

Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 4

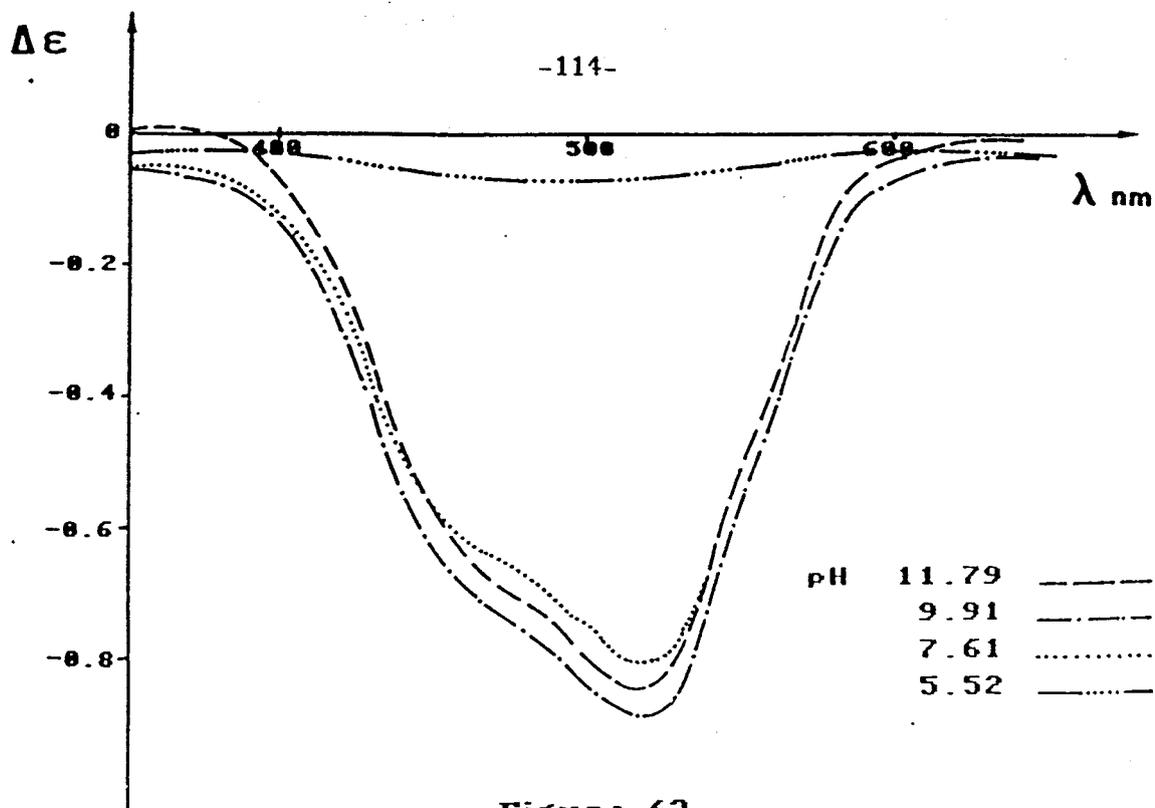


Figure 42

Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 2

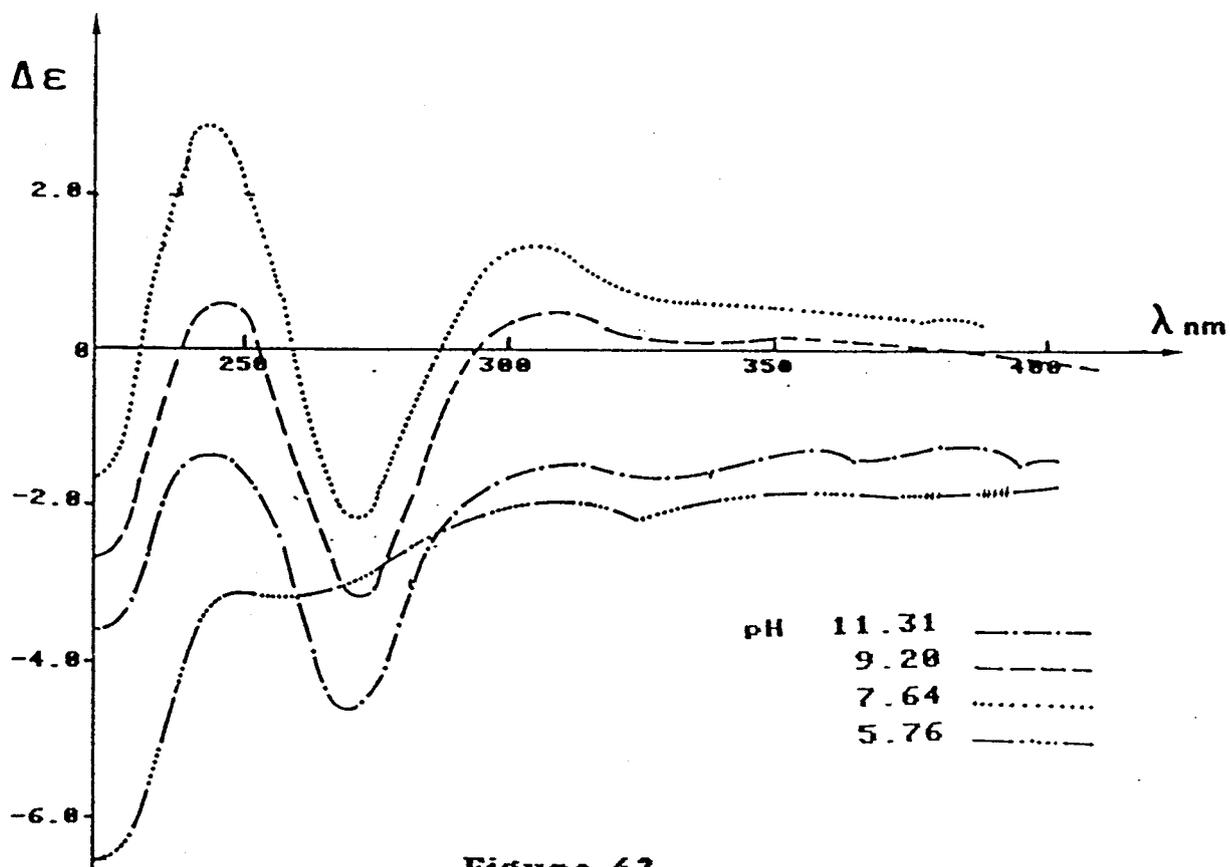


Figure 43

Spectre dichroïque U.V. de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 1

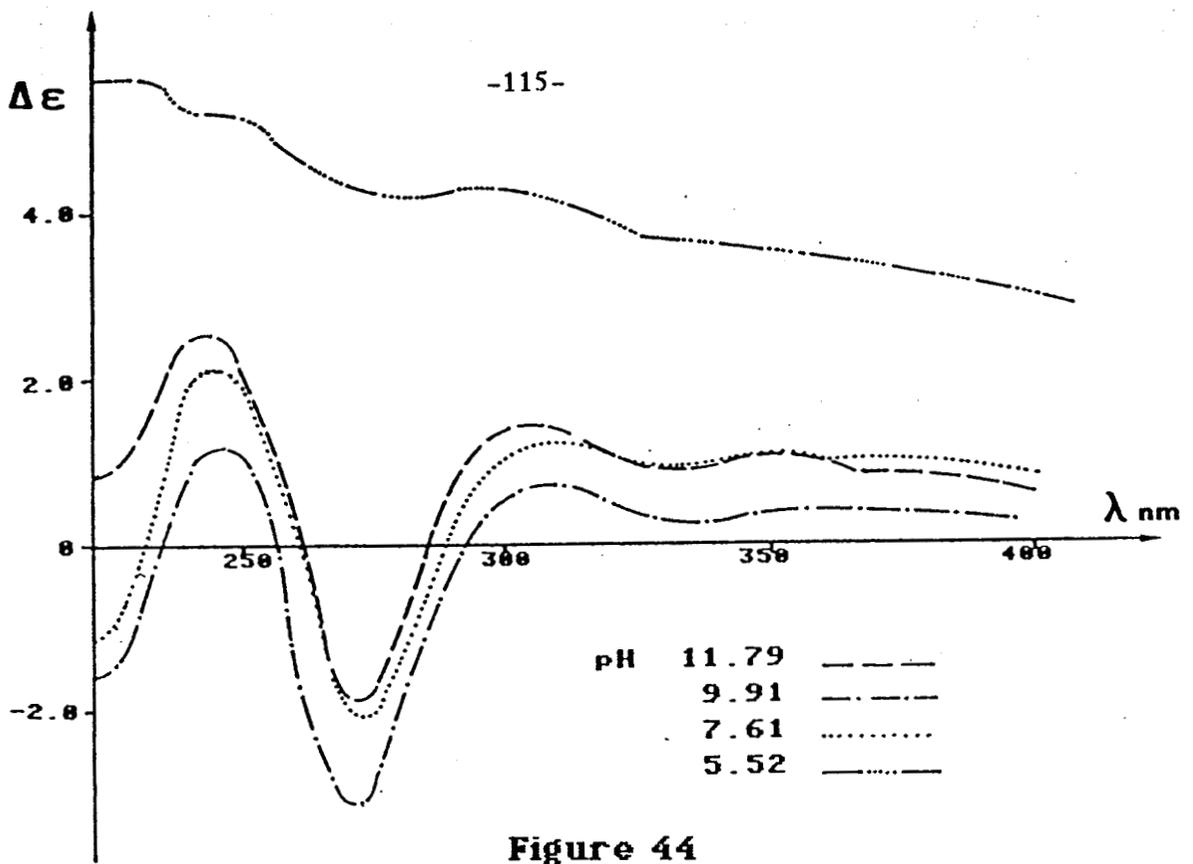


Figure 44

Spectre dichroïque U.V. de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 2

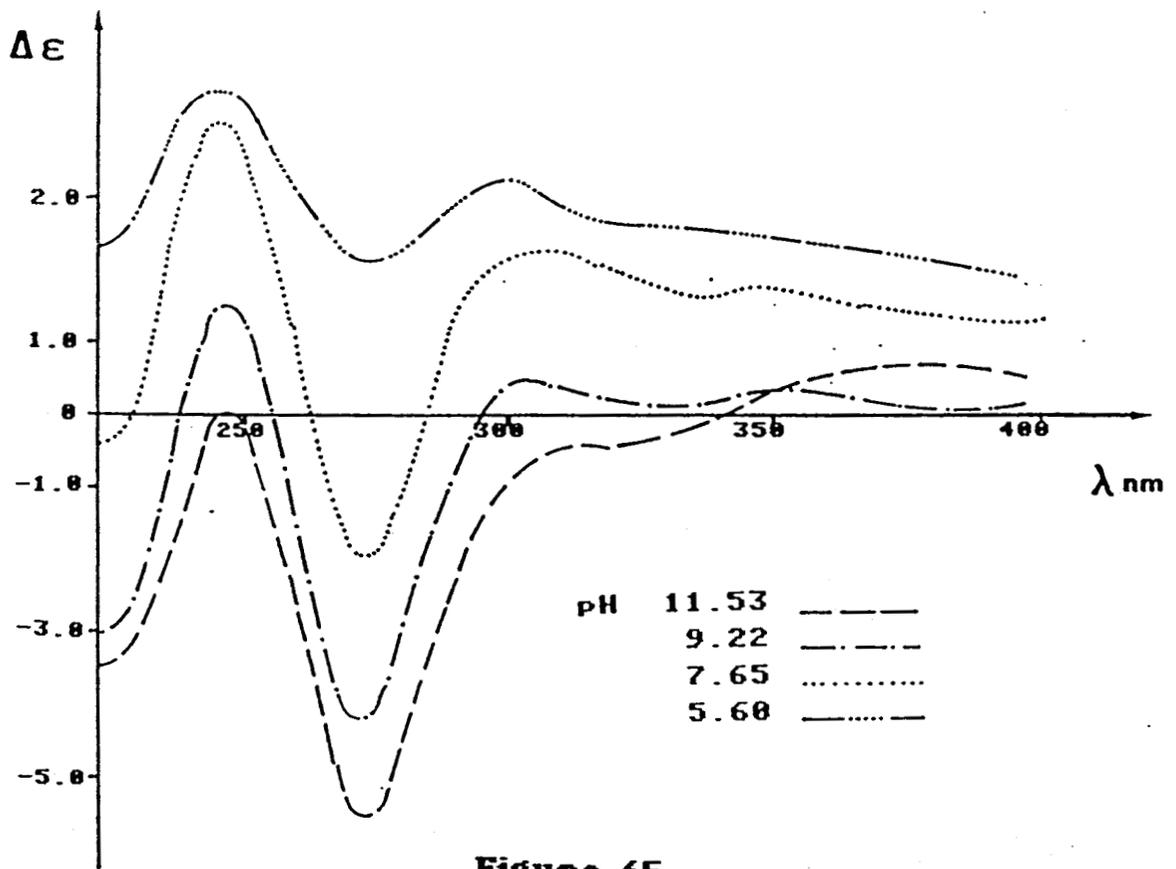


Figure 45

Spectre dichroïque U.V. de AlaAlaCys avec Ni(II) rapport 4

Figure 46

Spectra d'absorption de AlaAlaCys·Ni(II) rapport 1.5

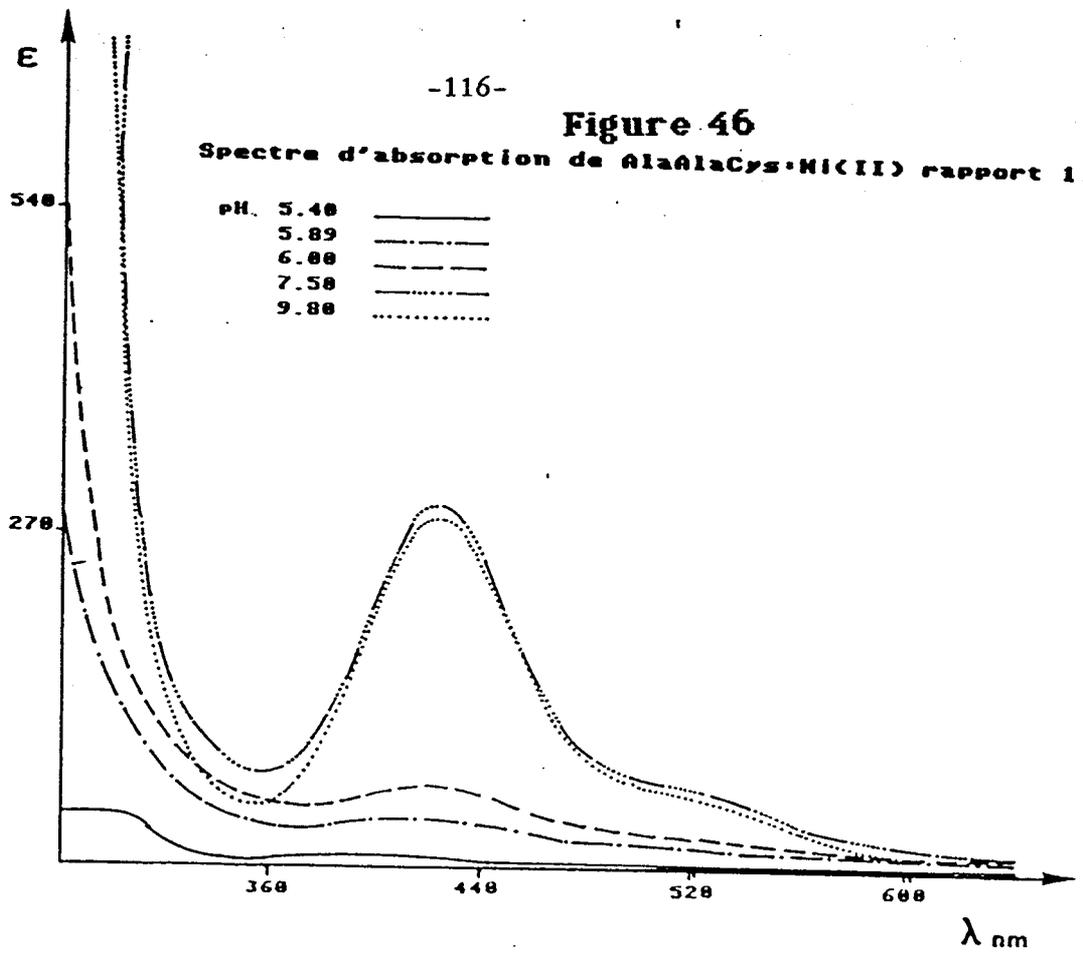
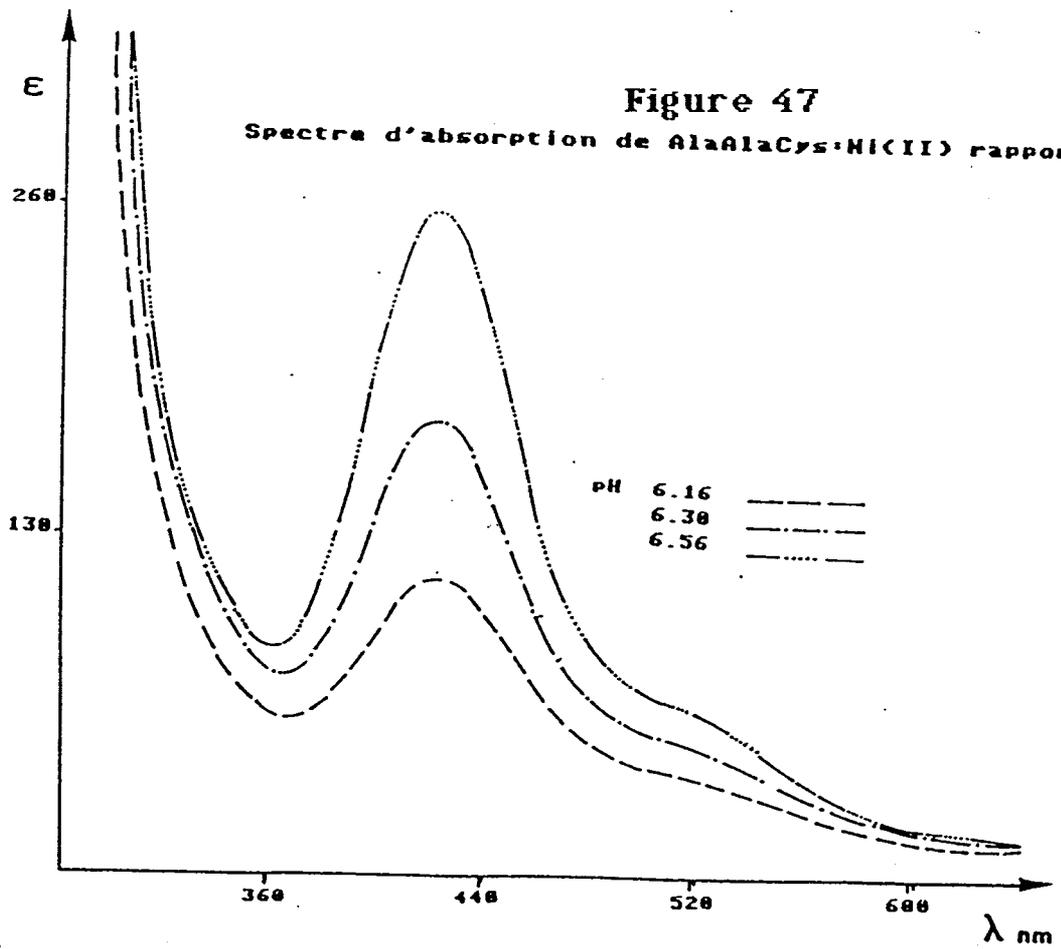


Figure 47

Spectra d'absorption de AlaAlaCys·Ni(II) rapport 1.5



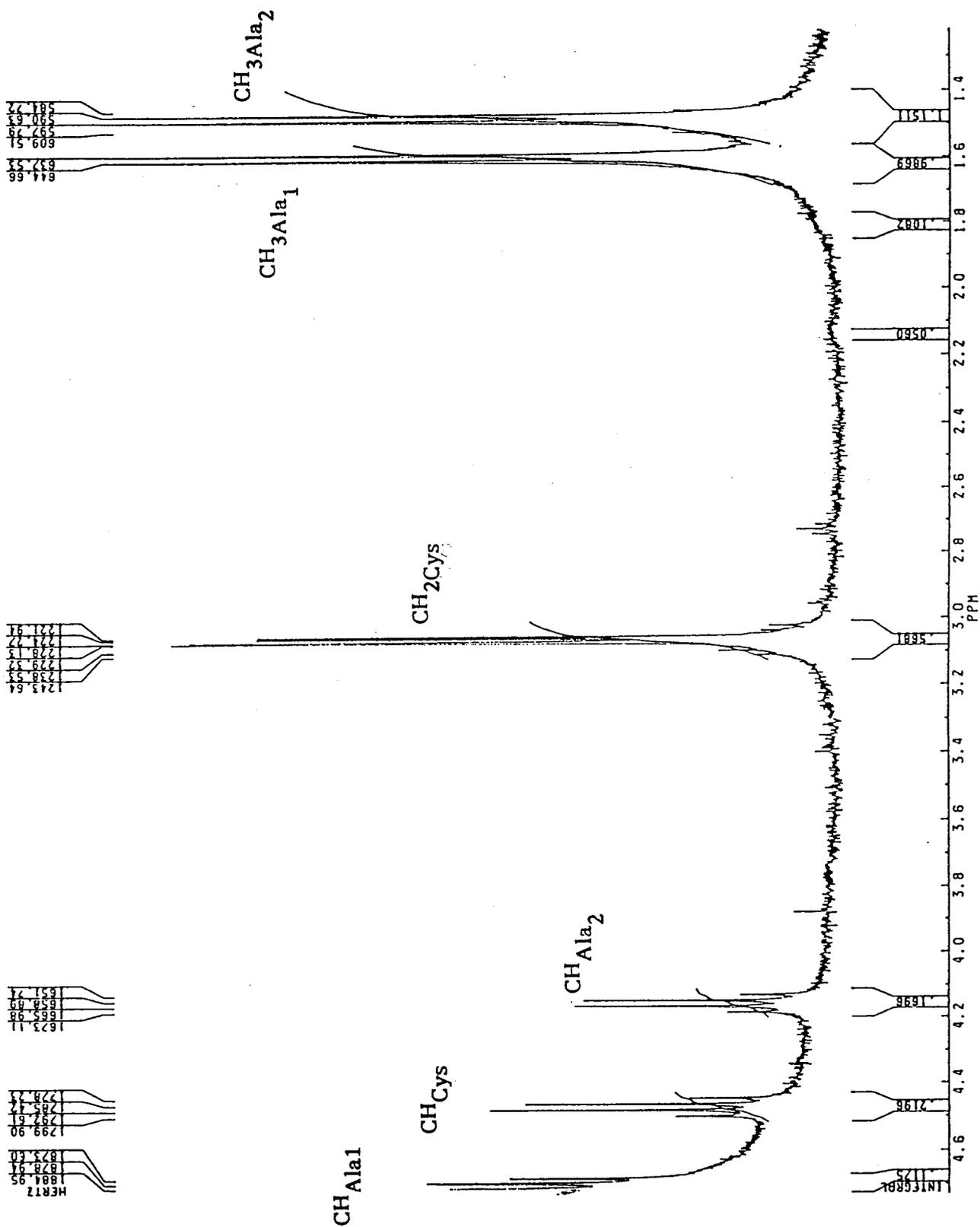


Figure 48 : Spectre R.M.N. de Ala-Ala-Cys en milieu acide

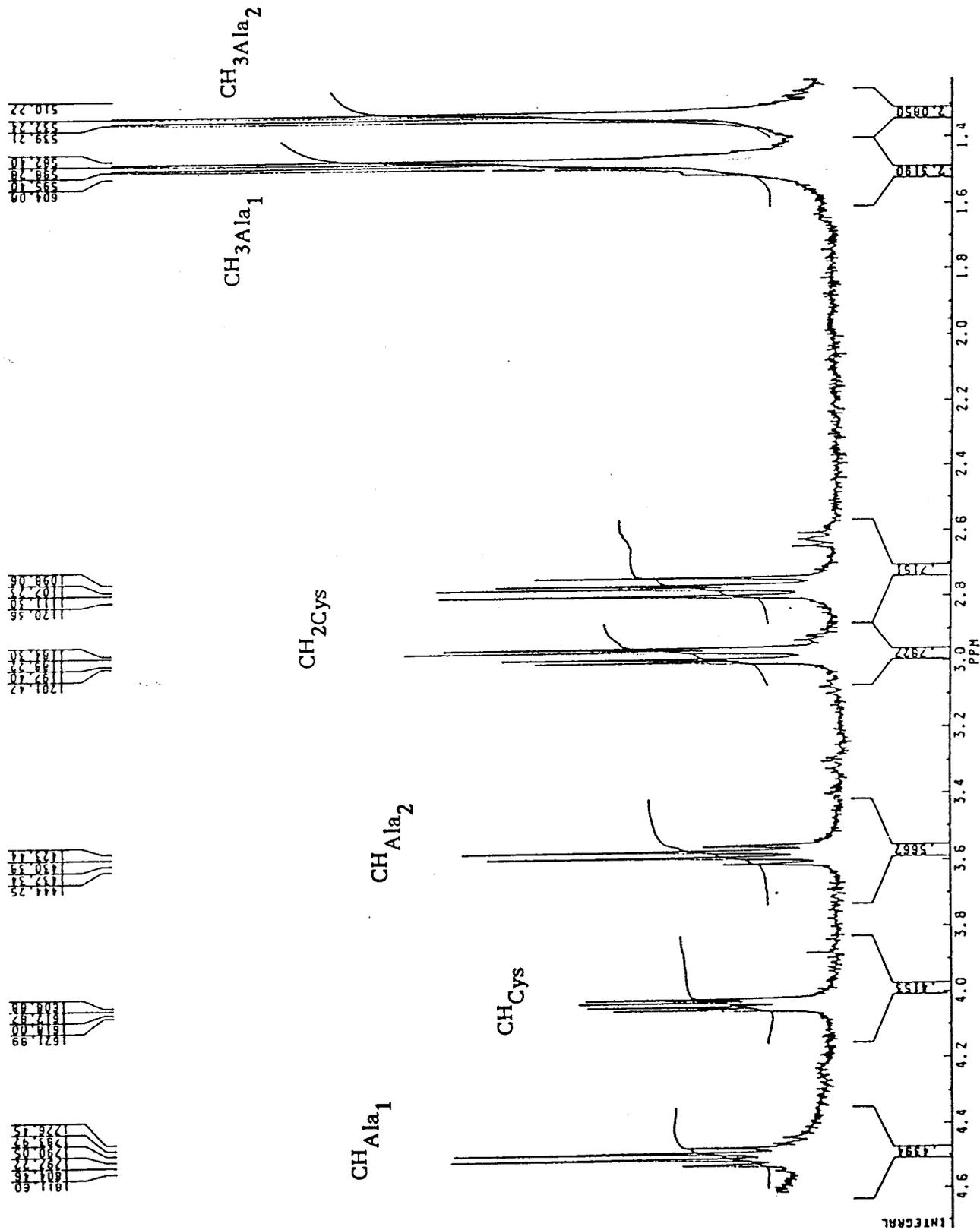


Figure 49 : Spectre R.M.N. de Ala-Ala-Cys en milieu basique

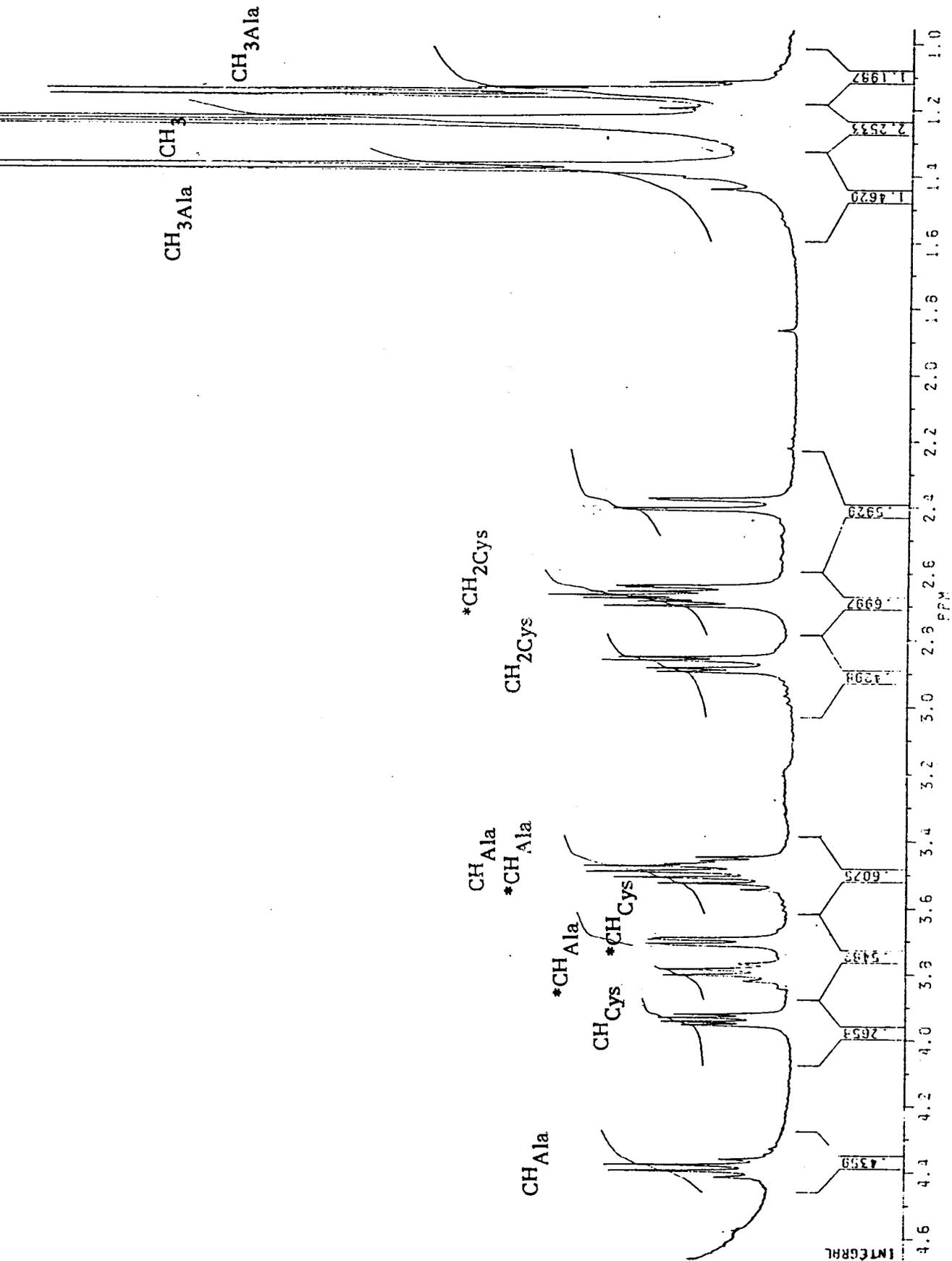


Figure 50 : Spectre R.M.N. de Ala-Ala-Cys : Ni en milieu basique (* peptide complexé)

D/ CYS-ALA-ALA-CYS

En dichroïsme circulaire le système Cys-Ala-Ala-Cys : Ni en rapport 1 fournit essentiellement deux informations :

- la formation typique d'un complexe plan avec le Ni (II) qui est représenté à pH 8.67 par deux bandes de transitions d-d à 475 et 400 nm (fig 51).

- la participation du soufre dans la coordination avec le Ni (II) donne deux bandes de transfert de charge à 335 nm et 260 nm. Ce type de coordination semble conduire à la formation de structures dimères ou oligomères (fig 52).

Les spectres dichroïques obtenus en rapport 2 montrent de grandes similitudes avec ceux des ligands Cys et Cys-Gly (fig 53 et 54).

Les bandes d'absorption à 530 et 450 nm correspondent aux bandes d-d et les trois bandes centrées à 330, 290 et 246 nm sont attribuées aux trois transitions $S_{\pi} \rightarrow Ni$, $S_{O} \rightarrow Ni$ et $S_{O} \rightarrow Ni$. Toutes ces absorptions sont caractéristiques de l'espèce NiA_2 et concordent avec les résultats de Cys et Cys-Gly. Cela signifie que le tétrapeptide Cys-Ala-Ala-Cys intervient par une coordination [N,S] avec le Ni (II) pour aboutir à la formation de l'espèce NiA_2 (fig 66).

En U.V.-visible, une bande d'absorption d-d à 450 nm pH 11.67 en rapport 1 témoigne de la formation du complexe plan (Fig 57). Dans la région U.V., on observe une diminution de la bande d'absorption située à 270 nm lorsque le pH et le rapport ligand métal augmentent (fig 58, 60 et 62). Cette bande a été observée pour d'autres ligands (21). Elle est due à la formation du complexe Ni_3A_4 (22) où deux complexes NiA_2 mettent leurs quatre soufres en commun pour former un complexe central NiS_4 qui a déjà été décrit pour différents composés contenant une fonction amine et une fonction thiolée (fig 65).

L'espèce Ni_3A_4 est présente en solution mais elle est vite remplacée par l'espèce NiA_2 lorsque le pH devient basique. Cette faible stabilité est

sûrement due à l'encombrement des résidus Alanine bien que ceux-ci ne soient pas coordonnés (21).

Les études potentiométriques montrent pour des pH supérieurs à 9 et fort rapport ligand/métal la formation de l'espèce NiA_2 . D'autres espèces telles que Ni_2A_2 et NiA_2H_2 existent à des pH plus faibles mais évoluent rapidement vers l'espèce NiA_2 (fig 63 et 64).

La faible présence de l'espèce Ni_3A_4 peut s'expliquer car les deux espèces donnent la même déprotonation du ligand, elles ne peuvent pas être différenciées en pH métrie. Seule l'utilisation d'électrodes spécifiques du nickel permettrait de connaître l'importance relative des deux espèces.

Cys-Ala-Ala-Cys semble donc se comporter avec le Ni (II) comme un peptide du type Cys-X-Y dans lequel la cystéine N-terminale est le principal site de liaison. On obtient ainsi un système très stable avec un chélate à cinq chaînons (23).

Tableau VIII : Valeur des maxima en dichroïsme circulaire pour Cys Ala Ala Cys avec Ni (II).

λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
530	+0.08	d-d A
450	-0.40	d-d E
330	-0.88	$\pi S_x \rightarrow Ni$
290	-1.67	$\sigma S_y \rightarrow Ni$
246	-2.5	$\sigma S_z \rightarrow Ni$

Tableau IX : Valeur des maxima en spectroscopie UV-visible pour Cys Ala Ala Cys avec Ni (II).

λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
450	900	d-d E
270	7500	$\sigma S_y \rightarrow Ni$

Tableau X : Données spectroscopiques et potentiométriques du Ni(II) avec Cys Ala Ala Cys.

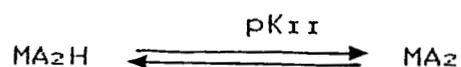
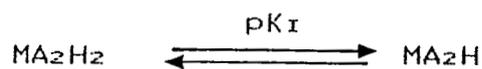
Constantes de stabilité des complexes

Espèces	log (β)
NiA ₂ H ₂	36.70±0.03
NiA ₂ H	29.96±0.06
NiA ₂	21.22±0.08
NiAH	18.41±0.03
Ni ₂ A ₂	28.45±0.04

Tableau XI : Données spectroscopiques et potentiométriques du Ni(II) avec Cys Ala Ala Cys.

Macroconstantes du ligand Cys Ala Ala Cys

pK _I	6.74
pK _{II}	8.74
pK ₁	2.89
pK ₂	7.02
pK ₃	8.89
pK ₄	9.78



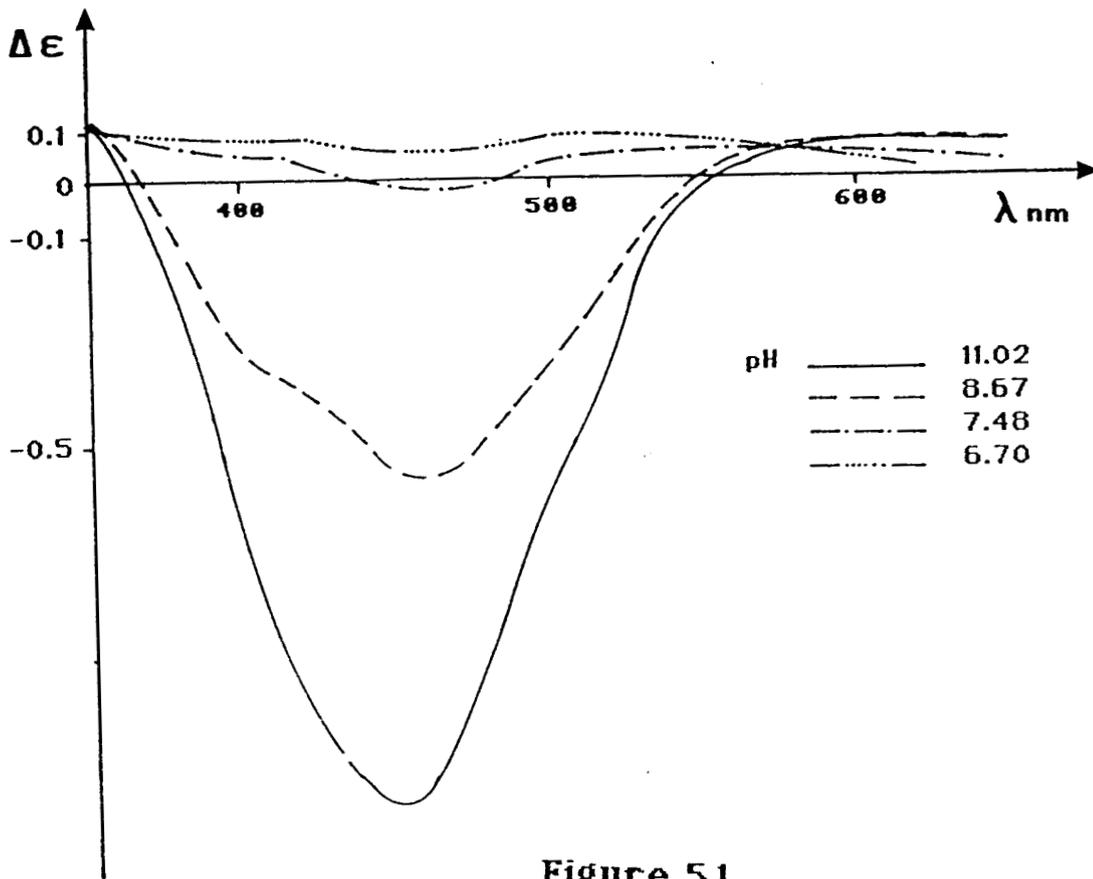


Figure 51
Spectre dichroïque visible de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 1

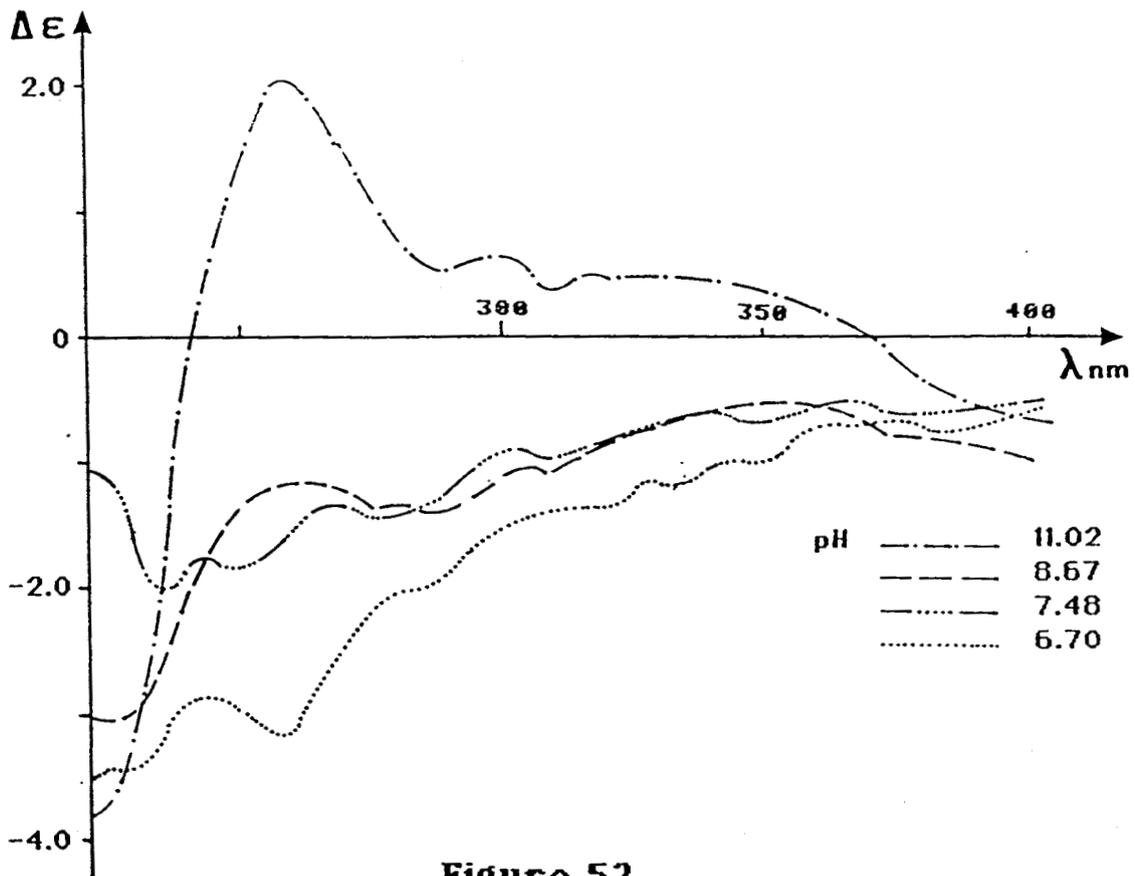


Figure 52
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 1

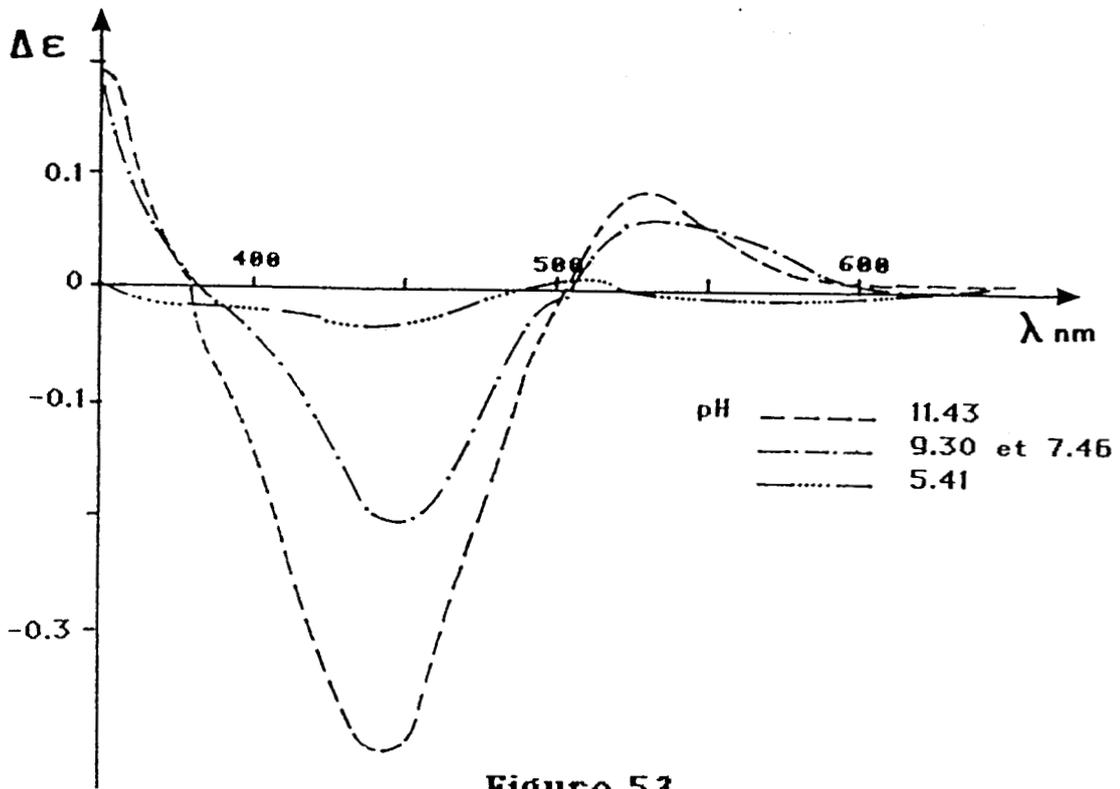


Figure 53

Spectre dichroïque visible de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 2

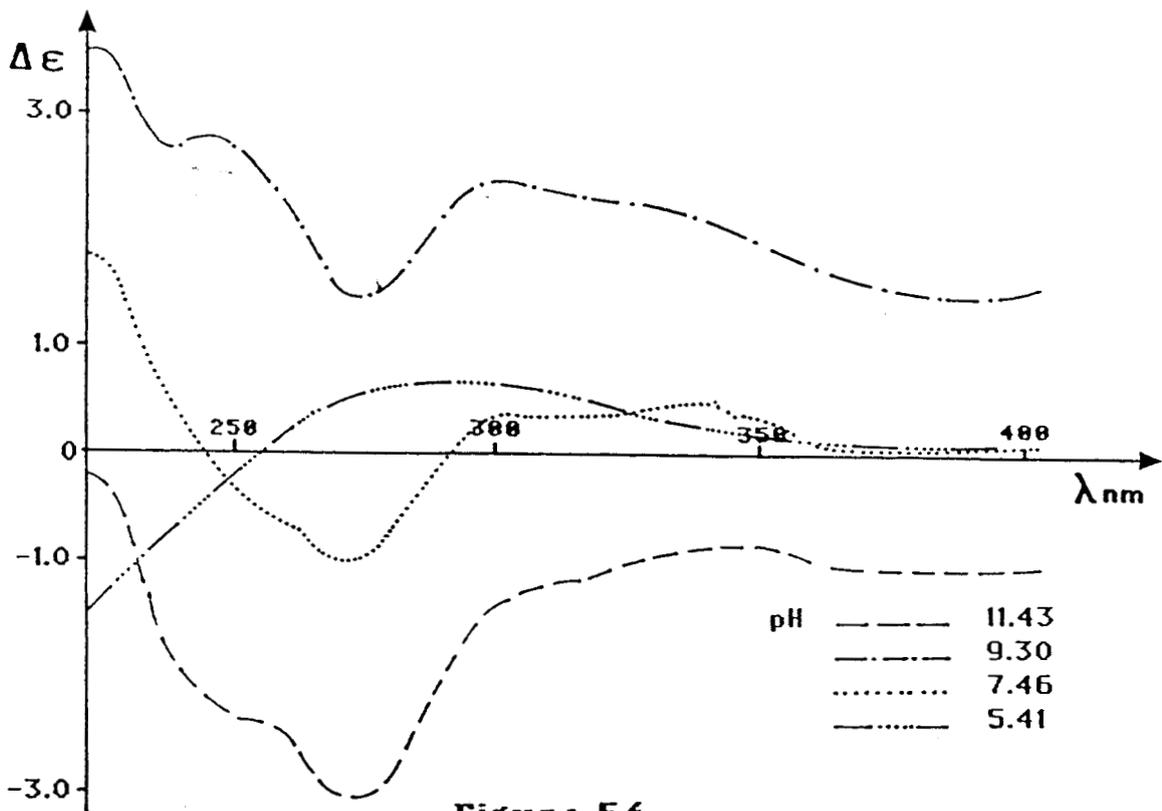


Figure 54

Spectre dichroïque U.V. de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 2

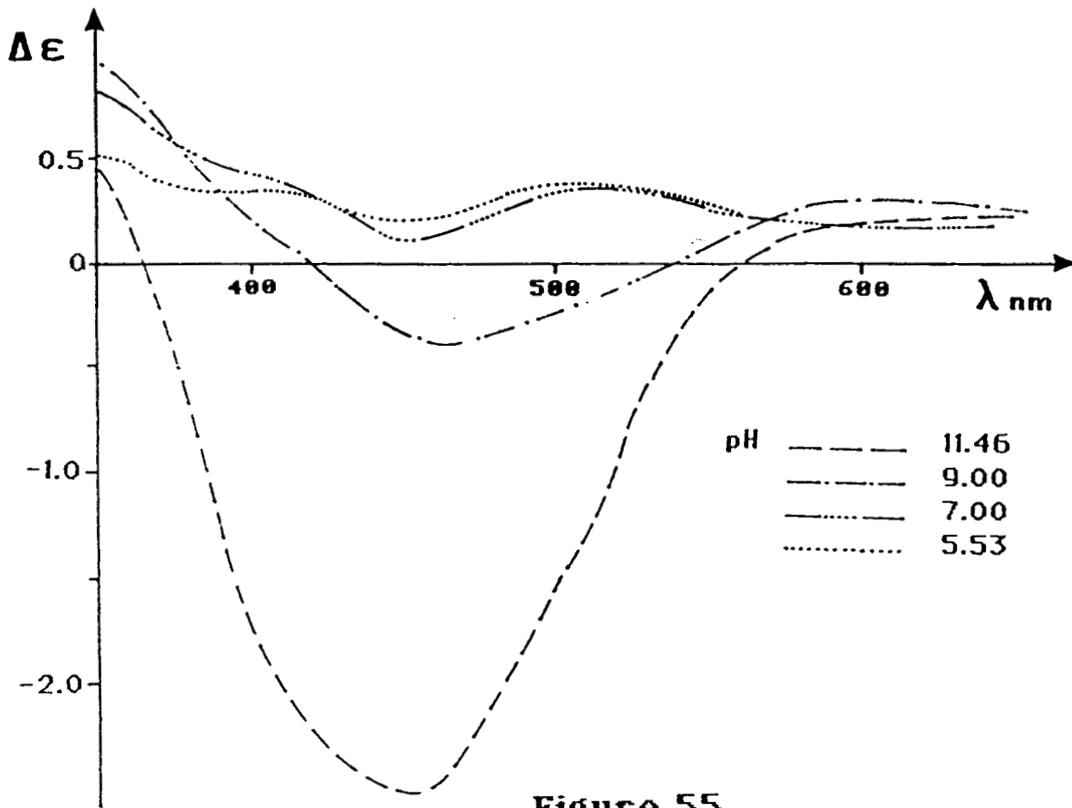


Figure 55

Spectre dichroïque visible de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 4

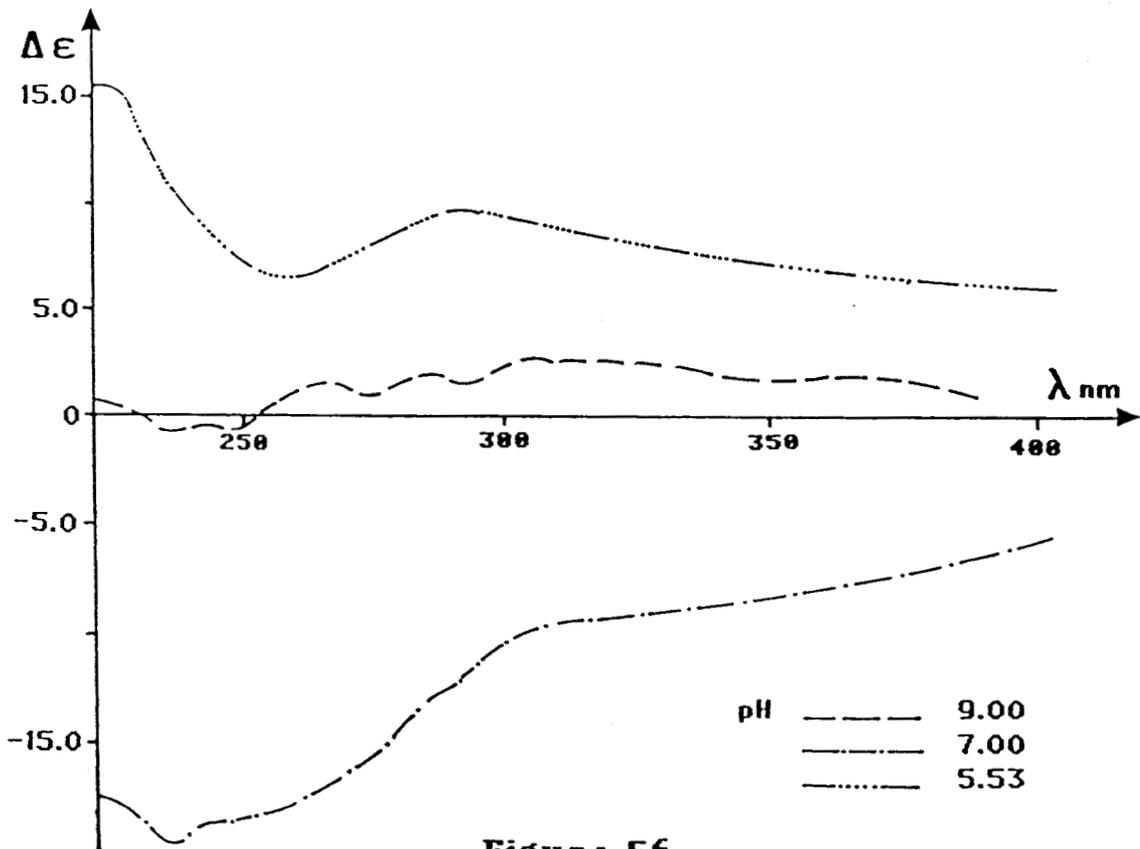


Figure 56

Spectre dichroïque U.V. de CysAlaAlaCys avec Ni(II) rapport 4

Figure 57
Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 1

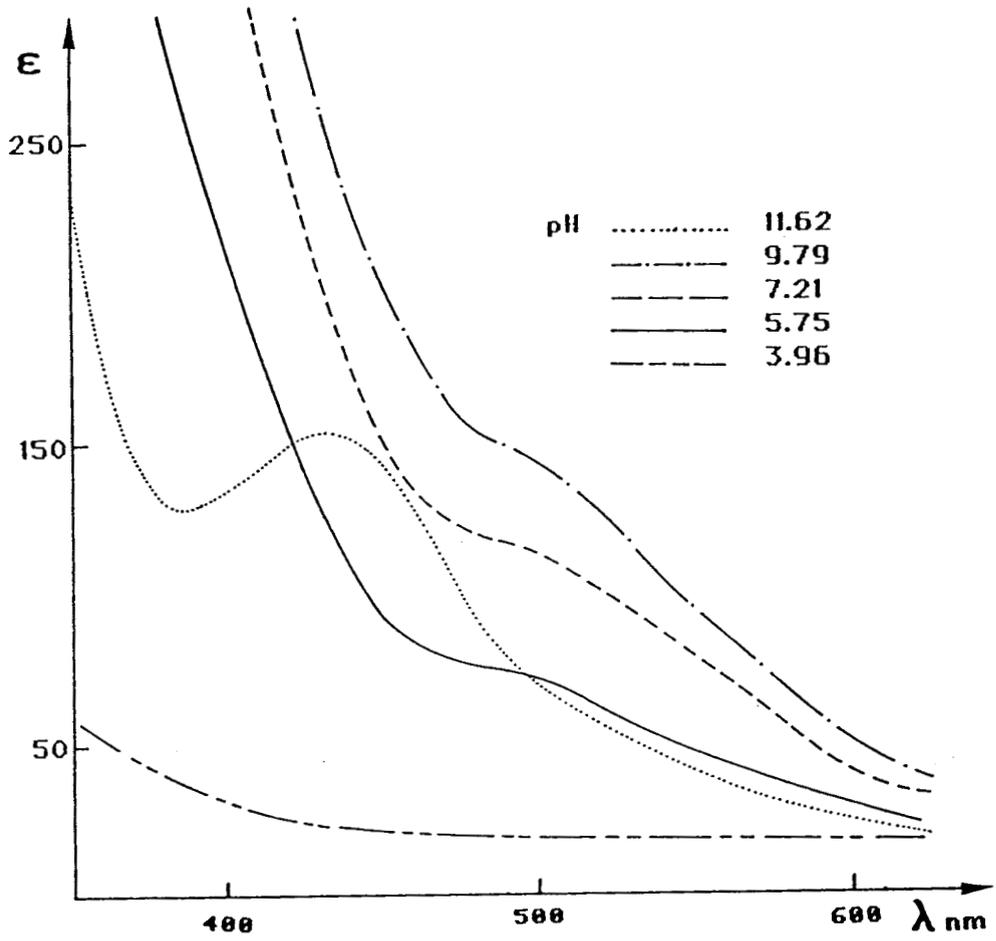


Figure 58

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 1

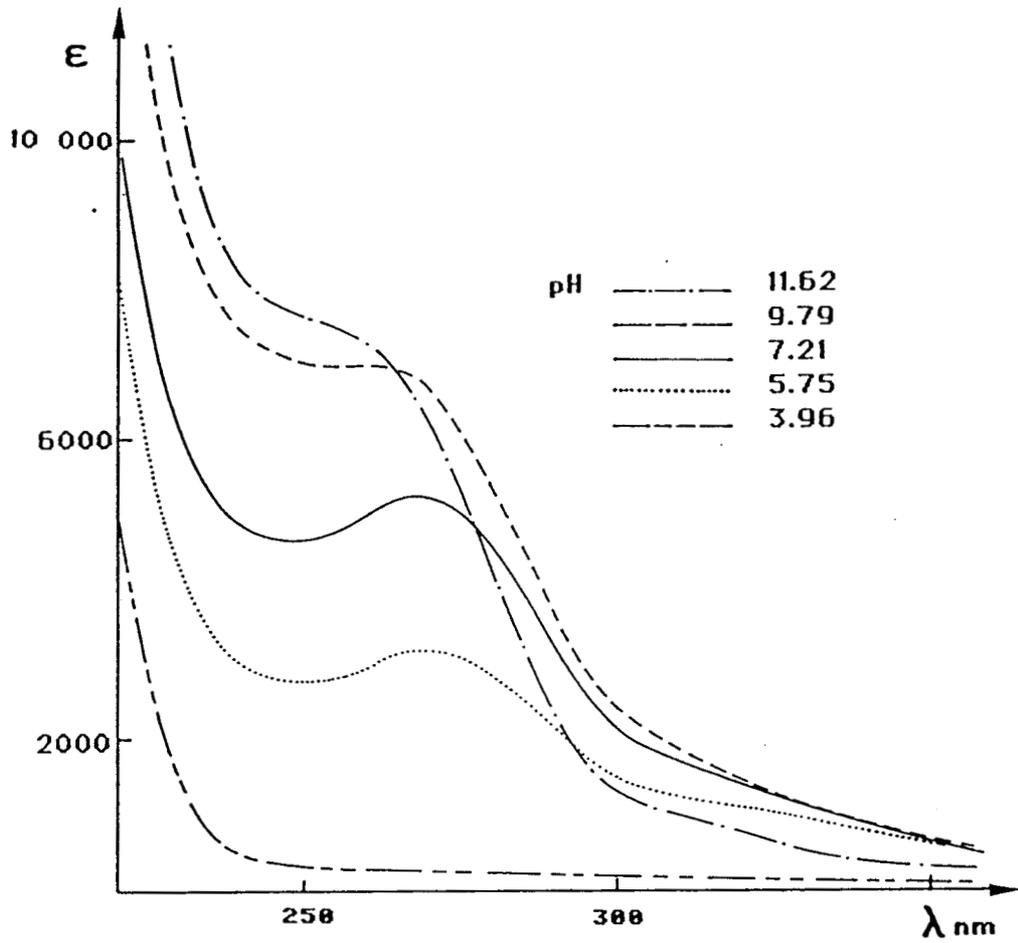


Figure 59

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 2

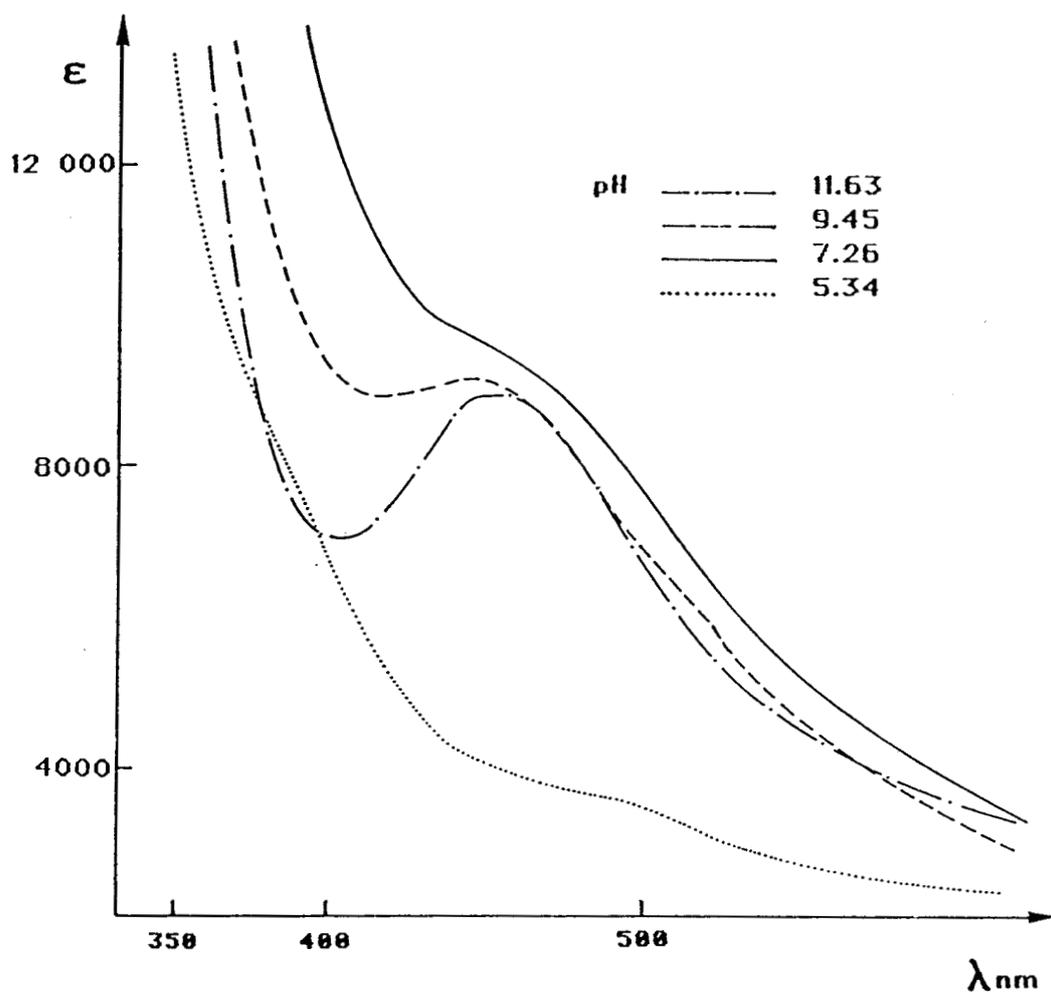


Figure 60

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 2

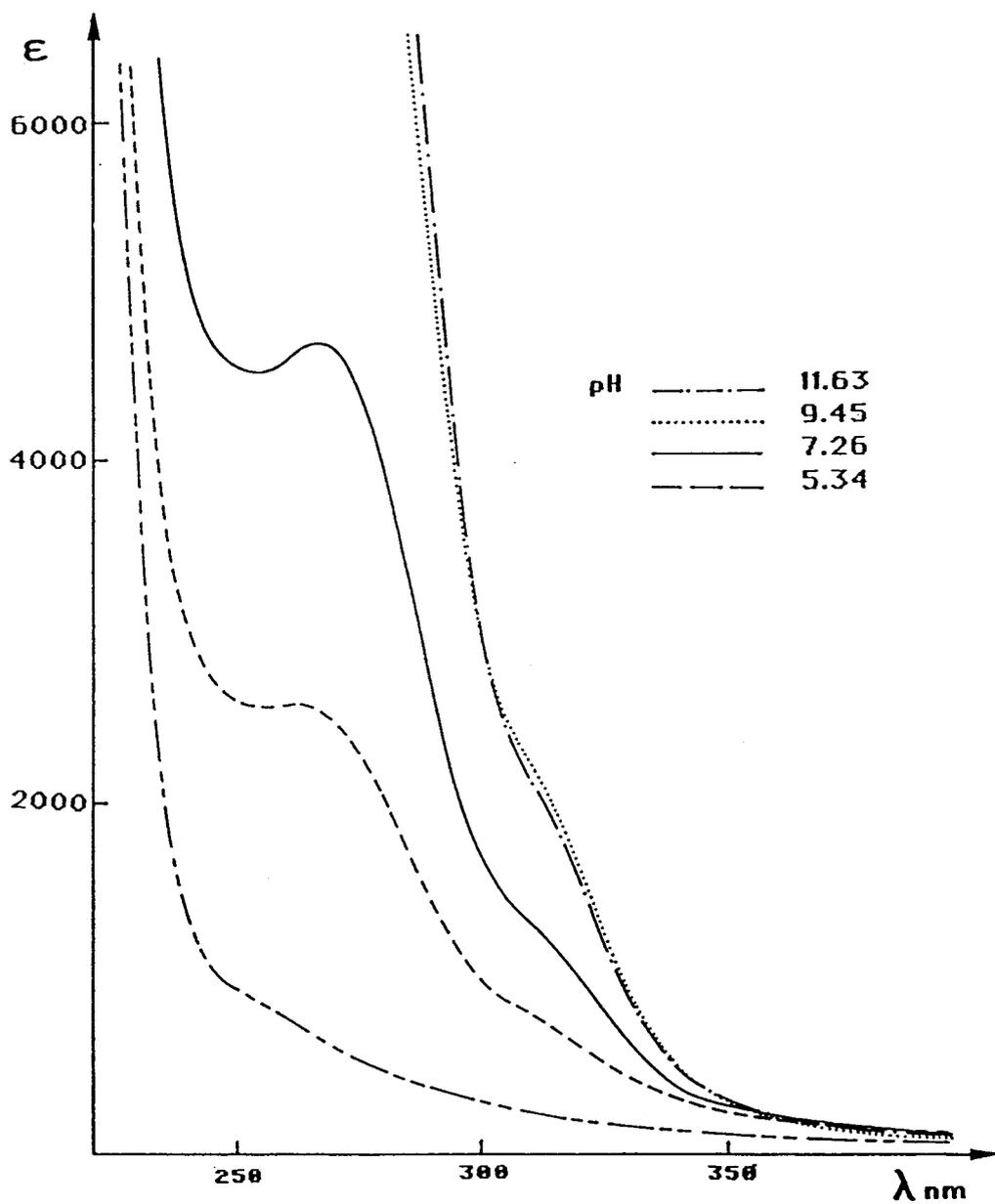


Figure 61

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 4

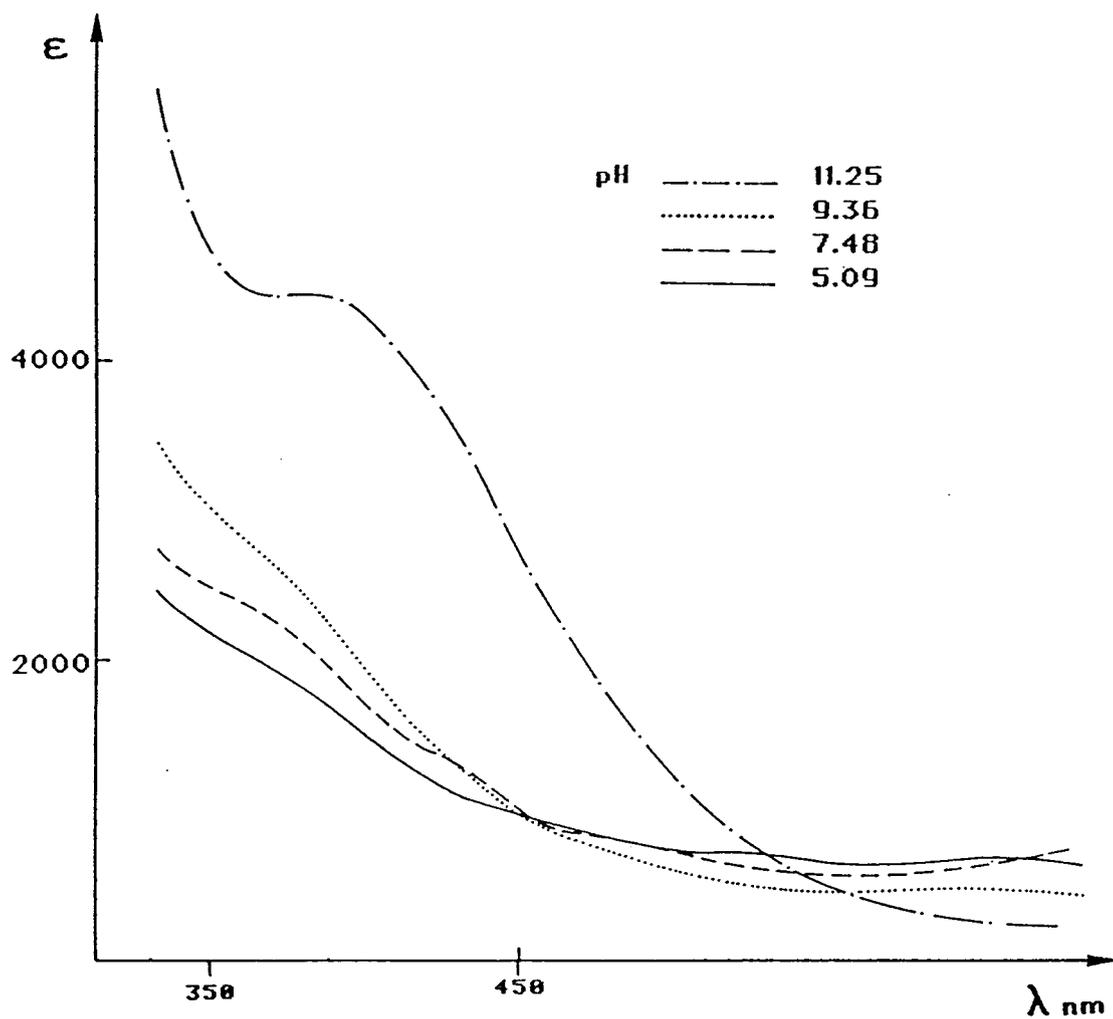
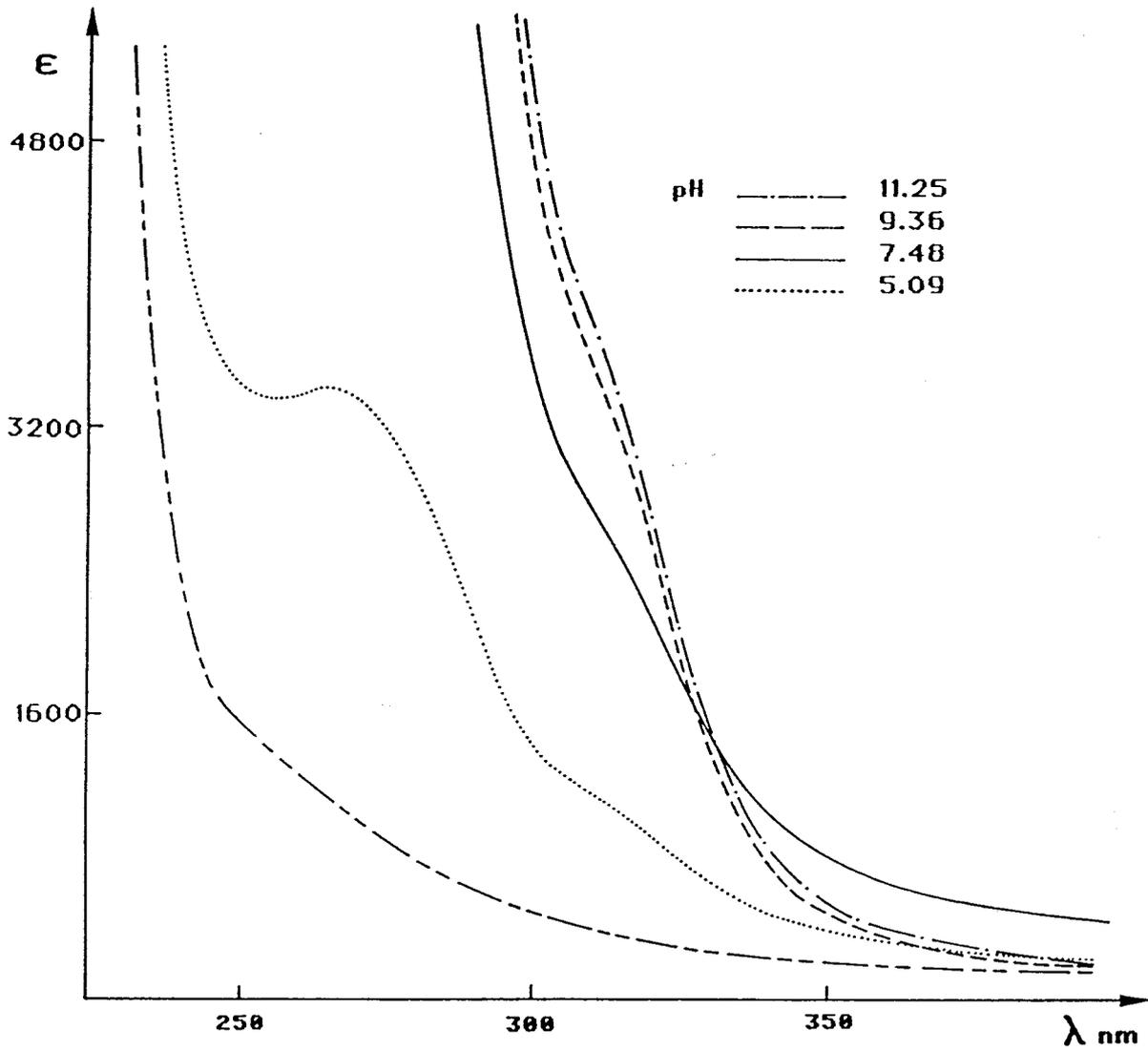


Figure 62

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Ni(II) rapport 4



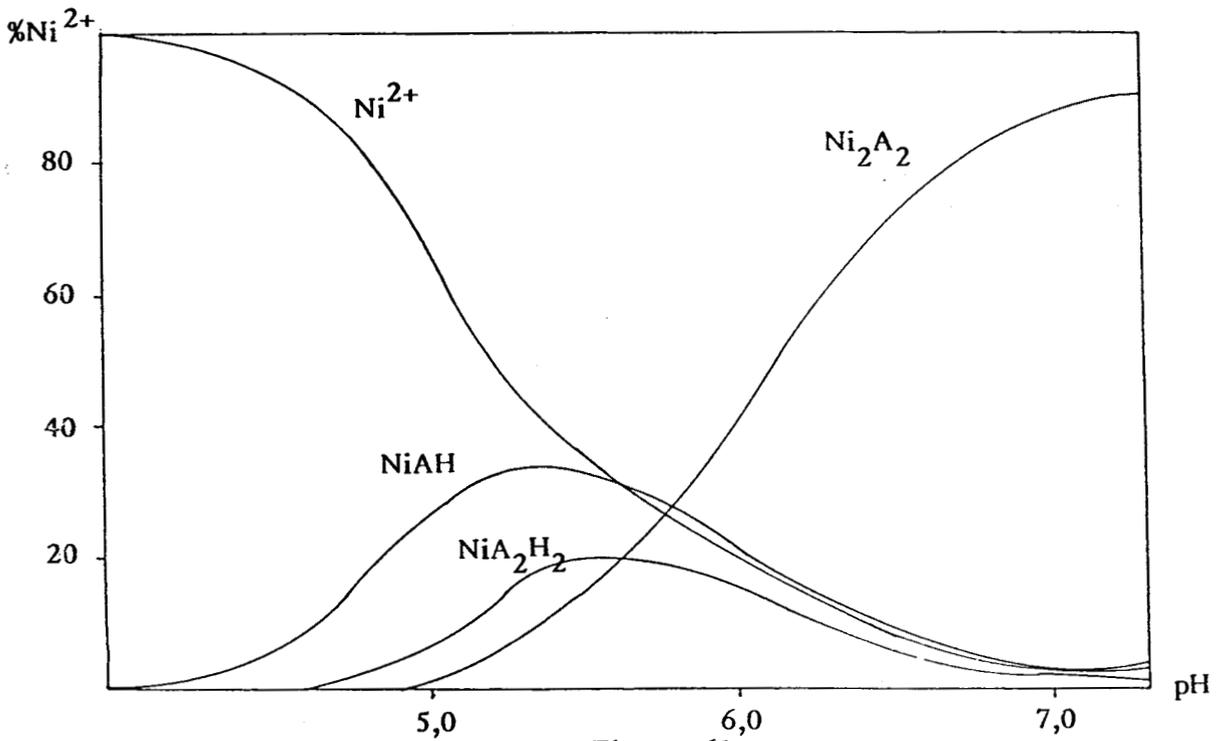


Figure 63
Courbes de répartition des espèces
Cys-Ala-Ala-Cys : Ni(II) Rapport 1

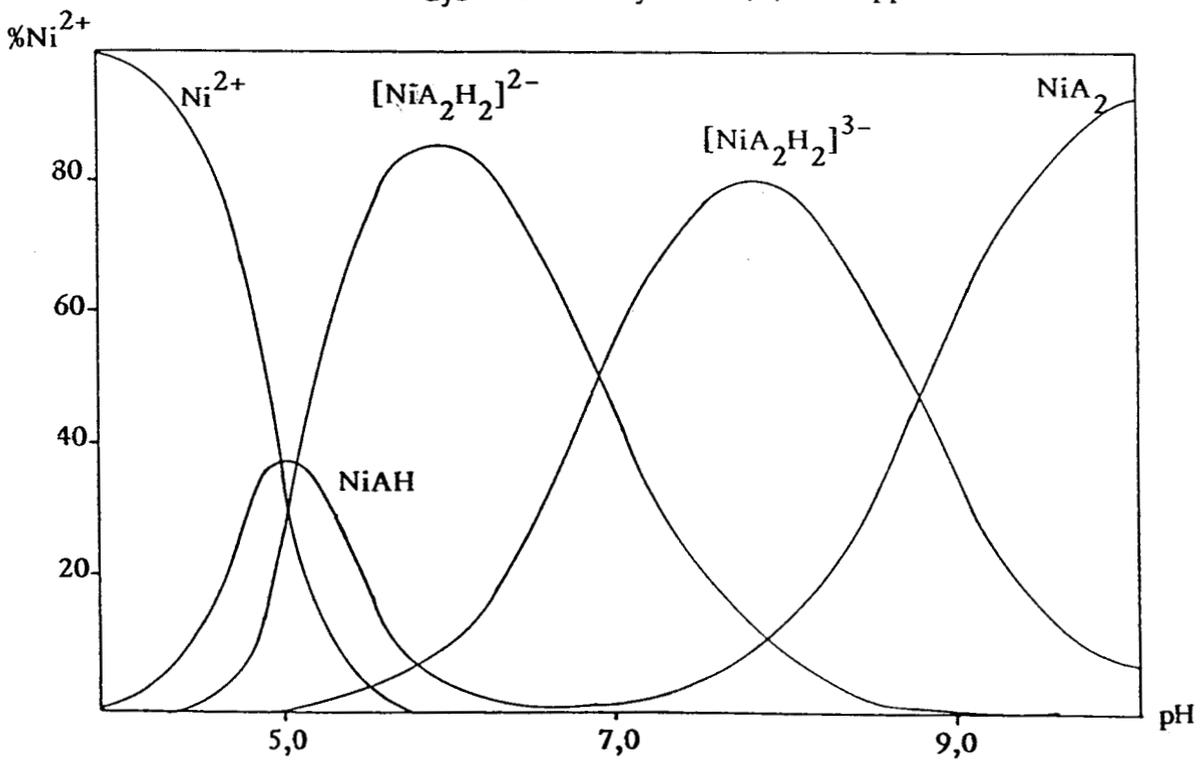


Figure 64
Courbes de répartition des espèces
Cys-Ala-Ala-Cys : Ni(II) Rapport 3

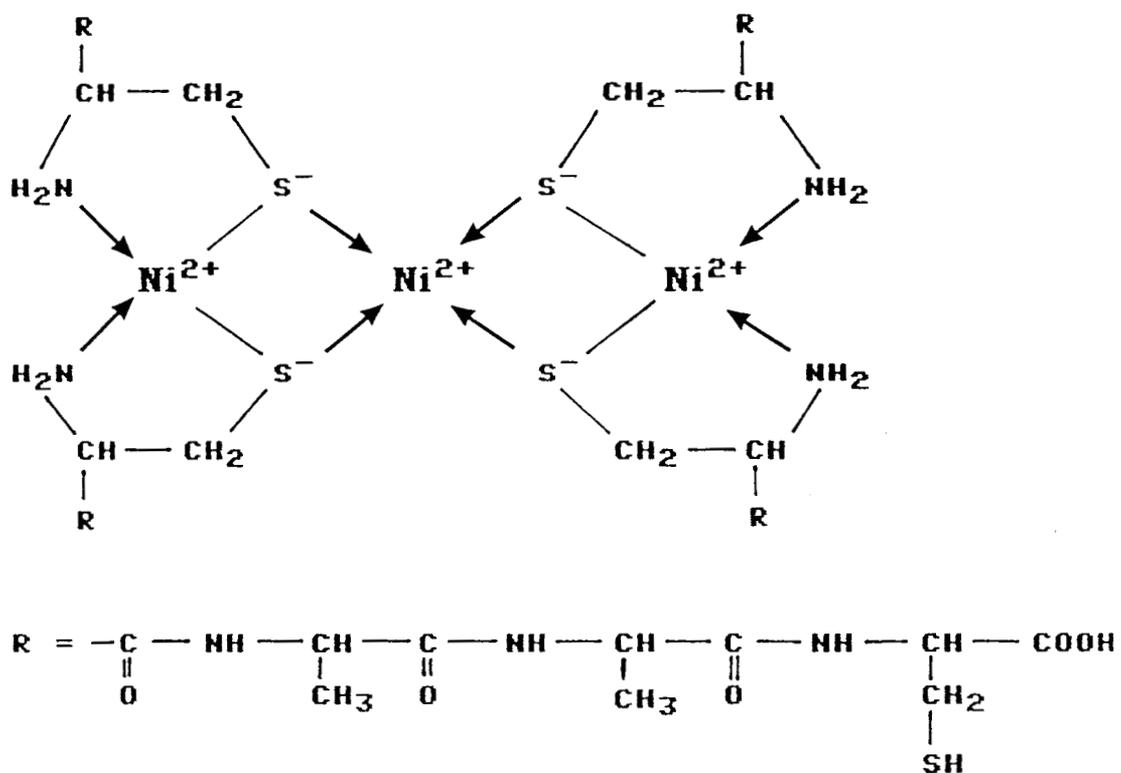


Figure 65
Structure du complexe Ni₃A₄

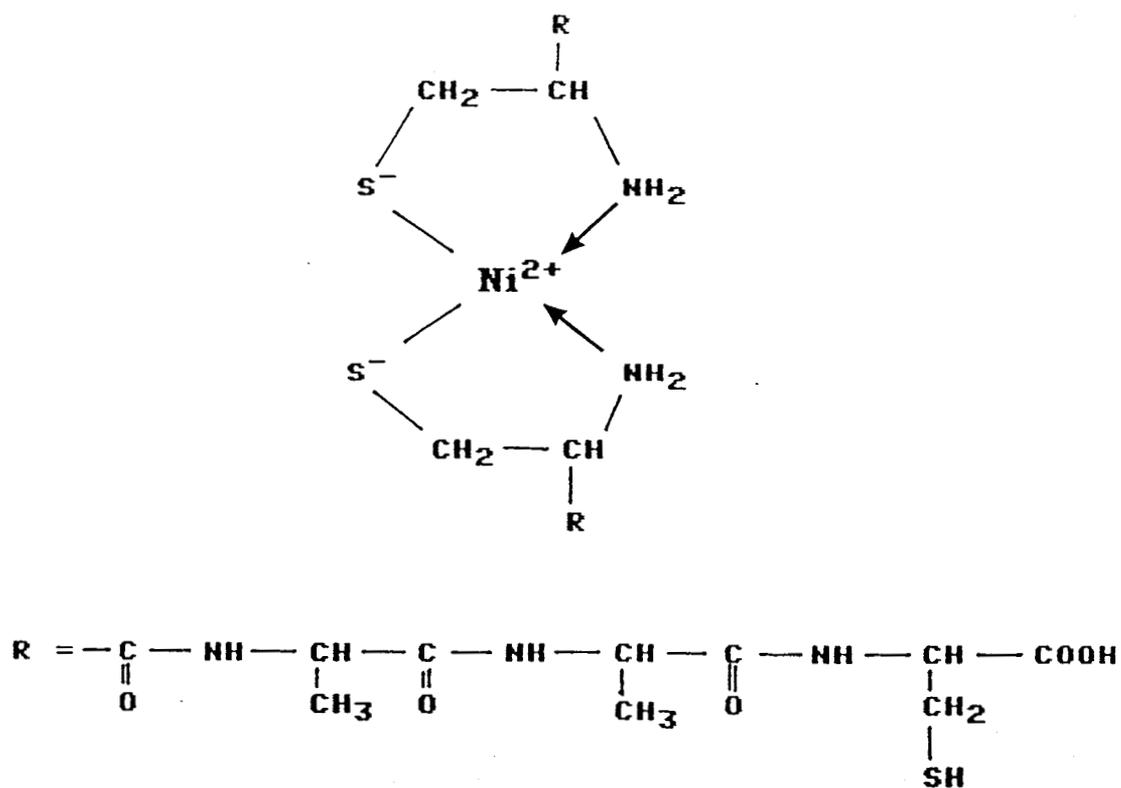


Figure 66
Structure du complexe NiA₂

E/ CYS-ALA-CYS

L'étude spectroscopique des complexes du Ni (II) avec Cys-Ala-Cys est difficile à effectuer, les équilibres étant très lents à se réaliser.

Pour des pH inférieurs à 7.5 les spectres dichroïques sont très proches de ce qui a été précédemment décrit pour Cys-Ala-Ala-Cys. Mais à haut pH les résultats sont différents, on note en effet entre pH 7.5 et 11.72 un déplacement des transitions d-d vers des énergies plus élevées qui suggère un passage du complexe NiA_2 (Fig 83), où deux cystéines N-terminales interviennent dans la coordination, vers la formation du complexe $NiAH_2$ (fig 82) pour lequel la complexation se fait par l'extrémité NH_2 terminale, les deux fonctions amides déprotonées et le soufre C terminal. Ce dernier complexe est surtout formé pour un rapport de 1 et est semblable à celui observé pour Ala-Ala-Cys (fig 67 et 70).

La présence d'une bande de transfert de charge à 380 nm et pH 7.49 laisse suggérer la formation d'une structure trimérique comme cela a pu être décrit pour Cys-Ala-Ala-Cys. Cette transition disparaît à haut pH.

Les spectres d'absorption à haut pH et à fort rapport ligand métal montre une bande d-d à 430 nm qui conforme la présence de l'espèce $NiAH_2$ et deux bandes de transfert de charge à 306 et 260 nm dues aux deux types de complexation du soufre (fig 82, 74, 76, 78).

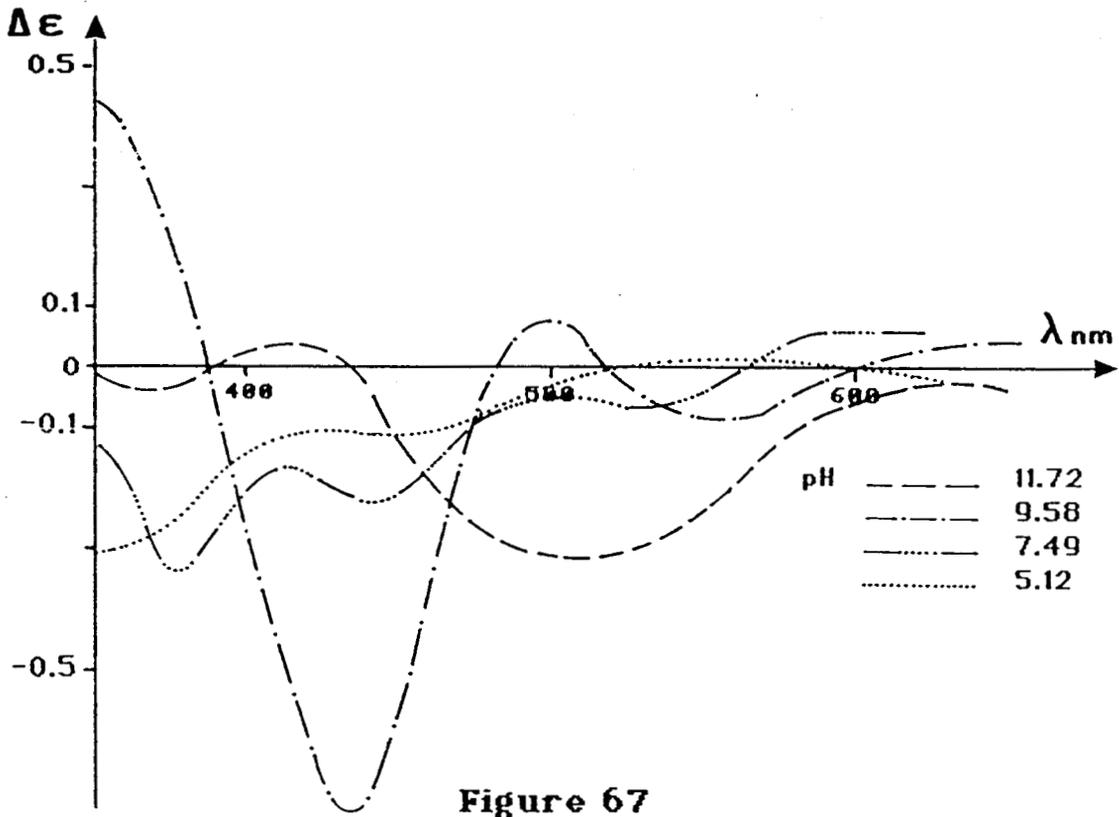
Les études potentiométriques se heurtent à la présence d'ions acétates en solution (24). Ils résultent de la coupure du groupement protecteur BOC. Ceux-ci forment des complexes avec le Ni (II). La présence de ces traces d'acétate, n'influe donc pas sur les constantes de formation des complexes peptides nickel mais empêche une détermination précise des constantes de protonation du carboxyle du ligand peptidique à moins que la concentration en acétate ne soit exactement connue. De plus, dans le peptide, le carboxyle est normalement ionisé à pH 3.5 or la complexation a lieu à pH 4.5. La protonation du COO^- , n'altère donc pas d'une façon significative le calcul des constantes de formation des complexes.

La potentiométrie montre qu'en rapport 2 et à pH 9 l'espèce à 3N est minoritaire, au profit du complexe à deux ligands alors que le phénomène inverse est observé en rapport 1 au dichroïsme (fig 79 et 80). A pH 9, en

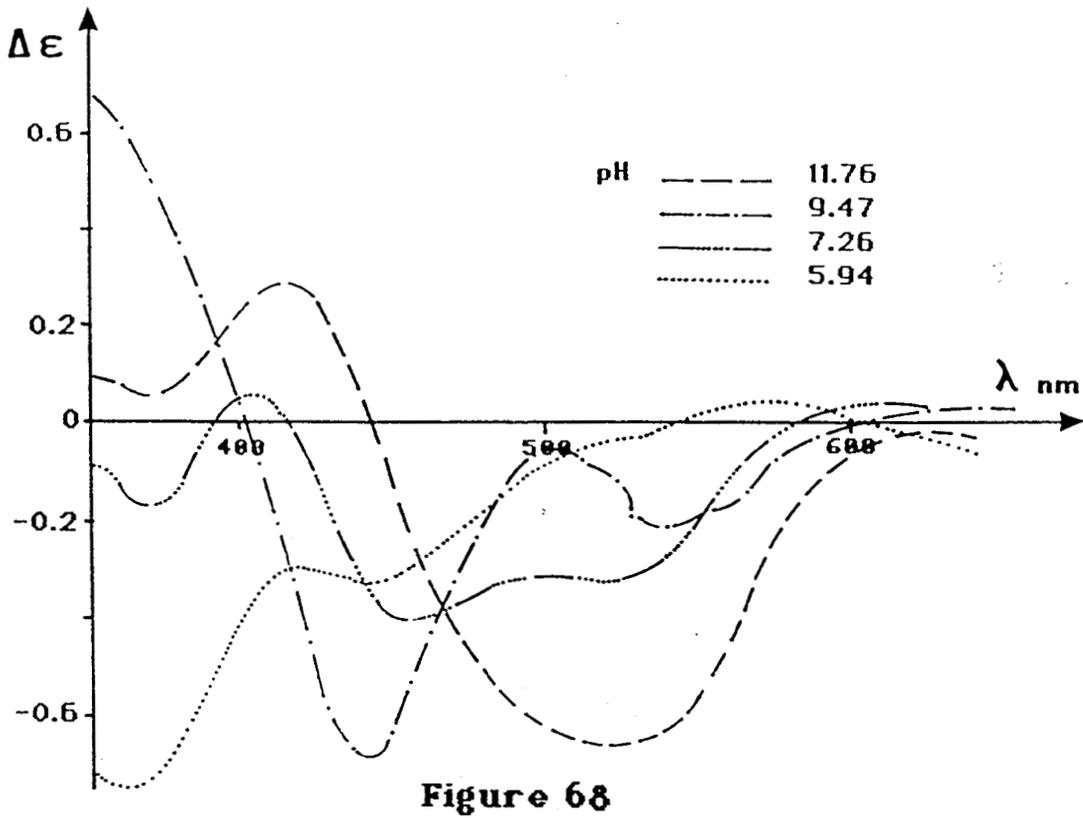
rapport 2 ces espèces sont encore protonés sur la cystéine qui n'intervient pas dans la complexation. La potentiométrie n'a pas permis de différencier les deux espèces Ni_3A_4 et NiA_2 puisque celles-ci ne présentent pas de différence dans leur déprotonation (fig 80).

Finalement les espèces les plus significatives diffèrent peu de ce qui a été observé pour les autres peptides : Ni_3A_4 , NiA_2 (rencontrées avec Cys, Cys-Gly et Cys-Ala-Ala-Cys) et $NiAH_2$ (rencontrée avec Gly-Gly-Cys et Ala-Ala-Cys).

Pour Cys-Ala-Cys, comme pour Cys-Ala-Ala-Cys les études RMN ont été contrariées par l'apparition d'un léger précipité dû à la faible solubilité des peptides (fig 84 et 88).



Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Ni(II) rapport 1



Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Ni(II) rapport 2

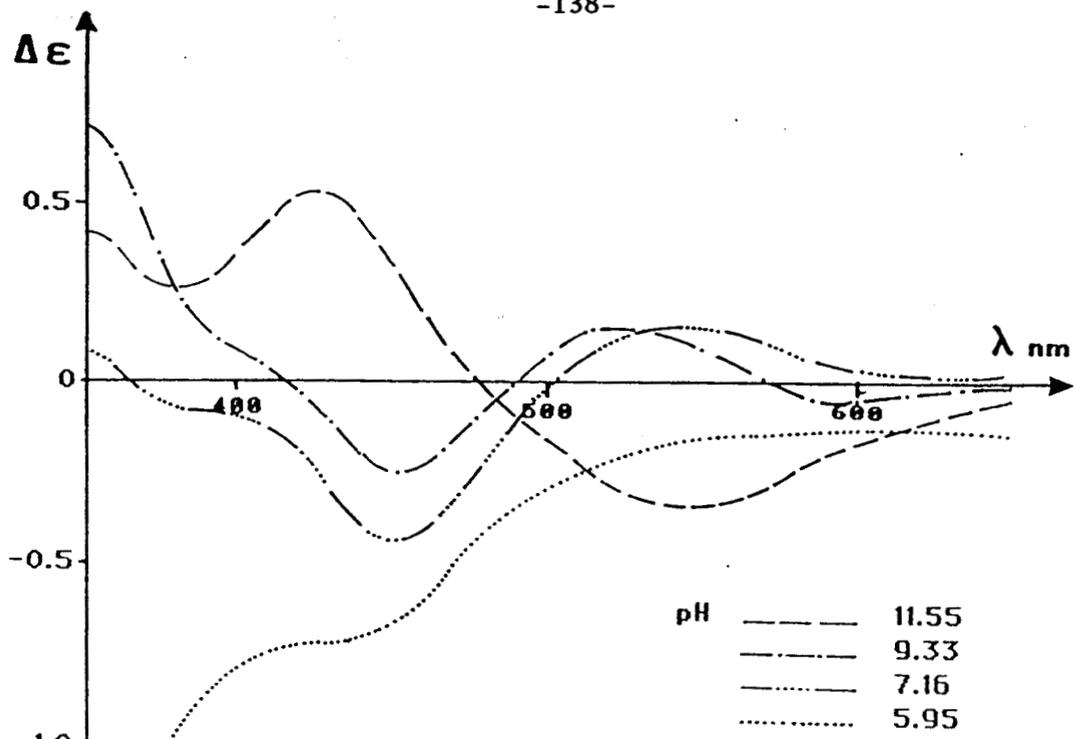


Figure 69
Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Ni(II) rapport 4

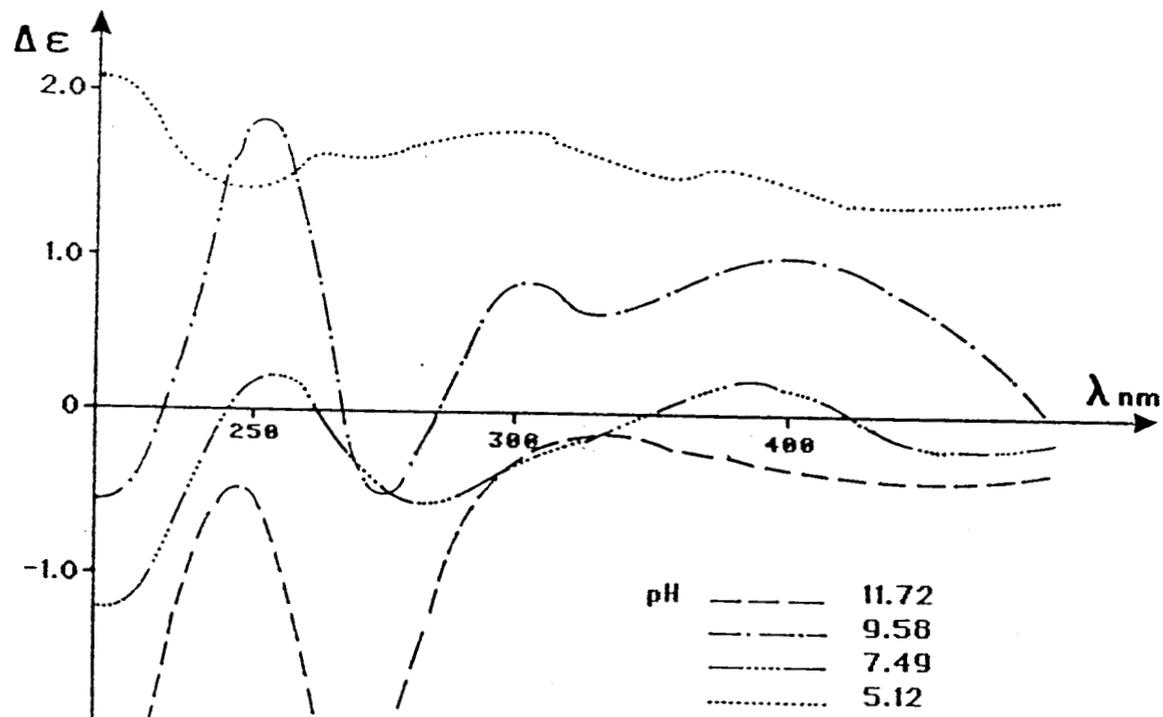


Figure 70
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaCys : Ni(II) rapport 1

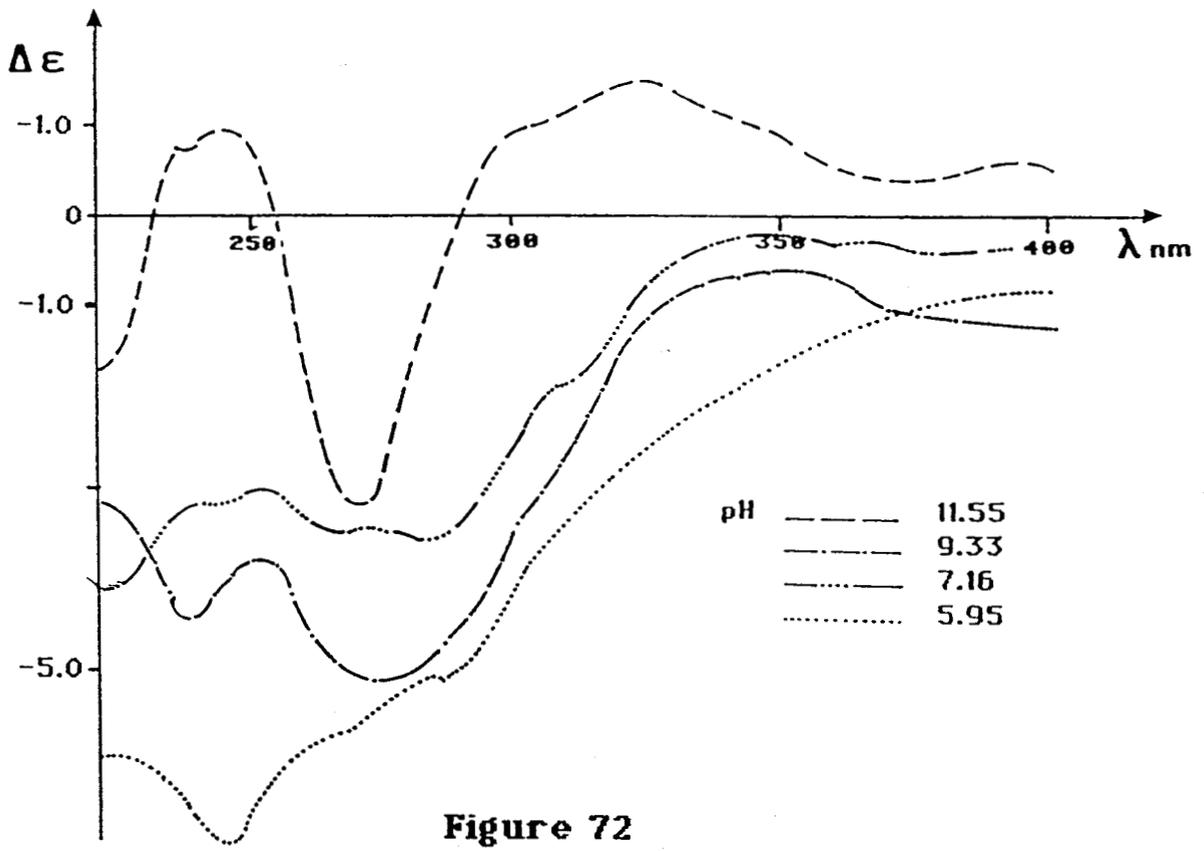
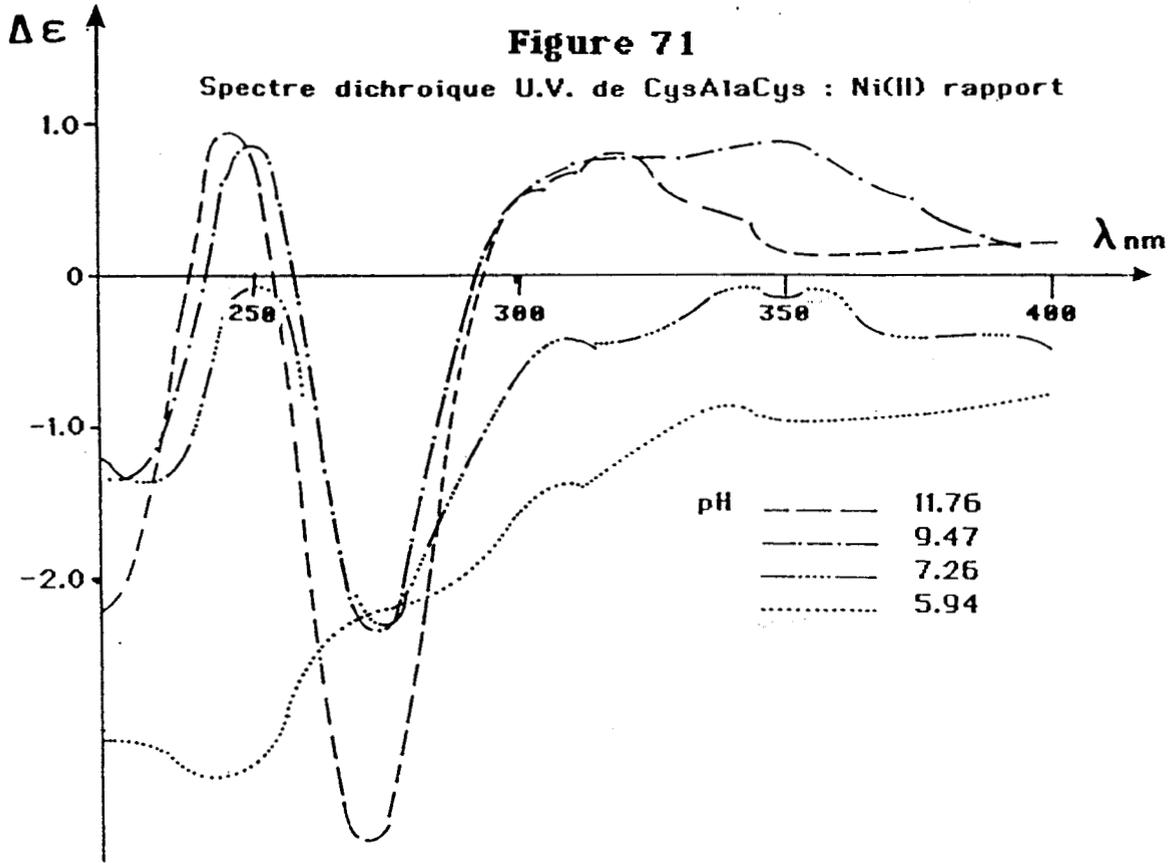


Figure 72
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaCys : Ni(II) rapport 4

Figure 73

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 1

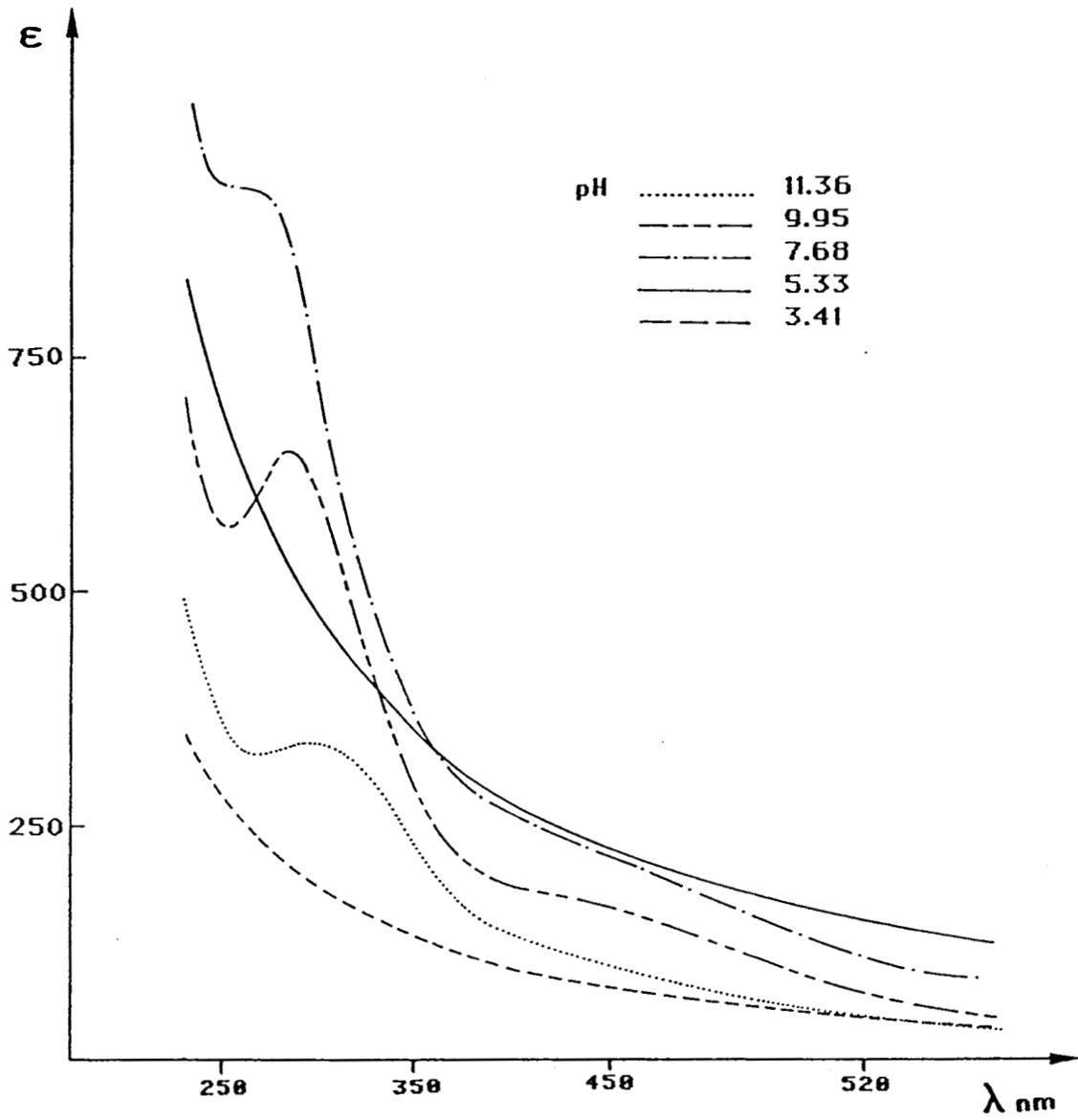


Figure 74

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 1

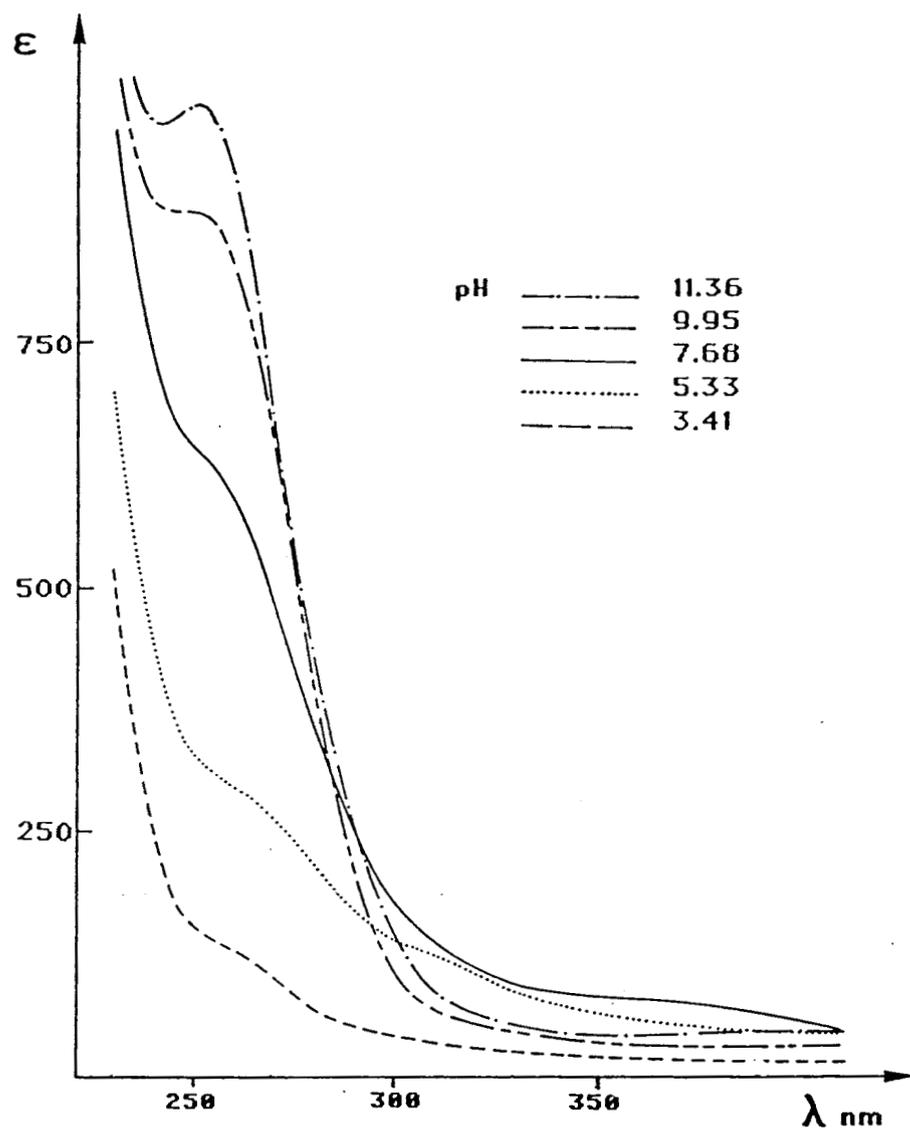


Figure 75

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 2

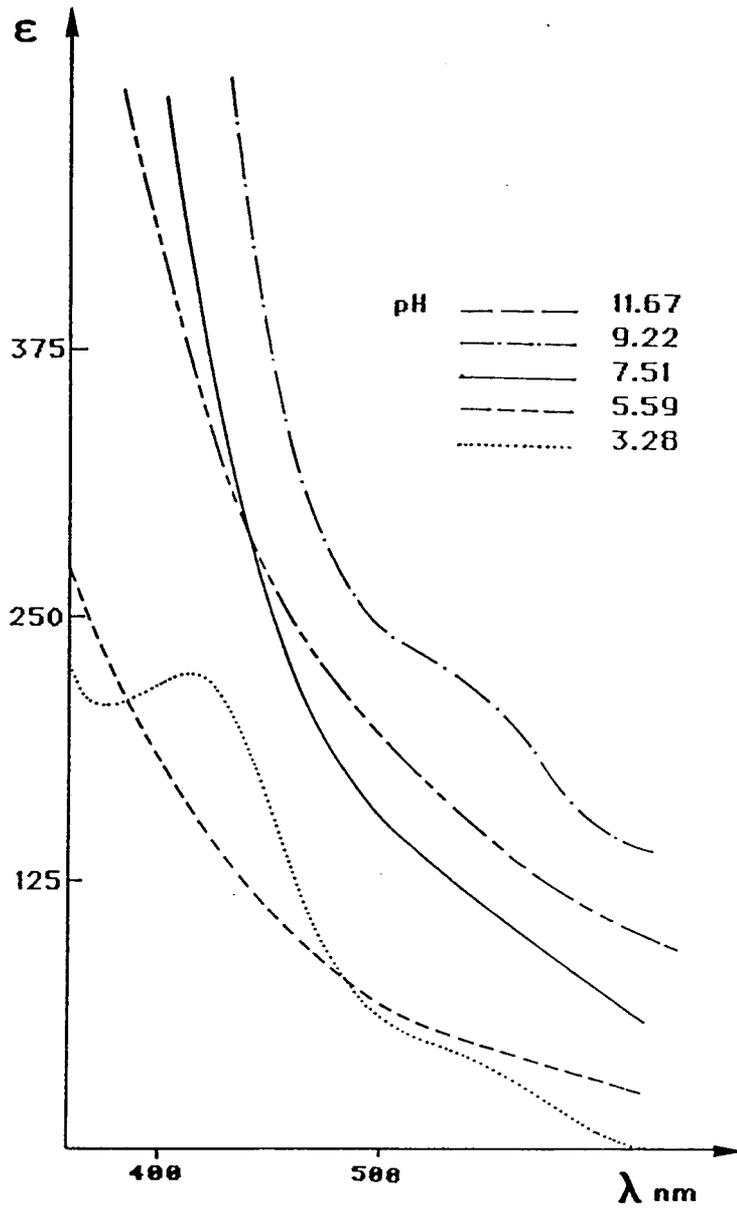


Figure 76

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 2

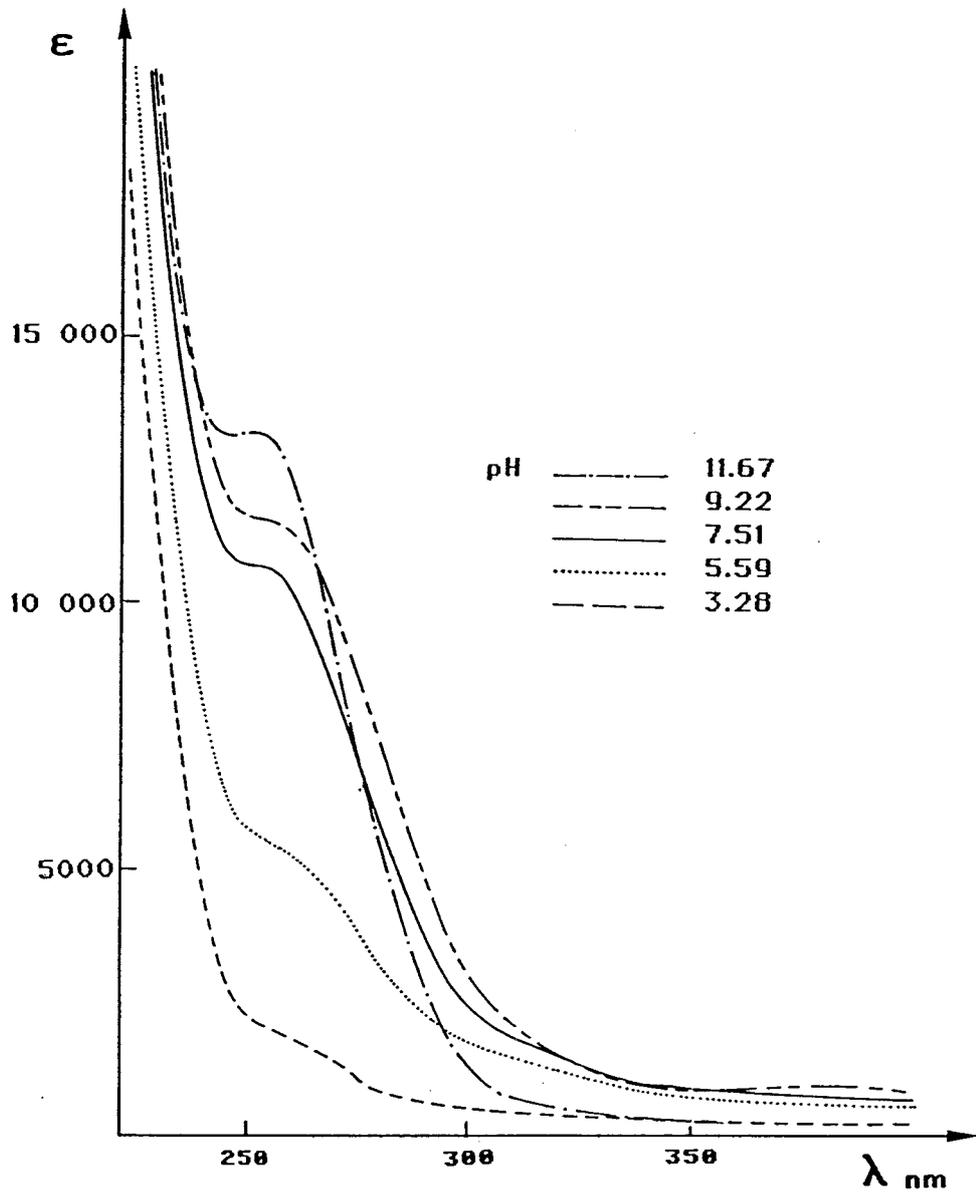


Figure 77

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 4

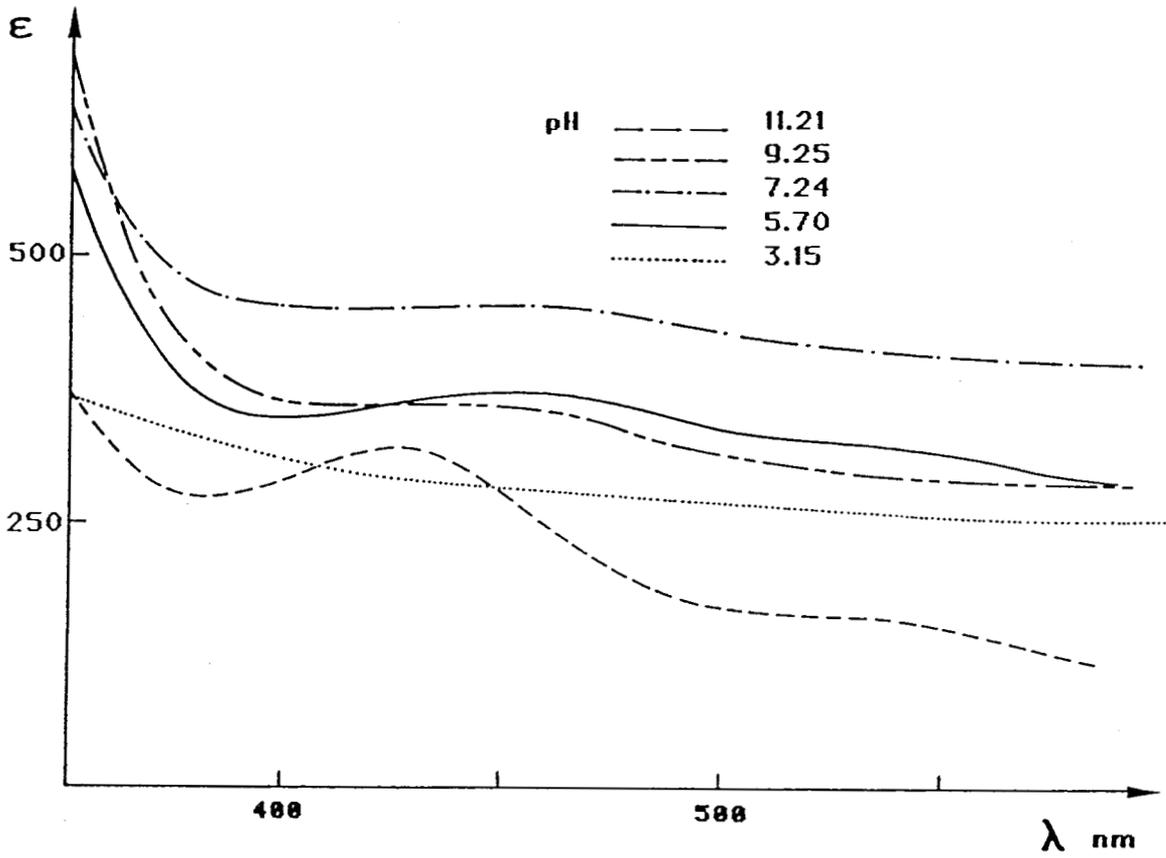
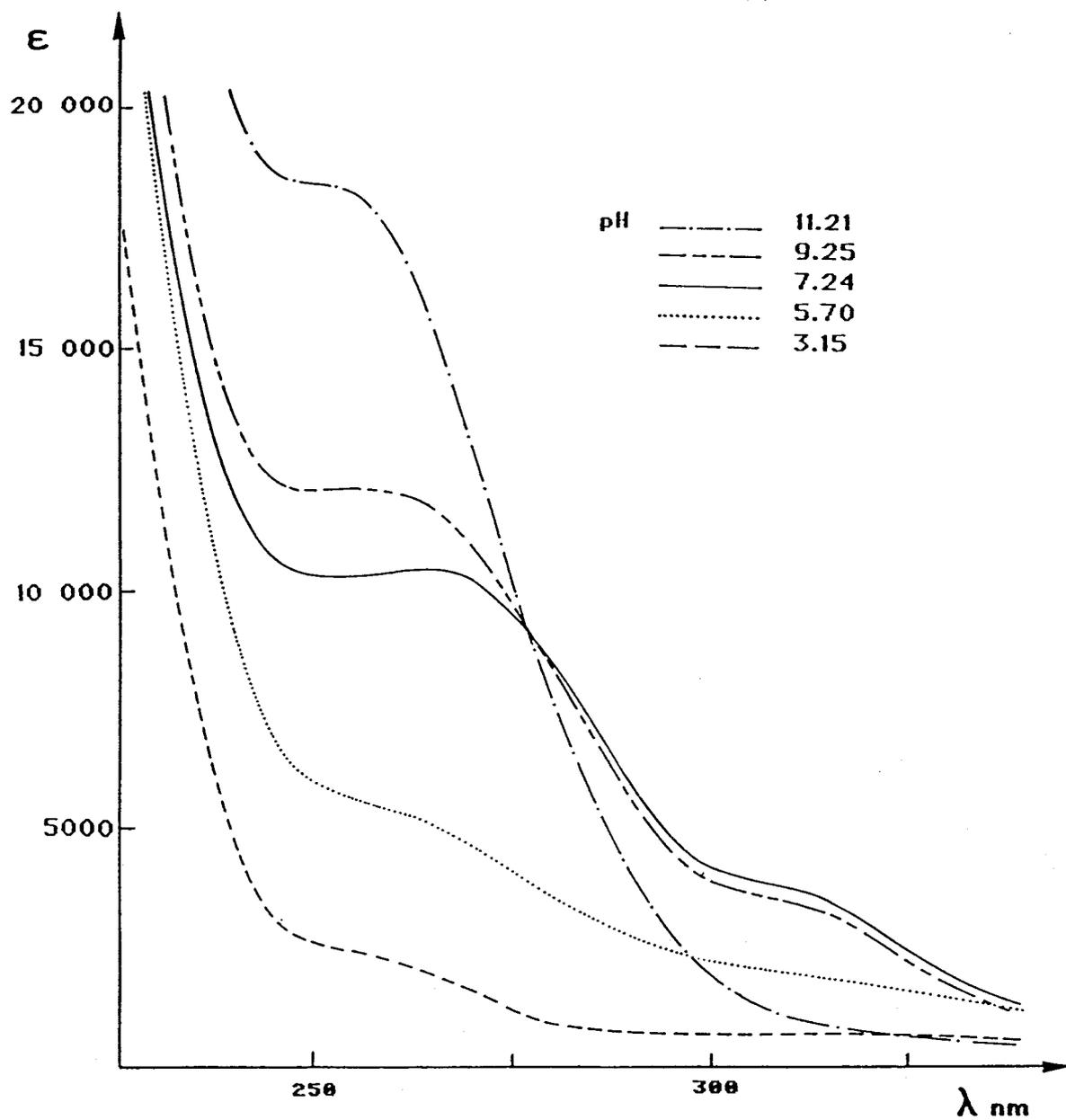


Figure 78

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Ni(II) rapport 4



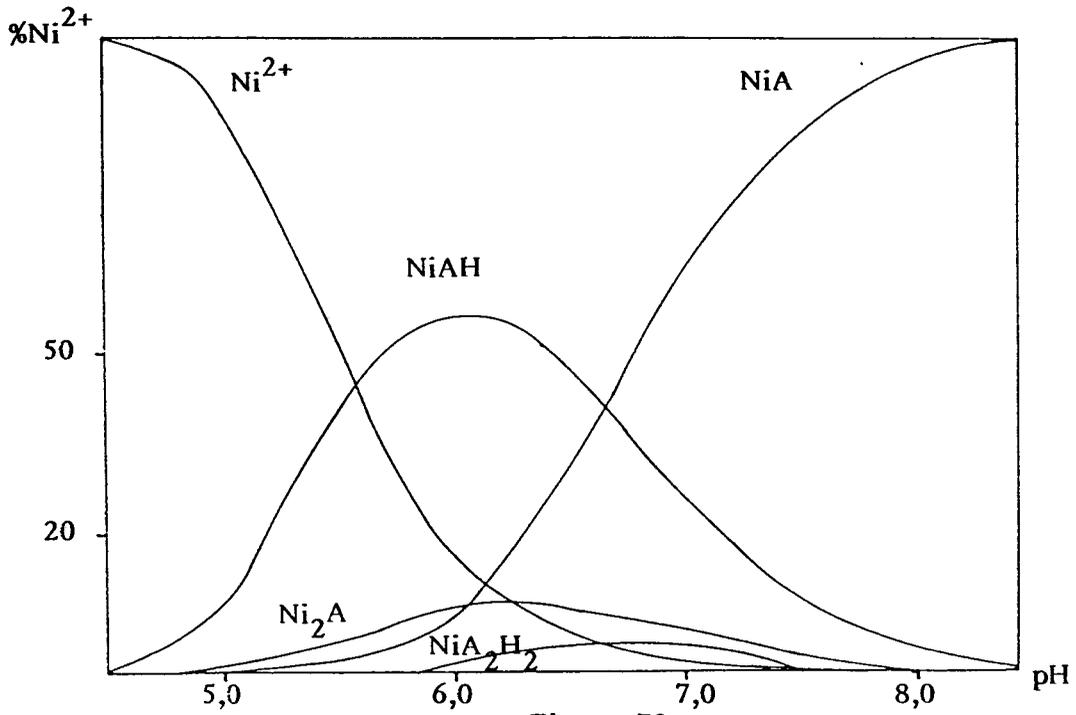


Figure 79
Courbes de répartition des espèces
Cys-Ala-Cys : Ni(II) Rapport 1

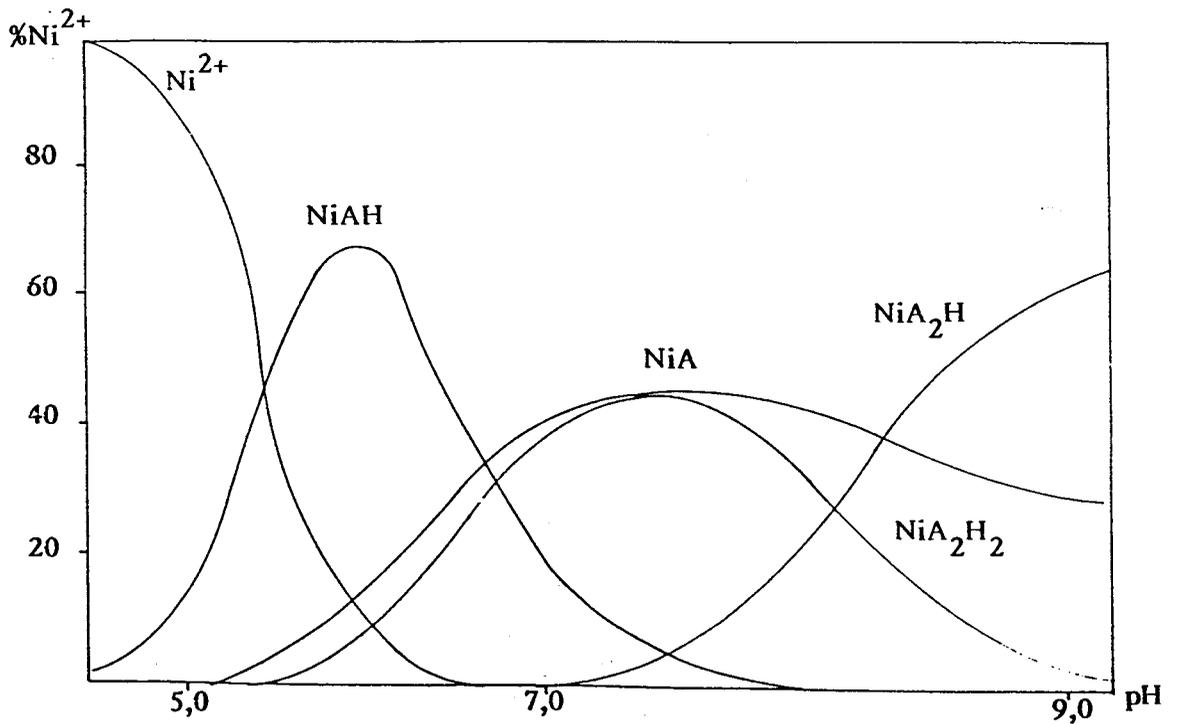


Figure 80
Courbes de répartition des espèces
Cys-Ala-Cys : Ni(II) Rapport 2

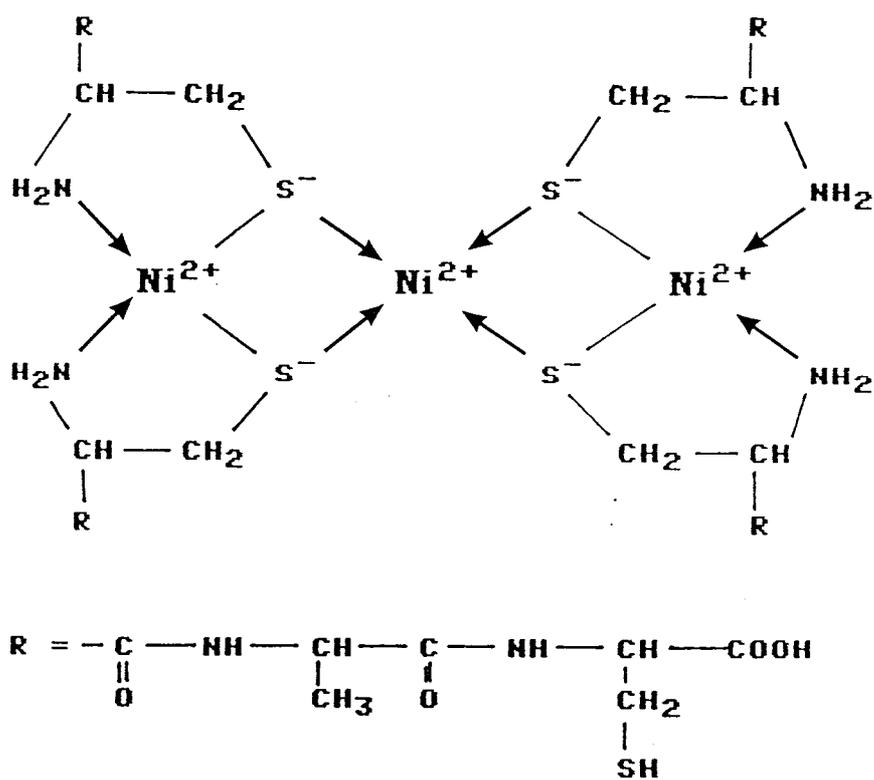


Figure 81
Structure du complexe Ni₃A₄

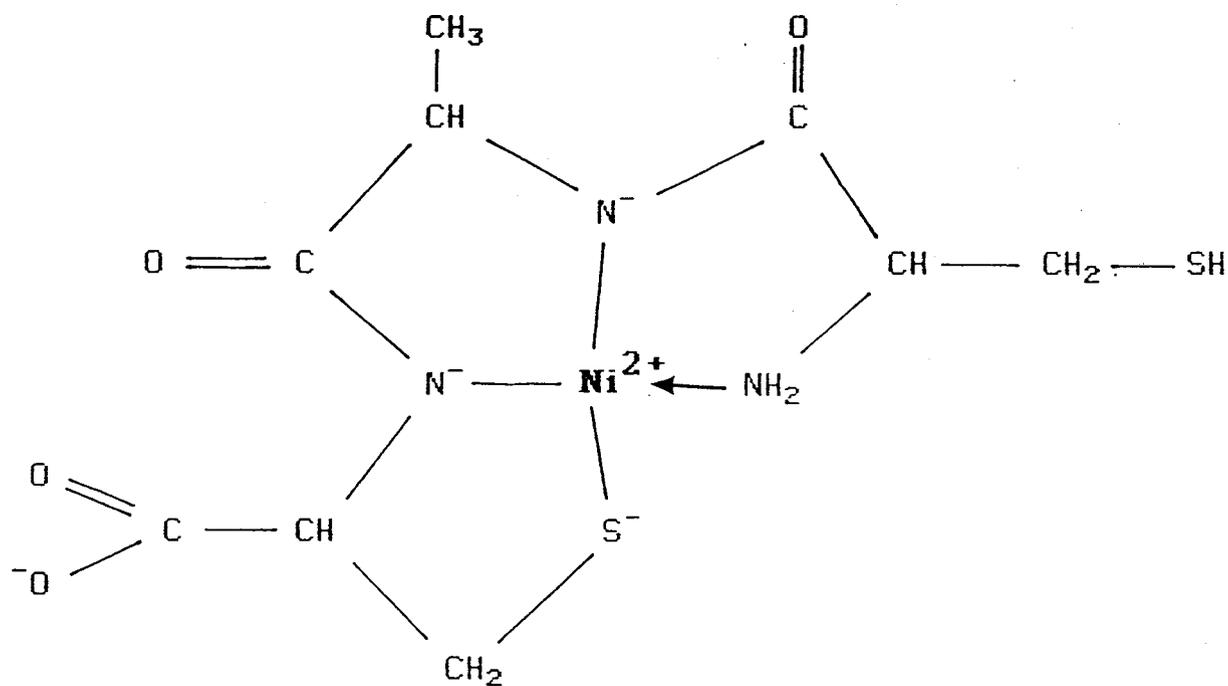


Figure 82
Structure du complexe NiAH_2

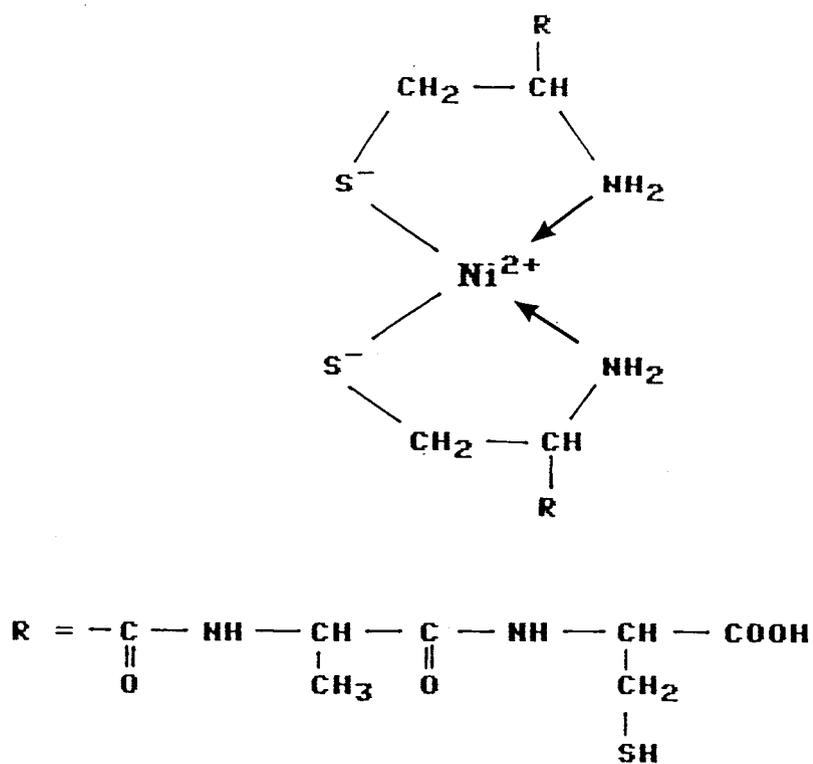


Figure 83
Structure du complexe NiA_2

Données spectroscopiques et potentiométriques

■ Constantes de stabilité et macroconstantes de Cys Ala Cys libre.

	log (β)		pK
HA	11.12±0.03	pK ₄	11.12
H ₂ A	20.38±0.03	pK ₃	9.26
H ₃ A	27.06±0.03	pK ₂	6.68
H ₄ A	30.32±0.03	pK ₁	3.26

■ Constantes de stabilité des complexes Cys Ala Cys: Ni(II)

Espèces	log (β)
NiA ₂ H ₂	36.44±0.12
NiA ₂ H	27.84±0.16
NiAH	19.16±0.01
NiA	12.51±0.04
Ni ₂ A	15.75±0.05
pK ₁	8.6
pK ₂	6.65

■ Valeur des maxima en dichroïsme circulaire et U.V.-visible pour Cys Ala Cys-Ni(II)

λ	$\Delta\epsilon$	Attribution	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
500	+0.08	A			
430	-0.72	E	430	320	E
350	+1.05	$S_{\pi} \rightarrow Ni$			
306	+0.80	$S_{\pi} \rightarrow Ni$			
250	+1.80	$S_{\sigma} \rightarrow Ni$	260	3666	$S_{\sigma} \rightarrow Ni$

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que la complexation des thiols par le nickel (II) est en accord avec l'hypothèse de SOLOMON sur les bandes de transfert de charge.

Pour les dipeptides Gly-Cys, Ala-Cys et Phe-Cys, l'accroissement de l'encombrement stérique de la chaîne latérale du premier acide aminé ne semble pas jouer un rôle prépondérant sur la nature des complexes formés. Dans les trois cas, l'espèce prédominante, en milieu basique, est du type NiA_2H_{-1} .

Pour le tripeptide Ala-Ala-Cys, l'allongement de la chaîne peptidique met en jeu les fonctions amides déprotonées dans la complexation avec le Ni (II). Dans tous les cas, la fonction thiol est fortement impliquée dans la formation des complexes.

La présence d'une deuxième cystéine N-terminale dans Cys-Ala-Cys et Cys-Ala-Ala-Cys permet de constater la formation d'espèce polynucléaire (Ni_3A_4). Les deux fonctions thiols ne sont jamais impliquées simultanément dans la complexation avec le nickel (II).

Dans le tétrapeptide, la fonction thiol N-terminale est privilégiée dans la complexation par rapport à la fonction thiol C-terminale et conduit au système NiA_2 . Par contre à haut pH, le complexe Cys-Ala-Cys : Ni est observé sous la forme d'une espèce à 3N, déjà rencontrée avec Ala-Ala-Cys, et qui met en jeu la fonction thiol C-terminale.

On remarque pour tous les peptides étudiés qu'à pH 7, un seul type de complexe est présent en forte proportion.

La présence d'une seule espèce à un pH physiologique montre l'importance des interactions peptides cations-métalliques dans les équilibres biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CHAPITRE III

- (1) L. SACCONI
Trans. Metal Chem. 4, 199 (1968)
- (2) R.H. HOLM
J.A.C.S. 82, 5632 (1960)
- (3) R.C. ROSENBERG, C.A. ROOT et H.B. GRAY
J.A.C.S. 97, 21 (1975)
- (4) Y. SUGIURA
Inorg. Chem. 17, 2176 (1978)
- (5) V. LUM et H.B. GRAY
Israël J. of Chem. 21, p 23 (1981)
- (6) E.I. SOLOMON, J.W. HARE, D.M. DOOLAY, J.H. DAWSON, P.J. STEPEHNS
et H.B. GRAY
J.A.C.S. 102, 168 (1980)
- (7) I. SOVAGO et R.B. MARTIN
J. Inorg. Nucl. Chem. 43, 425 (1981)
- (8) G. FORMICKA-KOZLOWSKA, P.M. MAY et D.R. WILLIAMS
Inorg. Chim. Acta 46, L51, (1980)
- (9) S.T. CHOW, C.A. Mac AULIFFE et B.J. SAYLE
J. Inorg. Nucl. Chem. 37, 451 (1975)
- (10) B. JEZOWSKA-TRZEBIATOWSKA, G. FORMICKA-KOZLOWSKA et H. KOZLOWSKI
Chem. Phys. Letters 42, 242 (1976)
- (11) M.K. KIM, A.E. MARTEL
J.A.C.S. 89, 5138 (1967)
- (12) R.B. MARTIN, M. CHAMBERLAIN, J.T. EDSALL
J.A.C.S. 82, 495 (1960)
- (13) T.F. DORIGATTI, E.J. BILLO
J. Inorg. Nucl. Chem. 37, 1515 (1975)
- (14) J.J. CZARNECKI, D.W. MAGERUM
Inorg. Chem. 16, 1997 (1977)
- (15) L.I. KATZIN, E. GLYAS
J.A.C.S. 91, 6940 (1960)

- (16) G. FORMICKA-KOZŁOWSKA, H. KOZŁOWSKI
Inorg. Chim. Acta 46, 29 (1980)
- (17) B. SARKAR
Chemica Scripta 21, 101 (1983)
- (18) J.D. GLENNON, B. SARKAR
Biochem. J. 203, 25, (1982)
- (19) J.M. TSANGARIS, J.W. CHANG, R.B. MARTIN
J.A.C.S. 91, 726 (1969)
- (20) Thèse Damien FICHEUX
Université de Lille I (1986)
- (21) I. SOVAGO, A. GERGELY, B. HARMAN et T. KISS
J. Inorg. Nucl. Chem. 41, 1629 (1979)
- (22) J.H. RITSMA et F. JELLINEK
Rec. Trav. Chim. 91, 923 (1972)
- (23) H. SIGEL et R.B. MARTIN
Chem. Rev. 82, 385 (1982)
- (24) Thèse Souad DJEMIL
Université de Lille I (198)
- (25) I. SOVAGO, T. KISS, K. VARNAGY and B. DECOCK-LE REVEREND
Polyhedron, 7, 1089 (1988)
- (26) H. KOZŁOWSKI, B. DECOCK-LE REVEREND, D. FICHEUX, C. LOUCHEUX and
I. SOVAGO
J. Inorg. Biochem., 29, 187 (1987)

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA COMPLEXATION PAR LE PALLADIUM (II)

**ETUDE DE LA COMPLEXATION AVEC LE
PALLADIUM (II) DE PEPTIDES
CONTENANT LA CYSTEINE**

INTRODUCTION

Le palladium (II) forme des complexes plan carrés avec les peptides (1). Leur spectre d'absorption U.V.-visible est souvent réduit à une large bande due aux transitions de transfert de charge et sur laquelle se trouve sous forme d'épaule les transitions d-d du métal. Ces dernières permettent de connaître en partie les groupes fonctionnels coordonnés car les complexes du Pd (II) répondent aux règles de TSUSHIDA (2,3).

Des équilibres stables avec les complexes du palladium sont très long à obtenir. Dans ces conditions, l'étude potentiométrique ne peut être effectuée.

A/ GENERALITES

Les cinq orbitales d du palladium ou du platine, bien que différentes, ont toutes la même énergie dans l'atome ou dans l'ion libre. Or, la présence autour du cation des charges négatives dues aux ligands lève cette dégénérescence.

L'effet produit sur les énergies des orbitales d, dépend de la disposition des ligands autour du cation métallique. De ce fait, l'éclatement des niveaux d'énergie de l'ion complexé est une mesure de la symétrie de son environnement chimique.

Les complexes du Pd(II) que nous avons étudiés présentent une symétrie de type D_{4h} caractéristique des complexes dit "plan-carrés".

La figure 1 montre le diagramme énergétique des orbitales de ces cations métalliques.

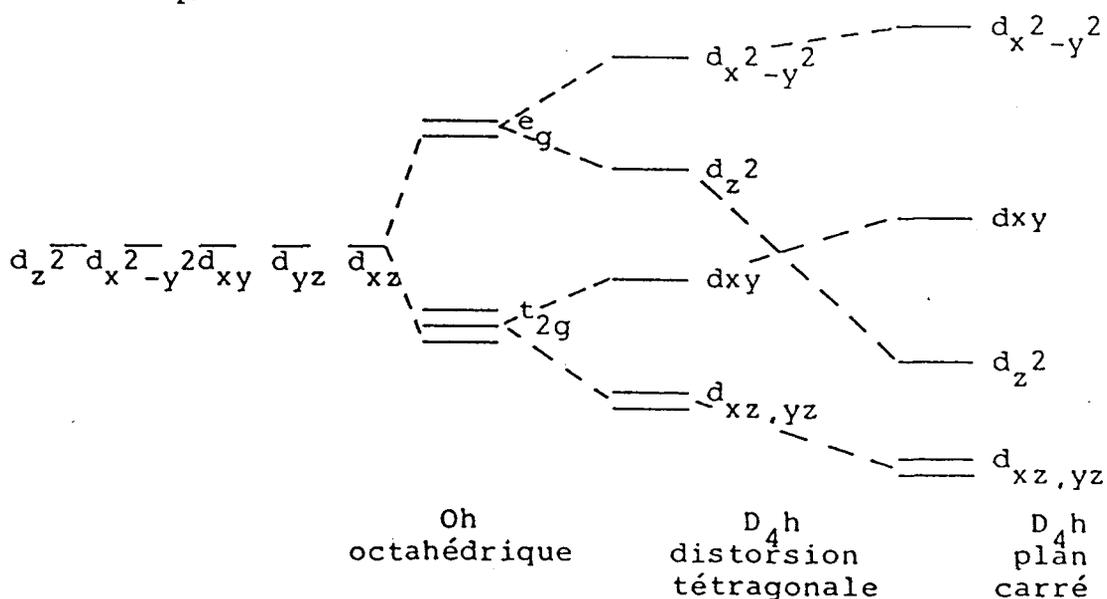


Figure 1

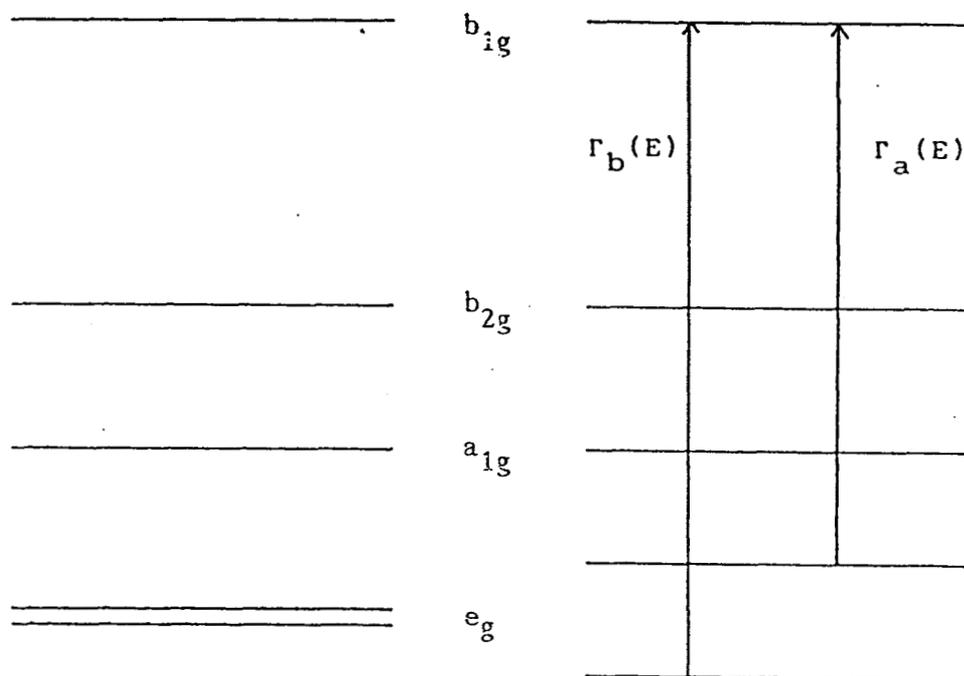
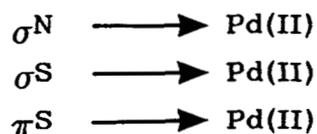


Figure 3

Les maxima d'absorption pour les bandes d-d du Pd(II) sont situés entre 300 et 500 nm. En spectroscopie U.V. la visualisation des transitions d-d est difficile. Elles se manifestent sous la forme d'un épaulement englobant les différentes transitions situés sur la bande de transfert de charge soufre-métal, les des transitions d-d étant faibles comparés au des transitions de transfert de charge.

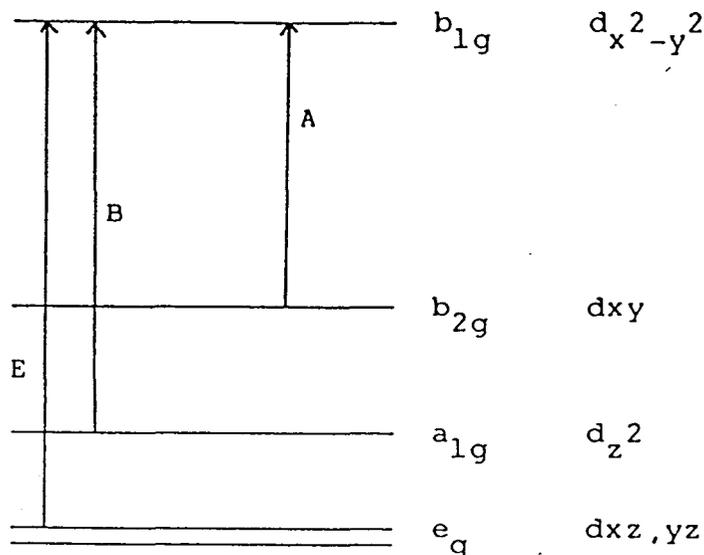
Le spectre de transfert de charge qui en résulte présente une absorption intense, généralement dans le domaine de l'ultraviolet.

Trois types de transfert de charge peuvent intervenir :



L'énergie du transfert de charge soufre → métal est plus faible que pour le transfert azote → métal. Le nombre de couches électroniques de l'atome d'azote étant inférieur à celui de l'atome de soufre.

De ce fait, les spectres d'absorption dans la région visible et du proche U.V. des complexes du Pd(II) sont dus aux transitions électroniques suivantes :



Avec	B :	$a_{1g} \rightarrow b_{1g}$	$(A_{1g} \rightarrow B_{1g})$
	E :	$e_g \rightarrow b_{1g}$	$(A_{1g} \rightarrow E_g)$
	A :	$b_{2g} \rightarrow b_{1g}$	$(A_{1g} \rightarrow A_{2g})$

Figure 2

De plus, une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie d_{xz} et d_{yz} est mise en évidence lorsqu'une diminution de symétrie du complexe intervient, celui-ci passant d'un type "plan-carré" (D_{4h}) à une symétrie de type orthombique (D_2). Ce passage à une symétrie plus basse provoque le dédoublement de la transition E en deux transitions dichroïques Γ_a et Γ_b (figure 3) (53).

Ces trois bandes de transfert de charge ne peuvent pas être expliquées par l'hypothèse émise par SCHUGAR (5) mais le sont par l'étude qu'en a faite SOLOMON (6).

SCHUGAR ne tient compte que de la liaison soufre métal et les deux orbitales P_x (perpendiculaire au plan de figure 4) et P_y ont un caractère de liaison π et on obtient dans ce cas seulement deux bandes de transfert de charge. Cette hypothèse qui néglige la liaison carbone-soufre ne pouvait pas expliquer la présence de trois bandes de transfert de charge pour le soufre. Dans l'hypothèse de SOLOMON, l'orbitale σ ($\alpha S + P_z$) se trouve dans l'axe du carbone et l'angle entre le carbone et un métal lié au soufre est de l'ordre de 107° . L'orbitale P_y forme une liaison avec le métal et prend en partie l'énergie d'une orbitale σ . Les deux niveaux de la première hypothèse se transforment en trois niveaux énergétiques. P_x (π) reste stable, P_y (σ) perd partiellement l'énergie de la liaison métallique. Comme le montre la figure, on obtient alors trois bandes de transfert qu'on observe dans le spectre dichroïque à 282, 256 et 232 nm attribuées respectivement aux transitions $P_x \rightarrow dx^2 - y^2$, $P_y \rightarrow dx^2 - y^2$ et $(\alpha S + P_z) \rightarrow dx^2 - y^2$. Les variations observées à pH élevé doivent être dues au remplacement de H_2O par OH^- ou à la dimérisation des molécules de palladium (II) avec la cystéine (7,8).

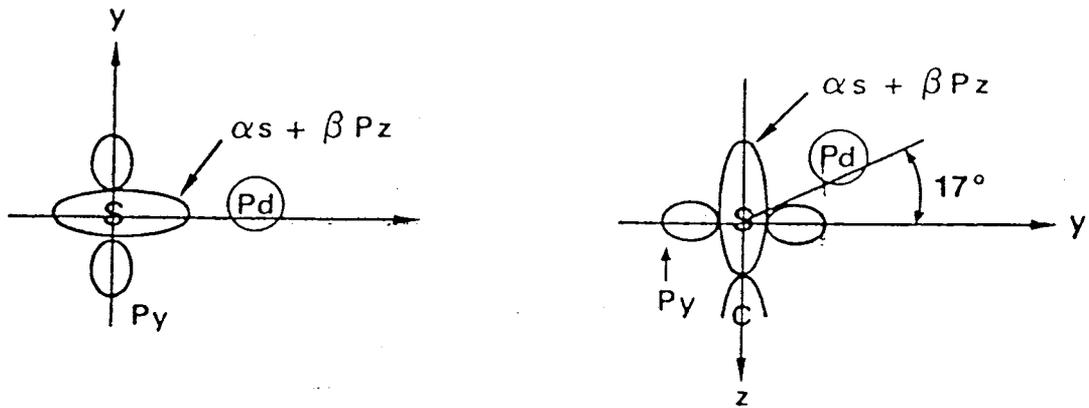
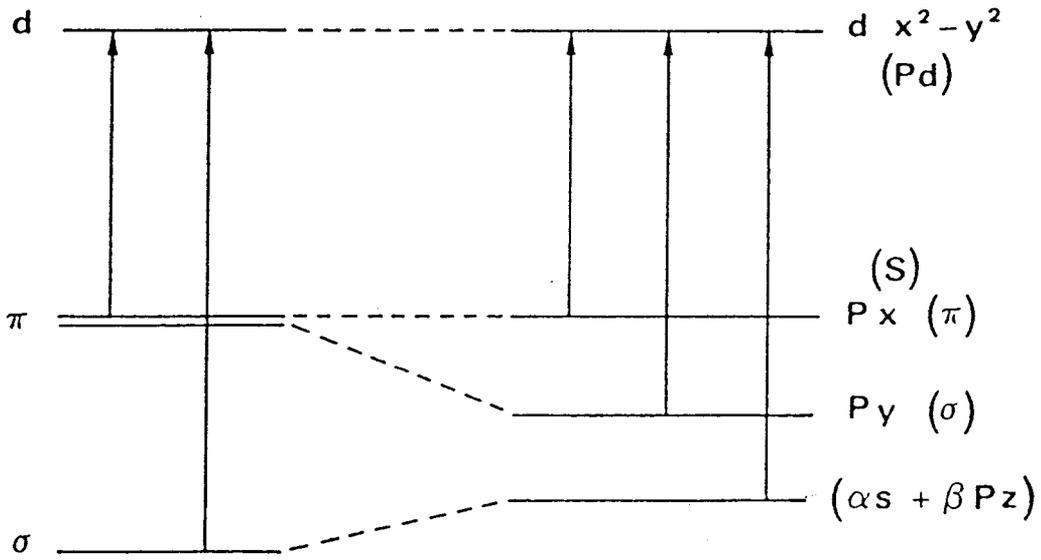


Figure 4

Transitions de transfert de charge entre le soufre et un métal suivant Schugar et Solomon.

B/ ALA-CYS ET PHE-CYS

La complexation de Ala-Cys avec le Pd(II) et de Phe-Cys avec le Pd(II) donne des résultats proches de ceux observés avec le Ni(II).

En dichroïsme circulaire, à pH 5.41 et en solution équimolaire (figure 6) on observe pour le complexe Ala-Cys - Pd(II) deux bandes d-d à 530 et 490 nm correspondant aux transitions A et E. A des pH plus élevés ces bandes sont déplacées vers les faibles longueurs d'onde. En outre, dans le domaine de l'ultraviolet on observe trois transitions de transfert de charge à 360 nm ($\pi S_x \rightarrow Pd$), 320 nm ($\sigma S_y \rightarrow Pd$) et 270 nm ($\sigma S_z \rightarrow Ni$) (figures 12,14,16). Dans les mêmes conditions des bandes identiques sont repérées pour le complexe Phe-Cys-Pd(II) mais à des longueurs d'ondes différentes : les deux bandes d-d à 410 nm et 490 nm, et les trois bandes de transfert de charge à 350 nm, 303 et 285 nm (figure 7, 13 et 15). Ces observations sont en accord avec une coordination : (NH₂, N⁻, S⁻) pour donner le complexe PdAH₁ (figure 5).

En U.V.-visible, la présence d'une bande de transfert de charge à 262 nm pour Ala-Cys - Pd(II) et à 258 nm pour Phe-Cys - Pd(II) confirme ce type de coordination (Tableau III, figures 18,19,24 et 25).

Pour des rapports supérieurs à 1, la complexation avec quatre azotes (2NH₂, 2N⁻) est favorisée ce qui explique la faible intensité des bandes de transfert de charge du soufre. Dans ce cas, il semblerait que le palladium forme plus facilement des liaisons avec des azotes amides qu'avec le thiolate (9) (figures 5,22 et 26).

Les complexes du palladium étant très longs à se stabiliser, l'étude potentiométrique n'a pu être effectuée.

Les spectres RMN ne sont pas assez bien définis pour que l'on puisse en tirer les populations de rotamères (figures 27,28).

Figure 5

Structure des complexes de Ala-Cys et Phe-Cys avec Pd(II)

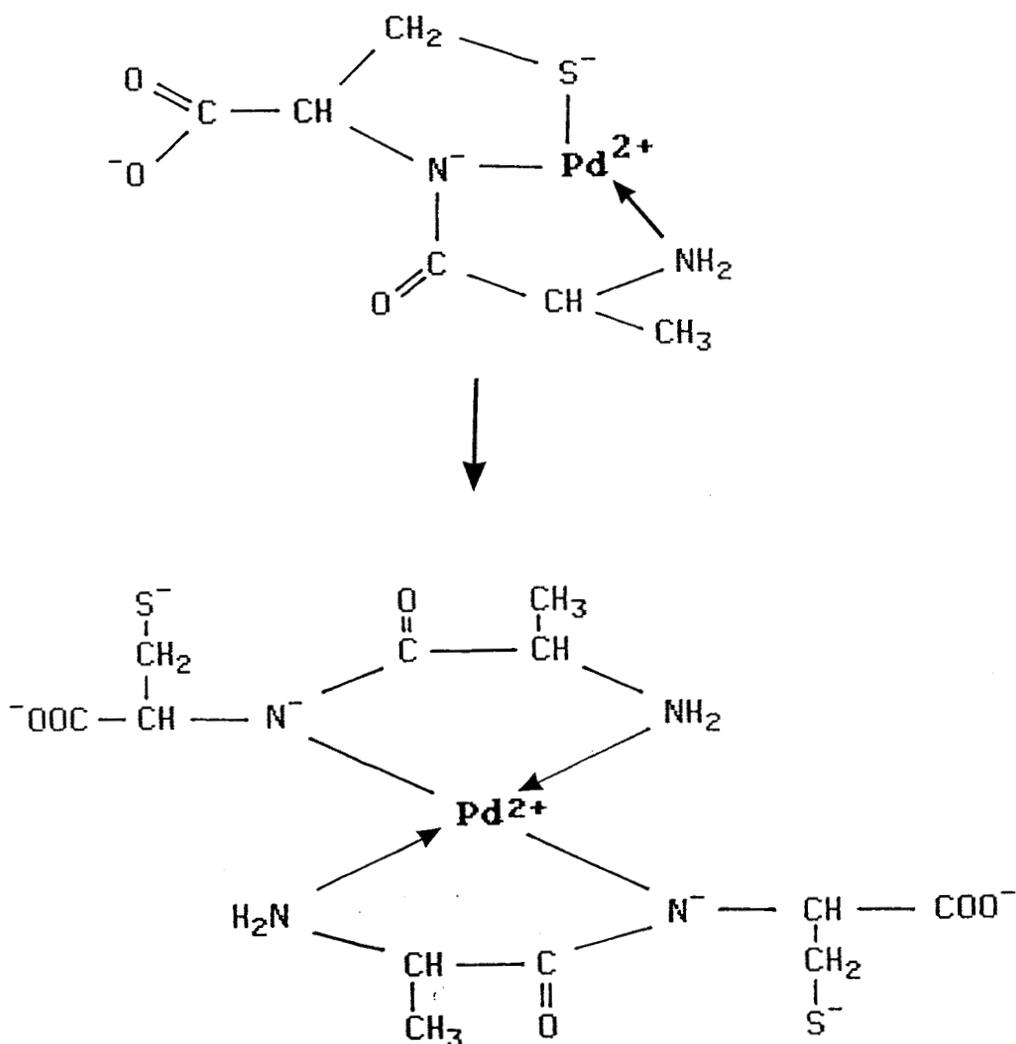


TABLEAU I : Valeurs des principaux maxima en dichroïsme circulaire pour Ala-Cys avec Pd(II)

pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1	11.21	425	d-d
		334	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		289	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		259	$N^- \rightarrow Pd$
	7.91	483	d-d
		340	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		298	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		253	$N^- \rightarrow Pd$
	3.52	488	d-d
		340	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		298	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		250	$N^- \rightarrow Pd$
Rapport 2	11.37	493	d-d
		355	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		316	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		268	$N^- \rightarrow Pd$
	7.26	493	d-d
		351	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		309	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		268	$N^- \rightarrow Pd$
	3.14	470	d-d
		356	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		313	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		268	$N^- \rightarrow Pd$
Rapport 4	11.23	490	d-d
		373	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		300	$S_{oy} \rightarrow Pd$
	9.20	488	d-d
		373	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		313	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		258	$N^- \rightarrow Pd$
	5.76	483	d-d
		375	$S_{xx} \rightarrow Pd$
		313	$S_{oy} \rightarrow Pd$
		255	$N^- \rightarrow Pd$

TABLEAU II
Valeurs des principaux maxima en dichroïsme circulaire pour
Phe-Cys avec Pd(II)

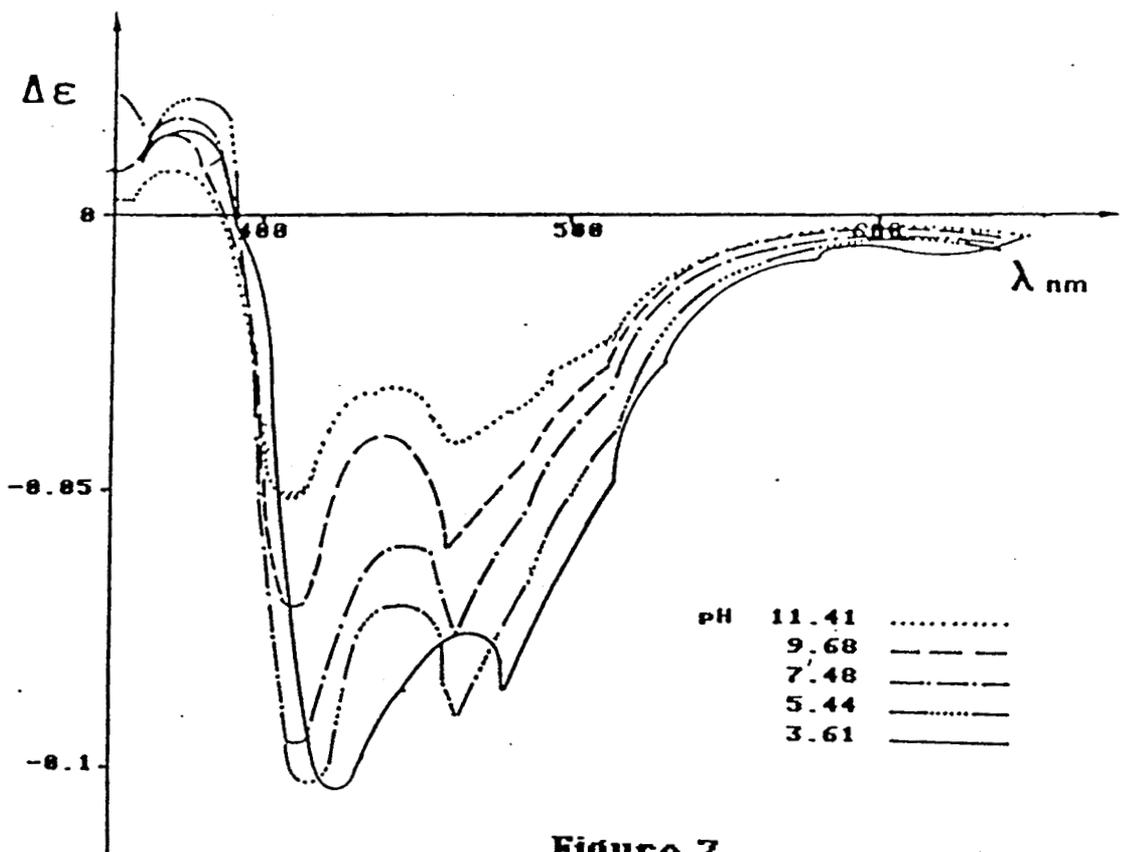
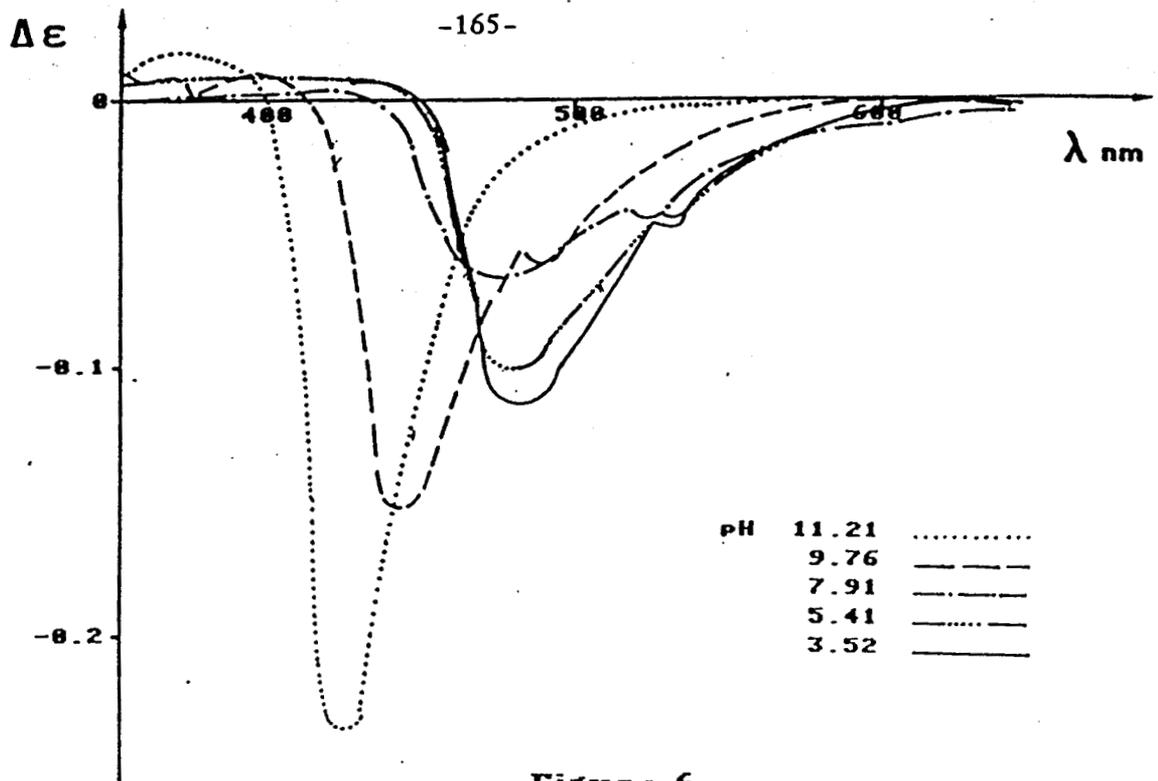
pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1 11.41	405	-0.059	A
	350	-1.660	$S_{\pi\pi} \rightarrow Pd$
	269	+0,875	$S_{\sigma y} \rightarrow Pd$
7.48	405	-0.109	d-d
	350	-1.375	$S_{\pi\pi} \rightarrow Pd$
	303	+1.583	$S_{\sigma y} \rightarrow Pd$
	269	+1.290	$N^- \rightarrow Pd$
3.61	428	-0.118	d-d
	364	-1.458	$S_{\pi\pi} \rightarrow Pd$
	303	+1.250	$S_{\sigma y} \rightarrow Pd$
	269	+1.710	$N^- \rightarrow Pd$
Rapport 2 11.37	483	-0.005	d-d
	443	-0.014	d-d
	330	-1.180	$S_{\pi\pi} \rightarrow Pd$
	307	+1.640	$S_{\sigma y} \rightarrow Pd$
	269	+1.550	$N^- \rightarrow Pd$
5.34	433	-0.330	d-d
	375	-0.340	$S_{\pi\pi} \rightarrow Pd$
	307	-2.254	$S_{\sigma y} \rightarrow Pd$
	269	-1.630	$N^- \rightarrow Pd$

TABLEAU III
Valeurs des principaux maxima en U.V.-visible pour Ala-Cys
avec Pd(II)

pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1			
11.50	270	5700	N ⁻ → Pd
7.09	270	6100	
3.34	268	4900	
Rapport 2			
11.17	310	10700	N ⁻ → Pd
7.58	315	10700	
3.05	310	12600	
Rapport 4			
11.17	330	8400	
7.58	325	9600	
3.23	320	11000	

Valeurs des principaux maxima en U.V.-visible pour Phe-Cys
avec Pd(II)

pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1			
11.07	258	8400	N ⁻ → Pd
7.75	258	7700	
3.20	258	6400	
Rapport 2			
11.52	258	10400	N ⁻ → Pd
5.42	258	10400	
3.64	258	6200	
Rapport 4			
10.46	258	19600	N ⁻ → Pd
5.53	258	17600	
4.10	258	12200	



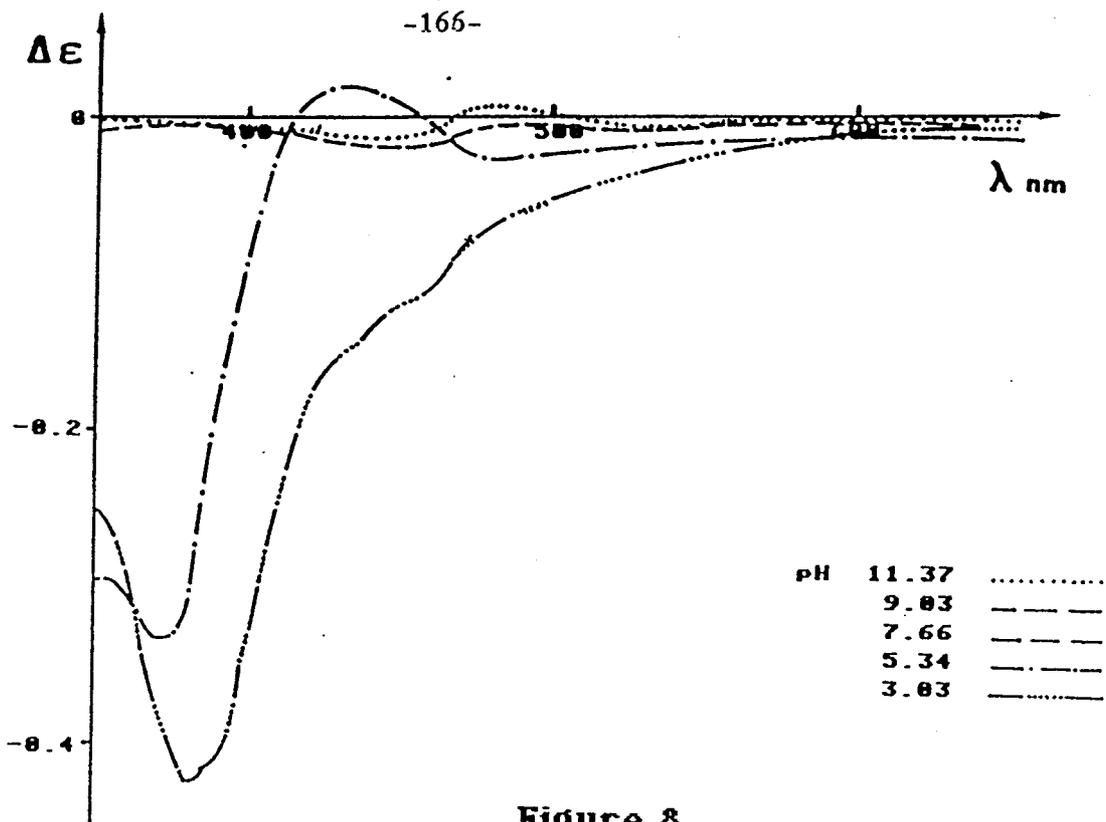


Figure 8
Spectre dichroïque visible de PheCys avec Pd(II) rapport 2

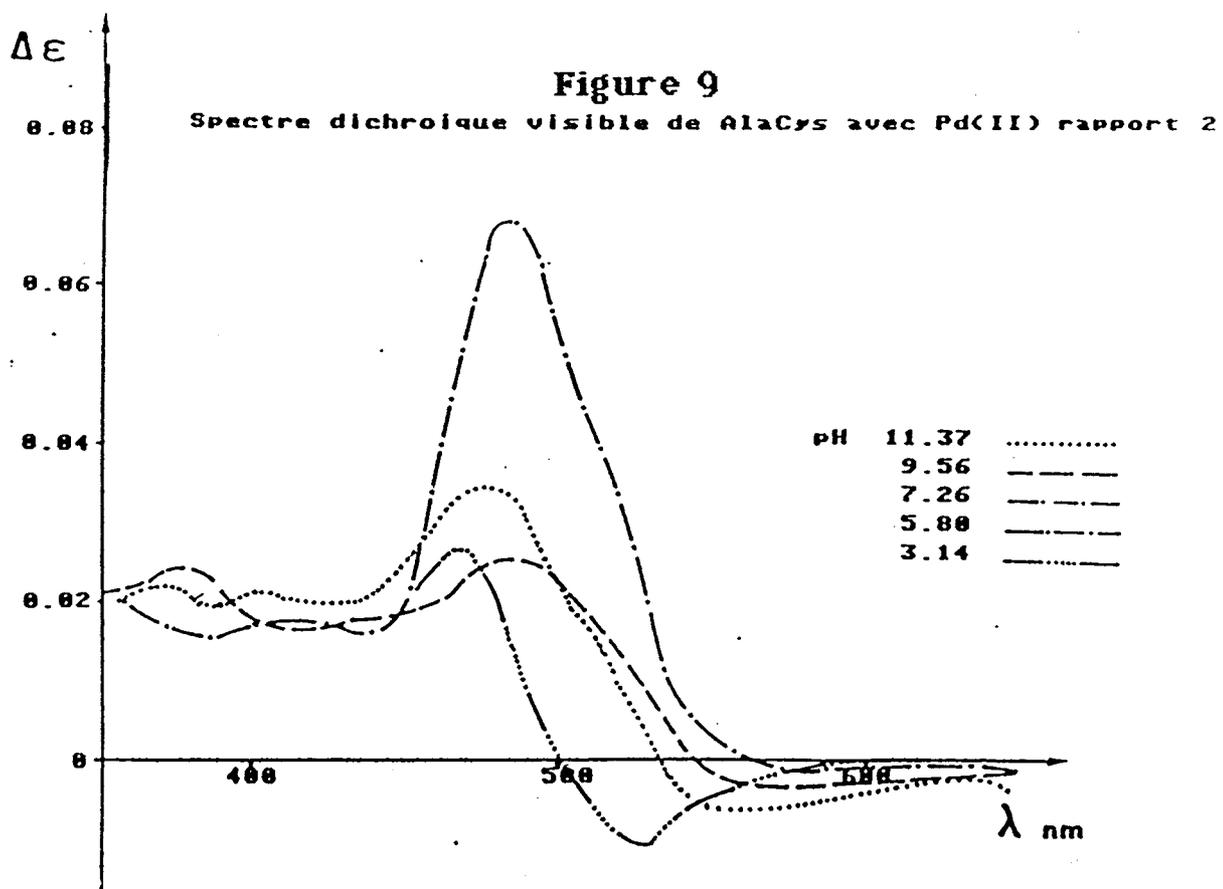


Figure 9
Spectre dichroïque visible de AlaCys avec Pd(II) rapport 2

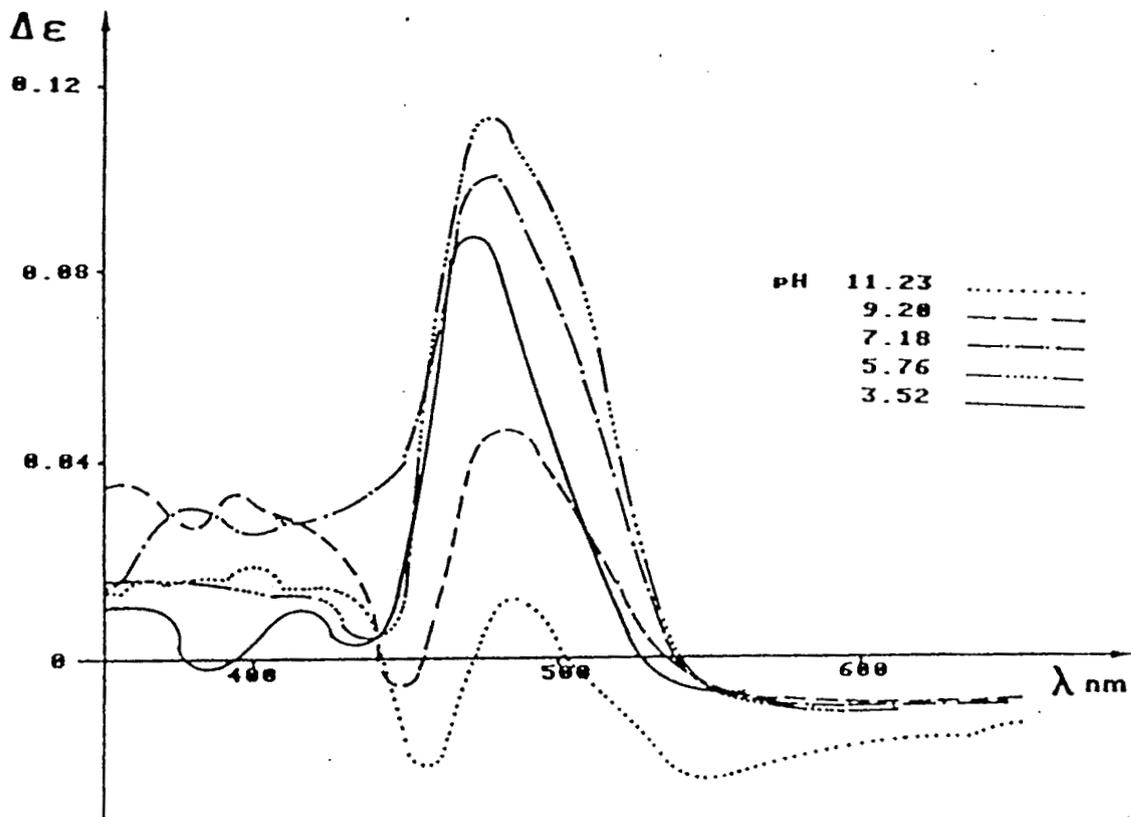


Figure 10

Spectre dichroïque visible de AlaCys avec Pd(II) rapport 4

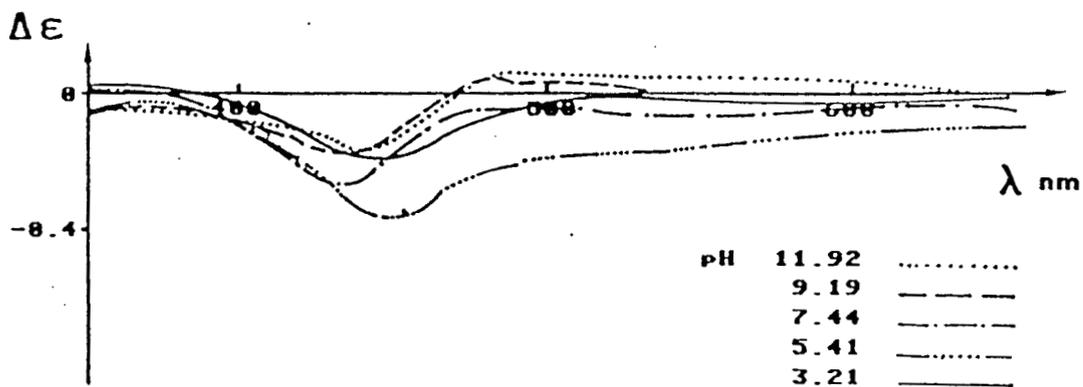


Figure 11

Spectre dichroïque visible de PheCys avec Pd(II) rapport 4

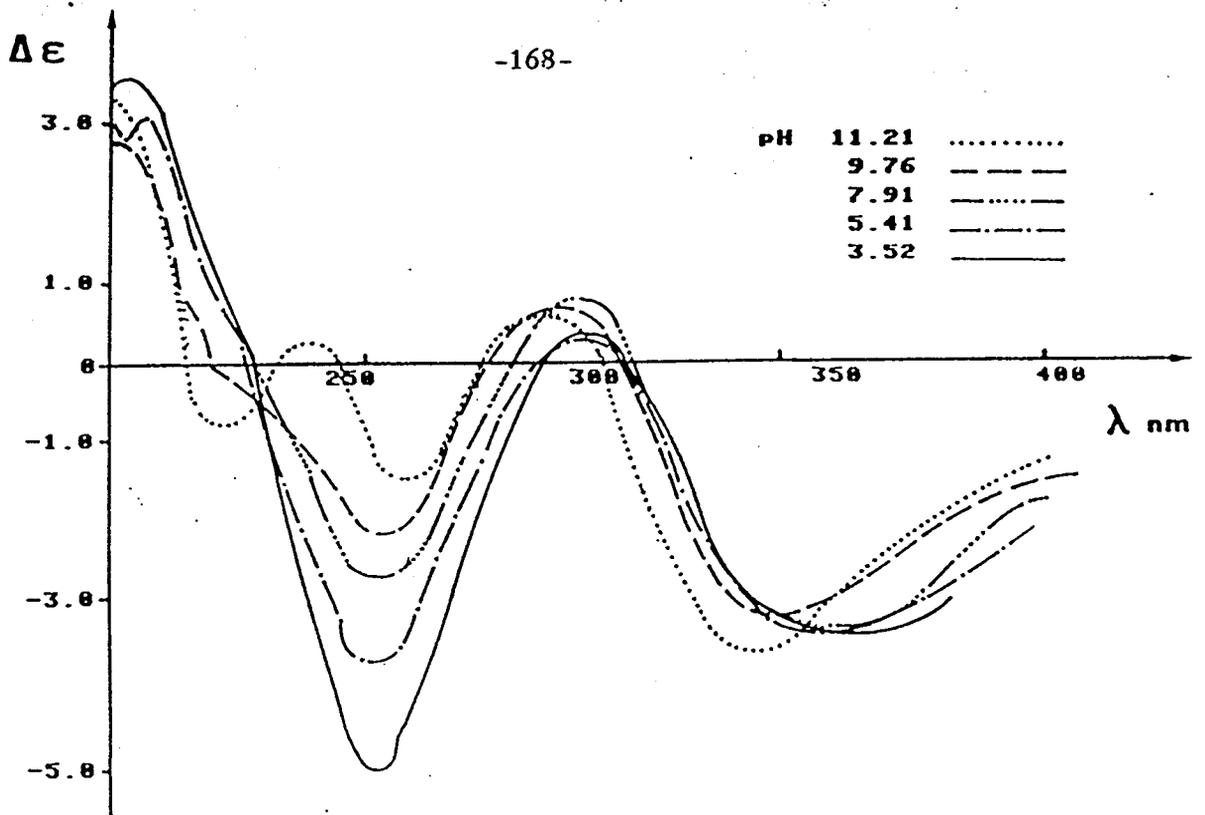


Figure 12
Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Pd(II) rapport 1

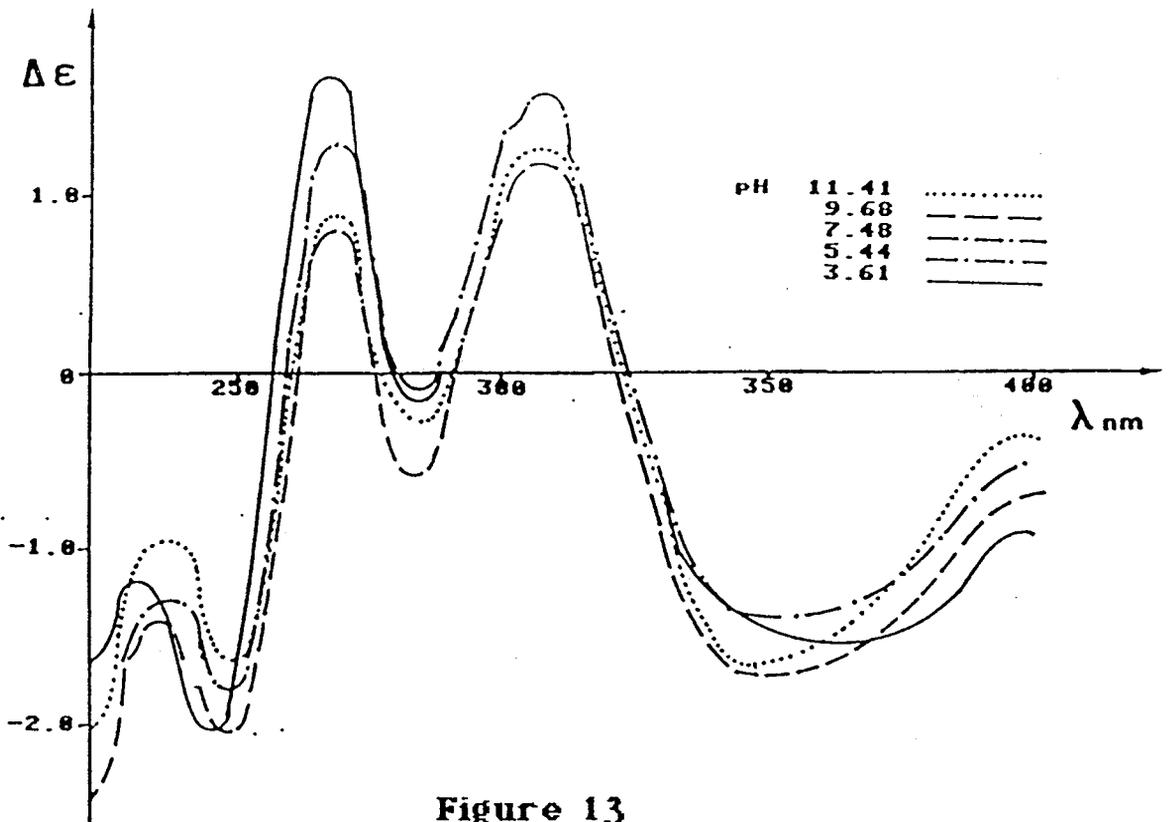


Figure 13
Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Pd(II) rapport 1

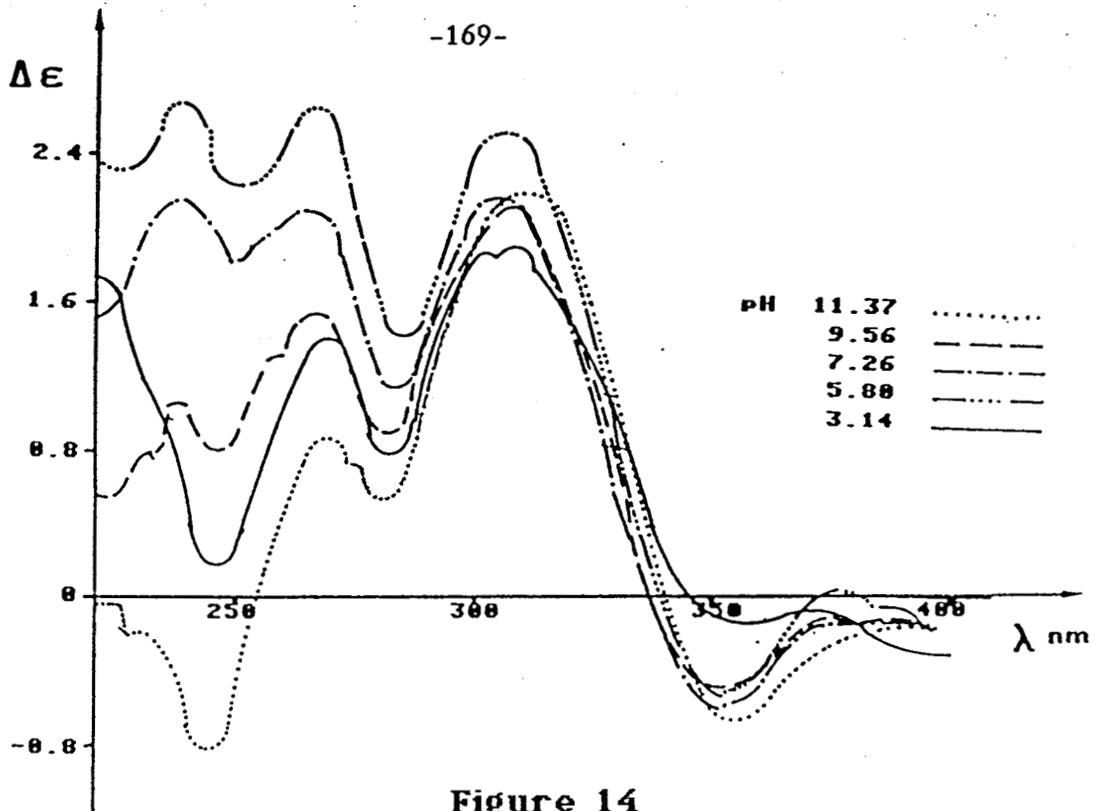


Figure 14
Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Pd(II) rapport 2

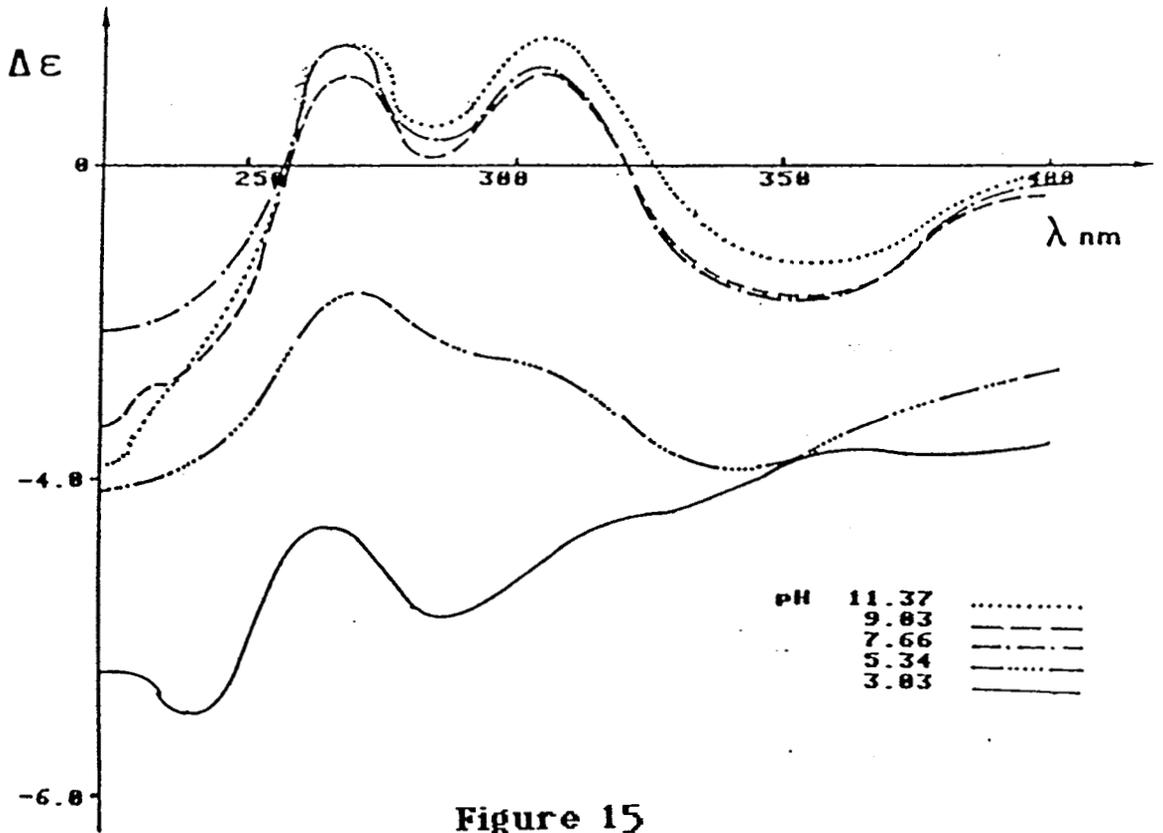
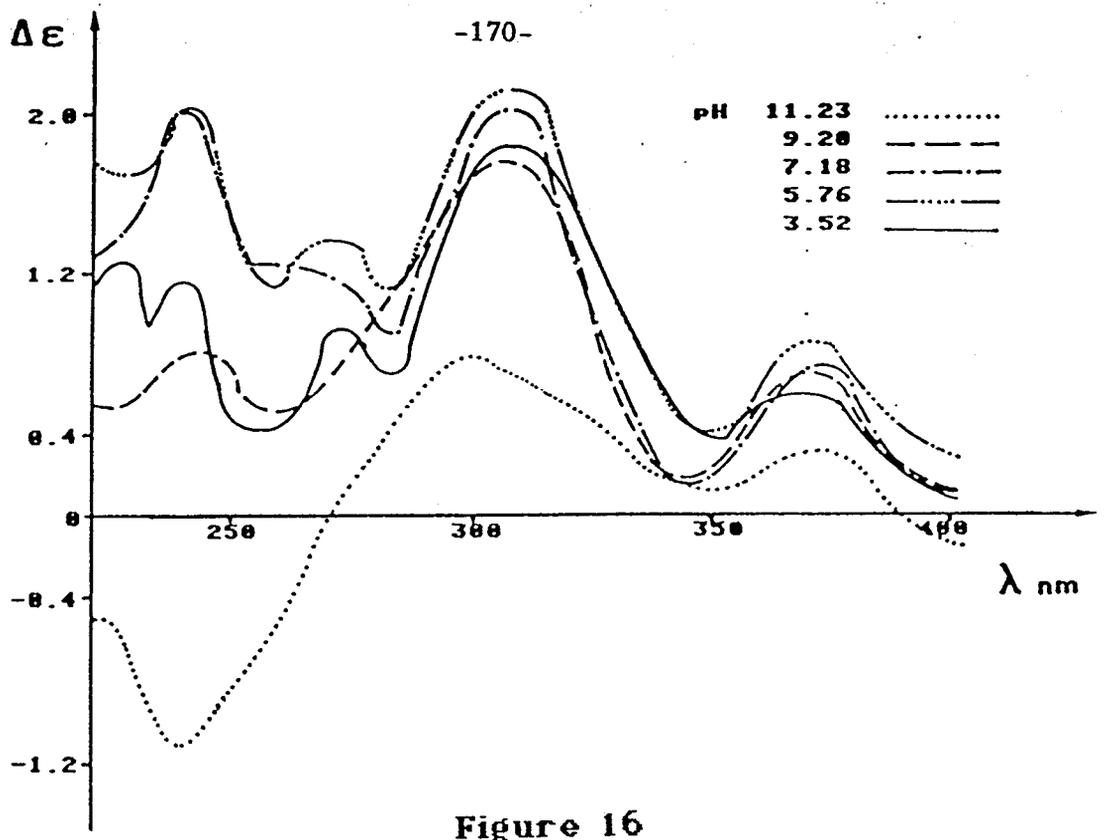
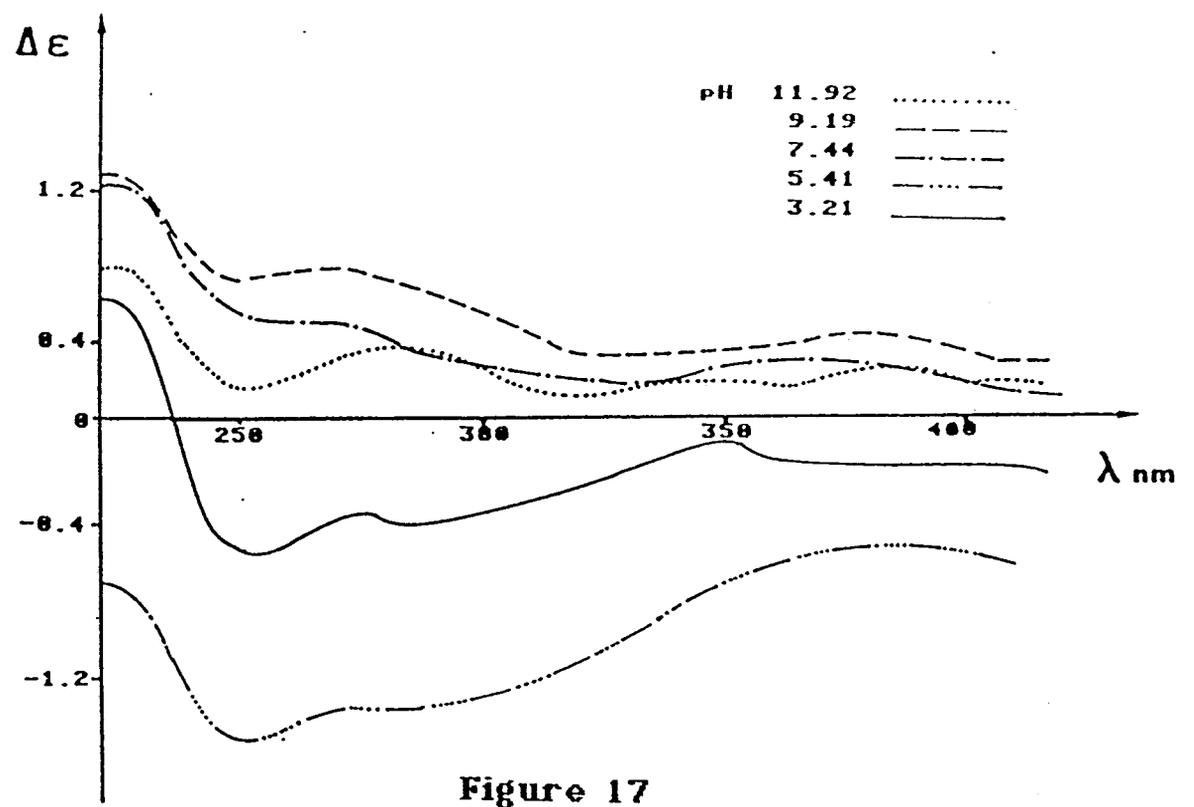


Figure 15
Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Pd(II) rapport 2



Spectre dichroïque U.V. de AlaCys avec Pd(II) rapport 4



Spectre dichroïque U.V. de PheCys avec Pd(II) rapport 4

Figure 18

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 1

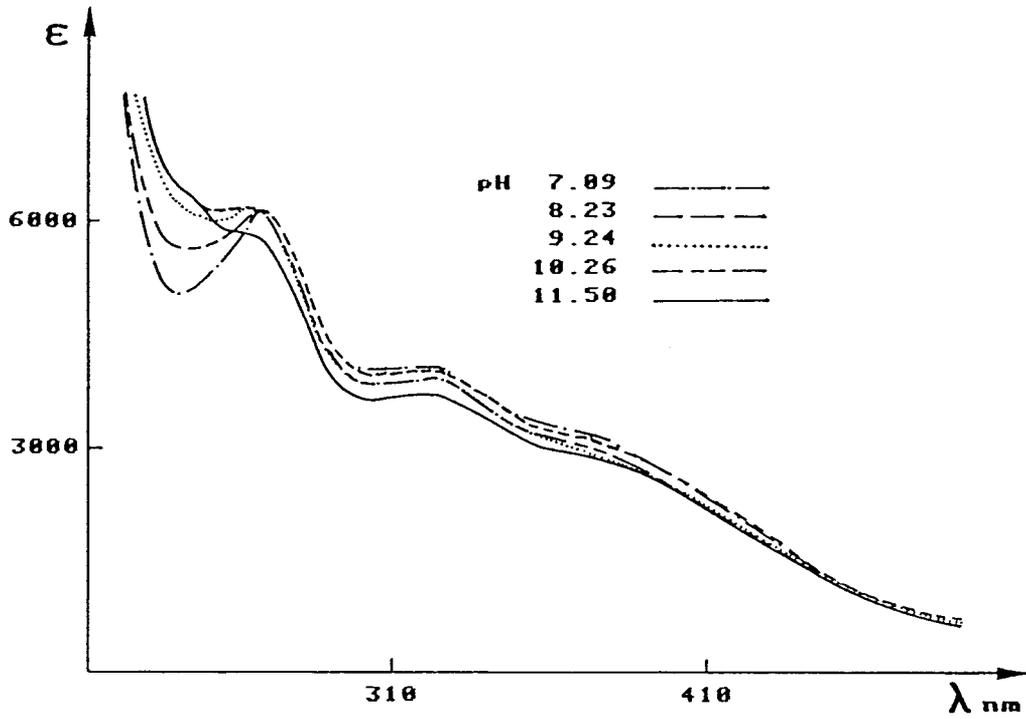


Figure 19

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 1

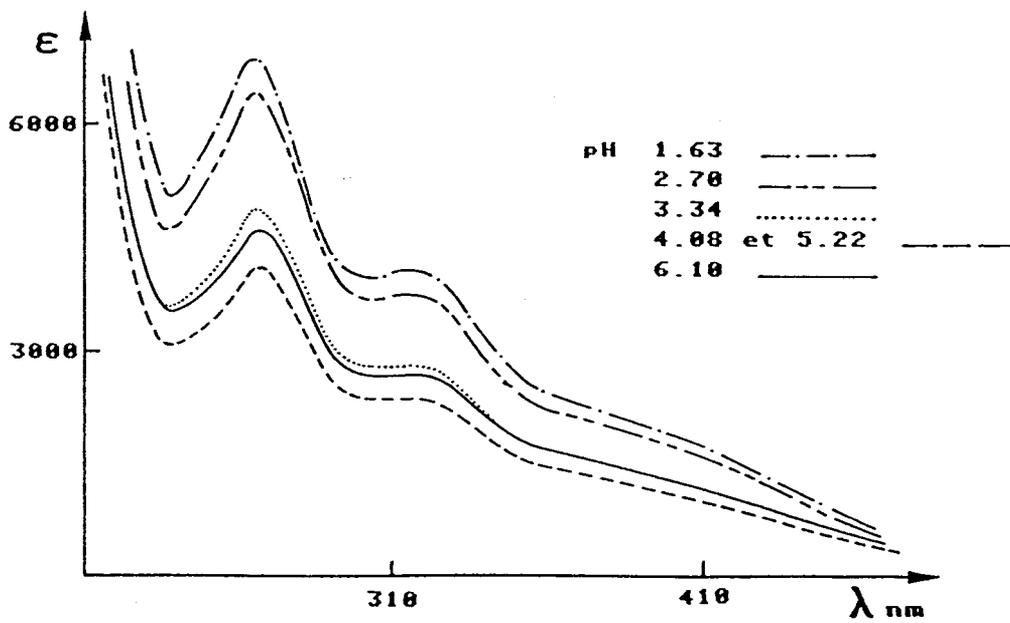


Figure 20

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 2

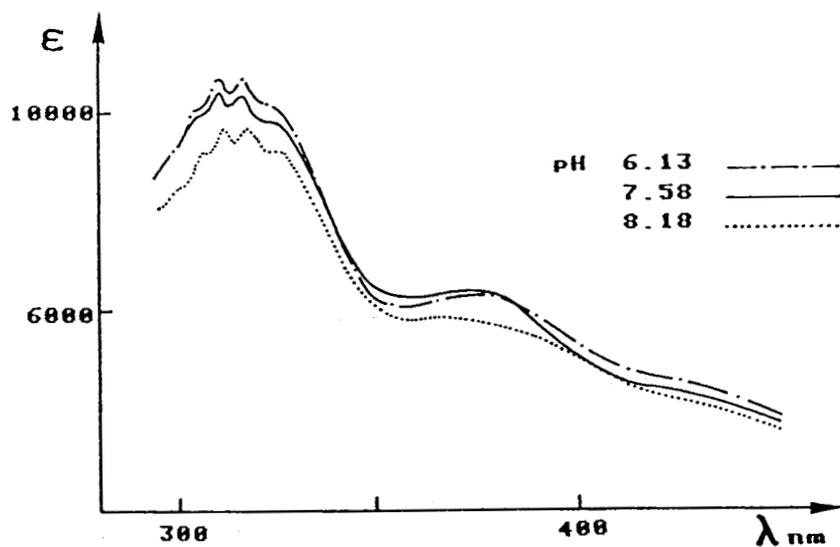
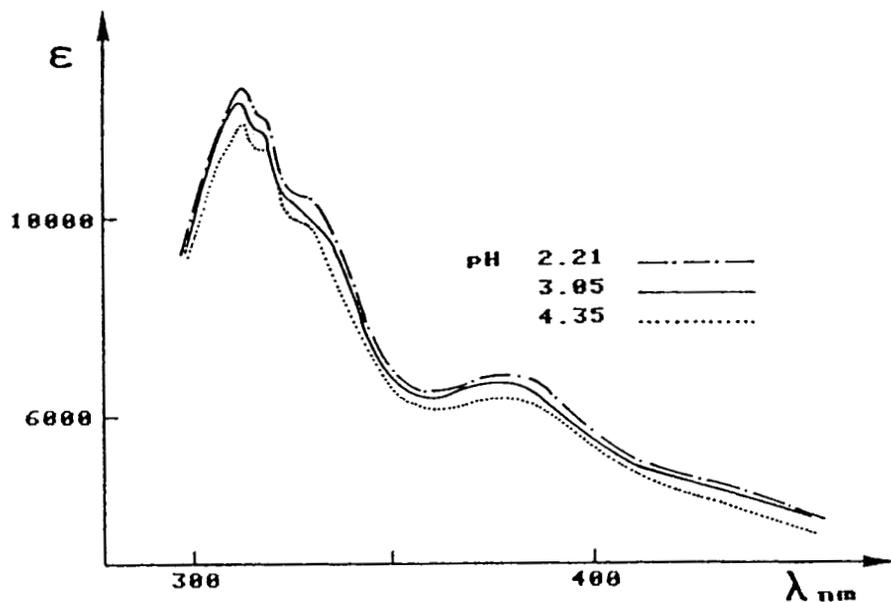


Figure 21

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 2

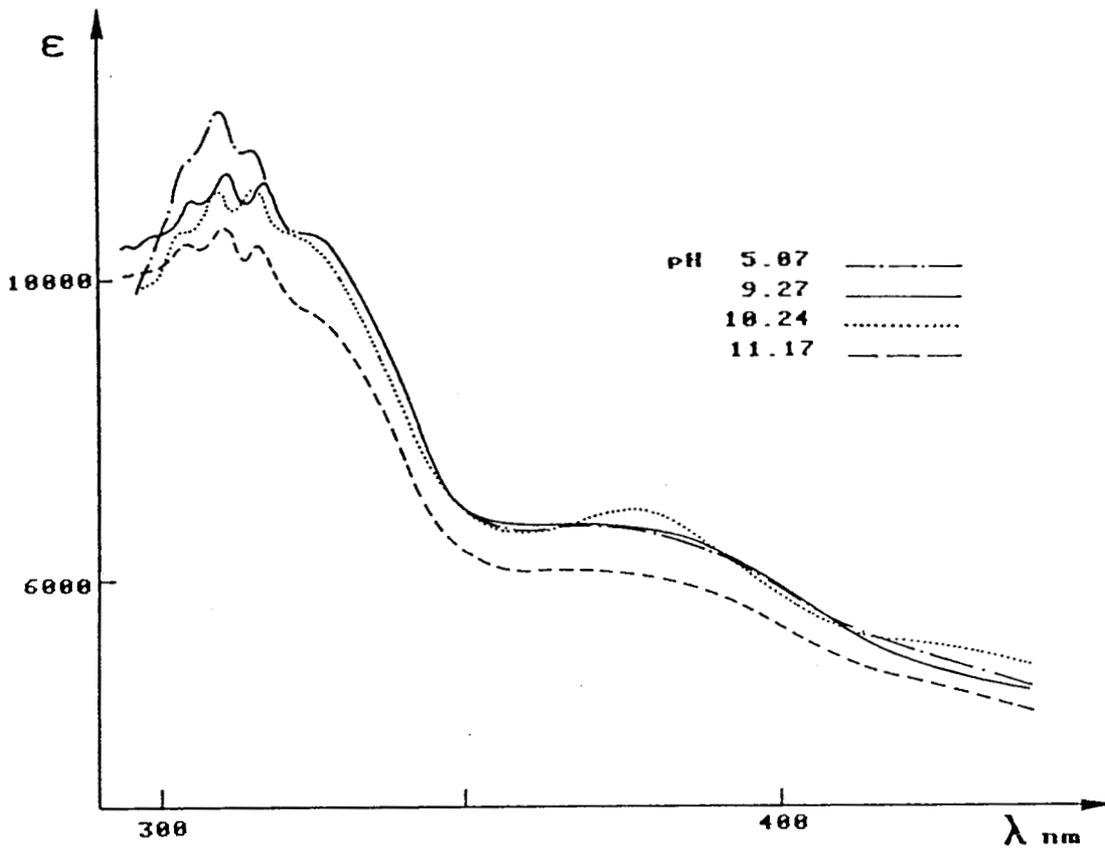


Figure 22

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 4

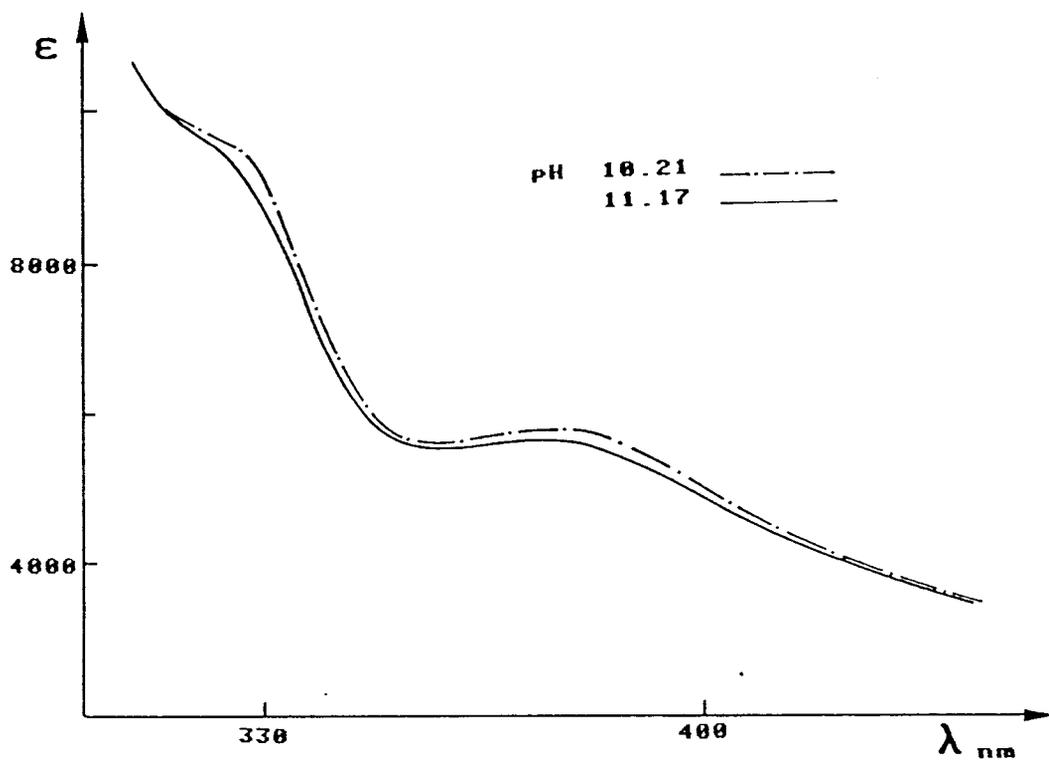


Figure 23

Spectre d'absorption de AlaCys avec Pd(II) rapport 4

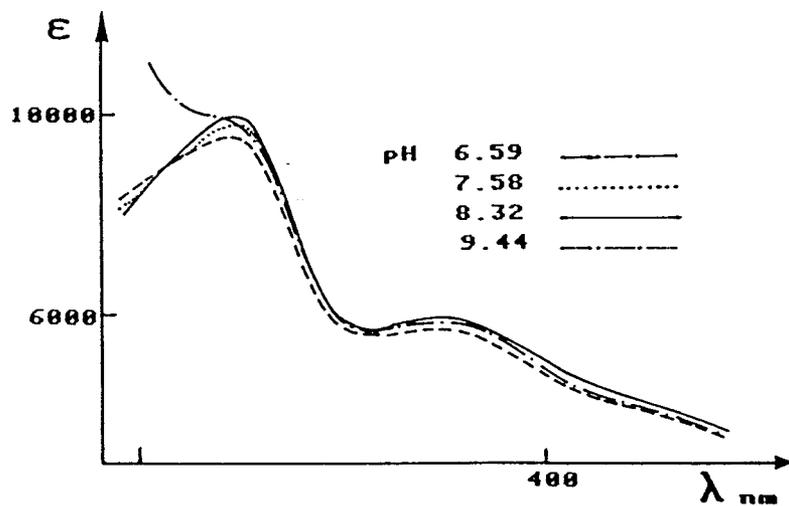
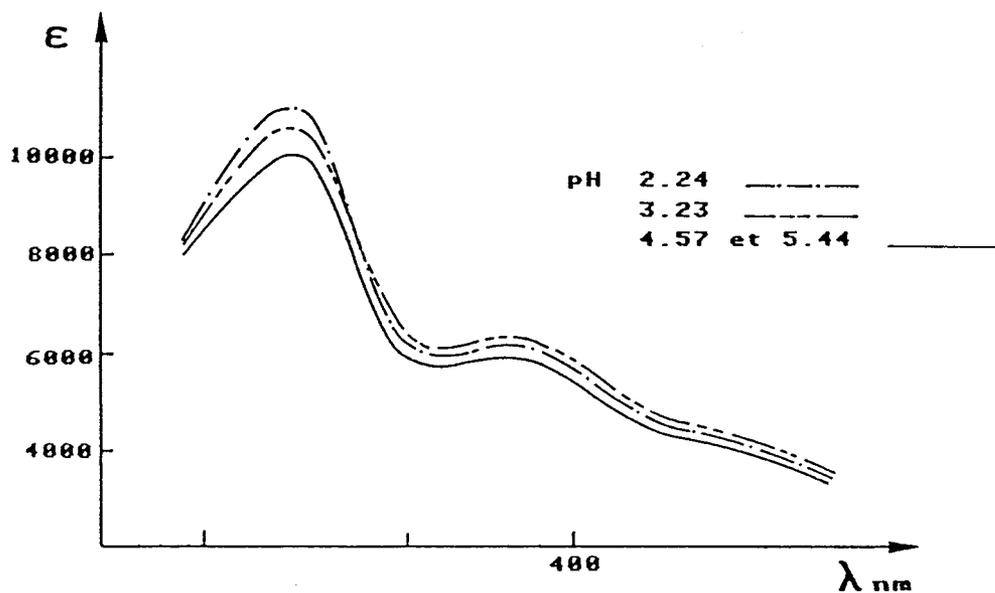


Figure 24

Spectre d'absorption de PheCys avec Pd(II) rapport 1

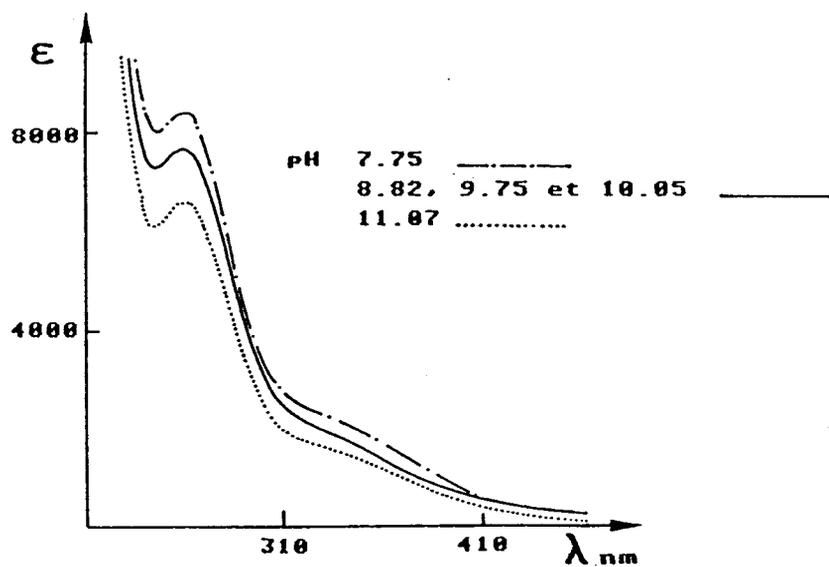
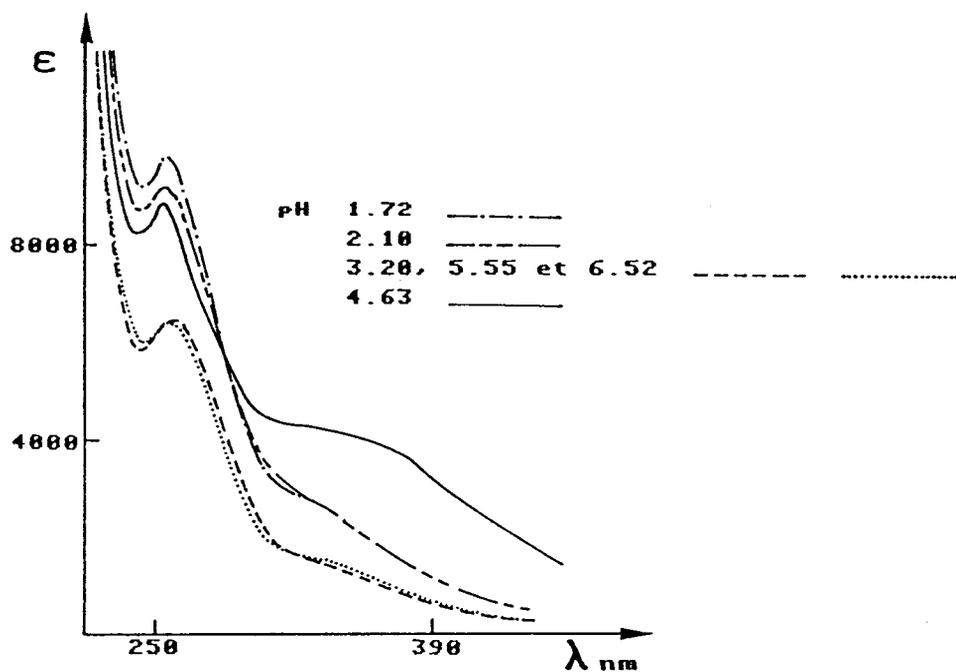


Figure 25

Spectre d'absorption de PheCys avec Pd(II) rapport 2

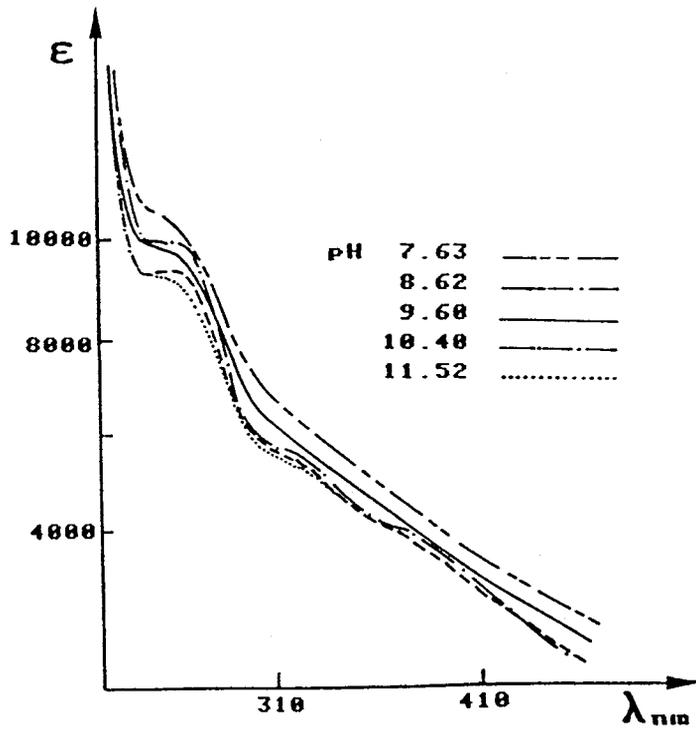
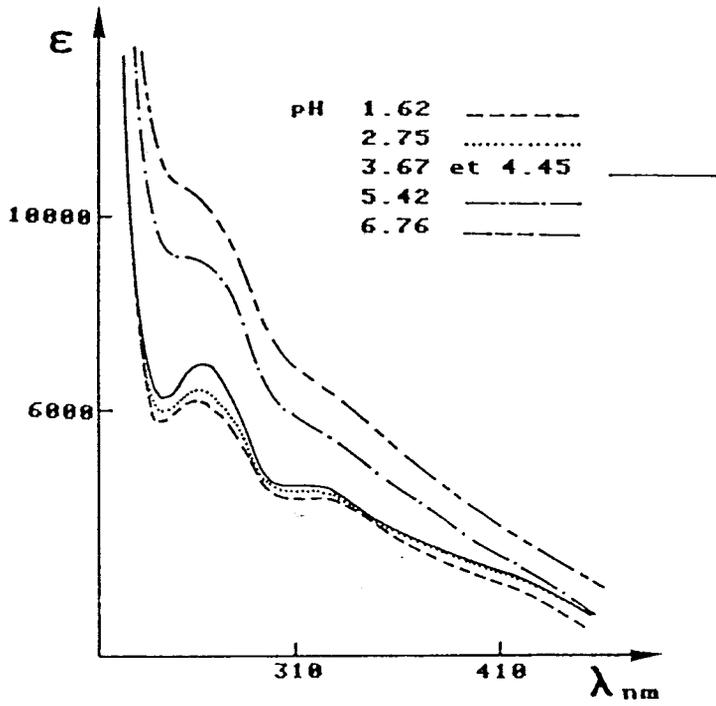
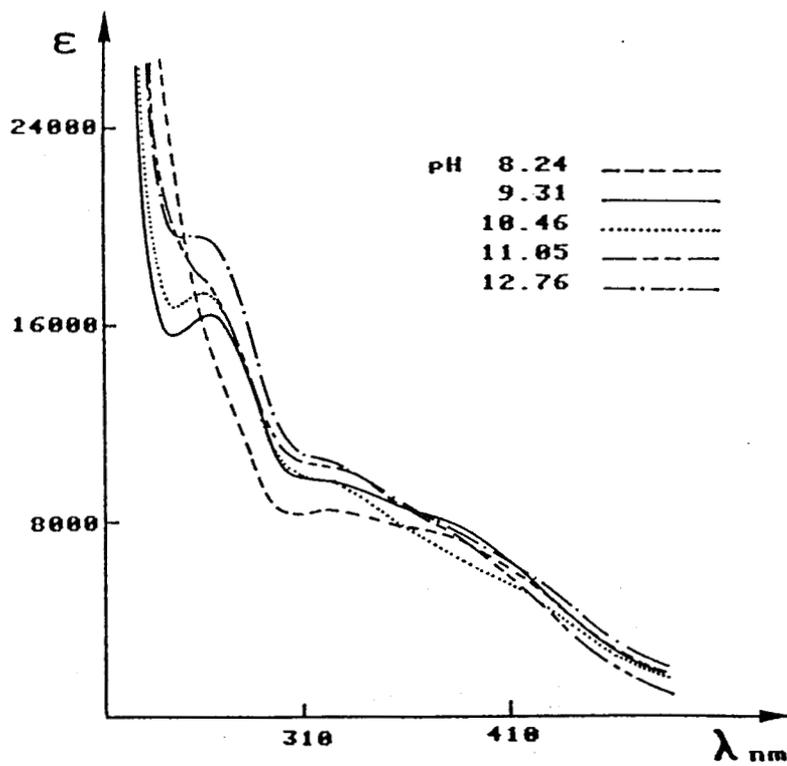
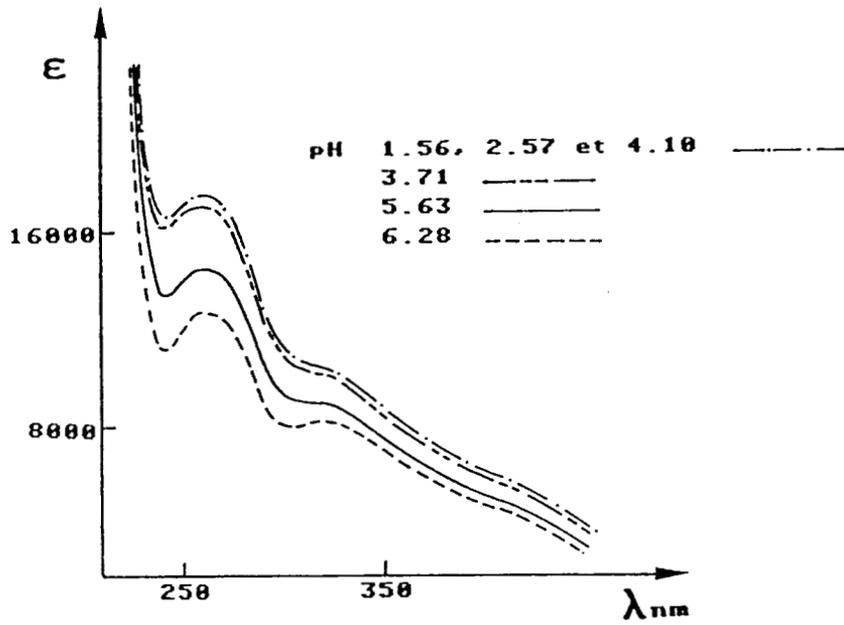


Figure 26

Spectre d'absorption de PheCys avec Pd(II), rapport 4



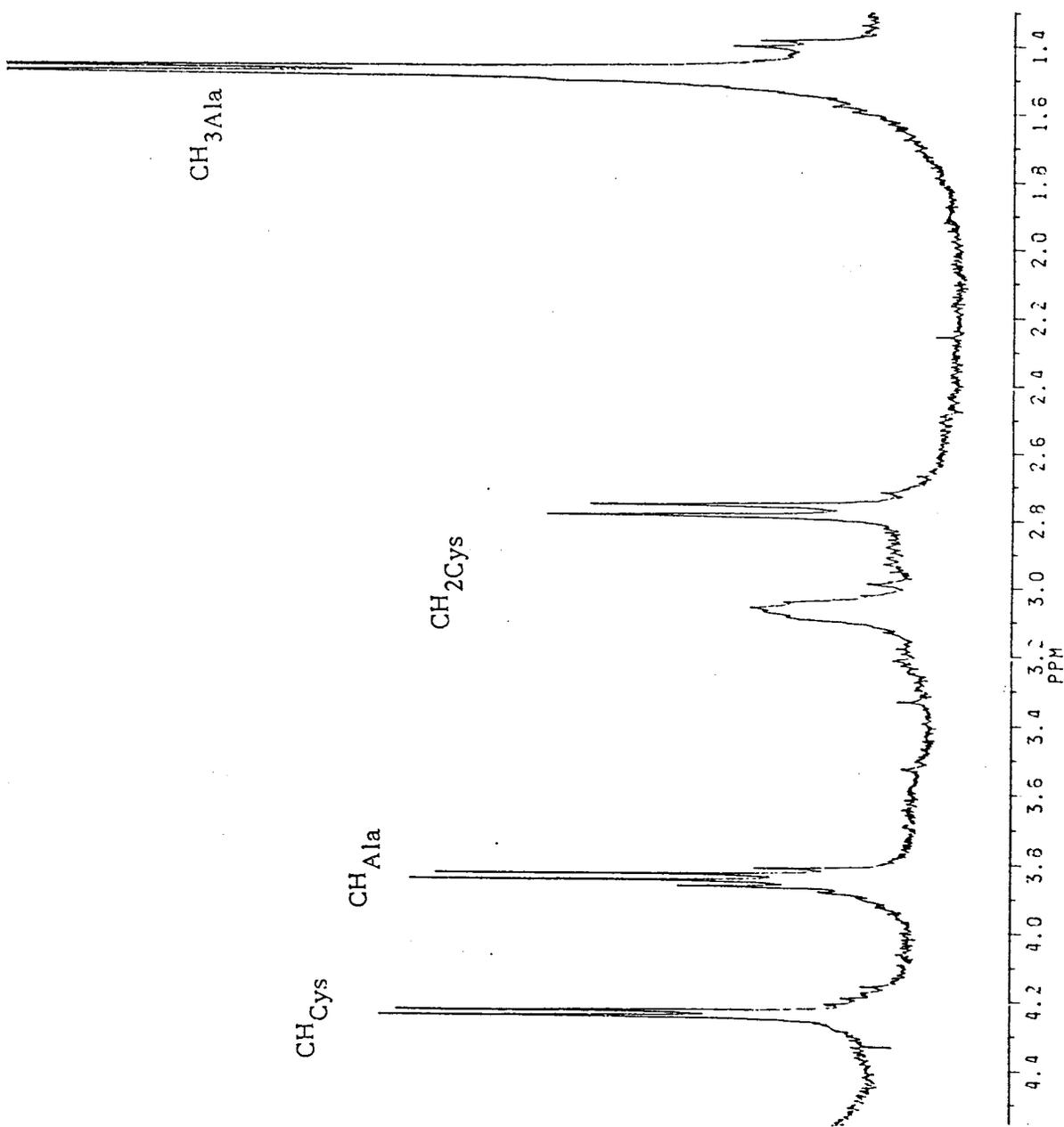


Figure 27
Spectre R.M.N. de Ala-Cys : Pd(II) en milieu basique

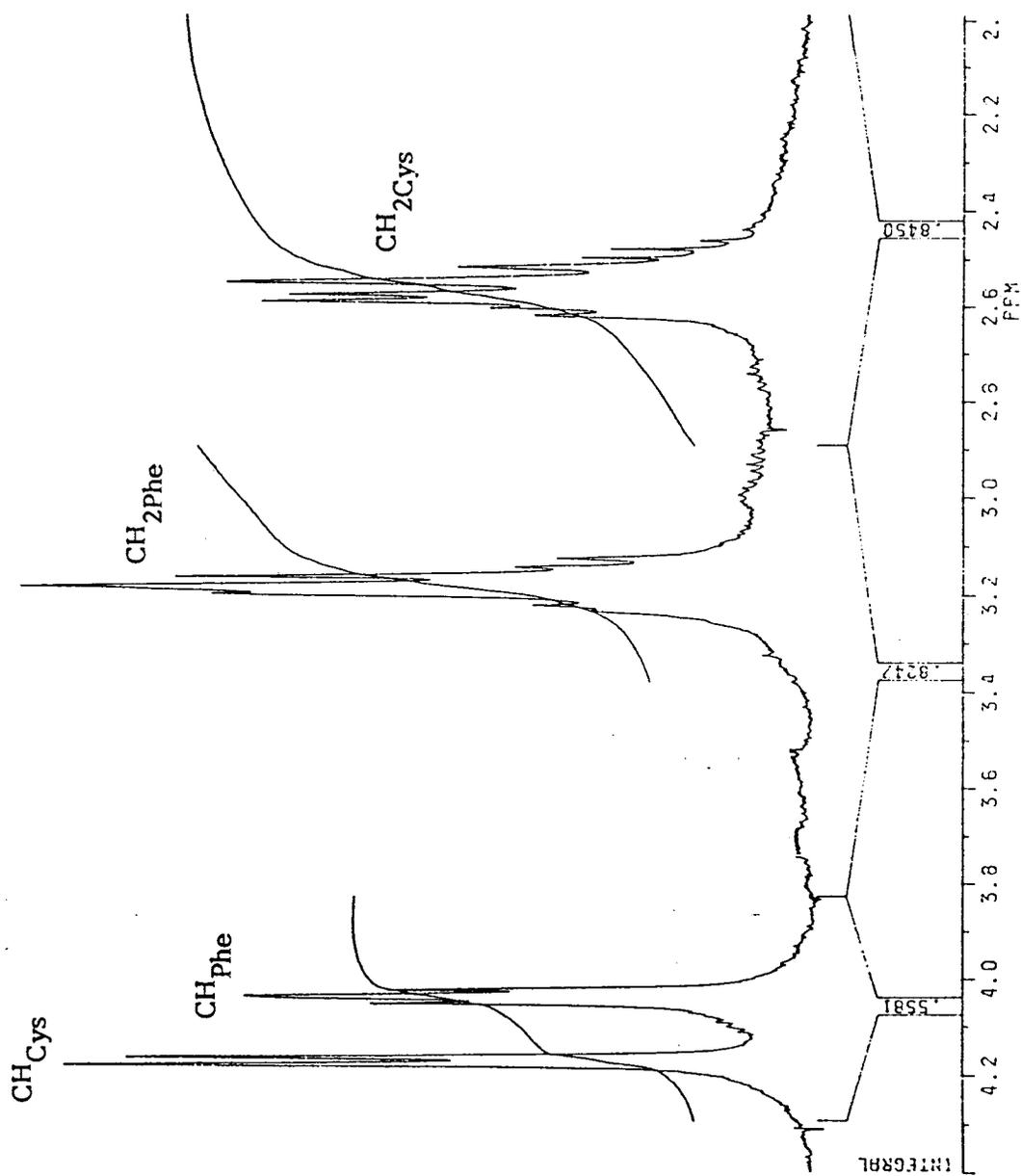


Figure 28
Spectre R.M.N. de Phe-Cys : Pd(II) en milieu basique

C/ ALA-ALA-CYS

La complexation de tripeptides avec le Pd(II) donne des spectres difficiles à interpréter car les conditions d'équilibre sont longues à obtenir. Une température de 40°C permet d'avoir des espèces stables mais qui ne correspondent pas toujours aux conditions idéales d'équilibre.

Le dichroïsme circulaire montre pour les complexes de rapport 1 à haut pH deux bandes d'absorption d-d à 475 nm et 405 nm (Tableau IV, figure 29). Ces bandes de faible énergie sont typiques d'une coordination {NH₂, N⁻, N⁻, S⁻} (figure 38).

Pour les complexes de rapport 2 les spectres obtenus sont totalement différents (figure 30). Aucune bande d'absorption n'est observée au delà de 400 nm. Toutefois, les deux bandes d'absorption d-d observées à 375 nm et 325 nm semblent indiquer une complexation {3N, 1S} (figure 31).

De manière générale, les complexes du Pd(II) avec Ala-Ala-Cys sont proches de ce qui a été constaté avec le Ni(II). Plusieurs bandes de transfert de charge soufre Pd(II) sont observées entre 230 et 300 nm.

La spectroscopie U.V.-visible confirme ces hypothèses par la présence d'une bande transition d-d à 310 nm et une bande transfert de charge du soufre à 270 nm (figure 34 à 37).

La disparition de cette dernière bande à haut pH et à fort rapport ligand-métal montre que la liaison S-Pd est peu stable car elle impliquerait 3 cycles consécutifs à 5 chaînons. La coordination se fait alors par l'intermédiaire de l'ion hydroxyle.

Les spectres RMN à haut pH montrent un blindage des CH de chaque alanine dans le peptide complexé alors que le CH de la cystéine ne subit aucun changement par rapport au peptide libre (figure 40). Ces

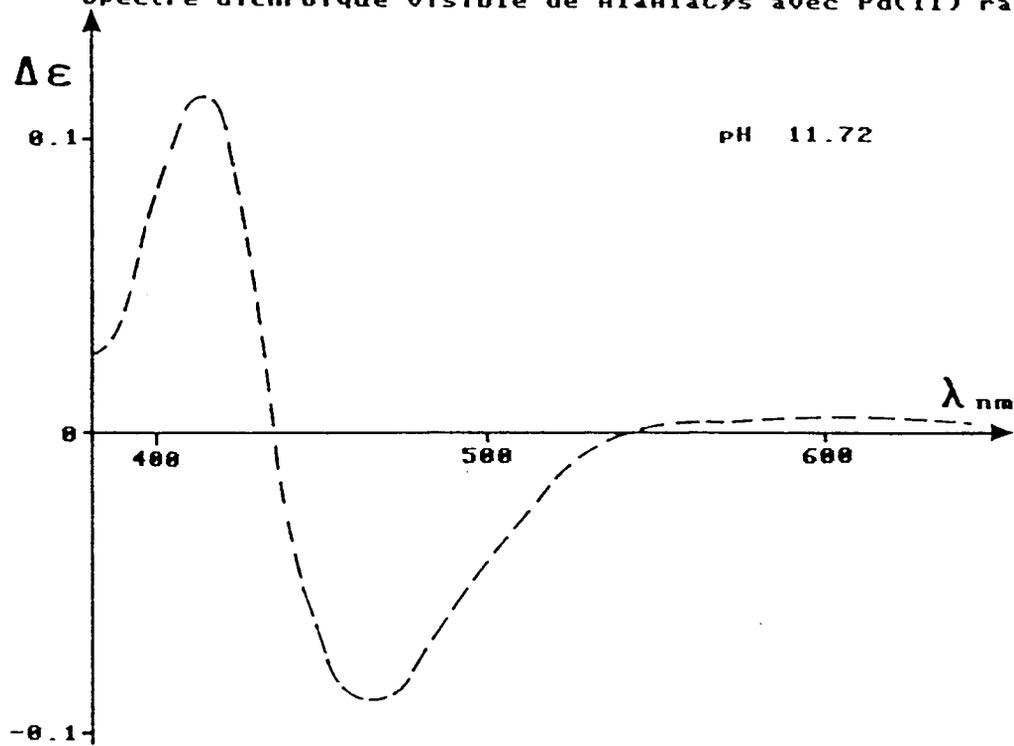
observations laissent supposer une complexation du peptide par le NH₂ terminal et le NH de la première liaison amide.

TABLEAU IV
Valeurs des principaux maxima en dichroïsme circulaire pour
Ala-Ala-Cys avec Pd(II)

pH	λ	$\Delta\epsilon$	Attribution
Rapport 1 11.72	473	-0.091	A
	418	+0.115	E
Rapport 2 11.71	375	-0.0021	d-d
	320	+0.786	d-d
	264	+0.071	S π x \rightarrow Pd
5.52	375	-0.100	d-d
	320	-0.250	d-d
	271	+0.214	S π x \rightarrow Pd
	245	+0.464	S σ y \rightarrow Pd
3.45	375	-0.250	d-d
	309	-0.238	d-d
	256	-2.000	S π x \rightarrow Pd
	238	-1.679	S σ y \rightarrow Pd
Rapport 4 11.45	478	-0.020	d-d
	329	-0.489	S π x \rightarrow Pd
	250	-0.887	S σ y \rightarrow Pd
7.28	469	+0.018	d-d
	244	+0.444	S π x \rightarrow Pd
3.34	496	-0.018	d-d
	426	-0.033	d-d
	229	-0.289	S π x \rightarrow Pd

Figure 29

Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 1



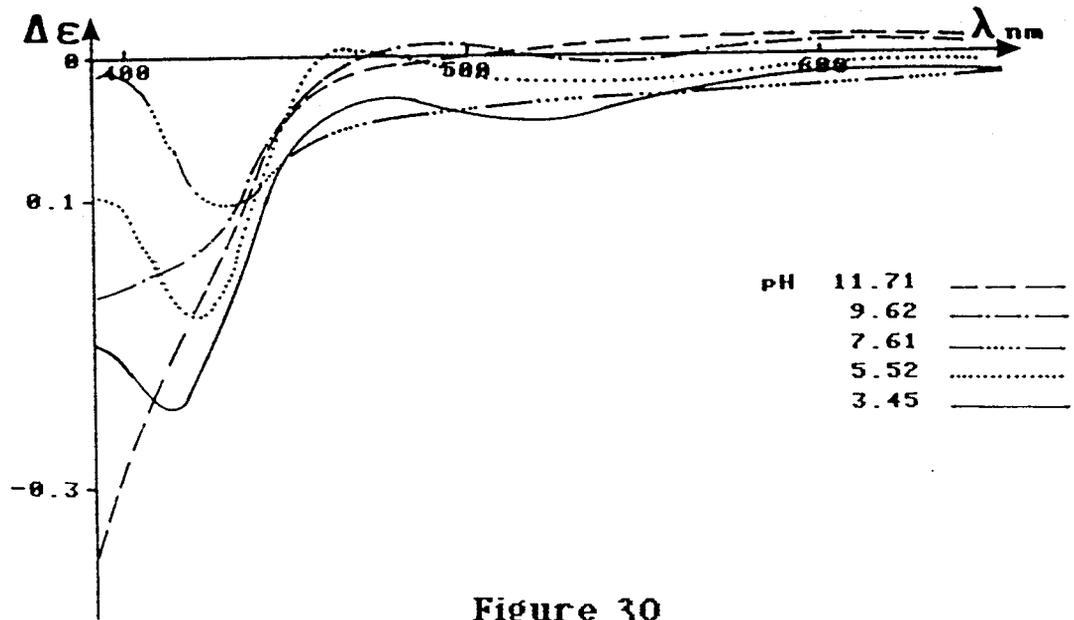


Figure 30
Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 2

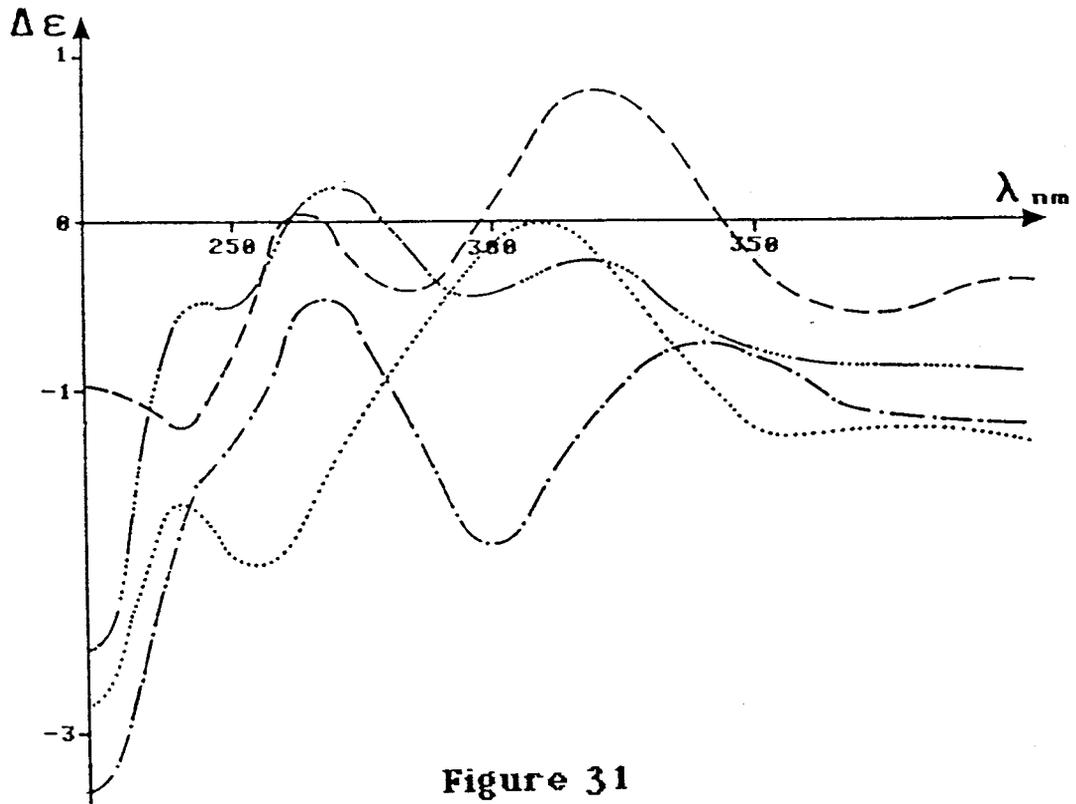


Figure 31
Spectre dichroïque U.V. de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 2

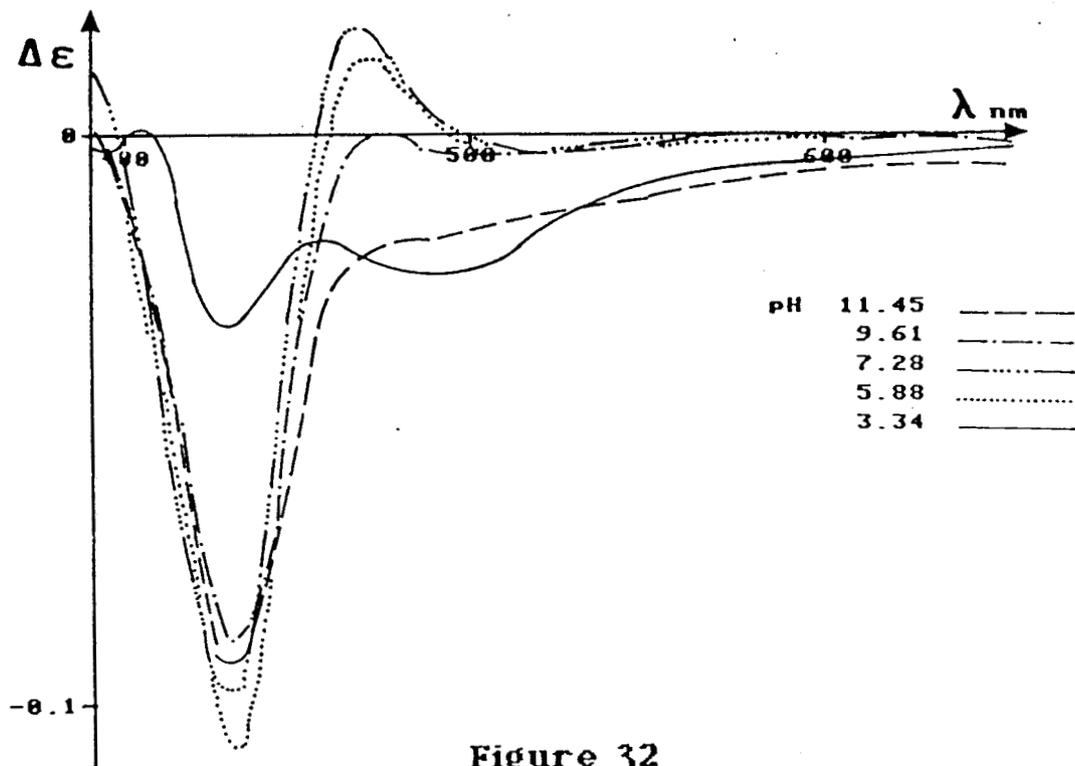


Figure 32
Spectre dichroïque visible de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 4

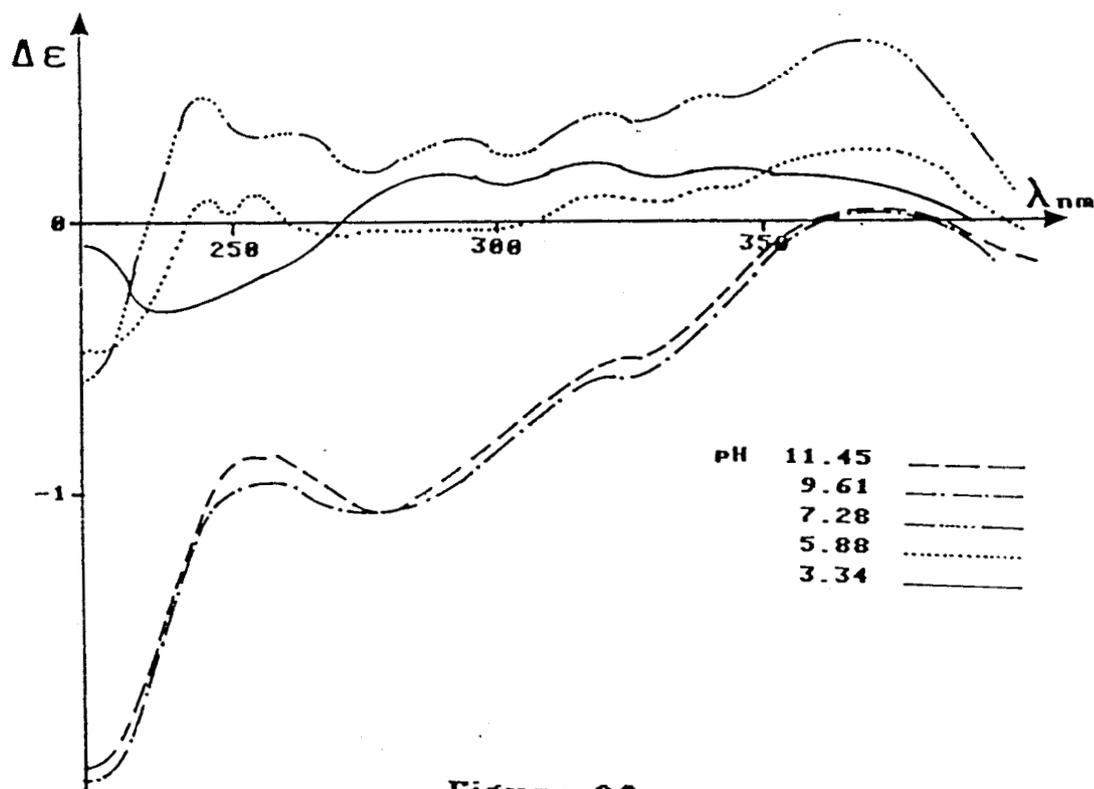


Figure 33
Spectre dichroïque U.V. de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 4

Figure 34

Spectre d'absorption de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 1

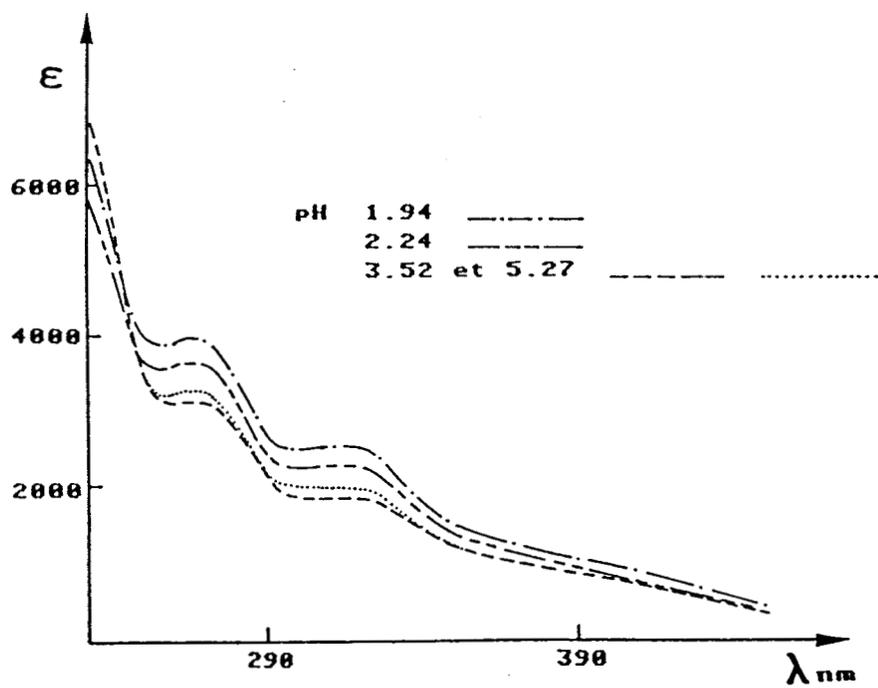
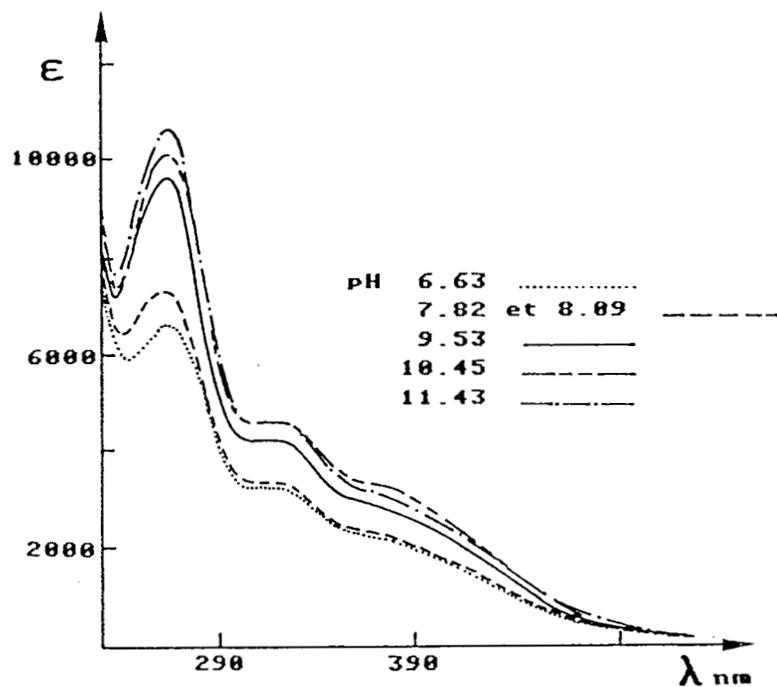


Figure 35

Spectre d'absorption de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 2

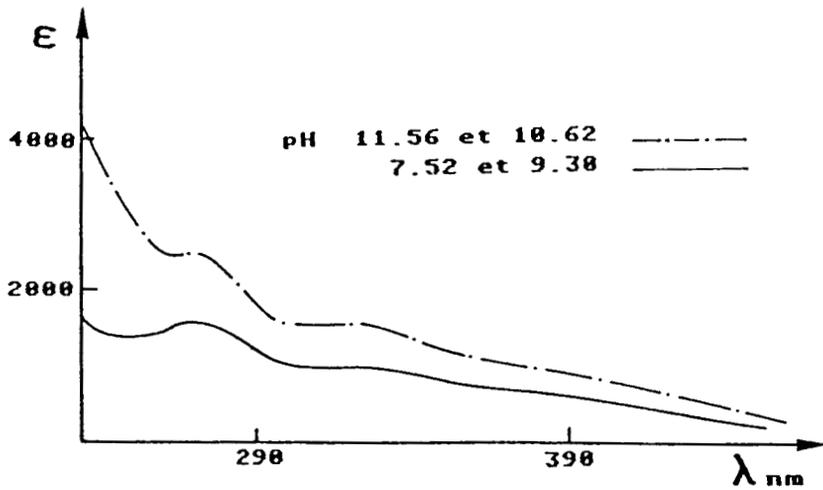
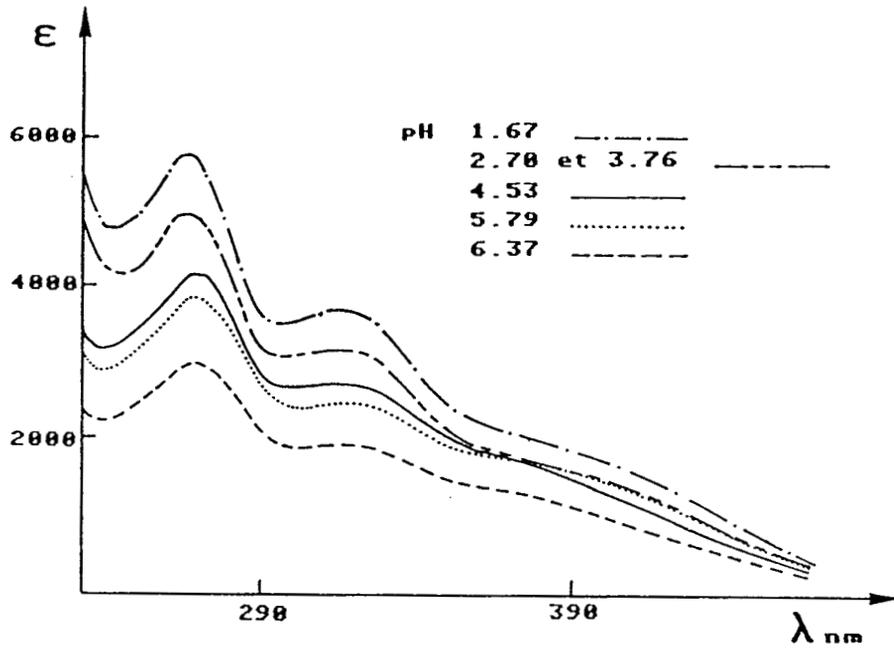


Figure 36

Spectre d'absorption de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 4

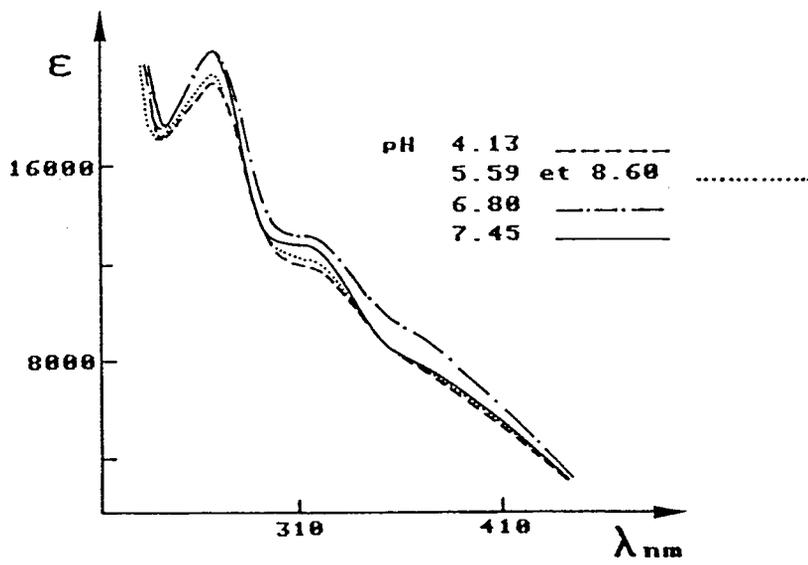
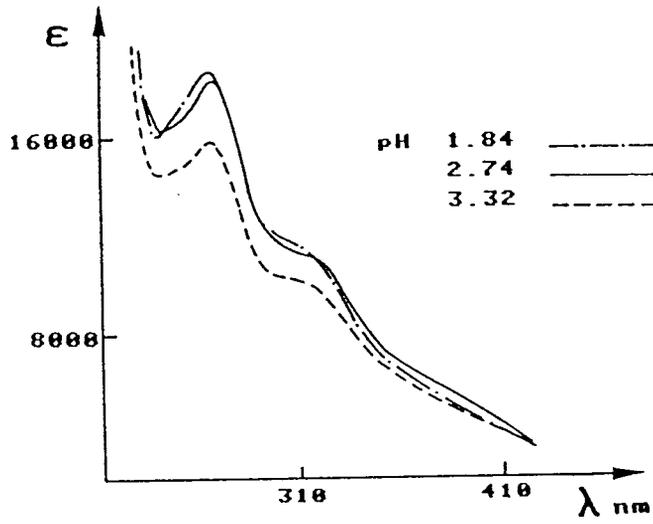
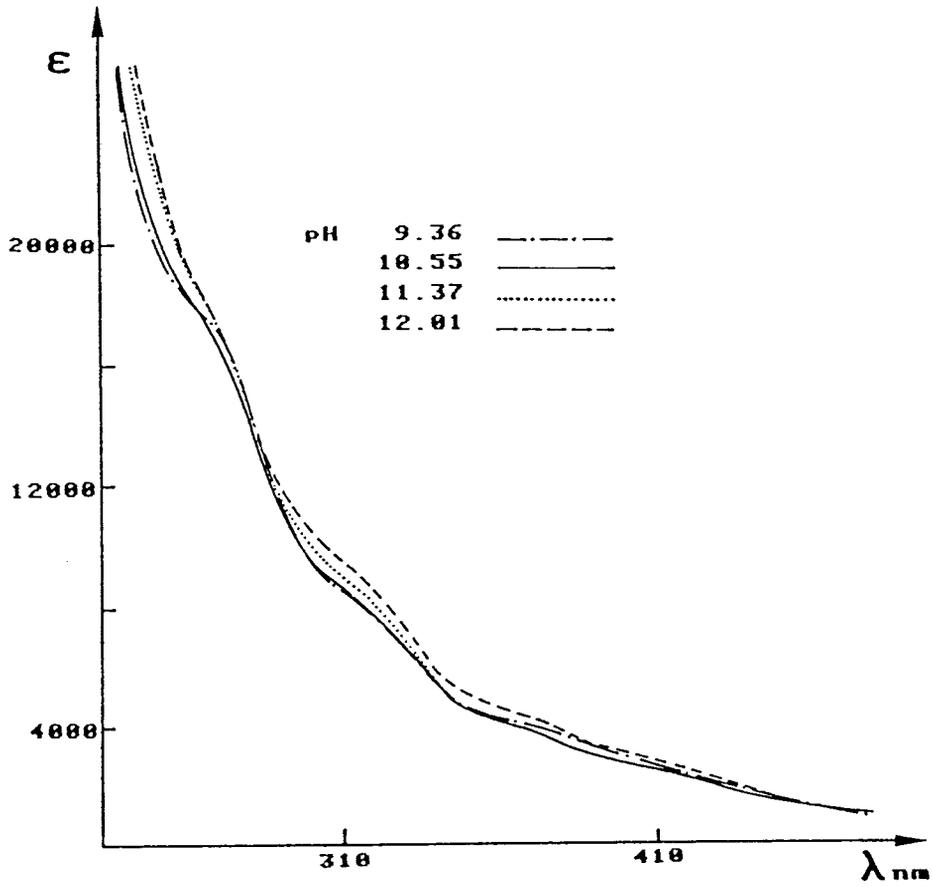


Figure 37

Spectre d'absorption de AlaAlaCys avec Pd(II) rapport 4



Principaux complexes observés avec Ala-Ala-Cys et Pd(II)

Figure 38 : Complexe PdA en rapport 1

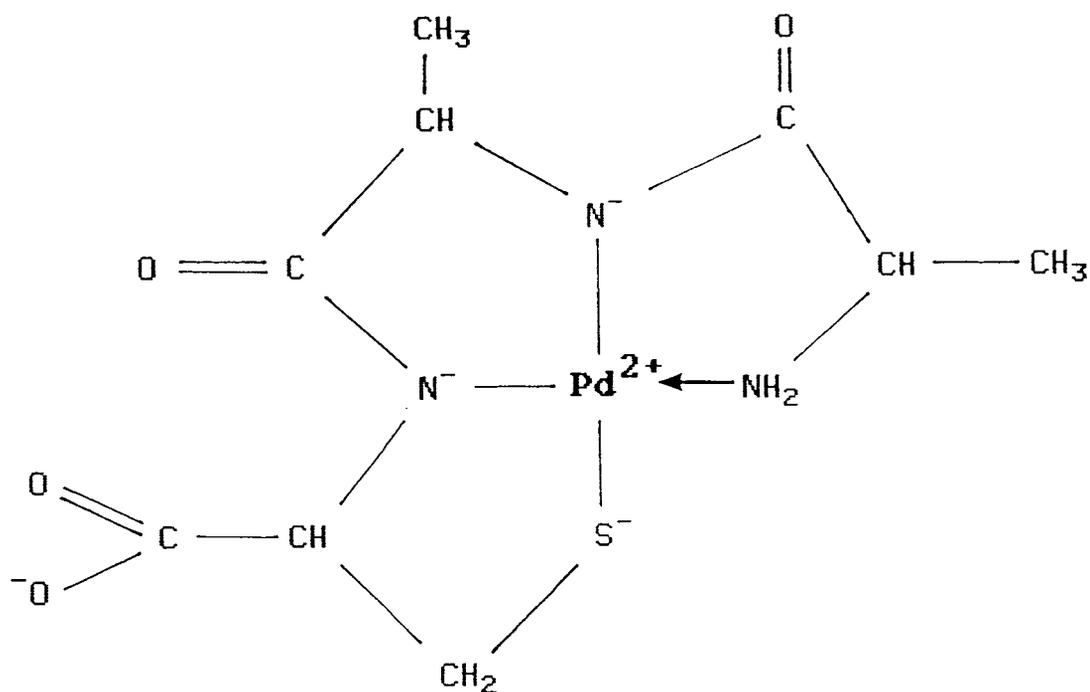
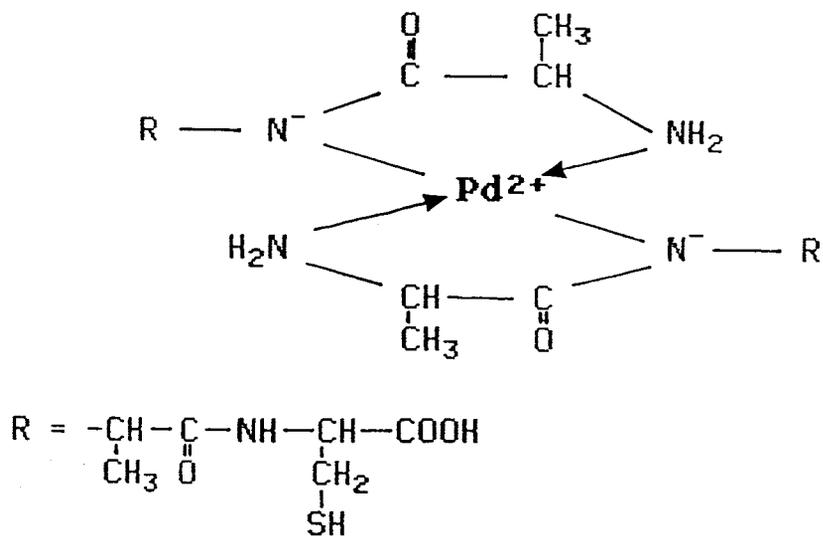


Figure 39 : Complexe PdA₂ en rapport 2



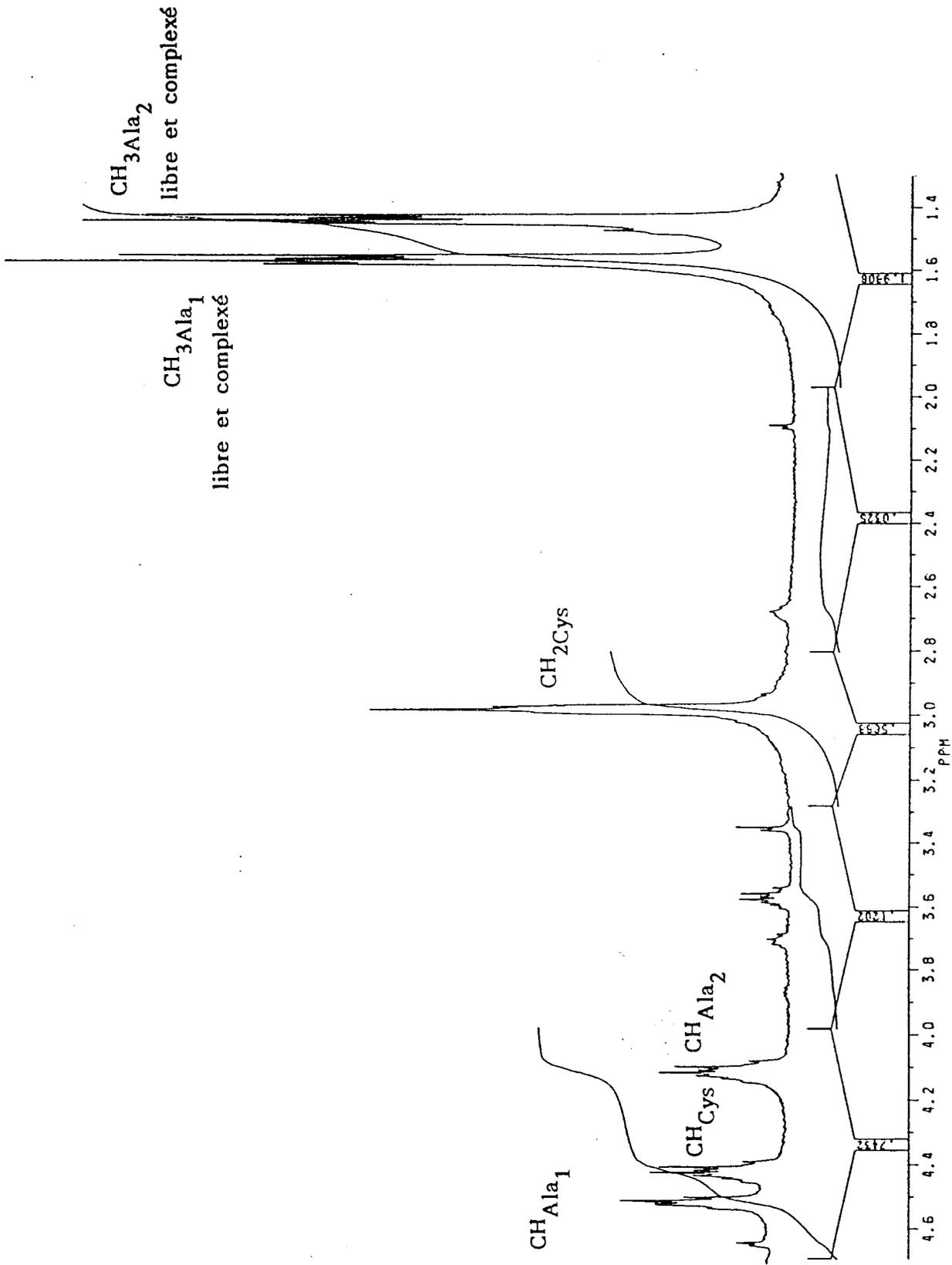


Figure 40

Spectre R.M.N. de Ala-Ala-Cys : Pd(II) en milieu basique

**D/ CYS-ALA-CYS ET
CYS-ALA-ALA-CYS**

Les problèmes de stabilité rencontrés lors de la formation des complexes Ala-Ala-Cys : Pd sont accrus, ici, par la présence, semble-t-il, d'une seconde cystéine. Les complexes obtenus ne répondent pas aux conditions idéales d'équilibre et les spectres enregistrés ne permettent pas de conclure sur la nature des espèces formées. Toutefois, certaines bandes d'absorptions peuvent être observées.

Ainsi, la complexation de Cys-Ala-Cys avec le palladium se traduit par une bande d'absorption d-d à 410 nm aussi bien en spectroscopie visible qu'en dichroïsme : cette bande laisse supposer la présence de l'espèce PdAH₂ (figure 61) observée aussi avec Ni(II). Cette dernière observation a été effectuée à haut pH et surtout pour de forts rapports ligand-métal. Dans les mêmes conditions, on remarque dans le domaine U.V., la présence de bandes de transfert de charge de faible intensité pour un rapport de 1 alors que pour un rapport de 4 ces bandes sont très intenses à 250 et 295 nm. Ceci montre que la liaison S-Pd est très instable probablement pour des raisons stériques (figures 41, 42 et 45, 46).

La spectroscopie U.V.-visible montre essentiellement pour le complexe Cys-Ala-Ala-Cys : Pd(II) deux bandes de transfert de charge à 244 et 294 nm (figures 54 à 59) qui disparaissent à haut pH et à fort rapport ligand-métal. Ce phénomène serait dû à la formation du complexe PdA₂ (1,9,10,11) (figure 60) qui évoluerait ensuite vers la formation de structures oligomériques.

L'apparition de précipité, lors de l'étude RMN, est encore plus accentué ici qu'avec le Ni(II) et ce phénomène ne s'atténue pas ni par addition de base, ni par augmentation du rapport ligand-métal (figures 62 et 63).

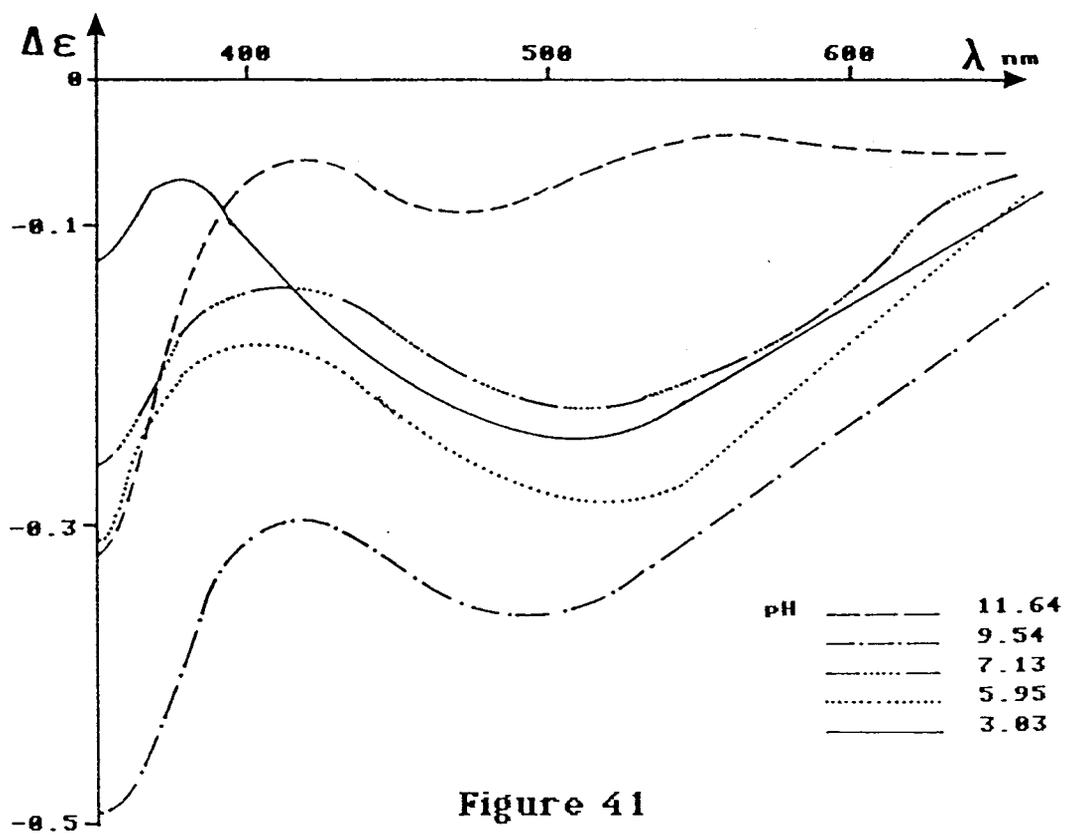


Figure 41
Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Pd(II) rapport 1

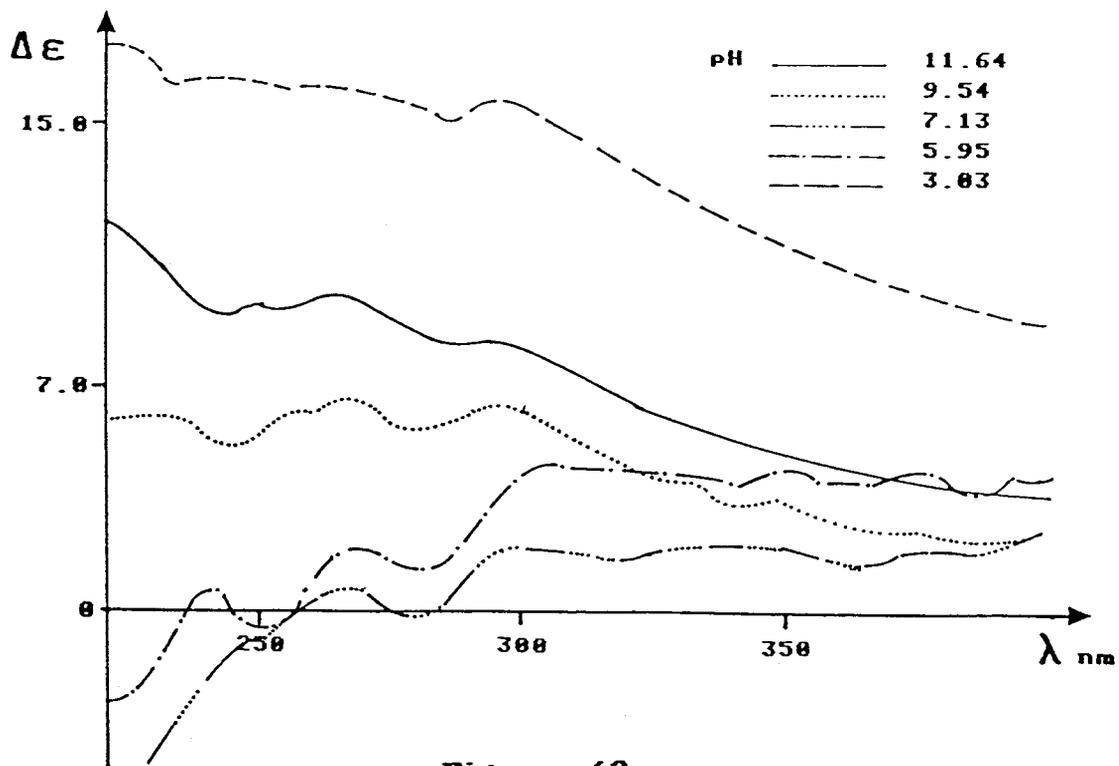


Figure 42
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaCys : Pd(II) rapport 1

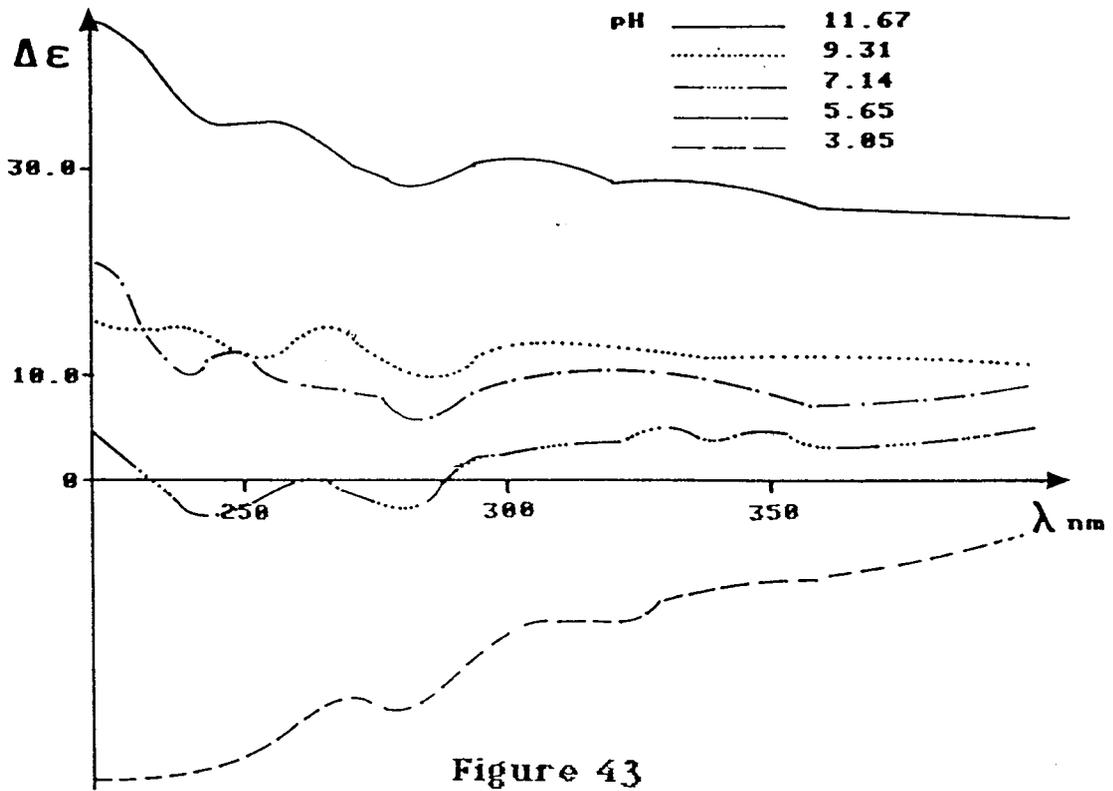


Figure 43
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaCys : Pd(II) rapport 2

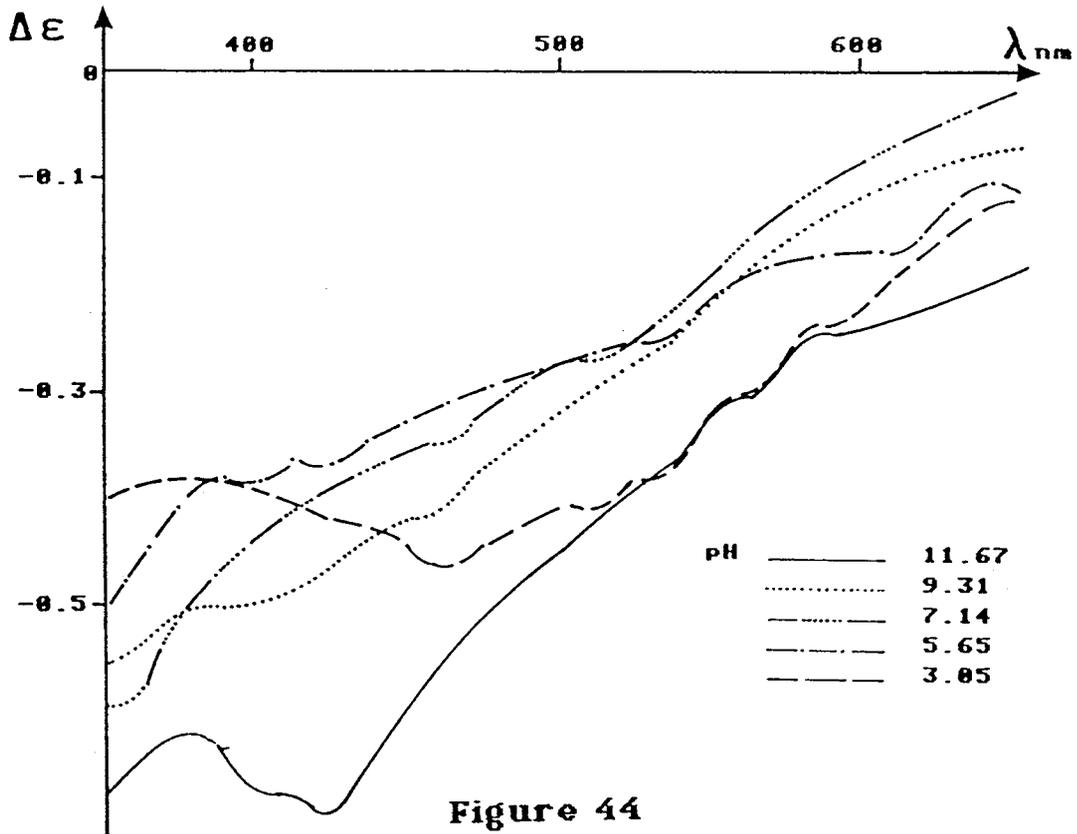


Figure 44
Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Pd(II) rapport 2

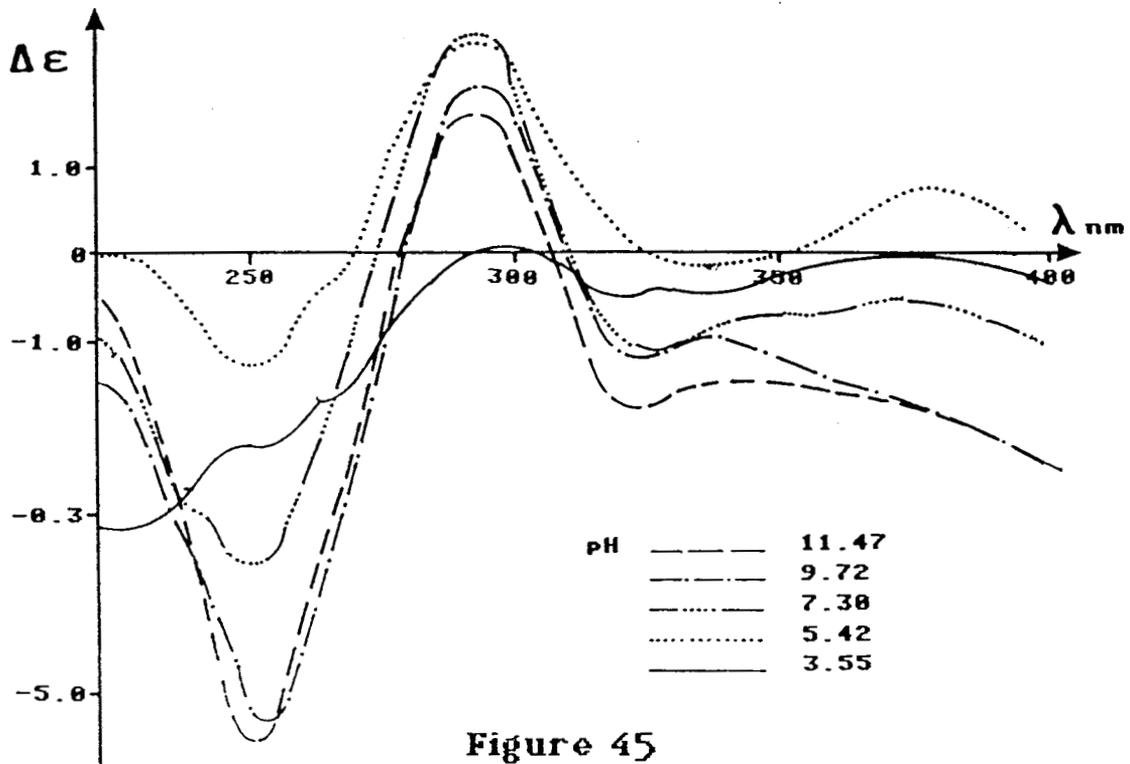


Figure 45
Spectre dichroïque U.V. de CysAlaCys : Pd(II) rapport 4

Figure 46

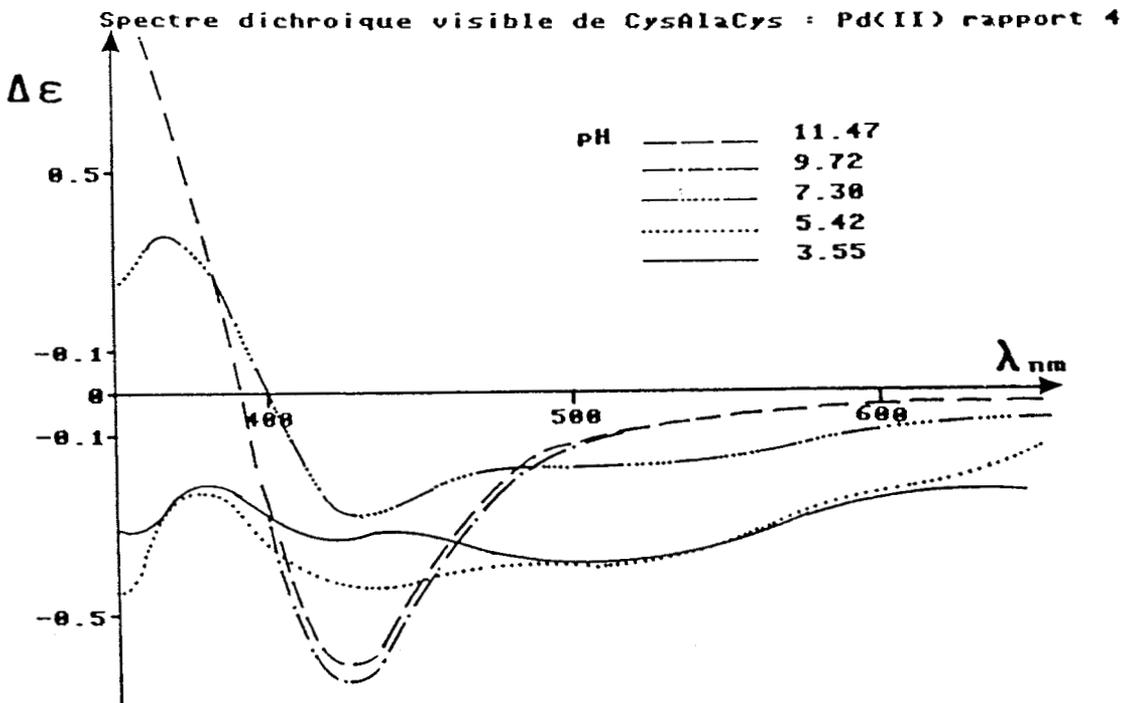


Figure 46
Spectre dichroïque visible de CysAlaCys : Pd(II) rapport 4

Figure 47

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Pd(II) rapport 1

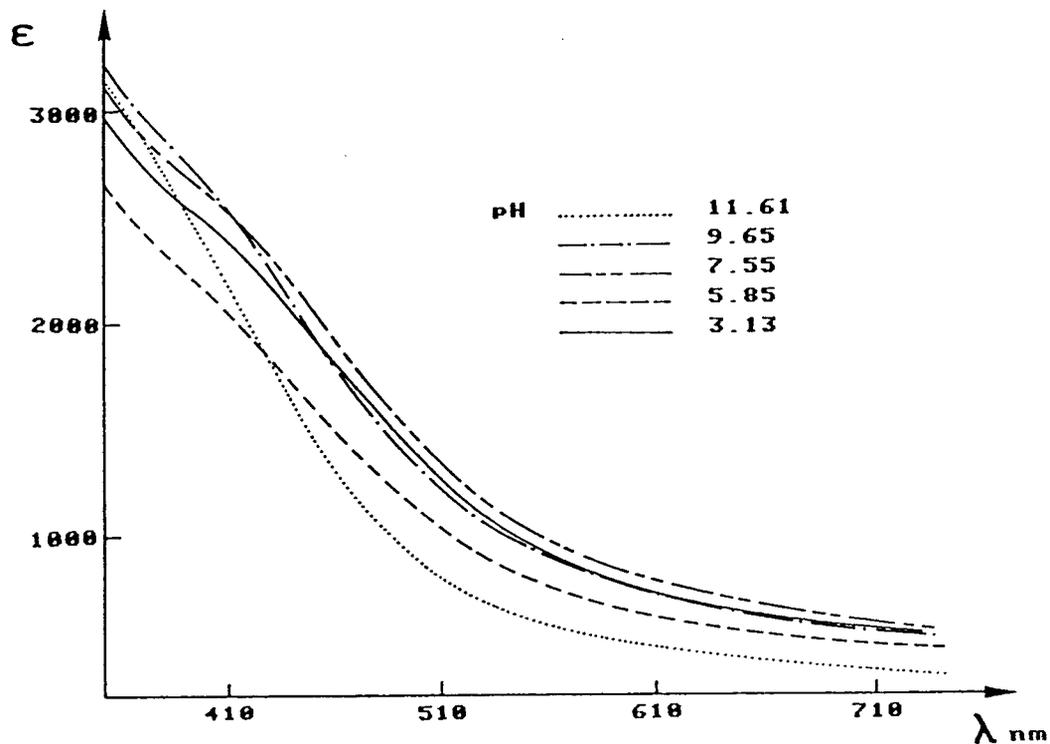


Figure 48

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Pd(II) rapport 1

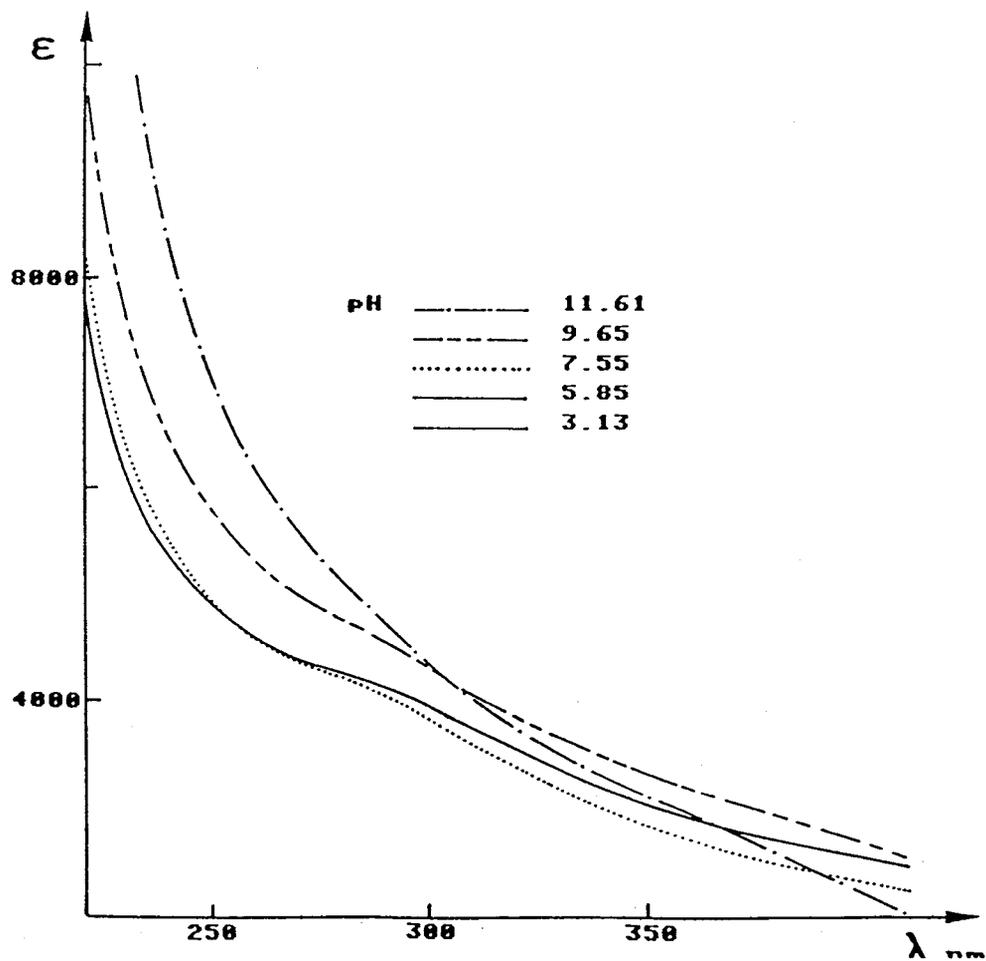


Figure 49

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Pd(II) rapport 2

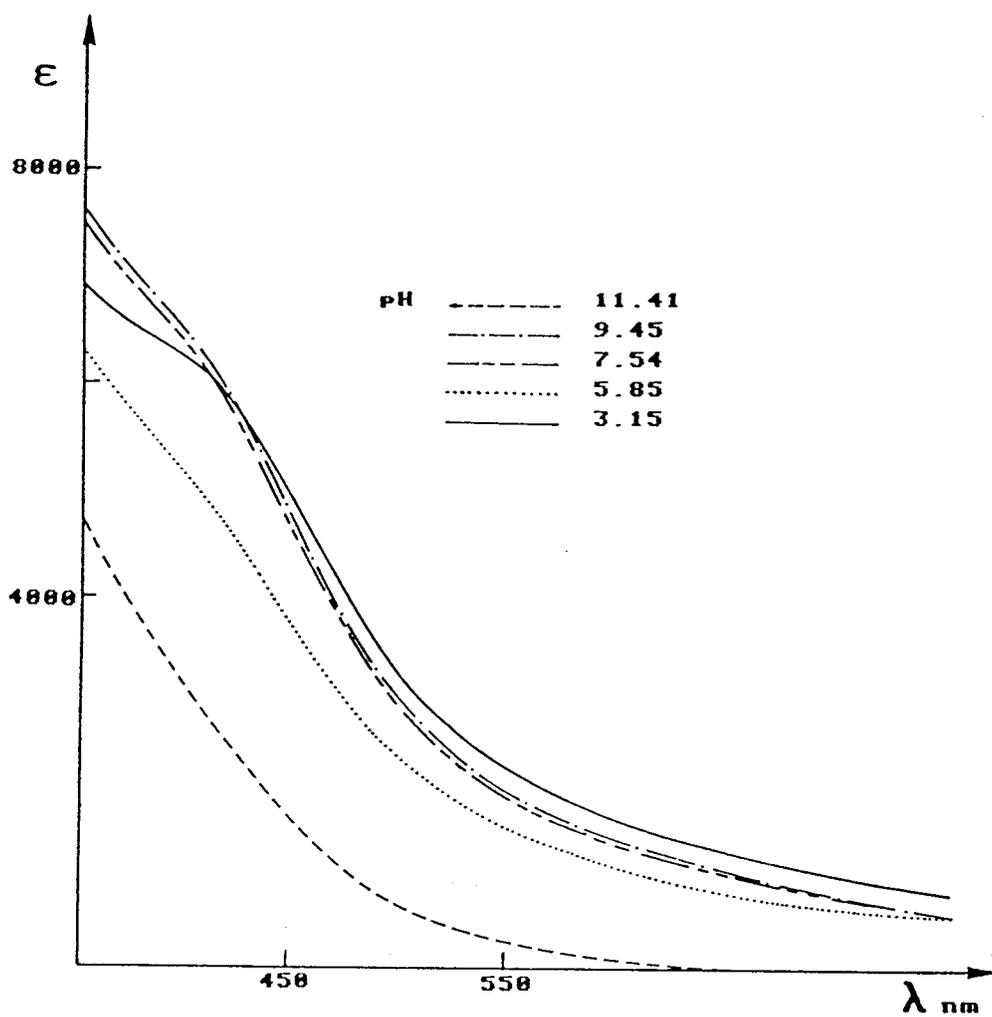


Figure 50

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Pd(II) rapport 2

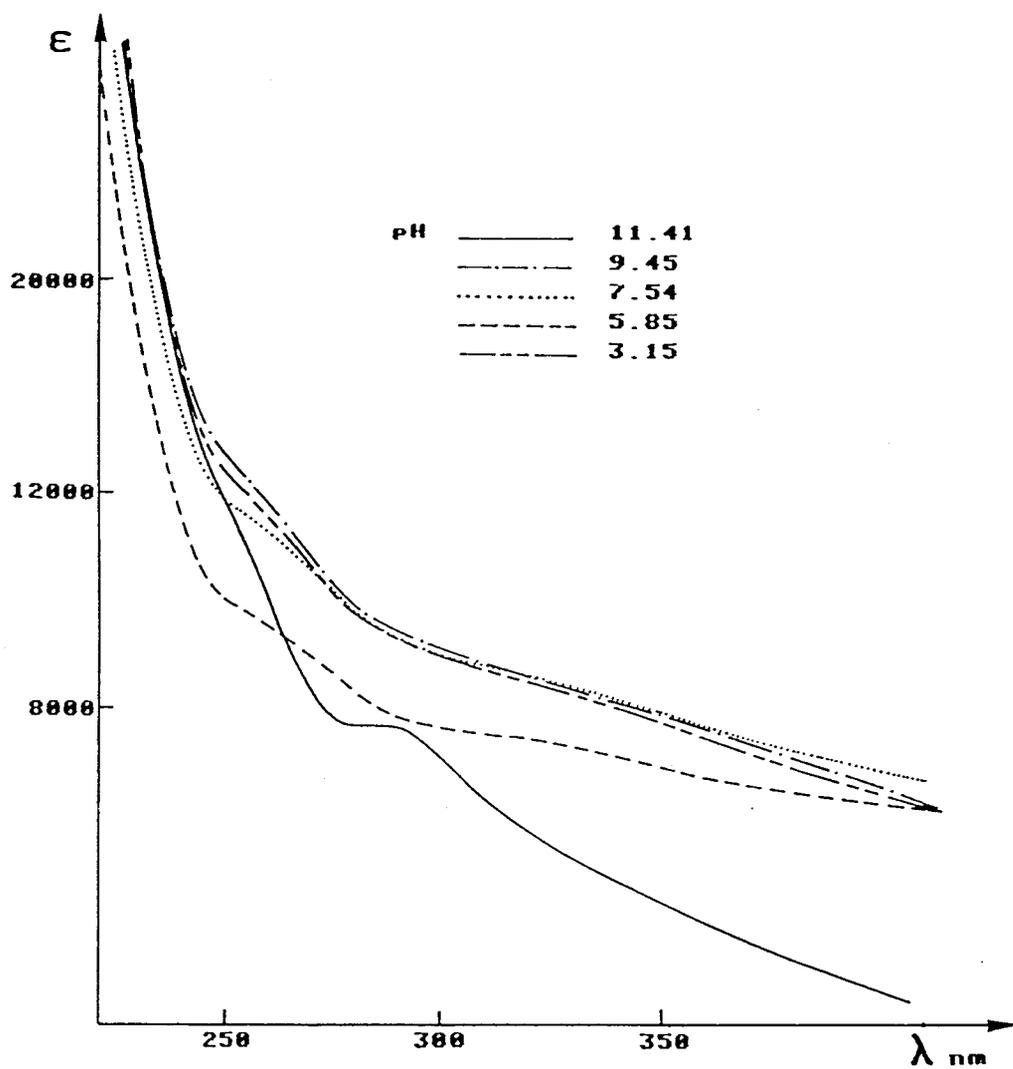




Figure 51

Spectre d'absorption de CysAlaCys : Pd(II) rapport 4

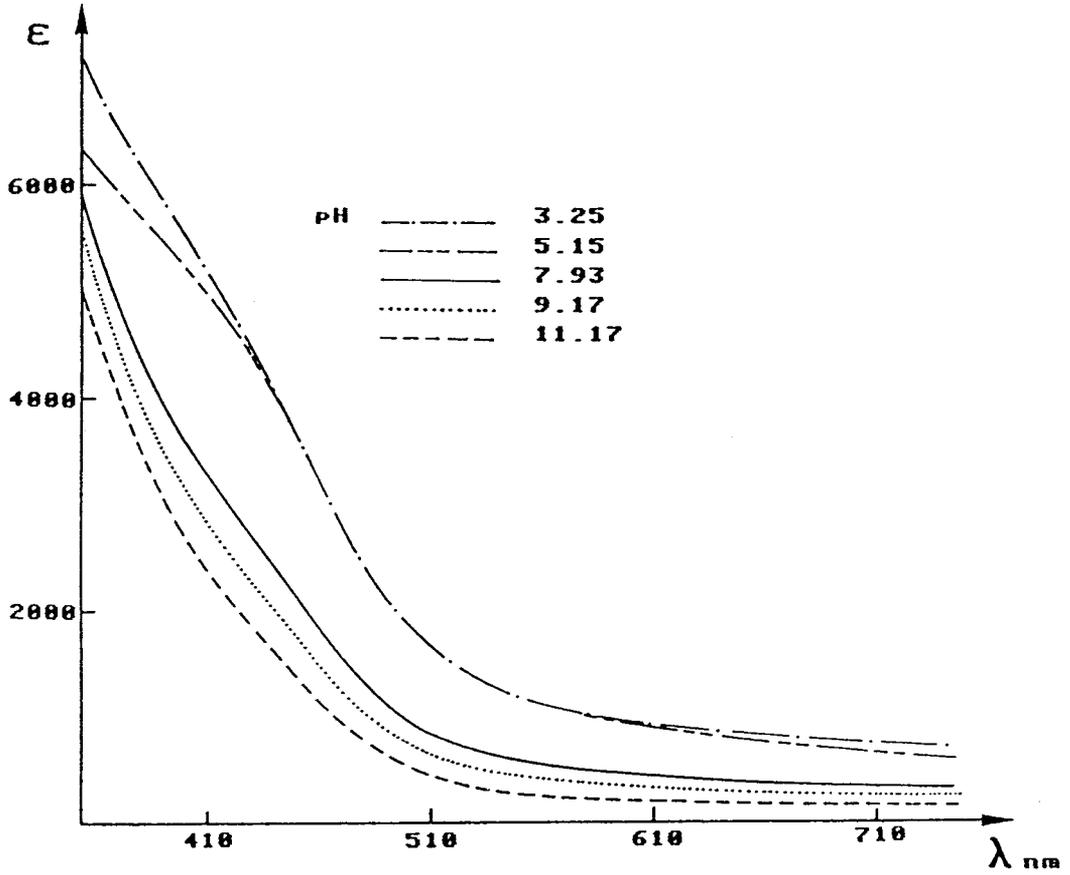


Figure 52

Spectre d'absorption de CysAlaCys · Pd(II) rapport 4

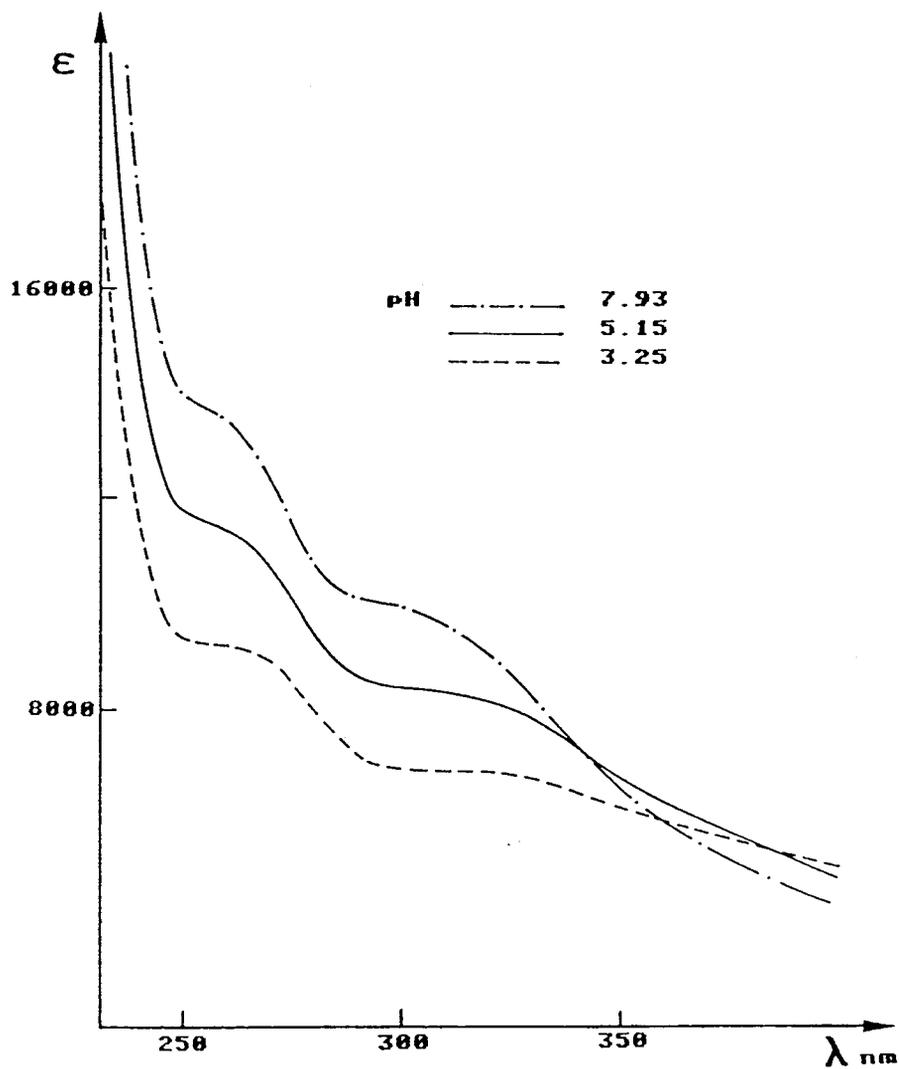


Figure 53

Spectre d'absorption de CysAlaCys - Pd(II) rapport 4

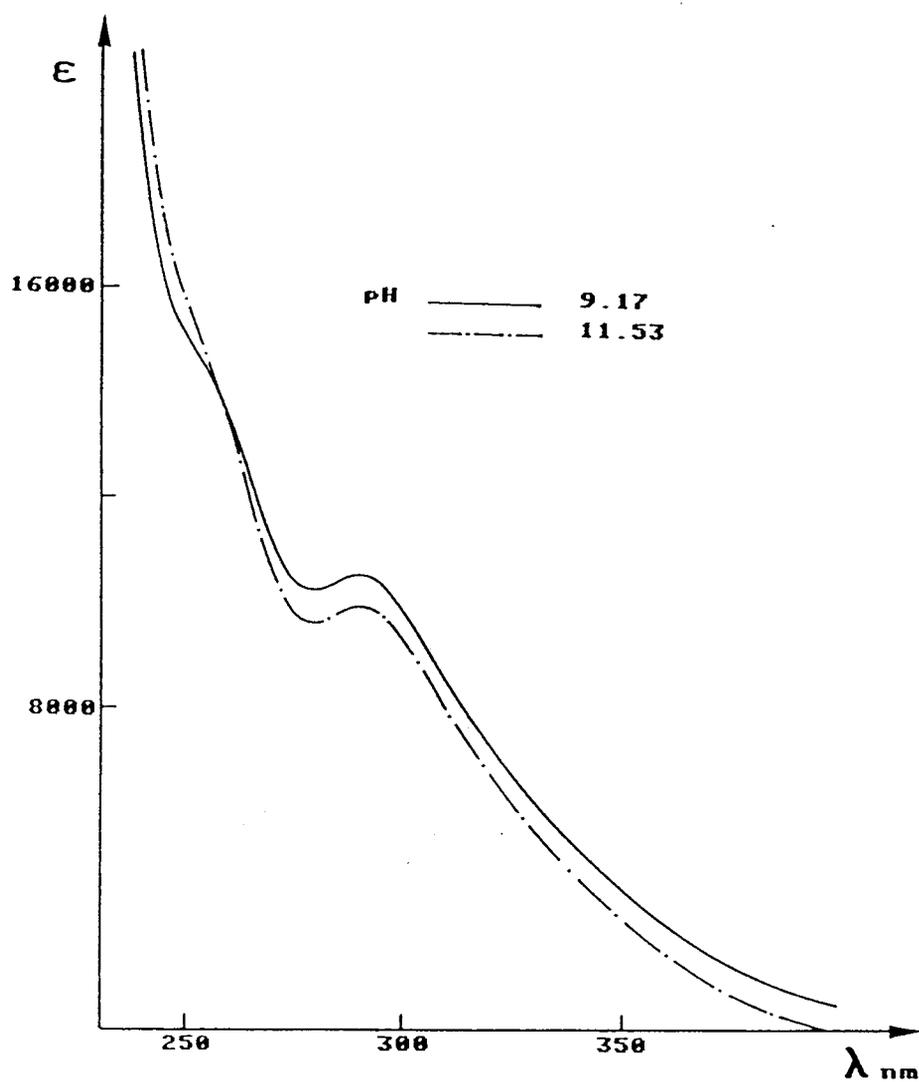


Figure 54

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 1

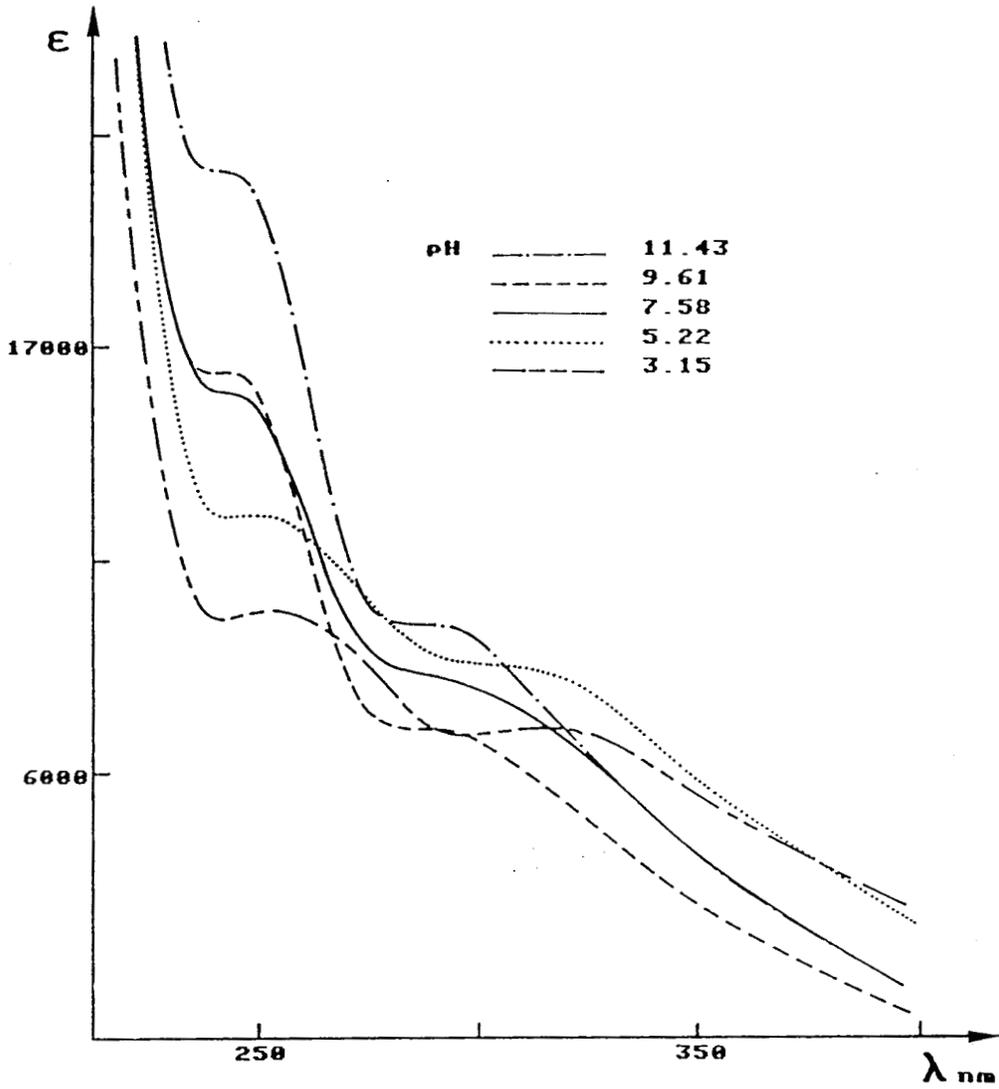


Figure 55

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 2

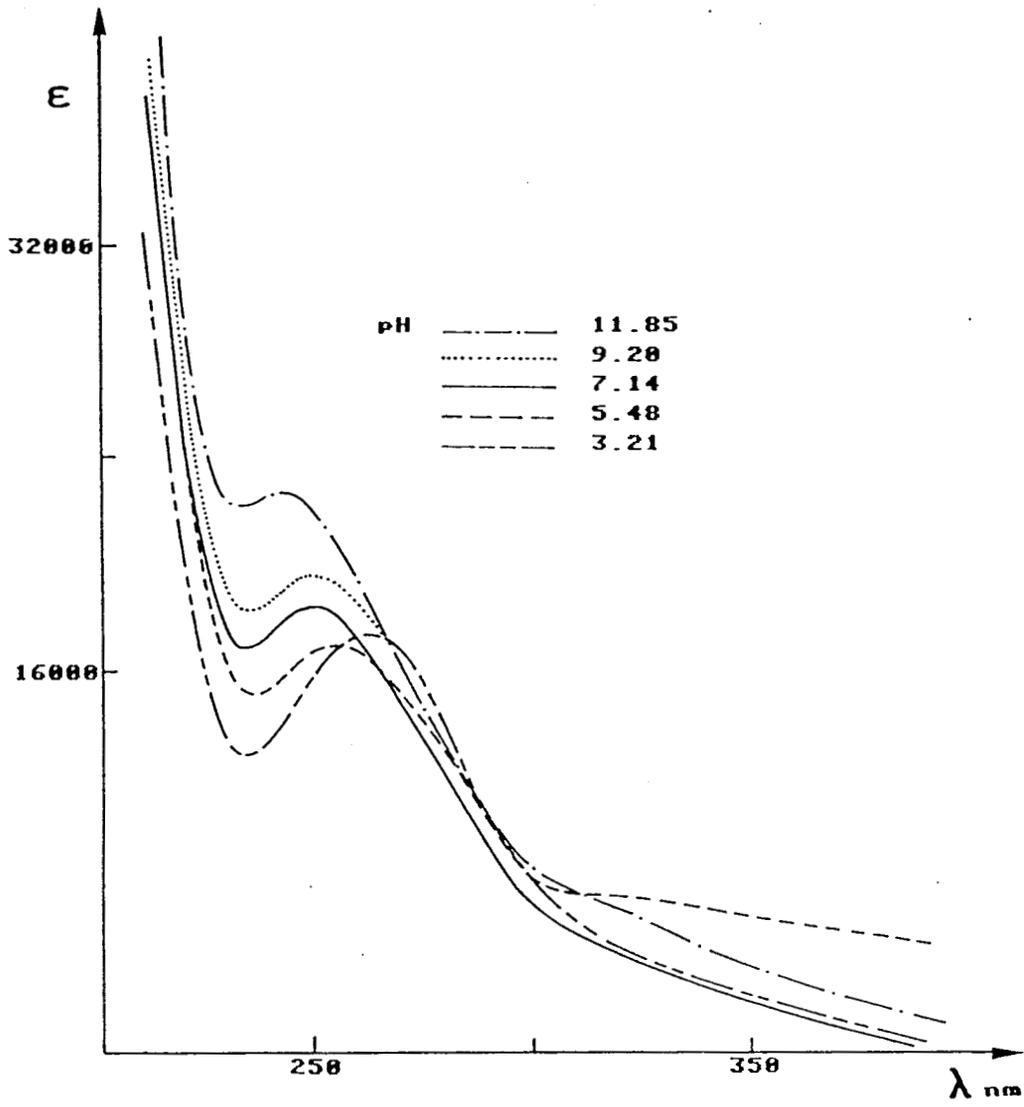


Figure 56

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 4

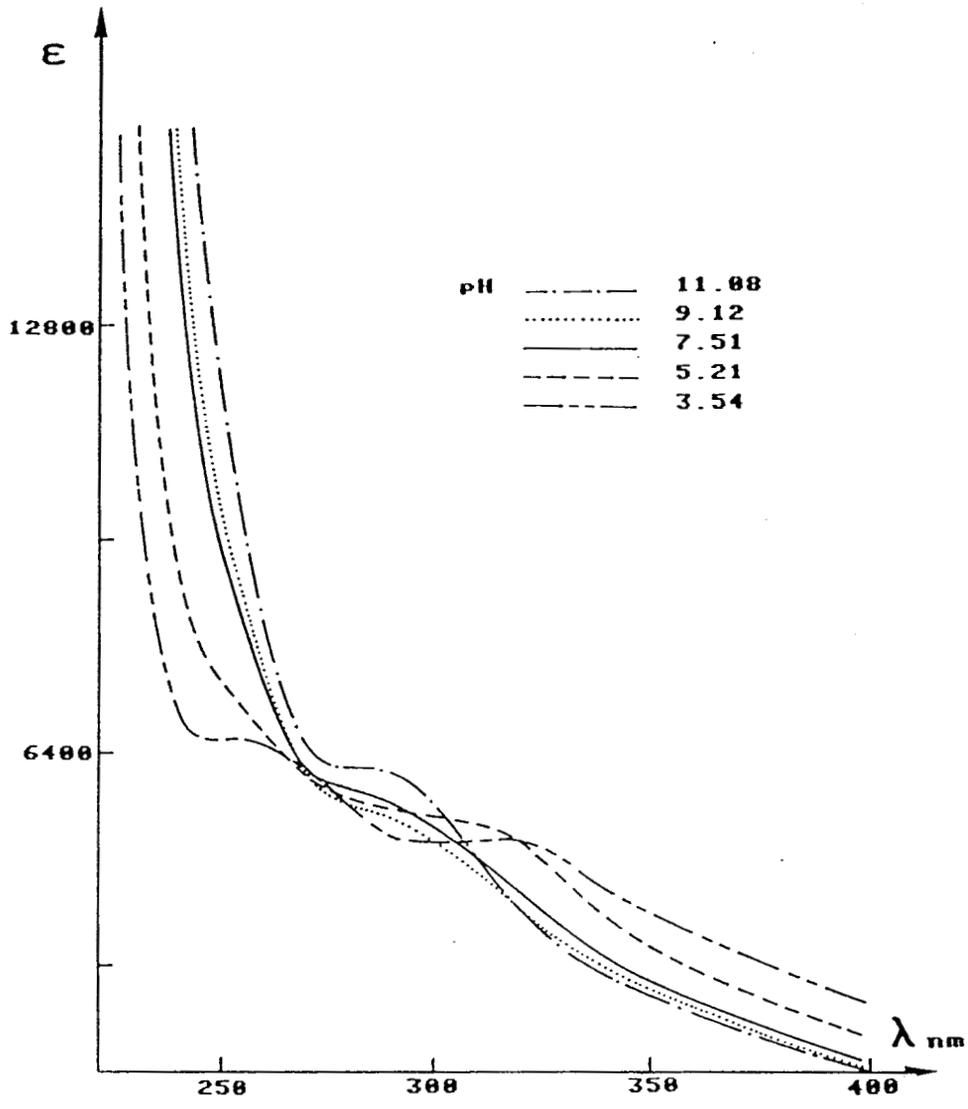


Figure 57

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 1

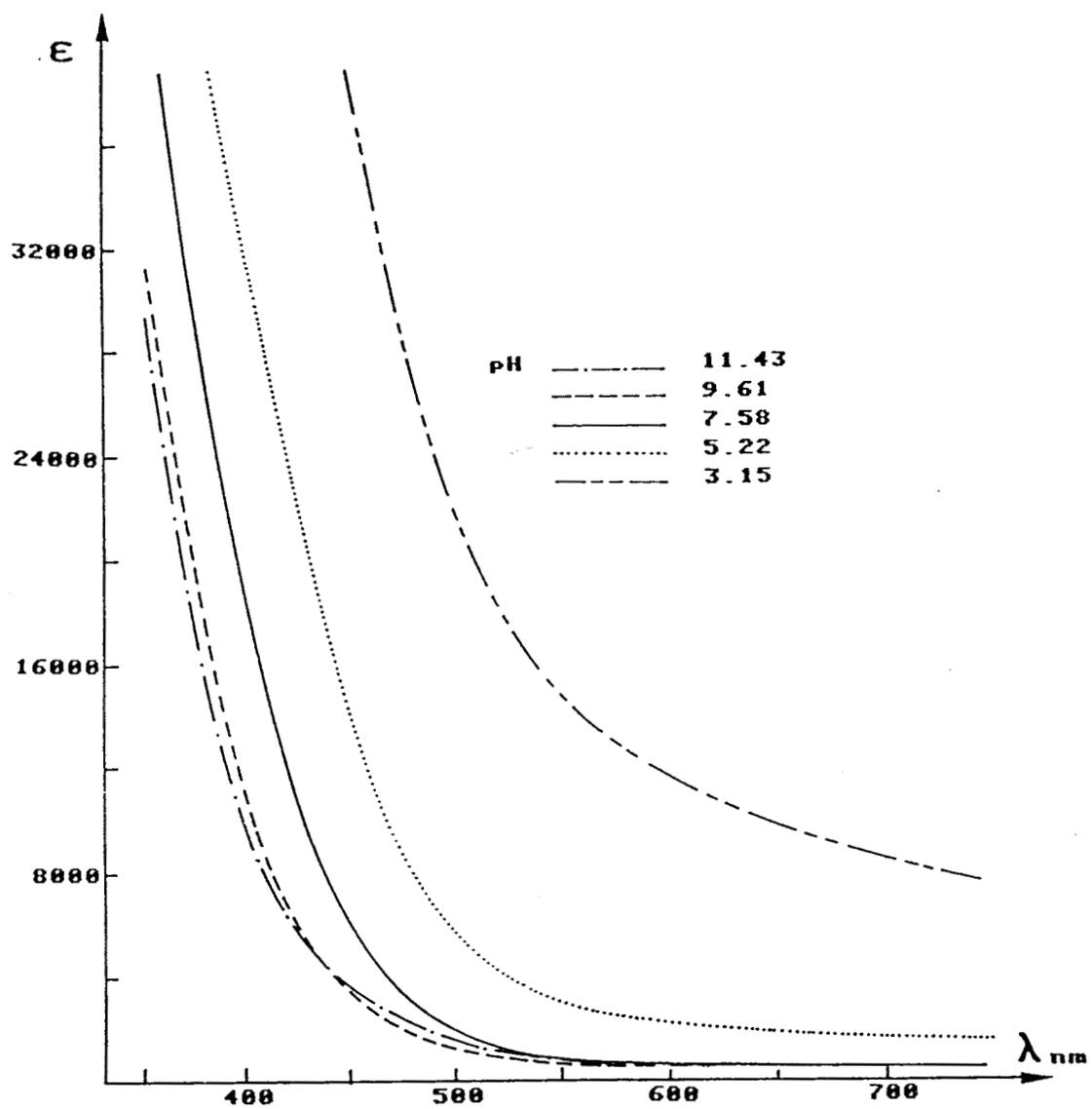


Figure 58

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 2

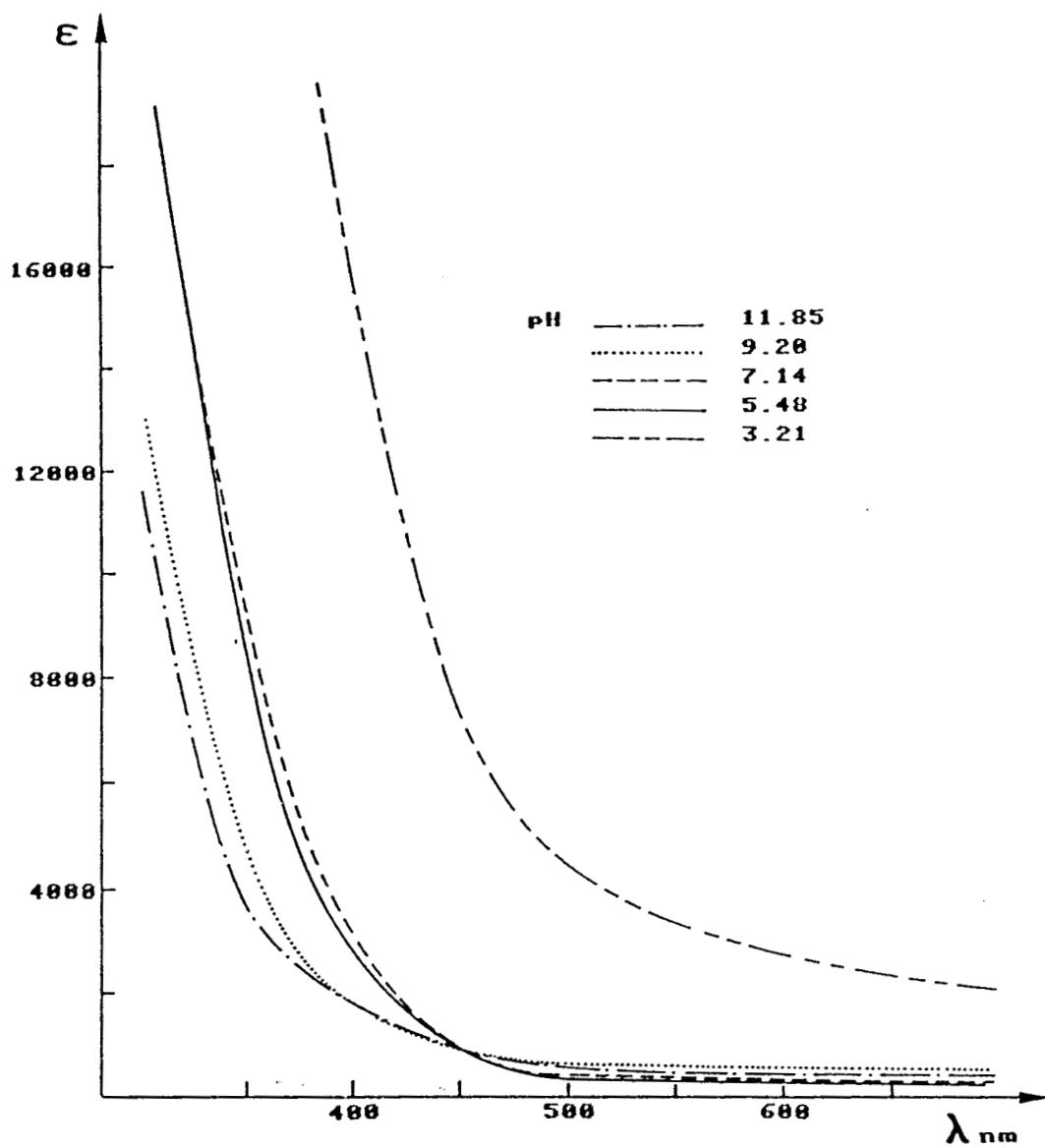
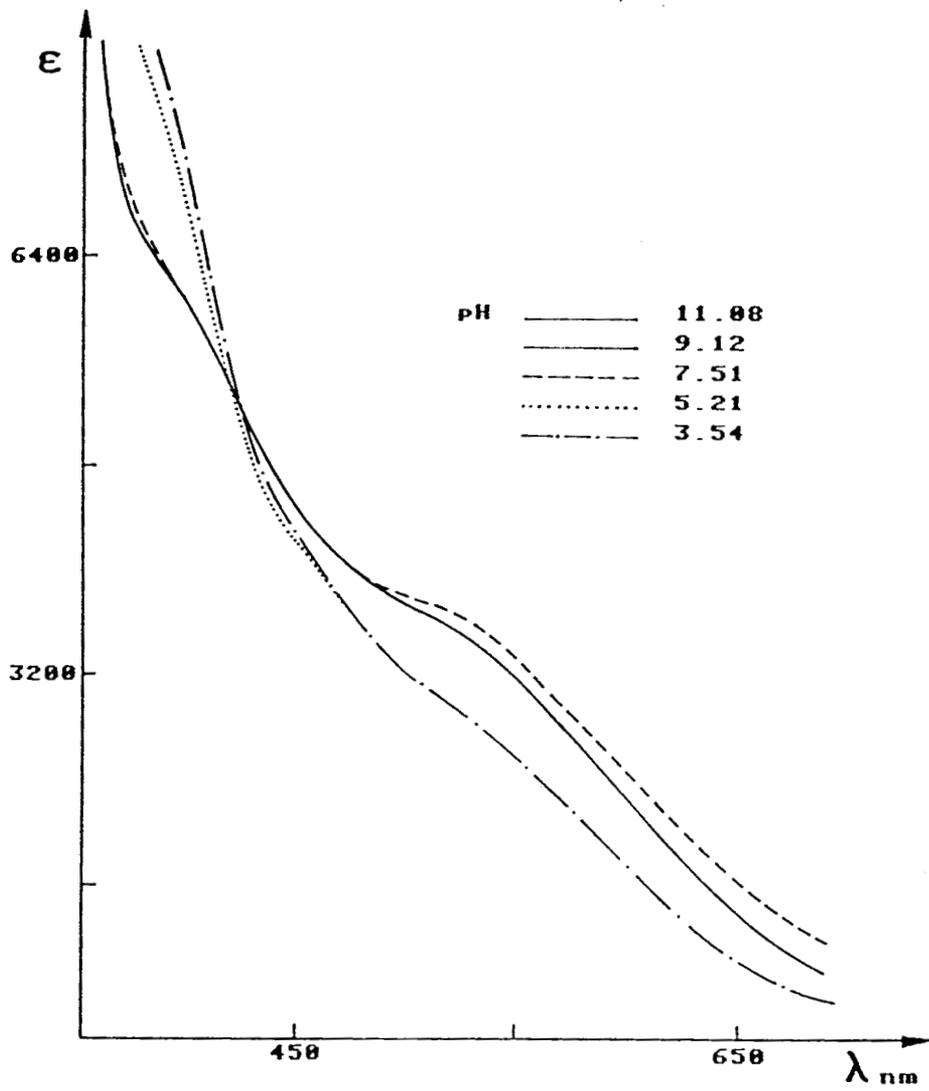


Figure 59

Spectre d'absorption de CysAlaAlaCys : Pd(II) rapport 4



Principaux complexes : Cys-Ala-Cys ou Cys-Ala-Ala-Cys et Pd(II)

Figure 60 : Complexe PdA₂ en rapport 2

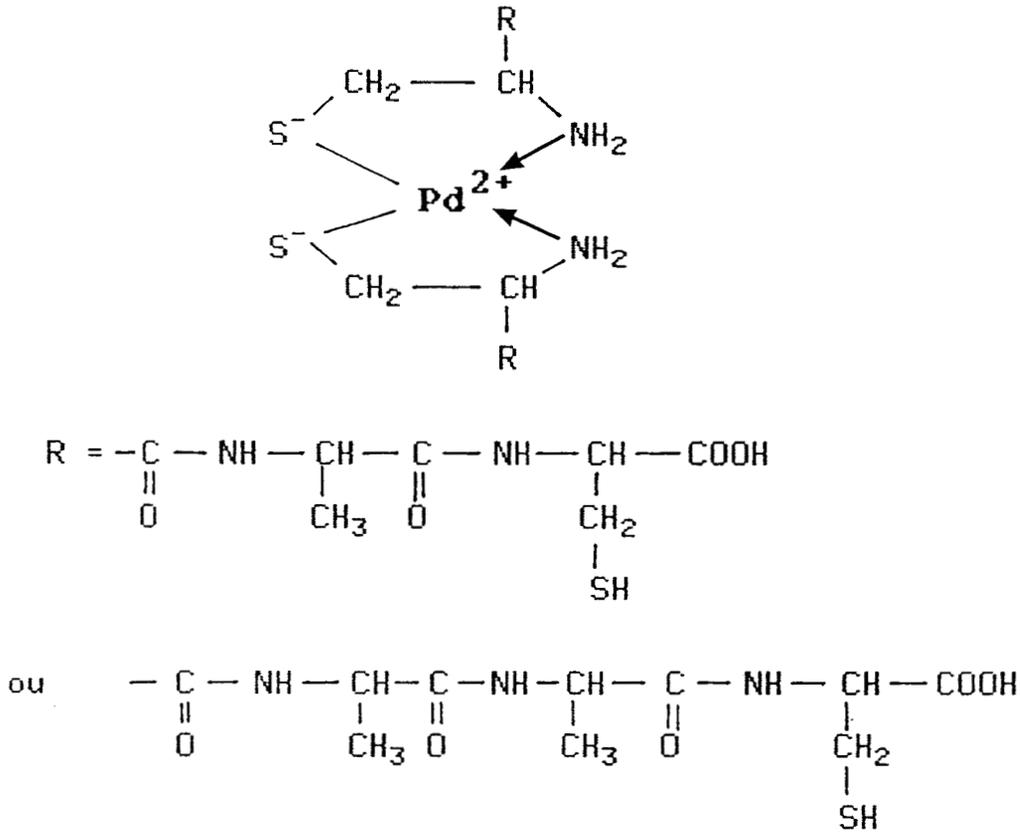
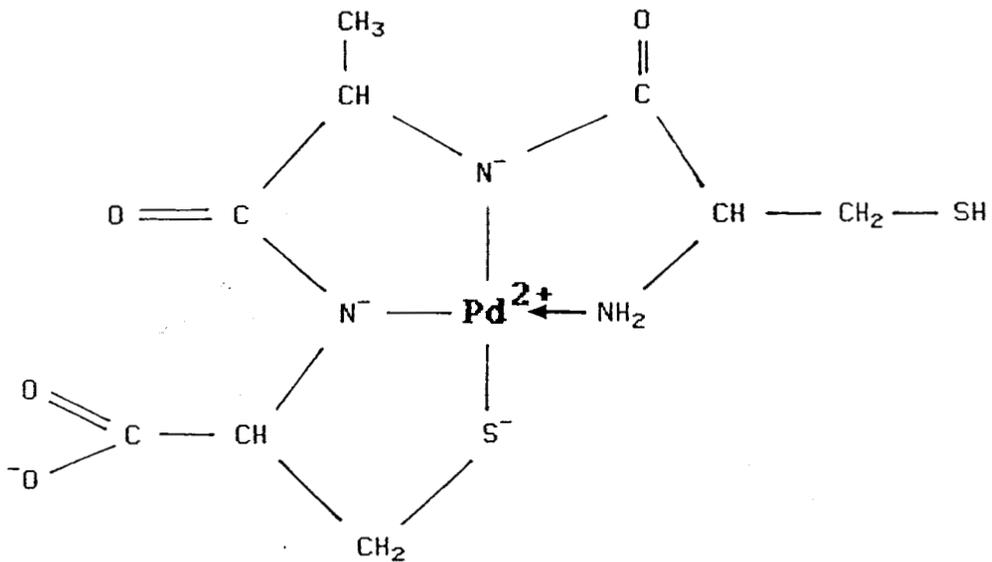


Figure 61 : Complexe PdAH₂ en rapport 1
(Cys-Ala-Cys : Pd(II))



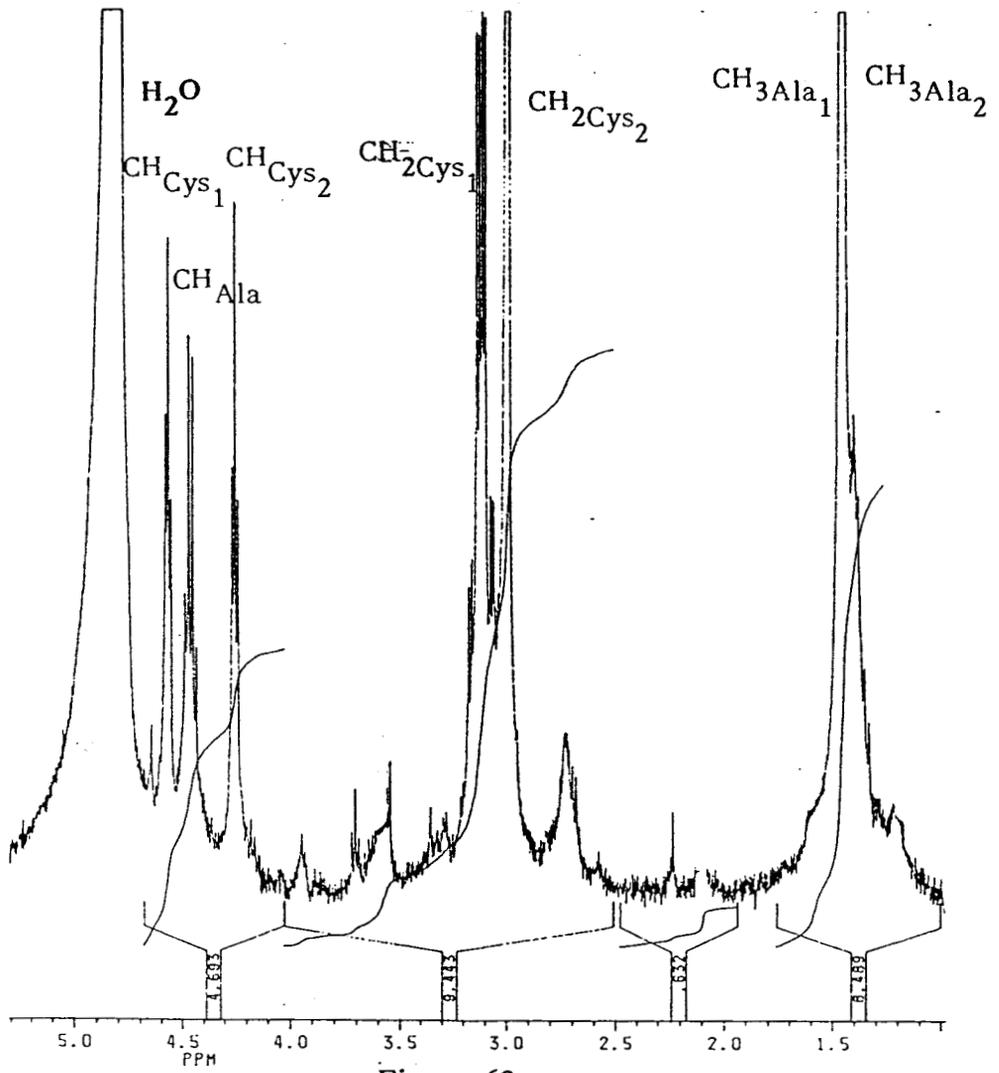


Figure 62
Spectre R.M.N. de Cys-Ala-Cys : Pd(II) en milieu basique

CONCLUSION

L'étude des complexes du Pd(II) est rendue difficile car les systèmes nécessitent un temps très long pour se stabiliser dans un état d'équilibre.

Pour les dipeptides Ala-Cys et Phe-Cys, la coordination avec le palladium permet d'observer les bandes de transfert de charge du soufre en accord avec une coordination $\{NH_2, N^-, N^-, S^-\}$ et confirme ainsi l'étude effectuée avec le Ni(II).

Mais ce type de complexation est vite abandonné lorsque le pH augmente au profit de l'espèce à 4 azotes $\{2NH_2, 2N^-\}$. Ceci s'est surtout vérifié avec le tripeptide Ala-Ala-Cys où la distance entre l'amine et le thiol est trop importante pour que le thiol, insuffisamment lié, puisse rester coordonné à haut pH. Par contre si une cystéine est présente à l'extrémité N-terminale comme dans Cys-Ala-Cys ou Cys-Ala-Ala-Cys, la coordination se fait par le soufre de cette cystéine et le NH_2 terminal impliquant comme précédemment deux ligands. La complexation du type $\{NH_2, N^-, N^-, S^-\}$ est observée en rapport 1 et met en jeu la cystéine C-terminale.

L'étude des complexes à pH 7 avec le Pd(II) est difficile en l'absence de résultats potentiométriques. Toutefois, certaines espèces ont bien été caractérisées à des pH plus élevés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CHAPITRE IV

- (1) E.W. WILSON et R.B. MARTIN
Inorg. Chem. 9, 528 (1970)
- (2) E. JORGENSEN et J. BJERRUM
Acta Chem. Scand. 22, 2313 (1968)
- (3) B. JEZOWSKA-TRZEBIATOWSKA, G. FORMICKA-KOZLOWSKA et H. KOZLOWSKI
Bull. Acad. Pol. Sciences 26, 561 (1978)
- (4) C.J. HAWKINS
Absolute configuration of Metal Complexes - Chapitre 5 Wiley-Interscience (1971)
- (5) J. SCHUGAR dans "Copper coordination Chemistry : biological and inorganic perspectives" K.D. Karlin et J. Zubieta eds, Adenine Press N.Y. p43 (1982)
- (6) E.I. SOLOMON, K.W. PENFIELD et D.E. WILCOX
Structure and bonding 53, 1 (1983)
- (7) M.C. LIM et R.B. MARTIN
J. Inorg. Nucl. Chem. 38, 1911 (1976)
- (8) R.F. COLEY et D.S. MARTIN
Inorg. Chim. Acta 7, 573 (1973)
- (9) H. KOZLOWSKI, B. DECOCK-LE REVEREND, J.L. DELARUELLE, C. LOUCHEUX et B. ANCIAN
Inorg. Chim. Acta 78, 31 (1983)
- (10) B. JEZOWSKA-TRZEBIATOWSKA, A. ALLAIN et H. KOZLOWSKI
Bull. Acad. Pol. Sciences 25, 971 (1977)
- (11) B. DECOCK-LE REVEREND, C. LOUCHEUX, T. KOWALIK et H. KOZLOWSKI
Inorg. Chim. Acta 66, 205 (1982)

CHAPITRE V

ETUDE DE LA COMPLEXATION PAR LE
ZINC (II), LE COBALT (II) ET LE
CADMIUM (II)

INTRODUCTION

Des études effectuées avec les métaux Ni(II), Zn(II) et Co(II) et les ligands Gly-Cys et Cys-Gly (1,2) ont montré les diverses possibilités de liaisons de la fonction thiol.

Ainsi, Cys-Gly forme des bis-complexes avec tous les métaux étudiés ; la cystéine-N terminale peut empêcher la déprotonation et la coordination de la fonction amide ; ceci a aussi été observé pour une histidine en position N-terminale (3,4,5).

Dans le cas de Gly-Cys, le type de coordination dépend largement de la nature de l'ion métallique. Le nickel (II) peut déprotoner la fonction amide et la coordination a lieu par l'extrémité NH₂ terminale, la fonction amide et la fonction SH.

Avec le Co(II) et le Zn(II) des complexes stables sont formés avec une coordination de type {S,O} (6). La formation de bis-complexes avec Gly-Cys semble avoir lieu avec ces métaux ; et la coordination de la cystéine C-terminale empêche la déprotonation et la coordination de la fonction amide (7,8).

Les résultats actuels ne permettent cependant pas de tirer avec précision les principales caractéristiques de la fonction thiol complexée. Des résultats supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la fonction thiol dans la complexation des métaux par les peptides.

Ainsi, une étude en potentiométrie, polarographie et R.M.N. du proton a été menée avec les métaux : Zn(II), Co(II) et Cd(II) et les ligands Ala-Cys, Phe-Cys et Ala-Ala-Cys ; on montrera en outre l'importance biologique de la coordination métal-soufre.

I - ETUDE DES COMPLEXES DU ZINC (II), COBALT (II) ET CADMIUM (II)

Les constantes de stabilité des complexes du Zn(II) et du Co(II) avec Ala-Cys et Ala-Ala-Cys sont rassemblées dans la table 1.

Le ligand Phe-Cys forme des précipités en présence des deux métaux ce qui empêche une détermination précise des constantes de stabilité des complexes formés.

Comme on peut le voir dans la table 1, la formation des complexes implique la cystéine C-terminale et aboutit à la création de bis-complexes très variés. L'absence de monocomplexe du type MAH, suggère une coordination {S,O} par l'intermédiaire de la cystéine comme cela a pu être observé pour le ligand Gly-Cys (2).

Les valeurs de pK des complexes confirment la protonation des groupes amine et amide dans les espèces MA₂H₂ et MA₂H (Table 1). Les constantes de stabilité du Co(II) dans les complexes sont plus faibles que celles obtenues avec le Zn(II). Cela résulte entre autre à la protonation des espèces à faible concentration.

La figure 1 montre qu'à des pH supérieurs à 9 la déprotonation du bis-complexe, MA₂H-1, a lieu ; elle correspond à la déprotonation de la fonction amide ou encore à la coordination d'une molécule d'eau.

La déprotonation de la fonction amide pourrait changer le mode de liaison entre le métal et le ligand, ce changement peut être suivi par RMN du proton. Mais des travaux antérieurs de RMN du complexe Gly-Cys-Zn(II) n'ont pas été concluants. Toutefois, l'étude par RMN du proton du complexe Ala-Ala-Cys-Zn(II) et Ala-Ala-Cys-Cd(II) a pu ici être utilisée et la comparaison avec les peptides libre est rassemblée dans le Tableau II.

Les déplacements chimiques des protons de l'alanine centrale ne sont pas affectés par la protonation du ligand ; les sites de protonation étant, pour des raisons de distances, l'extrémité NH₂ terminale et l'extrémité C-terminale (groupe thiol ou groupe carboxylique).

La déprotonation de la fonction amide et sa coordination pourrait, cependant, affecter les protons de la seconde alanine mais cet effet ne peut être perçu dans les résultats du tableau II.

Ainsi, la formation du complexe MA_2H_{-1} ne change pas le mode de liaison métal-peptide et l'hydrolyse semble avoir lieu à un pH supérieur à 9.

Des variations importantes des déplacements chimiques des protons de l'alanine N-terminale sont observées quand les espèces du type MA_2 sont formés à partir de MA_2H_2 . Ceci indique une déprotonation des fonctions amide.

Les complexes du cadmium avec des ligands renfermant une fonction thiol ont bien été étudiés et la bibliographie montre que ce métal peut former des complexes très stables avec des coordinations du type {S,O} ou {S,N}. La formation d'espèces polynucléaire impliquant la création de ponts S-Cd-S est caractéristiques de tels systèmes (9,10). Les constantes de stabilités de ces complexes n'ont pas encore été publiés, à l'exception des complexes formés avec le glutathion (11).

C'est pourquoi l'étude de complexe avec le Cd(II) a été effectuée avec les peptides suivants : Gly-Cys, Cys-Gly, Ala-Cys, Phe-Cys et Ala-Ala-Cys. Les constantes de stabilité de ces complexes sont regroupés dans la table 3. Tout comme le cobalt et le zinc, le ligand Phe-Cys forme des précipités avec Cd(II) même en présence d'un excès de base ou de ligand. La précipitation a lieu aussi avec Gly-Cys, mais disparaît en présence d'un excès de ligand. Ce phénomène suggère la formation d'espèces polynucléaires (9), mais il ne permet pas d'établir des réelles constantes de stabilité des complexes Gly-Cys-Cd(II) et Phe-Cys-Cd(II). Les résultats présentés dans la table 3 montre que la coordination peut se faire par l'extrémité NH_2 terminale ou par la cystéine en position C-terminale.

Le peptide Cys-Gly forme des bis-complexes dans lesquels le métal a une coordination de type {S,N} impliquant l'extrémité N-terminale et le groupe SH. L'encombrement stérique semble exclure la formation de complexes polynucléaires (caractéristiques de la cystéine).

La figure 2 montre la distribution des espèces pour le système Cd(II)-Ala-Cys, la coordination de ces système est très proche de ce qui a été

observé pour Zn(II) et Co(II), c'est à dire que le Cd(II) forme aussi des bis-complexes stables avec la cystéine C-terminale par une coordination de type {S,O}. La liaison amide n'intervient pas dans ce mode de coordination et ceci a été confirmé par RMN (Table 2). Les complexes du cadmium sont nettement plus stables que ceux du zinc (II) et du cobalt (II). Le rapport $\log k_1/k_2$ est plus élevé pour de cadmium et témoigne ainsi de la présence de l'espèce MAH.

La complexation du Cd(II) par des peptides renfermant un résidu de cystéine a été approfondie grâce à une étude polarographique des différents complexes formés. Les complexes du Cd(II) avec la fonction thiol ont montré en polarographie que Cd(II) peut former des chélates très stables en impliquant une coordination de type {S,O} ou {S,N}. (Table 4)

La formation des complexes montre que le Cd(II) n'est pas capable de déprotoner la fonction amide des peptides, cette fonction n'intervient donc pas dans la complexation et ces peptides réagissent donc comme des ligands bidentés. En outre, l'encombrement stérique fait que seulement une ou deux espèces (et leurs formes protonées) peuvent être détectées pour les ligands : Cys-Gly, Ala-Cys et Ala-Ala-Cys. Ici encore le type de liaison {S,N} du ligand Cys-Gly est plus stable que le type de liaison {S,O} alors que c'est l'inverse pour Ala-Cys et Ala-Ala-Cys (Table 4).

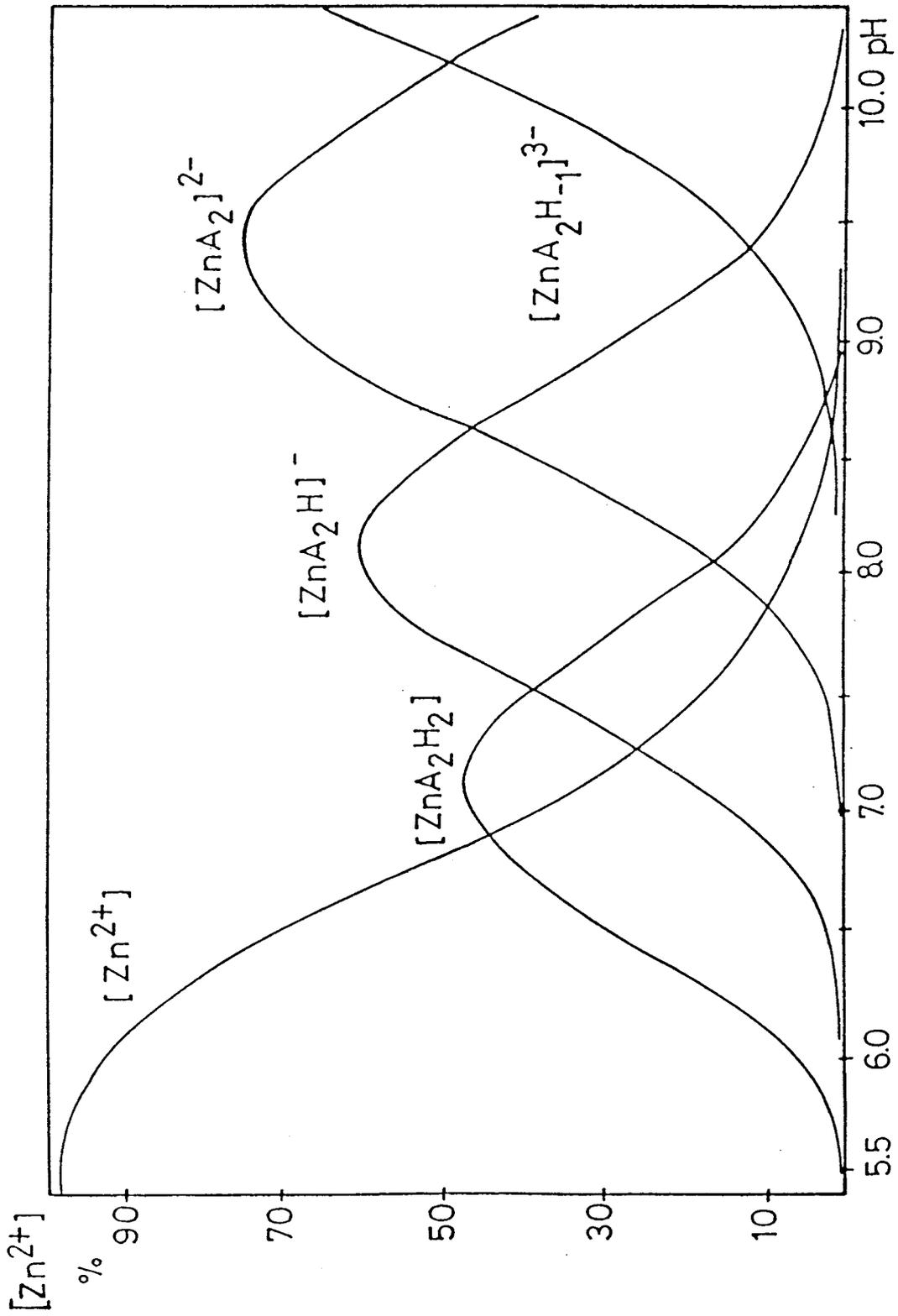


Figure 1
Courbes de distribution des espèces
Zn (II)-Ala-Cys

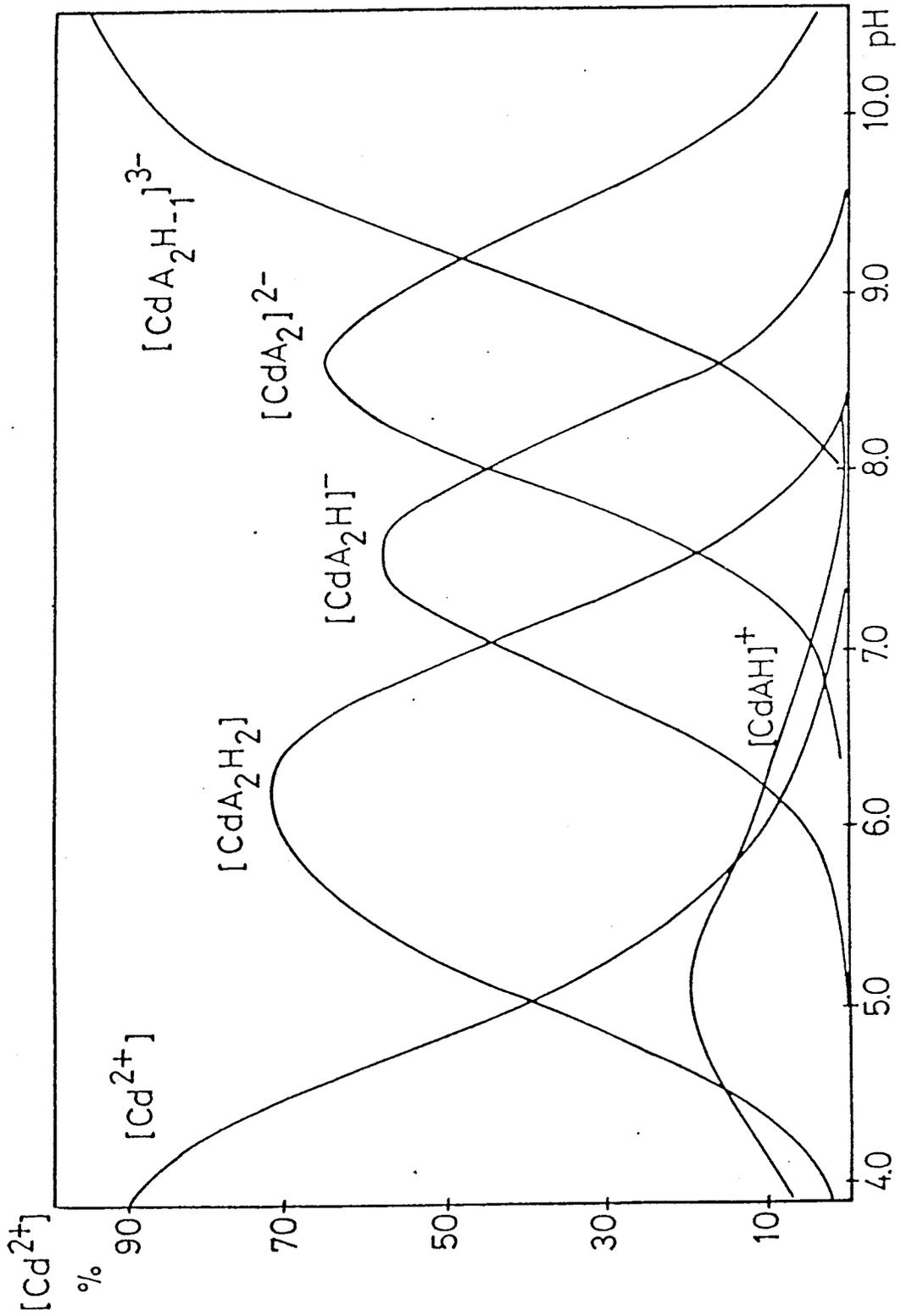


Figure 2
Courbes de distribution des espèces
Cd (II)-Ala-Cys

TABLEAU I : Constantes de stabilité (log β) du zinc (II) et du cobalt (II) avec Ala-Cys et Ala-Ala-Cys.

Espèces	Ala-Cys		Ala-Ala-Cys	
	Zn(II)	Co(II)	Zn(II)	Co(II)
MA ₂ H ₂	27.39±0.02	24.4±0.09	27.86±0.01	-
MA ₂ H	19.86±0.03	17.44±0.04	20.40±0.01	16.83±0.03
MA ₂	11.23±0.03	8.73±0.04	12.09±0.02	8.07±0.04
MA ₂ H ₋₁	1.05±0.05	-	2.83±0.02	-0.75±0.10
pK _I	7.53	6.98	7.46	-
pK _{II}	8.63	8.71	8.31	8.76

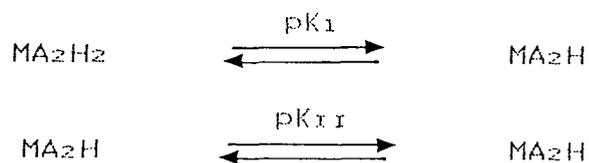


TABLEAU II : Déplacements chimiques en R.M.N. du proton : Ala-Ala-Cys libre et complexé.

Systèmes	pH	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\overset{\alpha}{\text{C}}-\text{NH}-\overset{\beta}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \beta \quad \quad \quad \text{SH} \end{array} $						CH ₃ (β)	CH(β)	CH(β)	CH ₃ (α)	CH ₃ (β)	CH ₂
		CH(α)	CH(β)	CH(β)	CH ₃ (α)	CH ₃ (β)	CH ₂						
Ala-Ala-Cys	1.00	4.16	4.47	4.70	1.61	1.49	3.07						
	4.00	4.18	4.50	4.50	1.64	1.50	3.02						
	8.29	3.83	4.50	4.50	1.49	1.49	3.00						
	9.55	3.61	4.46	4.27	1.35	1.49	2.95						
	11.81	3.59	4.52	4.05	1.35	1.49	2.89						
Zn(II)- Ala-Ala-Cys	6.94	4.09	4.48	4.37	1.60	1.49	3.01						
	7.12	4.09	4.47	4.37	1.60	1.49	3.01						
	9.43	3.69	4.50	4.34	1.41	1.44	2.98						
Cd(II) - Ala-Ala-Cys	9.90	3.65	4.53	4.33	1.42	4.44	2.95						
	3.37	4.18	4.48	4.56	1.63	1.50	3.05						
	6.72	4.14	4.50	4.40	1.61	1.49	3.16						
	9.80	3.79	4.50	4.40	1.43	1.47	3.16						

TABLEAU III : Constantes de stabilité ($\log\beta$) du cadmium (II) avec des peptides contenant de la cystéine. $T = 298K$; $I = 0.2 \text{ mol. dm}^{-3}$

Espèces	Cys-Gly	Ala-Cys	Ala-Ala-Cys
HA	9.37 ± 0.02	9.53 ± 0.01	9.72 ± 0.01
H ₂ A	16.31 ± 0.02	17.49 ± 0.02	17.69 ± 0.01
H ₃ A	19.44 ± 0.03	20.37 ± 0.03	20.92 ± 0.02
MA	9.84 ± 0.09	-	-
MA ₂	17.36 ± 0.12	13.71 ± 0.05	14.06 ± 0.03
MAH	-	15.30 ± 0.05	15.42 ± 0.02
MA ₂ H ₂	-	30.28 ± 0.02	30.08 ± 0.05
MA ₂ H	-	22.40 ± 0.05	22.34 ± 0.05
MA ₂ H-1	-	2.88 ± 0.10	3.45 ± 0.10
pK _I	-	7.88	7.74
pK _{II}	-	8.69	8.28
$\log K_1/K_2$	2.32	0.32	0.76

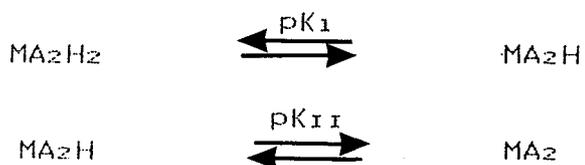


TABLEAU IV: : Constantes de stabilité des complexes du Cd(II).

Espèces	MA	MAz	MAH	M(AH) ₂	MAzH	MAzH ₋₁	log K ₁ /K ₂
CYS-GLY (S,N)	9.84	17.36	-	-	-	-	2.32
Ala-CYS (S,O)	-	13.71	15.30	30.28	22.40	2.88	0.32
Ala-Ala-CYS (S,O)	-	15.42	30.08	22.34	3.45	0.76	

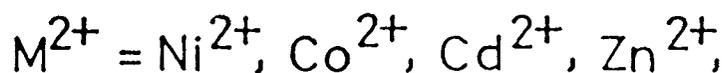
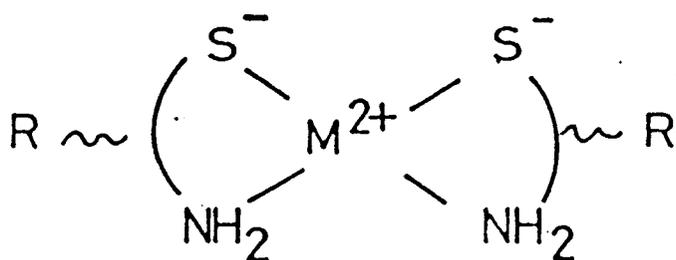


Schéma I

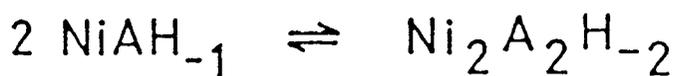
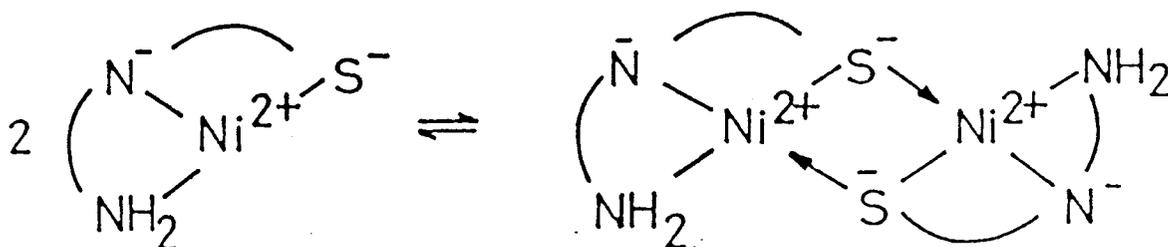


Schéma II

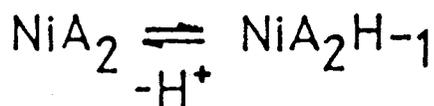
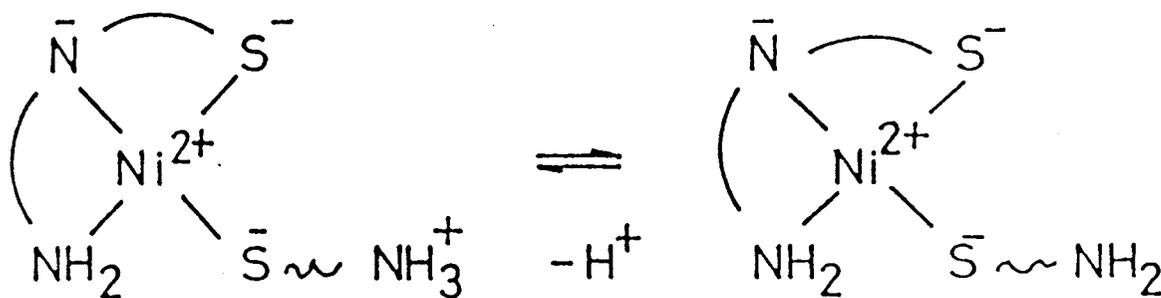
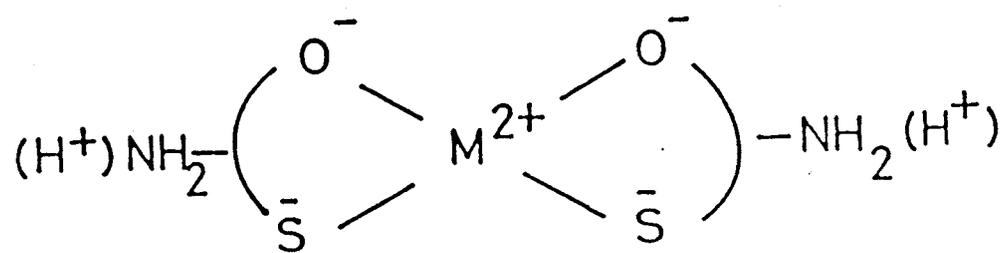


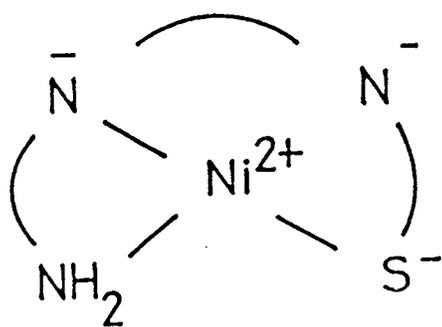
Schéma III



MA_2, MA_2H, MA_2H_2

$M^{2+} = Co^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}$

Schéma IV



$NiAH_{-2}$

Schéma V

CONCLUSION

L'étude de dipeptide tel que Cys-Gly, Gly-Cys, Ala-Cys et Phe-Cys, et de tripeptides : Gly-Gly-Cys et Ala-Ala-Cys avec quatre métaux I Ni(II), Co(II), Zn(II) et Cd(II) a permis d'établir une comparaison sur les possibilités de coordination de la cystéine contenu dans ces peptides et d'en tirer des conclusions sur la nature des espèces formées.

Lorsque la cystéine est en position N-terminale des bis-complexes stables sont formés réalisant ainsi un chélate à 5 chaînons dans lequel la coordination se fait par le NH₂ terminal et la fonction thiol. Ce mode de liaison est observé par tous les métaux de transitions étudiés ; la cystéine en position N-terminale semble empêcher la déprotonation de la fonction amide ainsi que sa coordination (Schéma I).

Le type de complexe formé avec des peptides dont la cystéine est à l'extrémité C-terminale dépend de l'ion métallique étudié.

Ni(II) exige la déprotonation et la coordination de la fonction amide. La formation d'espèces monomériques et oligomériques dépend du rapport ligand-métal et des conditions stériques (Schéma I).

En solution basique et à fort rapport ligand-métal la structure dimérique est détruite au profit du bis-complexe ; les deux espèces qui en résultent : NiA₂ et NiA₂H₋₁ montrent des ligands tridentés {N,N,S} et monodentés {S} comme on peut le voir sur le schéma III.

Le cobalt (II), le Zinc (II) et le cadmium (II) sont plus favorables à une coordination de type {S,O} qui aboutit aussi à la formation de bis-complexe (Schéma IV). Ainsi, la cystéine en position C-terminale empêche la déprotonation et la coordination du peptide ligand.

Les tripeptides qui renferment une cystéine en position C-terminale se comporte de la même façon que les dipeptides étudiés. Ni(II) déprotone les deux fonctions amide et forme un complexe stable MAH₋₂ (Schéma V). Les autres métaux sont plus favorables à une coordination de type {S,O} (Schéma IV) qui conduit à la formation de bis-complexes protonés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CHAPITRE V

- (1) H. KOZLOWSKI, B. DECOCK-LE REVEREND, D. FICHEUX, C. LOUCHEUX et I. SOVAGO
J. Inorg. Biochem., 29, 187, (1987)
- (2) I. SOVAGO, T. KISS, K. VARNAGY and B. DECOCK-LE REVEREND
Polyhedron, 7, 1089, (1988)
- (3) H. SIGEL, R.B. MARTIN
Chem. Rev., 82, 385, (1982)
- (4) I. SOVAGO, E. FARKAS and R. GERGELY
J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1982), 2159
- (5) E. FARKAS, I. SOVAGO, T. KISS and A. GERGELY
J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1984), 611.
- (6) B. HERMAN and I. SOVAGO
Inorg. Chim. Acta, 80, 75, (1983)
- (7) Y. SUGIURA, Y. HIRAYAMA, H. TANAKA and K. ISHIZU
J. Am. Chem. Soc., 97, 5577, (1977)
- (8) I. SOVAGO AND R.B. MARTIN
J. Inorg. Nucl. Chem., 43, 425, (1981)
- (9) I. SOVAGO, K. VARNAGY and A. BENYEI
Magyar Kemia Folyoirat, 92, 114, (1986)
- (10) A. ARDEEF and D.L. KEARNEY
J. Am. Chem. Soc., 104, 7212, (1983)
- (11) A.H. CORRIE, M.D. WALKER and D.R. WILLIAMS
J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1976), 1012.

CONCLUSION

La première partie de ce travail a donc consisté en la synthèse d'oligopeptides comportant une ou deux fonctions thiols libres.

La synthèse classique en phase homogène nous a permis de préparer : Ala-Cys, Phe-Cys, Ala-Ala-Cys, Cys-Ala-Cys et Cys-Ala-Ala-Cys.

Ces peptides constituent un modèle acceptable pour une première approche des mécanismes réactionnels de molécules biologiques telles que les métalloprotéines.

Nous avons alors, dans une deuxième partie, étudié la complexation des peptides préparés avec des métaux d'importance biologique comme le nickel (II), le palladium (II), le zinc (II), le cobalt (II) et le cadmium (II).

Ainsi, à l'aide de la spectroscopie électronique U.V.-visible, du dichroïsme circulaire et de la R.M.N. du proton, nous avons pu déterminer les différents sites de complexation et la structure des divers complexes formés en solution aqueuse.

On a pu observer pour le nickel (II), comme pour le palladium (II), des bandes de transfert de charge montrant l'existence de trois transitions dues à la liaison soufre-métal, ce qui confirme l'hypothèse émise par Solomon. La détection de ces bandes dans les spectres électroniques ou dichroïques constitue une preuve de la participation du soufre dans la complexation avec ces ions métalliques.

Avec le nickel (II), l'existence d'espèces polynucléaires est accentuée pour les peptides renfermant deux cystéines. Mais les espèces les plus stables montrent plutôt une coordination du type {S,N}₂ pour Cys-Ala-Ala-Cys et du type {S,N,N,N} pour Cys-Ala-Cys ; la cystéine impliquée dans la liaison étant N-terminale pour le térapeptide et C-terminale pour le tripeptide.

Avec le palladium (II), le soufre n'est pas le site de complexation le plus favorable dans les peptides.

Ainsi, les dipeptides montrent surtout des espèces stables à quatre azotes et deux ligands ; ceci est aussi le cas pour Ala-Ala-Cys. Par contre Cys-Ala-Cys et Cys-Ala-Ala-Cys forment des complexes à deux ligands avec coordination de la cystéine N-terminale.

L'étude du Zn(II), Cd(II) et Co(II) montrent avec les peptides à cystéine N-terminale une complexation du type $\{S,N\}_2$ qui aboutit à la formation de bis-complexes stables. La cystéine N-terminale semble empêcher la déprotonation et la coordination des fonctions amides.

Un ligand avec une cystéine C-terminale subit avec le nickel (II) la déprotonation et la coordination de la fonction amide conduisant ainsi à la formation d'espèces monomériques et oligomériques. Par contre, avec le même ligand, le cobalt (II), le zinc (II) et le cadmium (II) sont plus favorables à une coordination du type $\{S,O\}$.

La présence d'une espèce majoritaire à un pH physiologique pour tous les métaux étudiés, montre l'importance des interactions peptides cations-métalliques dans les équilibres biologiques et mérite une étude supplémentaire.

