



**HAL**  
open science

# Nouveaux systèmes complexants et application à la préparation de composés amphiphiles dérivés. Synthèse et étude physicochimique

Patrick Gizzi

► **To cite this version:**

Patrick Gizzi. Nouveaux systèmes complexants et application à la préparation de composés amphiphiles dérivés. Synthèse et étude physicochimique. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2006. Français. NNT: . tel-00259154

**HAL Id: tel-00259154**

**<https://theses.hal.science/tel-00259154>**

Submitted on 26 Feb 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

**U.F.R. Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés  
Ecole Doctorale de Chimie et de Physique Moléculaires (SESAMES)  
Département de Formation Doctorale de Chimie et Physicochimie moléculaires**

## Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I**

**en Chimie et Physicochimie Moléculaires**

par **Patrick GIZZI**

**NOUVEAUX SYSTÈMES COMPLEXANTS ET APPLICATION À LA  
PRÉPARATION DE COMPOSÉS AMPHIPHILES DÉRIVÉS.  
SYNTHÈSE ET ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE**

soutenue publiquement le 10 Février 2006

Membres du jury :

Président :	M. Pierre LOCHON	Professeur émérite, E.N.S.I.C., Nancy
Rapporteurs :	Mme Chantal LARPENT	Professeur, U.V.S.Q., Versailles
	M. Guy SERRATRICE	Professeur, U.J.F., Grenoble
Examineurs :	Mme Christine GÉRARDIN	Professeur, U.H.P., Nancy I (directrice de thèse)
	M. Bernard HENRY	Professeur, U.H.P., Nancy I
	M. Jean-Jacques DELPUECH	Professeur émérite, U.H.P., Nancy I



# REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire SRSMC (UMR 7565), au sein de l'équipe Matériaux Tensioactifs, Polymères et Colloïdaux en collaboration avec l'équipe Complexation et Cinétiques en Milieux Microhétérogènes.

Lors de mon arrivée, ces deux composantes formaient le Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloïdale dont le directeur était Monsieur Claude SELVE, Professeur à l'université Henri POINCARÉ. Monsieur SELVE a été mon directeur de thèse pendant deux ans, mais il est malheureusement décédé au cours de ma troisième année de thèse. J'ai beaucoup appris sous sa direction et les nombreuses discussions que j'ai eues avec lui ont toujours été enrichissantes. Je ne saurais présenter ce travail sans avoir une pensée pour lui.

Cette thèse a été ensuite dirigée par Madame Christine GÉRARDIN et Monsieur Bernard HENRY, tous deux professeurs à l'université Henri POINCARÉ. Je tiens à leur exprimer mes vifs remerciements pour leur disponibilité, leurs conseils et l'orientation qu'ils ont donné à mes recherches.

J'adresse mes remerciements à Madame Chantal LARPENT, Professeur à l'université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, et à Monsieur Guy SERRATRICE, Professeur à l'université Joseph FOURIER de Grenoble, d'avoir accepté de rapporter ce travail.

J'ai été très honoré par la présence dans mon jury de thèse de Monsieur Pierre LOCHON, professeur émérite à l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean-Jacques DELPUECH, professeur émérite à l'université Henri POINCARÉ, pour sa participation à ce jury et pour son implication dans mon travail de thèse.

Enfin, je remercie l'ensemble des personnes que j'ai côtoyées au laboratoire durant ces quatre années, pour leur amitié et pour l'ambiance agréable qu'ils ont su maintenir.



# ABRÉVIATIONS

AcOEt : acétate d'éthyle

Ala : alanine

APTS : acide paratoluènesulfonique

BOC : Tertbutyloxycarbonyl

BOP : hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium

CMC : concentration micellaire critique

EO : oxyéthylène

eq : équivalent

ESI : ionisation électrospray

Gly : glycine

His : histidine

HLB : balance hydrophile lipophile

I : force ionique

Im : imidazole

Lys : lysine

Pd : point de décomposition

Pf : point de fusion

Ph : phényle

RMN : résonance magnétique nucléaire

- AB : spectre de type AB

- d : doublet

- m : multiplet

- ma : massif

- md : multiplet dédoublé

- s : singulet

- t : triplet

- q : quadruplet

RPE : résonance paramagnétique électronique

THF : tétrahydrofuranne

TMS : tétraméthylsilane

UV : ultra violet



# SOMMAIRE

I. INTRODUCTION .....	1
II. PEPTIDOAMINES, SYNTHÈSE ET COMPLEXATION.....	11
II.1. INTRODUCTION.....	13
II.2. RAPPELS SUR LES COMPLEXES DE MÉTAUX DE TRANSITION.....	14
II.3. TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	16
II.3.1. Potentiométrie.....	16
II.3.1.1. Principe.....	16
II.3.1.2. Conditions expérimentales .....	17
II.3.1.3. Exploitation des données .....	18
II.3.1.4. Calcul des constantes de protonation et de stabilité : .....	20
II.3.2. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible.....	22
II.3.2.1. Principe et allure des spectres.....	22
II.3.2.2. Conditions expérimentales .....	23
II.3.3. Résonance magnétique nucléaire.....	24
II.3.3.1. Intérêt.....	24
II.3.3.2. Conditions expérimentales .....	25
II.3.4. Radiocristallographie.....	25
II.3.5. Résonance paramagnétique électronique.....	25
II.3.5.1. Principe.....	25
II.3.5.2. Conditions expérimentales .....	26
II.3.6. Dichroïsme circulaire .....	27
II.3.6.1. Principe.....	27
II.3.6.2. Conditions expérimentales .....	27
II.3.7. Spectrométrie de masse avec ionisation électrospray.....	28
II.3.7.1. Principe.....	28



II.3.7.2. Conditions expérimentales .....	28
II.4. SYNTHÈSE DE PEPTIDOAMINES.....	28
II.5. ÉTUDE DE LA PROTONATION DES PEPTIDOAMINES.....	30
II.6. COMPLEXATION MÉTALLIQUE.....	32
II.6.1. Complexes de pseudo-tripeptides.....	32
II.6.1.1. Étude des complexes de cuivre (II) et de nickel (II) du ligand Ala-Gly-Ha ..	32
II.6.1.2. Étude cristallographique du complexe CuLH <sub>2</sub> de l'alanyl-glycyl-histamine	45
II.6.1.3. Conclusion.....	49
II.6.2. Complexes de pseudo-dipeptides .....	49
II.6.2.1. Étude des complexes de cuivre (II) et de nickel (II) du ligand $\alpha$ -Me-Ala-Ha	49
II.6.2.2. Étude cristallographique du complexe Ni <sub>4</sub> L <sub>4</sub> H <sub>8</sub> de $\alpha$ -Me-Ala-Ha .....	56
II.6.2.3. Conclusion.....	59
II.7. CONCLUSION DU CHAPITRE .....	59
III. PEPTIDOAMINES AMPHIPHILES, SYNTHÈSE ET ÉTUDE PHYSICOCHEMIE 61	
III.1. INTRODUCTION.....	63
III.2. RAPPELS SUR LES TENSIOACTIFS.....	65
III.2.1. Définition .....	65
III.2.2. Structure chimique .....	66
III.2.3. Propriétés physicochimiques.....	67
III.3. SYNTHÈSE .....	69
III.3.1. Tensioactifs bimodulaires, synthèse d'alkylamido-peptides.....	69
III.3.1.1. Stratégie de synthèse .....	70
III.3.1.2. Synthèse d'alkylamidohistidine .....	71
III.3.1.3. Déblocage du motif protecteur.....	74
III.3.1.4. Synthèse d'alkylamido-peptides.....	74
III.3.1.5. Déblocages des motifs protecteurs.....	76

III.3.2. Tensioactifs trimodulaires .....	77
III.3.2.1. Tensioactifs trimodulaires de type I.....	77
III.3.2.1.1. Tensioactifs trimodulaires à lien amide et ester .....	79
III.3.2.1.2. Tensioactifs trimodulaires à deux liens amides.....	89
III.3.2.2. Tensioactifs trimodulaires de type II.....	95
III.3.2.2.1. Greffage de la glycine sur l'alkylamidohistidine .....	96
III.3.2.2.2. Greffage de la lysine .....	98
III.3.2.2.3. Déprotection de l'amine en $\epsilon$ de la lysine .....	98
III.3.2.3. Greffage du module hydrophile .....	99
III.3.3. Conclusion sur la synthèse de peptidoamines tensioactives .....	101
III.4. ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE.....	102
III.4.1. Propriétés des tensioactifs bimodulaires .....	102
III.4.1.1. Évaluation de la solubilité des tensioactifs bimodulaires dans l'eau .....	102
III.4.1.2. Comportement en solution des tensioactifs bimodulaires.....	106
III.4.1.2.1. Tensiométrie.....	106
III.4.1.2.2. Spectroscopie de fluorescence .....	114
III.4.1.3. Diagrammes de phase binaires : tensioactifs bimodulaires - eau.....	121
III.4.1.3.1. Généralités.....	121
III.4.1.3.2. Principe et conditions expérimentales.....	124
III.4.1.3.3. Diagrammes de phase des tensioactifs bimodulaires .....	125
III.4.1.4. Étude des propriétés complexantes des tensioactifs bimodulaires.....	131
III.4.1.4.1. Étude de la complexation de molécules modèles à chaînes courtes ....	132
III.4.1.4.2. Comparaison des propriétés complexantes des molécules modèles avec celles des tensioactifs bimodulaires .....	137
III.4.1.5. Étude des propriétés tensioactives des complexes .....	139
III.4.1.6. Conclusion sur les propriétés des tensioactifs bimodulaires.....	141
III.4.2. Propriétés des tensioactifs trimodulaires de type I.....	141
III.4.2.1. Propriétés des tensioactifs de type I à lien amide et ester .....	141
III.4.2.1.1. Étude par RMN de l'hydrolyse des esters.....	141
III.4.2.1.2. Evaluation de la solubilité dans l'eau.....	142
III.4.2.1.3. Étude des propriétés tensioactives.....	144
III.4.2.1.4. Étude des propriétés complexantes .....	145

III.4.2.2. Propriétés des tensioactifs trimodulaires à deux liens amides .....	149
III.4.2.2.1. Comportement en solution aqueuse .....	149
III.4.2.2.2. Étude des propriétés complexantes .....	153
III.4.2.3. Conclusion sur les propriétés des tensioactifs trimodulaires .....	153
III.5. CONCLUSION DU CHAPITRE.....	154
IV. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE PROTONATION DES PEPTIDOAMINES PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE.....	155
IV.1. INTRODUCTION .....	157
IV.2. DÉTERMINATION DES CONSTANTES D'ACIDITÉ À L'AIDE DE TITRAGES RMN.....	157
IV.2.1. Introduction.....	157
IV.2.2. Détermination des macro- et des micro-constantes de protonation des peptidoamines par RMN .....	159
IV.2.2.1. Considérations thermodynamiques .....	159
IV.2.2.2. Établissement des relations entre les constantes thermodynamiques .....	161
IV.2.2.3. Utilisation de la résonance magnétique nucléaire.....	162
IV.2.2.4. Méthode de calcul .....	167
IV.2.2.4.1. Calcul des constantes macroscopiques $K_1$ et $K_2$ .....	167
IV.2.2.4.2. Calcul des constantes microscopiques $k_i$ et $k_a$ .....	168
IV.2.3. Conclusion .....	177
IV.3. TRANSFERTS PROTONIQUES SUR LES FONCTIONS AMIDES DES PEPTIDOAMINES .....	179
IV.3.1. Introduction.....	179
IV.3.2. Théorie de l'échange entre deux sites A et B .....	180
IV.3.3. Rappels sur quelques types de spectres RMN .....	182
IV.3.3.1. Spectres de type AB.....	182
IV.3.3.2. Spectres de type ABX.....	182
IV.3.3.3. Spectres de type ABX <sub>2</sub> .....	183

IV.3.4. Description des spectres observés.....	184
IV.3.4.1. Cas de l'alanyl-glycyl-histamine .....	184
IV.3.4.2. Cas des alkylamidopeptides .....	188
IV.3.5. Étude cinétique des échanges protoniques.....	189
IV.3.6. Détermination de la constante d'acidité des fonctions amides .....	193
IV.3.7. Conclusion .....	195
V. CONCLUSION GÉNÉRALE .....	197
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	203
VI. SYNTHÈSE ORGANIQUE : PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	211



# I. INTRODUCTION



Les travaux présentés dans cette thèse sont consacrés à la conception et à l'étude physicochimique de nouveaux systèmes amphiphiles, complexants des métaux de transition.

Bien que présents en quantités infinitésimales, les métaux de transition jouent un rôle physiologique fondamental dans l'organisme. Certains de ces éléments ont une importance vitale chez les animaux supérieurs.

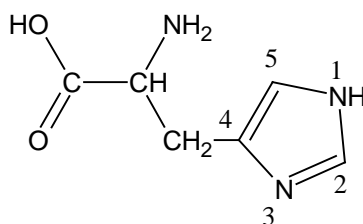
Le fer par exemple, joue un rôle capital dans le renouvellement des globules rouges et dans la respiration cellulaire. Le cuivre également, est indispensable à la vie ; il participe à de nombreux processus tels que la pigmentation, la détoxification des radicaux libres ou le transfert d'électrons <sup>(1)</sup> ; mais comme tout élément, il devient toxique à dose élevée.

La teneur maximale en ion cuivre dans les boissons est fixée par l'OMS à 1 mg.L<sup>-1</sup>. Cette valeur élevée s'explique par une bonne aptitude des reins à éliminer l'excès de cuivre, ce qui évite son accumulation dans l'organisme. Cependant, dans le cas d'une défaillance rénale, des affections liées au métabolisme du cuivre peuvent survenir.

La maladie dite de Wilson est une pathologie héréditaire faisant suite à un excès de cuivre dans l'organisme <sup>(2)</sup>, elle se caractérise par des troubles neurologiques et hépatiques.

À l'inverse, la maladie de Menkes résulte d'un déficit en cuivre qui provoque le dérèglement des fonctions vitales mentionnées précédemment. Les traitements actuels pour soigner cette maladie consistent à administrer des solutions de complexes de cuivre avec des ligands à base d'histidine pour favoriser l'absorption cellulaire de l'élément métallique <sup>(1)</sup>.

L'histidine est un acide aminé bien connu pour former des complexes très stables avec les ions métalliques (**Schéma I-1**).



*Les atomes du cycle imidazole sont numérotés selon la notation IUPAC*

### **Schéma I-1 : Structure moléculaire de l'histidine**

Les complexes de métaux de transition avec des peptides contenant l'histidine ont été longuement étudiés en raison de leur grande stabilité due à la présence du groupement imidazole. En effet, ce cycle est un groupe donneur d'électrons particulièrement fort par l'intermédiaire de ses deux atomes d'azote. De plus, il joue un rôle fondamental en chimie



biologique car il est le seul fragment, issu de protéine, capable de changer son état de protonation dans la zone de pH physiologique.

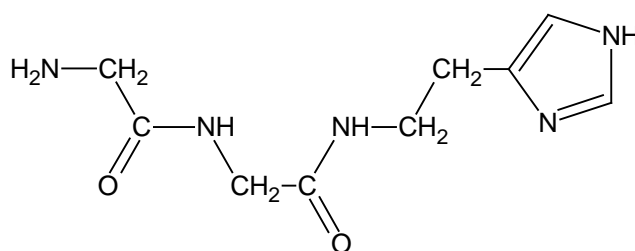
De nombreux travaux sur la complexation du cuivre et d'autres métaux de transition avec de petits peptides, ont été réalisés car ils permettent de modéliser certains mécanismes de coordination, intervenant avec des macromolécules biologiques difficiles à isoler telles que les protéines.

Par exemple, il existe un grand nombre d'articles sur la complexation par des peptides, comportant un motif histidine du côté N-terminal, qui modélisent le site de coordination principal du cuivre de la sérum albumine. Cette protéine fondamentale est présente chez de nombreux mammifères et notamment chez l'homme. La sérum albumine humaine est synthétisée par le foie, elle représente de 50 à 60% des protéines sériques et sa concentration est de  $63 \text{ mmol.L}^{-1}$  <sup>(3)</sup>. Elle est impliquée dans le transport d'hormones, de vitamines, d'acides gras, de drogues et d'ions métalliques aussi bien physiologiques  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  que toxiques  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  <sup>(3, 4, 5)</sup>. Cette variété de fonction est rendue possible par la présence de plusieurs sites de coordination à la surface de la protéine.

La séquence N-terminale de la sérum albumine humaine est Asp-Ala-His. Il s'agit d'un site de coordination qui permet le transport du cuivre (II) et de l'échanger avec les tissus. Il a également été établi que le complexe du nickel (II) avec ce site constitue le fragment antigénique dans l'allergie au nickel <sup>(6)</sup>.

Des tripeptides contenant l'histidine en troisième position et leur interaction avec le Cu(II) et le Ni(II) ont été utilisés pour modéliser ce site de coordination <sup>(7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21)</sup>. Ces peptides possèdent sur le résidu histidyle un groupement carboxylate qui est en réalité sous la forme d'un amide dans la séquence de la protéine. La substitution de l'histidine par l'histamine permet d'obtenir un meilleur mime et de confirmer le rôle mineur du carboxylate dans la complexation.

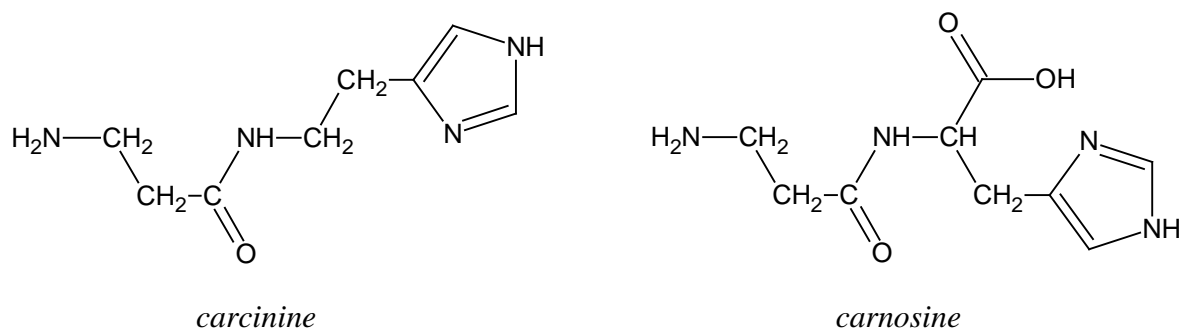
C'est pourquoi le laboratoire travaille depuis plusieurs années sur les complexes de métaux de transition avec des pseudo-tripeptides à base d'histamine de séquence X-Y-Ha (Ha : histamine). Le représentant élémentaire de ces molécules appelées peptidoamines est la glycyl-glycyl-histamine (Gly-Gly-Ha, **Schéma I-2**).



**Schéma I-2 : Structure moléculaire de la glycyl-glycyl-histamine**

Par ailleurs d'autres peptidoamines contenant l'histamine ont été étudiées dans notre laboratoire, notamment celles correspondant à des pseudo-dipeptides de séquence X-Ha. Ces molécules ont été identifiées dans plusieurs tissus biologiques, chez le crabe, le rat, le cochon d'inde, la souris et également chez l'homme <sup>(8, 22, 23, 24)</sup>. Elles se concentrent principalement dans le cœur et le système nerveux où elles sont supposées être des neurotransmetteurs <sup>(24, 25, 26, 27)</sup>.

La  $\beta$ -alanyl-histamine ( $\beta$ -Ala-Ha, **Schéma I-3**) ou carcinine a été particulièrement étudiée et est supposée avoir un rôle très important dans la physiologie cardiaque des mammifères <sup>(8, 22, 23, 28)</sup>. Tout comme la carnosine ( $\beta$ -alanyl-histidine), dont elle dérive par décarboxylation, on lui reconnaît des propriétés antioxydantes lorsqu'elle forme des complexes avec le cuivre (II). Il a ainsi été montré que la carnosine et ses dérivés protègent les membranes cellulaires de l'oxydation. Par ailleurs, ces composés sont connus pour complexer les métaux lourds dans l'organisme et pour moduler certaines réactions enzymatiques <sup>(27)</sup>.



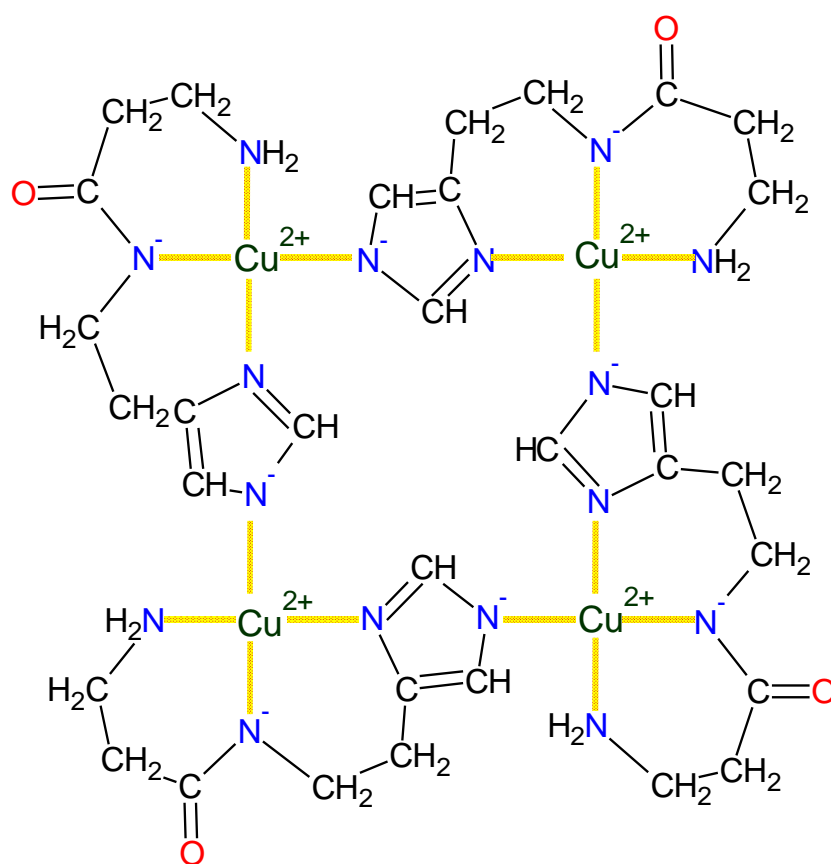
**Schéma I-3 : Structures moléculaires de la carcinine et de la carnosine**

La carcinine est liée métaboliquement à la carnosine, elle permet d'augmenter le rythme cardiaque et de ce fait, intervient dans la réponse physiologique contre le stress <sup>(28)</sup>.

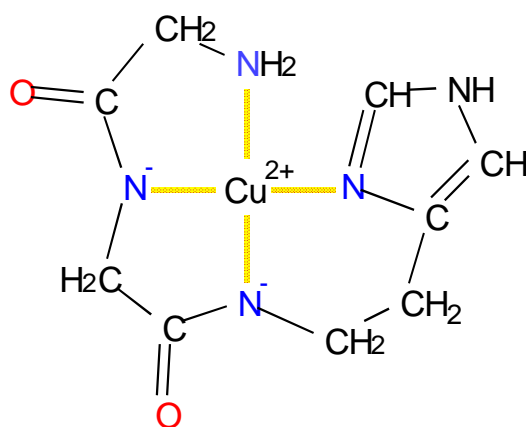
Pour bien comprendre le rôle que ces molécules peuvent tenir dans l'organisme, il est nécessaire de caractériser les complexes qu'elles forment en solution.

Les résultats obtenus au laboratoire sur certaines de ces peptidoamines ont fait l'objet de plusieurs publications <sup>(29, 30, 31, 32, 33, 34)</sup>. Ces résultats montrent que les pseudo-dipeptides forment avec le cuivre (II) et le nickel (II), ou d'autres métaux de transition, une variété de complexes parfois très différents par leur nature et leur stabilité alors que des systèmes plus simples sont observés pour les pseudo-tripeptides, à cause de la présence de 4 atomes donneurs dans le ligand.

Le **Schéma I-4** et le **Schéma I-5** donnent des exemples de structures proposées pour des complexes de cuivre (II) avec les deux types de peptidoamines.



**Schéma I-4 : Structure proposée pour un complexe tétramérique rencontré dans le système Cu(II)-carcinine (complexe Cu<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sup>-8</sup>)**



**Schéma I-5 : Structure déterminée par cristallographie pour le complexe CuLH<sub>2</sub> du système Cu(II)-glycyl-glycyl-histamine**

Le laboratoire possède une forte expérience dans la complexation des métaux de transition mais maîtrise également la synthèse organique de matériaux tensioactifs à propriétés spécifiques.

Pour mettre à profit les résultats précédents obtenus sur la complexation des peptidoamines, nous avons envisagé de synthétiser des molécules amphiphiles originales, par greffage d'une chaîne hydrophobe sur les peptidoamines tout en conservant les sites de complexation disponibles. En effet depuis plusieurs années, la recherche sur les matériaux tensioactifs se tourne vers la synthèse de molécules amphiphiles présentant des fonctionnalités additionnelles, chimiques ou biochimiques. Des groupements aux propriétés antibiotiques, antifongiques, antioxydantes... ont ainsi été intégrés dans la structure de molécules tensioactives<sup>(35, 36, 37)</sup>.

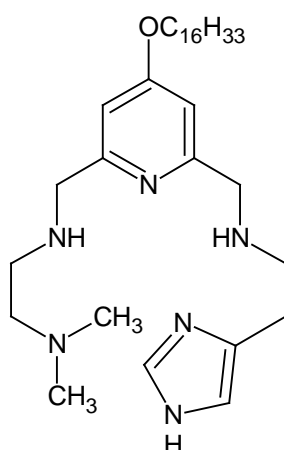
L'intérêt réside dans le fait que les systèmes organisés engendrés par les tensioactifs, possèdent de nombreuses applications potentielles aussi bien en chimie (ex : catalyse, réactivité en milieu micellaire) qu'en biologie où ils permettent la solubilisation de substances organiques en milieu aqueux (ex : extractions de protéines membranaires, transport de principes actifs en milieu biologique)

Les molécules auxquelles nous nous sommes intéressées, ont donc, comme fonction spécifique la propriété de complexer les métaux de transition.

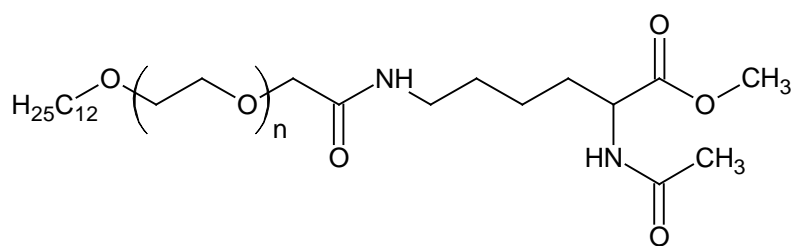
L'introduction d'une fonction chélatante dans un tensioactif a déjà été réalisée par ailleurs<sup>(38, 39)</sup>. Par exemple, des éthers couronnes amphiphiles alkyl-substitués ont été reportés<sup>(40, 41)</sup>. Des tensioactifs à base d'acides aminés ont également été synthétisés dans le but de faire de l'extraction sélective de cations en phase organique, par ultrafiltration ou bien par point de trouble<sup>(42)</sup>.

Enfin, l'introduction de peptides dans la partie hydrophile de tensioactifs a également été examinée. Les structures supramoléculaires formées dans l'eau par ce nouveau type de tensioactif permettent de mimer certaines fonctions de matériaux naturels (ex : substances organiques qui permettent l'élaboration des os, inhibiteurs de protéines engagés dans certaines infections virales) <sup>(43)</sup>. Toutefois, les propriétés complexantes de ce type de molécule n'ont pas été considérées.

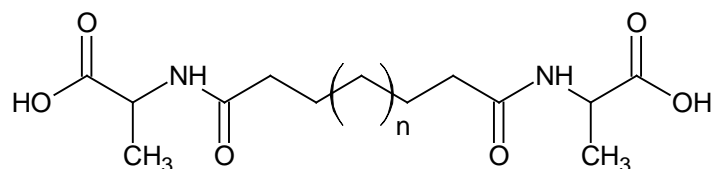
Les schémas suivants donnent plusieurs exemples de tensioactifs complexants trouvés dans la littérature.



**Schéma I-6 : Alcoxypyridine substituée (mime d'un site de complexation d'un antibiotique, la bléomycine) <sup>(39)</sup>**



**Schéma I-7 : Acetyl lysine greffée sur un alkyl-poly(oxyéthylène) <sup>(42)</sup>**



**Schéma I-8 : tensioactif bolaforme à base d'alanines <sup>(43)</sup>**

Dans une première partie, nous décrivons les aspects structuraux et thermodynamiques de la complexation de peptidoamines à base d'histamine. De nouvelles molécules ont été synthétisées et ont permis de compléter une étude générale réalisée sur une série de peptidoamines.

La seconde partie porte sur la préparation et la physicochimie de peptidoamines amphiphiles originales avec une étude parallèle des propriétés tensioactives et complexantes.

La formation des complexes et leur structure ont été étudiées à l'aide de diverses méthodes parmi lesquelles la potentiométrie, la spectroscopie UV-visible et la résonance magnétique nucléaire. Les aspects tensioactifs ont été examinés par tensiométrie, microscopie et diffraction de rayons X.

La partie suivante est consacrée à l'étude par résonance magnétique nucléaire, des échanges protoniques dans des solutions aqueuses de peptidoamines.

Enfin, une partie expérimentale rassemble les protocoles de toutes les synthèses ainsi que la caractérisation des produits synthétisés. Elle est suivie d'une conclusion générale.



# **II. PEPTIDOAMINES, SYNTHÈSE ET COMPLEXATION**

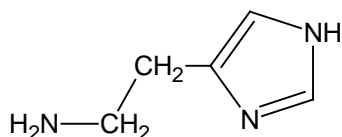




## II.1. INTRODUCTION

L'histamine provient de la décarboxylation de l'histidine (**Schéma II-1**). Elle existe en quantité variable dans tous les tissus des mammifères. Ses effets sont nombreux et se manifestent dans différentes parties de l'organisme, où elle intervient en tant que messager chimique. La libération de l'histamine survient principalement lors de réactions inflammatoires et allergiques (irritation de la peau, contraction des bronches, sécrétions gastriques...) <sup>(44)</sup>. Sa fonction dans le cerveau est moins bien connue, elle pourrait intervenir dans la régulation de l'alternance veille sommeil, le contrôle de la pression artérielle et de la température corporelle.

Depuis une trentaine d'année, de nombreux travaux ont été réalisés sur des pseudo-peptides dérivés de l'histamine, le laboratoire s'est consacré à l'étude de leurs propriétés complexantes.



**Schéma II-1 : Structure moléculaire de l'histamine**

Les cations Cu(II) et Ni(II) ont la particularité d'interagir fortement avec les molécules contenant le cycle imidazole, et particulièrement avec les dérivés pseudo-peptidiques de l'histamine.

L'étude de la glycyl-glycyl-histamine (Gly-Gly-Ha) a mis en évidence la formation d'un complexe plan carré où le cation est coordonné par 4 atomes d'azote <sup>(32)</sup>.

Nous avons synthétisé un nouveau ligand, l'alanyl-glycyl-histamine (Ala-Gly-Ha), sur lequel le résidu Ala, par l'intermédiaire de son carbone asymétrique, permet une étude par dichroïsme circulaire. Les propriétés de protonation et de coordination de ce ligand vis-à-vis des ions métalliques Cu(II) et Ni(II), ont été envisagées dans ce travail qui a permis également d'examiner l'effet de l'insertion d'un groupement méthyle dans la chaîne peptidique. Une autre peptidoamine, l' $\alpha$ -méthyl-alanyl-histamine a été synthétisée à cet effet et a permis de compléter l'étude des pseudo-dipeptides.

Dans un premier temps, nous allons d'abord effectuer un bref rappel sur les complexes de métaux de transition. Puis, nous présenterons les différentes techniques d'analyse qui permettent de les étudier. Ensuite, nous décrirons la synthèse de ces molécules originales, puis leurs propriétés acido-basiques seront étudiées. Enfin la complexation des pseudo-tripeptides sera traitée séparément de celle des pseudo-dipeptides.

## II.2. RAPPELS SUR LES COMPLEXES DE MÉTAUX DE TRANSITION

Les métaux de transition désignent généralement les éléments de la classification périodique dont la sous-couche d est partiellement remplie. Leur structure électronique s'écrit :

$(n-1)d^x ns^2$  avec  $n \geq 4$  et  $0 < x < 10$ .

Cette caractéristique leur confère plusieurs propriétés, dont l'existence de plusieurs degrés d'oxydation stables et la complexation de leurs ions avec des ligands comportant des doublets électroniques libres. Les ligands s'unissent aux ions métalliques par un type de liaison particulière, dite liaison de coordination qui correspond à l'apport d'une ou plusieurs paires d'électrons de la couche de valence du ligand, aux orbitales vides du métal.

Trois géométries de complexes sont courantes, octaédrique, tétraédrique et plan carré.

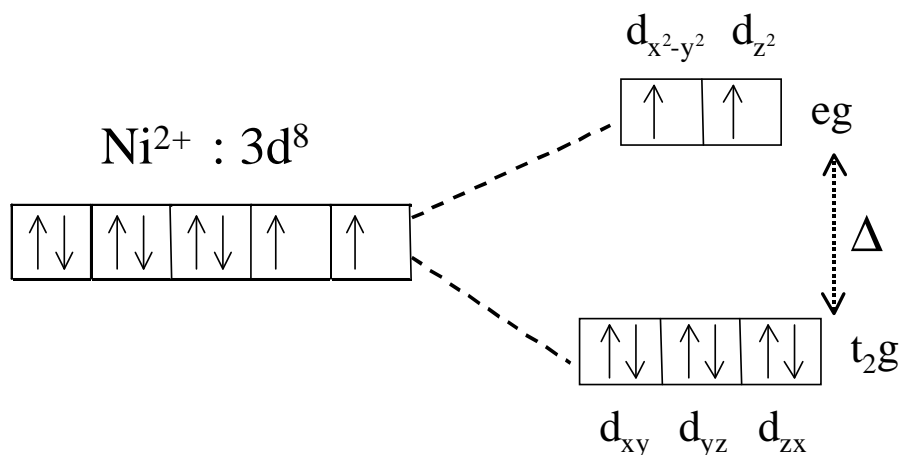
Les complexes de métaux de transition sont généralement colorés en raison de transitions énergétiques dans le domaine du visible. Ce phénomène s'explique par la théorie électrostatique du champ cristallin ou plus encore par la théorie des orbitales moléculaires.

Prenons l'exemple d'un complexe de nickel (II) de géométrie octaédrique :

L'ion nickel (II) compte 8 électrons sur le niveau 3d. Avant la complexation, les orbitales d sont dégénérées, c'est à dire qu'elles sont au même niveau énergétique.

La complexation va avoir pour effet de lever la dégénérescence. En simplifiant le modèle du champ cristallin, l'approche des ligands modifie l'énergie du cation au centre de l'octaèdre, les orbitales vis à vis des ligands sont déstabilisées par répulsion électrostatique et inversement, les autres sont stabilisées. Le niveau d se trouve alors divisé en deux sous-niveaux  $t_{2g}$  et  $e_g$  avec une séparation énergétique entre les deux que l'on note  $\Delta$  (**Schéma II-2**). La règle du barycentre impose que l'énergie de stabilisation du niveau  $t_{2g}$  est compensée par l'augmentation du niveau  $e_g$ .

La faible valeur de  $\Delta$  a pour conséquence de permettre l'excitation d'un électron du niveau inférieur vers le niveau supérieur par absorption de lumière visible, la couleur du complexe provient alors de la lumière transmise.

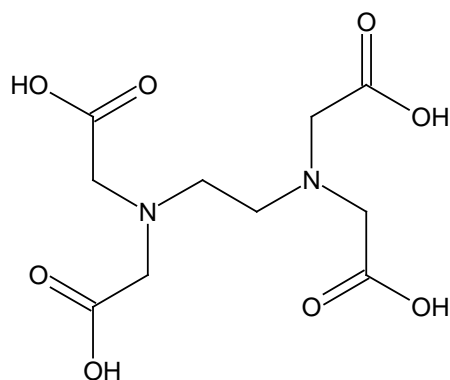


**Schéma II-2 : Illustration de la levée de dégénérescence du niveau d pour un champ cristallin octaédrique (ex : complexe de Ni(II))**

Pour cette raison, la spectrophotométrie UV-visible est une technique qui peut permettre de caractériser les complexes de métaux de transition.

Par exemple, dans le cas de complexes de cuivre (II) avec des ligands peptidiques, l'augmentation du nombre d'atomes d'azote coordonnés provoque un changement de couleur du bleu au rouge. Ce déplacement de la bande d'absorption, qui dépend de la nature des atomes coordonnés dans les positions équatoriales, est dû à la substitution de donneurs oxygénés (carboxylate,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ) par des donneurs azotés (amine, amide, imidazole). On peut donc obtenir des informations sur la structure d'un complexe à partir de son spectre d'absorption.

Par ailleurs, la coloration des complexes est une propriété que l'on emploie en complexiométrie pour doser les métaux de transition <sup>(45)</sup>. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une molécule chélatante : l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique, **Schéma II-3**). Le changement de couleur, faisant suite à la coordination de l'ion métallique dosé par l'EDTA, permet de repérer le point d'équivalence.



**Schéma II-3 : Structure moléculaire de l'EDTA**

## **II.3. TECHNIQUES ANALYTIQUES**

Pour étudier les propriétés de molécules complexantes, il est nécessaire de faire appel à différentes techniques d'investigation et d'opérer en deux étapes.

La première consiste à déterminer la formule brute des complexes ainsi que leur constante de formation, par potentiométrie. Ces premiers résultats permettent de connaître la composition d'un système en fonction du pH, et des concentrations relatives en ligand et en ion métallique. À partir de ces résultats et dans le but de les confirmer, la seconde étape consiste à étudier la structure des complexes du système par l'utilisation de méthodes spectroscopiques (spectrophotométrie UV-visible, RMN, RPE...) et de la radiocristallographie lorsqu'une recristallisation du complexe est possible.

### **II.3.1. Potentiométrie**

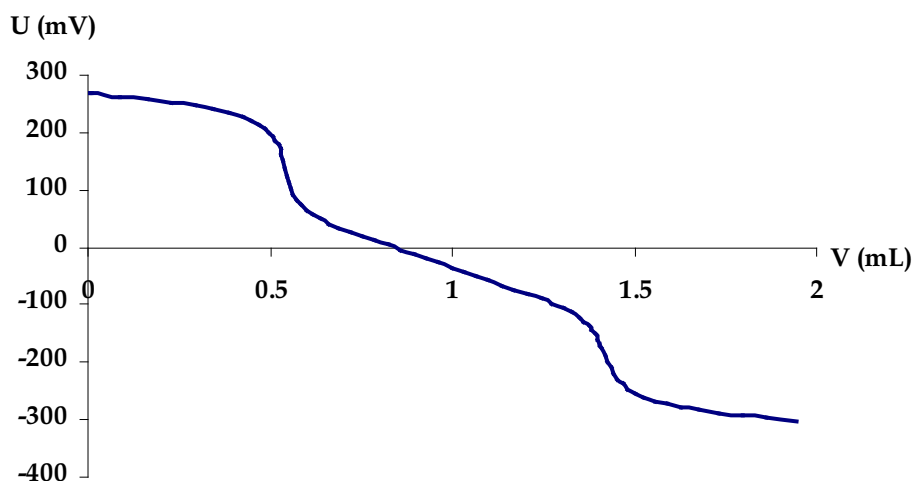
#### **II.3.1.1. Principe**

Dans le cas de ligands peptidiques, l'ion  $H^+$  et l'ion métallique sont en compétition afin de se lier aux groupements donneurs des ligands ( $-COOH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  ...). Quelle que soit la réaction qui se met en place dans la solution, elle s'accompagne généralement de la libération de protons en raison du remplacement des hydrogènes mobiles du ligand par un ion métallique. Il est donc possible de tirer des conclusions sur la formule brute et la stabilité des

complexes présents en solution, en mesurant le nombre moyen de protons libérés en fonction du pH.

Techniquement, il s'agit d'un dosage acide-base d'une solution acide de ligand par de la soude (**Figure II-1**). La mesure du potentiel  $\text{H}_3\text{O}^+/\text{H}_2\text{O}$  de la solution est effectuée en fonction du volume de soude ajouté, pour obtenir une courbe de dosage potentiométrique.

L'ajustement mathématique de cette courbe expérimentale par une courbe théorique, permet de déterminer les constantes de formation des différentes espèces.



**Figure II-1 : Exemple de courbe de dosage potentiométrique :  
Différence de potentiel mesurée en fonction du volume de soude ajouté**

### II.3.1.2. Conditions expérimentales

Les solutions sont préparées dans de l'eau osmosée et sont dosées par de la soude TITRINORM, prête à l'emploi, de normalité précisément connue ( $0,1000 \pm 0,2\%$ ). Les titrages sont effectués à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , sous atmosphère d'argon pour éviter la carbonatation de la soude et la force ionique est fixée à  $0,1\text{ mol.L}^{-1}$  par un sel de fond ( $\text{NaClO}_4$ )<sup>(46)</sup>. Les concentrations des solutions de ligand et d'ion métallique sont de l'ordre de  $0,01\text{ mol.L}^{-1}$ .

Les dosages sont réalisés à l'aide d'un titreur Metrohm titrino 721 NET, connecté à un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface RS 232C, ayant une amplitude de déplacement de 10 000 pas. Il fonctionne avec une seringue de 5 mL permettant des ajouts de soude de  $0,5\text{ }\mu\text{L}$  minimum.

La différence de potentiel est mesurée entre une électrode de verre et une référence interne de type ORION Ag / AgCl Modèle 91-03.

Le logiciel TINET détecte la stabilité du potentiel, permet de délivrer progressivement la solution de soude et enregistre les données du titrage dans un fichier.

### II.3.1.3. Exploitation des données

Pour convertir le potentiel mesuré en pH, nous utilisons l'équation de Nernst modifiée, qui relie la différence de potentiel à la concentration en proton libre (**Équation II-1**).

$$E = E_0 + K \log [H^+] + J_H [H^+] + J_{OH} [H^+]^{-1} K_e \quad \text{Équation II-1}$$

**E** : Force électromotrice mesurée

**E<sub>0</sub>** : Force électromotrice standard

$$K = RT/F$$

Avec **R** : constante des gaz parfaits

**F** : nombre de Faraday

**T** : la température en Kelvin

**K<sub>e</sub>** : Constante d'autoprotolyse de l'eau ( $\log K_e = -13,75$  à  $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  et à  $T = 25 \text{ °C}$ )<sup>(46)</sup>

**J<sub>H</sub>** et **J<sub>OH</sub>** sont des paramètres d'ajustement dans la zone acide et alcaline, respectivement pour la correction des erreurs expérimentales dues au potentiel de jonction et aux erreurs acides et surtout alcalines de l'électrode. Nous pouvons ainsi étendre les mesures en milieu basique jusqu'à pH = 11,5.

Pour obtenir les valeurs inconnues, **E<sub>0</sub>**, **J<sub>H</sub>** et **J<sub>OH</sub>**, l'électrode est étalonnée avant chaque dosage par le titrage de 5 mL d'une solution appelée TRIS. Il s'agit du mélange d'un acide fort (HClO<sub>4</sub>) et d'un acide faible, le TRIS (tris-(hydroxyméthyle)-aminométhane, pK<sub>a</sub> = 8,06)<sup>(47)</sup>. Le résultat de ce dosage est introduit dans un programme, écrit en VISUAL BASIC. Connaissant la concentration de la soude et les valeurs de potentiel en fonction du volume de soude ajouté, ce programme calcule par la méthode des moindres carrés les volumes d'équivalence, puis les paramètres **E<sub>0</sub>**, **J<sub>H</sub>** et **J<sub>OH</sub>** de l'**Équation II-1**.

Le programme effectue une régression sur l'équation de Nernst modifiée, connaissant la concentration en proton [H<sup>+</sup>], avant et après le premier point d'équivalence qui correspond au dosage de l'acide fort (**Équation II-2 et Équation II-3**)<sup>(48)</sup>.

Avant la première équivalence,

### Équation II-2

$$[\text{H}^+] = \frac{1}{V_i + V_{\text{NaOH}}} \left[ \left[ [\text{acide}]_i - [\text{TRIS}]_i + \frac{K_{\text{TRIS}} \cdot [\text{TRIS}]_i}{K_{\text{TRIS}} + [\text{H}^+]} \right] \cdot V_i - [\text{NaOH}] \cdot V_{\text{NaOH}} \right]$$

Après la première équivalence,

### Équation II-3

$$[\text{OH}^-] = \frac{K_e}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{V_i + V_{\text{NaOH}}} \left[ [\text{NaOH}] \cdot V_{\text{NaOH}} - \left[ [\text{acide}]_i + \frac{K_{\text{TRIS}} \cdot [\text{TRIS}]_i}{K_{\text{TRIS}} + [\text{H}^+]} \right] \cdot V_i \right]$$

Avec  $V_i$  = volume initial = 5mL

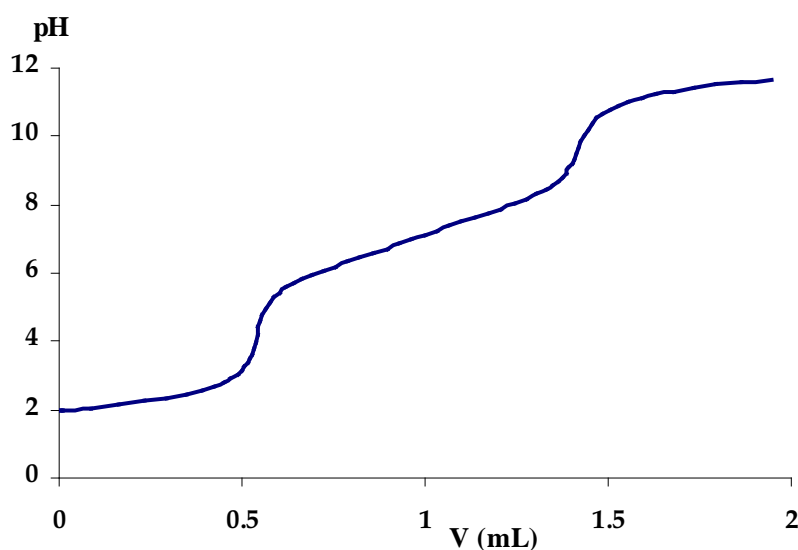
$V_{\text{NaOH}}$  = Volume de soude ajouté : donnée du titrage

$[\text{acide}]_i$  = concentration initiale en acide } Déterminées par les points d'équivalences  
 $[\text{TRIS}]_i$  = concentration initiale en TRIS }

$[\text{NaOH}]$  = concentration de la soude : 0,1000 mol.L<sup>-1</sup>

$K_{\text{TRIS}}$  : constante de dissociation du TRIS = 10<sup>-8,06</sup>

Une fois les 3 paramètres  $E_0$ ,  $J_H$  et  $J_{OH}$  obtenus, le programme calcule les valeurs de pH correspondants aux potentiels mesurés lors du dosage du ligand (**Figure II-2**)

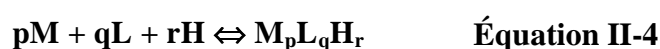


**Figure II-2 : Transformation de la courbe de dosage potentiométrique :  
Conversion du potentiel en pH**



### II.3.1.4. Calcul des constantes de protonation et de stabilité :

Les données pH-métriques obtenues sont ensuite utilisées pour calculer les constantes de formation des espèces à l'aide du programme informatique PSEQUAD <sup>(49)</sup>, écrit en FORTRAN. Ces constantes de stabilité sont définies par les équations ci-dessous. L'Équation II-4 décrit de façon générale l'équilibre de formation des différentes espèces et l'Équation II-5 est la définition de la constante de formation  $\beta_{pqr}$  (les crochets indiquent des activités).



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad \text{Équation II-5}$$

avec **M** : cation métallique

**L** : ligand

**H** : proton

Par convention, **r** est négatif lorsque le nombre de déprotonations sur le complexe est supérieur au nombre de déprotonations sur le ligand seul. Par exemple, un ligand qui possède 2 protons labiles est noté **LH<sub>2</sub>**. S'il forme un complexe avec un cation **M** en perdant 4 protons, on nommera le complexe **MLH<sub>2</sub>**.

L'activité d'une espèce ionique est égale au produit de la concentration par le coefficient d'activité  $\gamma$ . Celui-ci est relié à la force ionique pour un ion par l'Équation II-6.

$$\log \gamma = \frac{0,5z^2 \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + A \cdot I \quad \text{Équation II-6}$$

avec  $\gamma$  : coefficient d'activité

**I** : force ionique

**z** : charge de l'ion

**A** : terme correctif variable selon le système et la nature de l'ion

La constante de formation peut alors s'écrire selon l'**Équation II-7**.

$$\beta_{pqr} = \frac{|M_p L_q H_r|}{|M|^p |L|^q |H|^r} \cdot \frac{\gamma_{M_p L_q H_r}}{\gamma_M^p \gamma_L^q \gamma_H^r} \quad \text{Équation II-7}$$

Les barres verticales indiquent des concentrations.

En travaillant à force ionique constante, les coefficients d'activité sont constants, et on mesure alors une constante de formation apparente qui dépend de la force ionique et de la nature de l'électrolyte.

L'utilisation du logiciel PESQUAD nécessite la création d'un fichier où sont rassemblés, les concentrations et les volumes des solutions, les données pH-métriques des différents dosages et les espèces qui sont supposées être présentes dans le système. Pour chacune de ces espèces, une constante de formation  $\beta$  est donnée. Le programme permet de déterminer quelles espèces existent et ajuste leur constante de formation.

Le programme calcule le bilan de matière de chacun des composés du système (**M**, **L**, **H**) à l'aide de l'**Équation II-8** :

$$C_t = \sum_{J=1}^n \alpha_{jt} \cdot [S_j] = \sum_{J=1}^n \alpha_{jt} \cdot \beta_j \prod_{i=1}^k [C_i]^{\alpha_{ji}} \quad \text{Équation II-8}$$

avec  $t = 1, 2, \dots, k$

$C_t$  : concentration totale du  $t^{\text{ième}}$  composé

$n$  : nombre d'espèces contenant le  $t^{\text{ième}}$  composé (ML, MLH, ...)

$\alpha_{jt}$  : coefficient stœchiométrique du  $t^{\text{ième}}$  composé dans la  $j^{\text{ième}}$  espèce

$k$  : nombre de composés dans le système (en principe 3 : M, L, H)

$[S_j]$  : concentration de la  $j^{\text{ième}}$  espèce dans le système

$[C_i]$  : concentration libre à l'équilibre du  $i^{\text{ième}}$  composé dans le système

$\beta_j$  : constante de formation de la  $j^{\text{ième}}$  espèce

Le calcul se déroule en 2 étapes, dans un premier temps, le programme calcule les concentrations libres inconnues par la méthode de Newton-Raphson en résolvant l'**Équation II-9**, puis les valeurs de départ proposées pour les constantes de formation  $\beta$  sont affinées.

$$[\text{Ci}]_{\text{calculée}} - [\text{Ci}]_{\text{expérimentale}} = 0 \quad \text{Équation II-9}$$

Il est important de noter que le programme ne permet pas de traiter des systèmes à plusieurs phases donc toute précipitation rendra impossible la détermination des constantes de formation.

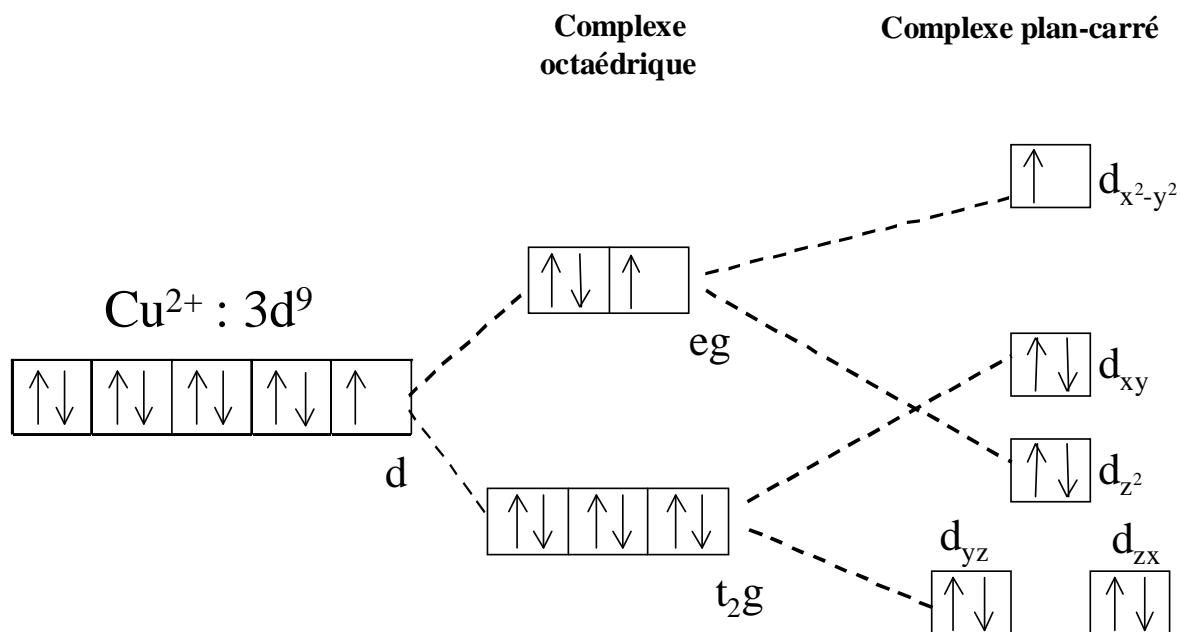
## II.3.2. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

### II.3.2.1. Principe et allure des spectres

La spectroscopie UV-visible repose sur les transitions électroniques qui ont lieu lors de l'absorption d'ondes dont les fréquences se situent dans le spectre visible et ultraviolet. Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas d'une coordination de géométrie octaédrique, la complexation d'un ion métallique de transition conduit à l'éclatement du niveau d'énergie d.

Les ions Cu(II) et Ni(II) n'étant pas toujours stables en géométrie rigoureusement octaédrique, les complexes présentent souvent une structure plan carré. Cet arrangement provient d'un étirement de l'octaèdre, selon l'axe vertical (effet Jahn-Teller). Lorsque cette déformation atteint son maximum, les ligands dans les positions axiales sont rejetés à l'infini et le cation se trouve donc dans un environnement plan carré. Les ligands se situent dans le plan xy et déstabilisent fortement l'orbitale  $dx^2-y^2$  ainsi que l'orbitale dxy. Il en résulte une nouvelle modification des niveaux d'énergie (**Schéma II-4**) car les orbitales ayant une composante verticale sont stabilisées.

Dans cette configuration, il existe 4 niveaux d'énergie différents et 3 états excités possibles. Les spectres d'absorption des complexes de cuivre (II) par exemple, devraient donc présenter 3 bandes correspondantes à 3 transitions électroniques. La proximité de ces transitions fait que les spectres ne présentent en fait qu'une bande très large qui correspond à la somme des 3 bandes.



**Schéma II-4 : Éclatement du niveau d'énergie d pour un complexe plan carré de cuivre (II)**

La position du maximum de la bande d'absorption peut renseigner sur la structure d'un complexe.

L'évolution des spectres en fonction du pH ou du rapport métal/ligand permet de confirmer la composition d'un système déterminé par potentiométrie.

### II.3.2.2. Conditions expérimentales

Les spectres ont été enregistrés sur un VARIAN CARY 3E à double faisceau en utilisant des cellules en quartz avec un chemin optique de 1 cm.

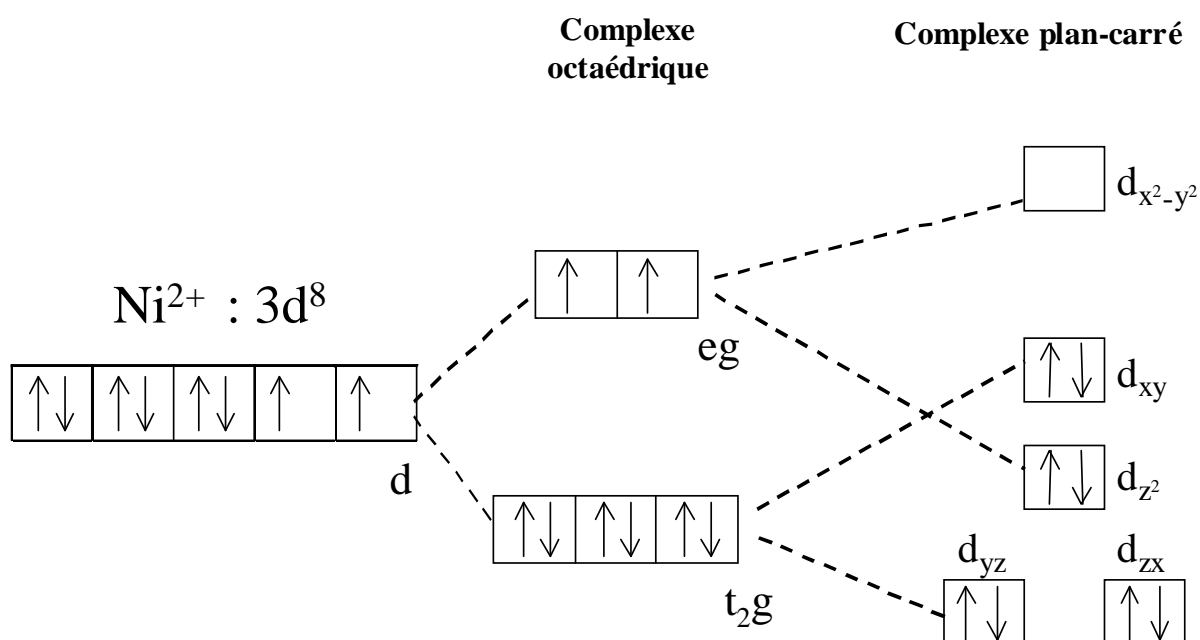
Les concentrations des solutions sont du même ordre que celles utilisées en potentiométrie et le pH a été ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique, à l'aide d'une burette automatique Metrohm 665 Dosimat. La précision des volumes ajoutés est de 1  $\mu$ L.

## II.3.3. Résonance magnétique nucléaire

### II.3.3.1. Intérêt

La spectroscopie RMN permet d'obtenir des informations sur la structure des complexes et de vérifier le système établi par potentiométrie. Cependant, les complexes de métaux de transition sont généralement paramagnétiques, ils possèdent un ou plusieurs électrons célibataires qui peuvent interagir avec les noyaux des ligands. La conséquence est une perturbation des temps de relaxation qui provoque un élargissement des raies de résonance et une impossibilité d'obtenir des informations à partir des spectres.

Le cuivre (II) possède toujours un électron célibataire quelque soit la configuration énergétique des orbitales car il possède un nombre impair d'électrons sur la couche 3d. L'étude par RMN des complexes de cuivre (II) s'avère donc difficile. Par contre, il est possible d'étudier des complexes de nickel (II) mais uniquement lorsque le cation est coordonné avec une symétrie plan carré car tous les électrons y sont appariés, on dit que le complexe est diamagnétique (**Schéma II-5**).



**Schéma II-5: Éclatement du niveau d'énergie d pour un complexe plan carré de nickel (II)**

La spectroscopie RMN peut aussi être utilisée pour étudier les équilibres de protonation intervenant avec des molécules organiques telles que des peptides. Il est possible de déterminer des constantes d'acidité (pKa) par des titrages RMN et également des constantes de vitesse d'échange protonique (chapitre IV).

### **II.3.3.2. Conditions expérimentales**

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DRX 400 avec une fréquence de travail de 400 MHz.

Les déplacements chimiques des spectres  $^1\text{H}$  sont mesurés par rapport au dioxanne (3,70 ppm). Les spectres ont été réalisés en milieu aqueux avec 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$ .

Les concentrations des solutions sont du même ordre ou supérieures à celles utilisées en potentiométrie et le pH a été ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique.

### **II.3.4. Radiocristallographie**

La détermination de la structure exacte d'un complexe peut se faire par diffraction des rayons X, à condition de réussir à obtenir le complexe à l'état solide sous forme de cristal.

Les intensités diffractées ont été enregistrées sur un diffractomètre NONIUS CCD, au service commun de diffractométrie de l'université de Nancy 1, en utilisant le rayonnement monochromatisé  $\overline{\text{K}\alpha}$  du molybdène. Les structures ont été résolues par une méthode directe de détermination des phases à l'aide du programme SHELX. 97<sup>(50)</sup> Les positions et les facteurs d'agitation thermique anisotrope des atomes autres que l'hydrogène ont été affinés par une méthode de moindres carrés. Pour les atomes d'hydrogène, seules les positions ont été affinés, les facteurs d'agitation thermique isotrope ont été gardés constants à  $5 \text{ \AA}^2$ .

### **II.3.5. Résonance paramagnétique électronique**

#### **II.3.5.1. Principe**

La spectroscopie RPE permet de préciser la structure d'un complexe en étudiant le champ du ligand autour du cation, à condition que celui-ci possède au moins un électron célibataire, ce qui est le cas pour les complexes de cuivre (II).

L'interaction entre le moment magnétique d'un électron libre et un champ magnétique appliqué provoque la levée de dégénérescence de spin et l'apparition de deux niveaux distincts. Une transition entre ces niveaux énergétiques peut être induite par un rayonnement électromagnétique du domaine des micro-ondes.

Il y a résonance lorsque  $h \cdot \nu = g_e \cdot \beta \cdot B$

avec  $h$  : constante de Planck

$\nu$  : fréquence du spectromètre

$g_e$  : facteur de Landé de l'électron libre

$\beta$  : magnéton de Bohr électronique =  $9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$

$B$  : champ magnétique appliqué

Dans les complexes de cuivre (II), l'électron est placé dans l'environnement de l'ion. Une interaction électron-noyau dite hyperfine intervient si le spin nucléaire  $I$  du cation est non nul, on observe alors  $2I+1$  transitions. Ainsi dans le cas du cuivre (II), la structure hyperfine présente 4 composantes car  $I = 3/2$ .

De même, une interaction est possible entre l'électron et les noyaux des atomes chélatants, on la nomme superhyperfine.

Si le ligand possède  $n$  atomes équivalents, chaque raie de structure hyperfine est alors décomposée en  $2nI+1$  composantes. Le spin des noyaux d'azote étant égal à 1, on peut en déduire le nombre d'atomes d'azote liés au cation. Par exemple, on doit observer 9 raies lorsque 4 atomes d'azote sont liés au cuivre.

La description d'un spectre de RPE en solution se fait par l'intermédiaire de 3 paramètres, qui apportent des renseignements sur la coordination de l'ion métallique : la constante de couplage hyperfin  $A_0$ , la constante de couplage superhyperfine  $a_N$  et le paramètre  $g_0$ .

### II.3.5.2. Conditions expérimentales

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ER-200 D à température ambiante et à 9,45 GHz.

Les concentrations des solutions sont du même ordre que celles utilisées en potentiométrie et le pH a été ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique.

## **II.3.6. Dichroïsme circulaire**

### **II.3.6.1. Principe**

Tout comme la spectrophotométrie, le dichroïsme circulaire est basé sur l'absorption de lumière dans les domaines du visible et de l'ultraviolet.

La lumière est une onde électromagnétique dont le champ électrique est perpendiculaire à la direction de propagation. Lorsque la lumière est polarisée, le champ électrique  $E$  ne se propage plus que dans un plan et on peut alors le considérer comme la somme de deux composantes : gauche  $E_g$  et droite  $E_d$ .

Une substance chirale est dite optiquement active, elle possède des propriétés physiques différentes pour les champs  $E_g$  et  $E_d$ , ce qui se traduit par une rotation du plan de polarisation.

Le dichroïsme circulaire s'appuie sur la capacité des molécules optiquement active à absorber différemment la lumière polarisée à droite et la lumière polarisée à gauche. En pratique, on considère qu'il existe une différence de coefficient d'extinction entre les deux lumières :  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$ .

Pour qu'une molécule soit active en dichroïsme circulaire, il faut qu'elle soit chirale et qu'elle absorbe la lumière. Pour certaines molécules, la propriété d'absorption de la lumière n'est possible que lors de la formation de complexes.

### **II.3.6.2. Conditions expérimentales**

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Jobin-Yvon CD6 en utilisant des cellules en quartz avec un chemin optique de 1 cm.

Les concentrations des solutions sont du même ordre que celles utilisées en potentiométrie et le pH a été ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique.



## **II.3.7. Spectrométrie de masse avec ionisation électrospray**

### **II.3.7.1. Principe**

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui consiste à séparer des molécules, préalablement ionisées et mises dans leur état gazeux, en fonction de leur masse et de leur charge.

Parmi plusieurs méthodes, l'électrospray permet d'ioniser les molécules d'une solution et de les transférer en phase gazeuse.

Cette technique consiste à soumettre à un champ électrique intense, une solution d'échantillon introduite dans un capillaire. On obtient ainsi une accumulation de charges à la surface du liquide, ce qui provoque la pulvérisation de l'échantillon en gouttelettes chargées. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette va provoquer une cascade d'explosions, au cours de laquelle les gouttelettes vont devenir de plus en plus petites jusqu'à obtenir des ions libres qui sont ensuite poussés dans un analyseur.

### **II.3.7.2. Conditions expérimentales**

Les spectres ont été enregistrés sur un appareil VG PLATFORM II, la température de la source était de 80 °C et un flux d'azote a été utilisé pour aider à l'évaporation du solvant. Les conditions étaient les suivantes : voltage du cône : 40 V et débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Les concentrations des solutions sont du même ordre que celles utilisées en potentiométrie et le pH a été ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique.

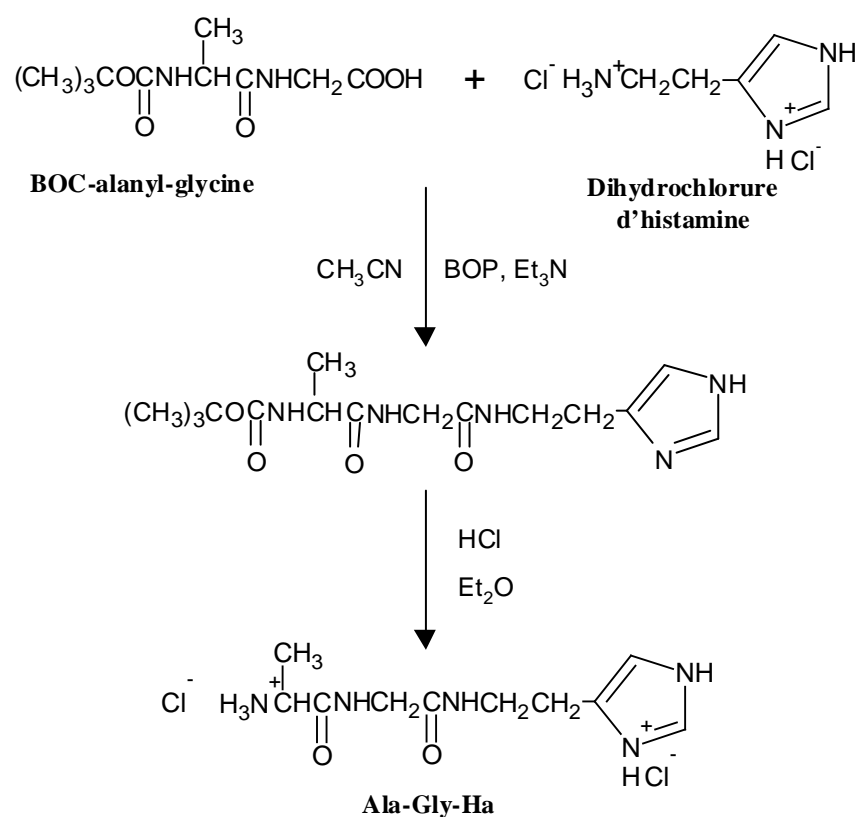
## **II.4. SYNTHÈSE DE PEPTIDOAMINES**

À l'exception de la carcinine, les peptidoamines à base d'histamine ne sont pas commerciales, Une méthode de synthèse simple, rapide et originale a été mise en place au laboratoire pour les synthétiser <sup>(51)</sup>. La procédure adoptée consiste à coupler avec l'histamine un peptide ou un acide aminé dont l'amine terminale est protégée par le groupement protecteur BOC (tertio-butyloxycarbonyle). L'agent de couplage utilisé est le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium).

Nous avons appliqué cette procédure à la synthèse de nos nouveaux ligands : l'alanyl-glycyl-histamine (Ala-Gly-Ha) et l' $\alpha$ -methyl-alanyl-histamine ( $\alpha$ -Me-Ala-Ha).

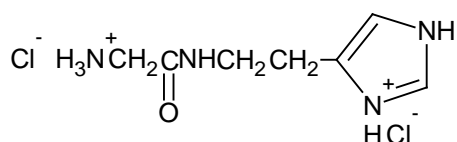
La synthèse se déroule en deux étapes représentées sur le **Schéma II-6**. Dans un premier temps est effectué le couplage peptidique entre les deux molécules de départ, puis la déprotection de l'amine terminale est réalisée en milieu acide.

Cette méthode présente l'avantage de n'utiliser qu'un seul réacteur pour le couplage peptidique et pour le déblocage du groupement protecteur BOC. Le protocole expérimental est décrit au chapitre V. Au final, les rendements ne sont pas excellents ( $\approx 60\%$ ) mais les produits obtenus sont très propres grâce à une recrystallisation terminale qui est indispensable pour pouvoir réaliser une étude potentiométrique de ces ligands.

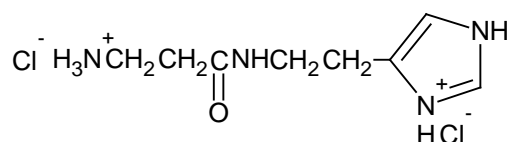


**Schéma II-6: Synthèse d'une peptidoamine (ex : synthèse de l'alanyl-glycyl-histamine)**

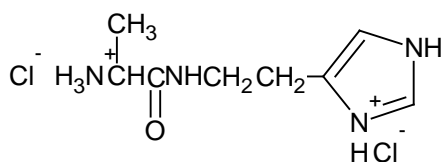
Les structures moléculaires des ligands traités dans ce chapitre sont représentées sur le **Schéma II-7**. Les molécules  $\beta$ -Ala-Ha, Gly-Ha, Gly-Gly-Ha<sup>(47)</sup> et Ala-Ha<sup>(52)</sup> ont été étudiées précédemment au laboratoire, elles sont donc citées en tant que référence. Les travaux exposés dans cette partie concernent les nouvelles molécules synthétisées Ala-Gly-Ha et  $\alpha$ -Me-Ala-Ha.



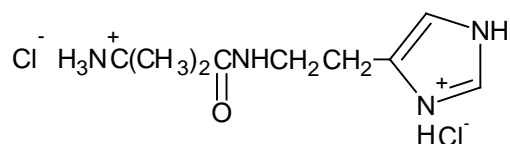
glycyl-histamine : **Gly-Ha**



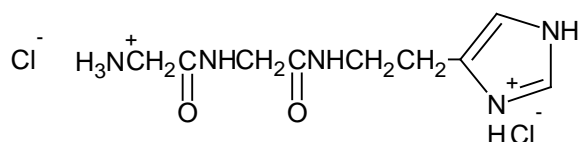
$\beta$ -alanyl-histamine :  **$\beta$ -Ala-Ha**



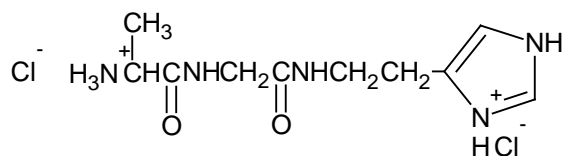
alanyl-histamine : **Ala-Ha**



$\alpha$ -methyl-alanyl-histamine :  **$\alpha$ -Me-Ala-Ha**



glycyl-glycyl-histamine : **Gly-Gly-Ha**



alanyl-glycyl-histamine : **Ala-Gly-Ha**

**Schéma II-7: Structures moléculaires des peptidoamines traitées dans ce chapitre**

## II.5. ÉTUDE DE LA PROTONATION DES PEPTIDOAMINES

Pour étudier précisément les propriétés complexantes des ligands, il est nécessaire de connaître leurs constantes d'acidité. Elles ont été déterminées par potentiométrie à partir des courbes de dosage des ligands seuls, à 25°C et à une force ionique de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

Les valeurs trouvées pour les différents produits synthétisés sont reportées dans le **Tableau II-1**.

Conformément à l'usage,  $pK_1 > pK_2$ , la première protonation ( $pK_1$ ) a lieu sur l'azote amino et la seconde ( $pK_2$ ), sur le noyau imidazole

	Gly-Gly-Ha	Ala-Gly-Ha	$\beta$ -Ala-Ha	Gly-Ha	Ala-Ha	$\alpha$ -Me-Ala-Ha
$pK_1$	7,85	7,87	9,23	8,04	8,06	8,10
$pK_2$	6,81	6,77	6,84	6,78	6,67	6,71

**Tableau II-1 : Constantes d'acidités des produits étudiés ( $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ )**

La valeur de  $pK_2$  ne varie quasiment pas alors que celle de  $pK_1$  change en fonction du type de ligand considéré.

Le  $pK_a$  de l'amine terminale dépend fortement de la position de la liaison peptidique la plus proche. En effet, celle-ci a tendance à modifier la basicité de l'amine par un effet électroattracteur du groupement carbonyle. Ceci explique la valeur élevée du  $pK_1$  de la  $\beta$ -alanyl-histamine par rapport aux autres pseudo-dipeptides, à cause des deux  $\text{CH}_2$  qui affaiblissent l'effet électroattracteur.

Pour les pseudo-tripeptides, le groupement amino est moins basique à cause de l'effet coopératif des deux groupes peptidiques.

Par ailleurs, l'addition de groupements méthyles sur le dernier acide aminé du côté N-terminal semble exercer un très faible effet inductif donneur, qui augmente la basicité du groupe amino.

A l'exception de la  $\beta$ -alanyl-histamine, il y a un faible écart entre les deux  $pK$  des ligands, ce qui implique une compétition entre les deux processus de déprotonation. Le cycle imidazole n'est donc pas forcément le site déprotoné en premier pour toutes les molécules.

La détermination des constantes d'acidités permet déjà, de connaître les propriétés acido-basiques des molécules synthétisées mais elle est également indispensable pour pouvoir étudier les propriétés complexantes.

## II.6. COMPLEXATION MÉTALLIQUE

### II.6.1. Complexes de pseudo-tripeptides

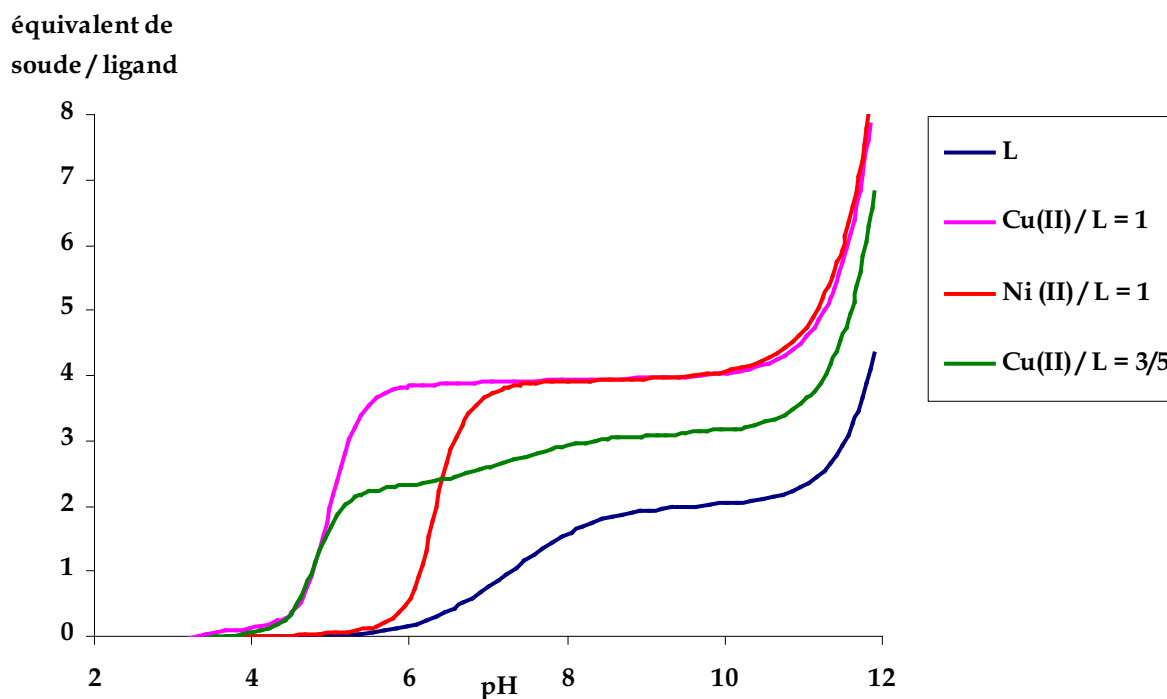
Les pseudo-tripeptides avec l'histamine en troisième position sont considérés comme des mimes du site de coordination du cuivre (II), dans la sérum albumine de plusieurs mammifères. Le seul ion métallique qui peut concurrencer le cuivre (II) pour ce site est le nickel (II).

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, des peptides ayant un résidu histidyle en troisième position et des acides aminés variés du côté N-terminal ont souvent été utilisés pour simuler ce site. Les résultats montrent la formation d'un complexe majoritaire dans la zone de pH physiologique avec 4 atomes d'azote coordonnés. Des complexes plus minoritaires en milieu acide avec un, deux et trois atomes d'azote coordonnés sont détectés par potentiométrie mais leur existence est controversée car il est assez difficile de les détecter avec des techniques spectroscopiques du fait de leur faible concentration. Certains auteurs pensent même que ces espèces mineures ne sont qu'un artefact de la méthode potentiométrique <sup>(7)</sup>.

La glycyl-glycyl-histidine très souvent étudiée, présente l'inconvénient de posséder un groupement carboxylate qui n'existe pas dans la structure de la sérum albumine. La glycyl-glycyl-histamine a été préférée au laboratoire il y a quelques années, car elle offre un meilleur modèle et a permis de confirmer le rôle mineur du carboxylate, sur la stabilité des complexes

#### II.6.1.1. Étude des complexes de cuivre (II) et de nickel (II) du ligand Ala-Gly-Ha

Il est intéressant de commencer par la présentation des courbes de titrages potentiométriques des systèmes  $\text{Cu}^{2+}$  - Ala-Gly-Ha et  $\text{Ni}^{2+}$  - Ala-Gly-Ha, pour différents rapports métal/ligand (**Figure II-3**). Les courbes  $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$  ont été transformées en courbes "équivalents de soude par ligand" =  $f(\text{pH})$  pour mieux visualiser les déprotonations.



**Figure II-3 : Courbes des titrages potentiométriques d'Ala-Gly-Ha**

Dans une solution équimolaire de Cu(II) et d'Ala-Gly-Ha, nous observons à partir de pH = 5 la consommation de quatre équivalents de base. Pour le système Ni(II) - Ala-Gly-Ha les processus de déprotonation se produisent à un pH plus élevé (6,5), mais la courbe de titrage est ensuite pratiquement identique à celle du cuivre (II). L'analyse de ces courbes par le logiciel PSEQUAD permet d'identifier la formation de 4 espèces : MLH, MLH<sub>1</sub>, MLH<sub>2</sub>, MLH<sub>3</sub>, le ligand totalement protoné étant LH<sub>2</sub>.

Les constantes de formation de ces complexes sont rassemblées dans le **Tableau II-2** et sont comparées à celles obtenues pour Gly-Gly-Ha. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'incertitude sur les constantes de formation données par le programme (par exemple, 11,59 (06) signifie  $11,59 \pm 0,06$ ).

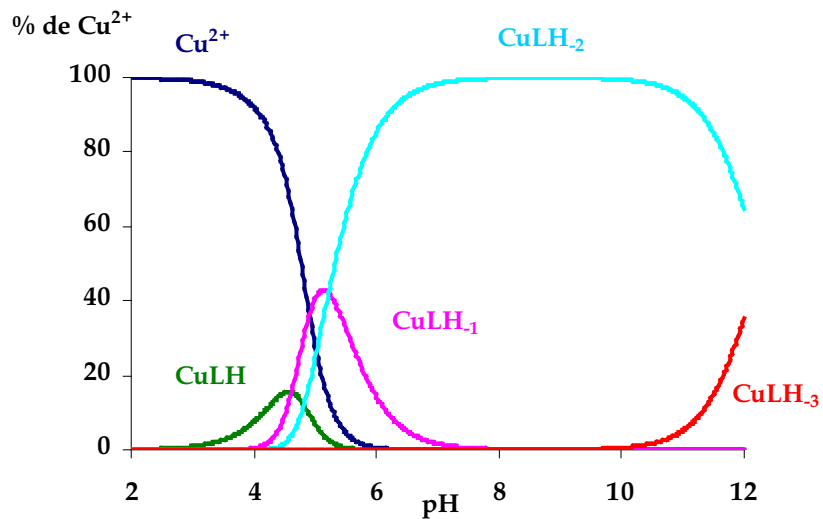
	Ala-Gly-Ha		Gly-Gly-Ha	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MLH	11,59 (06)	10,21 (08)	12,02 (03)	10,48 (02)
ML	—	—	6,61 (04)	4,15 (04)
MLH <sub>1</sub>	2,36 (02)	-1,68 (02)	1,65 (09)	-2,87 (12)
MLH <sub>2</sub>	-2,86 (01)	-7,89 (01)	-2,48 (04)	-7,99 (01)
MLH <sub>3</sub>	-15,12 (02)	-19,87 (02)	-14,34 (02)	-19,56 (02)
pK <sub>MLH<sub>2</sub></sub> <sup>MLH<sub>1</sub></sup>	5,22	6,21	4,13	5,12
pK <sub>MLH<sub>3</sub></sub> <sup>MLH<sub>2</sub></sup>	12,26	11,98	11,86	11,57

**Tableau II-2 : Constantes de formation des complexes de Cu(II) et de Ni(II) avec Ala-Gly-Ha et Gly-Gly-Ha (T = 298 K et I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**

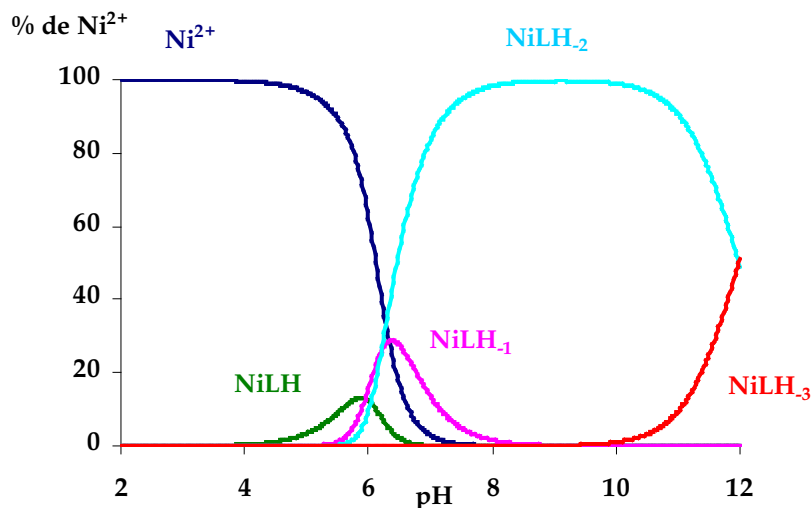
Les deux systèmes sont similaires à l'exception du complexe ML qui n'a pas été détecté pour Ala-Gly-Ha. Les valeurs obtenues pour les complexes communs aux deux systèmes sont du même ordre.

D'une façon générale, les complexes de Cu(II) sont plus stables que ceux de Ni(II). Les complexes CuLH et CuLH<sub>2</sub>, formés avec Ala-Gly-Ha, sont un peu moins stables que ceux formés avec Gly-Gly-Ha tandis que c'est l'inverse pour CuLH<sub>1</sub>. Ces différences peuvent être dues à un phénomène de solvation car le complexe de Ala-Gly-Ha est plus hydrophobe que celui de Gly-Gly-Ha. La présence du groupement méthyle de l'alanine a donc une légère influence sur la stabilité des complexes.

Les constantes de formation permettent de déterminer les diagrammes de répartition des complexes en fonction du pH, représentés sur la **Figure II-4** pour les deux ions métalliques.



Système  $[\text{Ala-Gly-Ha}] = [\text{Cu}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$



Système  $[\text{Ala-Gly-Ha}] = [\text{Ni}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

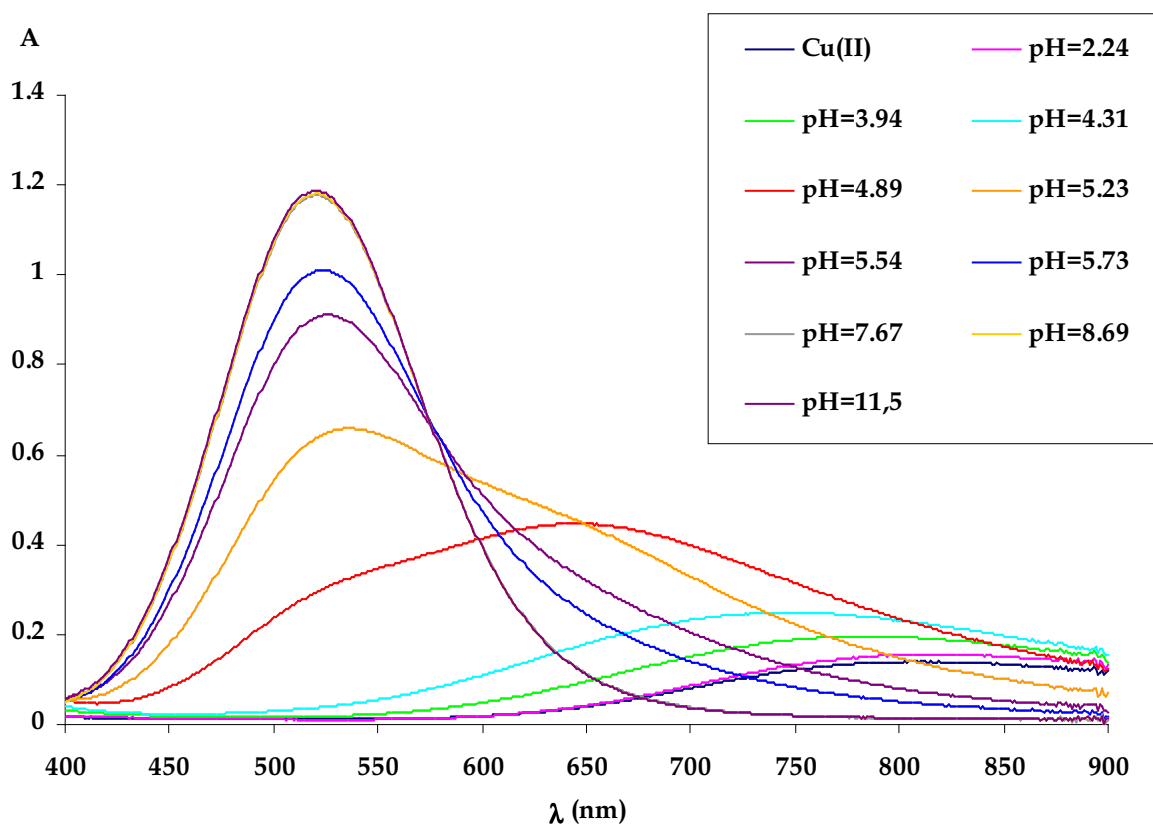
**Figure II-4 : Diagramme de répartition des espèces en fonction du pH**

On peut voir sur ces diagrammes que les espèces MLH et MLH<sub>1</sub> sont minoritaires. Le complexe MLH<sub>2</sub> est largement majoritaire sur un grand domaine de pH contenant la zone de pH physiologique. À partir de pH = 10, un complexe MLH<sub>3</sub> apparaît et devient prédominant lorsque le pH atteint des valeurs élevées.

La formation de ces différentes espèces a été identifiée par spectrophotométrie UV-visible. Les spectres du système  $[\text{Cu}^{2+}] / [\text{Ala-Gly-Ha}] = 1/5$  sont représentés sur la **Figure II-5**. Ce rapport a été préféré au rapport 1/1 afin de favoriser la complexation et de mettre plus facilement en évidence les espèces minoritaires. On peut y voir clairement la formation



successive de 3 complexes (les spectres ont été normés en fonction des dilutions causées par les ajouts de soude nécessaires pour augmenter le pH).



**Figure II-5 : Spectres visible du système  $[Cu^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[Ala-Gly-Ha] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$**

Aux faibles valeurs de pH, une bande large est détectée aux alentours de 750 nm. Lorsque le pH augmente, une nouvelle bande apparaît aux environs de 645 nm et enfin à partir de pH = 5, les spectres montrent la formation graduelle d'un complexe ayant un maximum d'absorption à 520 nm.

En comparant ces résultats à ceux obtenus en potentiométrie, on peut attribuer ces 3 bandes respectivement aux complexes  $CuLH$ ,  $CuLH_1$  et  $CuLH_2$ .

Le complexe  $CuLH_3$  détecté par potentiométrie peut être mis en évidence par une augmentation de l'absorbance en milieu très basique (pH  $\approx$  13).

Il est possible de calculer les spectres individuels des 4 complexes et du cuivre (II) seul, selon une procédure utilisée au laboratoire. Ceci peut permettre de déterminer la structure des différents complexes, à partir de données trouvées dans la littérature concernant l'influence des groupes chélatants sur la valeur de  $\lambda_{max}$ .

La loi de Beer-Lambert (**Équation II-10**) relie la concentration d'une espèce à l'absorbance de la solution qui la contient. Elle permet de calculer le coefficient d'extinction molaire à chaque longueur d'onde.

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot C \quad \text{Équation II-10}$$

avec  $\lambda$  : longueur d'onde

$A(\lambda)$  : absorbance du spectre

$\varepsilon(\lambda)$  : coefficient d'extinction molaire de l'espèce

$l$  : chemin optique

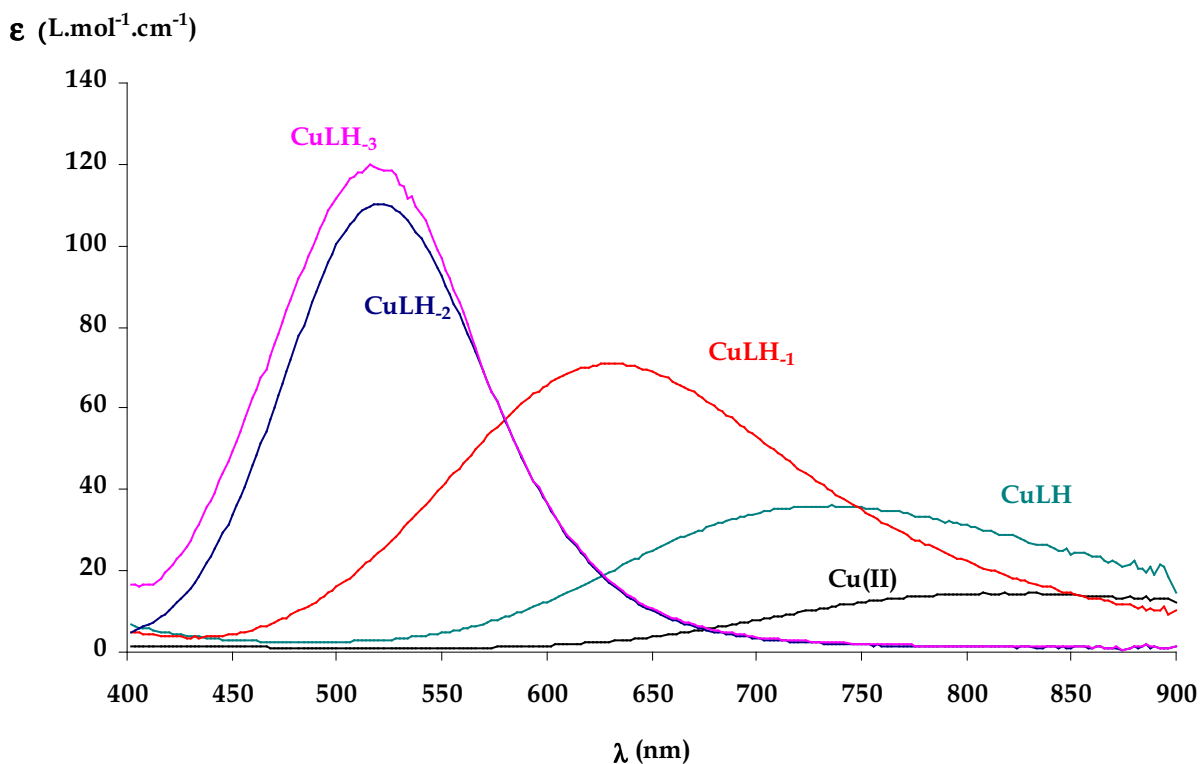
$C$  : concentration de l'espèce

La courbe  $\varepsilon = f(\lambda)$  est donc équivalente au spectre enregistré  $A = f(\lambda)$  à un facteur près ( $l \cdot C$ ). Étant donné que la loi de Beer-Lambert est additive, lorsqu'il y a plusieurs espèces, l'absorbance à une longueur d'onde est égale à la somme des absorbances de chaque espèce (**Équation II-11**).

$$A(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot l \cdot C_i \quad \text{Équation II-11}$$

À partir des constantes de formation déterminée par potentiométrie, on peut connaître les concentrations des 5 espèces, Cu(II), CuLH, CuLH<sub>1</sub>, CuLH<sub>2</sub> et CuLH<sub>3</sub>, en fonction du pH. Donc avec 5 spectres expérimentaux mesurés à des pH différents, on obtient un système de 5 équations dont la résolution à l'aide d'un ordinateur donne  $\varepsilon(\lambda)$  pour chaque espèce. On obtient ainsi les 5 spectres individuels (**Figure II-6**), ce qui permet de déterminer  $\lambda_{\max}$  (longueur d'onde au maximum d'absorption) et  $\varepsilon$  (coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption) pour les 4 complexes. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau II-3**.

À l'aide de systèmes d'incrémentes trouvés dans la littérature <sup>(53, 54, 55, 56)</sup>, il est possible de calculer une valeur approchée du  $\lambda_{\max}$  d'un complexe en fonction des groupes chélatants. En comparant ces valeurs aux  $\lambda_{\max}$  expérimentaux, on peut déterminer la structure des complexes du système.



**Figure II-6 : Spectres visible individuels  $\epsilon = f(\lambda)$  du système  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[\text{Ala-Gly-Ha}] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$**

	CuLH	CuLH <sub>1</sub>	CuLH <sub>2</sub>	CuLH <sub>3</sub>
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	740	644	520	516
$\epsilon$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	35	69	110	119

**Tableau II-3 : Valeurs de  $\lambda_{\text{max}}$  et  $\epsilon$  pour les complexes du système  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[\text{Ala-Gly-Ha}] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$**

Les valeurs obtenues pour CuLH sont compatibles avec une coordination de l'amine terminale ou du cycle imidazole.

Celles obtenues pour CuLH<sub>1</sub> concordent avec une coordination de l'amine, de l'imidazole et d'un amide déprotoné.

Pour CuLH<sub>2</sub>, on peut confirmer une coordination par 4 atomes d'azote avec l'amine terminale, le cycle imidazole et les deux amides déprotonés.

Il est intéressant de remarquer que les déprotonations des amides peptidiques présentent des valeurs de pKa très faibles en présence d'ions métalliques (5,22 et 6,21, respectivement pour le Cu(II) et le Ni(II) (**Tableau II-2**)), alors qu'elles sont impossibles dans l'eau ( $pK_a \geq 14$ ).

Les valeurs de  $\lambda_{max}$  et d' $\epsilon$  obtenues pour CuLH<sub>3</sub> sont très proches de celles de CuLH<sub>2</sub>, ce qui indique que la formation du complexe MLH<sub>3</sub> est due à une déprotonation du NH restant de l'imidazole et non à la substitution d'un des atomes d'azote par un ion hydroxyde.

Avec les complexes de nickel (II), la spectroscopie UV-visible n'apporte pas autant d'informations qu'avec les complexes de cuivre (II). On observe un déplacement continu de la bande d'absorption pour le système Ni(II) - Ala-Gly-Ha, de 394 nm à pH = 2,2 à 417 nm à pH = 6,3. Ce qui est caractéristique d'une coordination plan carré à quatre atomes d'azote (MLH<sub>2</sub>).

Avec le système Ni(II) - Ala-Gly-Ha, la spectroscopie RMN apporte une information intéressante en confirmant la déprotonation du complexe MLH<sub>2</sub> en MLH<sub>3</sub>. Rappelons que lorsque le nickel (II) est impliqué dans un complexe plan carré, contrairement au cuivre (II), il devient diamagnétique, ce qui rend possible une étude par RMN.

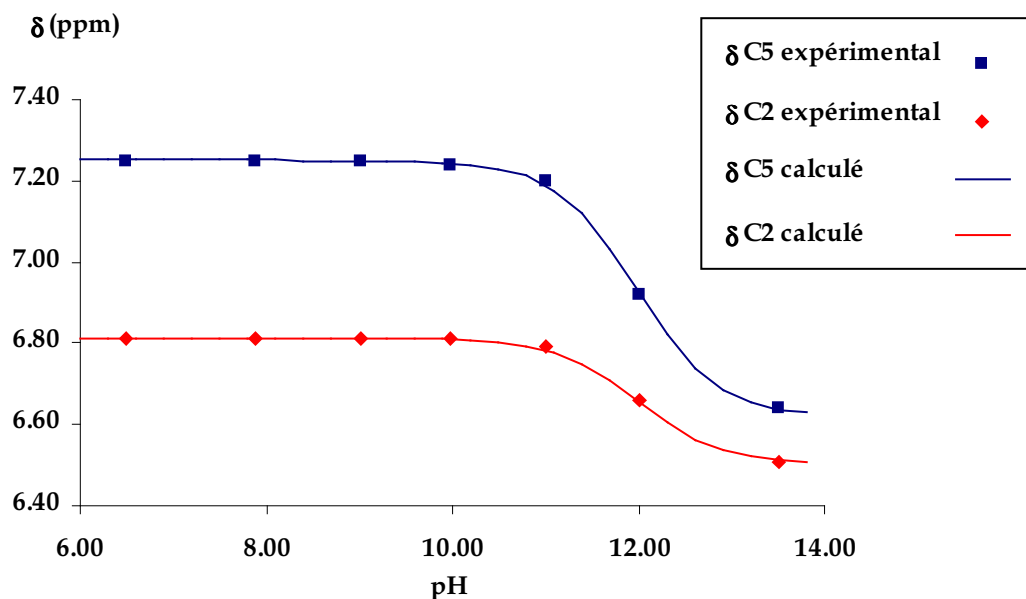
Les déplacements chimiques des protons portés par les carbones C2 et C5 de l'imidazole sont sensibles à l'état de protonation du cycle et on observe un déplacement des résonances en milieu basique lorsque le pH augmente (**Tableau II-4**).

pH	6,50	7,89	9,02	9,98	11,0	12,0	>13,5
C5-H	7,25	7,25	7,25	7,24	7,20	6,92	6,64
C2-H	6,81	6,81	6,81	6,81	6,79	6,66	6,51

**Tableau II-4 : déplacements chimiques des protons de l'imidazole pour le complexe Ni<sup>2+</sup> - Ala-Gly-Ha en fonction du pH dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 90/10 v/v**

Il est possible de calculer le pKa du couple NiLH<sub>2</sub> / NiLH<sub>3</sub>, à partir des déplacements chimiques des espèces totalement protonées et totalement déprotonées.

En admettant que les déplacements aux pH intermédiaires sont les moyennes des déplacements limites, pondérées par les proportions des deux espèces, on obtient par ajustement des points expérimentaux, pKa = 11,98 (**Figure II-7**), ce qui coïncide avec la valeur déduite des titrages potentiométriques, pKa = 11,98 (**Tableau II-2**).

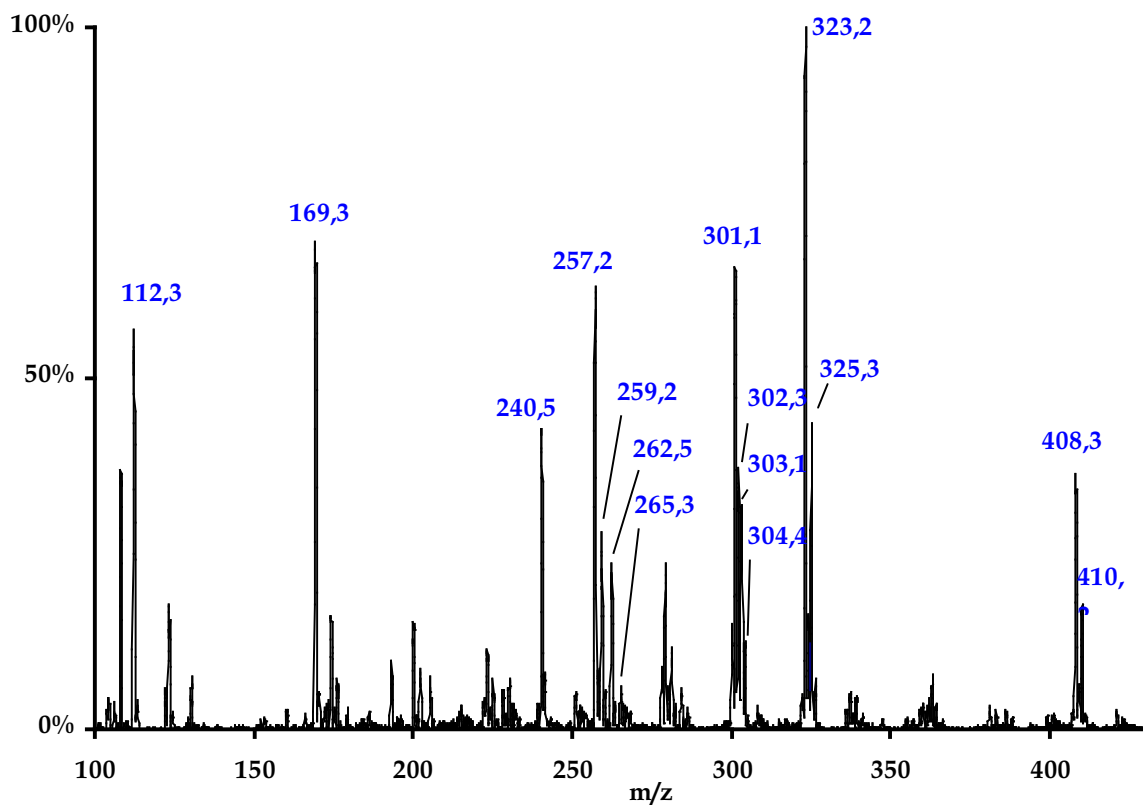


**Figure II-7: Déplacements chimiques des protons de l'imidazole en fonction du pH pour le système Ni(II) - Ala-Gly-Ha**

La formation des complexes est confirmée par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray (ESI-MS). Les complexes  $\text{CuLH}_{1,2}$  et  $\text{CuLH}_3$  peuvent être identifiés sachant que les isotopes du cuivre  $^{63}\text{Cu}$  et  $^{65}\text{Cu}$  donnent des pics doubles d'intensités relatives 69/31 (**Figure II-8**).

L'attribution des principaux pics s'est faite en tenant compte de la réduction du Cu(II) en Cu(I) déjà observée en ESI-MS <sup>(57)</sup>, ainsi que de la fragmentation du ligand dans les complexes, également déjà observée <sup>(58)</sup>. Les correspondances entre les pics et les rapports m/z sont rassemblés dans le **Tableau II-5**, les espèces ont été détectées en mode positif à l'exception du complexe  $\text{MLH}_3$  détecté en mode négatif.

Les pics pour les rapports m/z = 112 et 169 apparaissent également dans le spectre ESI-MS du ligand seul.



**Figure II-8: Spectre ESI-MS en mode positif du système  $[Cu^{2+}] = [Ala-Gly-Ha] = 0,01$  mol.L<sup>-1</sup> à pH = 5**

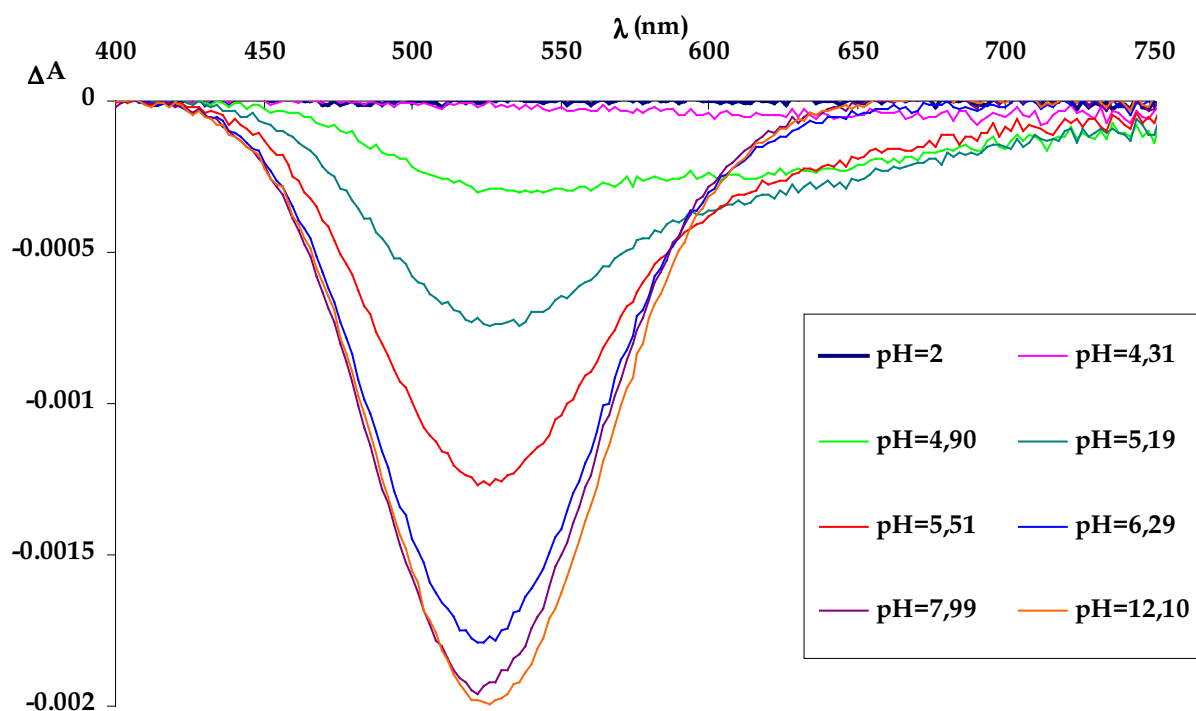
m/z	Attribution des pics
112	$(H_2N-CH_2-CH_2-Imidazole)H^+ = LH^+$ moins les 2 résidus Ala et Gly
169	$(H_2N-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-Imidazole)H^+ = LH^+$ moins le résidu Ala
240	$LH^+$
257-259	$CuLH_1^+$
262	L, $Na^+$
301-303	$Cu(D)L^+$
302-304	$CuLH_2, Na^+$
323-325	$CuLH_2, NaNO_3, Na^+$
299-301	$CuLH_3^-$

**Tableau II-5 : Attribution des principaux pics de l'analyse ESI-MS**

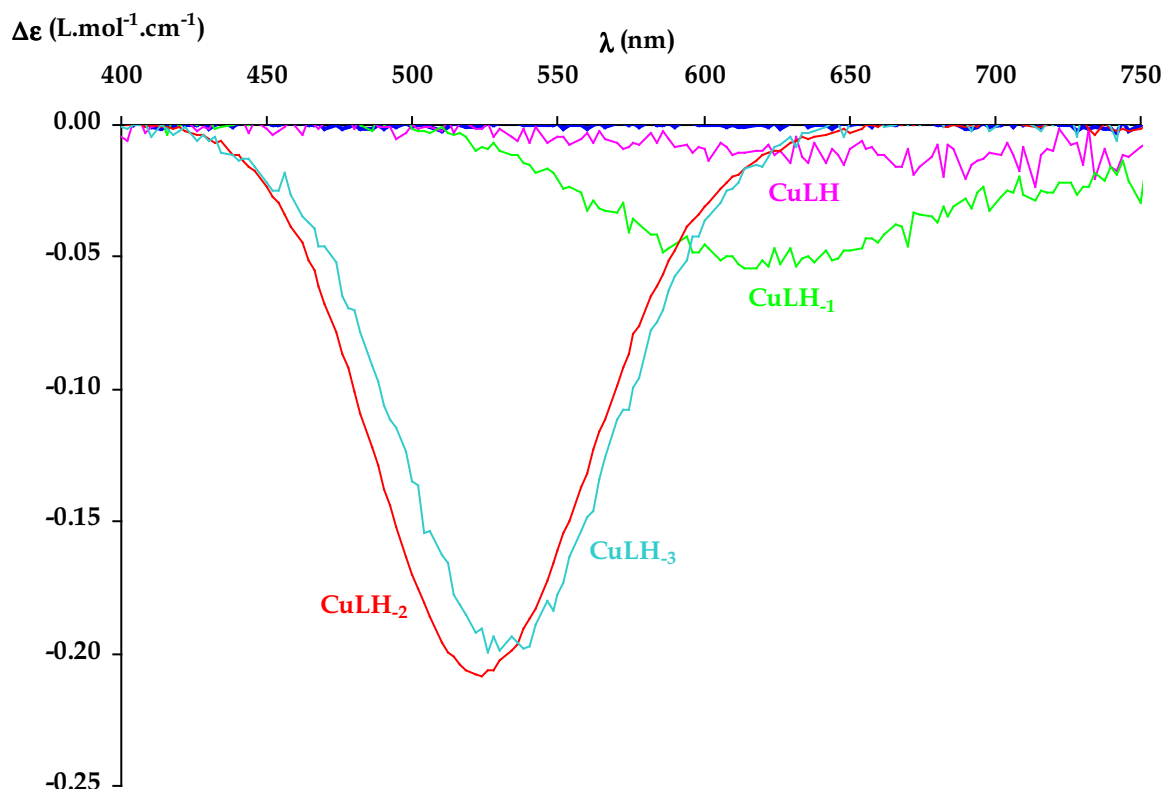
La structure des complexes peut être précisée grâce à une étude de dichroïsme circulaire. Les spectres de plusieurs solutions de Cu(II) - Ala-Gly-Ha à différents pH sont représentés sur la **Figure II-9**, les spectres individuels ont également été calculés selon la procédure décrite pour le spectre UV-visible, ils sont représentés sur la **Figure II-10**.

En dessous de pH = 4,31, aucune bande n'est observée, pourtant à ce pH le complexe CuLH est bien présent en solution. Ceci permet de lever l'incertitude sur la structure de ce complexe, en effet, le groupe se coordonnant au cuivre dans MLH ne peut être que le cycle imidazole car dans le cas où la coordination aurait commencé par l'amine terminale, on aurait observé un effet de dichroïsme circulaire du fait de la proximité du carbone asymétrique de l'alanine.

À partir de pH = 4,31, deux bandes différentes sont observées, la plus intense à 524 nm est attribuée sans ambiguïté à CuLH<sub>2</sub>. L'autre bande à 620 nm correspond probablement au complexe CuLH<sub>1</sub>, on sait que les groupes coordinants sont l'amine terminale, le cycle imidazole et un des deux amides déprotoné. Étant donné que l'effet de dichroïsme correspondant à CuLH<sub>1</sub> est très faible comparé à celui de CuLH<sub>2</sub>, on peut supposer que c'est le groupe amide du résidu Gly qui se lie au cation.



**Figure II-9 : Spectres de dichroïsme circulaire du système  $[Cu^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[Ala-Gly-Ha] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$**



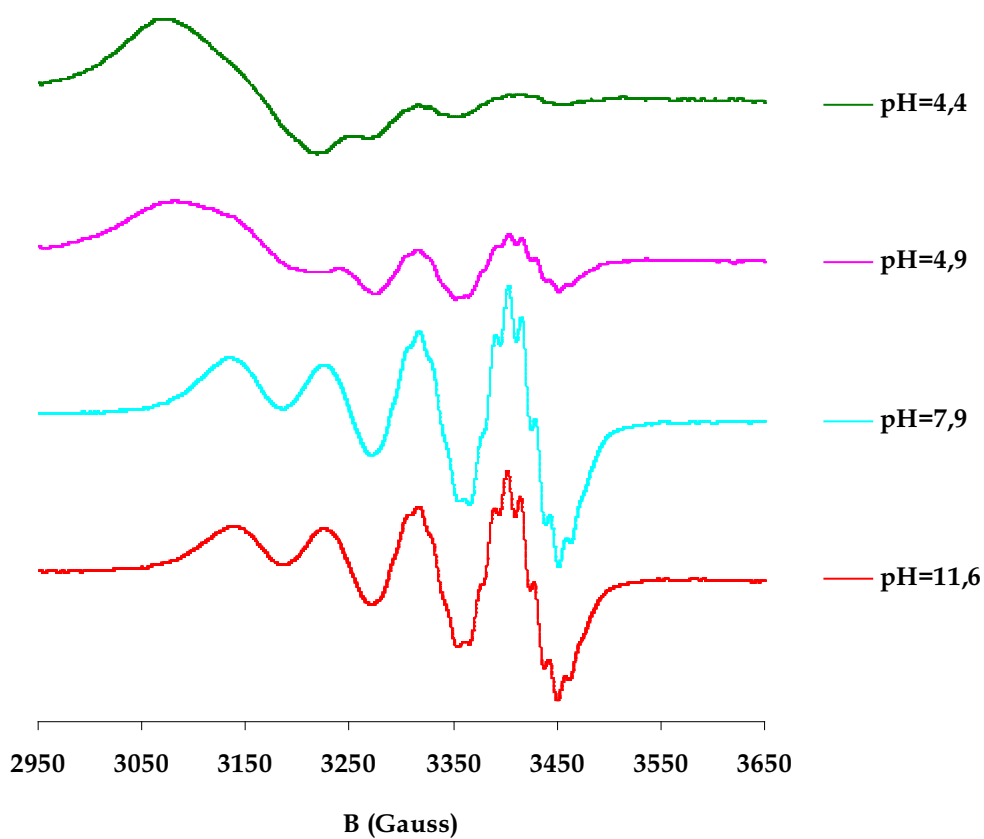
**Figure II-10 : Spectres de dichroïsme circulaire individuels  $\Delta\epsilon = f(\lambda)$  du système  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[\text{Ala-Gly-Ha}] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$**

Enfin, la **Figure II-11** représente les spectres RPE obtenus pour une solution équimolaire de Cu(II) et d'Ala-Gly-Ha. Le spectre à pH = 7,9 confirme une coordination plan carré avec 4 atomes d'azote pour le complexe CuLH<sub>2</sub> car on observe bien 9 raies de résonance.

Les paramètres spectraux ( $g_0 = 2,096$  ;  $A_0 = 86,1 \text{ G}$  et  $a_N = 12,5 \text{ G}$ ) sont en accord avec ceux reportés pour Cu(II) - Gly-Gly-Ha et les complexes analogues <sup>(32, 59, 60)</sup>. Ces valeurs sont conformes à une géométrie plan carré

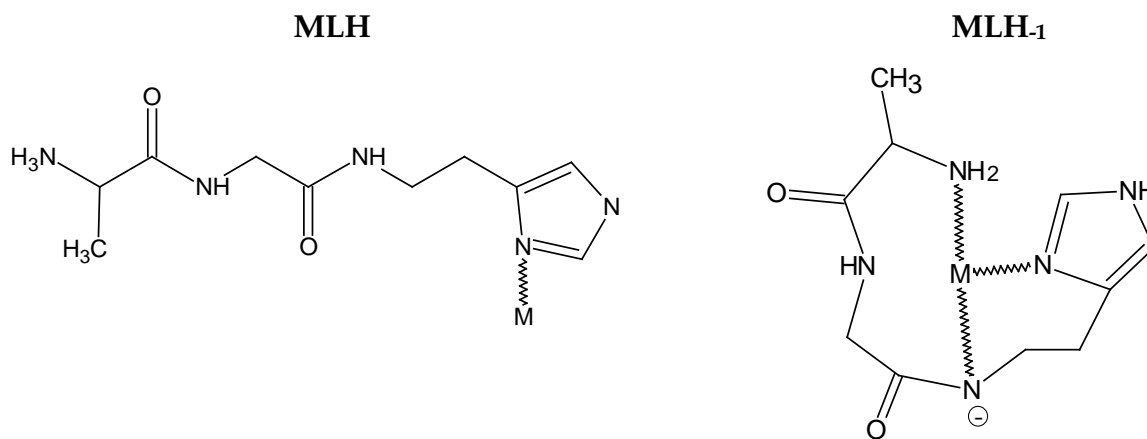
À pH = 11,6, le spectre est un peu moins intense et les paramètres légèrement modifiés ( $g_0 = 2,095$  ;  $A_0 = 85,3\text{G}$  et  $a_N = 12,4\text{G}$ ), ce qui confirme la déprotonation de MLH<sub>2</sub> en MLH<sub>3</sub>.

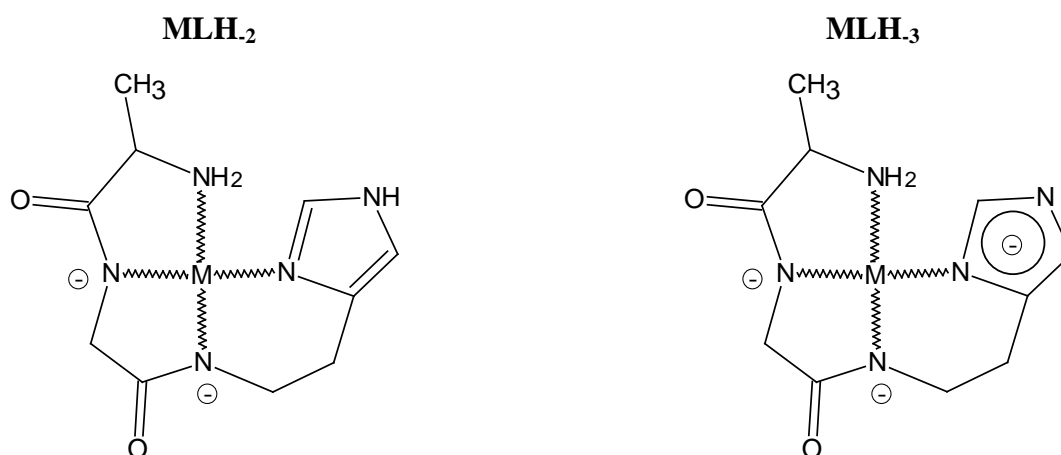




**Figure II-11 : Spectres RPE du système  $[Cu^{2+}] = [Ala-Gly-Ha] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$**

Sur la base des argumentations précédentes, les structures des complexes formés avec Ala-Gly-Ha sont représentées sur le **Schéma II-8**.





**Schéma II-8 : Structures schématiques proposées pour les complexes formés dans les systèmes Cu(II) - Ala-Gly-Ha et Ni(II) - Ala-Gly-Ha**

### II.6.1.2. Étude cristallographique du complexe CuLH<sub>2</sub> de l'alanyl-glycyl-histamine

La cristallisation du complexe a été obtenue à partir d'une solution équimolaire d'Ala-Gly-Ha et de Cu<sup>2+</sup> de concentration 0,02 mol.L<sup>-1</sup>, dont le pH a été ajusté à 9. Le volume de la solution a été réduit par lente évaporation à température ambiante, et des petits cristaux rouges en forme d'épingle sont apparus au bout de quelques semaines.

La structure du complexe représentée sur la **Figure II-12** confirme la structure tétracoordinée envisagée. Le cuivre est bien coordonné par l'azote amino, les deux atomes d'azote des fonctions amides et l'azote N3 du cycle imidazole (N3 sur la figure, N3 également selon la notation IUPAC) formant un complexe plan carré légèrement distordu.

Les paramètres cristallographiques, les différentes distances interatomiques et les principaux angles de liaisons sont rassemblés respectivement dans les **Tableau II-6**, **Tableau II-7** et **Tableau II-8**.

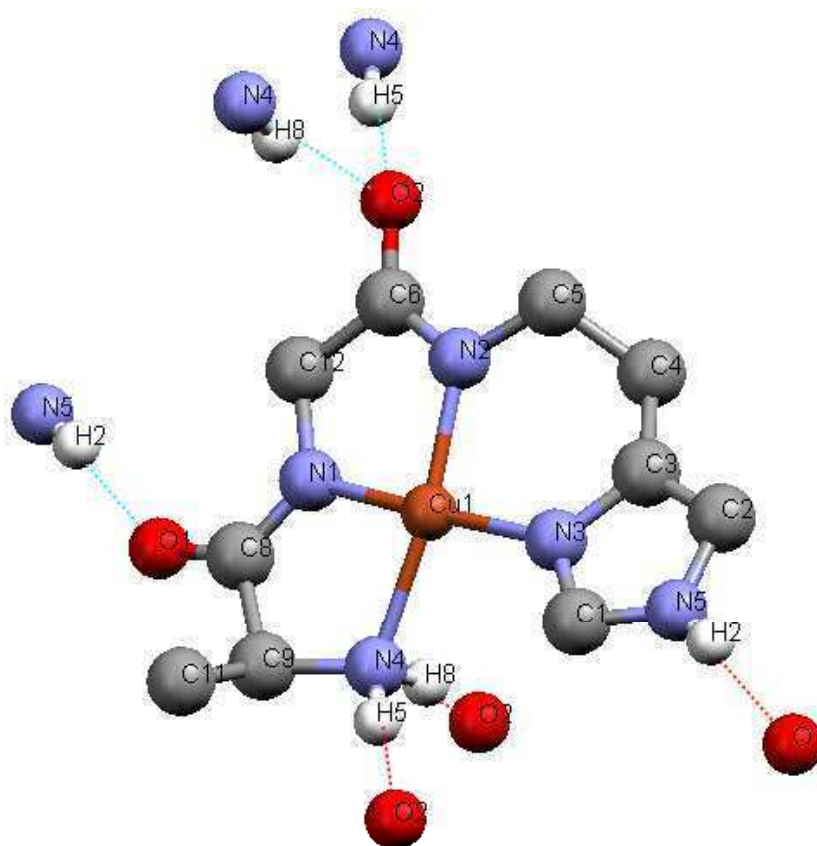
La structure de ce complexe est peu différente de celle déterminée pour le cristal Cu(II) - Gly-Gly-Ha, 3H<sub>2</sub>O<sup>(32)</sup>. Les distances Cu(II)-N dans la sphère de coordination varient de 1,890 à 2,036 Å et sont proches de celles rencontrées habituellement dans les complexes de Cu(II) avec des peptides<sup>(61)</sup>.

La structure montre que le cristal ne comporte pas de molécules d'eau contrairement à celle déterminée pour Cu(II) - Gly-Gly-Ha, 3H<sub>2</sub>O<sup>(32)</sup>. Par conséquent, le nombre de liaisons hydrogène est considérablement réduit. Chaque atome d'hydrogène du groupe amino terminal (H5 et H8 sur la figure) est lié à l'atome d'oxygène du résidu Gly des molécules voisines (d = 2,015 et 2,066 Å). De la même façon, l'atome d'hydrogène porté par l'azote N5 (N1 selon la

notation IUPAC) forme une liaison hydrogène forte ( $d = 1,966 \text{ \AA}$ ) avec l'atome d'oxygène du résidu Ala.

Le plan du cycle imidazole n'est pas tout à fait coplanaire au plan des atomes coordonnés, l'angle entre les normales est de  $24^\circ$ .

Contrairement au système Cu(II) - Gly-Gly-Ha où le cuivre se place exactement dans le plan formé par les quatre atomes d'azote, nous observons une légère déviation de  $0,075 \text{ \AA}$  par rapport à ce plan moyen dans le cristal Cu(II) - Ala-Gly-Ha. Cet écart est très probablement causé par la présence du groupement méthyle.



**Figure II-12 : Structure du complexe cristallin  $\text{CuLH}_2$  de Ala-Gly-Ha**

Formule	$\text{CuC}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$
Masse molaire	300,81 g.mol <sup>-1</sup>
Système cristallin	Monoclinique
a	8,242 Å
b	7,886 Å
c	9,835 Å
$\beta$	111,137 °
Volume de la maille	596,58 Å <sup>3</sup>
Nombre de molécules dans la maille	2
Masse volumique	1,675 g.cm <sup>-3</sup>
Groupe spatial	P2 <sub>1</sub>

**Tableau II-6 : Paramètres cristallographiques du complexe CuLH<sub>2</sub> de Ala-Gly-Ha**

Atome 1	Atome 2	Distance (Å)	Atome 1	Atome 2	Distance (Å)
Cu	N1	1,899	C5	N2	1,466
Cu	N2	1,944	C6	N2	1,309
Cu	N3	1,949	C6	C12	1,534
Cu	N4	2,036	C6	O2	1,262
C1	N5	1,339	C8	N1	1,306
C1	N3	1,334	C8	O1	1,249
C2	N5	1,367	C8	C9	1,537
C2	C3	1,352	C9	C11	1,527
C3	N3	1,384	C9	N4	1,494
C3	C4	1,496	C12	N1	1,444
C4	C5	1,505			

**Tableau II-7 : Principales distances interatomiques dans le complexe CuLH<sub>2</sub> de Ala-Gly-Ha**

Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)
N1	Cu	N2	83,07	Cu	N2	C5	123,88
N2	Cu	N3	94,80	Cu	N2	C6	117,03
N3	Cu	N4	99,36	Cu	N1	C12	116,77
N4	Cu	N1	82,57	Cu	N1	C8	121,03
Cu	N3	C1	130,24	Cu	N4	C9	109,33
Cu	N3	C3	123,02				

**Tableau II-8 : Principaux angles de liaisons dans le complexe CuLH<sub>2</sub> de Ala-Gly-Ha**

### II.6.1.3. Conclusion

Les systèmes de complexes formés par les pseudo-tripeptides, que ce soit Gly-Gly-Ha ou Ala-Gly-Ha sont sensiblement identiques. L'étude de ce dernier ligand a permis de préciser certains points sur la coordination dans les différents complexes, notamment grâce à l'utilisation du dichroïsme circulaire.

L'atome ancreur de la complexation serait l'atome d'azote N3 du cycle imidazole plutôt que le groupement amino et le premier groupe peptidique à être déprotoné est celui situé entre le résidu glycyle et l'histamine, c'est à dire le groupe peptidique le plus proche du cycle imidazole.

Les différentes techniques d'analyse utilisées ont permis de confirmer le système de complexes établi par potentiométrie et de préciser leur structure. Notamment, la diffraction de rayons X a confirmé la structure plan carré, constituée de 4 atomes d'azote, du complexe majoritaire de ce système.

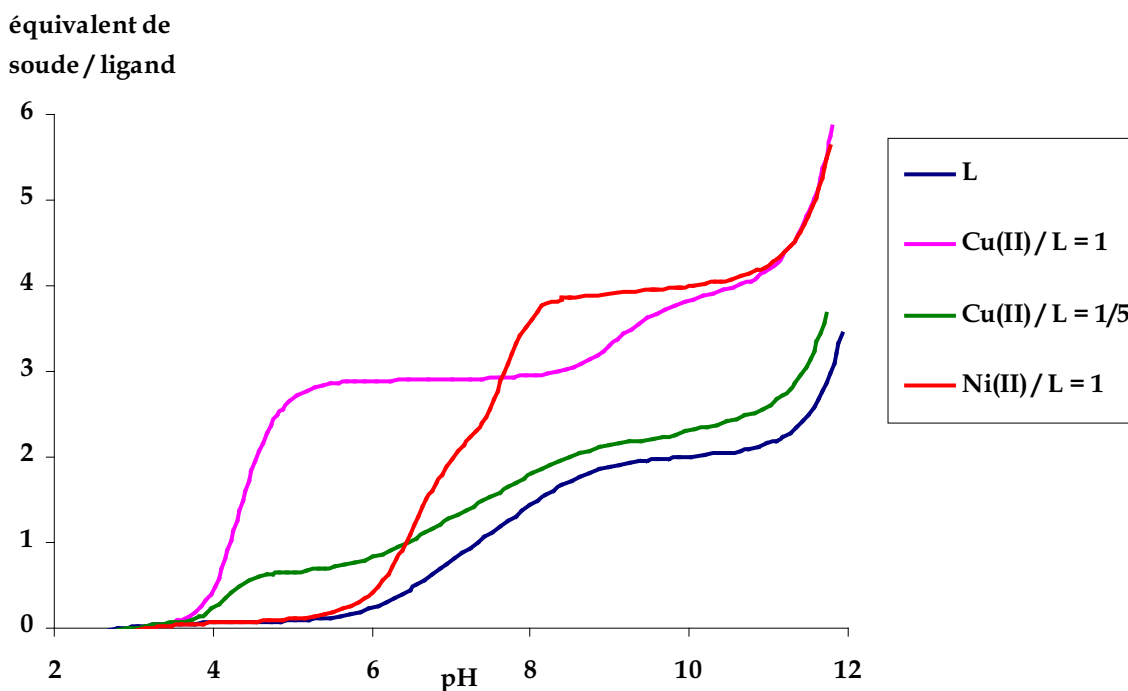
## II.6.2. Complexes de pseudo-dipeptides

Gly-Ha est le plus simple représentant des pseudo-dipeptides. Les études précédentes ont montré que les systèmes de complexes avec ces ligands étaient plus compliqués que ceux rencontrés avec les pseudo-tripeptides<sup>(47)</sup>. Les espèces sont nombreuses et les diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH dépendent fortement des concentrations relatives en ligand et en ion métallique.

L'étude de la complexation de l' $\alpha$ -methyl-alanyl-histamine ( $\alpha$ -Me-Ala-Ha) a été réalisée dans le but de faire une comparaison avec les pseudo-dipeptides déjà étudiés et de préciser la structure des complexes que ce type de ligand forme avec les cations  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$ .

### II.6.2.1. Étude des complexes de cuivre (II) et de nickel (II) du ligand $\alpha$ -Me-Ala-Ha

Comme pour Ala-Gly-Ha, commençons par examiner les courbes de dosages (**Figure II-13**). Dans une solution équimolaire de Cu(II) et d' $\alpha$ -Me-Ala-Ha, on observe un point d'équivalence très marqué après la consommation de 3 équivalents de base. Cette constatation va dans le sens de la formation d'un complexe  $\text{CuLH}_1$  par coordination de l'amine terminale, du cycle imidazole et de l'amide déprotoné.



**Figure II-13 : Courbes des titrages potentiométriques d' $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

Après  $\text{pH} = 9$ , il y a un deuxième point d'équivalence qui correspond à la consommation d'un équivalent de base supplémentaire. On peut expliquer ce phénomène, soit par coordination avec un ion hydroxyde, soit par la déprotonation de l'azote N1 de l'imidazole.

Pour le système  $\text{Ni(II)} - \alpha\text{-Me-Ala-Ha}$ , les déprotonations surviennent à un  $\text{pH}$  plus élevé, mais un précipité jaune est observé à partir de  $\text{pH} \approx 9$ , la formation des complexes n'a donc été étudiée que dans la zone de  $\text{pH}$  inférieure à cette limite.

L'analyse des courbes de dosage a permis d'identifier la formation des espèces  $\text{CuL}$ ,  $\text{CuLH}_{-1}$ ,  $\text{CuLH}_{-2}$ ,  $\text{CuLH}_{-3}$ ,  $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$  et  $\text{Cu}_4\text{L}_4\text{H}_{-8}$  d'une part et  $\text{NiL}$ ,  $\text{NiLH}_{-1}$ ,  $\text{NiL}_2\text{H}_{-1}$ ,  $\text{Ni}_4\text{L}_4\text{H}_{-8}$  d'autre part.

Les constantes de formation des complexes d' $\alpha\text{-Me-Ala-Ha}$  et de ses analogues  $\text{Ala-Ha}$  et  $\text{Gly-Ha}$ , sont rassemblées dans le **Tableau II-9**.

	$\alpha$ -Me-Ala-Ha		Ala-Ha		Gly-Ha	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MLH	—	—	—	10,61 (05)	11,84 (08)	10,46 (02)
ML	7,91 (03)	4,06 (1)	7,84 (03)	4,02 (04)	7,19 (10)	4,20 (02)
ML <sub>2</sub>	—	—	14,41 (04)	7,76 (06)	14,50 (01)	7,73 (02)
MLH <sub>1</sub>	4,10 (01)	-3,67 (05)	3,73 (01)	-3,07 (03)	3,99 (01)	-2,69 (01)
MLH <sub>2</sub>	-5,39 (04)	—	-5,60 (02)	-12,15 (06)	-5,46 (01)	-12,22 (03)
MLH <sub>3</sub>	-17,43 (04)	—	-16,70 (05)	—	-16,76 (02)	—
ML <sub>2</sub> H <sub>1</sub>	6,66 (08)	0,81 (03)	6,60 (04)	0,12 (04)	6,90 (01)	0,16 ± 0,01
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	-13,75 (07)	-36,13 (02)	-14,46 (07)	-37,76 (08)	-14,53 (05)	-37,68
pK <sub>MLH<sub>1</sub></sub> <sup>ML</sup>	3,81	7,73	4,11	7,09	3,20	6,89
pK <sub>MLH<sub>2</sub></sub> <sup>MLH<sub>1</sub></sup>	9,49	—	9,33	9,08	9,45	9,53
pK <sub>MLH<sub>3</sub></sub> <sup>MLH<sub>2</sub></sup>	12,04	—	11,10	—	11,24	—

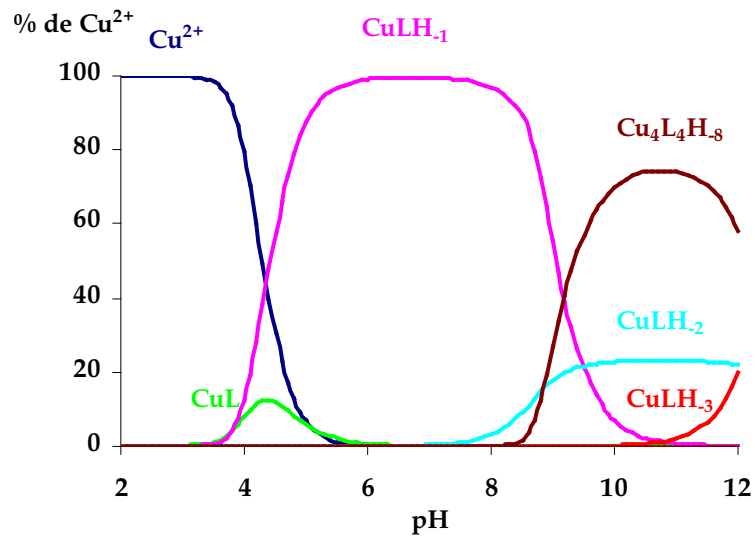
**Tableau II-9 : Constantes de formation des complexes de Cu(II) et de Ni(II) avec des pseudo-dipeptides (T = 298 K et I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**

On rencontre des systèmes semblables pour les 3 ligands avec des valeurs de log  $\beta$  du même ordre et des complexes de Cu(II) plus stables que ceux de Ni(II).

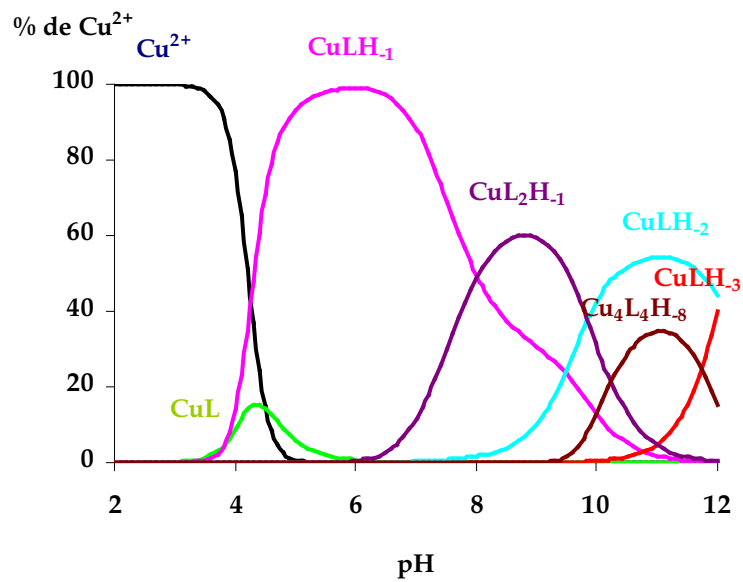
Les diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH sont représentés sur la **Figure II-14** et pour les deux ions métalliques. Contrairement aux systèmes rencontrés avec les pseudo-tripeptides, la distribution des complexes dépend fortement du rapport métal/ligand.



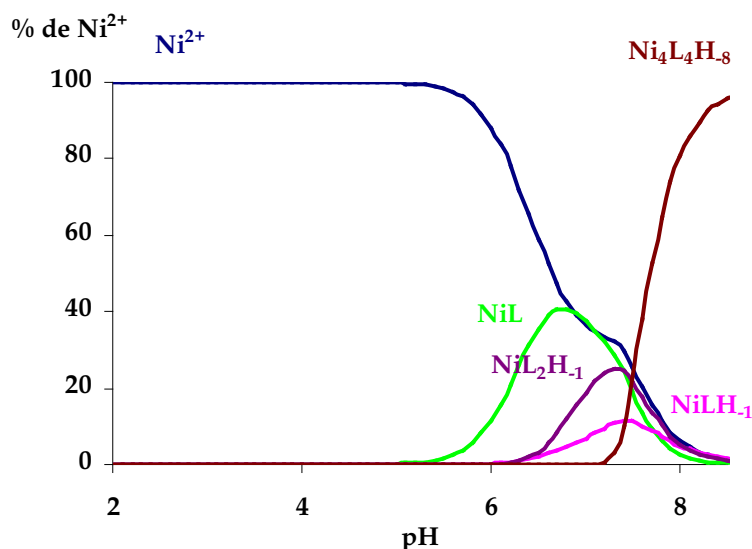
On remarque également que la présence de groupements méthyles sur le premier résidu du côté N-terminal influe sur la formation de certains complexes. En effet, le nombre d'espèces dans le système diminue lorsque l'on passe de Gly-Ha à  $\alpha$ -Me-Ala-Ha.



Système  $[\alpha\text{-Me-Ala-Ha}] = [\text{Cu}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$



Système  $[\alpha\text{-Me-Ala-Ha}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,0025 \text{ mol.L}^{-1}$



Système  $[\alpha\text{-Me-Ala-Ha}] = [\text{Ni}^{2+}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

**Figure II-14 : Diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH**

L'espèce CuLH n'est pas détectée, l'espèce CuL est quasiment négligeable et sa formation ne peut pas être confirmée par des méthodes spectroscopiques.

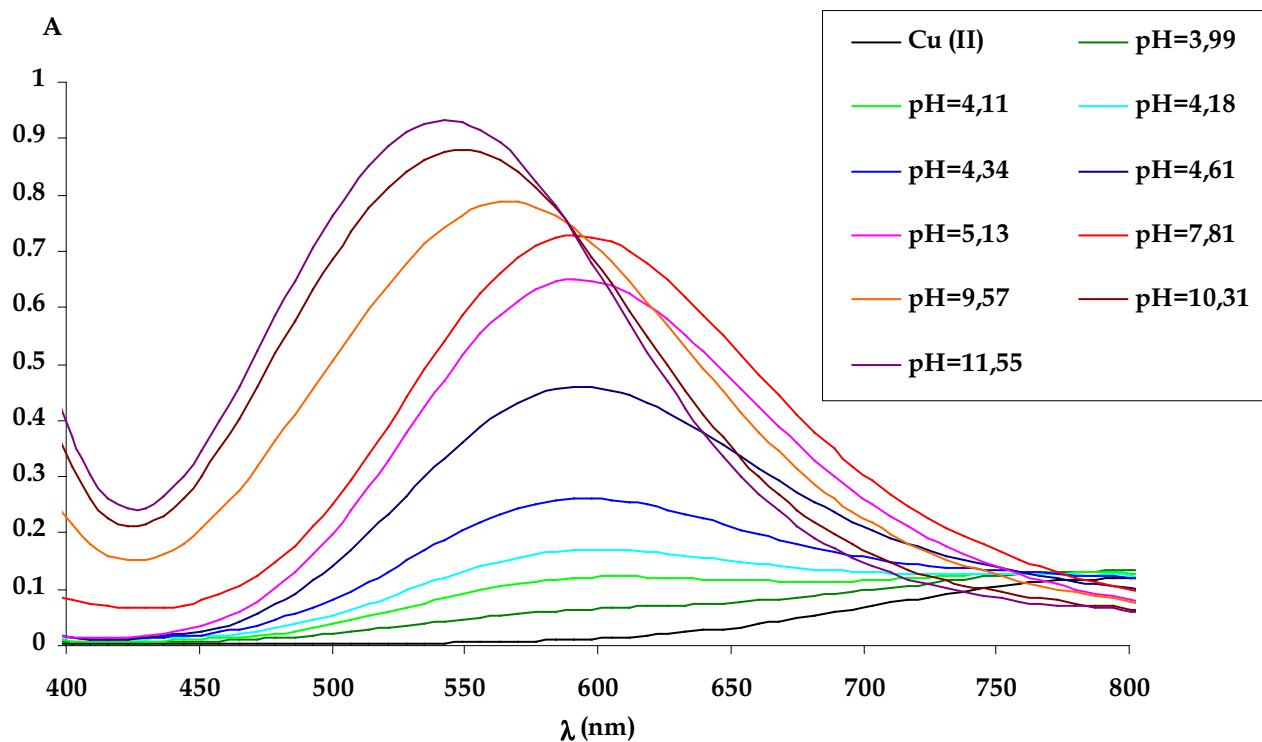
Dans la zone de pH 4 à 8, pour une solution équimolaire de Cu(II) et d' $\alpha$ -Me-Ala-Ha, l'espèce prédominante dans la zone de pH physiologique est CuLH<sub>1</sub>.

Le complexe CuL<sub>2</sub>H<sub>-1</sub> apparaît uniquement en présence d'excès de ligand. Sur la base des résultats précédents, ce complexe peut être dénommé CuLH<sub>1</sub>(L) avec coordination d'un second ligand sur le complexe CuLH<sub>1</sub>, par l'intermédiaire de l'azote N3 du cycle imidazole <sup>(47)</sup>.

En augmentant le pH, les complexes CuLH<sub>2</sub> et CuLH<sub>3</sub> apparaissent suite à deux déprotonations successives de pKa respectifs, 9,49 et 12,04. Ce dernier pKa peut être attribué à la déprotonation de l'azote N1 car sa valeur est très proche de celle déterminée pour le système Cu(II) - Ala-Gly-Ha (pKa = 12,26).

Par conséquent, le complexe CuLH<sub>2</sub> provient de l'hydrolyse du complexe CuLH<sub>1</sub>, c'est à dire de la déprotonation de la molécule d'eau située en quatrième position équatoriale. L'écart entre les deux pKa supérieur à 2 unités de pH démontre que le recouvrement des déprotonations est négligeable. Cependant la formation d'un complexe CuLH<sub>2</sub> où la déprotonation se fait sur l'azote N1 au lieu de la molécule d'eau est possible dans une très faible proportion. C'est cette espèce qui conduit à la formation du tétramère Cu<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>-8</sub> que l'on peut écrire (CuLH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>.

La formation de ce complexe a été clairement mise en évidence par spectrophotométrie UV-visible. Les spectres du système  $[\text{Cu}^{2+}] / [\text{Ala-Gly-Ha}] = 1/1$  sont représentés sur la **Figure II-15**.



**Figure II-15 : spectres visibles du système  $[\text{Cu}^{2+}] = [\alpha\text{-Me-Ala-Ha}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$**

Entre pH 4 et 8, on observe une bande à 600 nm caractéristique d'une coordination de l'amine, de l'imidazole et d'un amide déprotoné. Il s'agit du complexe  $\text{CuLH}_1$ . À partir de pH = 9, apparaît une nouvelle bande dont le maximum d'absorption se situe à 540 nm. Pour avoir une telle valeur, il faut que le cation  $\text{Cu}^{2+}$  soit coordonné par 4 atomes d'azote dans un environnement plan carré. Il y a déjà 3 atomes d'azote dans la sphère de coordination du cuivre, le quatrième ne peut venir que du cycle imidazole d'un autre ligand pour former le tétramère  $\text{Cu}_4\text{L}_4\text{H}_8$ .

La formation de ce complexe a été confirmée par RPE. Le spectre à pH = 11,0 représenté sur la **Figure II-16**, montre effectivement la présence de 9 raies superhyperfines caractéristiques d'une coordination à 4 atomes d'azote. Les paramètres spectraux sont les suivants :  $g_0 = 2,06$  ;  $A_0 = 84,0 \text{ G}$  et  $a_N = 13,2 \text{ G}$ .

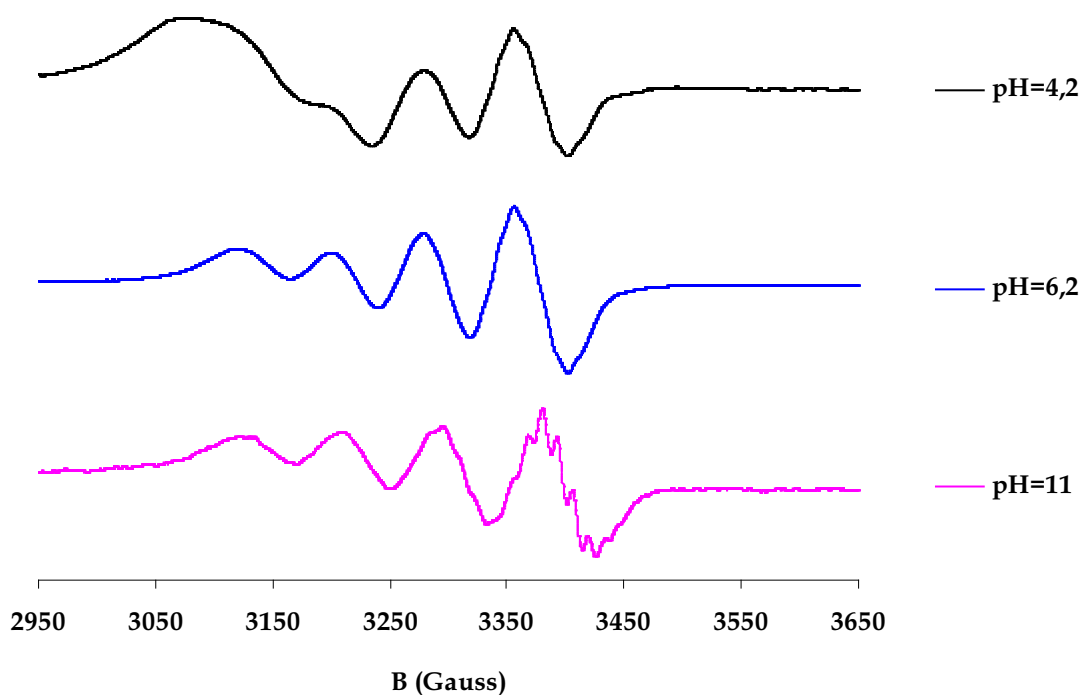
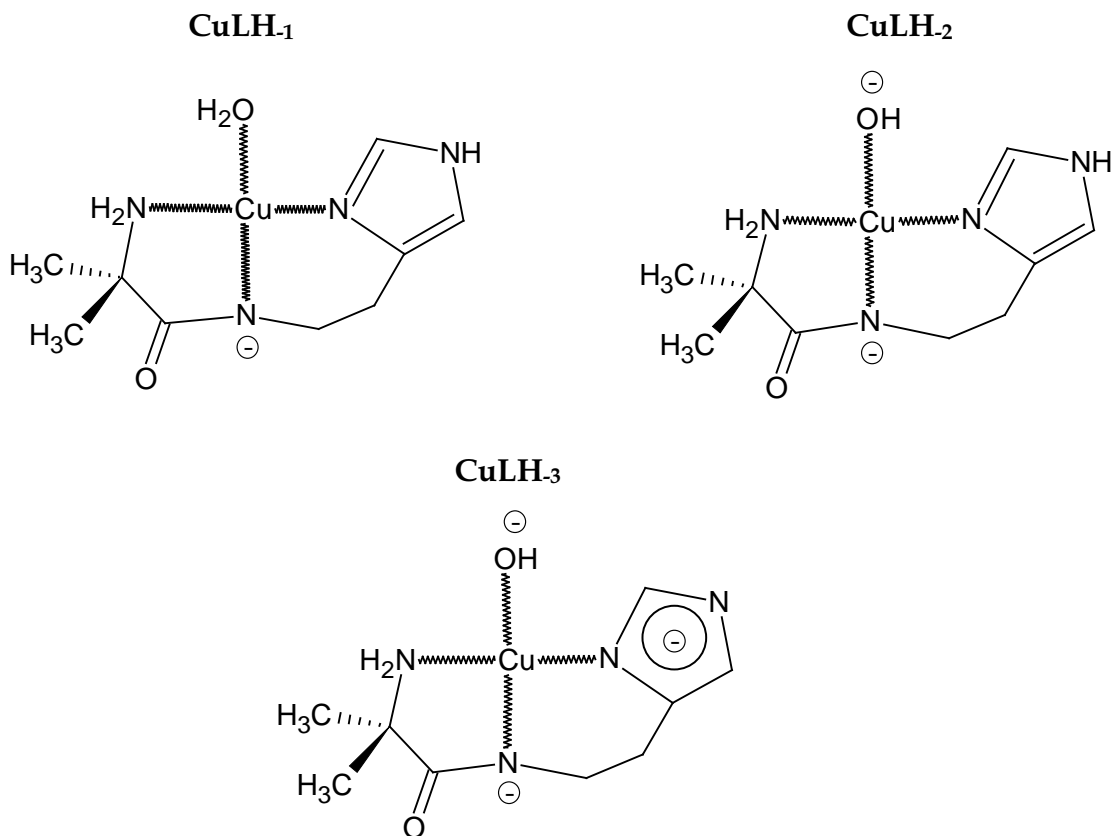
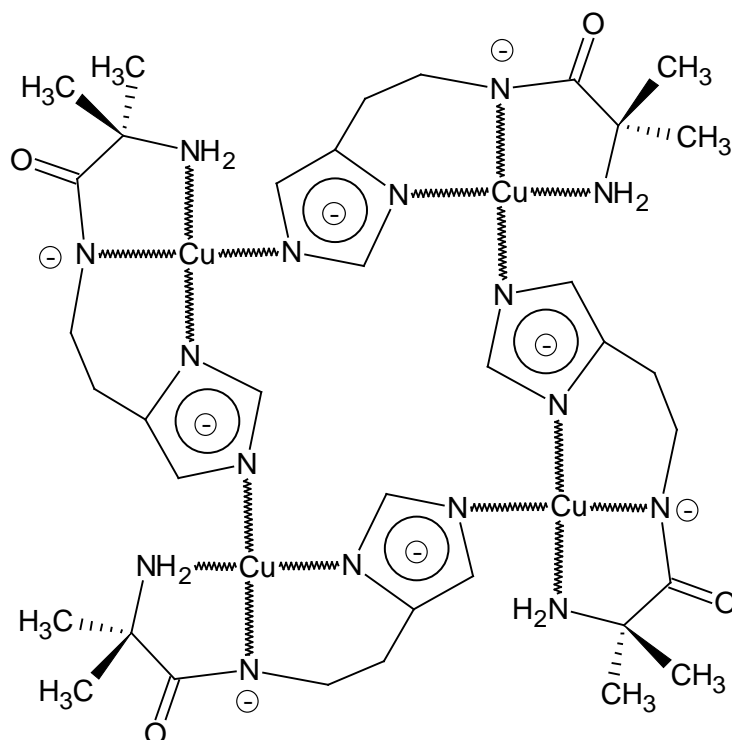


Figure II-16 : spectres RPE du système  $[Cu^{2+}] = [\alpha\text{-Me-Ala-Ha}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

Sur la base des argumentations précédentes, les structures des complexes formés avec Ala-Gly-Ha sont représentées sur le **Schéma II-9**.

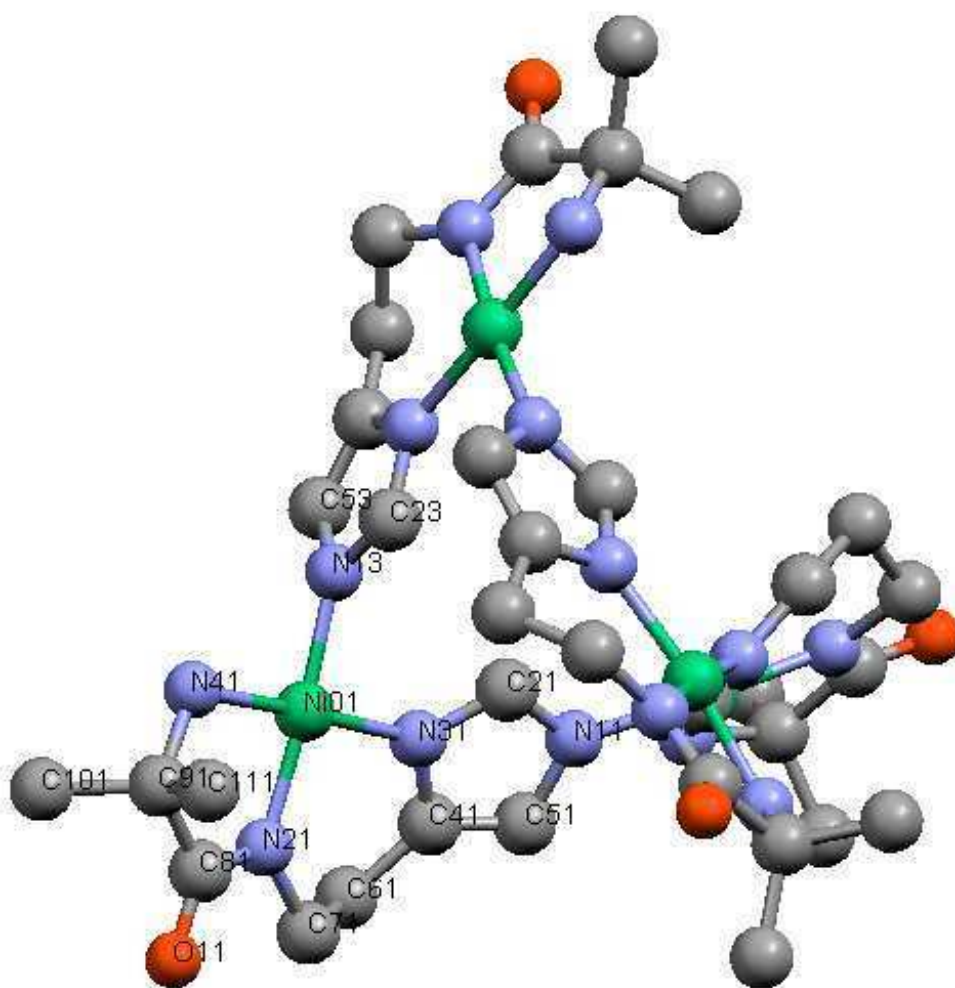




**Schéma II-9 : Structures schématiques proposées pour les complexes formés dans les systèmes Cu(II) -  $\alpha$ -Me-Ala-Ha et Ni(II) -  $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

### II.6.2.2. Étude cristallographique du complexe $\text{Ni}_4\text{L}_4\text{H}_8$ de $\alpha$ -Me-Ala-Ha

Aucune spectroscopie n'a été utilisée avec les complexes de nickel (II) à cause de l'apparition d'un précipité jaune à partir de  $\text{pH} = 9$ . Ce précipité se forme lorsque le complexe  $\text{Ni}_4\text{L}_4\text{H}_8$  est prédominant. En dissolvant le précipité dans le méthanol, on obtient des petits cristaux jaunes après une lente évaporation à température ambiante. La structure du complexe représenté sur la **Figure II-17** confirme la formation de l'espèce tétramérique  $\text{Ni}_4\text{L}_4\text{H}_8$  avec 4 atomes d'azote dans la sphère de coordination de l'ion central.



**Figure II-17 : Structure du complexe cristallin  $Ni_4L_4H_8$  de  $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

Les 4 atomes de nickel ne se disposent pas dans un plan mais au sommet d'un tétraèdre déformé. Cette géométrie a déjà été rapportée pour un complexe d'or (I) avec un dérivé du cycle imidazole <sup>(62)</sup>, mais jamais avec des peptides ou des pseudo-peptides.

Pour chaque monomère, les 4 atomes d'azote de la sphère de coordination d'un ion nickel s'inscrivent dans un plan et chaque plan est perpendiculaire à celui d'un autre monomère.

Cependant, la structure est en cours de raffinement, les paramètres cristallographiques (**Tableau II-10**) peuvent être encore améliorés pour certains.

Les différentes distances interatomiques et les principaux angles de liaisons sont rassemblés respectivement dans le **Tableau II-11** et le **Tableau II-12**.

Système cristallin	Monoclinique
a	11,229 Å
b	23,468 Å
c	21,245 Å
$\beta$	101,534 °
Volume de la maille	5485,47 Å <sup>3</sup>
Nombre de molécules dans la maille	4
Groupe spatial	P2 <sub>1</sub> /c

**Tableau II-10 : Paramètres cristallographiques du complexe Ni<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>8</sub> de  $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

Atome 1	Atome 2	Distance (Å)	Atome 1	Atome 2	Distance (Å)
Ni01	N13	1,885	N31	C41	1,382
Ni01	N31	1,9	N41	C91	1,499
Ni01	N21	1,882	C41	C61	1,475
Ni01	N41	1,904	C41	C51	1,345
N11	C21	1,331	C61	C71	1,492
N11	C51	1,366	C81	C91	1,478
N21	C71	1,494	C91	C101	1,564
N21	C81	1,299	C91	C111	1,554
N31	C21	1,343	O11	C81	1,254

**Tableau II-11 : Principales distances interatomiques dans le complexe Ni<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>8</sub> de  $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)
N13	Ni01	N31	90,76	Ni01	N21	C71	125,32
N21	Ni01	N41	83,64	Ni01	N21	C81	117,15
N31	Ni01	N21	94,36	Ni01	N31	C21	129,45
N41	Ni01	N13	91,26	Ni01	N31	C41	124,91
Ni01	N13	C23	128,35	Ni01	N41	C91	111,72
Ni01	N13	C53	126,04				

**Tableau II-12 : Principaux angles de liaisons dans le complexe Ni<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>8</sub> de  $\alpha$ -Me-Ala-Ha**

### II.6.2.3. Conclusion

La formation d'un complexe MLH<sub>1</sub> de type plan carré survient à pH relativement bas (pH = 4-5 pour le cuivre (II)), ce qui montre un abaissement considérable du pKa de l'azote peptidique ( $pK_{MLH_1}^{ML} = 3,81$ ). La quatrième position du plan équatorial peut être occupée par une molécule d'eau ou par une autre molécule de ligand qui conduit à la formation de complexes multiligandés de type ML<sub>2</sub>. Aux pH plus élevés, la quatrième position équatoriale est occupée par l'azote N1 du cycle imidazole d'un autre ligand qui forme un complexe tétramérique original, M<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>8</sub>. La formation de ce dernier a été confirmée par spectroscopie UV-visible, par RPE et par diffraction de rayons X.

Les complexes de cuivre (II) sont généralement plus stables que ceux formés avec le nickel (II). Par ailleurs ceux-ci ont une tendance notable à former des précipités en milieu basique.

## II.7. CONCLUSION DU CHAPITRE

Ce travail a permis de mieux comprendre la complexation des ions Cu(II) et Ni(II) par les peptidoamines à base d'histamine.

Nous avons synthétisé un nouveau dérivé du site principal du cuivre (II) de la sérum-albumine. L'étude de la protonation de ce ligand a montré l'existence d'une déprotonation



alternative qui entraîne l'apparition de micro-espèces. Nous allons étudier ce point au chapitre IV.

La complexation de ce ligand a été étudiée à l'aide de plusieurs techniques. La principale espèce détectée, présente dans un large domaine de pH, est un complexe plan carré très stable qui présente la même coordination que celle reportée pour la sérum-albumine et les dérivés tripeptidiques de l'histidine. Ceci montre que la nature des résidus du côté N-terminal ne semble pas avoir d'effet sur la coordination métallique.

Ce travail a permis également de compléter une étude effectuée sur des pseudo-dipeptides qui a pu mettre en évidence l'effet négligeable, sur la formation des complexes, de l'insertion de groupements méthyles dans la séquence peptidique.

**III. PEPTIDOAMINES  
AMPHIPHILES, SYNTHÈSE ET  
ÉTUDE PHYSICOCHEMIQUE**



### III.1. INTRODUCTION

Fort des résultats concernant la complexation des peptidoamines, et du fait de son expérience en synthèse de tensioactifs à propriétés spécifiques, le laboratoire s'est intéressé il y a quelques années à la préparation de composés amphiphiles à base de carcinine et de carnosine.

Ces deux molécules, sont présentes en concentrations relativement élevées dans les muscles et le cerveau des vertébrés.

La carnosine possède de nombreuses fonctions biologiques telles que la régulation du pH et de la concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules, la contraction du cœur<sup>(63, 64)</sup> et la défense contre l'oxydation intracellulaire<sup>(65, 66)</sup>. En effet, cette molécule est capable de piéger l'oxygène singulet, responsable de l'oxydation des lipides, principaux constituants des membranes cellulaires<sup>(67)</sup>.

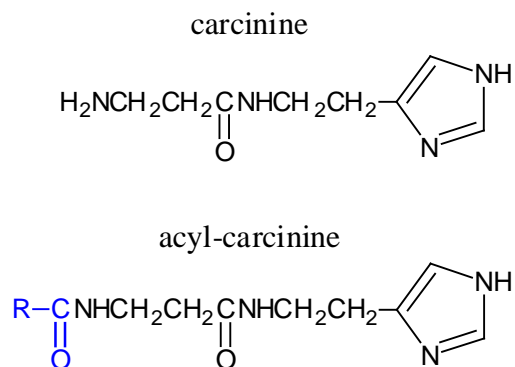
Les propriétés complexantes de la carnosine vis à vis du cuivre et du fer contribuent à son activité antioxydante en empêchant la formation des radicaux hydroxyles<sup>(68)</sup>.

Dans des systèmes in vitro, il a été montré que la carnosine permet de prévenir des dommages de l'oxydation plusieurs molécules biologiques telles que les protéines<sup>(66, 69)</sup>, les lipides<sup>(65, 70)</sup> et l'ADN<sup>(70)</sup>.

La carnosine a été testée avec succès, en tant que molécule antioxydante et chélatante dans le traitement de troubles ophtalmiques<sup>(71)</sup> et comme anti-ulcère<sup>(72)</sup>.

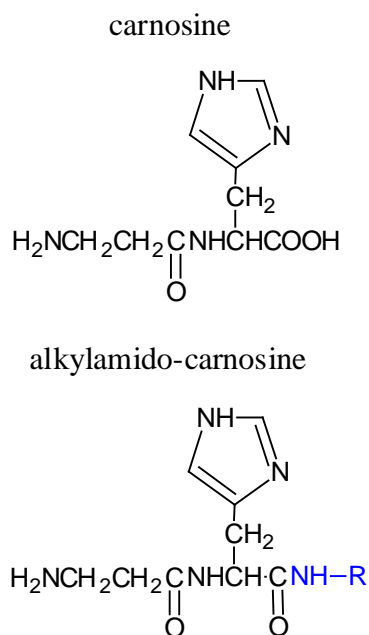
Pour augmenter le champ de leurs applications, le laboratoire a souhaité greffer sur ce type de molécule une chaîne hydrophobe afin de synthétiser des tensioactifs originaux<sup>(73)</sup>.

Le but initial était de préparer des dérivés amphiphiles, par greffage d'une chaîne hydrophobe sur les pseudopeptides décrits dans le chapitre II, tout en gardant disponibles les sites de complexation. Deux approches ont été considérées. La première consistait à synthétiser des acylcarcinines par greffage d'un acide gras sur la carcinine, avec l'amine terminale comme fonction de jonction (**Schéma III-1**). Mais du fait de la forte implication de l'amine terminale dans la complexation, les composés synthétisés ne présentaient qu'une faible capacité chélatante, vis à vis du cuivre (II) par exemple. Ceci s'explique par la diminution de la disponibilité du doublet d'électron de l'atome d'azote par mésomérie avec le groupement carbonyle.

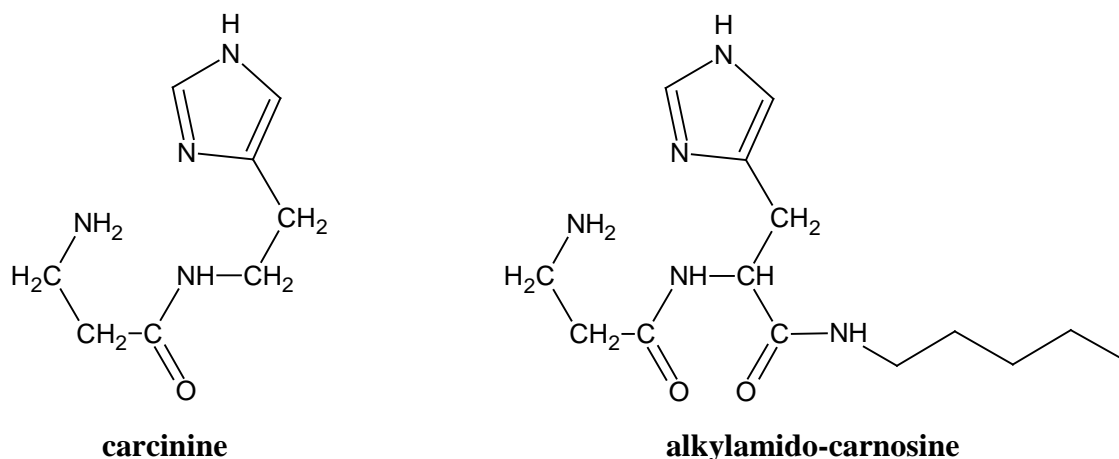


**Schéma III-1 : Première approche**

Il est donc nécessaire de maintenir l'amine libre pour conserver aux molécules tensioactives leurs propriétés complexantes. La seconde stratégie a donc consisté à préparer des alkylamidocarnosines à partir de la carnosine, dont la fonction carboxyle offre une possibilité de greffer une chaîne grasse par un lien de type amide, à partir d'une amine grasse (**Schéma III-2**). Cette approche permet d'obtenir un motif complexant identique à celui de la carcinine (**Schéma III-3**).



**Schéma III-2 : Deuxième approche**



**Schéma III-3 : Motifs complexants de la carcinine et de l'alkylamido-carnosine**

Nous avons poursuivi ces travaux en étudiant les propriétés physicochimiques de ces derniers composés. Nous avons également envisagé de synthétiser des molécules analogues, dérivées des pseudo-tripeptides vus précédemment comme par exemple la glycyl-glycyl-histidine.

Les matériaux synthétisés sont à base de molécules naturelles, ils devraient donc posséder une bonne biodégradabilité. Puisqu'ils présentent des propriétés tensioactives, complexantes et antioxydantes, ils pourraient trouver diverses applications, aussi bien dans le domaine de l'extraction de cations que dans le domaine médical ou cosmétique.

Dans un premier temps, nous ferons un bref rappel sur les tensioactifs en général. Ensuite nous décrirons la synthèse de ces tensioactifs complexants, puis leurs propriétés physicochimiques seront étudiées. Nous verrons rapidement que ces molécules n'ont pas parfaitement répondu à nos attentes, notamment en raison de leur faible solubilité dans l'eau et que d'autres structures ont dû être envisagées par la suite.

## **III.2. RAPPELS SUR LES TENSIOACTIFS**

### **III.2.1. Définition**

Les composés dits "tensioactifs" font partie des substances organiques les plus répandues dans le monde puisqu'on les trouve aussi bien dans le monde du vivant, dans l'industrie chimique que dans la vie quotidienne.

Les premiers tensioactifs de synthèse datent du début du vingtième siècle mais on utilise des agents de surface naturels depuis l'antiquité. En effet le plus ancien des tensioactifs, le savon, existe depuis au moins deux mille ans, on le fabriquait à l'époque à partir de cendres et de graisses végétales ou animales.

Actuellement, le savon existe toujours en tant qu'agent lavant mais est concurrencé par de nouveaux agents de surface synthétiques, préparés essentiellement grâce à la pétrochimie, mais également à partir de composés d'origine végétale ou animale (huile, sucres,...).

Les tensioactifs trouvent désormais leurs applications dans de nombreux secteurs tels que la détergence, les cosmétiques, l'industrie textile et alimentaire. Leur marché actuel approche les 10 millions de tonnes dans le monde avec un taux de croissance annuel de 3,6% <sup>(74)</sup>.

Dans la nature, les tensioactifs présents dans le monde du vivant sont principalement les phospholipides qui entrent dans la constitution des membranes cellulaires. Certaines protéines possèdent également des propriétés de surfaces.

### **III.2.2. Structure chimique**

De façon générale, les tensioactifs, qu'ils soient naturels ou synthétiques sont constitués par deux groupements atomiques liés par une liaison covalente, l'un hydrophile (qui aime l'eau) que l'on appellera tête polaire et l'autre hydrophobe qui est plus compatible avec les corps gras. De la même façon, on appellera cette partie "queue hydrophobe" ou même "chaîne grasse", si elle est lipophile. Cette formule est la plus simple et bien évidemment il existe des structures plus complexes pouvant combiner plusieurs têtes et plusieurs queues.

On dit que les molécules sont amphiphiles (du Grec aimant les deux) et c'est cette dualité structurale qui est responsable de plusieurs phénomènes observés en milieu aqueux, à savoir l'abaissement de la tension superficielle de l'eau (origine de la terminologie tensioactif), la formation de mousse, la détergence et l'agrégation supramoléculaire, en particulier la formation de micelles au delà d'une certaine concentration.

Ces propriétés dépendent et sont modulées par l'équilibre existant entre les deux parties de la molécule. On peut définir cet équilibre par la HLB (hydrophilic-lipophilic balance en anglais). On peut déterminer expérimentalement cette HLB mais il existe, selon le type de tensioactif, plusieurs lois empiriques permettant de la calculer. Sa valeur donne une information sur la solubilité dans l'eau, mais également sur le domaine d'application du tensioactif considéré <sup>(75, 76)</sup>.

Plus simplement, on peut considérer que l'augmentation de la longueur de la queue hydrophobe diminue l'hydrosolubilité des tensioactifs et augmente leur tendance à s'adsorber à l'interface et à s'autoassembler.

Etant donné que l'eau est le principal milieu dans lequel les composés tensioactifs trouvent leurs applications, il est important de les classer selon la nature de leur tête hydrophile.

On distingue ainsi quatre familles d'agents de surface :

- Les tensioactifs anioniques, qui sont les plus utilisés dans le monde <sup>(77)</sup>, notamment les carboxylates (savons) et les sulfonates dont fait partie le SDS (dodécylsulfonate de sodium) présent dans la plupart des shampoings, gels douche et détergents.
- Les tensioactifs cationiques, principalement des amines grasses et des sels d'ammoniums quaternaires, le plus souvent des chlorures. Ils possèdent peu d'applications du fait de leur faible pouvoir moussant et de leur mauvaise activité détergente. De façon générale, ils vont se comporter comme des précipitants ou des floculants. Ils peuvent tout de même être utilisés en tant qu'adoucissant ou agent antistatique <sup>(78)</sup>.
- Les tensioactifs non-ioniques, qui, à la différence des précédents, ne se dissocient pas en ions hydratés. Leurs propriétés hydrophiles sont dues à l'hydratation de groupements polaires tels que des chaînes polyoxyéthylées ou des fonctions hydroxyles
- Les tensioactifs amphotères, qui possèdent au moins deux groupements fonctionnels pouvant donner soit un cation, soit un anion selon les conditions du milieu. On peut les appeler zwitterioniques lorsqu'ils sont préparés à partir d'acides aminés.

### **III.2.3. Propriétés physicochimiques**

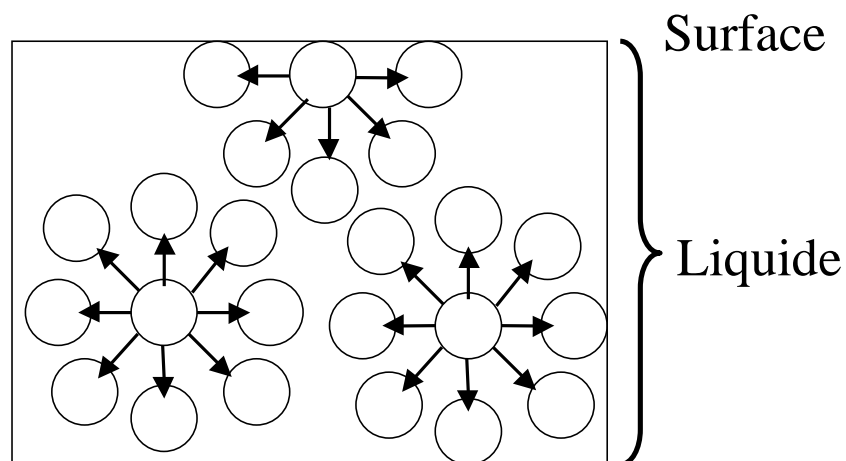
La première propriété des tensioactifs est leur tendance à migrer vers les interfaces et notamment l'interface liquide-air. Ceci a pour conséquence d'abaisser la tension superficielle de l'eau. Celle-ci est directement liée à l'anisotropie des interactions qui existent entre les



molécules qui constituent le liquide. Elle est d'autant plus importante que la force d'attraction entre les molécules est intense.

En effet, les molécules d'un liquide se déplacent librement mais sont soumises à des forces de cohésion de type Van der Waals ou électrostatiques. Les molécules situées à l'intérieur du volume subissent des forces d'attraction égales dans toutes les directions. Dans ce cas, la force résultante est nulle. Par contre, les molécules situées à l'interface liquide-air, sont soumises uniquement à des forces d'attraction dirigées vers l'intérieur dont la résultante est perpendiculaire à la surface du liquide (**Figure III-1**). Celle-ci se contracte donc spontanément et est réduite au maximum. Pour l'agrandir, il faut réaliser un travail puisqu'on amène à la surface des molécules qui ont tendance à la fuir.

Par définition, la tension superficielle ( $\gamma$ ) est égale au travail nécessaire pour augmenter la surface d'une unité d'aire. Elle s'exprime logiquement en  $\text{mJ.m}^{-2}$ , l'autre unité utilisée obtenue par simplification est le  $\text{mN.m}^{-1}$ .



**Figure III-1 : Origine de la tension superficielle**

La tension superficielle est responsable par exemple, de la forme sphérique des gouttes d'eau car cette forme est celle qui possède la plus petite surface pour un volume donné. D'autres phénomènes s'expliquent par la tension de surface, comme la faculté qu'ont certains insectes à marcher sur l'eau. Dans ce cas, il se crée un équilibre entre la tension superficielle et le poids de l'insecte, qui l'empêche de s'enfoncer dans l'eau.

Il existe plusieurs méthodes mécaniques, mettant en jeu des équilibres entre forces, pour mesurer la tension superficielle. On peut citer l'ascension de l'eau dans un tube capillaire ou la stalagmométrie.

Lorsque l'on introduit un composé tensioactif dans l'eau, la partie hydrophobe des molécules va fuir la solution et s'adsorber aux interfaces. L'adsorption progressive des molécules amphiphiles à la surface va provoquer une modification des forces d'interaction entre les molécules d'eau et ainsi diminuer la tension superficielle. Tant que la concentration reste faible, les molécules de tensioactifs forment un film mais très vite, la surface se sature et les molécules vont plutôt avoir tendance à former des agrégats appelés micelles. La concentration correspondant à ce phénomène est appelée cmc (concentration micellaire critique).

La valeur de la cmc dépend de nombreux facteurs, tels que la température, la nature de la partie hydrophile et la longueur de la chaîne hydrophobe.

Par exemple, pour une tête polaire donnée, la concentration micellaire critique diminue lorsque le nombre de CH<sub>2</sub> dans la chaîne augmente.

Concernant la température, la solubilité d'un tensioactif ionique augmente fortement au-delà d'une certaine température grâce à la formation de micelles. Ce phénomène a été observé la première fois par Krafft<sup>(79)</sup>. En dessous de cette température, les tensioactifs sont sous forme de monomères et sous l'effet de leur chaîne grasse, ne sont pas solubles dans l'eau. Cette température est appelée point de Krafft.

La température influe également sur la stabilité de solutions micellaires dans le cas de tensioactifs non-ioniques. On parle de point de trouble pour indiquer la température à partir de laquelle une phase liquide homogène démixe pour donner une phase micellaire riche en tensioactifs et une autre phase micellaire pauvre en tensioactifs.

Lorsque la concentration en tensioactif augmente, on assiste à la formation d'autres systèmes moléculaires organisés. Ce sont des états de la matière intermédiaires entre l'état solide et l'état liquide appelés cristaux liquides. Il en existe plusieurs types où les molécules peuvent s'organiser avec une structure hexagonale, lamellaire ou cubique par exemple.

### **III.3. SYNTHÈSE**

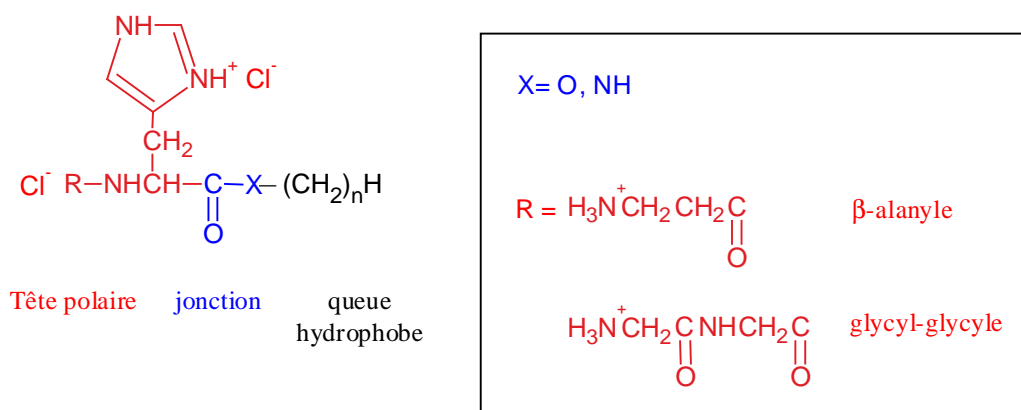
#### **III.3.1. Tensioactifs bimodulaires, synthèse d'alkylamido-peptides**

Nous pouvons qualifier les premiers tensioactifs complexants que nous avons synthétisés de "bimodulaires". Ils sont en effet constitués d'une tête polaire peptidique et d'une chaîne hydrophobe (**Schéma III-4**). Ces deux parties peuvent donc "moduler" les propriétés de la

molécule puisque l'on peut aussi bien faire varier la nature du peptide complexant, que la longueur de la chaîne grasse.

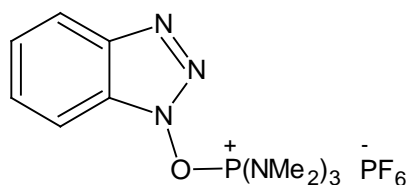
### III.3.1.1. Stratégie de synthèse

La stratégie utilisée consiste à "enchaîner" les différentes parties de la molécule les unes à la suite des autres par un jeu de protection - déprotection. Il s'agit en quelque sorte d'une synthèse peptidique classique dont la première étape correspond au couplage d'une chaîne grasse sur la fonction acide de l'histidine. Pour cela, deux types de liens peuvent être envisagés : soit ester, soit amide.



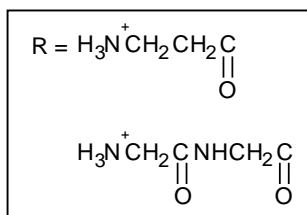
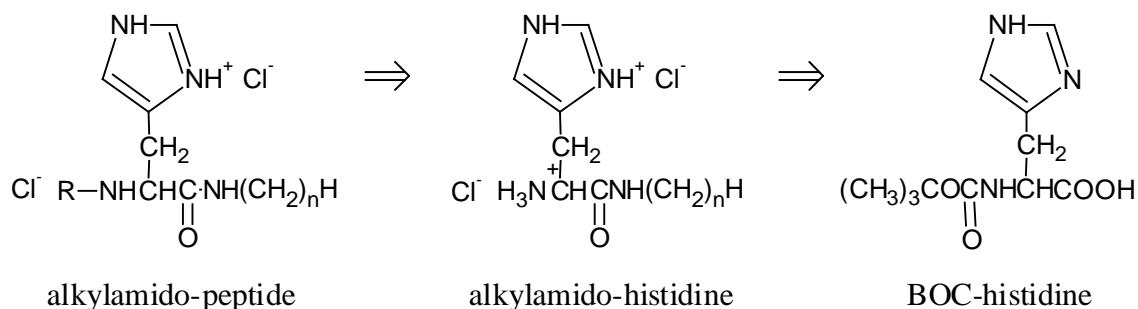
**Schéma III-4 : Structure d'un tensioactif bimodulaire**

Nous avons opté pour un lien de type amide moins sensible à l'hydrolyse qu'un ester, ce qui devrait augmenter le champ des applications du composé final. Les différentes étapes d'amidation nécessitent un réactif de couplage pour activer la fonction acide. Ce réactif doit permettre de favoriser l'attaque de l'amine sur le C=O de l'acide en activant ce dernier. L'agent de couplage choisi est le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium), **Schéma III-5** pour sa facilité d'utilisation mais aussi car il permet d'obtenir en général des produits avec de bons rendements, les temps de réactions sont relativement courts, il y a peu de racémisation, et les sous-produits sont facilement éliminables<sup>(80)</sup>.



**Schéma III-5 : Structure moléculaire du BOP**

Il y a 4 étapes pour obtenir un alkylamido-peptide, le schéma rétrosynthétique (**Schéma III-6**) représente les différentes étapes de la synthèse, du produit final au produit de départ.



**Schéma III-6 : Schéma rétrosynthétique de la préparation d'un alkylamido-peptide**

### III.3.1.2. Synthèse d'alkylamidohistidine

Dans cette étape, la protection de la fonction amine de l'histidine qui ne doit pas réagir est indispensable. La synthèse a donc été réalisée à partir de l'histidine protégée par un motif tertbutyloxycarbonyle (BOC).

Le greffage de la chaîne grasse s'effectue alors par couplage entre l'amine grasse et la BOC-histidine, par activation par le BOP, dans l'acétonitrile. Le pH est maintenu aux alentours de 7-8 par ajout de triéthylamine. Au niveau mécanistique, la triéthylamine déprotone l'acide carboxylique qui, par réaction avec le BOP, conduit à un ester actif (**Schéma III-7**). Celui-ci réagit alors avec l'amine grasse. Les acides formés sont neutralisés par un excès de triéthylamine. Aucune réaction parasite liée à la présence du noyau imidazole, non protégé, n'est observée. Différentes longueurs de chaîne au niveau amine grasse ont été utilisées. Dans

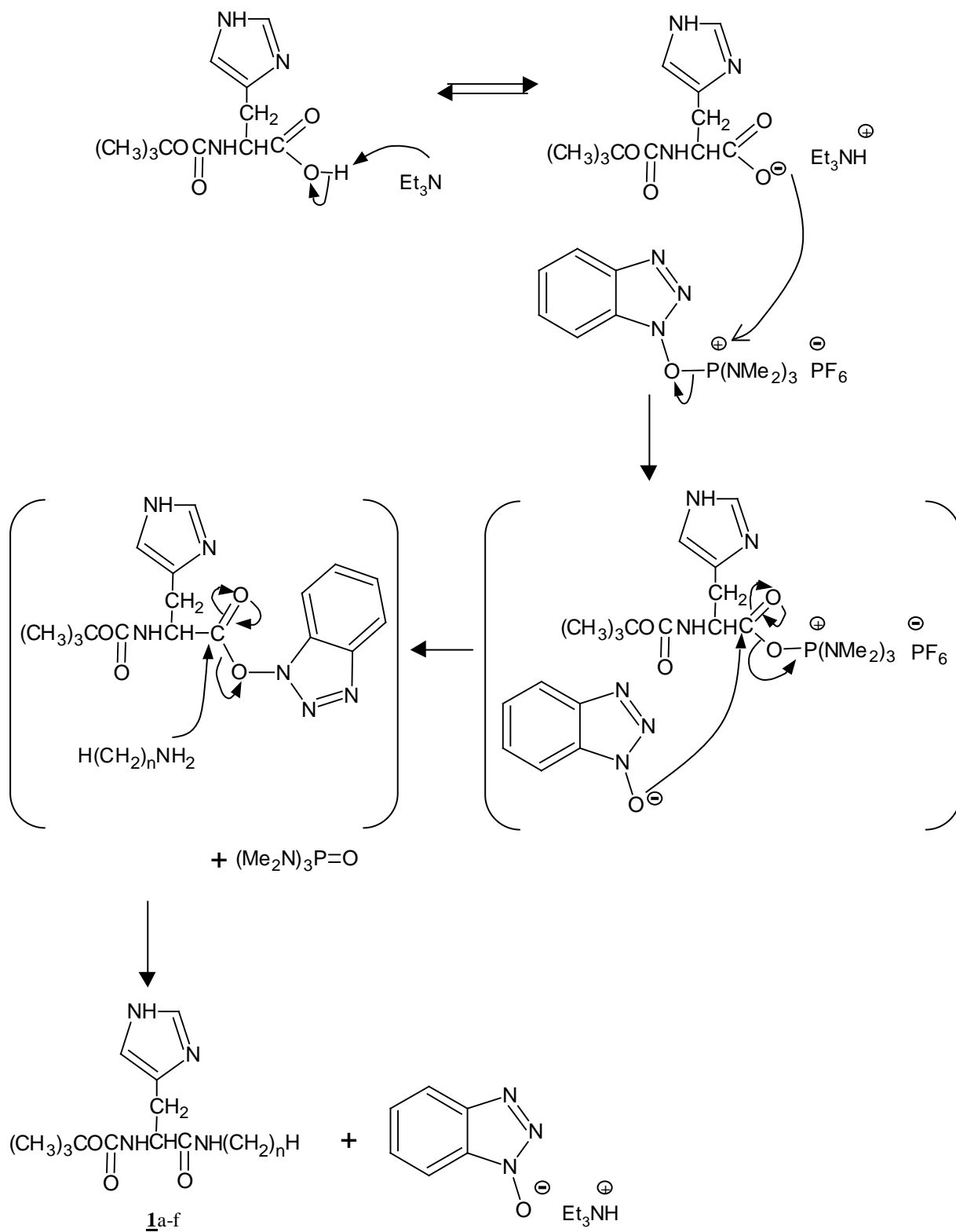
la plupart des cas, le produit final précipite. Il suffit alors de le filtrer. Un lavage puis une recristallisation de la poudre obtenue, permet d'obtenir un produit très pur.

Les rendements sont satisfaisants et sont un peu plus élevés pour les chaînes longues, car les produits de couplages correspondants sont totalement insolubles dans l'acétonitrile et précipitent davantage que les produits à chaînes plus courtes.

Pour récupérer une partie du produit qui n'a pas précipité, le filtrat est traité par des lavages basiques et acides et extrait en phase organique, ce qui permet d'augmenter un peu le rendement. (**Tableau III-1**).

Composé	n	Rendement (%)
1a	4	71
1b	7	80
1c	8	83
1d	10	88
1e	12	95
1f	14	95

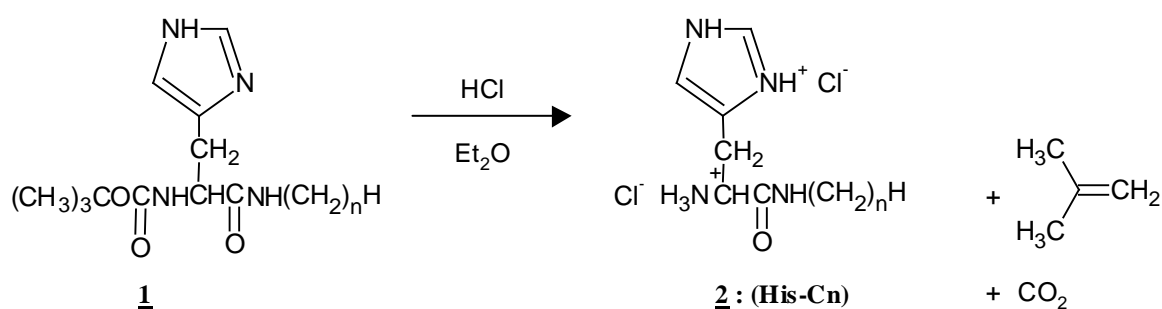
**Tableau III-1 : Couplage de la BOC-histidine avec une amine grasse**



**Schéma III-7 : Couplage de la BOC-histidine avec une amine grasse par activation au BOP**

### III.3.1.3. Déblocage du motif protecteur

Avant de procéder au couplage suivant, c'est-à-dire correspondant au greffage de la  $\beta$ -alanine ou de la glycyl-glycine, il est nécessaire de retirer le motif protecteur de l'amine de l'histidine. Il suffit de soumettre le composé **1**, en solution dans l'éther, à un courant d'HCl gazeux (**Schéma III-8**). Les sous-produits étant gazeux ( $\text{CO}_2$  et isobutène), aucune purification n'est nécessaire, le milieu réactionnel est simplement évaporé et les rendements sont quantitatifs.

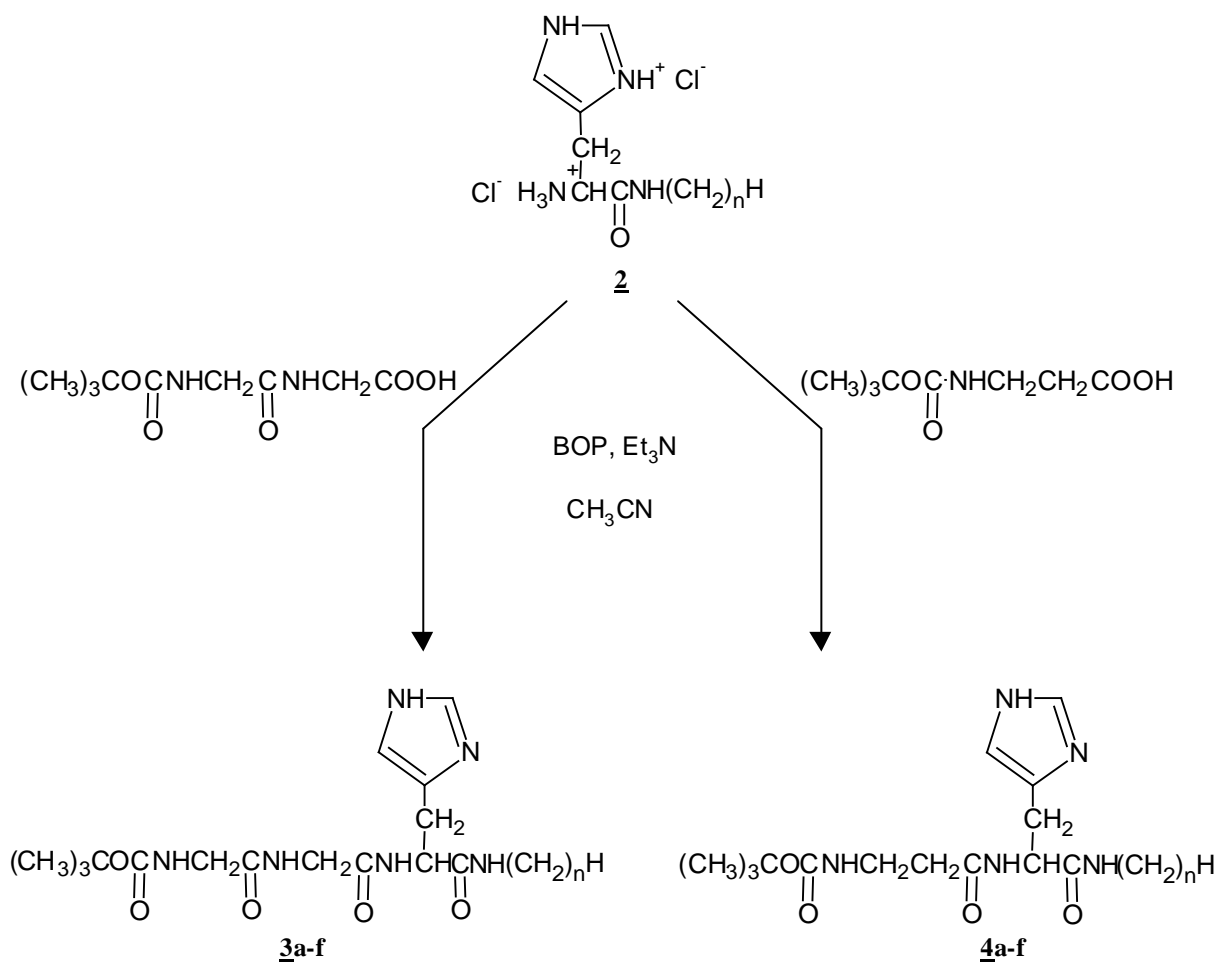


**Schéma III-8 : Déprotection de l'amine terminale de l'histidine**

### III.3.1.4. Synthèse d'alkylamidopeptides

L'étape suivante de la synthèse correspond au greffage de l'acide aminé  $\beta$ -alanine ou du dipeptide glycyl-glycine sur le composé **2**.

Nous avons là encore mis à profit les techniques classiques de couplage peptidique et utilisé le BOP pour coupler le dérivé amidique de l'histidine, préparé précédemment, avec la BOC- $\beta$ -alanine ou la BOC-glycyl-glycine (**Schéma III-9**). Les rendements sont du même ordre que ceux obtenus pour le couplage précédent (**Tableau III-2**).



**Schéma III-9 : Couplage de l'alkylamido-histidine avec la BOC-β-alanine ou la BOC-glycyl-glycine**

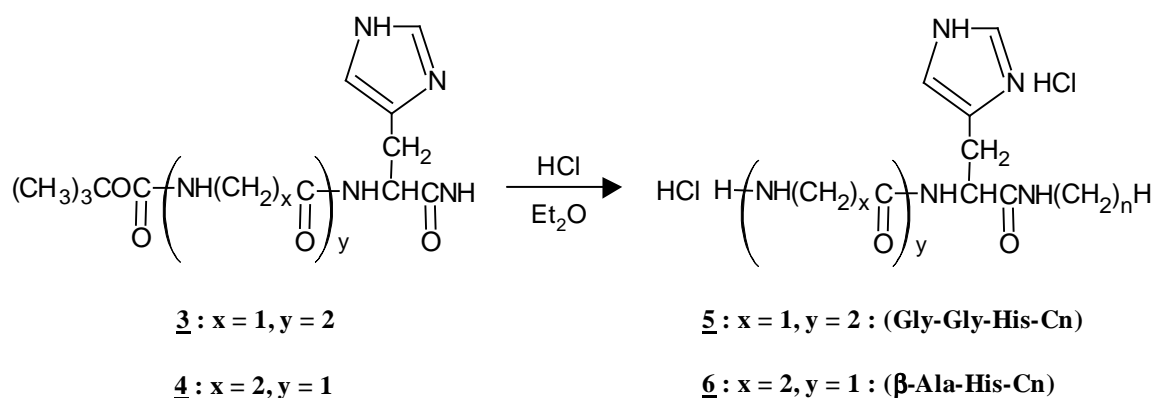
Série	n	3 (rendement %)	4 (rendement %)
a	4	70	71
b	7	77	79
c	8	77	80
d	10	80	81
e	12	88	90
f	14	90	92

**Tableau III-2 : Couplage de l'alkylamido-histidine avec la BOC-β-alanine ou la BOC-glycyl-glycine**



### III.3.1.5. Déblocages des motifs protecteurs

Le déblocage des motifs BOC est aisément réalisé par HCl gazeux pour conduire aux produits finaux avec des rendements quantitatifs. Les produits sont conservés sous forme de chlorhydrate d'ammonium pour éviter toute dégradation (**Schéma III-10**). Les produits obtenus **5** et **6** sont dénommés respectivement Gly-Gly-His-Cn, 2HCl et  $\beta$ -Ala-His-Cn, 2HCl. Pour simplifier l'écriture, les 2 HCl seront omis dans la suite du texte.



**Schéma III-10 : Déprotection de l'amine terminale**

La stratégie de synthèse adoptée s'est révélée efficace pour les deux types de structure, les produits ont été obtenus avec de bons rendements (entre 50 et 90% au final sur les 4 étapes) et avec une pureté nécessaire pour pouvoir être étudiés en physicochimie.

Pour chacun des deux peptides complexants, six longueurs de chaîne différentes de quatre à quatorze atomes de carbone ont été considérées pour en étudier l'effet sur plusieurs grandeurs physicochimiques à savoir, la solubilité dans l'eau, la tension superficielle et le pouvoir complexant vis à vis des métaux de transition.

Les résultats, exposés dans la deuxième partie de ce chapitre, montrent que les produits sont tensioactifs, ce qui se traduit par une baisse de la tension superficielle, lorsque la concentration en produit augmente (page 110). Les diagrammes de phase binaires (tensioactif/eau) ont été également déterminés pour plusieurs chaînes. Ces mesures ont été effectuées principalement en milieu acide en raison de la très faible solubilité dans l'eau à partir de pH = 5.

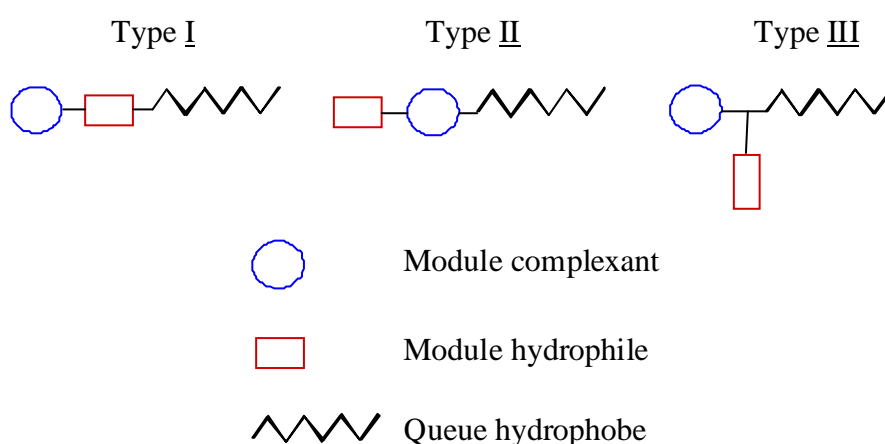
Pour la même raison, le pouvoir complexant de ces molécules n'a pas pu être étudié rigoureusement. En effet, la complexation du cuivre conduit le plus souvent à la précipitation des complexes. Voilà pourquoi des molécules modèles à chaîne très courte (4 atomes de

carbone) ont été synthétisées, elles ont permis de déterminer le diagramme de répartition des espèces en fonction du pH qui doit s'approcher de celui des molécules à plus longues chaînes (page 134).

Du fait de cette trop grande hydrophobie, nous n'avons pas pu obtenir de résultats satisfaisants, nous avons donc envisagé d'insérer dans la molécule un module polaire apportant une hydrophilie plus grande sans modifier le pouvoir complexant.

### III.3.2. Tensioactifs trimodulaires

Plusieurs structures sont possibles pour insérer le module hydrophile dans la molécule (**Schéma III-11**). Les 3 parties peuvent être associées de façon linéaire ou ramifiée. Par ailleurs, nous avons souhaité remplacer les amines grasses par les acides gras correspondants en raison de leur prix moins élevé. Pour augmenter l'hydrophilie de nos molécules, nous avons choisi des motifs constitués d'unités oxyéthyléniques, qui sont susceptibles de ne pas interférer au niveau du site de complexation.



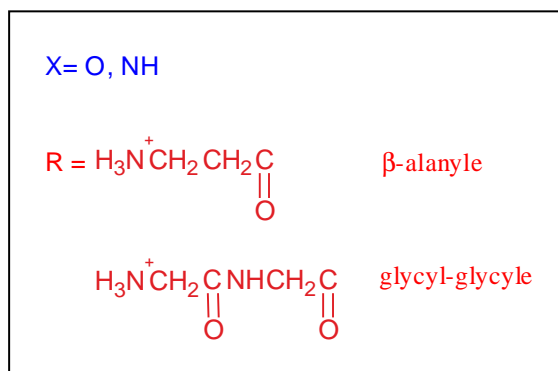
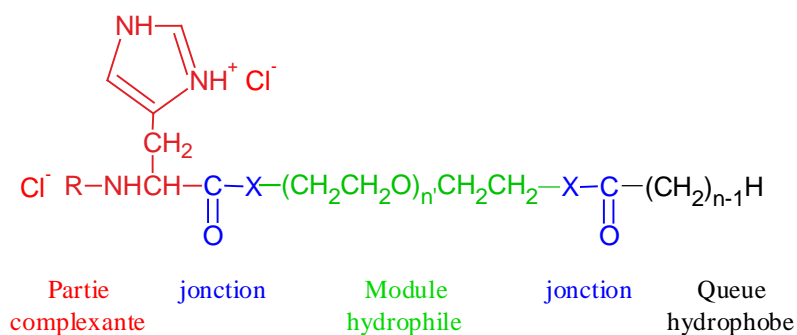
**Schéma III-11 : Différentes possibilités d'insertion du module hydrophile**

#### III.3.2.1. Tensioactifs trimodulaires de type I

Les tensioactifs trimodulaires de type **I** comportent un module hydrophile intercalé entre la chaîne grasse et le peptide complexant. Pour synthétiser ce type de molécule, nous avons mis à profit la technique de synthèse modulaire, qui consiste à préparer indépendamment chaque module, puis à les associer. Il faut dans un premier temps, coupler un acide gras avec un

module hydrophile possédant une fonction amine ou alcool à chacune de ses extrémités, on obtient ainsi un bimodule amphiphile fonctionnalisé qui va jouer le même rôle que l'amine grasse dans la synthèse précédente (page 73). On enchaîne ensuite les différents acides aminés à partir de ce bimodule, toujours par une succession de couplages et de déprotections.

Comme précédemment avec les tensioactifs bimodulaires, deux types de liens sont possibles pour greffer les trois modules : ester ou amide (**Schéma III-12**). Les modules hydrophiles peuvent donc être des diols, des diamines ou des aminoalcools. Nous avons opté pour les deux dernières possibilités, les diols n'ont pas été retenus pour limiter le nombre de liens ester à 1.



**Schéma III-12 : Structure d'un tensioactif trimodulaire**

Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler avec des aminoalcools, ce qui sous-entend que la molécule finale comporte un lien ester et donc que le tensioactif présente l'inconvénient d'être plus fragile car plus facilement hydrolysable. Cependant, les études actuelles sur les tensioactifs portent de plus en plus sur la recherche d'agents non toxiques et totalement biodégradables. Donc, le fait d'être hydrolysable pour un tensioactif peut également être un avantage.

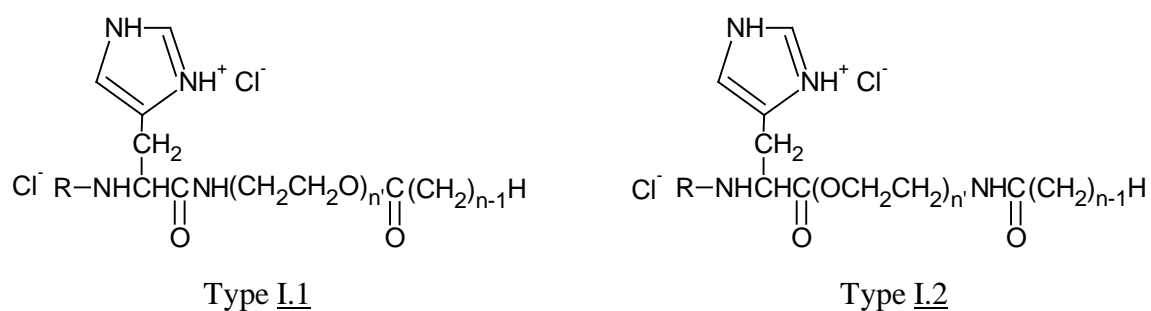
Par la suite, nous avons utilisé des diamines pour préparer d'autres tensioactifs trimodulaires, cependant leur synthèse s'est avérée plus difficile car il a été nécessaire de faire réagir chacune

des amines sélectivement. Par contre les molécules obtenues au final sont beaucoup moins sensibles à l'hydrolyse.

### III.3.2.1.1. Tensioactifs trimodulaires à lien amide et ester

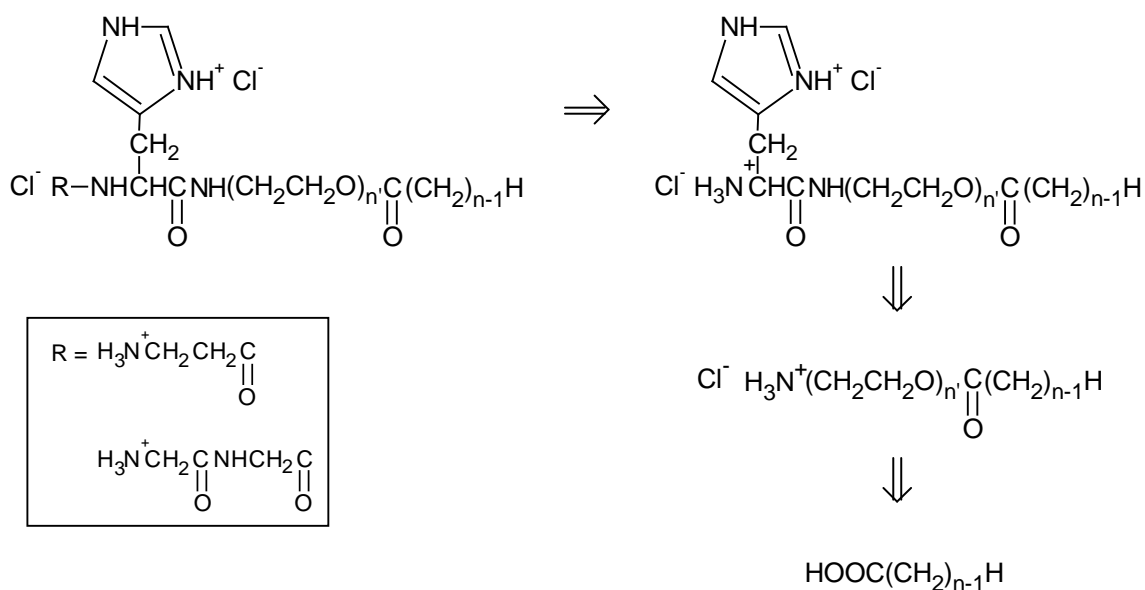
La synthèse se déroule en deux parties, on prépare d'abord le bimodule amphiphile puis on greffe la partie peptidique.

Le module hydrophile utilisé dans ce cas est donc un amino-alcool comportant des motifs oxyéthyléniques. Le tensioactif final possède ainsi un lien de chaque côté du module hydrophile : un amide et un ester. Deux structures sont possibles puisque l'on peut intervertir les deux liens dans la molécule (**Schéma III-13**).



**Schéma III-13 : Structures possibles pour un tensioactif trimodulaire à lien amide et ester**

1) Synthèse des composés de type **I.1**



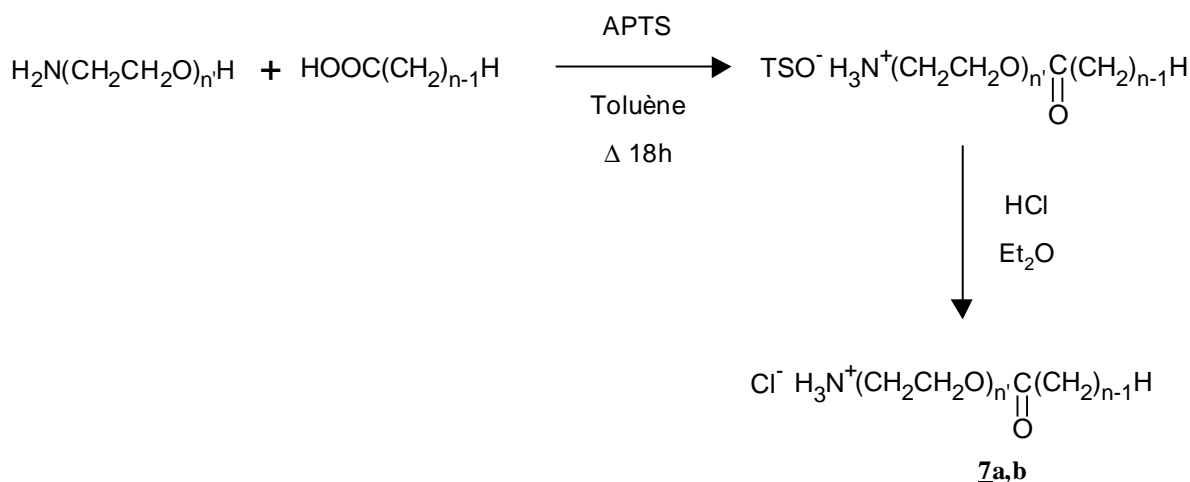
**Schéma III-14 : Schéma rétrosynthétique de la préparation d'un tensioactif trimodulaire de type **I.1****

*a) Greffage du module hydrophile sur l'acide gras*

La chaîne grasse est introduite grâce à une simple estérification selon Fischer à partir de l'acide correspondant (**Schéma III-15**).

L'amine est protégée par protonation, par ajout d'un excès d'acide paratoluènesulfonique qui permet par ailleurs, d'obtenir un sel d'amino-alcool soluble dans le toluène. Le produit est récupéré après 18 heures de reflux dans le toluène, c'est un tosylate d'ammonium qui précipite après refroidissement et concentration. L'excès d'APTS est éliminé par une simple filtration et une recristallisation permet de purifier le produit.

Pour améliorer le couplage de ce composé avec l'histidine, nous avons été amenés à effectuer un échange d'anion au niveau de l'ammonium. Le remplacement du tosylate ( $\text{TSO}^-$ ) par un chlorure est effectué en soumettant l'ester, en solution dans l'éther, à un courant d'HCl gazeux. Deux oligomères oxyéthyléniques ont été testés afin de pouvoir moduler l'hydrophilie du composé final. Les rendements sont très satisfaisants et identiques pour les deux composés (**Tableau III-3**).



**Schéma III-15 : Estérification de l'acide gras par un amino-alcool**

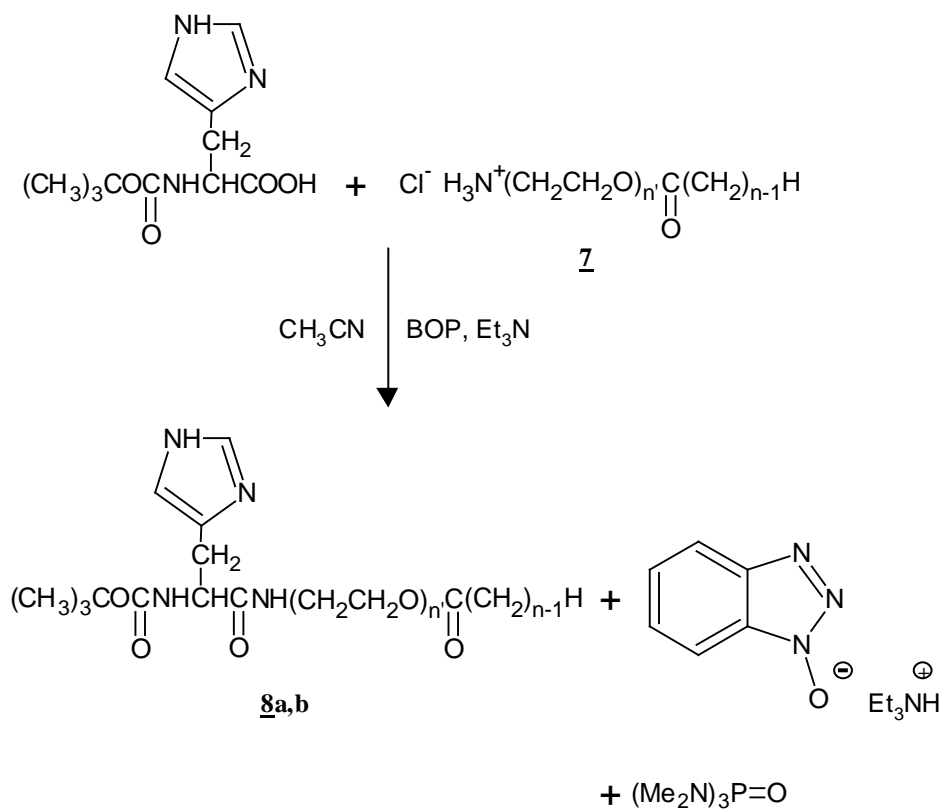
composé	n	n'	Rendement (%)
7a	10	1	81
7b	10	2	80

**Tableau III-3 : Estérification de l'acide gras par un amino-alcool**

*b) Greffage de la partie peptidique*

La suite de la synthèse consiste à greffer, de la même manière que pour les tensioactifs bimodulaires, les parties complexantes  $\beta$ -alanyl-histidyle et glycyglycyl-histidyle. Le bimodule amphiphile **7** correspond au partenaire aminé et l'agent de couplage utilisé est une nouvelle fois le BOP (**Schéma III-16**). Dans ce cas, les produits de couplage avec la BOC-histidine ne précipitent pas, il est donc nécessaire d'éliminer les sels de triéthylamine ainsi que les différents sous-produits du BOP par des lavages acido-basiques.

Les rendements sont légèrement inférieurs à ceux obtenus pour le greffage de la BOC-histidine avec des amines grasses. En effet, l'absence de précipitation déplace l'équilibre de façon moins importante en faveur de la formation du produit de couplage (**Tableau III-4**).

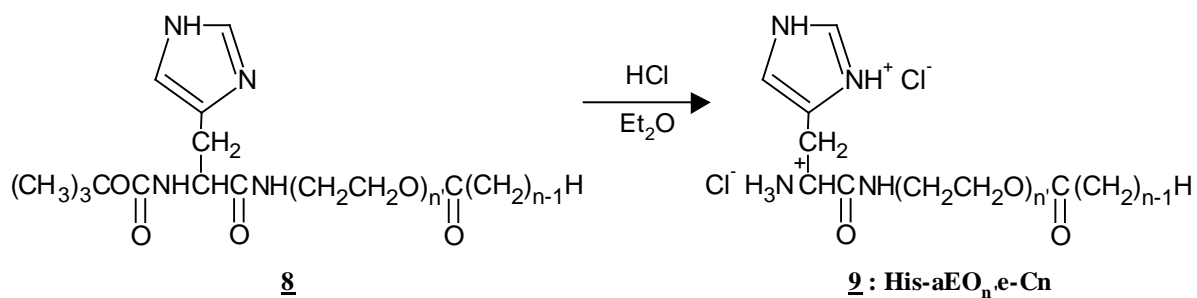


**Schéma III-16 : Couplage de la BOC-histidine avec le bimodule 7**

Composé	n	n'	Rendement (%)
8a	10	1	82
8b	10	2	80

**Tableau III-4 : Couplage de la BOC-histidine avec le bimodule 7**

Le déblocage du motif protecteur tertbutyloxycarbonyle est réalisé une nouvelle fois par HCl gazeux avec des rendements quantitatifs (**Schéma III-17**). Le produit **9** récupéré est désigné par His-aEO<sub>n</sub>e-Cn, "a" indiquant un lien amide, "e", un lien ester et "OE", un oxyéthylène.



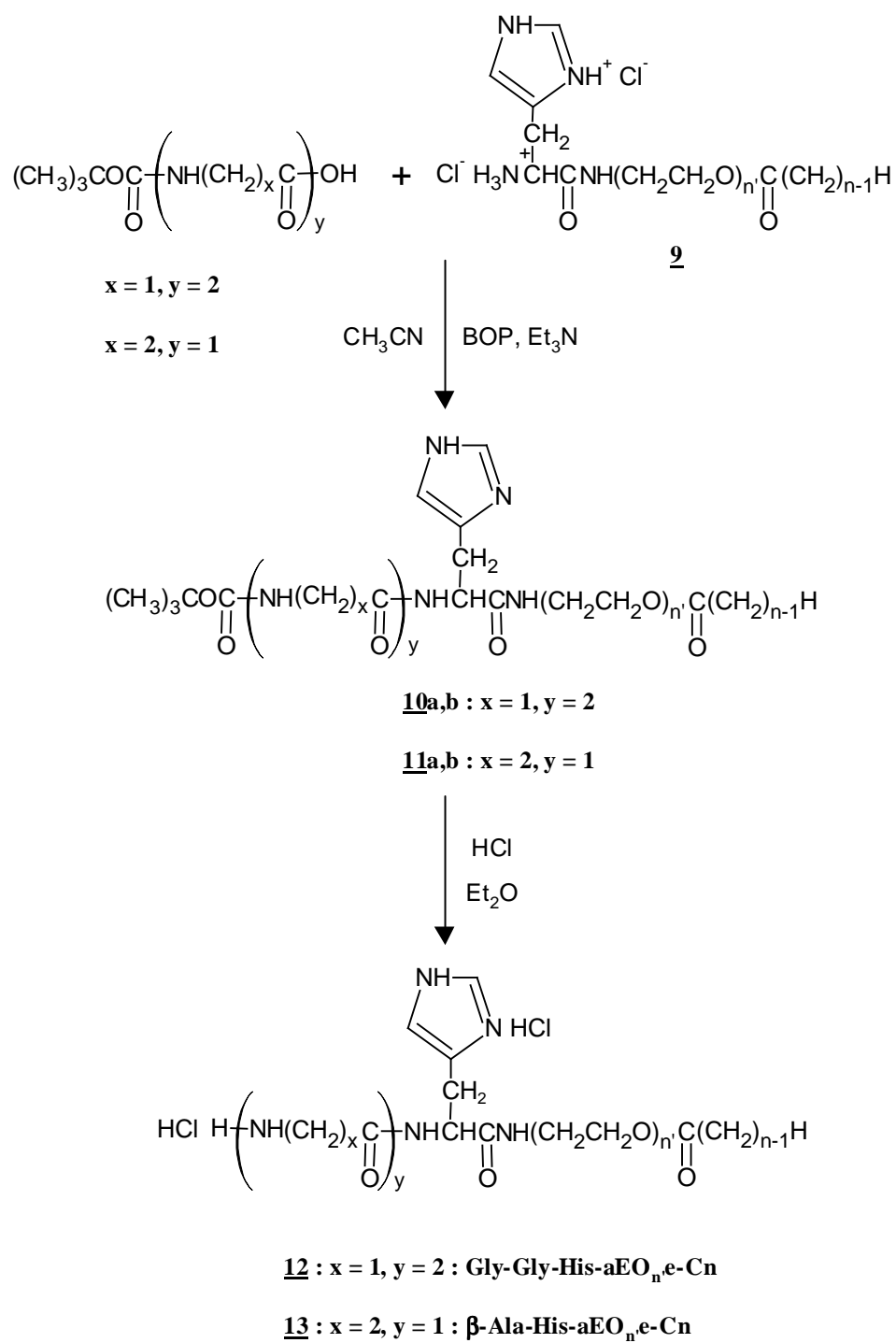
**Schéma III-17 : Déprotection de l'amine terminale de l'histidine**

Le greffage de la  $\beta$ -alanine ou de la glycyl-glycine est réalisé sans problème particulier. (Schéma III-18). Les rendements du couplage (Tableau III-5) sont supérieurs à 80 % quelque soit la taille du motif oxyéthylénique et le type d'acide-amino. Le déblocage du motif protecteur est dans tous les cas, quantitatif.

série	n	n'	10 Rendement (%)	11 Rendement (%)
a	10	1	81	82
b	10	2	82	84

**Tableau III-5 : Couplage des différents acides aminés avec le composé 9**

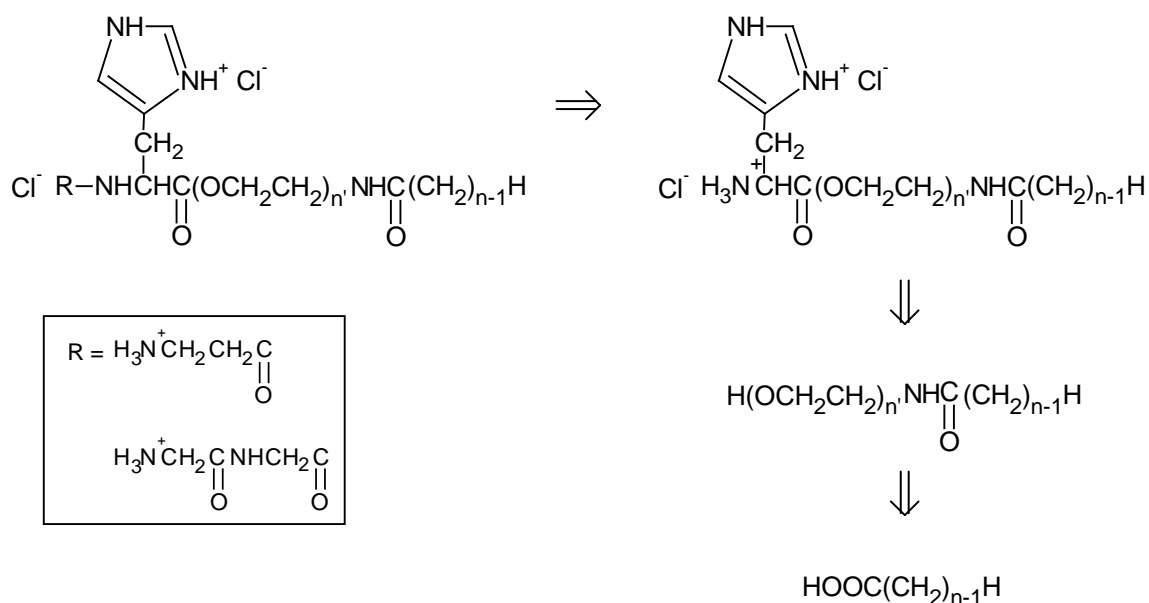




**Schéma III-18 : Couplage des différents acides aminés avec le composé 9 et déprotection de l'amine terminale**

## 2) Synthèse des composés de type I.2

Pour examiner l'effet de la position de l'ester sur la stabilité des tensioactifs, une deuxième structure pour préparer le bimodule a été essayée, avec une inversion des liens ester et amide (**Schéma III-19**).



**Schéma III-19 : Schéma rétrosynthétique de la préparation d'un tensioactif trimodulaire de type I.2**

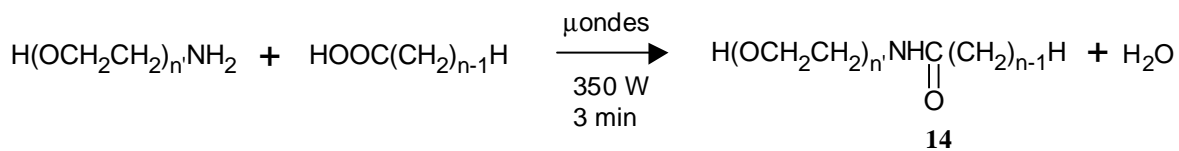
### a) Greffage du module hydrophile sur l'acide gras

Il s'agit dans ce cas de coupler l'acide gras et l'amino-alcool en formant un amide. Celui-ci est obtenu par activation du mélange des deux constituants sous micro-ondes.

L'amide est obtenu en quelques minutes, par chauffage dans un four micro-ondes domestique avec un rendement de 90 % (**Schéma III-20**).

Le produit brut ne contient pas d'impuretés, ce qui n'est pas le cas lors d'un couplage au BOP. Quelques lavages acides et basiques suffisent pour éliminer les restes d'acide et d'amino-alcool qui n'ont pas réagi.

L'irradiation avec des micro-ondes a pour effet d'agiter les molécules par absorption d'énergie. De plus l'absence de solvant entraîne une concentration élevée des réactifs. Ces deux faits suggèrent que la réactivité est considérablement augmentée et expliquent le faible temps de réaction.

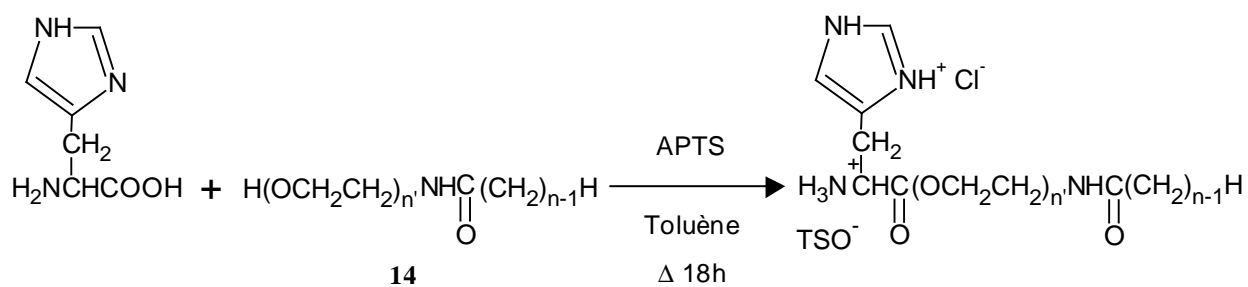


**Schéma III-20 : Couplage de l'acide gras avec un amino-alcool**

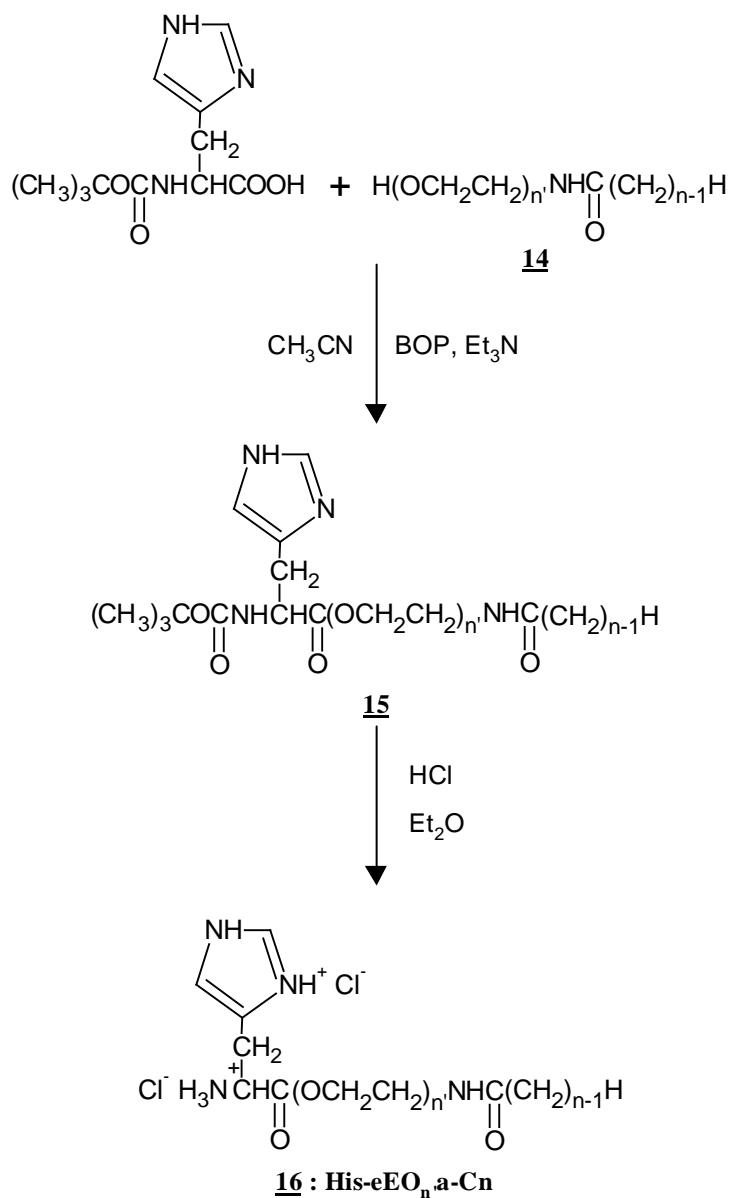
*b) Greffage de la partie peptidique*

La synthèse se poursuit avec le greffage de l'histidine par estérification. Un premier essai dans les conditions classiques de Fischer n'a pas donné de résultat satisfaisant (40%) (**Schéma III-21**). Ce faible rendement s'explique par l'insolubilité partielle de l'histidine dans le solvant malgré la présence d'un équivalent d'APTS.

Par contre une activation par le biais du BOP a permis d'obtenir l'ester attendu avec un rendement avoisinant les 83%, après lavages acido-basiques pour éliminer les sous-produits (**Schéma III-22**).

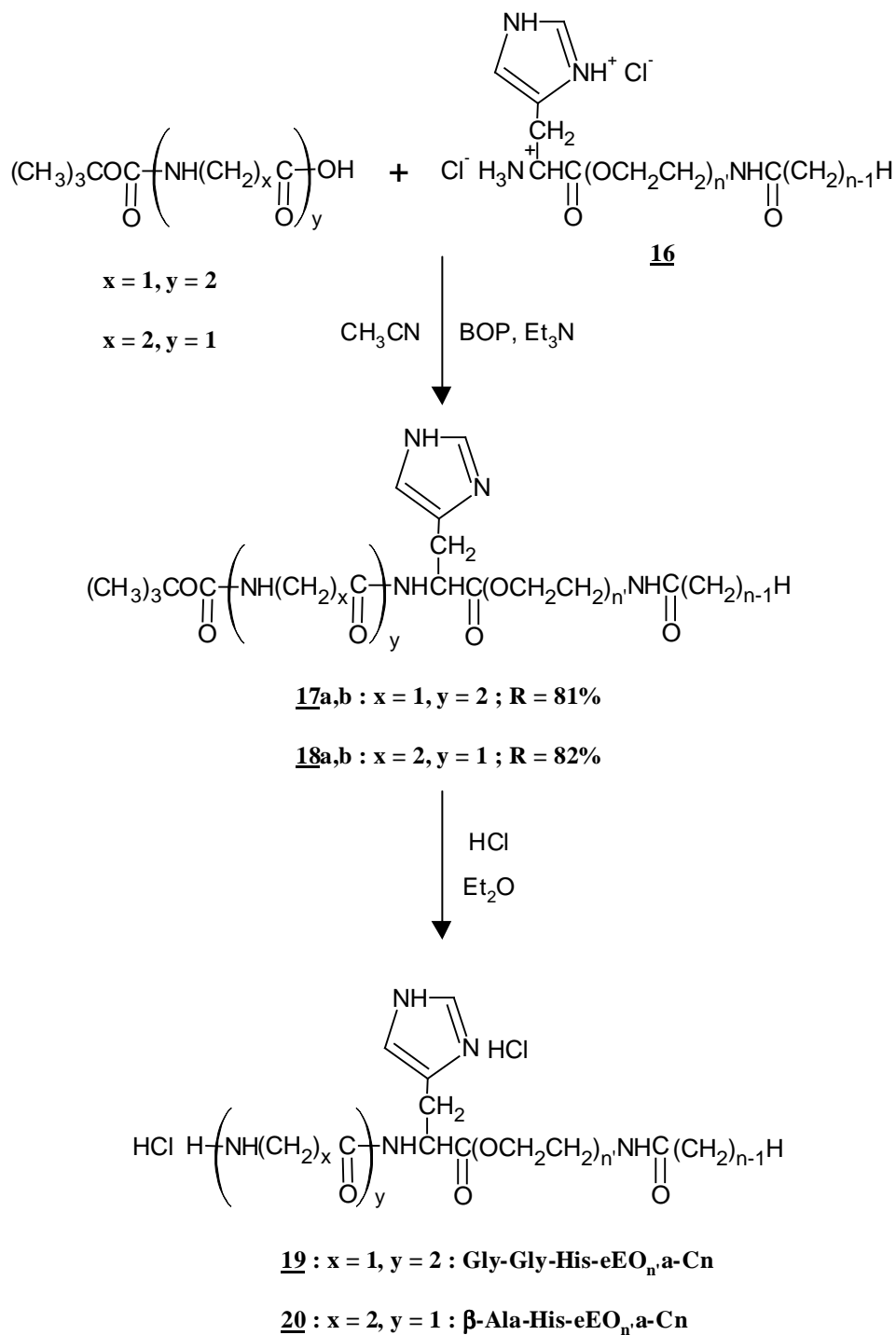


**Schéma III-21 : Premier essai d'estérification de l'histidine par le bimodule 14**



**Schéma III-22 : Estérification avec le BOP de la BOC-histidine par le bimodule 14 et déprotection de l'amine terminale**

Après déprotection de l'amine terminale, la synthèse s'achève par le greffage de la  $\beta$ -alanine ou de la glycyl-glycine selon les procédures décrites précédemment pour conduire aux produits 17 et 18 (Schéma III-23) puis 19 et 20 après déprotection des groupements tertbutyloxycarbonyles.



**Schéma III-23 : Couplage des différents acides aminés avec le composé 16 et déprotection de l'amine terminale**

La stabilité dans l'eau de ce type de tensioactifs a été évaluée en milieu acide et en milieu basique (page 141).

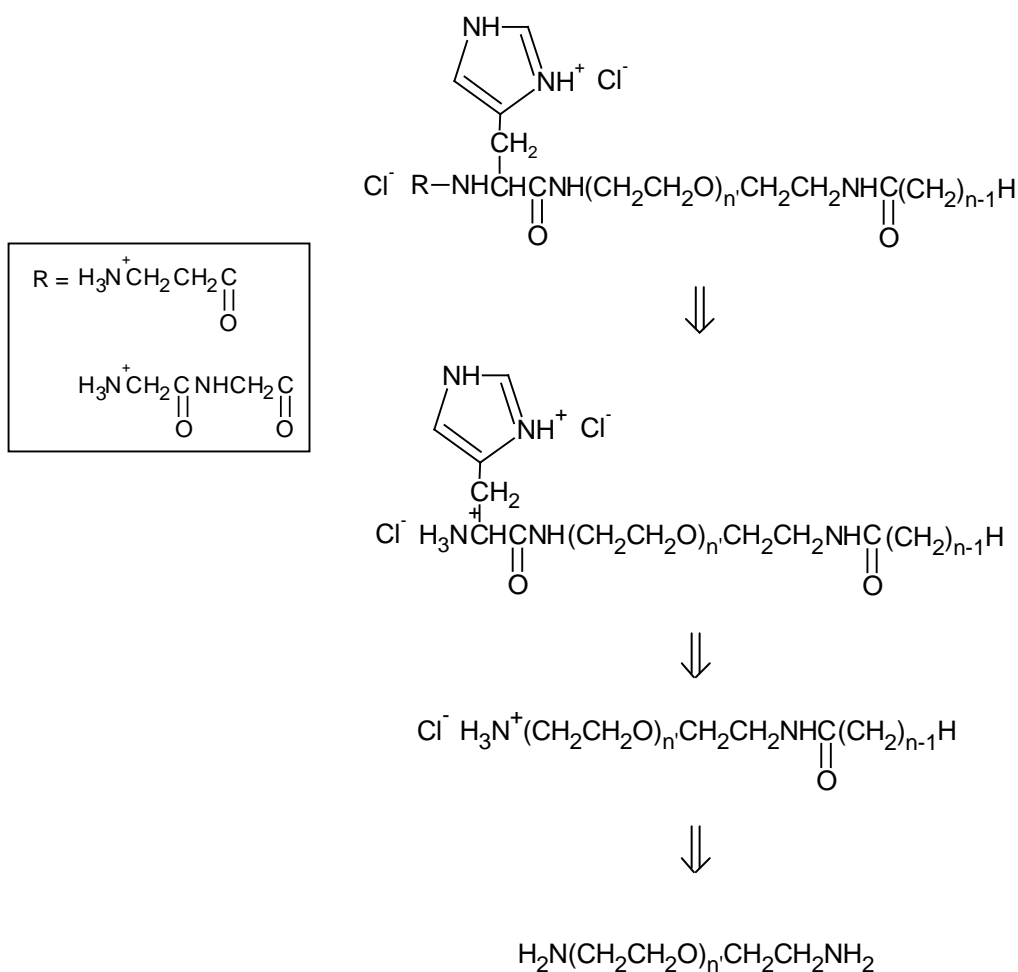
Des mesures de solubilité ont montré que l'insertion d'un module oxyéthyléniques augmente considérablement l'hydrophilie de ce type de tensioactif par rapport aux analogues bimodulaires (page 142).

Les propriétés tensioactives et complexantes ont également été examinées (page 144).

La fragilité de ces molécules dans l'eau nous a conduit à envisager d'autres tensioactifs trimodulaires possédant deux liens amides, donc moins sensibles à l'hydrolyse.

### III.3.2.1.2. Tensioactifs trimodulaires à deux liens amides

Pour obtenir deux liens amides, le module hydrophile utilisé ici est une diamine symétrique dérivée de polyoxyéthylène. Comme précédemment, le bimodule amphiphile est préparé dans un premier temps par greffage de la diamine avec un acide gras ; la partie peptidique est couplée dans un second temps (**Schéma III-24**).

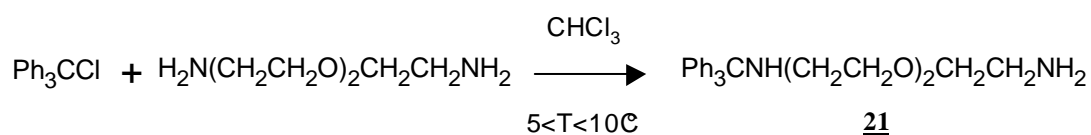


**Schéma III-24 : Schéma rétrosynthétique de la préparation d'un tensioactif trimodulaire à deux liens amides**

Il n'est pas possible d'obtenir un produit monosubstitué à 100 % en faisant réagir une diamine avec un équivalent d'acide gras. Une première étape est donc nécessaire pour protéger une des deux amines pour pouvoir les faire réagir sélectivement.

### 1) Monoprotection de la diamine

Nous avons choisi de protéger par un motif de type trityle (triphénylméthyle)<sup>(81)</sup>. C'est une réaction de substitution nucléophile. Elle est réalisée dans le chloroforme à basse température avec la diamine en large excès (**Schéma III-25**), le chlorure de trityle est ajouté par portions et le mélange est vigoureusement agité pour conduire uniquement au produit monosubstitué.



### Schéma III-25 : Monoprotection de la diamine par un groupement triphénylméthyle

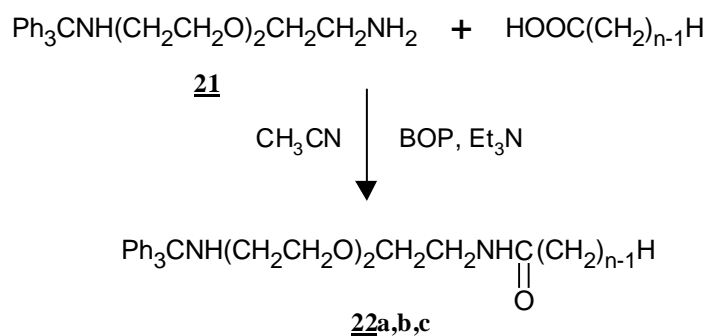
Notre choix s'est porté sur l'(éthylènedioxy)bis(éthylamine) (n' = 2) qui est commerciale et qui devrait apporter suffisamment d'hydrophilie.

Le choix des réactifs rend la purification du produit très simple car la diamine en excès est très hydrophile et peut être facilement éliminée par un lavage par l'eau. Le composé monoprotégé est insoluble dans l'eau à cause de la présence des 3 cycles aromatiques. Le coefficient de partage est donc favorable à une extraction dans le chloroforme. Une chromatographie rapide est tout de même nécessaire pour obtenir une pureté suffisante. Le rendement après purification est de 70%.

L'une des deux fonctions amine étant protégée, la seconde étape consiste à greffer un acide gras sur l'amine libre.

### 2) Couplage de l'amine libre avec l'acide gras

L'amidation avec l'acide gras est réalisée par couplage au BOP dans les conditions habituelles (**Schéma III-26**). Les produits précipitent dans tous les cas ; ils sont donc aisément isolés avec une pureté suffisante. Trois longueurs de chaînes différentes ont été utilisées, les rendements sont indiqués dans le **Tableau III-6**.

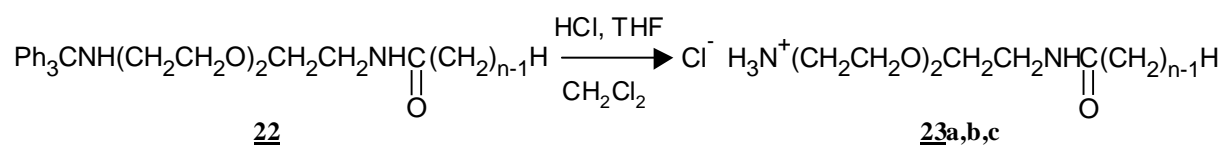


**Schéma III-26 : Couplage de l'amine libre avec l'acide gras**

Composé	n	n'	Rendement (%)
22a	10	2	90
22b	12	2	91
22c	14	2	92

**Tableau III-6 : Couplage de l'amine libre avec l'acide gras**

Le groupement protecteur triphenylméthyle est débloqué ensuite avec de l'HCl 12 N dans le dichlorométhane avec du THF comme co-solvant (**Schéma III-27**). Après 18 heures d'agitation à température ambiante, l'évaporation du milieu réactionnel permet d'obtenir un résidu solide que l'on peut recristalliser dans l'acétonitrile. Plus la chaîne grasse est longue et meilleur est le rendement (**Tableau III-7**).



**Schéma III-27 : Déprotection de l'amine**



Composé	n	n'	Rendement (%)
23a	10	2	77
23b	12	2	84
23c	14	2	92

**Tableau III-7 : Déprotection de l'amine**

*3) greffage de la partie peptidique*

De même que précédemment, pour obtenir les molécules finales, il suffit de greffer les peptides complexants sur le bimodule **23** (**Schéma III-28** et **Schéma III-29**). Les rendements sont très satisfaisants, ils sont meilleurs pour les dérivés à chaîne C14 car la précipitation est plus importante (**Tableau III-8**).

Série	n	n'	24 (rendement %)	26 (rendement %)	27 (rendement %)
a	10	2	81	86	87
b	12	2	88	85	87
c	14	2	90	90	92

**Tableau III-8 : Couplage de la BOC-histidine et des différents acides aminés**

L'augmentation de la solubilité grâce au module hydrophile a été démontrée et les propriétés complexantes et tensioactives ont été mises en évidence. Cependant les produits aux chaînes les plus longues (C12 et C14) ont la particularité de former des gels en milieu basique et neutre, ce qui a gêné leur étude complète (page 149).

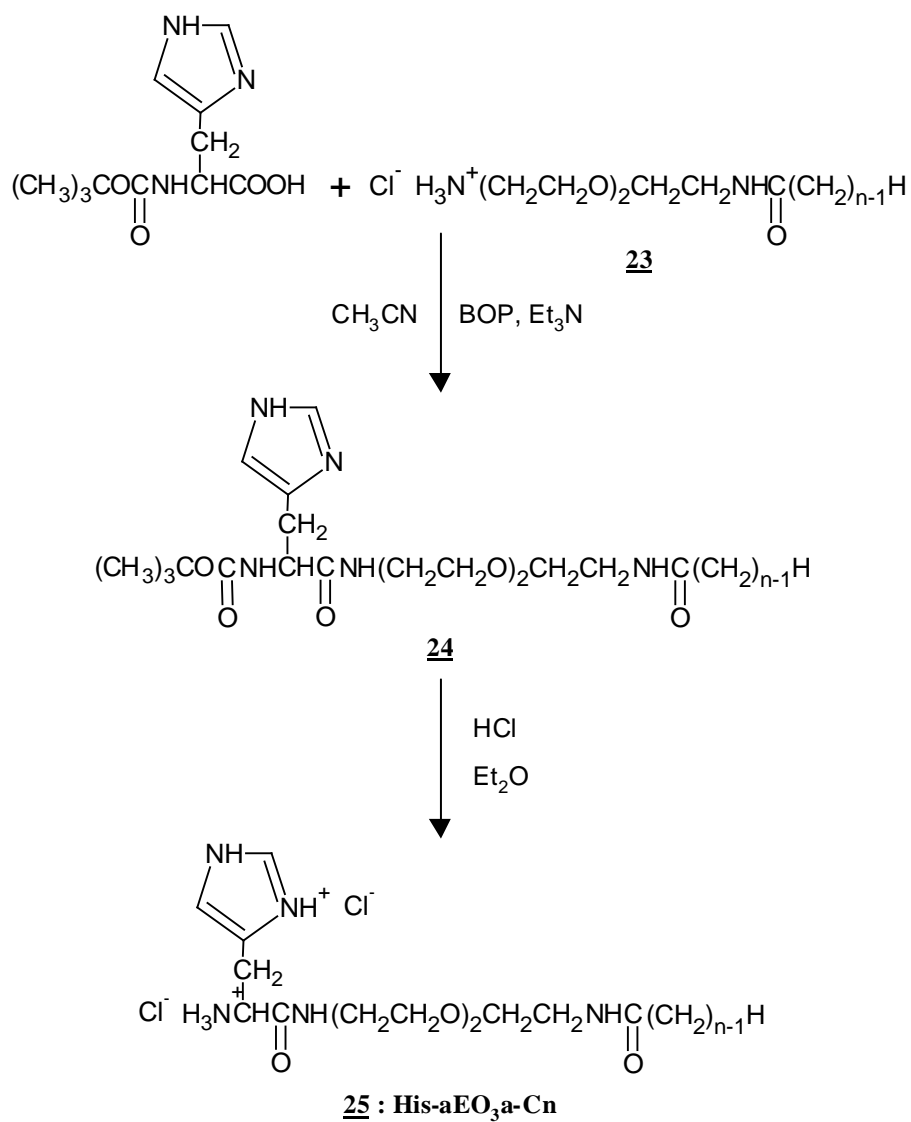
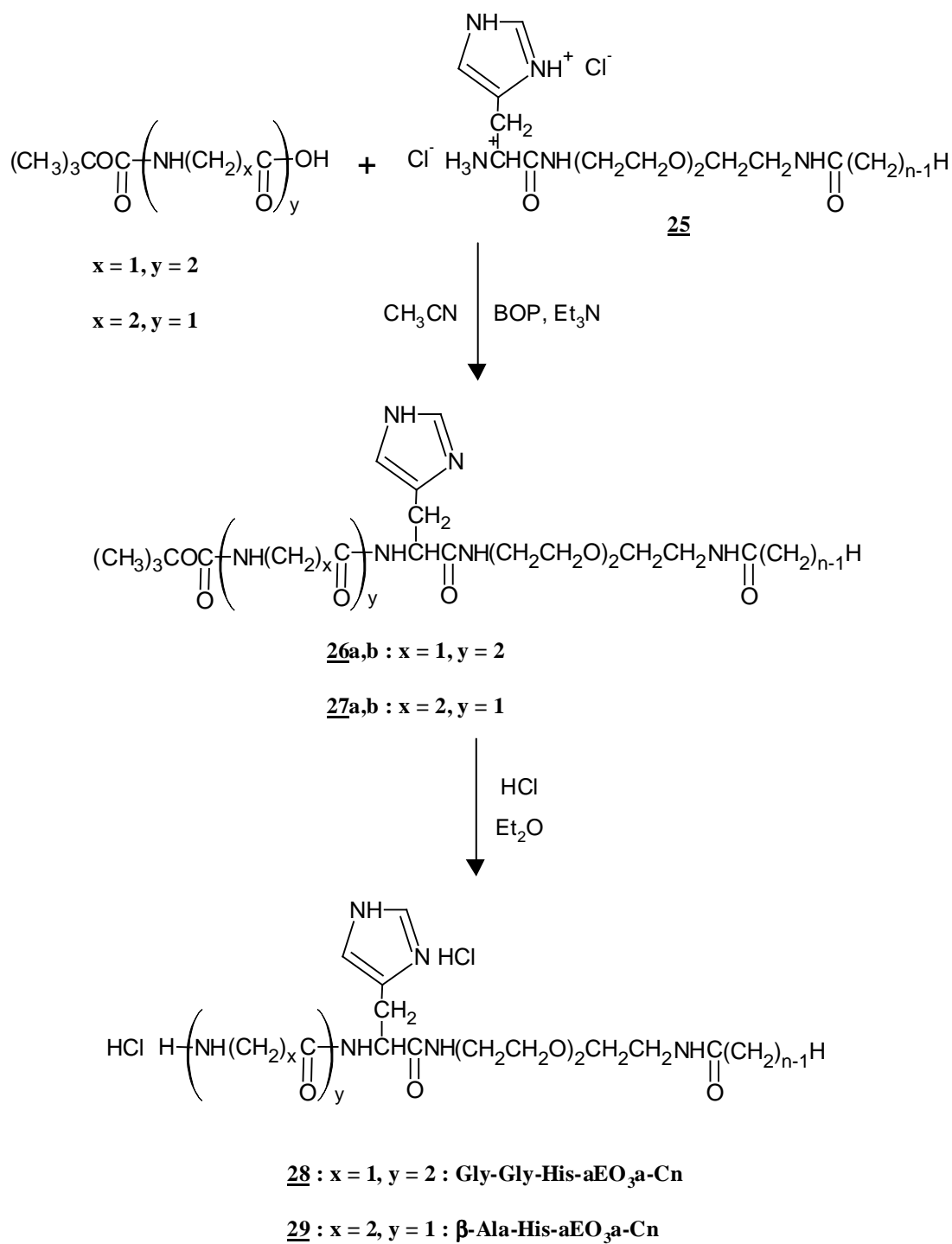


Schéma III-28 : Greffage de l'histidine sur le bimodule 23



**Schéma III-29 : Couplage des différents acides aminés avec le composé 25 et déprotection de l'amine terminale**

### III.3.2.2. Tensioactifs trimodulaires de type II

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la synthèse de tensioactifs trimodulaires de type II pour lesquels la partie complexante se trouve entre le module hydrophobe et la partie hydrophile (Schéma III-30). L'intérêt de ce type de molécule est que, dans le cas de la formation de micelles directes, la partie complexante devrait se trouver dans un site hydrophobe, ou du moins à l'interface, avec une réactivité très différente de celle existant en milieu aqueux.

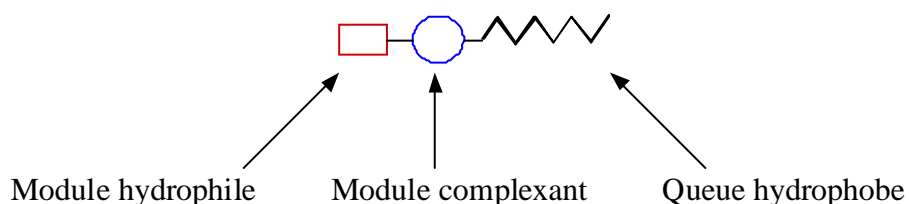


Schéma III-30 : Structure schématique d'un tensioactif trimodulaire de type II

Pour obtenir de telles molécules, une fonction de jonction est nécessaire du côté N-terminal du peptide pour greffer le module hydrophile. Nous avons envisagé de greffer la partie hydrophile du côté N-terminal du peptide et la partie hydrophobe du côté C-terminal, c'est à dire au niveau de la fonction acide de l'histidine.

Afin de laisser libre la fonction amine terminale du tripeptide, nous avons choisi de remplacer le dernier motif glycine par un amino-acide trifonctionnel, c'est à dire la lysine. Cet amino-acide permet en effet de laisser la fonction amine  $\alpha$  libre pour la complexation et d'utiliser la fonction amine  $\epsilon$  pour ajouter un motif hydrophile (Schéma III-31).

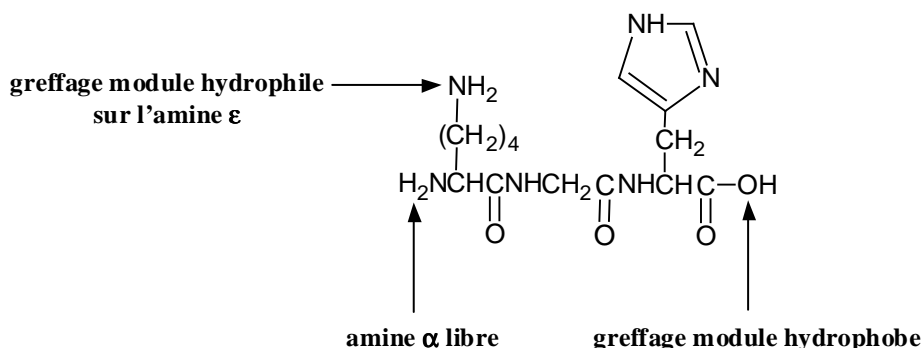
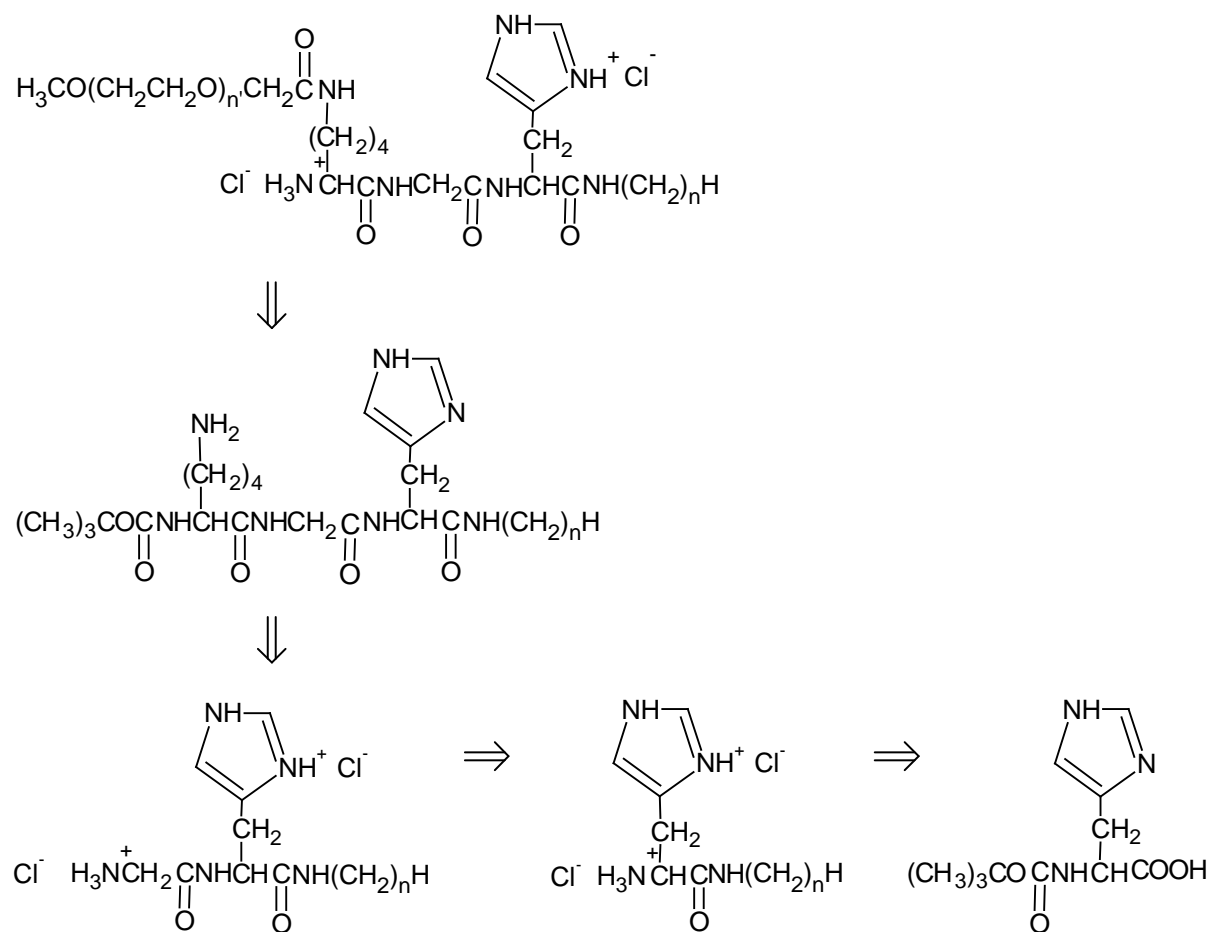


Schéma III-31 : Stratégie de synthèse d'un tensioactif trimodulaire de type II

Le schéma rétrosynthétique (**Schéma III-32**) représente les différentes étapes de la synthèse, de la molécule finale au composé initial.



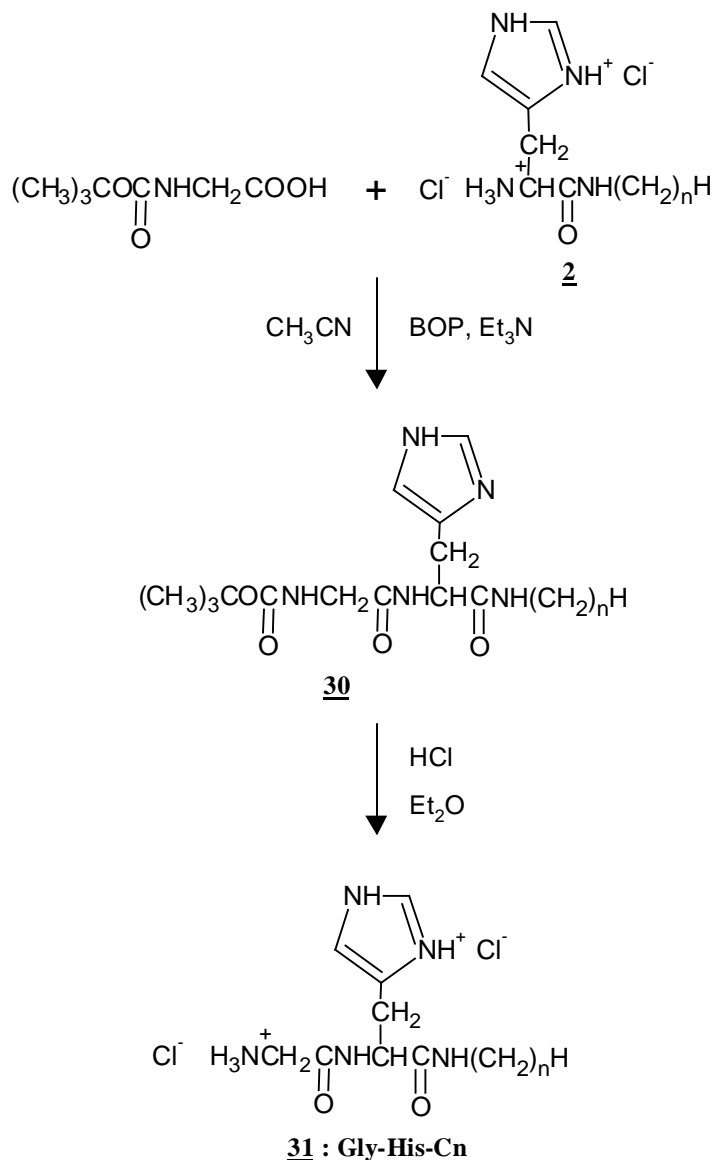
**Schéma III-32 : Schéma rétrosynthétique de la préparation d'un tensioactif trimodulaire de type II**

La synthèse s'apparente beaucoup à celle des tensioactifs bimodulaires. En effet, la première étape consiste à coupler l'histidine avec une amine grasse. Ce produit intermédiaire a déjà été synthétisé, il s'agit du composé **2** (page 74). Il faut ensuite greffer les autres acides aminés par couplage au BOP.

#### III.3.2.2.1. Greffage de la glycine sur l'alkylamidohistidine

Le couplage de la BOC-glycine avec le composé **2** se fait dans les conditions habituelles (**Schéma III-33**). Le produit **30** précipite. Une seule chaîne grasse a été considérée ( $n = 12$ ).

Un excellent rendement de 90% est obtenu. La déprotection de l'amine terminale est réalisée là encore par HCl gazeux et permet d'obtenir le composé **31**.

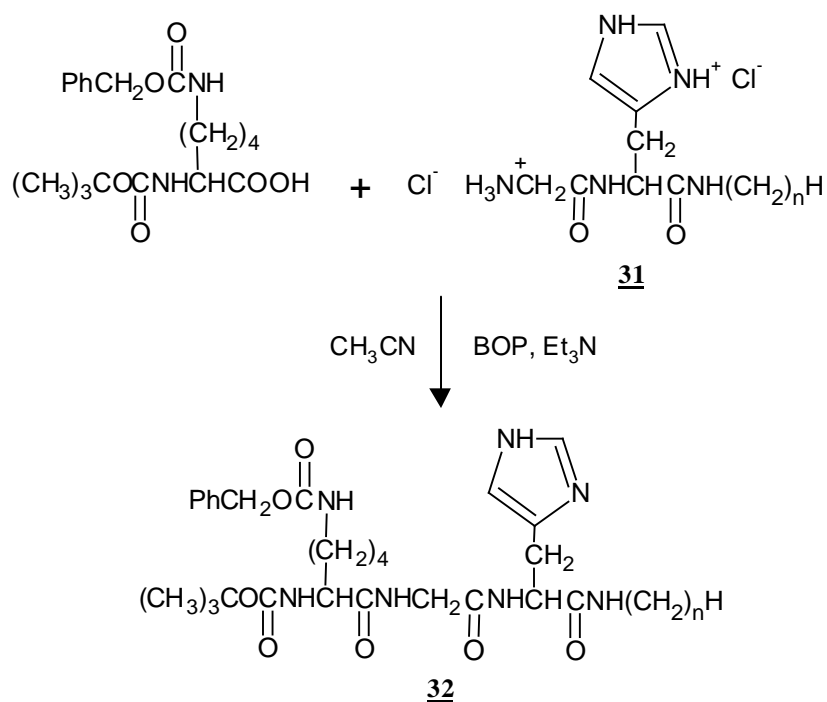


**Schéma III-33 : Greffage de la glycine sur l'alkylamidohistidine**

La synthèse se poursuit par le greffage de la lysine, cependant il est indispensable de protéger les deux amines de façon orthogonale pour les faire réagir sélectivement. Nous avons utilisé une lysine avec l'amine en  $\alpha$  protégée par un tertbutyloxycarbonyle (BOC) et l'amine en  $\epsilon$  protégée par un benzyloxycarbonyle (Z).

### III.3.2.2.2. Greffage de la lysine

La BOC-lysine est couplée à l'amido-glycyl-histidine avec le BOP, dans les conditions habituelles. Le produit **32** précipite et le rendement pour  $n = 12$  est de 94% (**Schéma III-34**).

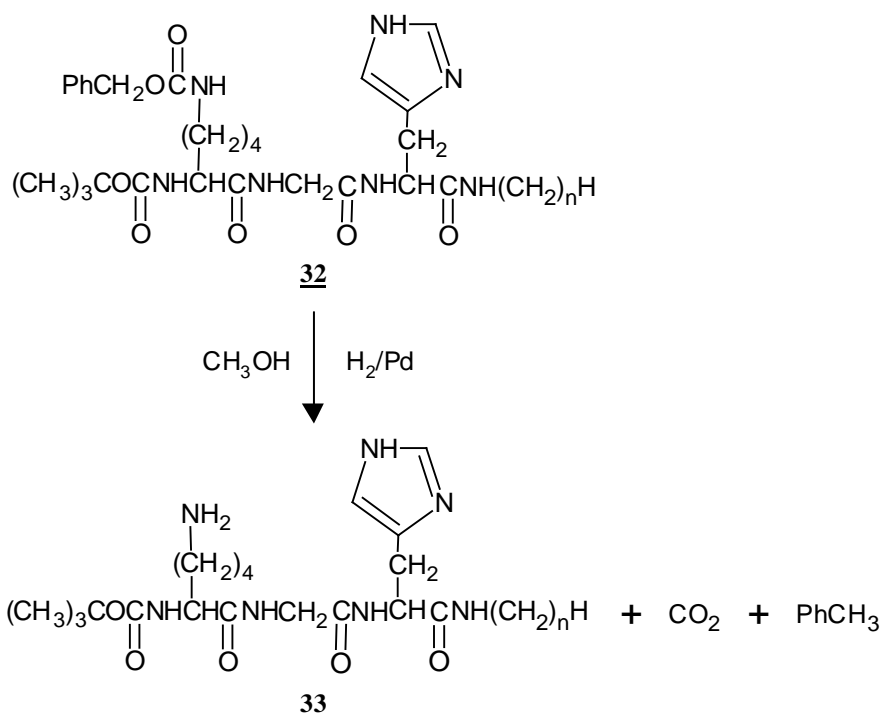


**Schéma III-34 : Réaction de couplage de la BOC-lysine(Z) avec le composé 31**

### III.3.2.2.3. Déprotection de l'amine en $\epsilon$ de la lysine

Le déblocage du groupement protecteur Z est effectué à température ambiante sous une pression d'hydrogène de 30 bar, en présence de palladium sur charbon (**Schéma III-35**). Le milieu réactionnel est évaporé ; les sous-produits ( $\text{CO}_2$  et toluène) ne posent pas de problèmes puisqu'ils sont facilement éliminables et la réaction est quantitative.

Dans ces conditions, la fonction amine  $\alpha$  reste protégée et le module hydrophile pourra être greffé uniquement sur l'amine en  $\epsilon$ .



**Schéma III-35 : Déblocage du motif protecteur benzyloxycarbone**

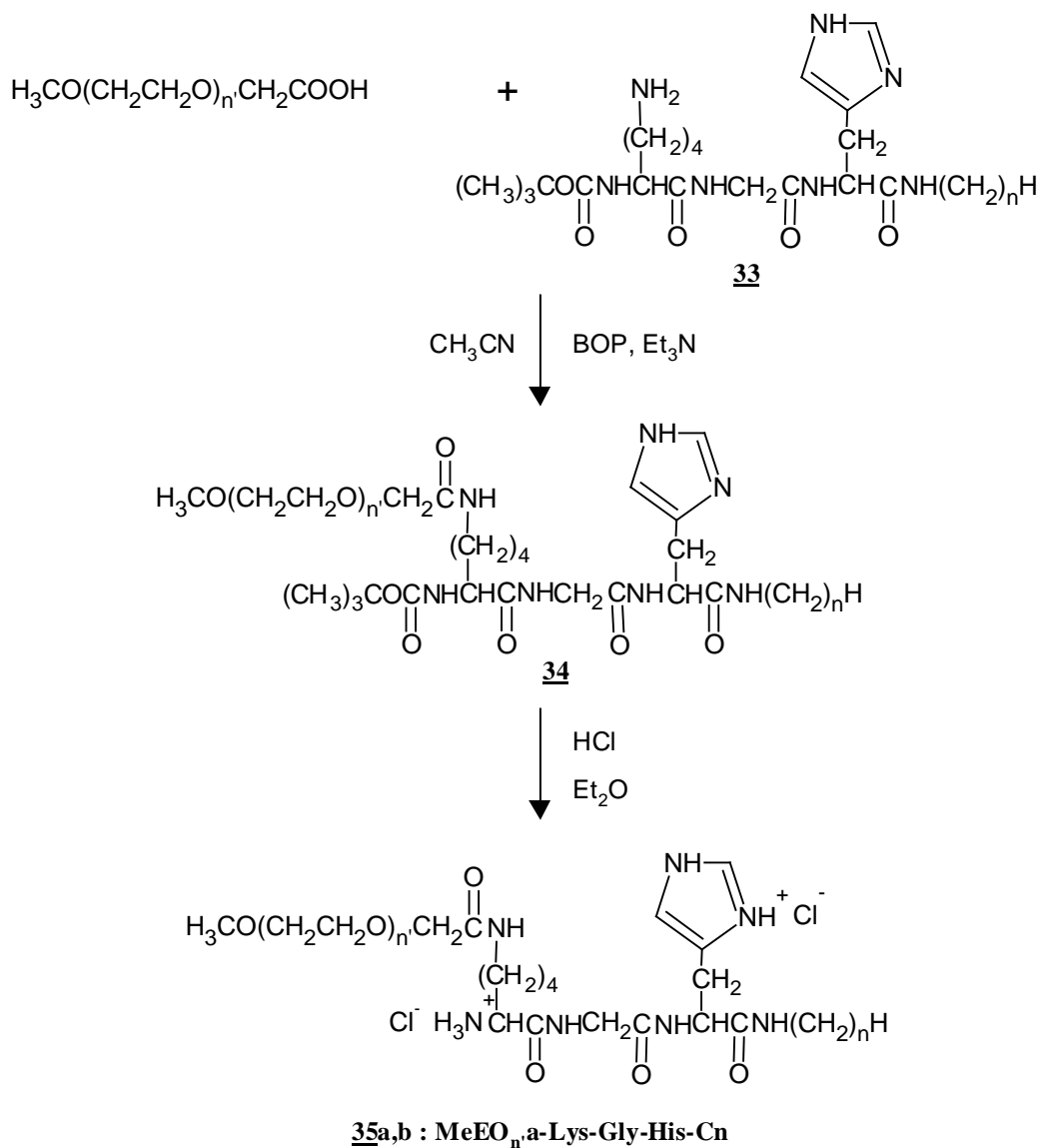
### III.3.2.3. Greffage du module hydrophile

Pour introduire une partie hydrophile sur la fonction amine en  $\epsilon$  de la lysine, nous avons choisi d'utiliser des dérivés oxyéthyléniques de l'acide acétique, de façon à les greffer par un lien de type amide par le biais d'un couplage au BOP (**Schéma III-36**).

Le produit **34** ne précipite pas, il est donc nécessaire d'effectuer des lavages acides et basiques du produit brut. Deux valeurs différentes de  $n$  ont été considérées, les rendements sont un peu plus faibles du fait de la non-précipitation des produits (**Tableau III-9**).

La déprotection du motif BOC pour obtenir le produit final **35**, est réalisée avec un rendement quantitatif. Le produit est désigné par MeEO $_n$ -a-Lys-Gly-His-Cn.





**Schéma III-36 : Couplage du module hydrophile avec le composé 33**

Composé	n	n'	Rendement (%)
35a	12	1	81
35b	12	2	80

**Tableau III-9 : Couplage du module hydrophile avec le composé 33**

La stratégie de synthèse adoptée s'est révélée efficace, cependant une seule longueur de chaîne a été prise en compte pour le moment.

### **III.3.3. Conclusion sur la synthèse de peptidoamines tensioactives**

Ces différentes synthèses ont permis d'aboutir à des tensioactifs originaux, dérivés de peptidoamines. Ces produits possèdent donc des propriétés de surface et ont un pouvoir complexant vis-à-vis des métaux de transition.

La mise en œuvre des réactions est simple et les rendements obtenus sont satisfaisants.

Les premiers tensioactifs synthétisés se sont révélés relativement hydrophobe, il a fallu insérer un module polaire pour augmenter l'hydrophilie de ces composés. Les stratégies de synthèse employées ont permis de greffer le module hydrophile sans modifier les sites de complexation.

Nous allons à présent détailler les différentes mesures physicochimiques effectuées.

## III.4. ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE

### III.4.1. Propriétés des tensioactifs bimodulaires

Avant d'entreprendre toute étude sur le comportement tensioactif de ces nouvelles molécules ou de déterminer la nature des complexes qu'elles forment avec les cations métalliques, il est nécessaire de mesurer leur solubilité en solution aqueuse en fonction de plusieurs paramètres : la nature de la tête polaire, le pH et la longueur de la chaîne hydrophobe. En effet, les structures de ces tensioactifs représentées sur le **Schéma III-37** peuvent déjà nous indiquer que leur solubilité va dépendre fortement du pH puisque deux fonctions azotées sont présentes.

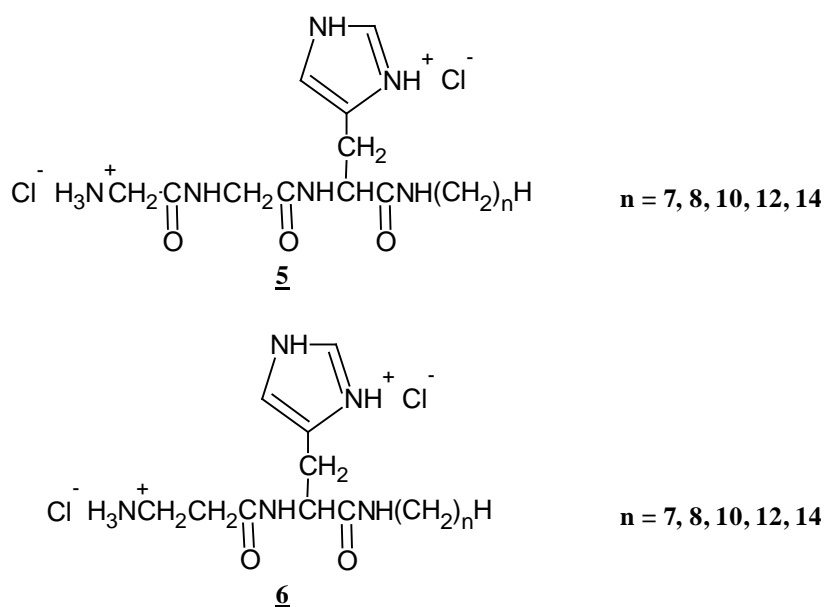


Schéma III-37 : Structure des tensioactifs bimodulaires

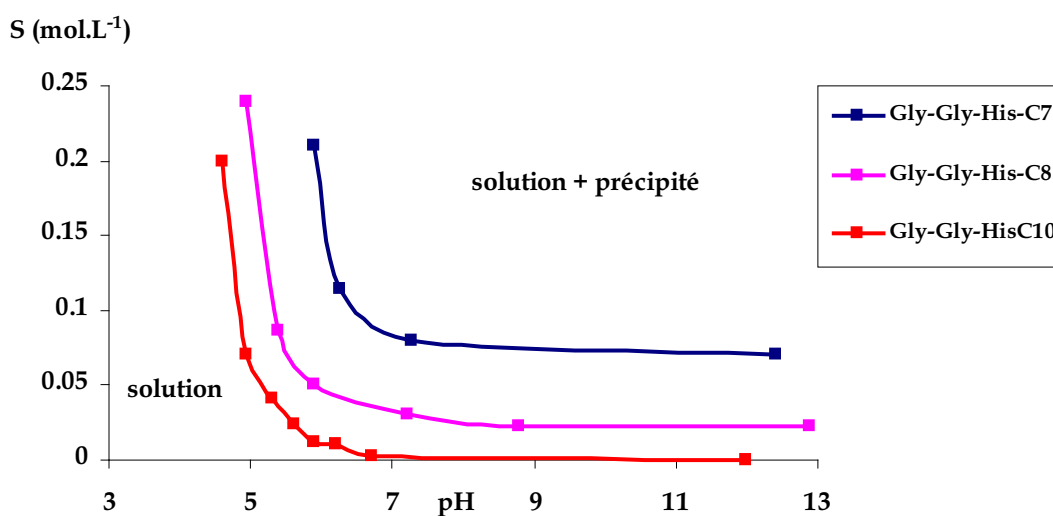
#### III.4.1.1. Évaluation de la solubilité des tensioactifs bimodulaires dans l'eau

Nous avons mesuré, dans une cellule thermostatée à 25°C, les solubilités dans l'eau des alkylamido-glycyl-glycyl-histidines (**5**) et des alkylamido-carnosines (**6**). La solubilité maximale est déterminée par ajout de soude à une solution de concentration connue jusqu'à obtenir une turbidité. Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode reliée à un pH-mètre. La solubilité est calculée à partir de la quantité initiale de produit, rapportée au volume de soude ajouté au volume de départ. On obtient les courbes représentées sur la **Figure III-2** et la

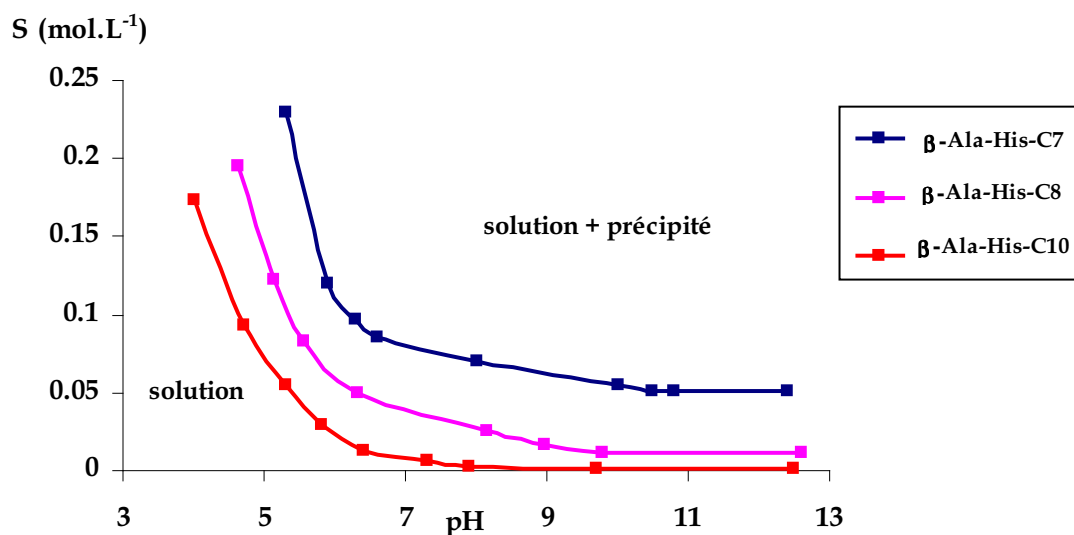
**Figure III-3** qui délimitent le domaine de solubilité de plusieurs composés. Il existe une incertitude sur chaque mesure, donc les points représentés donnent plutôt une tendance que des valeurs précises.

De façon générale, lorsque le pH augmente, la solubilité chute fortement pour atteindre un palier et reste constante jusqu'en milieu très basique.

À un pH donné, on observe de façon logique que la solubilité est d'autant plus faible que la queue hydrophobe est longue.

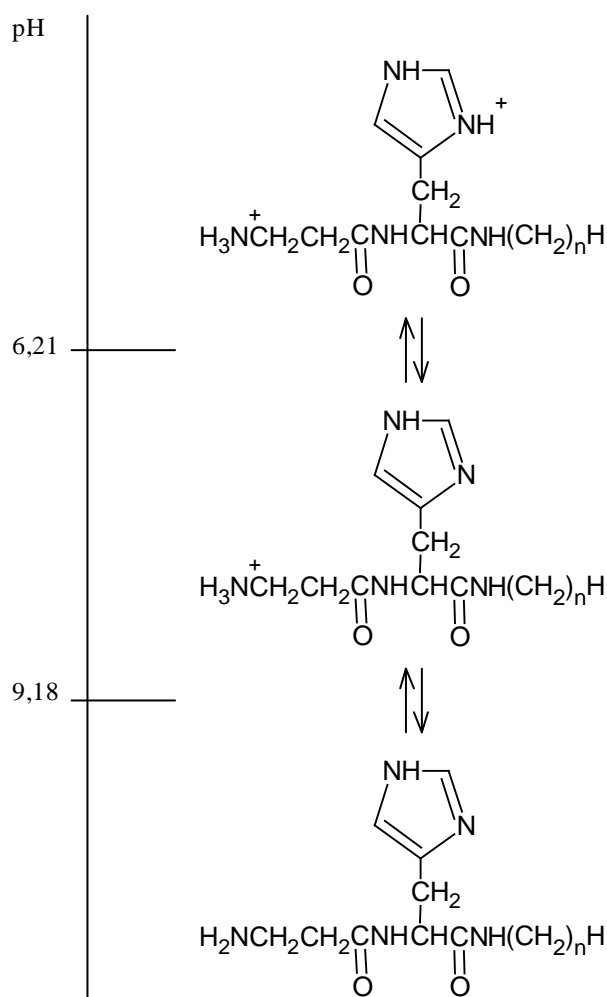


**Figure III-2 : Solubilité à 25°C en fonction du pH pour plusieurs chaînes des dérivés de la glycyl-glycyl-histidine**



**Figure III-3 : Solubilité à 25°C en fonction du pH pour plusieurs chaînes des dérivés de la β-Alanyl-histidine**

Il est impossible de déterminer les constantes d'acidité de ces tensioactifs car les bases conjuguées ne sont pas solubles dans l'eau. Nous avons donc déterminé les pKa de molécules modèles, c'est à dire des molécules analogues à chaîne courte Gly-Gly-His-C4 (pKa<sub>imidazole</sub> = 6,23 et pKa<sub>amino</sub> = 7,79) et β-Ala-His-C4 (pKa<sub>imidazole</sub> = 6,21 et pKa<sub>amino</sub> = 9,18) (page 133). Ces valeurs servent uniquement de références, mais en supposant que ces constantes d'acidité sont du même ordre que celles des dérivés tensioactifs, on peut expliquer par ce biais la chute de la solubilité. L'augmentation du pH provoque les déprotonations successives du cycle imidazole et de l'amine terminale. La tête polaire peptidique n'étant plus chargée, la molécule devient hydrophobe et le produit précipite. Lorsque l'on continue à augmenter le pH, la solubilité reste constante car il n'y a pas de déprotonation supplémentaire qui pourrait faire apparaître une charge négative (**Schéma III-38**).



**Schéma III-38 : Diagramme de prédominance des espèces pour β-Ala-His-C4**

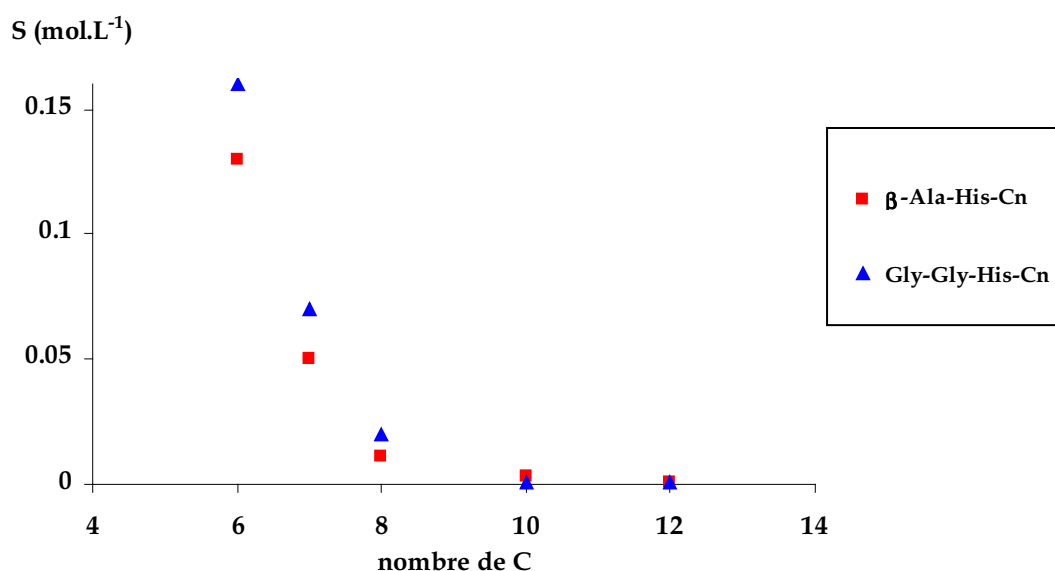
La solubilité des dérivés Gly-Gly-His-Cn est plus sensible au pH que celle des analogues  $\beta$ -Ala-His-Cn. En effet, pour une même variation de pH, on observe une diminution plus importante de la solubilité des dérivés tripeptidiques. La plus faible valeur de pKa pour l'amine de Gly-Gly-His-C4 explique que ces composés se retrouvent neutres à pH plus bas.

Le **Tableau III-10** et la courbe représentée sur la **Figure III-4** montrent qu'une fraction des molécules déprotonées est tout de même soluble. En effet, les solubilités de ces produits ne sont pas nulles, même à pH élevé.

En milieu basique, pour une même chaîne grasse, les dérivés Gly-Gly-His-Cn sont un peu plus solubles que les dérivés  $\beta$ -Ala-His-Cn car la liaison peptidique supplémentaire du tripeptide accroît son hydrophilie.

n	6	7	8	10	12
$\beta$ -Ala-His-Cn	0,130	0,05	0,01	$1.10^{-3}$	$\approx 1.10^{-4}$
Gly-Gly-His-Cn	0,160	0,07	0,02	$2.10^{-3}$	$\approx 1.10^{-4}$

**Tableau III-10 : Solubilités ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) à  $25^\circ\text{C}$  et à  $\text{pH} > 10$  des composés  $\beta$ -Ala-His-Cn et Gly-Gly-His-Cn en fonction du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne grasse**



**Figure III-4 : Solubilités à  $25^\circ\text{C}$  et à  $\text{pH} > 10$  des composés  $\beta$ -Ala-His-Cn et Gly-Gly-His-Cn en fonction du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne grasse**

Lorsque l'on augmente la température, on observe la dissolution des précipités entre 40 et 50°C pour les différents produits. Ceci laisse supposer la possibilité d'un point de Krafft.

Les deux types de pseudo-peptides synthétisés ne sont pas suffisamment solubles en milieu basique ou neutre pour permettre une étude correcte de leurs propriétés tensioactives. Pour les mêmes raisons, les complexes que ces composés forment en solution ont tendance à précipiter (page 131). Par contre, la solubilité dans l'eau est très élevée en milieu acide (jusqu'à 80% en tensioactif à 25°C (page 127). Nous pouvons donc étudier le comportement tensioactif de ces composés en fixant le pH des solutions à 2. Ce pH est facilement ajustable avec de l'acide chlorhydrique  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>, et au vu des pKa, toutes les molécules seront doublement protonées quelque soit la dilution. Nous pourrons ainsi établir des comparaisons entre les différents produits.

### **III.4.1.2. Comportement en solution des tensioactifs bimodulaires**

Pour décrire le caractère tensioactif d'une molécule, il faut dans un premier temps déterminer sa concentration micellaire critique (cmc), c'est à dire la concentration à partir de laquelle les molécules s'agrègent en micelles (page 67). Nous avons déterminé les cmc des tensioactifs à tête polaire Gly-Gly-His et  $\beta$ -Ala-His à l'aide de deux méthodes : la tensiométrie et la spectroscopie de fluorescence

L'utilisation de la spectrofluorimétrie nous a permis de confirmer les valeurs de cmc obtenues par tensiométrie mais aussi d'effectuer une comparaison entre les deux méthodes.

#### *III.4.1.2.1. Tensiométrie*

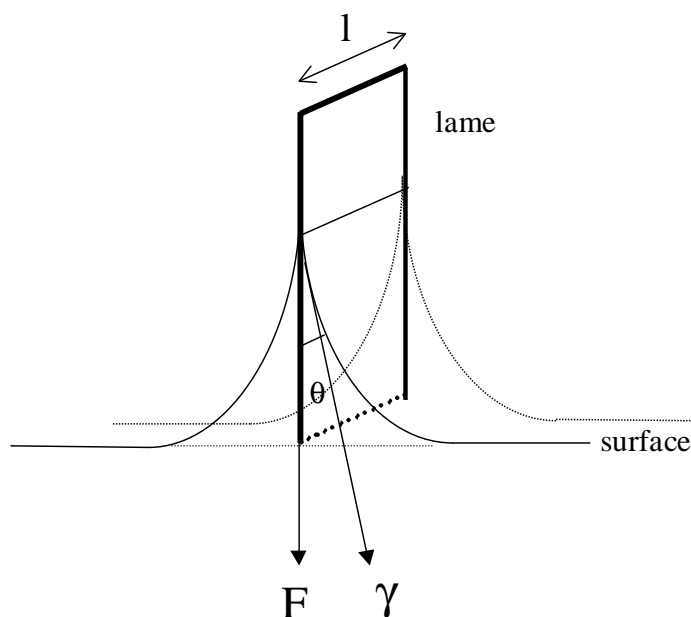
##### *1) Principe*

Cette technique permet de déterminer la cmc par mesure de la tension superficielle  $\gamma$ . Nous avons utilisé la méthode de la lame de Wilhelmy<sup>(82)</sup>.

Le dispositif est constitué d'une lame de platine dépolie suspendue à une balance électromagnétique. Elle est plongée dans la solution puis remontée jusqu'à ce que le bord inférieur affleure la surface et provoque la formation d'un ménisque.

A ce moment, la force mesurée par la balance pour compenser le poids du ménisque est :

**$F = 2.l.\gamma.\cos\theta$  (Figure III-5).**



**Figure III-5 : Illustration de la méthode de la lame de Wilhelmy**

L'équation précédente pour la détermination de la tension superficielle ne peut être utilisée en réalité que si  $\theta$  est nul, car on ne peut pas le mesurer, le mouillage de la lame doit donc être total. On a alors  $\gamma = F/(2.l)$ .

Gibbs a étudié les variations de tension superficielle causée par des faibles ajouts de tensioactifs <sup>(83)</sup>. Il a établi une relation à partir de l'expression de l'énergie libre de surface qui, après simplification, conduit à l'Équation 12.

$$A.d\gamma + \sum_i n_i.d\mu_i = 0 \quad \text{Équation 12}$$

avec **A** : aire de la surface

**n<sub>i</sub>** : nombre de moles de l'espèce *i* à la surface

**μ<sub>i</sub> = μ<sub>i</sub><sup>0</sup> + 2,303.R.T.log C** : potentiel chimique de l'espèce *i*

**γ** : tension superficielle

L'équation de Gibbs (Équation 13) permet de relier la quantité de tensioactif adsorbé à la surface et l'effet produit sur la tension superficielle.

$$\frac{d\gamma}{d \log C} = -2,303.R.T.\Gamma_2 \quad \text{Équation 13}$$



avec  $C$  : concentration totale en tensioactif

$R$  : constante des gaz parfaits =  $8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

$T$  : température en Kelvin

$\Gamma_2 = n_2/A$  : concentration d'excès de surface du tensioactif

(2 désigne le soluté tensioactif)

Cette relation démontre que l'augmentation de la concentration en tensioactifs provoque une saturation progressive de la surface. Ceci se traduit par un abaissement linéaire de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration.

Selon que le tensioactif soit ionique ou non, il faut ajouter un facteur  $(z+1)$  dans le membre de droite de l'équation de Gibbs,  $z$  étant égal à la charge du tensioactif.

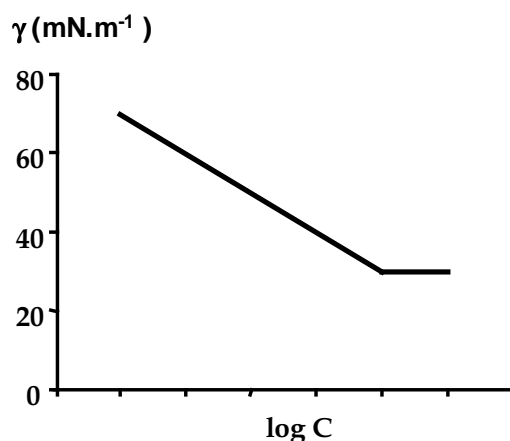
Lorsque le tensioactif est non-ionique,  $z = 0$  et on retrouve l'**Équation 13**.

Lorsque le tensioactif porte une charge,  $z = 1$  et il faut ajouter un facteur 2 et ainsi de suite.

Ceci vient du fait que lorsqu'un tensioactif est ionique, il est accompagné d'un ou plusieurs contre-ions dont il faut tenir compte dans l'**Équation 12**.

L'inverse de la concentration d'excès de surface  $\Gamma_2$  est égal à la surface occupée par une mole de tensioactif. On en déduit ainsi la surface par tête polaire ( $\sigma$ ) en divisant par le nombre d'Avogadro  $\mathcal{N}$ .

Les variations de la tension superficielle d'une solution aqueuse de tensioactif obéissent à l'équation de Gibbs jusqu'à la concentration micellaire critique. Au delà de cette concentration, il y a une rupture de pente (**Figure III-6**).



**Figure III-6 : Représentation d'une courbe de tensiométrie  $\gamma = f(\log C)$**

## 2) Conditions expérimentales

Le système est thermostaté par un circuit d'eau à 25°C et le tensiomètre K1 OST est connecté à un ordinateur via une interface numérique qui permet de mesurer la tension superficielle en fonction du temps. La valeur est prise en compte une fois la stabilité de la mesure obtenue.

Les résultats sont corrects et reproductibles uniquement si la lame et la verrerie sont propres, une solution d'acide sulfochromique est utilisée pour nettoyer ces éléments. Malgré cela, il n'est pas toujours facile d'obtenir des résultats parfaits surtout avec des tensioactifs non commerciaux car le produit à étudier ne doit contenir aucune impureté. De plus cette méthode nécessite un grand nombre de mesures qui peuvent durer jusqu'à une heure, l'obtention d'une courbe complète prend plusieurs jours.

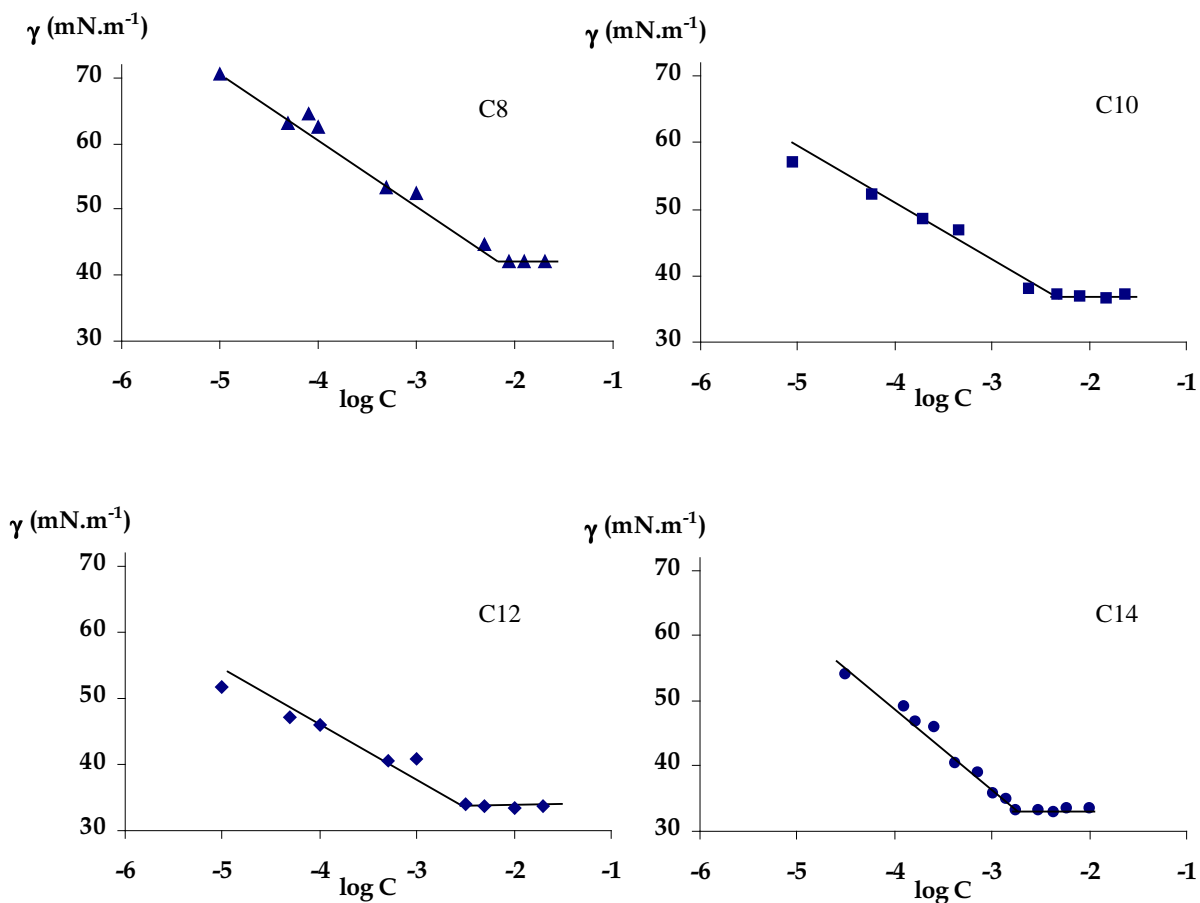
## 3) Détermination des cmc par tensiométrie

Les dilutions ont été réalisées à l'aide d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> pour fixer le pH à 2.

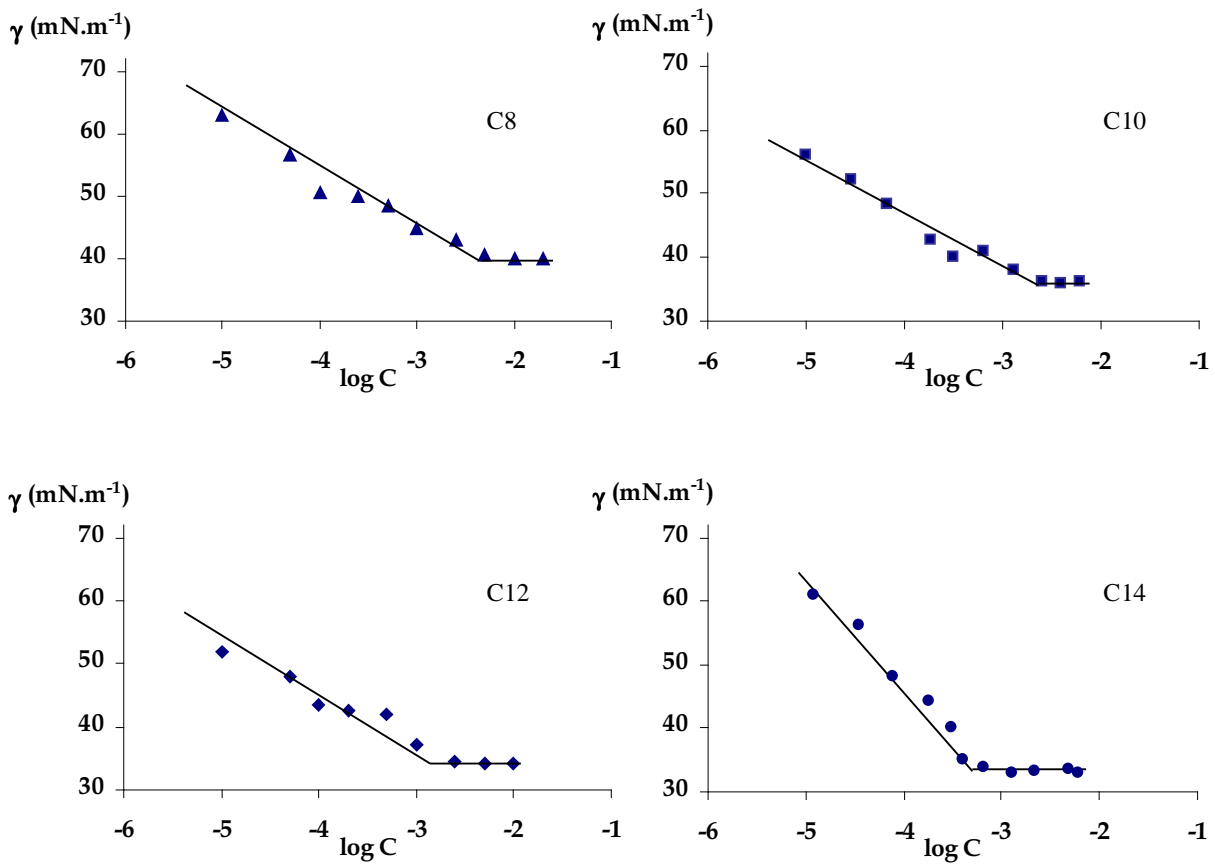
L'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration a été déterminée pour les deux types de pseudo-peptides (Gly-Gly-His et  $\beta$ -Ala-His) et avec différentes longueurs de chaîne : 8, 10, 12 et 14 atomes de carbone.

Les courbes sont représentées sur la **Figure III-7** et la **Figure III-8**. Les surfaces par tête polaire  $\sigma$  ont été calculées à partir de la loi de Gibbs. Comme les tensioactifs étudiés possèdent deux charges positives et donc deux contre-ions chlorure, il a fallu introduire un facteur 3 (**Équation 14**). Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau III-11**.

$$\sigma = \frac{-2,303.R.T.3}{\frac{d \gamma}{d \log C}} \mathcal{N} \quad \text{Équation 14}$$



**Figure III-7 : Courbes de tensiométrie  $\gamma = f(\log C)$  pour les dérivés du type Gly-Gly-His-Cn à pH = 2**



**Figure III-8 : Courbes de tensiométrie  $\gamma = f(\log C)$  pour les dérivés du type  $\beta$ -Ala-His-Cn à pH = 2**

composé	$\gamma$ (cmc) mN.m <sup>-1</sup>	cmc (mol.L <sup>-1</sup> )	A (Å <sup>2</sup> )
Gly-Gly-His-C8	42	8,1.10 <sup>-3</sup>	280
Gly-Gly-His-C10	37	6,0.10 <sup>-3</sup>	310
Gly-Gly-His-C12	34	3,0.10 <sup>-3</sup>	316
Gly-Gly-His-C14	33	1,1.10 <sup>-3</sup>	150
$\beta$ -Ala-His-C8	40	3,4.10 <sup>-3</sup>	300
$\beta$ -Ala-His-C10	36	2,5.10 <sup>-3</sup>	333
$\beta$ -Ala-His-C12	34	1,1.10 <sup>-3</sup>	322
$\beta$ -Ala-His-C14	33	4,4.10 <sup>-4</sup>	158

**Tableau III-11 : Concentrations micellaires critiques et valeurs de la tension superficielle à ces concentrations à 25°C et à pH = 2 pour les dérivés  $\beta$ -Ala-His-Cn et Gly-Gly-His-Cn**

Les composés étudiés ont un comportement de tensioactifs hydrogénés classiques, les mesures de tension superficielle à la cmc indiquent des abaissements par rapport à l'eau (72 mN.m<sup>-1</sup>). L'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle entraîne une diminution de la tension superficielle à la cmc jusqu'à 33 mNm<sup>-1</sup> pour les tensioactifs les plus hydrophobes.

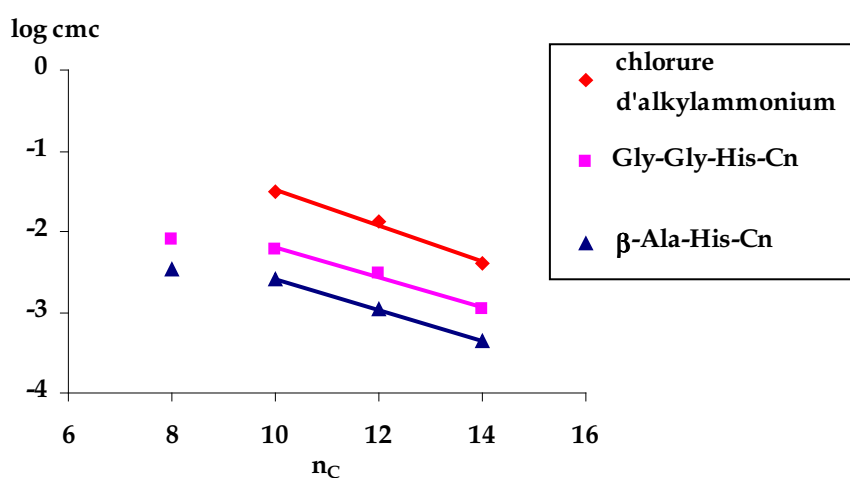
Les surfaces par tête polaire sont du même ordre de grandeur pour les composés C8, C10 et C12 mais sont plus faibles pour les composés C14. L'effet hydrophobe se fait plus sentir à partir de 14 atomes de carbone et la surface par tête polaire dans ce cas est nettement diminuée.

Par ailleurs, si l'on compare les surfaces par tête polaire en fonction de la nature de la partie peptidique, on s'aperçoit qu'à longueur de chaîne équivalente, le tripeptide occupe la même place que le dipeptide. Ceci sous-entend un repliement du tripeptide sur lui même.

On peut remarquer que la cmc d'un dérivé de  $\beta$ -alanyl-histidine est en moyenne 2,5 fois plus petite que celle d'un dérivé tripeptidique pour une même longueur de chaîne. Cette diminution correspond au fait qu'un motif  $\beta$ -alanine est plus hydrophobe qu'un motif glycyglycine .

Si nous analysons plus en détail l'effet de la longueur de chaîne sur la cmc, nous constatons que l'addition de deux groupements méthylènes entraîne une diminution linéaire du logarithme de la cmc à partir de 10 atomes de carbone. Pour les dérivés à 8 atomes de carbone, on est à la limite de la micellisation.

En portant  $\log \text{cmc}$  en fonction du nombre d'atome de carbone dans la chaîne grasse ( $n_C$ ), on obtient une droite pour les deux types de peptide (**Figure III-9**). Les deux droites sont parallèles entre elles et le sont également à la droite obtenue avec les chlorures d'alkylammonium ( $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ ). Les cmc des dérivés C10, C12 et C14 de ces tensioactifs cationiques sont respectivement de  $3,2 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,3 \cdot 10^{-2}$  et  $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (84, 85).



**Figure III-9 : Effet du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne grasse sur la valeur de la concentration micellaire critique**

La relation entre la cmc et le nombre d'atome de carbone dans la chaîne grasse est du type :

$$\log \text{cmc} = A n_C + B$$

avec  $A = -0,22$  et  $B = 0,75$  pour les chlorures d'alkylammonium

$A = -0,18$  et  $B = -0,36$  pour Gly-Gly-His-Cn

$A = -0,19$  et  $B = -0,71$  pour  $\beta$ -Ala-His-Cn

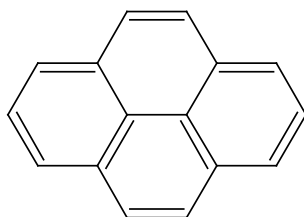
Les coefficients directeurs des droites ( $A$ ) sont quasiment identiques, ce qui indique que les alkylamidopeptides ont un comportement classique de tensioactifs cationiques de type sel d'ammonium.

L'ordonnée à l'origine ( $B$ ) est caractéristique de la HLB de la molécule, les alkylamidopeptides sont plus hydrophobes que les sels d'amines grasses. Le greffage d'un peptide apporte de l'hydrophobie.

### III.4.1.2.2. Spectroscopie de fluorescence

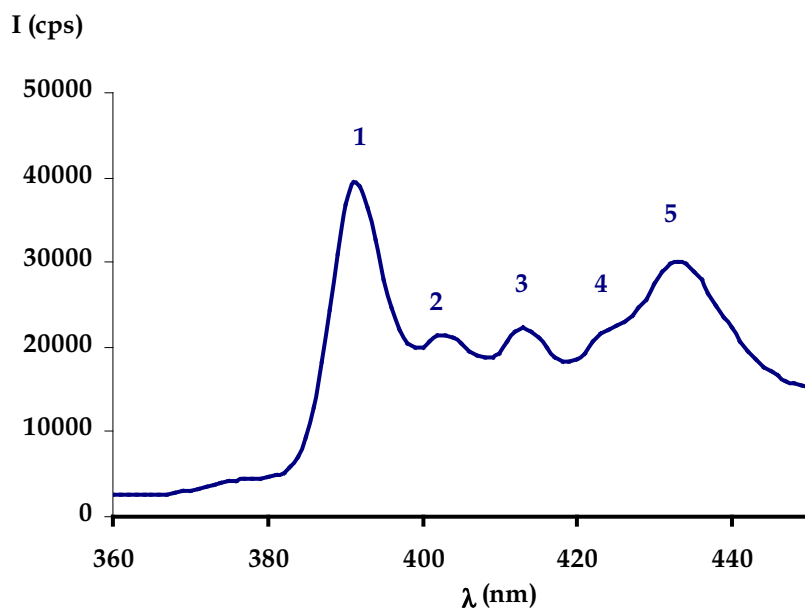
#### 1) Utilisation

Il existe d'autres méthodes pour mesurer la cmc, on peut citer la conductimétrie <sup>(86)</sup> ou la diffusion de lumière <sup>(87)</sup>. Parmi ces techniques, la spectroscopie de fluorescence fait partie des plus populaire depuis une dizaine d'années. Cette méthode implique l'utilisation d'une sonde hydrophobe, dont les caractéristiques de fluorescence dépendent du milieu dans lequel elle est solubilisée. Par exemple, le pyrène (**Figure III-10**) est une sonde fluorescente sensible à la polarité de son environnement. Dans le cas d'une solution micellaire, les molécules de pyrène ont tendance à s'introduire dans le cœur des micelles qui offrent un milieu hydrophobe. Les caractéristiques de fluorescence de la sonde deviennent alors différentes de celles rencontrées dans l'eau.



**Figure III-10 : Structure du pyrène**

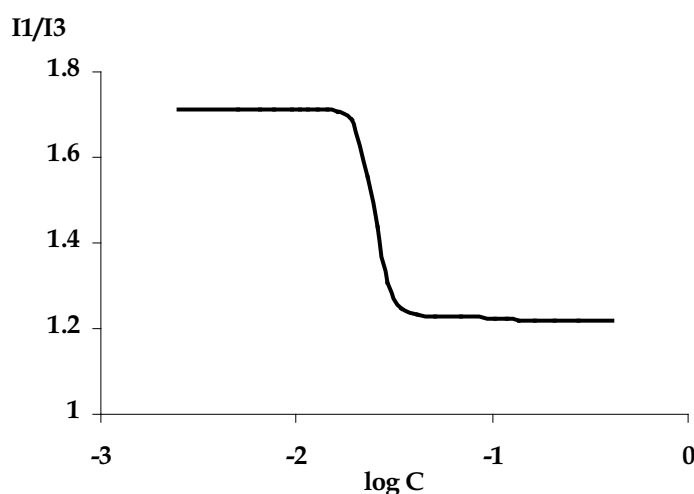
Le spectre de fluorescence du pyrène représenté **Figure III-11** possède 5 pics. Il a été montré que le rapport des intensités du premier pic ( $I_1$  à 373 nm) et du troisième ( $I_3$  à 384 nm) est sensible à la polarité de l'environnement de la sonde <sup>(88)</sup>.



**Figure III-11 : Spectre d'émission de fluorescence du pyrène ( $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ )**

Dans la littérature, on trouve de nombreuses courbes représentant l'évolution du rapport  $I_1/I_3$  en fonction du logarithme de la concentration en tensioactif. Habituellement, les courbes ont une allure caractéristique représentée sur la **Figure III-12**.

Lorsque la concentration augmente, le rapport  $I_1/I_3$  reste égal à celui mesuré en absence de tensioactif (pyrène dans l'eau), puis on observe une chute à partir d'une certaine concentration, ce qui pourrait indiquer une solubilisation de la sonde dans un milieu plus hydrophobe que l'eau, c'est à dire les micelles <sup>(89)</sup>, la diminution se termine par un nouveau plateau aux concentrations les plus élevées.



**Figure III-12 : Variation du rapport  $I_1/I_3$  du pyrène en fonction de la concentration en tensioactif**



Il y a donc deux points d'inflexion sur cette courbe. Intuitivement, on peut penser que la cmc correspond au premier de ces deux points, c'est à dire celui dont la concentration est la plus faible. Différents exemples relevés dans la littérature montrent qu'il y a une controverse à ce sujet et en particulier pour la détermination de la cmc. Dans certains cas, elle correspond à la concentration à la limite de diminution du rapport  $I_1/I_3$ , c'est à dire au premier point <sup>(89, 90)</sup> et dans d'autres cas, au deuxième point <sup>(91, 92)</sup>. En général, les auteurs justifient leur choix par comparaison avec les valeurs obtenues par d'autres techniques, bien souvent la tensiométrie, et ne proposent donc pas d'explication.

Le modèle envisagé dans notre cas correspond à celui où la cmc est prise au premier point d'inflexion :

Il faut considérer un équilibre chimique entre les molécules de pyrène et les micelles.

Si on fait l'hypothèse que l'entrée d'une sonde de pyrène dans une micelle se fasse par l'association d'une sonde avec une molécule de tensioactif, on obtient la réaction ci-dessous qui se caractérise par une constante d'équilibre  $K_{mic}$  :



$$K_{mic} = [\text{PyrMic}] / ([\text{PyrEau}] \cdot [\text{Mic}])$$

avec **[PyrEau]** : concentration en pyrène dans l'eau

**[Mic]** : concentration en tensioactif engagé dans une micelle

**[PyrMic]** : concentration en pyrène associé à un tensioactif engagé dans une micelle

La cmc est la concentration à partir de laquelle les tensioactifs s'agrègent en micelles, donc la concentration totale C en tensioactifs est égale à la somme des concentrations en tensioactifs seuls et en tensioactifs engagés dans des micelles.

$$C = [\text{Mic}] + \text{cmc}$$

$$\text{D'où } [\text{Mic}] = C - \text{cmc}$$

$$\text{et } [\text{PyrMic}] = K_{mic} \cdot [\text{PyrEau}] \cdot (C - \text{cmc})$$

On peut calculer  $x(\text{PyrEau})$  et  $x(\text{PyrMic})$ , respectivement les fractions molaires de pyrène dans l'eau et dans les micelles et on obtient :

$$x(\text{PyrEau}) = [\text{PyrEau}] / ([\text{PyrEau}] + [\text{PyrMic}]) = 1 / (1 + K_{\text{mic}} (C - \text{cmc}))$$

et comme la somme des fractions molaire est égale à 1 :

$$x(\text{PyrMic}) = K_{\text{mic}} (C - \text{cmc}) / (1 + K_{\text{mic}} (C - \text{cmc}))$$

À partir de ces 2 équations, on peut exprimer le rapport  $I_1/I_3$  en fonction de la concentration totale en tensioactifs. En effet, on peut voir que le rapport est constant aux concentrations extrêmes.

Le rapport  $I_1/I_3$  a une valeur fixe avant la formation des micelles car toutes les molécules de pyrène sont dans l'eau. Il a une autre valeur fixe bien après la cmc, lorsque toutes les sondes de pyrène sont dans les micelles.

Ainsi, à chaque concentration, le rapport  $I_1/I_3$  est égal à la moyenne de ces 2 valeurs limites, pondérée par les fractions molaires de pyrène dans l'eau et dans les micelles.

$$I_1/I_3 = x(\text{PyrEau}) \cdot I_1/I_{3 \text{ Eau}} + x(\text{PyrMic}) \cdot I_1/I_{3 \text{ Mic}}$$

avec  $I_1/I_{3 \text{ Eau}}$  : valeur du rapport  $I_1/I_3$  lorsque toutes les sondes sont dans l'eau

$I_1/I_{3 \text{ Mic}}$  : valeur du rapport  $I_1/I_3$  lorsque toutes les sondes sont dans les micelles

À l'aide de deux lignes de programme, on peut retranscrire ce modèle :

Avant la cmc, le rapport est égal à  $I_1/I_{3 \text{ Eau}}$  et à partir de la cmc, il est égal à la moyenne pondérée écrite ci-dessus.

Avec un solveur, on peut ajuster parfaitement les points expérimentaux en faisant varier  $K_{\text{mic}}$ , cmc,  $I_1/I_{3 \text{ Eau}}$  et  $I_1/I_{3 \text{ Mic}}$ .

Ce modèle a été testé avec succès avec des amines grasses. Il confirme que la cmc se trouve bien au premier point d'inflexion et permet de la déterminer précisément

Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide que la tensiométrie car l'enregistrement d'un spectre ne dure que quelques minutes. Par contre même si l'obtention d'une courbe complète ne dure que quelques heures, elle apporte moins d'informations qu'une courbe de tensiométrie. L'autre inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite l'adjonction d'une sonde fluorescente dans les solutions de tensioactif.

## 2) Conditions expérimentales

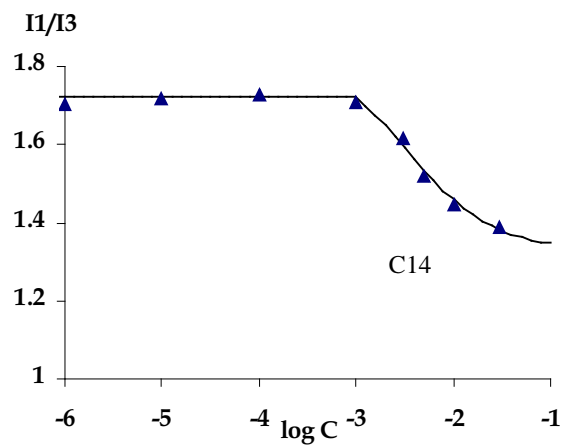
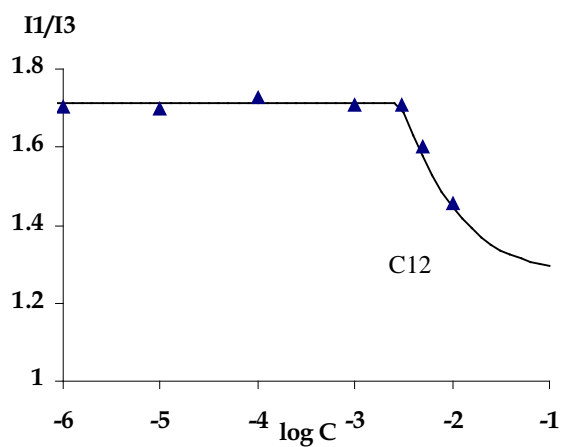
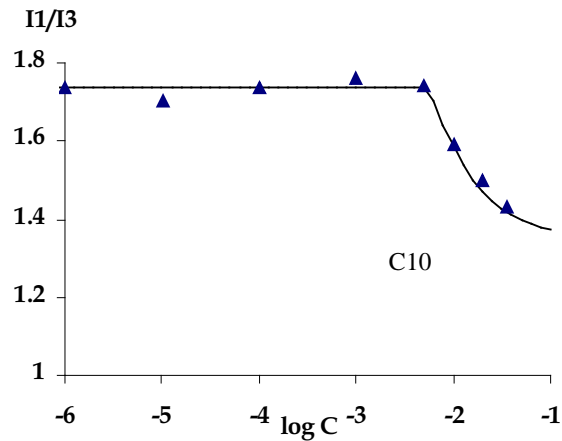
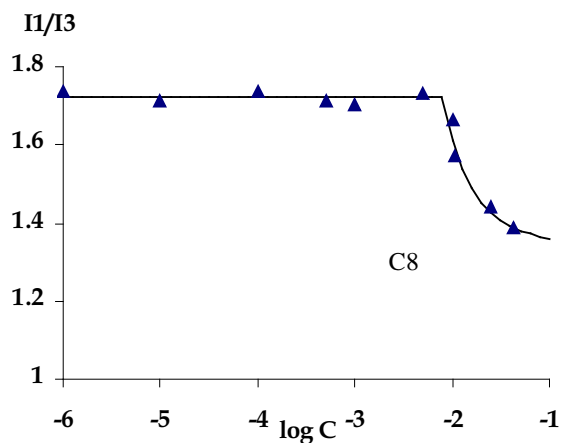
Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à température ambiante sur un Fluorolog Jobin Yvon en utilisant des cellules en polystyrène à usage unique (longueur d'excitation : 332 nm).

Les conditions de mesure sont les mêmes que celles utilisées en tensiométrie. Les dilutions sont réalisées avec une solution d'acide chlorhydrique contenant la sonde fluorescente, pour fixer le pH à 2.

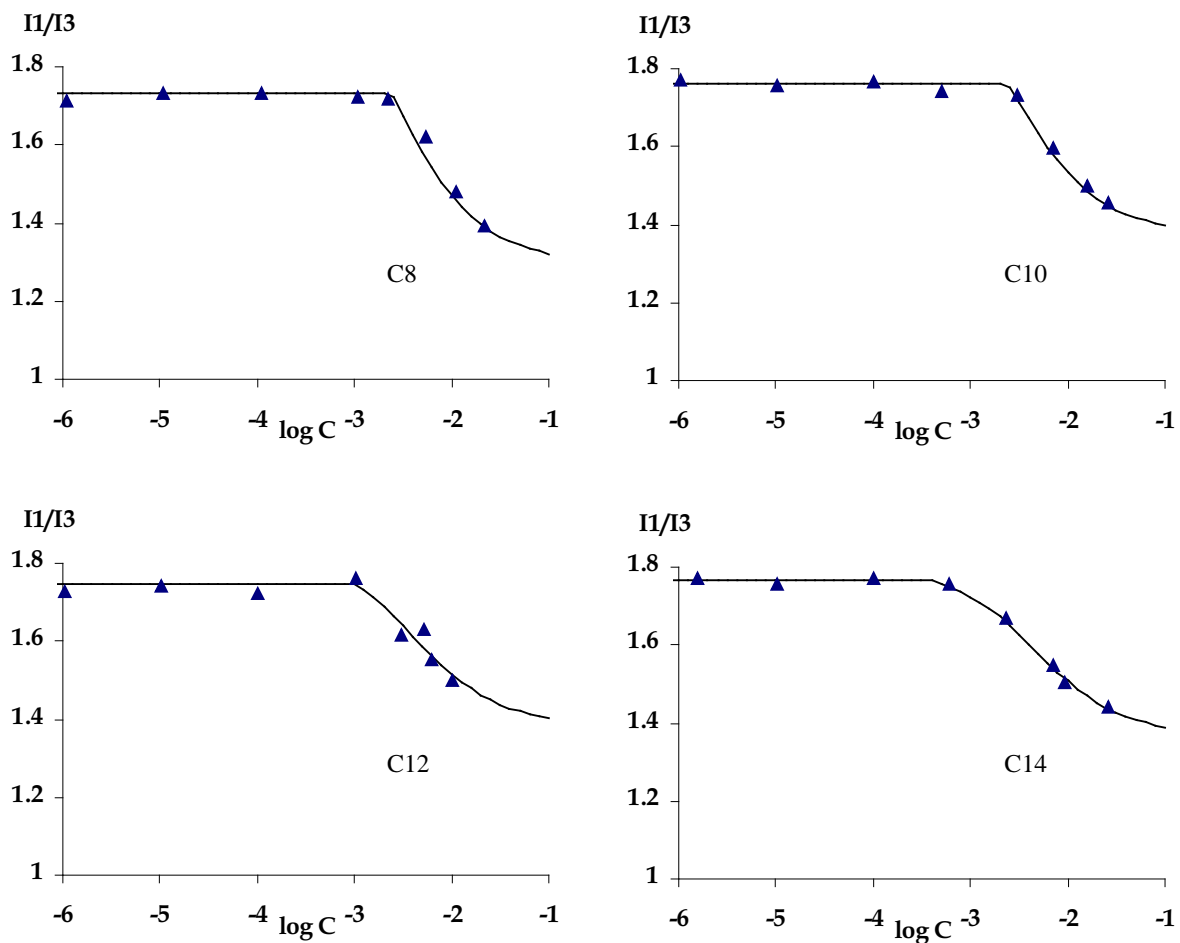
La solution mère de pyrène est préparée à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, dans l'éthanol pur. Puis elle est diluée au 1/1000 avec une quantité suffisante d'HCl pour arriver à des concentrations respectives en acide chlorhydrique et en pyrène de  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> et  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. La concentration en pyrène est très faible afin d'éviter une quelconque influence sur la valeur de la cmc. Ceci n'est pas gênant car la spectroscopie de fluorescence est une méthode très sensible.

## 3) Détermination des cmc par spectrofluorimétrie

Les courbes sont représentées sur la **Figure III-13** et la **Figure III-14**. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau III-12** comparés à ceux obtenus par tensiométrie. Les points bleus représentent les mesures expérimentales et les courbes continues noires indiquent les variations du rapport  $I_1/I_3$  du pyrène par ajustement des points expérimentaux, selon le modèle décrit précédemment.



**Figure III-13 : Changement des caractéristiques de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en tensioactif pour les dérivés du type Gly-Gly-His-Cn à pH = 2**



**Figure III-14 : Changement des caractéristiques de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en tensioactif pour les dérivés du type  $\beta$ -Ala-His-Cn à pH = 2**

composé	cmc (mol.L <sup>-1</sup> )	
	fluorimétrie	tensiométrie
Gly-Gly-His-C8	7,8.10 <sup>-3</sup>	8,1.10 <sup>-3</sup>
Gly-Gly-His-C10	5,7.10 <sup>-3</sup>	6,0.10 <sup>-3</sup>
Gly-Gly-His-C12	2,9.10 <sup>-3</sup>	3,0.10 <sup>-3</sup>
Gly-Gly-His-C14	1,0.10 <sup>-3</sup>	1,1.10 <sup>-3</sup>
β-Ala-His-C8	3,2.10 <sup>-3</sup>	3,4.10 <sup>-3</sup>
β-Ala-His-C10	2,4.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-3</sup>
β-Ala-His-C12	1,0.10 <sup>-3</sup>	1,1.10 <sup>-3</sup>
β-Ala-His-C14	4,2.10 <sup>-4</sup>	4,4.10 <sup>-4</sup>

**Tableau III-12 : Concentrations micellaires critiques déterminées par deux méthodes à 25°C et à pH = 2 pour les dérivés β-Ala-His-Cn et Gly-Gly-His-Cn**

La comparaison des deux méthodes montre que les valeurs de cmc obtenues par fluorimétrie sont très proches de celles obtenues par tensiométrie mais généralement un peu plus faibles. On retrouve cette légère différence pour des tensioactifs ioniques ou non ioniques relevés dans la littérature <sup>(89)</sup>. Ceci peut s'expliquer par une pré-agrégation des tensioactifs intervenant avant la formation de micelles.

### III.4.1.3. Diagrammes de phase binaires : tensioactifs bimodulaires - eau

#### III.4.1.3.1. Généralités

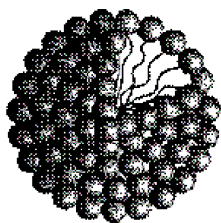
Nous avons étudié ci-dessus le comportement des tensioactifs bimodulaires en phase aqueuse très diluée, c'est à dire avec une teneur en eau supérieure à 99%. Les propriétés tensioactives de ces produits en milieu acide ont été démontrées à 25°C.

Nous allons considérer à présent des concentrations plus élevées en tensioactif jusqu'à 100%.

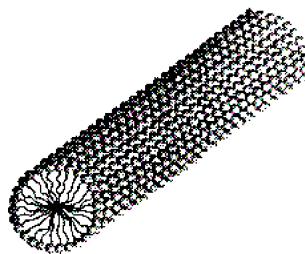
De manière générale, à partir de la cmc, les tensioactifs forment des agrégats qui correspondent le plus souvent à des micelles (**Figure III-15**). Au fur et à mesure que la concentration augmente, d'autres organisations appelées cristaux liquides peuvent apparaître. Les micelles sont des organisations à courte distance alors que les cristaux liquides sont des organisations dites à longue distance. Toutes ces structures sont thermodynamiquement stables.

### *Les phase micellaires*

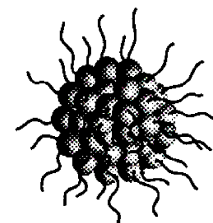
Ces phases sont notées L avec un indice de 1 à 3, elles sont fluides et isotropes. Selon la polarité du solvant, on parle de micelles directes  $L_1$  (dans un solvant polaire, tel que l'eau) ou de micelles inverses  $L_2$  (dans un solvant apolaire, tel que l'huile). Les micelles peuvent être sphériques ou cylindriques lorsque la concentration en tensioactif augmente. On peut également rencontrer des micelles inverse dans l'eau pour des compositions très riches en tensioactifs. La phase  $L_3$  est dit phase éponge, elle n'est pas constituée d'agrégats fermés mais d'une structure bicontinue repliée dans l'espace, formée par des bicouches, et séparant deux domaines de solvant équivalents (**Figure III-16**)



micelle sphérique directe

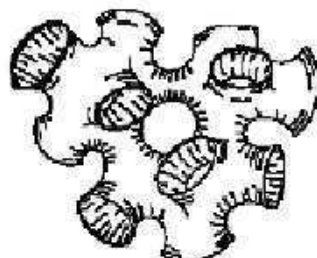


micelle cylindrique directe



micelle sphérique inverse

**Figure III-15 : Structures schématiques de différentes micelles** <sup>(74)</sup>



**Figure III-16 : Structure schématique de la phase  $L_3$**

### *Les cristaux liquides*

L'état de la matière appelé cristal liquide ou état mésomorphe possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un cristal solide et celles d'un liquide. Les phases de cristaux liquides possèdent à la fois un caractère cristallin et les propriétés d'un liquide à l'échelle moléculaire. Il existe trois grandes catégories de cristaux liquides (**Figure III-17**) :

#### - *Les phases hexagonales*

Elles sont caractérisées par une anisotropie optique et une texture spécifique au microscope avec polariseurs croisés. Les phases hexagonales sont constituées de cylindres de longueur infinie disposés aux nœuds d'un réseau hexagonal bidimensionnel. Il en existe deux types, la phase hexagonale directe  $H_1$  où les molécules de tensioactif sont orientés de façon à disposer leur tête polaire vers l'extérieur des cylindres et la phase inverse  $H_2$  où les têtes polaires sont dirigées vers l'intérieur des tubes. On peut la mettre en évidence par diffraction de rayons X aux petits angles. Les diagrammes de diffraction de ces phases contiennent une série de raies dont les espacements de bragg sont dans les rapports :

$$1 ; 1/\sqrt{3} ; 1/\sqrt{4} ; 1/\sqrt{7}$$

#### - *La phase lamellaire*

Cette phase est notée  $L\alpha$ , elle est composée d'un empilement de lamelles séparées par une épaisseur d'eau. Chaque lamelle est formée de deux plans infinis de tensioactifs appelés bicouches. Celles-ci définissent un plan périodique régulier qui permet une caractérisation par diffraction de rayons X aux petits angles. Le diagramme de diffraction d'une phase lamellaire contient une série de raies dont les espacements de bragg sont dans les rapports :

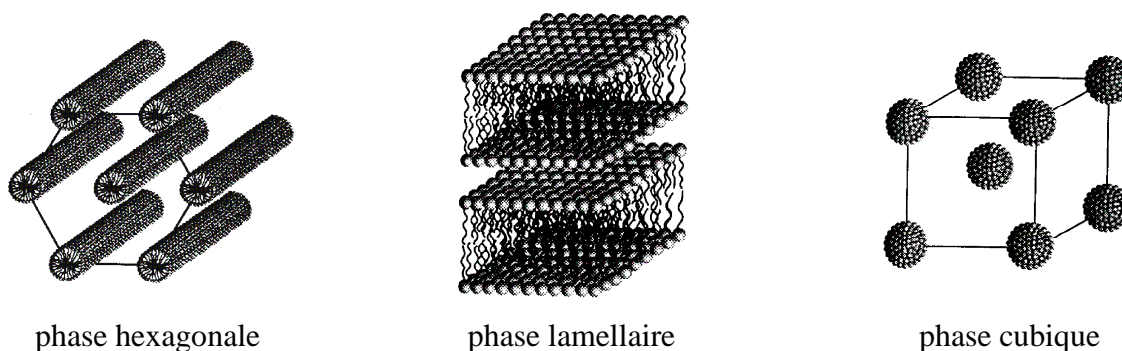
$$1 ; 1/2 ; 1/3 ; 1/4$$



La phase lamellaire peut conduire après sonication à une phase constituée de bicouches refermées sur elles-mêmes (vésicules), partageant l'espace en deux milieux de nature identique.

- *Les phases cubiques.*

Ces phases sont optiquement isotropes et se caractérisent par une très grande viscosité. Elles peuvent être identifiées par diffraction de rayons X aux petits angles. De nombreux groupes d'espace ont été mis en évidence. Il existe deux types de phases cubiques, des phases micellaires et des phases bicontinues. Les premières sont formées de micelles organisées dans une maille cubique, alors que les autres sont constituées de canaux de tensioactifs enchevêtrés avec une symétrie cubique.



**Figure III-17 : Structures schématiques de différentes organisations à longue distance**

*III.4.1.3.2. Principe et conditions expérimentales*

Le diagramme de phase binaire d'un tensioactif est une représentation graphique à deux dimensions qui permet de connaître l'organisation des molécules en fonction de deux variables, la température et la teneur en tensioactif.

La méthode pour établir ces diagrammes consiste à préparer des solutions de tensioactifs dans l'eau à différentes concentrations allant de 0 à 100% en masse de tensioactif. On suit l'évolution des préparations en fonction de la température en plaçant les échantillons dans un bain d'eau thermostatée. On laisse la température se stabiliser à l'intérieur des fioles en attendant de 20 à 30 minutes avant de faire un prélèvement. Plusieurs températures sont étudiées pour chaque concentration. On observe l'aspect de chaque solution à l'œil nu et à la

lumière polarisée. Un microscope polarisant permet de déterminer la présence de cristaux liquides. Enfin, la diffraction de rayons X aux petits angles permet de caractériser sans ambiguïté les différentes phases.

Les échantillons ont été préparés en dissolvant les tensioactifs dans de très faibles quantités d'eau. Les concentrations ont été calculées à partir des masses d'eau et de tensioactifs connues précisément.

Étant donné que les tensioactifs bimodulaires ne sont solubles qu'en milieu acide, les échantillons ont été préparés avec une solution d'acide chlorhydrique  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>. Initialement, les produits sont déjà sous forme d'ammonium.

Les diagrammes de phase binaires ont été établis pour les deux types de pseudo-peptides (Gly-Gly-His-Cn et  $\beta$ -Ala-His-Cn), avec différentes longueurs de chaîne (**Figure III-18** et **Figure III-19**).

Les limites entre les phases ne sont pas définies avec une grande précision mais les diagrammes obtenus donnent une bonne représentation des différentes organisations existant avec ces composés.

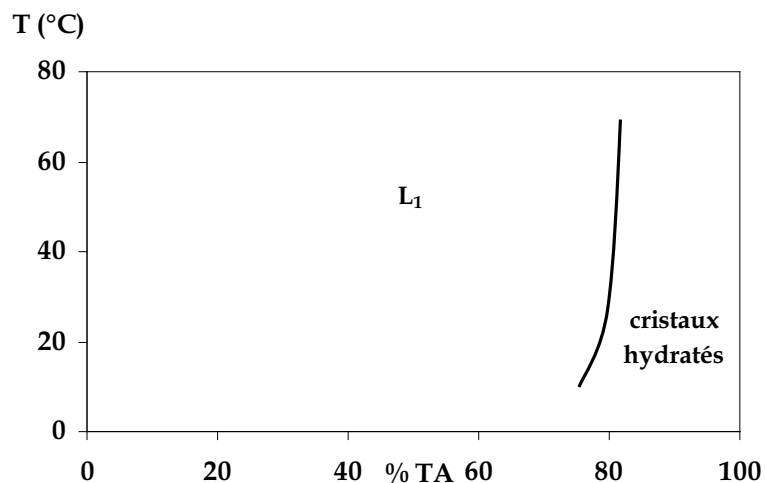
#### *III.4.1.3.3. Diagrammes de phase des tensioactifs bimodulaires*

Les systèmes étudiés sont relativement simples, seulement 3 types de phases ont été détectés. Étant donné qu'il s'agit de tensioactifs ioniques, il n'existe pas de point de trouble.

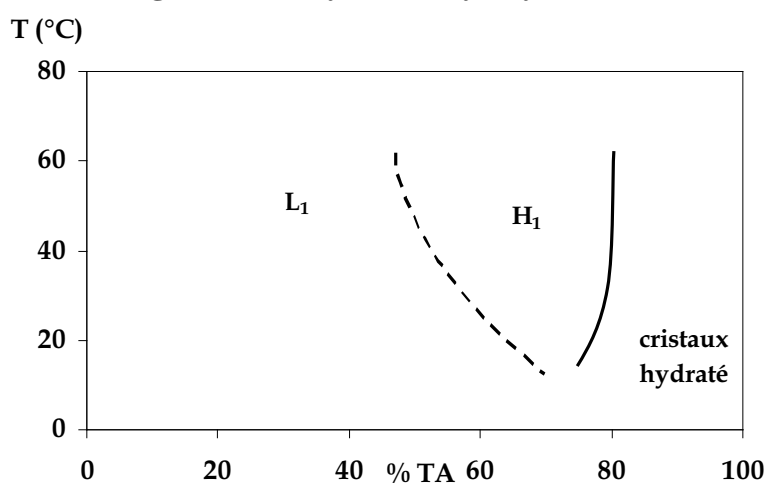
On observe dans tous les cas, comme pour les chlorures d'alkylammonium, une phase isotrope sur un domaine très large<sup>(93, 94)</sup>. L'analyse de cette phase, par diffraction de rayons X aux petits angles, donne un pic très large caractéristique d'une phase micellaire **L<sub>1</sub>**. La formation de cette phase est favorisée par l'importante tête hydrophile de ces composés.

La phase **L<sub>1</sub>** se réduit avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse, au profit de l'apparition d'une phase hexagonale **H<sub>1</sub>**.

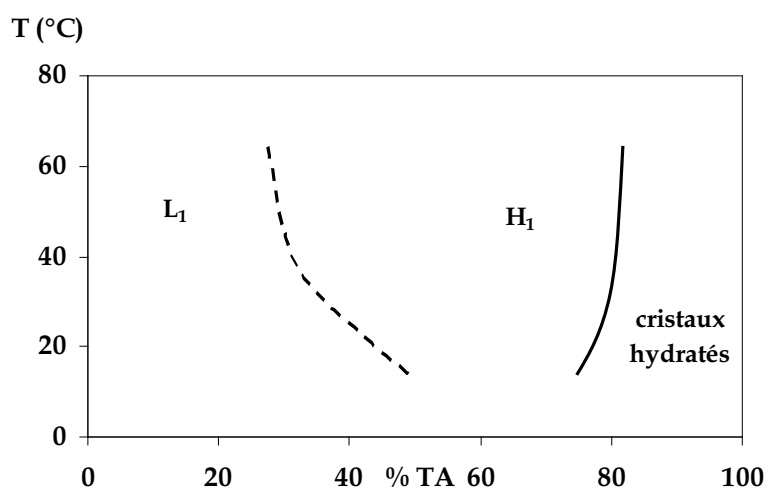
En milieu très riche en tensioactif, il y a formation de cristaux hydratés.



**Diagramme du système Gly-Gly-His-C8/eau**



**Diagramme du système Gly-Gly-His-C10/eau**



**Diagramme du système Gly-Gly-His-C12/eau**

**Figure III-18 : Diagrammes de phase binaires en fonction de la longueur de chaîne pour les dérivés du type Gly-Gly-His-Cn**

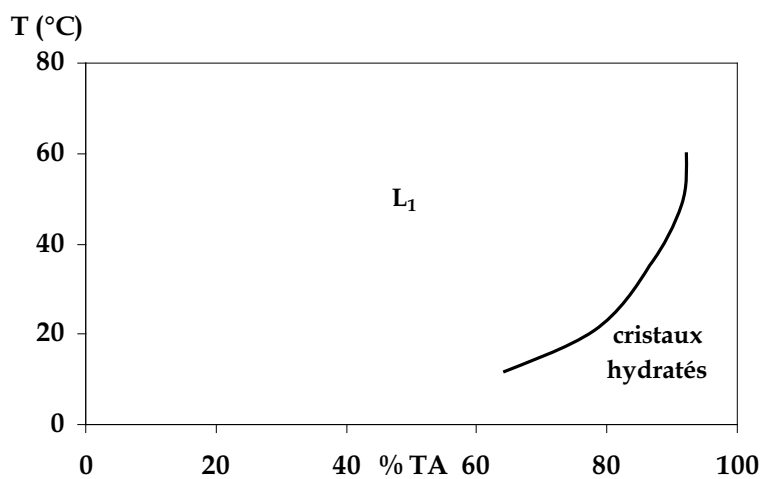


Diagramme du système  $\beta$ -Ala-His-C8/eau

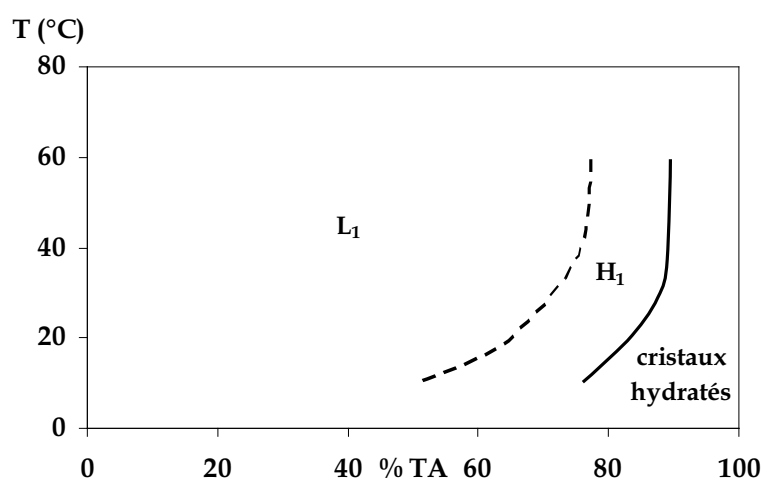


Diagramme du système  $\beta$ -Ala-His-C10/eau

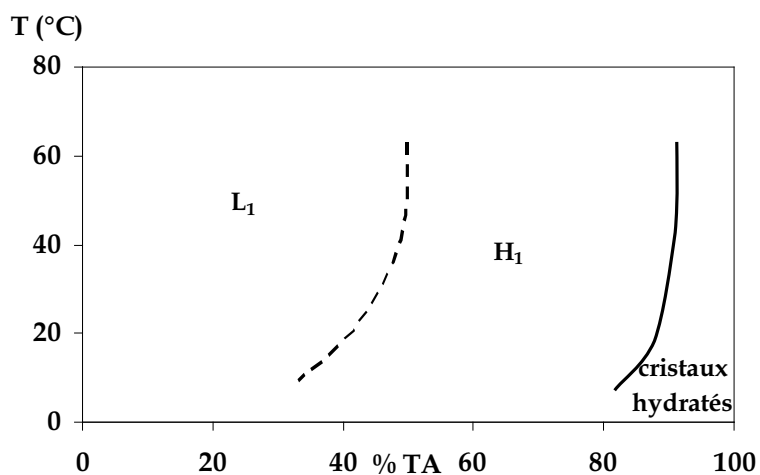
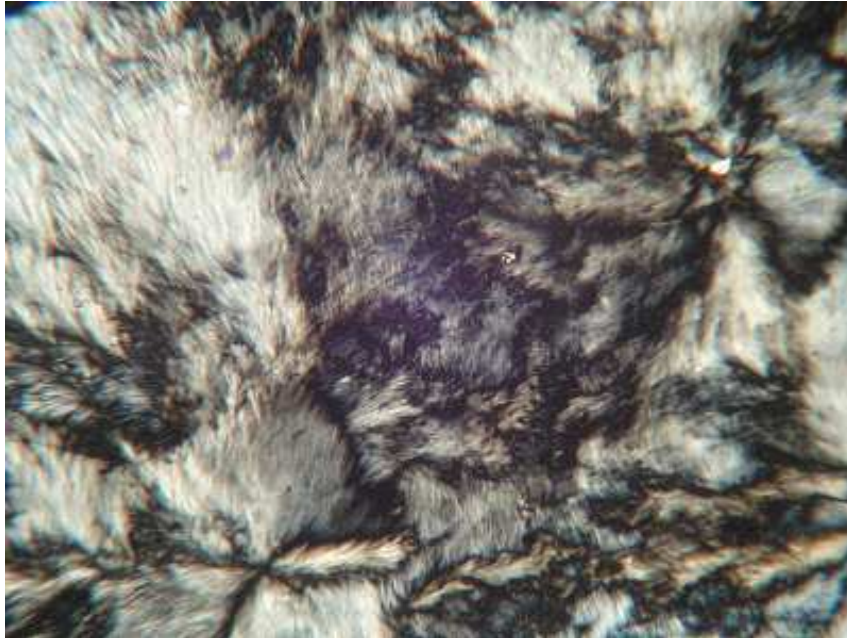


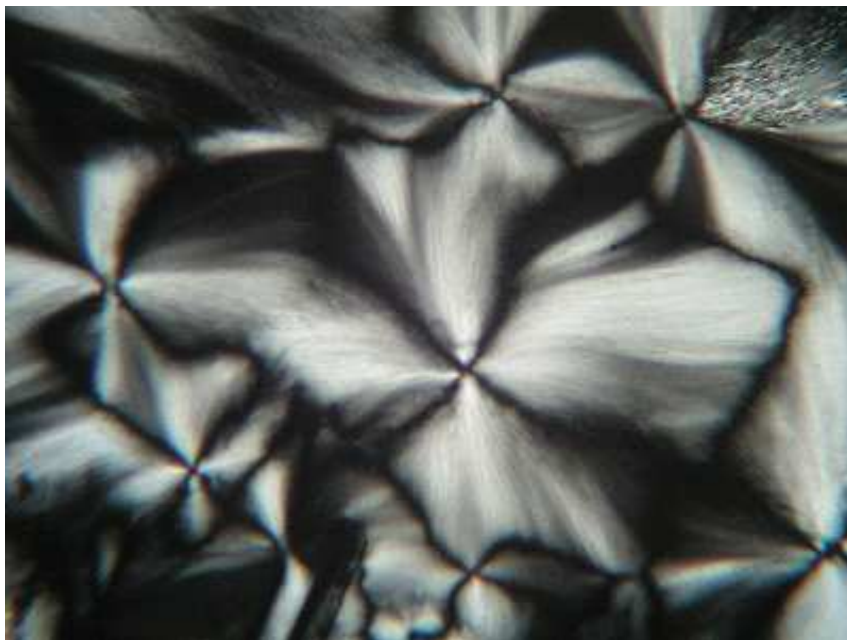
Diagramme du système  $\beta$ -Ala-His-C12/eau

Figure III-19 : Diagrammes de phase binaires en fonction de la longueur de chaîne pour les dérivés du type  $\beta$ -Ala-His-Cn

Pour les chaînes à 8 atomes de carbone, aucun cristal liquide n'est constaté. Seule une phase micellaire et des cristaux hydratés sont observés. La phase micellaire est très importante, elle existe jusqu'à des concentrations très élevées en tensioactifs (80-90%).



**Photographie III-1 : Cristal hydraté pour le système Gly-Gly-His-C8**

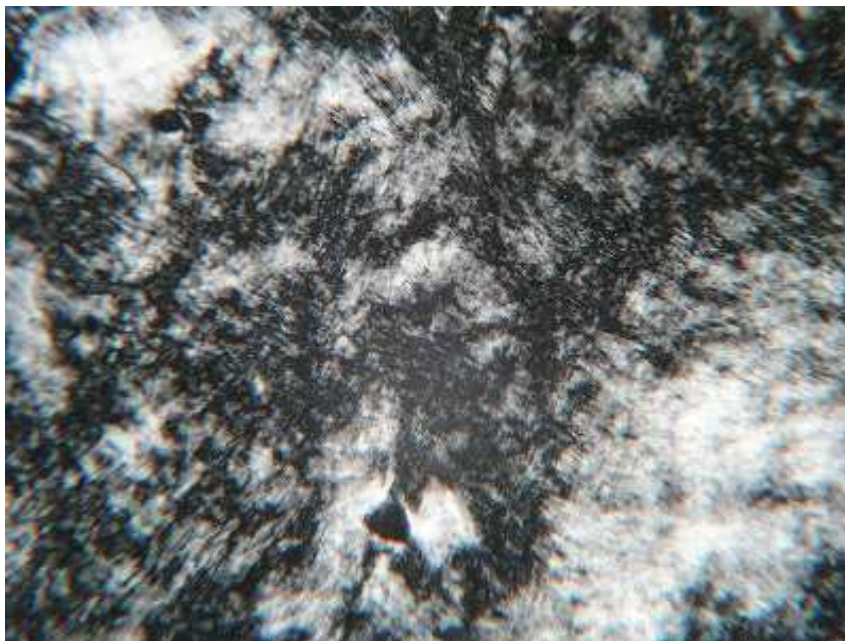


**Photographie III-2 : Cristal hydraté pour le système  $\beta$ -Ala-His-C8**

Les photographies ci-dessus ont été obtenues à partir du microscope optique avec polariseur croisé. Les textures observées semblent correspondre à des phases de cristaux liquides cependant les analyses par diffraction de rayons X ne présentent aucun pic. Il faut noter par ailleurs que le diffractomètre utilisé ne permet pas de détecter des organisations dont la distance de répétition est supérieure à 30 nm. Étant donné que l'on observe à l'œil nu, sur la paroi des piluliers, des objets plus gros identiques à ceux des photographies, nous pouvons conclure que ces phases sont composées de cristaux hydratés.

Les dérivés à plus longues chaînes présentent une transition phase micellaire – phase hexagonale différente selon la tête polaire. Pour les dérivés Gly-Gly-His, c'est à partir de la phase  $L_1$ , en augmentant la température, que l'on forme la phase  $H_1$ , alors que c'est l'inverse pour les dérivés  $\beta$ -Ala-His. En effet dans ce cas, la fusion de la phase hexagonale conduit à une phase micellaire, ce qui est plus fréquemment observé <sup>(95)</sup>.

La présence d'une phase hexagonale a été démontrée par observation au microscope et par diffraction de rayons X. Les photographies suivantes donnent quelques illustrations de phases hexagonales et de cristal hydraté.

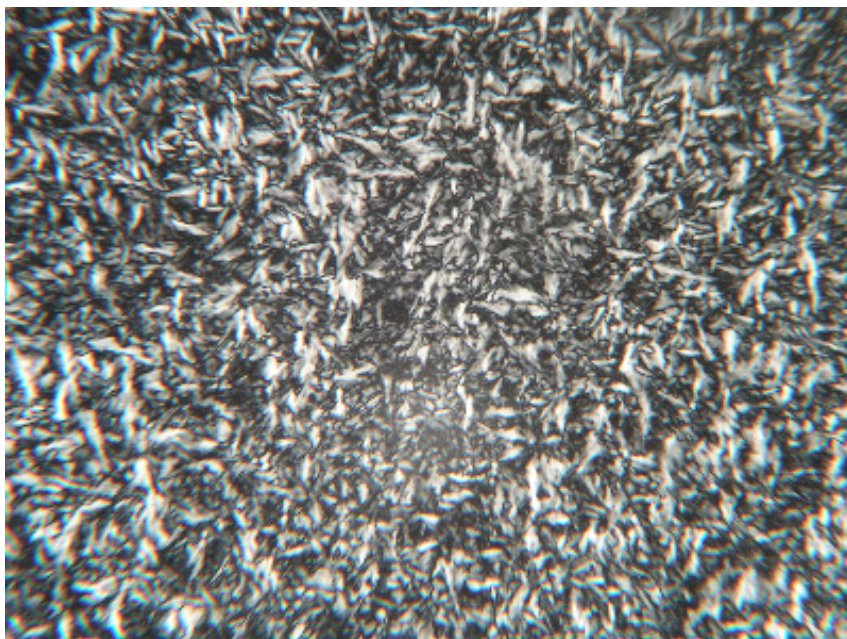


**Photographie III-3 : Phase hexagonale pour le système Gly-Gly-His-C10**





**Photographie III-4 : Phase hexagonale pour le système  $\beta$ -Ala-His-C10**



**Photographie III-5 : Cristal hydraté pour le système  $\beta$ -Ala-His-C12**

#### III.4.1.4. Étude des propriétés complexantes des tensioactifs bimodulaires

De la même façon que les tensioactifs bimodulaires sont insolubles en milieu basique, les complexes qu'ils forment avec le cuivre (II) et le nickel (II) ont tendance à précipiter. Il s'avère donc impossible d'étudier de façon rigoureuse la formation des complexes par potentiométrie car le programme PSEQUAD ne permet pas de traiter les problèmes à plusieurs phases.

Par contre, nous avons enregistré des spectres UV-visible des systèmes Cu(II) – Gly-Gly-His-C10 et Cu(II) –  $\beta$ -Ala-His-C10. Les spectres représentés sur la **Figure III-20** et la **Figure III-21** peuvent donner une information sur la structure des complexes formés. Les spectres obtenus avec le nickel (II) n'apportent aucune indication car la précipitation est trop importante.

On observe pour chaque système des bandes d'absorption synonymes de complexation (un décalage de la ligne de base indique l'apparition d'un précipité).

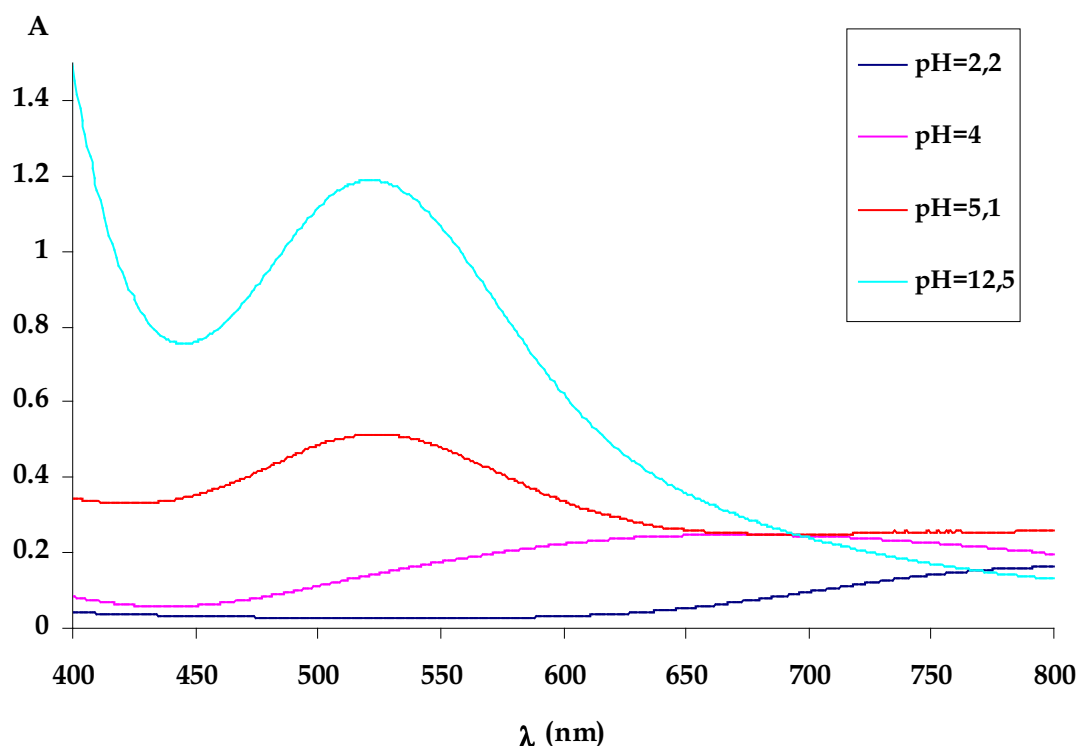
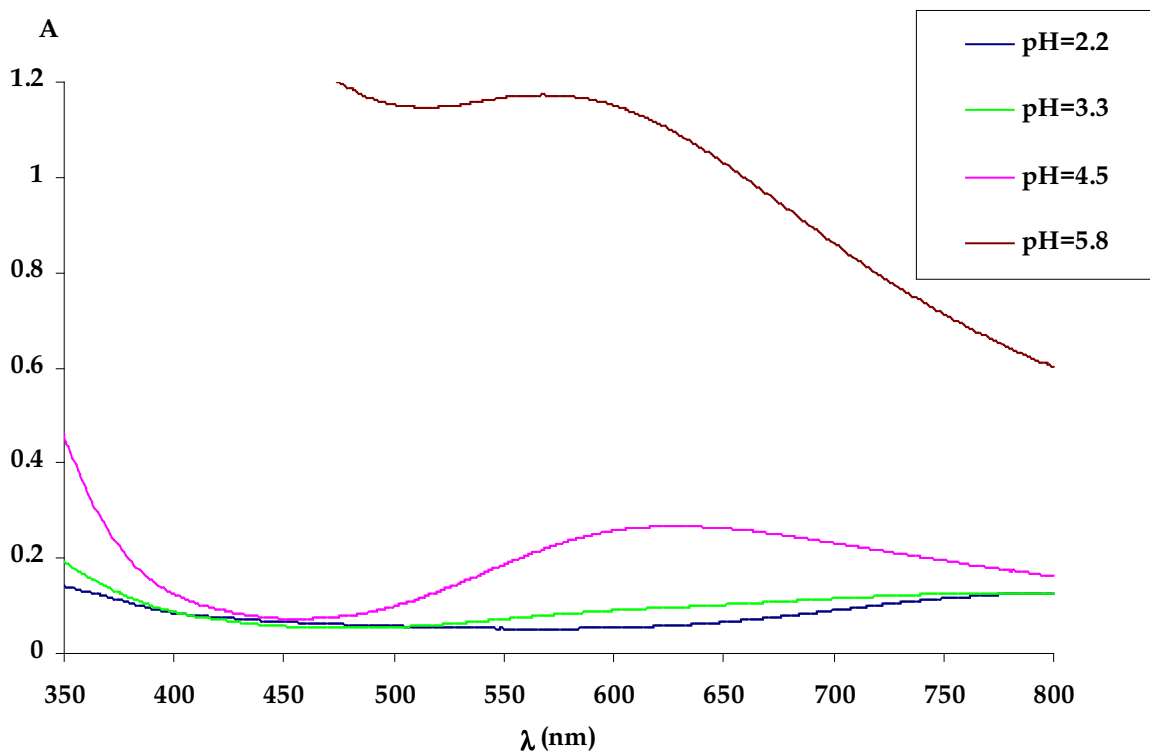


Figure III-20 : Spectres UV-visible du système Cu(II) - Gly-Gly-His-C10





**Figure III-21 : Spectres UV-visible du système Cu(II) -  $\beta$ -Ala-His-C10**

Pour vérifier que le pouvoir complexant de ces tensioactifs est similaire à celui des peptidoamines, nous avons été amenés à synthétiser des molécules modèles, sans propriétés tensioactives, à chaînes courtes, du type Gly-Gly-His-C4 et  $\beta$ -Ala-His-C4. En effet, ces deux produits ne précipitent pas lorsque l'on augmente le pH. L'étude des propriétés complexantes de ces molécules a pu être réalisée par potentiométrie.

#### *III.4.1.4.1. Étude de la complexation de molécules modèles à chaînes courtes*

##### *1) Détermination des pKa*

Dans un premier temps, nous avons déterminé les constantes de déprotonations des deux types de molécule grâce aux courbes de titrage des ligands seuls. Les pKa obtenus pour l'amine terminale et le cycle imidazole sont relevés dans le **Tableau III-13**.

	Gly-Gly-His-C4	Gly-Gly-Ha	$\beta$ -Ala-His-C4	$\beta$ -Ala-Ha
pK <sub>1</sub> (amino)	7,79	7,85	9,18	9,23
pK <sub>2</sub> (Im)	6,23	6,81	6,21	6,84

**Tableau III-13 : Constantes d'acidités des ligands tensioactifs comparés aux peptidoamines analogues (T = 298 K, I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**

Les constantes d'acidité des amines terminales obtenues pour les amides en C4 sont en accord avec les valeurs trouvées pour les peptidoamines analogues. Les composés dérivés de la  $\beta$ -alanine ont un pK<sub>1</sub> plus élevé que les autres pour la raison invoquée au II, à savoir les deux méthylènes qui diminuent l'effet inductif attracteur du motif carbonyle.

En ce qui concerne le pK<sub>2</sub> de l'imidazole, les valeurs déterminées pour les deux composés sont sensiblement identiques, par contre elles sont plus faibles de 0,6 unité par rapport à celles des peptidoamines. Cet effet peut s'expliquer par le fait que l'histidine présente une fonction du type carboxyle, que ne possède pas l'histamine, qui augmente un peu l'acidité du cycle.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la formation de complexes à partir des différents composés.

## 2) Complexation métallique

### a) Complexes de Gly-Gly-His-C4

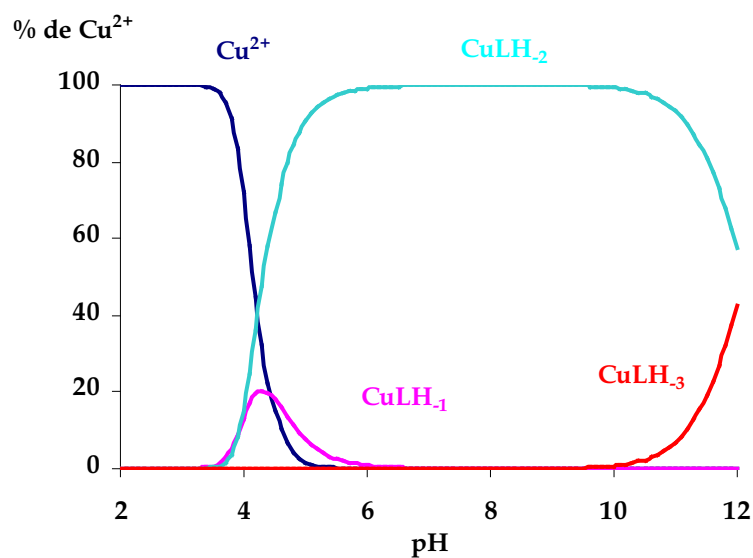
Les pKa étant du même ordre, les systèmes devraient être similaires pour les dérivés amides en C4 et les peptidoamines, cependant la chaîne bien que courte, peut exercer une contrainte stérique et avoir une influence sur la stabilité des complexes.

Comme pour les tripeptides Ala-Gly-Ha et Gly-Gly-Ha décrits au chapitre II, on s'attend à obtenir un diagramme de répartition avec un complexe majoritaire CuLH<sub>2</sub> dans la zone de pH physiologique avec 4 atomes d'azote coordonnés.

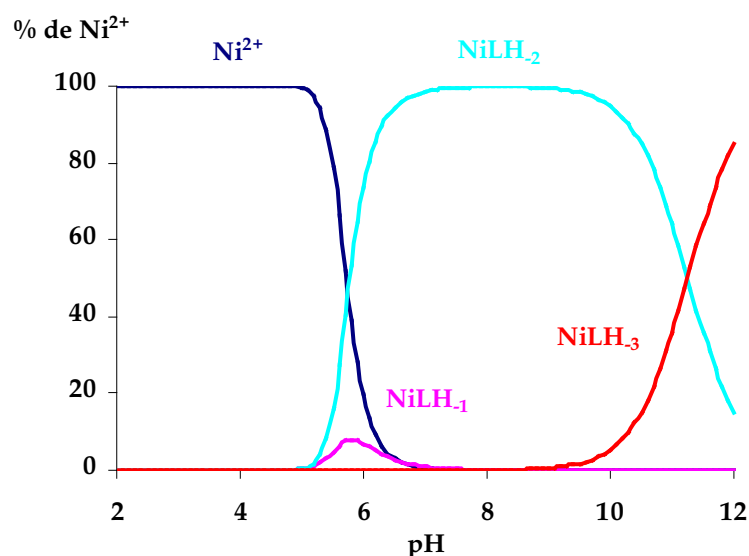
Les constantes de stabilité pour les complexes de Cu(II) et de Ni(II) ont été calculées à partir des courbes de dosage avec le programme PSEQUAD. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux de Gly-Gly-Ha sur le **Tableau III-14** et les diagrammes de répartition sont représentés sur la **Figure III-22**.

	Gly-Gly-His-C4		Gly-Gly-Ha	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MLH	—	—	12,02 (03)	10,48 (02)
ML	—	—	6,61 (04)	4,15 (04)
MLH <sub>1</sub>	3,42 (03)	-1,52 (08)	1,65 (09)	-2,87 (12)
MLH <sub>2</sub>	-0,51 (01)	-6,49 (01)	-2,48 (04)	-7,99 (01)
MLH <sub>3</sub>	-12,64 (03)	-17,74 (02)	-14,34 (02)	-19,56 (02)
$pK_{MLH_2}^{MLH_1}$	3,93	4,97	4,13	5,12
$pK_{MLH_3}^{MLH_2}$	12,13	11,25	11,86	11,57

**Tableau III-14 : Constantes de formation des complexes de Cu(II) et de Ni(II) avec Gly-Gly-His-C4 et Gly-Gly-Ha (T = 298 K et I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**



Système  $[Gly-Gly-His-C4] = [Cu^{2+}] = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$



Systeme  $[\text{Gly-Gly-His-C4}] = [\text{Ni}^{2+}] = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$

**Figure III-22 : Diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH**

Les systèmes obtenus sont effectivement ceux attendus dans le cas des deux cations, c'est à dire avec un complexe du type  $\text{MLH}_2$  prédominant. Les espèces mineures en milieu acide  $\text{MLH}$  et  $\text{ML}$  ne sont pas détectées pour  $\text{Gly-Gly-His-C4}$ . Seul  $\text{MLH}_1$  est présent. En milieu basique, une dernière déprotonation produit le complexe  $\text{MLH}_3$ .

On remarque une nouvelle fois que les complexes de  $\text{Cu(II)}$  sont plus stables que ceux de  $\text{Ni(II)}$ .

Le pouvoir complexant de la partie peptidique  $\text{Gly-Gly-His}$  est donc très peu modifié par la présence d'une courte chaîne aliphatique.

#### *b) Complexes de $\beta\text{-Ala-His-C4}$*

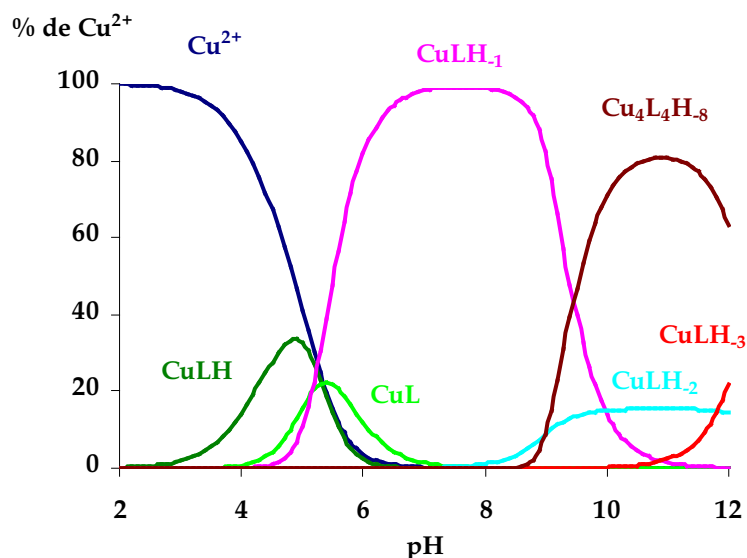
Les constantes de formation des espèces à partir des dérivés  $\beta\text{-Ala-His-C4}$  sont reportées dans le **Tableau III-15** et comparées à celles de la carcinine. Les deux systèmes sont un peu différents avec le cuivre (II), par contre aucun complexe de nickel (II) n'est observé avec  $\beta\text{-Ala-His-C4}$  contrairement la carcinine.

Le diagramme de répartition des espèces du système représenté sur la **Figure III-23** montre que le ligand  $\beta\text{-Ala-His-C4}$  possède un système de complexation du cuivre (II) proche de celui des pseudo-dipeptides tels que  $\alpha\text{-Me-Ala-Ha}$  (page 51).

En effet, après la formation des espèces CuLH et CuL, apparaît le complexe CuLH<sub>1</sub> majoritaire dans la zone de pH physiologique. Le complexe tétramère Cu<sub>4</sub>L<sub>4</sub>H<sub>8</sub> est bien détecté dans le domaine basique. Aucun complexe multiligandé n'est détecté, même en excès de ligand.

	$\beta$ -Ala-His-C4		$\beta$ -Ala-Ha	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MLH	12,30 (03)	—	12,78 (02)	11,84 (03)
ML	6,69 (04)	—	6,91 (05)	4,21 (03)
MLH <sub>1</sub>	1,71 (01)	—	-0,36 (05)	—
MLH <sub>2</sub>	-8,20 (04)	—	-10,60 (08)	—
MLH <sub>3</sub>	-19,88 (03)	—	—	—
ML <sub>2</sub>	—	—	—	6,96 (04)
ML <sub>2</sub> H <sub>1</sub>	—	—	—	-2,93 (04)
ML <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	—	—	34,10 (10)	—
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	-24,42 (05)	—	-33,20 (10)	—

**Tableau III-15 : Constantes de formation des complexes de Cu(II) et de Ni(II) avec  $\beta$ -Ala-His-C4 et  $\beta$ -Ala-Ha (T = 298 K et I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**



Système  $[\beta\text{-Ala-His-C4}] = [\text{Cu}^{2+}] = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$

**Figure III-23 : Diagramme de répartition des espèces en fonction du pH**

À l'aide des diagrammes de répartition, on peut conclure que les systèmes de complexes formés par les alkylamidopeptides à courtes chaînes sont très proches de ceux obtenus avec les peptidoamines.

#### III.4.1.4.2. Comparaison des propriétés complexantes des molécules modèles avec celles des tensioactifs bimodulaires

##### 1) Système $\text{Cu(II)} - \text{Gly-Gly-His-Cn}$

L'évolution, en fonction du pH, des spectres UV-visible précédents, établis pour le système  $\text{Cu(II)} - \text{Gly-Gly-His-C10}$  (**Figure III-20**) a été comparée avec le diagramme de répartition obtenu avec  $\text{Gly-Gly-His-C4}$  (**Figure III-22**).

En milieu acide, on observe une bande autour de 800 nm qui correspond au  $\text{Cu(II)}$  coordonné par des molécules d'eau, le ligand est sous sa forme acide et est donc soluble.

À partir de  $\text{pH} = 4,5$ , la solution devient bleue et on constate la présence d'un léger précipité violet ainsi qu'une bande d'absorption à 670 nm, caractéristique d'une coordination par 3 atomes d'azote.

Le diagramme de répartition de  $\text{Gly-Gly-His-C4}$  indique que les complexes  $\text{CuLH}_1$  et  $\text{CuLH}_2$  sont présents entre  $\text{pH} 4$  et  $5$ . D'après les résultats exposés au chapitre II (page 45), on sait que  $\text{CuLH}_1$  est globalement chargé positivement (le ligand porte une charge négative et le

cation, deux charges positives). Ce complexe est donc soluble, ce qui explique la couleur bleue observée entre  $\text{pH} = 2,2$  et 4.

Le complexe  $\text{CuLH}_2$ , quant à lui est neutre, donc il précipite et la ligne de base du spectre est décalée verticalement. C'est un complexe avec 4 atomes d'azote coordonnés, il est donc violet.

Le complexe  $\text{CuLH}_2$  reste tout de même un peu soluble, car il y a une bande d'absorption à 530 nm. Comme l'indique le diagramme de répartition, ce complexe est majoritaire jusqu'à  $\text{pH} = 11$ . Ensuite une dernière déprotonation survient sur le cycle imidazole et le complexe devient à nouveau soluble car il est chargé négativement. Le précipité se redissout et la ligne de base redescend.

## 2) Système $\text{Cu(II)} - \beta\text{-Ala-His-Cn}$

De la même façon, on peut faire un parallèle entre le diagramme de répartition de  $\beta\text{-Ala-His-C4}$  (**Figure III-23**) et les spectres UV-visible du dérivé tensioactif (**Figure III-21**).

En milieu acide, les espèces  $\text{CuLH}$  et  $\text{CuL}$  sont en faibles proportions et ne sont pas très colorées. Ces complexes sont chargés et sont donc solubles. À partir de  $\text{pH} = 4,5$ , la solution prend une coloration bleue qui s'intensifie avec l'augmentation du  $\text{pH}$ . On observe une bande à 630 nm, caractéristique d'une coordination à 3 atomes d'azote. Il s'agit du complexe  $\text{CuLH}_1$ . À partir de  $\text{pH} = 6$ , une précipitation intense survient, il s'agit du tétramère  $\text{Cu}_4\text{L}_4\text{H}_8$  qui est neutre. Après  $\text{pH} = 7$ , La précipitation de ce complexe devient tellement importante qu'il ne reste plus de cuivre en solution. Cette insolubilité peut s'expliquer par la forme tétraédrique du complexe (page 57). En effet, avec cette géométrie, les chaînes grasses ne peuvent se trouver qu'à la périphérie du complexe, ce qui le rend très hydrophobe. Le tétramère  $\text{Cu}_4\text{L}_4\text{H}_8$  se forme à un  $\text{pH}$  plus bas pour le tensioactif que pour le modèle à chaîne courte, ce qui sous-entend des constantes de formation différentes pour les deux espèces. Ceci peut être dû à une micellisation des complexes tensioactifs. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les tensions superficielles des solutions de complexes de cuivre avec  $\text{Gly-Gly-His-C8}$  et  $\beta\text{-Ala-His-C8}$ .

### III.4.1.5. Étude des propriétés tensioactives des complexes

Lorsque l'on mesure la tension superficielle d'une solution, l'idéal est qu'elle ne contienne qu'une seule espèce tensioactive. Ce fut le cas avec les tensioactifs bimodulaires seuls, en fixant le pH à 2.

Dans le cas de systèmes complexes, la composition de la solution dépend fortement du pH. Étant donné que les constantes de formation des complexes avec les tensioactifs sont inconnues, la composition du système en fonction du pH n'est pas connue. Dans tous les cas, il est peu probable qu'il n'y ait qu'une seule espèce en solution.

Nous avons donc fixé le pH à une valeur suffisamment élevée, juste avant la précipitation, de manière à obtenir un maximum de complexes en solution.

Pour le système Cu(II) - Gly-Gly-His-C8, le pH a été fixé à 4,5 et pour le système Cu(II) -  $\beta$ -Ala-His-C8, le pH a été fixé à 5,5.

Les courbes de tensiométrie sont représentées sur la **Figure III-24** et la **Figure III-25** avec celles obtenues pour les tensioactifs en absence d'ion métallique. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau III-16**.

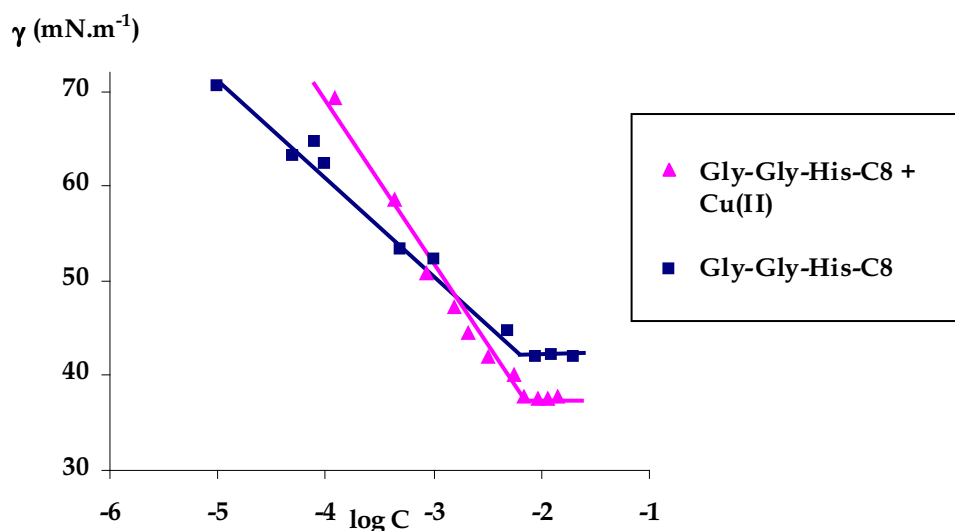


Figure III-24 : Courbe  $\gamma = f(\log C)$  pour le système Cu(II) – Gly-Gly-His-C8



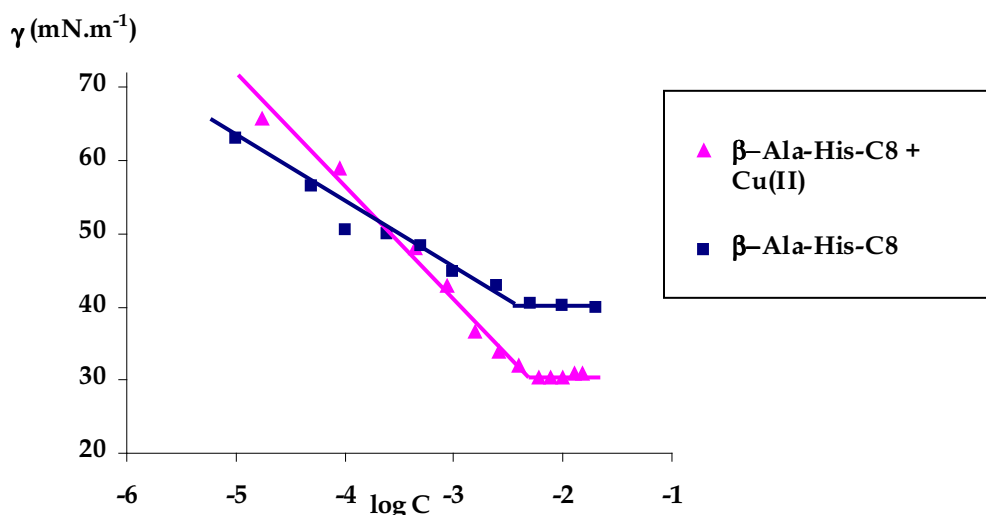


Figure III-25 : Courbe  $\gamma = f(\log C)$  pour le système Cu(II) –  $\beta$ -Ala-His-C8

Composé	$\gamma$ (cmc) mN.m <sup>-1</sup>	cmc (mol.L <sup>-1</sup> )
Gly-Gly-His-C8 + Cu(II)	37	$8,5 \cdot 10^{-3}$
Gly-Gly-His-C8 seul	42	$8,1 \cdot 10^{-3}$
$\beta$ -Ala-His-C8 + Cu(II)	31	$4,6 \cdot 10^{-3}$
$\beta$ -Ala-His-C8 seul	40	$3,4 \cdot 10^{-3}$

**Tableau III-16 : Concentrations micellaires critiques et valeurs de la tension superficielle à ces concentrations pour les complexes de Gly-Gly-His-C8 et de  $\beta$ -Ala-His-C8 et pour les tensioactifs seuls**

Dans les deux cas, la tension superficielle à la cmc est plus basse que celle mesurée pour les tensioactifs seuls, ce qui montre que les espèces tensioactives sont différentes en présence de cuivre (II). Ce sont donc bien les complexes qui abaissent la tension superficielle dans ce cas. Du fait de la présence de l'ion cuivre qui apporte de l'hydrophilie au tensioactif, les cmc sont un peu plus élevées pour les complexes que pour les tensioactifs seuls.

La micellisation peut donc expliquer les différences observées pour la répartition des complexes entre les tensioactifs bimodulaires et les molécules analogues à courte chaîne.

Étant donné que le nombre d'espèces en solution et leur concentration exacte ne sont pas connus, nous n'avons pas appliqué l'équation de Gibbs pour déterminer les surfaces par tête polaire.

#### **III.4.1.6. Conclusion sur les propriétés des tensioactifs bimodulaires**

L'étude physicochimique des tensioactifs bimodulaires a montré que ces composés ont bien une activité de surface mais celle-ci n'est possible qu'en milieu acide.

L'augmentation du pH neutralise les fonctions acides de ces produits et provoque leur précipitation.

Les diagrammes de phase binaires ont été déterminés et ont montré que les tensioactifs s'organisent en micelles jusqu'à des concentrations élevées. L'augmentation de la concentration provoque l'apparition d'une phase hexagonale. Des cristaux hydratés se forment aux concentrations les plus élevées.

Enfin les propriétés complexantes ont été mises en évidence. Une méthode sélective d'extraction de métaux par précipitation pourrait être envisagée.

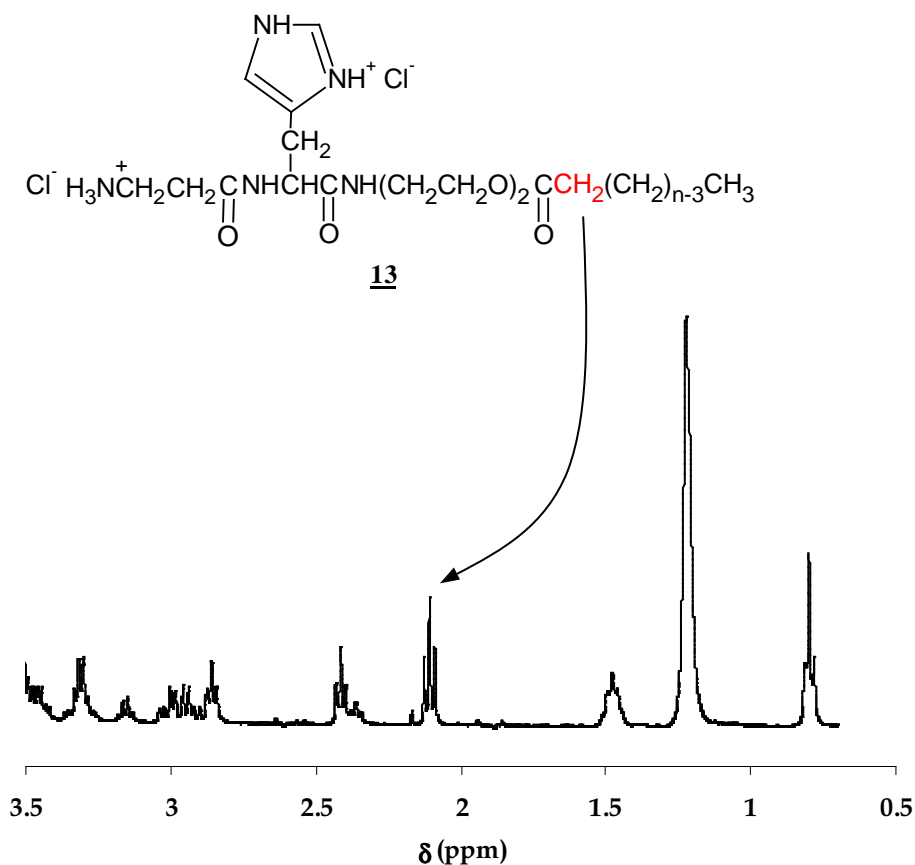
### **III.4.2. Propriétés des tensioactifs trimodulaires de type I**

#### **III.4.2.1. Propriétés des tensioactifs de type I à lien amide et ester**

Avant d'entreprendre toute étude physicochimique, il est nécessaire de contrôler la stabilité de ces tensioactifs par RMN. Étant donné que ces composés possèdent une fonction ester, ils sont relativement fragiles en solution aqueuse. Nous avons donc essayé d'estimer la durée de vie de l'ester en solution pour les composés dérivés de la  $\beta$ -alanyl-histidine.

##### *III.4.2.1.1. Étude par RMN de l'hydrolyse des esters*

Nous avons suivi l'évolution des signaux correspondant au  $\text{CH}_2$  de la chaîne grasse, en  $\alpha$  du carbonyle (**Figure III-26**). En effet, ce groupe de protons a un déplacement chimique bien différencié selon que l'ester soit hydrolysé ou non.



**Figure III-26 : Structure et partie du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **13****

En milieu acide, les résultats montrent que l'hydrolyse de l'ester est lente, elle n'est pas significative avant plusieurs jours et n'est jamais totale alors qu'en milieu basique elle est beaucoup plus rapide. En effet, après seulement 60 minutes, la totalité du composé est hydrolysée.

Par contre, la position du lien ester dans la molécule influence la stabilité du tensioactif dans l'eau. Ainsi, les composés qui comportent un ester au niveau de l'histidine sont très rapidement hydrolysés, même en milieu acide.

Tenant compte de ces résultats, seuls les tensioactifs trimodulaires avec l'ester au niveau de la chaîne grasse ont été considérés.

#### *III.4.2.1.2. Evaluation de la solubilité dans l'eau*

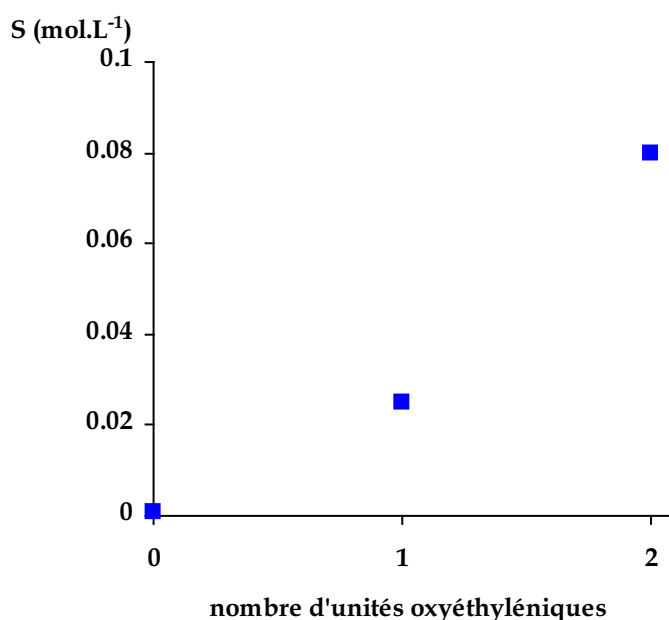
Les solubilités de ces tensioactifs peuvent être mesurées très rapidement. Nous avons évalué la solubilité des dérivés trimodulaires de la  $\beta$ -alanyl-histidine à pH = 8. Les pH basiques ont été exclus pour limiter la saponification des esters.

Pour le tensioactif bimodulaire,  $\beta$ -Ala-His-C10, la solubilité à ce pH est très faible. Elle a été mesurée pour les dérivés avec une et deux unités oxyéthyléniques, respectivement  $\beta$ -Ala-His-aEOe-C10 et  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>2</sub>e-C10. Les solubilités obtenues pour ces composés sont rassemblées dans le **Tableau III-17** et représentées sur la **Figure III-27**.

L'augmentation du nombre d'unités oxyéthyléniques (n') apporte incontestablement de l'hydrophilie à la molécule. Cela se traduit par une hausse sensible de la solubilité en particulier lorsque la molécule est neutre.

composés	$\beta$ -Ala-His-C10	$\beta$ -Ala-His-aEOe-C10	$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>2</sub> e-C10
n'	0	1	2
solubilité (mol.L <sup>-1</sup> )	$2.10^{-3}$	$2,5.10^{-2}$	$8.10^{-2}$

**Tableau III-17 : Solubilités à 25 °C et à pH = 8 de plusieurs dérivés de la  $\beta$ -alanyl-histidine**



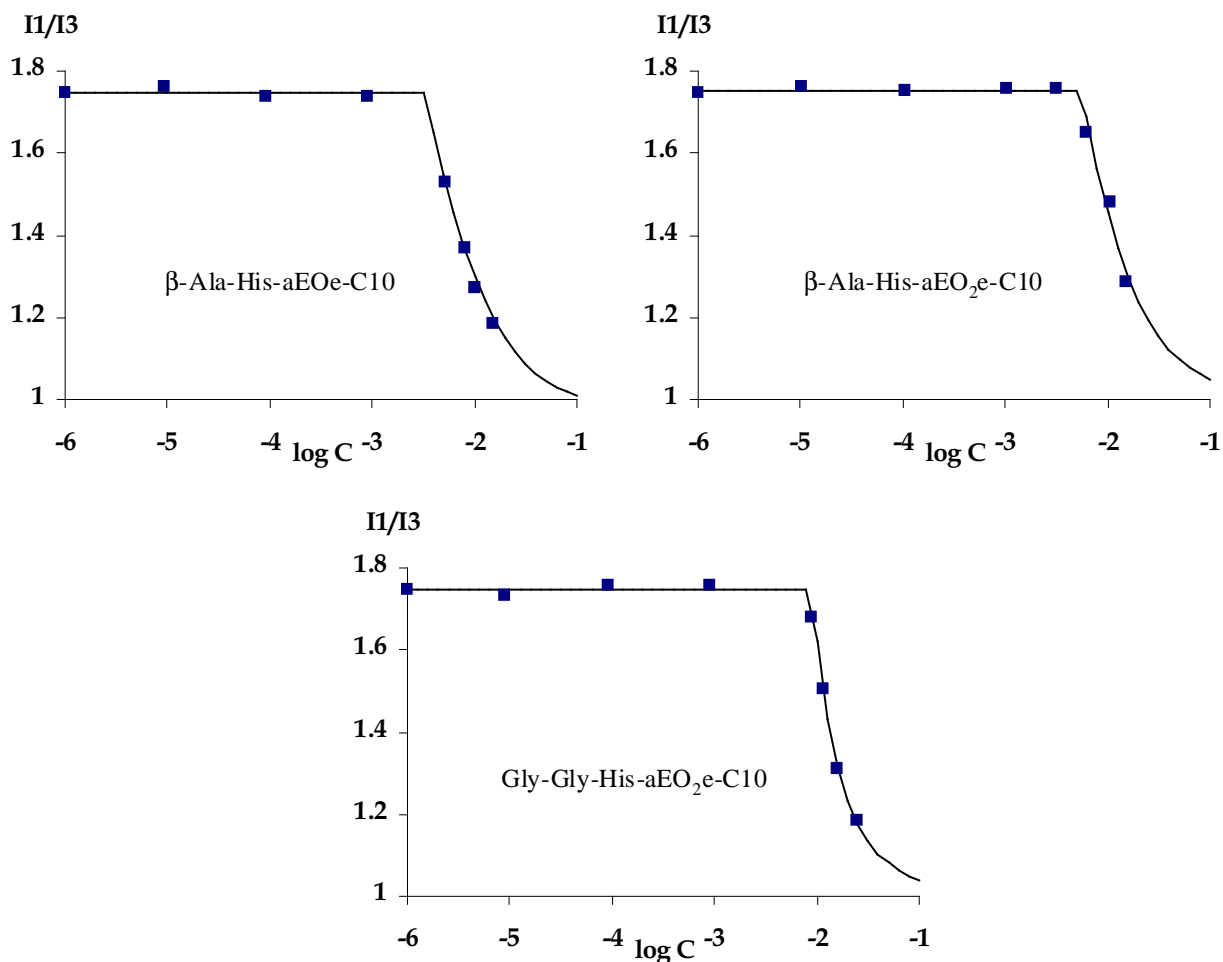
**Figure III-27 : Solubilités à 25 °C et à pH = 12 des dérivés de la  $\beta$ -alanyl-histidine en fonction du nombre d'unités oxyéthyléniques**

### III.4.2.1.3. Étude des propriétés tensioactives

Une étude par tensiométrie de ces composés prendrait trop de temps et les solutions risqueraient de se dégrader du fait de l'hydrolyse des esters. Les propriétés tensioactives ont donc été mises en évidence par spectroscopie de fluorescence. Comme nous l'avons vu avec les tensioactifs bimodulaires, les mesures sont rapides et les résultats sont comparables à ceux obtenus par tensiométrie.

Les solutions ont été réalisées à partir d'acide chlorhydrique aqueux de manière à maintenir un  $\text{pH} = 2$ , pour pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus à partir des tensioactifs bimodulaires.

Les courbes sont représentées sur la **Figure III-28** et les cmc sont rassemblées dans le **Tableau III-18**.



**Figure III-28 : Changement des caractéristiques de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration pour les tensioactifs à lien amide et ester, à 25 °C et à  $\text{pH} = 2$**

L'incorporation de motifs oxyéthyléniques provoque une augmentation de l'hydrophilie de la molécule puisque les composés correspondants présentent des concentrations micellaires critiques plus élevées que celles des composés bimodulaires.

Toutefois, les cmc restent du même ordre que ce soit pour les tensioactifs bimodulaires ou les analogues trimodulaires. Ce sont donc les ammoniums sur le cycle imidazole et sur l'amine, qui imposent la valeur de la cmc. L'augmentation du nombre d'unités oxyéthyléniques ne modifie que faiblement la balance hydrophile lipophile en milieu acide.

Il est intéressant de noter que l'hydrophilie d'un motif  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>2</sub>e équivaut à celle d'un motif Gly-Gly-His.

composé	n'	cmc (mol.L <sup>-1</sup> )
$\beta$ -Ala-His-C10	0	$2,4 \cdot 10^{-3}$
$\beta$ -Ala-His-aEOe-C10	1	$3,3 \cdot 10^{-3}$
$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>2</sub> e-C10	2	$5,7 \cdot 10^{-3}$
Gly-Gly-His-C10	0	$5,7 \cdot 10^{-3}$
Gly-Gly-His-aEO <sub>2</sub> e-C10	2	$8,9 \cdot 10^{-3}$

**Tableau III-18 : Concentrations micellaires critiques déterminées par spectrofluorimétrie pour les tensioactifs trimodulaires à lien amide et ester à 25°C et à pH = 2**

#### III.4.2.1.4. Étude des propriétés complexantes

Le pouvoir complexant de ce type de tensioactif a été étudié en potentiométrie en faisant des dosages rapides. Le risque d'hydrolyse a ainsi été évité. Les points relevés en milieu très basique (pH > 11) n'ont pas été retenus.

##### 1) Détermination des pKa

Dans un premier temps, nous avons déterminé les constantes de déprotonations des produits grâce aux courbes de titrage des ligands seuls. Les valeurs de pKa obtenues pour l'amine

terminale et le cycle imidazole peuvent être comparés à ceux des analogues bimodulaires à courte chaîne (**Tableau III-19**).

Concernant le pKa de l'imidazole, les valeurs déterminées pour les tensioactifs contenant deux unités oxyéthyléniques sont plus faibles que celles des analogues bimodulaires non tensioactifs (C4). On pourrait expliquer cette diminution par la formation de systèmes organisés qui modifierait les constantes d'acidité. Par contre, comme les pKa des amines ne changent pas, cette diminution pourrait être attribuée plutôt à un effet inductif attracteur du motif oxyéthylénique qui augmenterait l'acidité de l'imidazole.

On observe une divergence des courbes de dosage pour les pH > 10,5 qui résulte d'une perturbation des équilibres normaux de déprotonation. Ceci confirme l'hydrolyse rapide des esters en milieu très basique.

composé	pK <sub>1</sub> (amino)	pK <sub>2</sub> (imidazole)
Gly-Gly-His-aEO <sub>2</sub> e-C10	7,79	6,14
Gly-Gly-His-C4	7,79	6,23
β-Ala-His-aEO <sub>2</sub> e-C10	9,13	5,95
β-Ala-His-aEOe-C10	9,24	6,20
β-Ala-His-C4	9,18	6,21

**Tableau III-19 : Constantes d'acidités des ligands tensioactifs comparés aux peptidoamines analogues (T = 298 K, I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**

## 2) Complexation métallique

L'étude des propriétés complexantes de ces produits vis à vis des cations Cu(II) et Ni(II) a été réalisée en prenant soin d'éliminer les points mesurés en milieu basique ( pH > 11). Là encore, les dérivés de la β-alanine forment des précipités en présence de ces cations, nous n'avons donc pas interprété les courbes de dosage de ces systèmes.

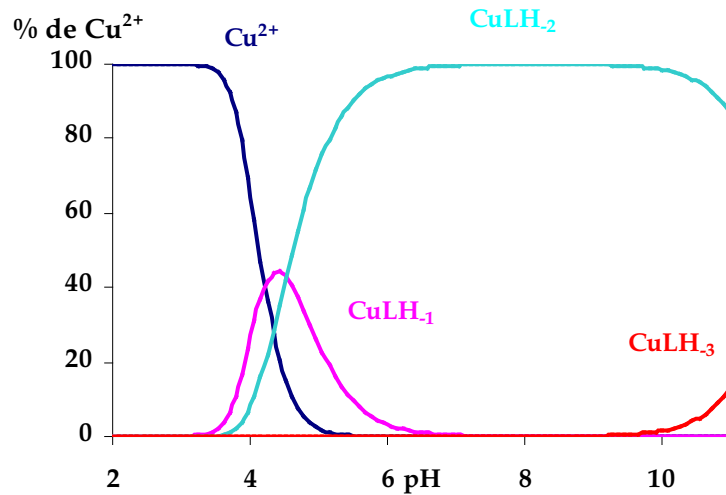
a) Complexes de Gly-Gly-His-aEO<sub>2</sub>e-C10

Les constantes de stabilité pour les complexes de Cu(II) et de Ni(II) ont été calculées à partir des courbes de dosage avec le programme PSEQUAD. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux de Gly-Gly-His-C4 sur le **Tableau III-20** et les diagrammes de répartition sont représentés sur la **Figure III-29**.

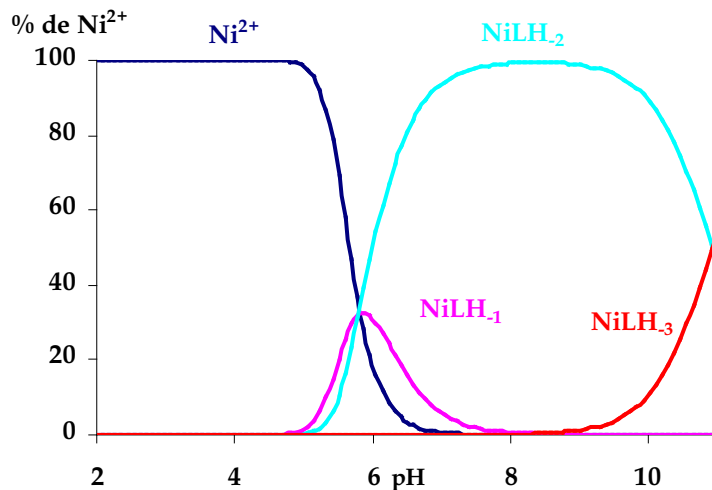
	Gly-Gly-His-aEO <sub>2</sub> e-C4		Gly-Gly-His-C4	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MLH	—	—	—	—
ML	—	—	—	—
MLH <sub>1</sub>	3,68 (03)	-0,88 (03)	3,42 (03)	-1,52 (08)
MLH <sub>2</sub>	-0,85 (02)	-6,67 (01)	-0,51 (01)	-6,49 (01)
MLH <sub>3</sub>	-12,68 (04)	-17,59 (03)	-12,64 (03)	-17,74 (02)
pK <sub>MLH<sub>2</sub></sub> <sup>MLH<sub>1</sub></sup>	4,53	5,79	3,93	4,97
pK <sub>MLH<sub>3</sub></sub> <sup>MLH<sub>2</sub></sup>	11,83	10,92	12,13	11,25

**Tableau III-20 : Constantes de formation des complexes de Cu(II) et de Ni(II) avec Gly-Gly-His-aEO<sub>2</sub>e-C10 et Gly-Gly-His-C4 (T = 298 K et I = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>)**





Système  $[\text{Gly-Gly-His-aEO}_2\text{e-C10}] = [\text{Cu}^{2+}] = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$



Système  $[\text{Gly-Gly-His-aEO}_2\text{e-C10}] = [\text{Ni}^{2+}] = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$

**Figure III-29 : Diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH**

Les complexes  $\text{MLH}_1$ ,  $\text{MLH}_2$  et  $\text{MLH}_3$  sont détectés dans le cas du cuivre (II) et du nickel (II). Les systèmes de complexes sont équivalents à ceux obtenus avec Gly-Gly-His-C4 et Gly-Gly-Ha. L'espèce  $\text{MLH}_2$  est toujours majoritaire dans un large domaine de pH.

Ce tensioactif trimodulaire possède donc un pouvoir complexant proche de celui de la peptidoamine correspondante Gly-Gly-Ha. Cependant le risque d'hydrolyse n'en fait pas un système stable, nous nous sommes donc intéressés aux propriétés des tensioactifs trimodulaires à deux liens amides.

### III.4.2.2. Propriétés des tensioactifs trimodulaires à deux liens amides

#### III.4.2.2.1. Comportement en solution aqueuse

Du fait de la précipitation des tensioactifs bimodulaires en milieu basique, nous avons augmenté l'hydrophilie de ces composés en y incorporant un motif à base d'oxyéthylènes, lié par deux liens amides, pour obtenir une molécule plus résistante à l'hydrolyse. Les produits obtenus ont la particularité de former des gels en solution aqueuse.

Pour les composés synthétisés aux longueurs de chaîne à 12 et 14 atomes de carbone, la formation de gel intervient lorsque l'on augmente le pH. Aucun gel ne se forme pour les composés à longueurs de chaîne à 10 atomes de carbone. Au contraire, on observe plutôt une légère précipitation en milieu basique ( $\text{pH} > 10$ ), beaucoup moins importante que celle obtenue avec les tensioactifs bimodulaires.

Les gels sont obtenus pour les deux peptides aux alentours de pH 7-8. Cette formation est réversible car en ajoutant de l'acide à un gel, on obtient à nouveau une solution.

La déprotonation des sites acides (imidazole et amino) semble donc jouer un rôle prépondérant dans la formation de gels, en effet, lorsque l'on augmente le pH jusqu'à obtenir un milieu très basique, on n'observe pas de modification.

La structure de ces gels est fragile, on peut la casser par agitation mécanique mais elle a une mémoire de forme et se reforme après un temps de repos.

On peut trouver des exemples de formation de gels similaires dans la littérature. Il s'agit en fait d'hydrogels<sup>(96)</sup>. Les molécules qui les forment sont intéressantes du fait des nombreuses applications pratiques qu'elles présentent, telles que l'élaboration de tissus<sup>(97)</sup>, le transport et la libération contrôlée de principe actif<sup>(98)</sup>, la capture et la destruction de polluants<sup>(99)</sup>.

Ces hydrogels offrent plusieurs avantages par rapport aux gels actuels à base de polymères qui posent un problème de biodégradabilité. En effet, l'utilisation de petites molécules gélifiantes permet résoudre ce problème puisqu'elles sont liées par des forces non-covalentes plus faciles à rompre. De plus, il est possible d'incorporer directement des principes actifs dans la molécule gélifiante<sup>(98)</sup>.

En général, les hydrogels sont préparés par refroidissement d'une solution de composé gélifiant dans l'eau chaude. Il existe une température de gélification ( $T_{\text{gel}}$ ) à laquelle le volume d'eau est immobilisé et peut supporter son propre poids sans s'effondrer. Nous avons donc mesuré la température de gélification de nos produits, les valeurs pour les deux types de peptides sont indiquées dans le **Tableau III-21**.

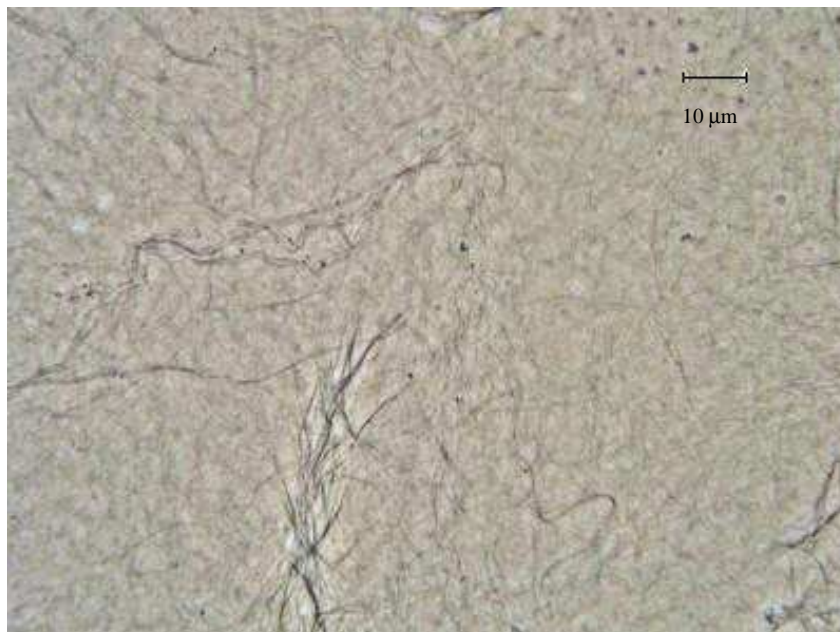
Composé	Gly-Gly-His-aEO <sub>3</sub> a-Cn			β-Ala-His-aEO <sub>3</sub> a-Cn		
	n	10	12	14	10	12
T <sub>gel</sub> (°C)	Pas de gel	26	35	Pas de gel	25	34

**Tableau III-21 : Température de gélification pour les tensioactifs trimodulaires à deux liens amides**

Pour les deux types de pseudo-peptides, la température de fusion est sensiblement la même. Plus la longueur de la chaîne est importante, plus la température de gélification est élevée.

Le phénomène de gélification est supposé provenir de l'enchevêtrement de fibres qui piègent l'eau par effet de tension de surface. Une agrégation, de nature hydrophobe, des molécules est à l'origine de la formation de ces fibres. Des études sur des tensioactifs à tête polaire peptidique ont montré que ces fibres étaient constituées de couches multilamellaires de tensioactifs <sup>(100)</sup>.

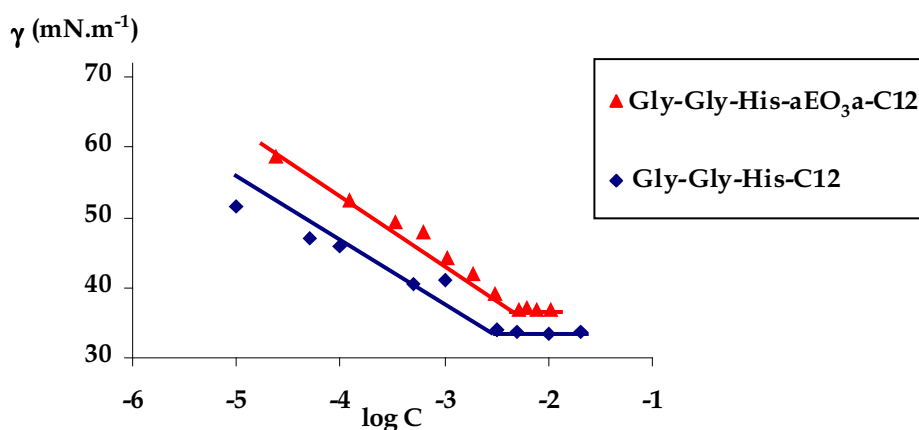
L'observation au microscope optique de ces gels a permis de visualiser la formation de filaments d'épaisseur relativement grande. Ces macro-fibres ont pu se former à partir des fibres de base, impossibles à observer avec un microscope optique. Elles sont apparues après exposition à la lumière du microscope, ce qui a permis l'élimination d'une partie de l'eau piégée entre les fibres et leur rapprochement (**Photographie III-6**).

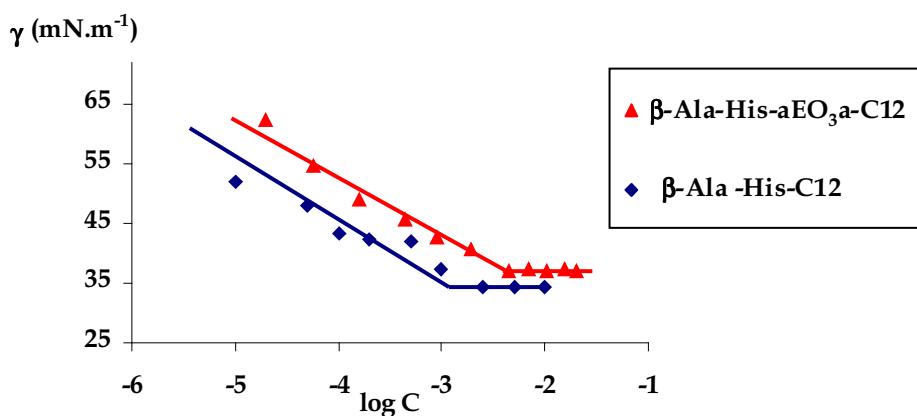


**Photographie III-6 : Macro-fibres provenant d'un gel formé à partir d'une solution aqueuse de  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>3</sub>a-C12**

Par ailleurs, lorsque la concentration en tensioactifs est inférieure à  $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , on n'observe pas de gélification.

Les propriétés tensioactives des molécules en milieu acide ont été vérifiées par tensiométrie, les courbes obtenues sont représentées sur la **Figure III-30** et les résultats sont comparés à ceux des tensioactifs bimodulaires dans le **Tableau III-22**.





**Figure III-30 : Courbes de tensiométrie  $\gamma = f(\log C)$  pour les deux types de tensioactif trimodulaire à deux liens amides à pH = 2**

composé	$\gamma$ (cmc) $\text{mN.m}^{-1}$	cmc ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	A ( $\text{\AA}^2$ )
Gly-Gly-His-C12	34	$3,0 \cdot 10^{-3}$	316
Gly-Gly-His-aEO <sub>3</sub> a-C12	37	$4,6 \cdot 10^{-3}$	309
$\beta$ -Ala-His-C12	34	$1,1 \cdot 10^{-3}$	322
$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>3</sub> a-C12	36	$2,8 \cdot 10^{-3}$	328

**Tableau III-22 : Concentrations micellaires critiques et valeurs de la tension superficielle à ces concentrations pour les tensioactifs trimodulaires Gly-Gly-His-aEO<sub>3</sub>a-C12 et  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>3</sub>a-C12 et pour les analogues bimodulaires**

Du fait de l'hydrophilie apportée par les unités oxyéthyléniques, les cmc sont un peu plus élevées pour ce type de tensioactifs trimodulaires. Il y a donc formation de micelles (ou d'autres agrégats solubles) avec ces tensioactifs en milieu acide. Á l'aide de ce résultat, il est possible d'expliquer le fait que la gélification n'ait lieu qu'en milieu basique. En effet, lorsque les molécules de tensioactifs sont chargées en milieu acide, elles sont trop hydrophiles et s'agrègent en micelles. Il faut donc augmenter le pH pour obtenir la déprotonation des sites acides et avoir des tensioactifs plus hydrophobes susceptibles de s'agréger en fibre.

Pour les molécules à longueur de chaîne à 10 atomes de carbone, les agrégats formés n'arrivent pas à piéger l'eau et ont plutôt tendance à y précipiter. Ceci montre que la formation de gels est en partie due à des interactions hydrophobes entre les tensioactifs.

En conclusion, la formation des hydrogels a lieu à partir d'une concentration en tensioactifs déprotonés, pour cela, il faut que le pH soit supérieur aux deux pKa et que la concentration initiale soit suffisamment importante.

#### *III.4.2.2.2. Étude des propriétés complexantes*

Compte tenu de ces résultats, les propriétés complexantes des tensioactifs à deux liens amides n'ont pas pu être étudiées. En effet, du fait de la formation de gel ou de précipité, les pKa des ligands seuls n'ont pas été déterminés. De plus, des précipités sont également obtenus en présence de cuivre (II) ou de nickel (II). Nous avons tout de même vérifié que ces tensioactifs complexent ce type de cations avec les mêmes systèmes que les peptidoamines ou les molécules dérivées. Des solutions colorées, violettes pour le cuivre (II), jaunes pour le nickel (II) et des précipités avec les espèces neutres ont été aussi obtenues.

#### **III.4.2.3. Conclusion sur les propriétés des tensioactifs trimodulaires**

L'étude des propriétés physicochimiques des tensioactifs trimodulaires a montré qu'ils étaient plus solubles dans l'eau que les tensioactifs bimodulaires, du fait de la présence de motifs oxyéthyléniques.

La fragilité en milieu aqueux des dérivés trimodulaires comportant un lien ester a été confirmée. Les propriétés tensioactives et complexantes de ces composés ont été mises en évidence, ce qui en fait des extractants intéressants du fait de leur dégradabilité dans l'eau et du faible impact sur l'environnement qu'ils occasionneraient.

Les tensioactifs trimodulaires à deux liens amides possèdent un comportement en solution aqueuse assez particulier. La déprotonation de leurs deux sites acides provoque l'agrégation des molécules de tensioactifs en fibres, occasionnant la formation de gels gorgés d'eau.

Des applications médicales ou dans le domaine des cosmétiques peuvent être envisagées avec ce type de tensioactifs.

Des analyses supplémentaires de rhéologie seront réalisées pour déterminer plus précisément le comportement et la nature de ces gels.

Par ailleurs, l'étude physicochimique des tensioactifs trimodulaires de type II, avec la partie complexante intercalée entre la chaîne grasse et le module hydrophile est à poursuivre.

### **III.5. CONCLUSION DU CHAPITRE**

L'objectif de ce travail était de préparer de nouvelles molécules, dérivées de peptidoamines, combinant à la fois des propriétés tensioactives et complexantes. Nous avons mené en parallèle la synthèse de ces composés et leur étude physicochimique.

La première voie de synthèse s'est avérée très satisfaisante et a permis d'obtenir une famille de tensioactif de façon très simple. Les propriétés tensioactives et complexantes de ces composés dits bimodulaires ont été démontrées. Cependant des problèmes de solubilité dans l'eau nous ont amené à mettre au point une seconde stratégie. Celle-ci a permis d'augmenter l'hydrophilie des molécules grâce à l'incorporation d'une partie hydrophile, composée de motifs polyoxyéthyléniques. L'étude de ces premiers produits synthétisés dits trimodulaires, a montré que les propriétés complexantes n'ont pas été altérées mais que la présence d'une fonction ester rend la molécule fragile en solution. Nous avons donc synthétisé d'autres tensioactifs trimodulaires, où les différentes parties sont liées avec des fonctions amides, et étudié leurs propriétés physicochimiques.

**IV. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE  
PROTONATION DES  
PEPTIDOAMINES PAR  
RÉSONANCE MAGNÉTIQUE  
NUCLÉAIRE**





## **IV.1. INTRODUCTION**

Ce dernier chapitre est consacré à l'étude par RMN des réactions de protonation intervenant dans des solutions aqueuses de peptidoamines.

Ce chapitre est divisé en deux parties, la première traite des concepts de micro-protonation et de titrage RMN, la deuxième est consacrée à l'étude cinétique des échanges protoniques sur les fonctions amides des peptidoamines.

Toutes les expériences ont été faites en solution aqueuse dans des tubes de 5 mm, avec un capillaire contenant une référence externe, le dioxanne, et du D<sub>2</sub>O pour le verrouillage champ-fréquence.

## **IV.2. DÉTERMINATION DES CONSTANTES D'ACIDITÉ À L'AIDE DE TITRAGES RMN**

La résonance magnétique nucléaire est une technique efficace pour caractériser et quantifier la formation de "micro-espèces".

Au début des années 60, le titrage RMN était une méthode utilisée pour déterminer des constantes de protonation. Toutefois, cette technique présentait l'inconvénient d'utiliser des solvants deutérés comme le D<sub>2</sub>O. Aujourd'hui, les progrès techniques, notamment la suppression du pic de l'eau, permettent d'obtenir des valeurs réelles en solution aqueuse.

### **IV.2.1. Introduction**

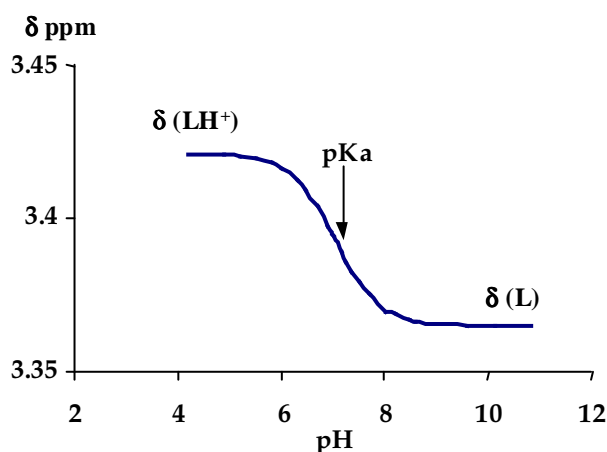
Le déplacement chimique d'un noyau actif en RMN est gouverné par plusieurs facteurs comme les effets de solvation, l'effet inductif des substituants proches, ou l'état de protonation des sites acides (ou basiques) environnants<sup>(101)</sup>.

La protonation d'une molécule a pour conséquence de modifier la densité électronique locale du site où elle intervient. Un noyau se trouvant au voisinage d'un site de protonation va donc être dans un environnement électronique différent selon l'état de protonation, et va présenter un déplacement chimique pour la forme acide différent de celui de la forme basique.

Cependant, la protonation de molécules en solution aqueuse est limitée par la diffusion, il s'agit donc de réactions très rapides par rapport à l'échelle des temps RMN. Ainsi sur un

spectre, pour un noyau donné, on observe une seule résonance pour les molécules protonées et déprotonées. Elle se situe à un déplacement chimique moyen, entre les deux déplacements extrêmes, pondéré par les fractions molaires de chaque espèce.

Dans le cas d'un monoacide ( $LH^+$ ), un titrage RMN se présente sous la forme d'une courbe de dosage à l'allure familière avec deux asymptotes et un point d'inflexion lorsque le pH est égal au pKa (**Figure IV-1**).



**Figure IV-1 : Allure de la courbe de titrage RMN d'un monoacide**

Dans les systèmes biologiques, la notion de micro-espèce est très importante. En effet, dans certaines réactions biochimiques hautement spécifiques, il existe de nombreuses possibilités de protonation. La complémentarité des réactifs n'est alors possible que lorsque les molécules participantes sont dans un état de protonation particulier<sup>(102)</sup>.

On parle de micro-espèces lorsqu'il existe, dans une même molécule, au moins deux fonctions acides (ou basiques) avec des acidités (ou basicités) proches ( $\Delta pK_a < 2$ ).

Les peptidoamines répondent à cette condition, en effet nous avons vu au chapitre II que le cycle imidazole et le groupement amino terminal de ces composés ont des pKa voisins. Ceci implique que les deux groupes peuvent se déprotoner quasi simultanément, comme on peut le voir sur le **Schéma IV-1**. La première ionisation peut avoir lieu soit sur le cycle imidazole, soit sur l'amine terminale, ce qui provoque l'apparition de deux micro-espèces qui conduisent, après une deuxième ionisation, à la même espèce totalement déprotonée.

Les micro-espèces sont des isomères de protonation, elles ne peuvent pas être séparées analytiquement et leurs caractéristiques ne peuvent être déterminées qu'indirectement.

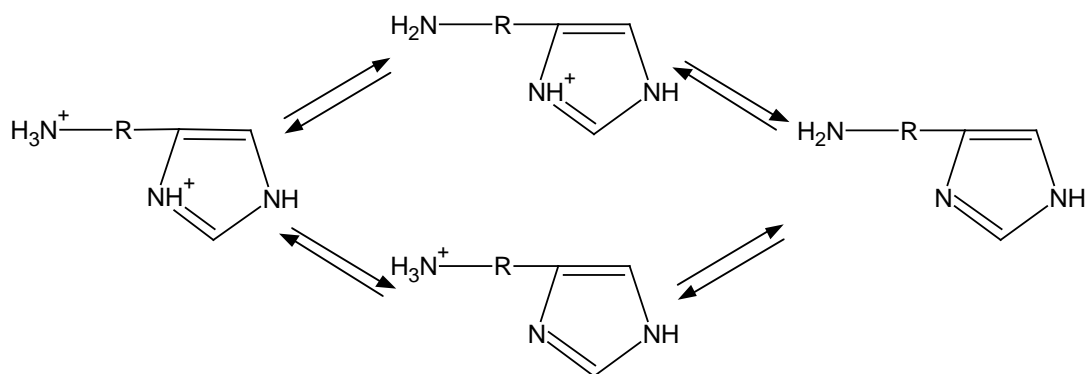


Schéma IV-1 : Ionisations microscopiques d'une peptidoamine

## IV.2.2. Détermination des macro- et des micro-constantes de protonation des peptidoamines par RMN

### IV.2.2.1. Considérations thermodynamiques

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II, les constantes d'acidité trouvées pour les pseudo-tripeptides tels que Gly-Gly-Ha et Ala-Gly-Ha impliquent une déprotonation alternative des deux fonctions acides de la molécule.

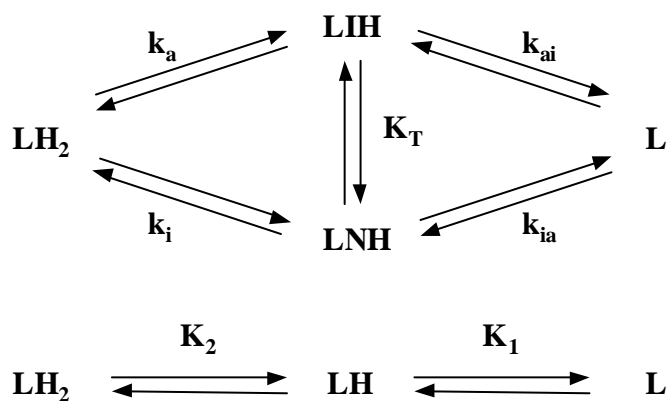
On retrouve la même chose avec le dérivé amidique de la glycyl-glycyl-histidine (Gly-Gly-His-C4, chapitre III) bien que l'écart entre les deux pKa soit un peu plus grand.

Pour les dérivés de la  $\beta$ -alanine, par suite d'une plus grande basicité de l'amine terminale, les deux processus de déprotonation sont bien séparés.

	Gly-Gly-Ha	Ala-Gly-Ha	Gly-Gly-His-C4	$\beta$ -Ala-His-C4
pK <sub>1</sub> (amino)	7,85	7,87	7,79	9,18
pK <sub>2</sub> (Im)	6,81	6,77	6,23	6,21
pK <sub>1</sub> - pK <sub>2</sub>	1,04	1,10	1,56	2,97

Tableau IV-1 : Constantes d'acidité de plusieurs peptidoamines

Pour les trois premières peptidoamines citées dans le **Tableau IV-1**, les deux chemins de déprotonation apparaissent en quantité notable. Le **Schéma IV-2** représente les différents équilibres de protonation d'une peptidoamine avec les constantes thermodynamiques correspondantes.



**Schéma IV-2 : Ionisations microscopiques d'une peptidoamine et micro-constantes de protonation**

Les termes employés sur le **Schéma IV-2** sont définis ci-dessous.

**LH<sub>2</sub>** : peptidoamine où les deux sites sont protonés

**LH** {   
**LIH** : micro-espèce où seule l'amine terminale est déprotonée   
**LNH** : micro-espèce où seul le cycle imidazole est déprotoné

**L** : peptidoamine où les deux sites sont déprotonés

**K<sub>1</sub>** et **K<sub>2</sub>** sont des macro-constantes de protonation

**k<sub>a</sub>**, **k<sub>i</sub>**, **k<sub>ai</sub>** et **k<sub>ia</sub>** sont des micro-constantes de protonation

Par définition,  $k_a = \frac{[\text{LIH}] [\text{H}^+]}{[\text{LH}_2]}$

et  $k_i = \frac{[\text{LNH}] [\text{H}^+]}{[\text{LH}_2]}$

Il est possible de déterminer les constantes de protonation macroscopiques et microscopiques, définies ci-dessus, à l'aide de titrages RMN.

Afin d'obtenir les relations entre les constantes, quelques lignes de calcul sont nécessaires. Pour faciliter la lecture de celles-ci, les équations importantes ont été mises en valeur.

#### IV.2.2.2. Établissement des relations entre les constantes thermodynamiques

La première déprotonation peut avoir lieu sur l'un ou sur l'autre site, l'espèce **LH** correspond à la somme des deux micro-espèces.

$$[\text{LH}] = [\text{LIH}] + [\text{LNH}] = (k_a + k_i) [\text{LH}_2] / [\text{H}^+]$$

On obtient ainsi une première corrélation entre les macro et les micro-constantes.

$$K_2 = k_a + k_i$$

Équation IV-1

Par définition,  $k_{ai} = [\text{L}] [\text{H}^+] / [\text{LIH}]$

$$\text{et } k_{ia} = [\text{L}] [\text{H}^+] / [\text{LNH}]$$

On peut obtenir l'espèce totalement déprotonée **L** par les deux chemins d'ionisation.

$$\text{D'où, } [\text{L}] = k_{ai} [\text{LIH}] / [\text{H}^+] = k_{ai} \cdot k_a [\text{LH}_2] / [\text{H}^+]^2$$

$$[\text{L}] = k_{ia} [\text{LNH}] / [\text{H}^+] = k_{ia} \cdot k_i [\text{LH}_2] / [\text{H}^+]^2$$

D'où une deuxième corrélation entre les macro et les micro-constantes.

$$K_1 \cdot K_2 = k_{ai} \cdot k_a = k_{ia} \cdot k_i$$

Équation IV-2

On peut retrouver cette relation par la thermodynamique en considérant les enthalpies libres des différentes réactions. Le **Schéma IV-2** implique que :

$$\Delta G_{ai} + \Delta G_a = \Delta G_{ia} + \Delta G_i$$

$$\text{d'où, } -RT \ln k_{ai} - RT \ln k_a = -RT \ln k_{ia} - RT \ln k_i$$

$$\text{on retrouve bien } k_{ai} \cdot k_a = k_{ia} \cdot k_i$$

Les deux espèces **LIH** et **LNH** sont liées par un équilibre tautomère défini par une constante d'équilibre  $K_T$ , elles figurent donc en proportions fixes dans la solution, indépendamment de la concentration ou du pH.

De la même façon, on peut déterminer les relations entre les constantes d'équilibre à l'aide des enthalpies libres.

$$\Delta G_T = \Delta G_a - \Delta G_i = \Delta G_{ia} - \Delta G_{ai}$$

$$\text{d'où, } -RT \ln K_T = -RT \ln k_a + RT \ln k_i = -RT \ln k_{ia} + RT \ln k_{ai}$$

et un rapport constant des deux tautomères.

$$\text{LIH} / \text{LNH} = K_T = k_a / k_i = k_{ia} / k_{ai}$$

**Équation IV-3**

### IV.2.2.3. Utilisation de la résonance magnétique nucléaire

Nous avons établi les équations reliant les constantes thermodynamiques entre elles, il reste maintenant à les déterminer. Nous allons prendre l'exemple de l'alanyl-glycyl-histamine (**Schéma IV-3**).

Selon le pH, une peptidoamine peut se trouver sous les quatre formes du **Schéma IV-2**. La concentration totale est égale à la somme des concentrations des quatre espèces **LH<sub>2</sub>**, **LIH**, **LNH** et **L**.

Pour un proton donné, il existe un déplacement  $\delta$  propre à chaque espèce et en échange rapide, le déplacement mesuré est une moyenne des 4 déplacements, pondérée par les fractions molaires  $x$  de chaque espèce (**Équation IV-4**).

### Équation IV-4

$$\delta_{\text{pH}} = X_{\text{LH}_2} \delta_{\text{LH}_2} + X_{\text{LH}} \delta_{\text{LH}} + X_{\text{LNH}} \delta_{\text{LNH}} + X_{\text{L}} \delta_{\text{L}}$$

En faisant varier le pH, on peut voir se déplacer les raies de résonance des noyaux proches des sites de protonation (**Figure IV-2**). Les changements de déplacements chimiques sont importants et chaque courbe de dosage de la **Figure IV-3** représente spécifiquement la déprotonation d'un groupe, soit l'imidazole (C2-H et C5-H), soit l'amine terminale (CH et CH<sub>3</sub> du résidu alanyl). Cette spécificité de site de protonation est particulièrement vraie en RMN du proton <sup>(102)</sup>

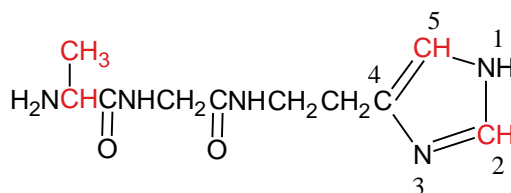
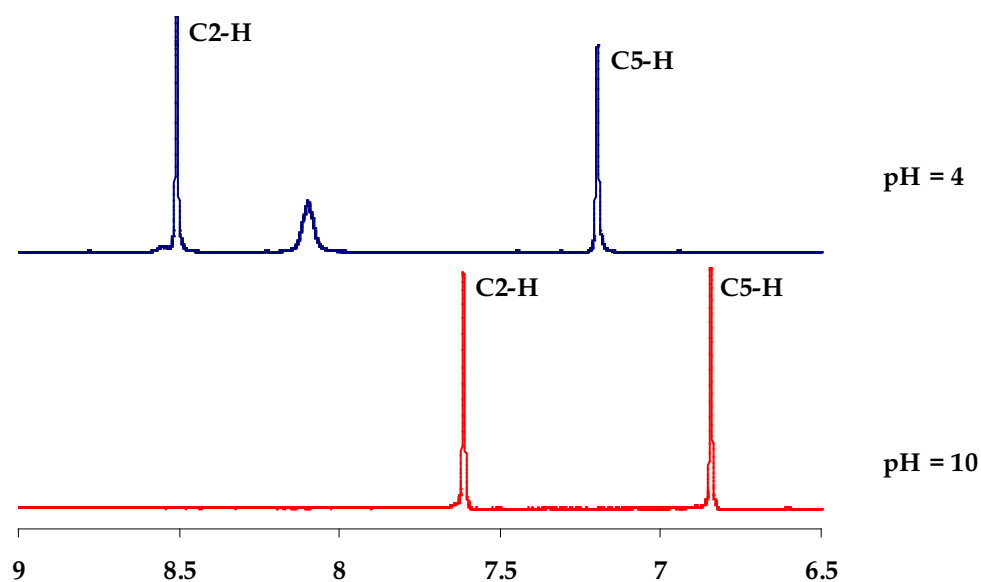
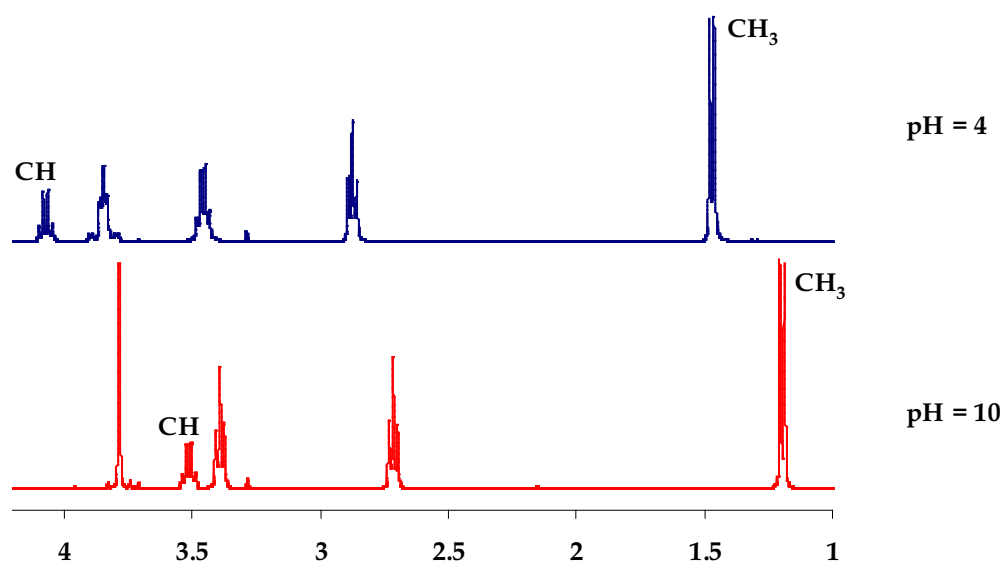


Schéma IV-3: Structure moléculaire de l'alanyl-glycyl-histamine



Protons C2-H et C5-H du cycle imidazole





**Protons CH et CH<sub>3</sub> du résidu alanyle**

**Figure IV-2 : Déplacement des raies de résonance des protons de l'alanyl-glycyl-histamine selon le pH**

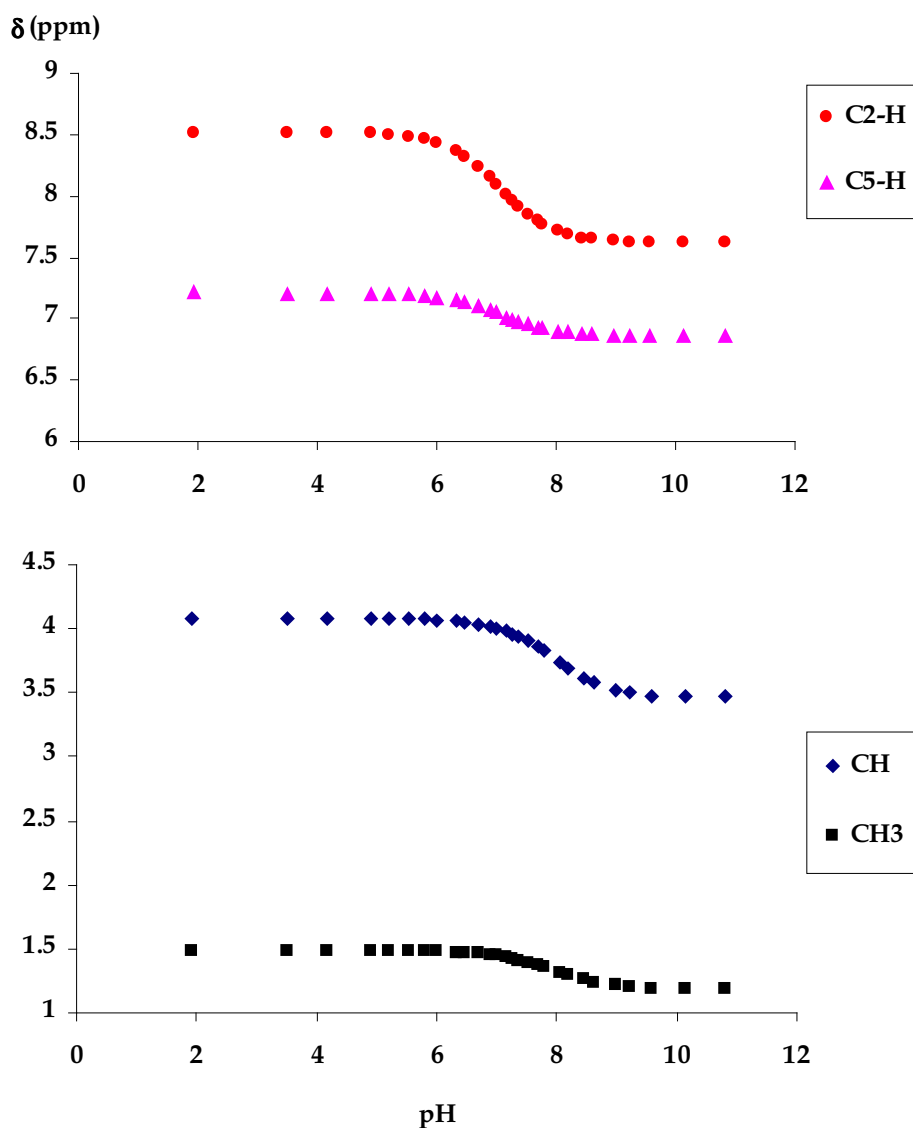
Les signaux des autres protons de la molécule se déplacent aussi mais sont plus éloignés des sites de protonation, donc moins spécifiques, nous ne les avons pas considéré.

À partir des courbes de titrage RMN, il est possible de calculer la fraction molaire d'espèces déprotonées pour chacun des sites.

Pour le cycle imidazole, on suppose que les déplacements chimiques des protons C2-H et C5-H ne sont pas perturbés par l'état de protonation de l'amine terminale, à cause de l'éloignement.

D'où 
$$\delta_{\text{LIH}}^i = \delta_{\text{LH}_2}^i \text{ et } \delta_{\text{LNH}}^i = \delta_{\text{L}}^i$$

Les exposants *i* indiquent qu'il s'agit de déplacements pour des noyaux appartenant au cycle imidazole.



**Figure IV-3 : Titrages RMN d'Ala-Gly-Ha : déplacements chimiques des protons en fonction du pH**

De ce fait l'Équation IV-4 est simplifiée et devient :

$$\delta_{\text{pH}}^i = (x_{\text{LH}_2} + x_{\text{LIH}}) \delta_{\text{LH}_2}^i + (x_{\text{LNH}} + x_{\text{L}}) \delta_{\text{L}}^i \quad \text{Équation IV-5}$$

Sachant que la somme des fractions molaires est égale à 1, on obtient l'Équation IV-6 qui permet de calculer, à partir des déplacements chimiques des protons C2-H et C5-H, la fraction molaire des espèces dont le cycle imidazole est déprotoné.

$$X_{\text{LNH}} + X_{\text{L}} = \frac{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{pH}}^i}{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{L}}^i} \quad \text{Équation IV-6}$$

En suivant le même raisonnement pour des noyaux proches de l'amine terminale tels que les protons CH et CH<sub>3</sub> du résidu alanyle, on obtient l'équation suivante.

$$X_{\text{LIH}} + X_{\text{L}} = \frac{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{pH}}^a}{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{L}}^a} \quad \text{Équation IV-7}$$

On peut aussi exprimer les fractions molaires de façon théorique à l'aide des constantes d'équilibre. À partir des relations établies précédemment et en mettant [LH<sub>2</sub>] en facteur on obtient :

$$[\text{LH}_2] + [\text{LIH}] + [\text{LNH}] + [\text{L}] = [\text{LH}_2] \cdot (1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2)$$

D'où les fractions molaires :

$$x_{\text{LIH}} = \frac{k_a / [\text{H}^+]}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}$$

$$x_{\text{LNH}} = \frac{k_i / [\text{H}^+]}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}$$

$$x_{\text{L}} = \frac{K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}$$

En réinjectant ces expressions dans l'Équation IV-6 et l'Équation IV-7, on obtient finalement deux formules permettant de relier les constantes d'équilibre aux déplacements chimiques expérimentaux.

$$\frac{k_i / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2} = \frac{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{pH}}^i}{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{L}}^i} \quad \text{Équation IV-8}$$

$$\frac{k_a / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2} = \frac{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{pH}}^a}{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{L}}^a} \quad \text{Équation IV-9}$$

#### IV.2.2.4. Méthode de calcul

##### IV.2.2.4.1. Calcul des constantes macroscopiques $K_1$ et $K_2$

En sommant l'Équation IV-8 et l'Équation IV-9, on obtient une relation dans laquelle il ne reste plus que deux inconnues, il s'agit des macro-constantes  $K_1$  et  $K_2$ .

$$\frac{K_2 / [\text{H}^+] + 2 \cdot K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2}{1 + K_2 / [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2 / [\text{H}^+]^2} = \frac{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{pH}}^i}{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{L}}^i} + \frac{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{pH}}^a}{\delta_{\text{LH}_2}^a - \delta_{\text{L}}^a} \quad \text{Équation IV-10}$$

On calcule ces constantes avec un ordinateur à l'aide d'un tableur (Excel).

On forme à tout pH le rapport  $\frac{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{pH}}^i}{\delta_{\text{LH}_2}^i - \delta_{\text{L}}^i}$ , pour les protons C2-H et C5-H du cycle

imidazole.

Les déplacements  $\delta_{\text{LH}_2}^i$  et  $\delta_{\text{L}}^i$  sont connus, respectivement aux extrémités acides et basiques des courbes de dosage.

On fait de même avec les déplacements chimiques des noyaux CH et CH<sub>3</sub> proches de l'amine

terminale, en formant le rapport  $\frac{\delta_{LH_2}^a - \delta_{pH}^a}{\delta_{LH_2}^a - \delta_L^a}$ .

Puis, la somme des deux rapports est ajustée en fonction du pH, selon l'Équation IV-10, en faisant varier  $K_1$  et  $K_2$ , ce qui fournit les valeurs des constantes macroscopiques (Tableau IV-2)

Composé	pK <sub>1</sub> (amino)	pK <sub>2</sub> (imidazole)
Ala-Gly-Ha	8,03	6,95

**Tableau IV-2 : Valeurs provisoires des macro-constantes obtenues pour Ala-Gly-Ha**

#### IV.2.2.4.2. Calcul des constantes microscopiques $k_i$ et $k_a$

La deuxième étape consiste à calculer les micro-constantes à partir des macro-constantes.  $k_i$  est obtenu à l'aide de l'Équation IV-8, en remplaçant  $K_1$  et  $K_2$  par les valeurs obtenues lors de la première étape.

$$k_i = \frac{\delta_{LH_2}^i - \delta_{pH}^i}{\delta_{LH_2}^i - \delta_L^i} \cdot ([H^+] + K_2 + K_1 \cdot K_2 / [H^+]) - K_1 \cdot K_2 / [H^+]$$

$k_i$  est calculé à chaque valeur du pH, une valeur provisoire est obtenue en faisant la moyenne sur tous les points et en enlevant les extrémités.

On fait de même avec  $k_a$  en utilisant l'Équation IV-9.

$$k_a = \frac{\delta_{LH_2}^a - \delta_{pH}^a}{\delta_{LH_2}^a - \delta_L^a} \cdot ([H^+] + K_2 + K_1 \cdot K_2 / [H^+]) - K_1 \cdot K_2 / [H^+]$$

On vérifie que  $K_2$  est bien égal à la somme  $k_i + k_a$  et on calcule  $k_{ai} = K_1 \cdot K_2 / k_a$

$$\text{et } k_{ia} = K_1 \cdot K_2 / k_i$$

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau IV-3.

Composé	$pK_i$	$pK_a$	$p(K_i + K_a)$	$pK_{ai}$	$pK_{ia}$
Ala-Gly-Ha	7,01	7,74	6,94	7,24	7,97

**Tableau IV-3 : Valeurs provisoires des micro-constantes obtenues pour Ala-Gly-Ha**

Ces valeurs sont dites provisoire car elles n'ont pas été toutes ajustées en même temps.

Les valeurs finales sont obtenues après une dernière étape définitive, où toutes les valeurs sont affinées à la fois (**Tableau IV-4**). On peut voir sur la **Figure IV-4** que les courbes de déplacement chimique sont remarquablement ajustées.

Composé	$pK_1$	$pK_2$	$pK_a$	$pK_{ai}$	$pK_{ia}$	$pK_i$
Ala-Gly-Ha	8,05	6,97	7,75	7,27	7,97	7,05

**Tableau IV-4 : Valeurs définitives de toutes les constantes de protonation d'Ala-Gly-Ha**

L'ensemble des micro-constantes permet de tracer le diagramme de répartition des espèces représenté sur la **Figure IV-5**.

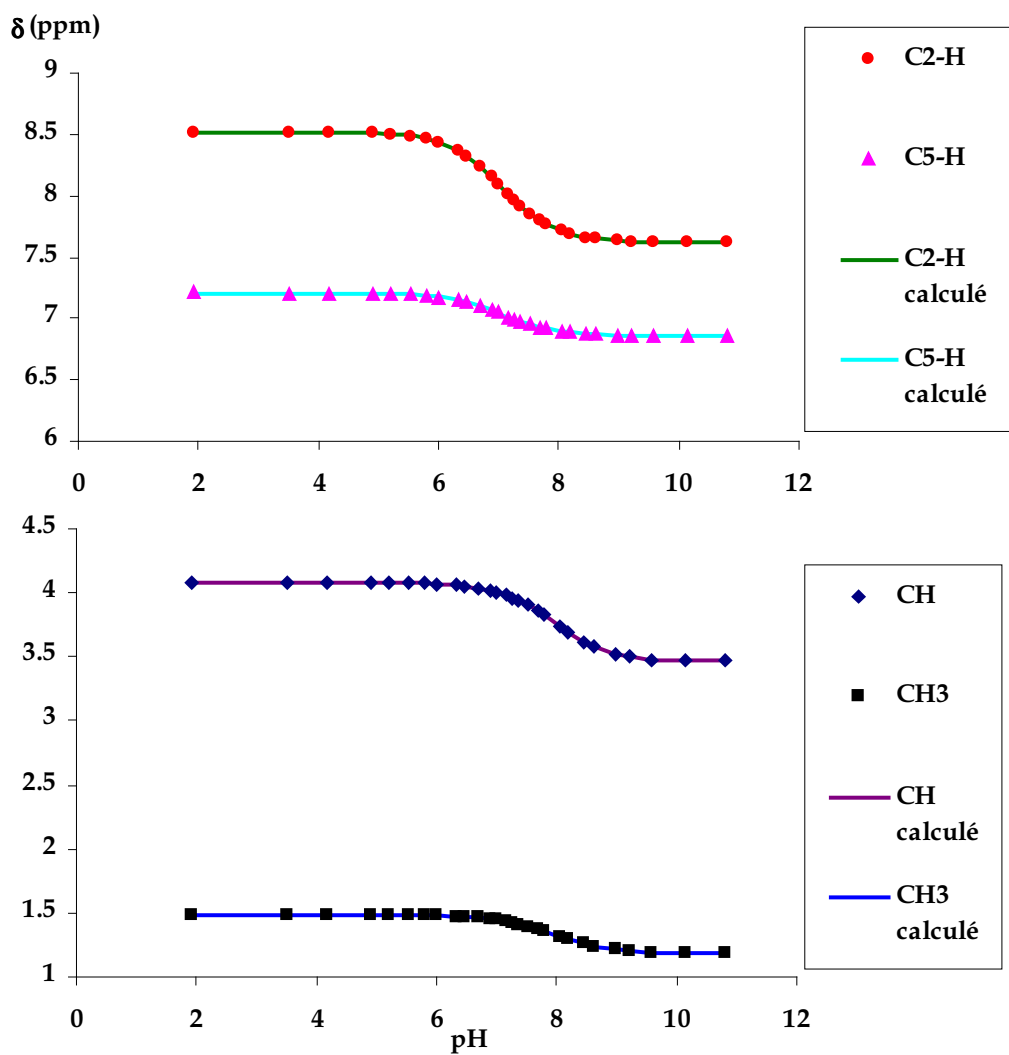


Figure IV-4 : Ajustement des courbes de déplacement chimique d'Ala-Gly-Ha

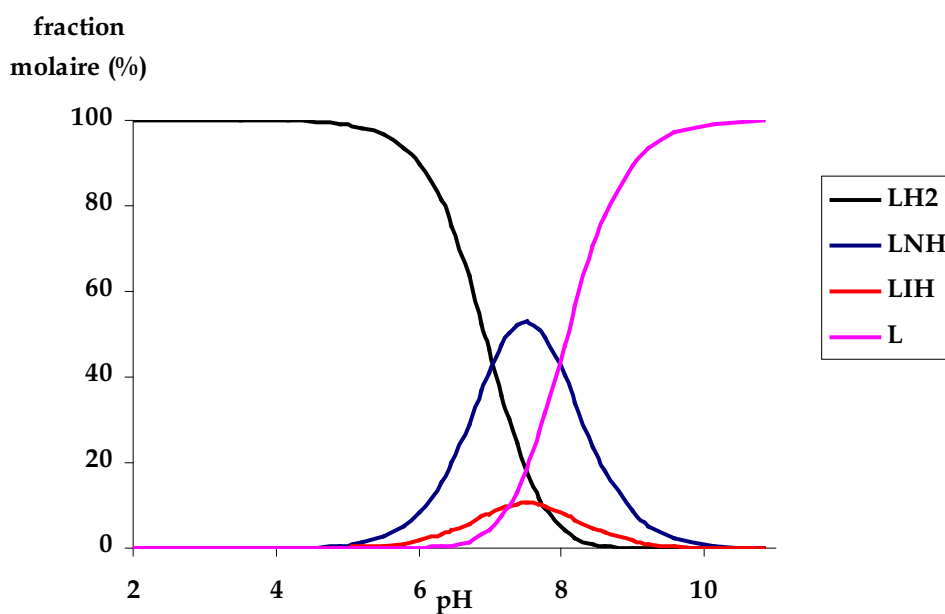


Figure IV-5 : Diagramme de répartition des micro-espèces d'Ala-Gly-Ha

La proportion des isomères de protonation ( $k_a/k_i$ ) est indépendante du pH et est égale à 0,195, ce qui montre que les deux micro-espèces sont en proportions notables simultanément (83% de déprotonation sur le cycle imidazole et 17% sur le groupement amino).

Le paramètre d'interactivité  $\Delta$  ( $\Delta = \text{pk}_{\text{ai}} - \text{pk}_i = \text{pk}_{\text{ia}} - \text{pk}_a = 0,22$ ) indique une faible interaction entre les deux sites de protonation. Lorsqu'un site est protoné, il porte une charge positive qui, par effet électrostatique, augmente l'acidité de l'autre site de 0,22 unités logarithmique.

Ce phénomène ne peut pas être attribué à un effet inductif à cause du nombre important de liaisons qui sépare les deux sites. La molécule doit probablement être repliée sur elle-même pour induire cet effet. Nous avons envisagé une recristallisation pour tenter de confirmer cette hypothèse.

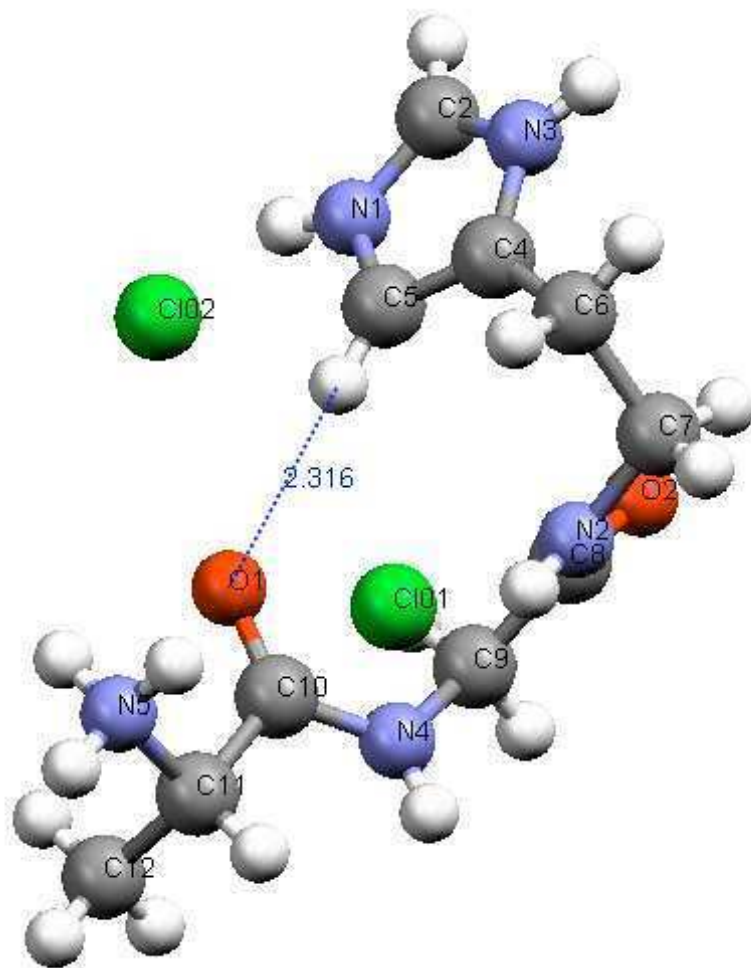
La cristallisation a été obtenue à partir d'une solution de dihydrochlorure d'alanyl-glycyl-histamine de concentration  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , dont le pH a été ajusté à 2. Le volume de la solution a été réduit par lente évaporation à température ambiante, des petits cristaux transparents sont apparus au bout de quelques semaines.

La structure de la molécule représentée sur la **Figure IV-6** confirme la présence d'une interaction intramoléculaire peu commune, entre un atome d'hydrogène du cycle imidazole et l'atome d'oxygène du carbonyle du résidu alanyle. La distance entre les deux atomes est relativement courte ( $2,316 \text{ \AA}$ )

Pour former une liaison hydrogène  $\text{X-H}\cdots\text{A}$ , il n'est pas nécessaire que l'atome d'hydrogène soit porté par un atome X très électronégatif tel qu'un oxygène un azote ou un halogène..., la seule condition nécessaire est que la liaison X-H soit légèrement polarisée. Il existe donc des liaisons hydrogènes impliquant des groupes C-H ou P-H<sup>(103)</sup>.

Dans notre cas, on peut supposer que la liaison C5-H est suffisamment polarisée du fait de la résonance à l'intérieur du cycle imidazole. Une liaison hydrogène est donc possible, elle permet un repliement de la molécule qui rapproche les deux sites de protonation et de ce fait, lorsque l'un de ces deux sites est déprotoné, l'acidité de l'autre site est un peu abaissée.





**Figure IV-6 : Structure cristalline du dihydrochlorure d'alanyl-glycyl-histamine**

Les paramètres cristallographiques, les distances et les angles de liaisons de cette structure sont rassemblés respectivement dans le **Tableau IV-5**, le **Tableau IV-6** et le **Tableau IV-7**.

Formule	$C_{10}H_{19}O_2N_5Cl_2$
Masse molaire	312,20 g.mol <sup>-1</sup>
Système cristallin	Monoclinique
a	7,625 Å
b	7,438 Å
c	13,729 Å
$\beta$	105,265 °
Volume de la maille	778,64 Å <sup>3</sup>
Nombre de molécules dans la maille	2
Masse volumique	1,332 g.cm <sup>-3</sup>
Groupe spatial	P2 <sub>1</sub>

**Tableau IV-5 : Paramètres cristallographiques de la structure Ala-Gly-Ha, 2HCl**

Atome 1	Atome 2	Distance (Å)	Atome 1	Atome 2	Distance (Å)
N1	C2	1,317	O1	C10	1,222
N1	C5	1,371	O2	C8	1,243
N2	C7	1,456	C4	C5	1,358
N2	C8	1,331	C4	C6	1,486
N3	C2	1,316	C7	C6	1,525
N3	C4	1,388	C8	C9	1,507
N4	C9	1,456	C10	C11	1,525
N4	C10	1,343	C11	C12	1,516
N5	C11	1,492			

**Tableau IV-6 : Distances des liaisons dans le cristal Ala-Gly-Ha, 2HCl**

Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle (°)
N1	C2	N3	108,02	N2	C8	O2	121,87
C2	N3	C4	109,96	C9	C8	O2	118,93
N3	C4	C5	105,22	C8	C9	N4	116,58
C4	C5	N1	107,29	C9	N4	C10	120,01
C5	N1	C2	109,51	N4	C10	O1	124,05
C5	C4	C6	130,84	N4	C10	C11	115,31
N3	C4	C6	123,88	C11	C10	O1	120,61
C4	C6	C7	113,43	C10	C11	N5	107,85
C6	C7	N2	111,69	C12	C11	N5	110,00
C7	N2	C8	122,77	C10	C11	C12	110,21

**Tableau IV-7 : Angles de liaisons dans le cristal Ala-Gly-Ha, 2HCl**

Pour compléter l'étude sur la déprotonation des peptidoamines, nous avons déterminé par RMN les constantes macroscopiques et microscopiques d'une autre peptidoamine Gly-Gly-Ha ainsi que celles de son dérivé amidique à chaîne courte, Gly-Gly-His-C4. Pour ces deux expériences, nous avons considéré les déplacements chimiques des protons C2-H, C5-H et CH<sub>2</sub> du résidu glycyle du côté N-terminal. Les courbes de déplacement chimique en fonction du pH et leur ajustement sont représentées sur la **Figure IV-7** et la **Figure IV-8**. Les peptidoamines tensioactives n'ont pas pu être étudiées du fait de leur précipitation (chapitre III).

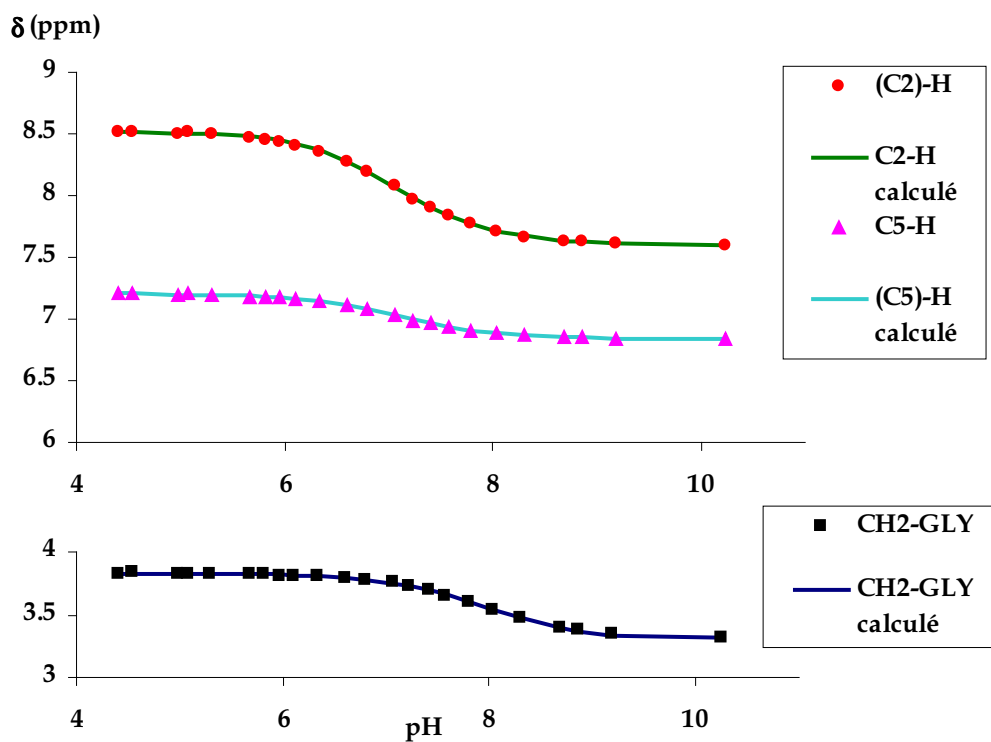


Figure IV-7 : Déplacements chimiques des protons de Gly-Gly-Ha en fonction du pH

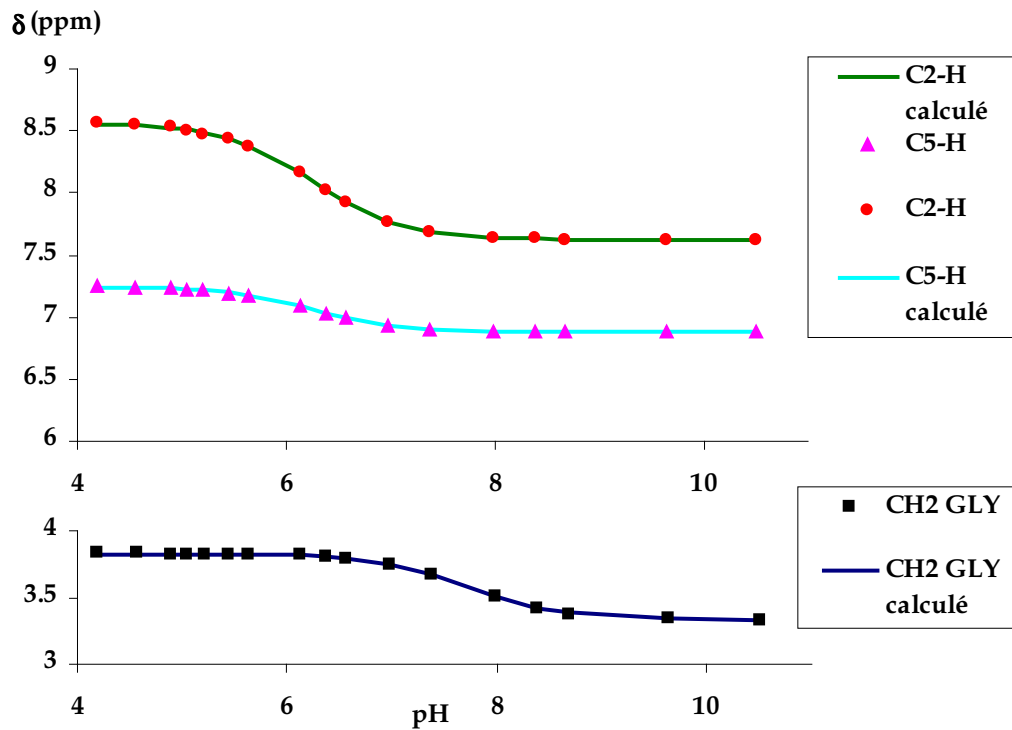


Figure IV-8 : Déplacements chimiques des protons de Gly-Gly-His-C4 en fonction du pH

Les valeurs des macro-constantes sont rassemblées dans le **Tableau IV-8**, comparées à celles obtenues par potentiométrie et les micro-constantes, sont réunies dans le **Tableau IV-9**.

méthode	macro-constante	Ala-Gly-Ha	Gly-Gly-Ha	Gly-Gly-His-C4
potentiométrie	pK <sub>1</sub>	7,87	7,85	7,79
	pK <sub>2</sub>	6,77	6,81	6,23
RMN	pK <sub>1</sub>	8,05	8,06	7,75
	pK <sub>2</sub>	6,97	6,96	6,24

**Tableau IV-8 : Valeurs des macro-constantes déterminées par deux méthodes pour plusieurs peptidoamines**

micro-constante	Ala-Gly-Ha	Gly-Gly-Ha	Gly-Gly-His-C4
pK <sub>a</sub>	7,75	7,66	7,76
pK <sub>ai</sub>	7,27	7,36	6,23
pK <sub>ia</sub>	7,97	7,96	7,73
pK <sub>i</sub>	7,05	7,06	6,25

**Tableau IV-9 : Valeurs des micro-constantes pour plusieurs peptidoamines**

Pour les deux molécules dérivées de l’histamine, les valeurs déterminées par RMN sont assez proches de celles obtenues par potentiométrie. Par contre, elles sont quasiment identiques pour Gly-Gly-His-C4. Pour cette dernière molécule, la déprotonation sur l’amine terminale se fait dans une proportion nettement plus faible que pour les deux autres, on peut le voir sur le diagramme de répartition des espèces en fonction du pH, représenté sur la **Figure IV-10**. Il y a 97 % de déprotonation sur le cycle imidazole et seulement 3% sur le groupement amino.

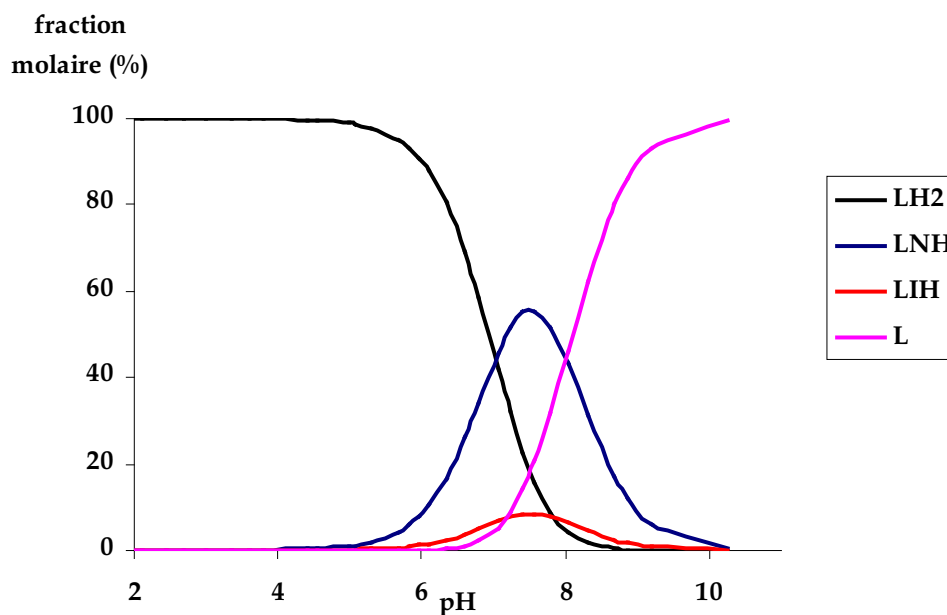


Figure IV-9 : Diagramme de répartition des micro-espèces de Gly-Gly-Ha

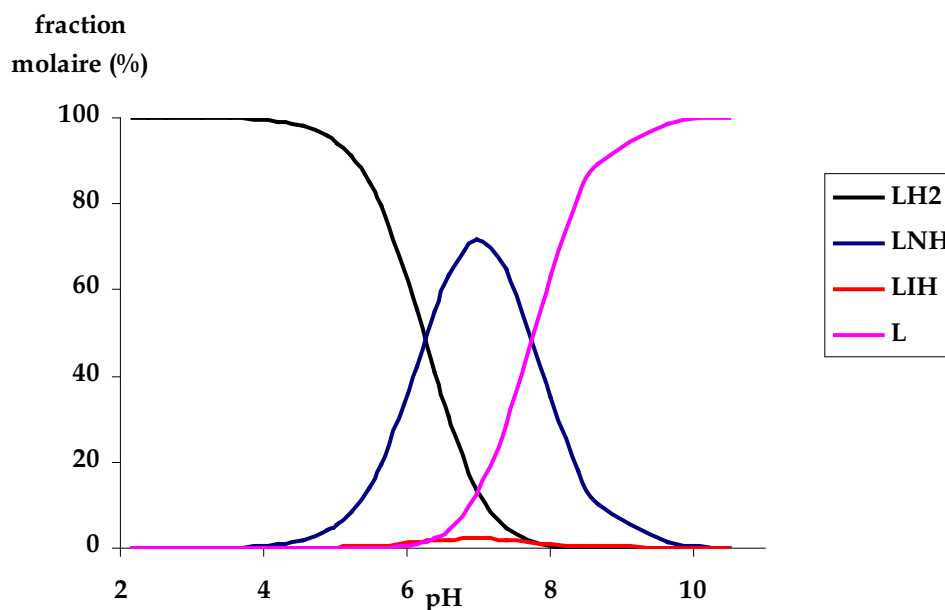


Figure IV-10 : Diagramme de répartition des micro-espèces de Gly-Gly-His-C4

### IV.2.3. Conclusion

L'étude de la protonation de plusieurs peptidoamines a montré l'existence d'une déprotonation alternative qui entraîne l'apparition de micro-espèces. Ce résultat est particulièrement intéressant par rapport au premier site de coordination dans l'espèce MLH. Il

suggère en effet la possibilité de coordination métallique par le cycle imidazole mais également par le groupement amino. Cette étude de la micro-déprotonation ne rend compte en fait que de la basicité globale du cycle imidazole. Celle-ci est pourtant la conséquence de la basicité des deux atomes azotes (N1 et N3), il faudrait donc considérer la tautomérisation de la molécule et établir un système à trois sites de déprotonation avec deux protons titrables. Une étude par RMN  $^{14}\text{N}$  permettrait de déterminer la basicité individuelle des deux atomes d'azote pour estimer la proportion tautomérique. La connaissance de cette propriété serait très importante compte tenu de l'importance du cycle imidazole dans de nombreux processus biologiques.

## IV.3. TRANSFERTS PROTONIQUES SUR LES FONCTIONS AMIDES DES PEPTIDOAMINES

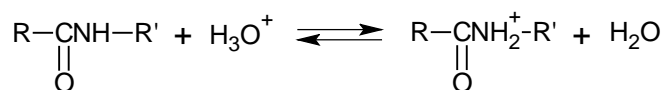
### IV.3.1. Introduction

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude par RMN, des transferts protoniques intervenant sur les fonctions amides des peptidoamines.

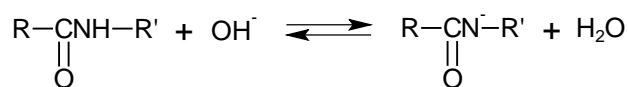
Une telle étude sur des composés peptidiques (ou dérivés de peptides) dans l'eau peut donner des informations intéressantes sur la structure primaire, la forme et la force des interactions avec le solvant. Par ailleurs, la connaissance des vitesses d'échange des protons des fonctions amides informe sur l'acidité de ceux-ci et peut permettre de mieux comprendre les conformations de certains polypeptides.

Nous avons réalisé cette étude sur les pseudo-peptides dérivés de l'histamine (chapitre II). Nous avons considéré à nouveau les dipeptides Ala-Gly-Ha et Gly-Gly-Ha et nous avons synthétisé le pseudo-térapeptide Gly-Gly-Gly-Ha pour étudier l'évolution du transfert protonique le long d'une chaîne peptidique. Nous avons également étudié le cas des dérivés amidiques de l'histidine, les tensioactifs, Gly-Gly-His-C10 et Ala-Gly-His-C12, ainsi que les non-tensioactifs, Gly-Gly-His-C4 et Ala-Gly-His-C4. Les molécules comportant un résidu alanyle ont été synthétisées selon la même procédure que les tensioactifs bimodulaires du chapitre III.

Une fonction amide possède un doublet libre sur l'atome d'azote et peut donc capter un proton, mais cette réaction impose un pH très acide ( $\text{pH} < 0$ ).



Nous nous sommes intéressés à l'autre possibilité où l'amide peut céder son proton à l'eau ou à une base présente dans le milieu (ex :  $\text{OH}^-$ )



L'acidité du milieu détermine la vitesse d'échange de ce proton avec la base attaquante. On peut mesurer la durée de vie des espèces entre lesquelles s'opère le transfert en étudiant la



déformation des spectres de RMN, à condition d'avoir une vitesse mesurable à l'échelle de temps de cette technique

La corrélation entre cette durée de vie et l'acidité du milieu permet d'atteindre la cinétique du transfert et de calculer les constantes de vitesse correspondantes.

La méthode que nous avons utilisée, pour aborder cette étude cinétique, est de faire varier le pH des solutions, pour modifier la durée de vie  $\tau$  des espèces entre lesquelles s'opère le transfert.

Pour faire cette étude, nous avons suivi l'évolution des raies de résonance des protons voisins des fonctions amides.

Dans un premier temps, nous allons rappeler la théorie de l'échange entre deux sites, ensuite nous verrons les types de spectres que nous avons rencontrés et enfin nous présenterons les résultats obtenus avec les peptidoamines étudiées.

#### **IV.3.2. Théorie de l'échange entre deux sites A et B <sup>(104)</sup>**

Prenons l'exemple d'une molécule peptidique où un méthylène ( $\text{CH}_2$ ) se trouve en  $\alpha$  du NH d'une fonction amide.

En échange lent, dès que le proton d'un amide quitte l'atome d'azote, après y être resté un temps  $\tau$ , il est immédiatement remplacé par un autre proton dont le spin est parallèle ou antiparallèle au spin du proton initial. De ce fait, par suite du couplage entre les protons  $\text{CH}_2$  et NH, les protons méthyléniques possèdent deux fréquences de résonance  $\nu_A$  et  $\nu_B$ , selon l'état de spin du proton NH. Ces deux fréquences portent le nom de sites nucléaires et les changements de fréquence, celui d'échange de sites.

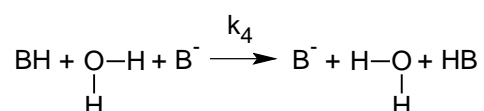
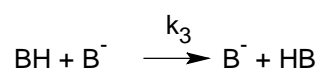
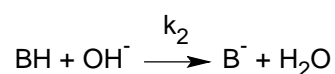
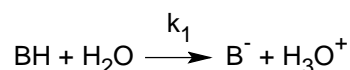
Lorsque l'échange s'accélère, les spectres se déforment pour coalescer en un pic large unique de fréquence moyenne  $(\nu_A + \nu_B)/2$ . Enfin, quand l'échange est rapide, on observe une raie aussi fine que s'il n'y avait pas d'échange.

Le signal évolue donc, selon la vitesse d'échange, qui dépend du pH, d'un doublet à un singulet à la moyenne pondérée des deux sites de départ.

Pour étudier la cinétique d'échange, il est nécessaire d'accomplir les expériences dans une zone de pH où les spectres sont déformés. Cette zone, appelée fenêtre spectrale, est généralement limitée à deux unités de pH.

À l'aide du programme **ECHGN**, écrit en VISUAL BASIC par le professeur Delpuech, dont les travaux sur les transferts protoniques ont été nombreux <sup>(105, 106, 107, 108)</sup>, nous pouvons déterminer par simulation des spectres expérimentaux, la durée  $\tau$ .

Les travaux de Grunwald, dans le domaine des transferts protoniques en milieu aqueux, sur des sels d'ammonium, ont mis en évidence les mécanismes par lesquels l'échange peut avoir lieu.



La vitesse d'échange est donnée par la somme des vitesses de ces différents équilibres

$$\frac{d[\text{BH}]}{dt} = k_1 [\text{BH}] + k_2 [\text{BH}][\text{OH}^-] + k_3 [\text{BH}][\text{B}^-] + k_4 [\text{BH}][\text{B}^-]$$

La durée de vie moyenne d'une espèce participant à l'échange est liée à la concentration de l'espèce et à sa vitesse de formation selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{d[\text{BH}]}{dt} \cdot \frac{1}{[\text{BH}]}$$

soit

$$\frac{1}{\tau} = k_1 + \frac{k_2 K_e}{[\text{H}^+]} + \frac{(k_3 + k_4) [\text{BH}] K_a}{[\text{H}^+]} \quad \text{Équation IV-11}$$

$K_e$  = constante d'autoprotolyse de l'eau

$K_a$  = constante d'acidité de la fonction amide

Dans notre cas, **BH** représente une fonction amide NH et **B<sup>-</sup>** une fonction amide déprotonée N<sup>-</sup>.

### IV.3.3. Rappels sur quelques types de spectres RMN

L'analyse d'un spectre RMN, en vue de faire une étude cinétique, se fait dans un premier temps hors de la fenêtre spectrale. Les paramètres d'un spectre en absence d'échange portent le nom de paramètres statiques (nombre de sites, fréquences des résonances, demi-largeurs de raies à mi-hauteur, intensités des raies). Ils sont nécessaires pour établir le spectre de façon théorique. Ces paramètres peuvent être déterminés à l'aide du programme **ECHGN**.

L'analyse des spectres protoniques des peptidoamines nous a fait rencontrer les différentes situations décrites ci-dessous.

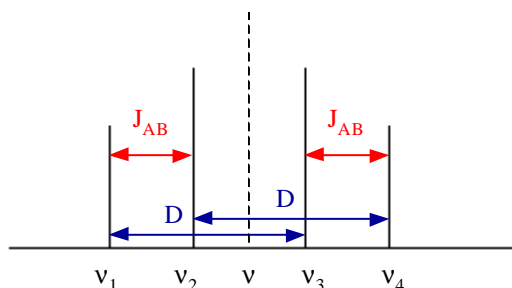
#### IV.3.3.1. Spectres de type AB

Il s'agit d'un cas où deux protons sont fortement couplés, la constante de couplage est du même ordre que la différence des fréquences de résonance ( $J_{AB} \approx \nu_A - \nu_B$ ).

Le spectre observé contient 4 raies avec les grandeurs caractéristiques suivantes :

$$\nu_1 - \nu_3 = \nu_2 - \nu_4 = D \quad \text{et} \quad \nu_1 - \nu_2 = \nu_3 - \nu_4 = J_{AB}$$

L'allure du spectre est déterminée par les deux paramètres mesurables  $D$  et  $J$ , suffisants pour les échanges. Son emplacement nécessite la connaissance de la fréquence  $\nu$  (**Figure IV-11**).



**Figure IV-11 : Allure et caractéristiques d'un spectre de type AB**

#### IV.3.3.2. Spectres de type ABX

Dans ce cas, il s'agit de 3 protons dont deux sont fortement couplés (A et B), avec une fréquence de résonance pour le noyau X très différente de celle des deux autres noyaux.

$$(J_{AB} \approx \nu_A - \nu_B \quad \text{et} \quad J_{AX}, J_{BX} \ll (\nu_A - \nu_X), (\nu_B - \nu_X)).$$

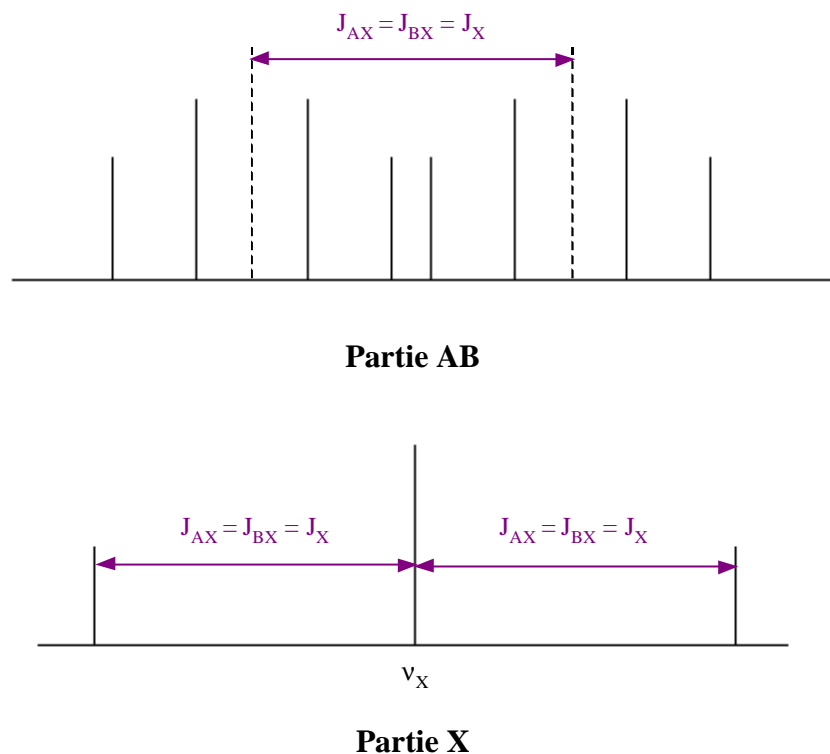
Le spectre comporte une partie AB et une partie X nettement séparées et étudiables de manière autonome.

La partie AB se compose de 2 sous-spectres  $AB^+$  et  $AB^-$ , correspondant à chacun des deux états de spin de X, décalés l'un par rapport à l'autre de  $(J_{AX} + J_{BX})/2$ .

La partie AB contient donc 8 raies, avec possibilité d'enchevêtrement, d'intensité totale double de celle de la partie X.

La partie X est un multiplet symétrique à 4 raies, centré sur  $\nu_X$ .

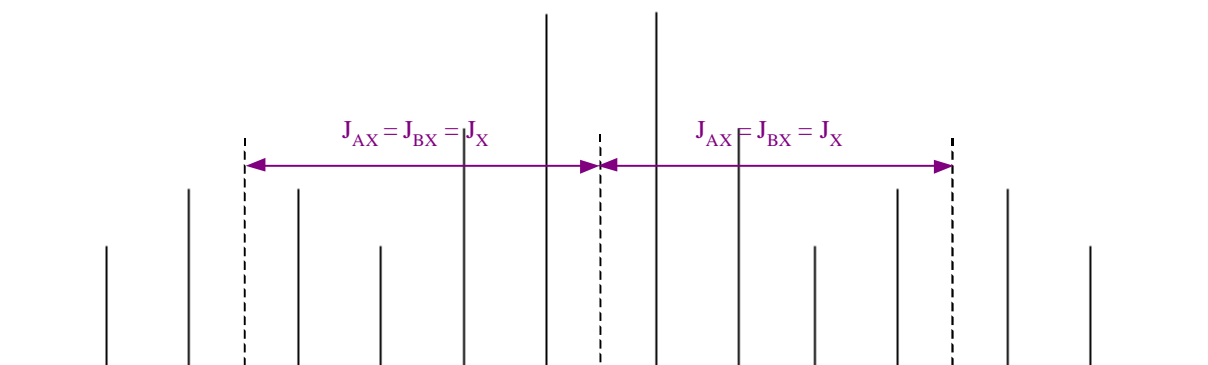
Un cas particulier important est celui où  $J_{AX} = J_{BX} = J_X$ . La partie X est alors un triplet symétrique d'intensités relatives 1, 2, 1, exactement comme si le spectre était de type  $AX_2$ . La partie AB se compose de deux sous-spectres identiques, décalés de  $J_X$  (**Figure IV-12**).



**Figure IV-12 : Allure et caractéristiques d'un spectre de type ABX avec  $J_{AX} = J_{BX}$**

### IV.3.3.3. Spectres de type $ABX_2$

Prenons comme exemple le cas particulier où  $J_{AX} = J_{BX} = J_X$ . Dans ce cas, la partie AB se compose de 3 sous-spectres AB de mêmes caractéristiques mais d'intensités globales relatives 1, 2, 1, comme pour la partie A d'un spectre  $AX_2$  (**Figure IV-13**).



**Figure IV-13 : Allure et caractéristiques de la partie AB d'un spectre de type ABX avec  $J_{AX} = J_{BX}$**

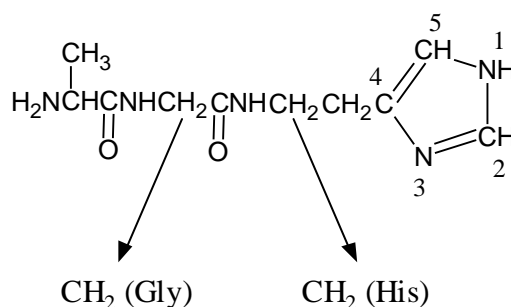
La partie X est encore un simple triplet d'intensités relatives 1, 2,1, comme pour la partie X d'un spectre ABX.

Ces deux types de spectre (ABX et ABX<sub>2</sub>) seront eux-mêmes dupliqués si on leur adjoint un proton supplémentaire M, couplé à AB (NH avant échange par exemple). Les parties AB faisant suite à ce couplage posséderont ainsi 16 ou 24 raies, selon le type de spectre.

### IV.3.4. Description des spectres observés

#### IV.3.4.1. Cas de l'alanyl-glycyl-histamine

Nous avons étudié les échanges intervenant sur les deux fonctions amides de la molécule. Nous avons basé nos mesures sur la déformation des signaux correspondant aux protons situés en  $\alpha$  des atomes d'azote (**Schéma IV-4**).



#### Schéma IV-4 : Notation des protons considérés lors de l'étude de l'alanyl-glycyl-histamine

Une étude réalisée avec un spectromètre 600 MHz a permis une analyse détaillée du spectre statique de l'alanyl-glycyl-histamine. Ce spectre a été enregistré à  $\text{pH} = 2,5$  en absence d'échange.

Le spectre de la partie  $\text{NH-CH}_2$  de la glycine est de type ABX, car les protons méthyléniques sont inéquivalents par suite de l'existence d'un carbone asymétrique sur le résidu alanyl adjacent.

Les protons méthyléniques A et B fournissent un spectre composé de deux sous-spectres AB identiques, du fait du couplage avec le proton NH, avec  $J_{\text{AX}} = J_{\text{BX}} = 6,23 \text{ Hz}$ . Le spectre est donc composé de 8 raies.

Les fréquences centrales des deux spectres AB varient avec le pH. Comme on a pu le voir précédemment avec les titrages RMN, chaque spectre AB résulte d'une moyenne pondérée du spectre AB de la forme déprotonée ( $\text{NH}_2$ ) et de la forme protonée ( $\text{NH}_3^+$ ).

Ceci est dû à la protonation de l'amine terminale qui déblindé les protons méthyléniques ( $\text{CH}_2$ ) soumis au champ électrique de  $\text{NH}_3^+$ .

L'un des protons, noté A, est nettement plus déblindé au cours de la protonation que l'autre, noté B (**Figure IV-14**) (l'allure des points en milieu très acide est due à la protonation du carbonyle de l'amide).

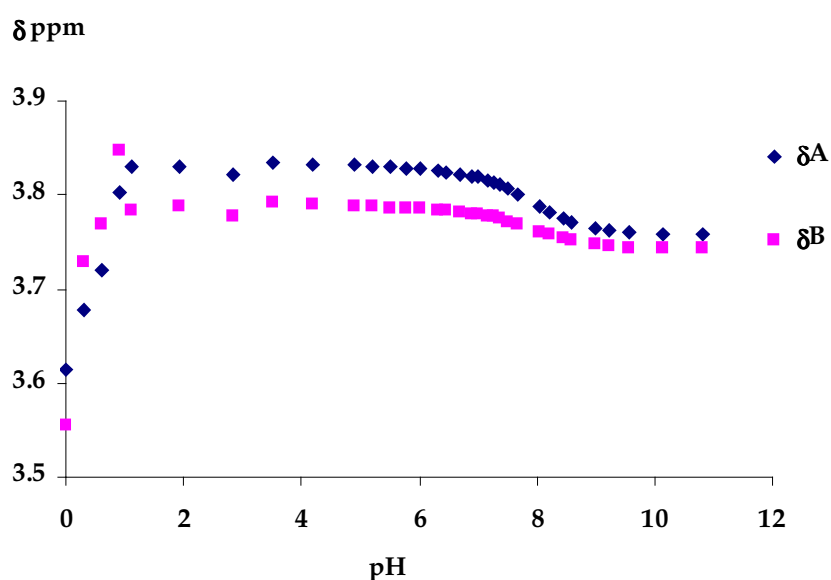
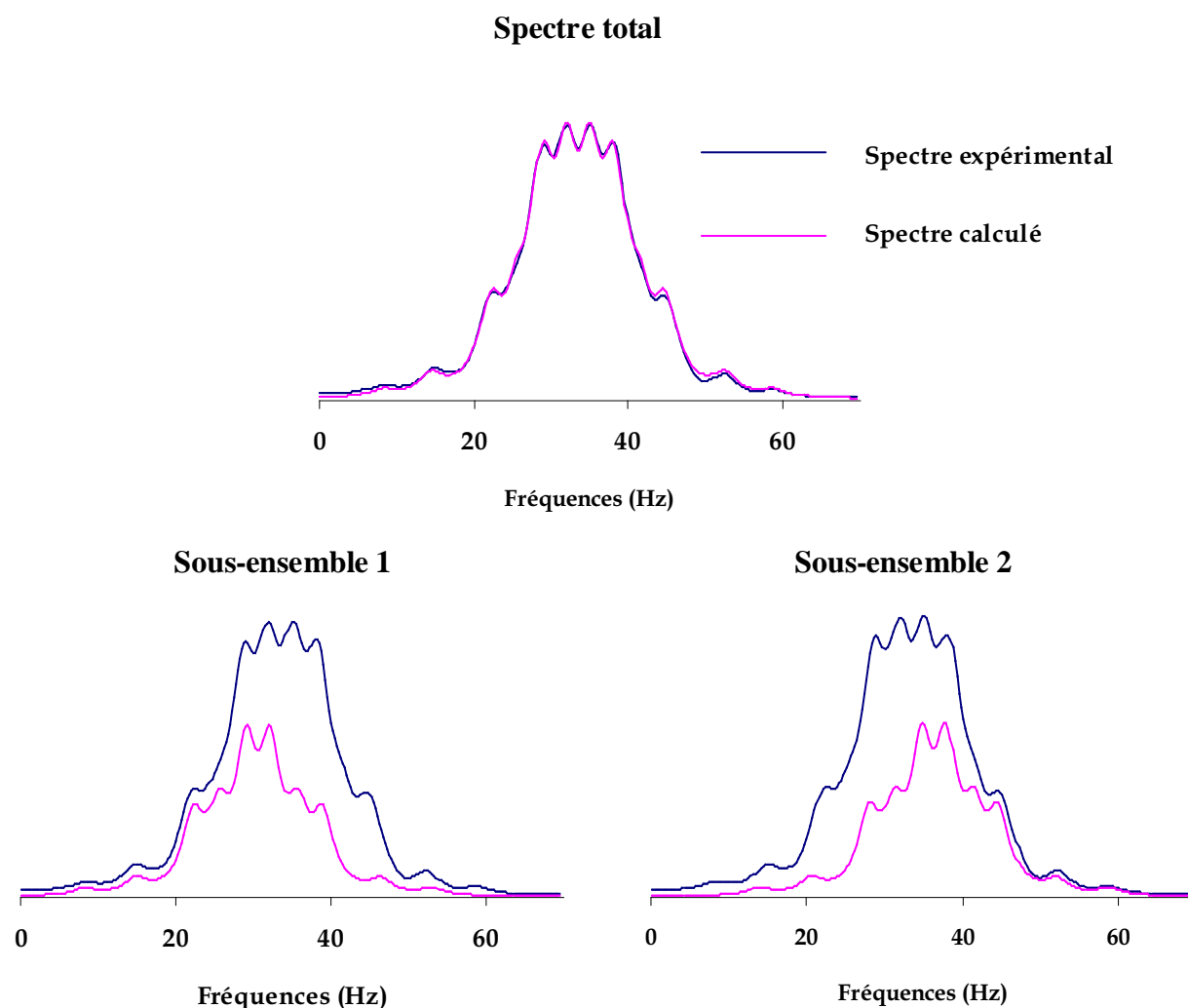


Figure IV-14 : Déplacements individuels des protons méthyléniques A et B

Les protons du CH<sub>2</sub> (His) montrent une légère inéquivalence. Le spectre de la partie NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> est donc de type ABX<sub>2</sub>M, d'où un spectre à 24 raies pour la partie AB. La déconvolution en 6 sous-spectres AB a été réalisée, confirmant l'inéquivalence des deux protons méthyléniques (**Figure IV-15**). Les deux spectres ABX<sub>2</sub> coalescent raie à raie, en un seul, par élévation du pH.

L'inéquivalence inhabituelle des protons méthyléniques aurait pu résulter d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le NH du résidu glycyle et le C=O du résidu alanyl, formant ainsi un gamma turn <sup>(109)</sup>. Cependant, l'étude du spectre de la glycyl-glycyl-histamine a permis de rejeter cette hypothèse. En effet, pour cette molécule, le CH<sub>2</sub> (His) se présente sous l'apparence d'un quadruplet qui résulte de l'enchevêtrement de deux triplets, partiellement superposés. Ceux-ci coalescent en un seul triplet, par élévation du pH. Il s'agit donc d'un spectre A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>M qui ne présente pas d'inéquivalence.

L'inéquivalence des protons méthyléniques du résidu glycyle, observée avec l'alanyl-glycyl-histamine, est donc due à la présence d'un carbone asymétrique, pourtant éloigné de deux liaisons peptidiques.



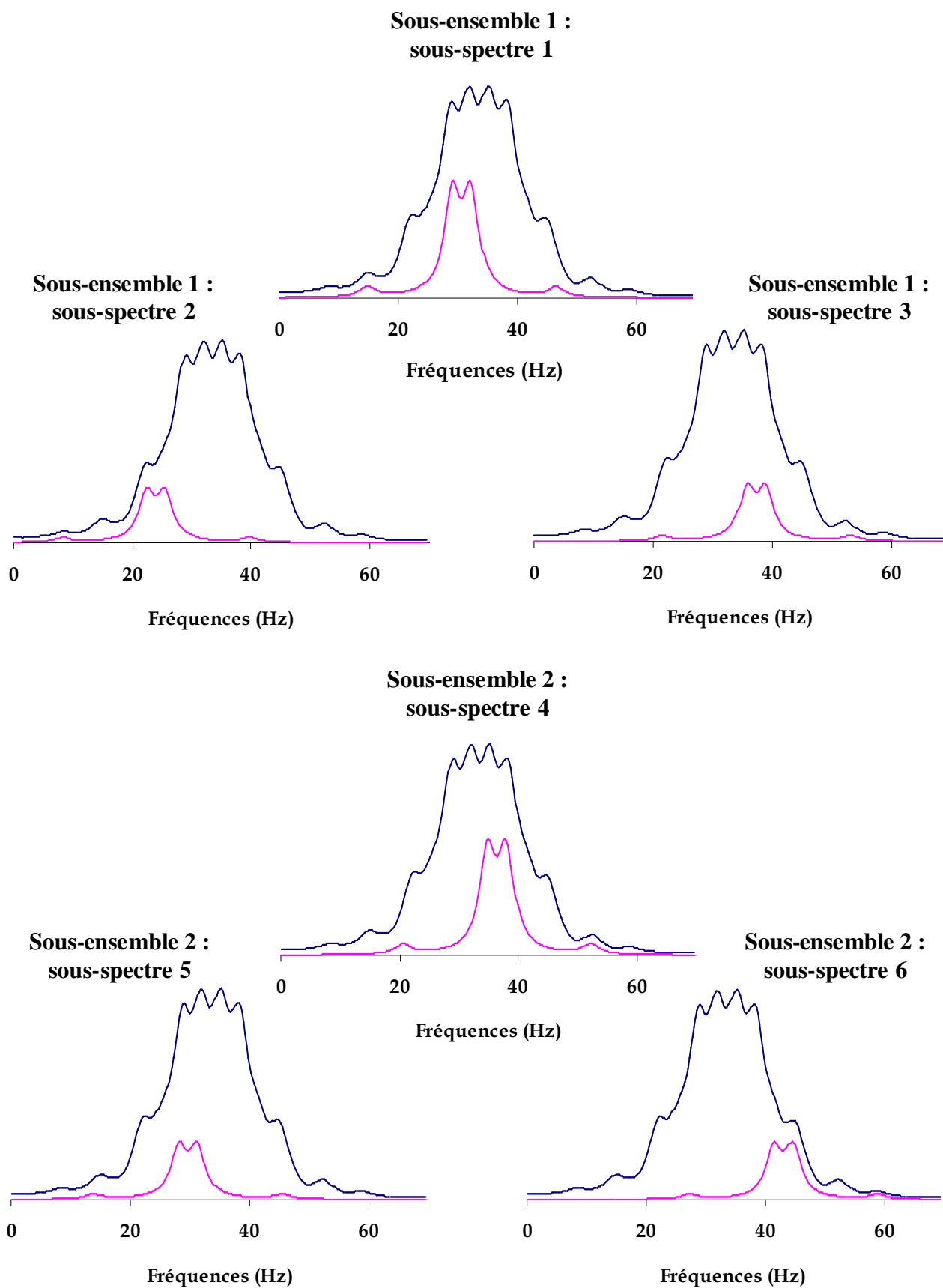


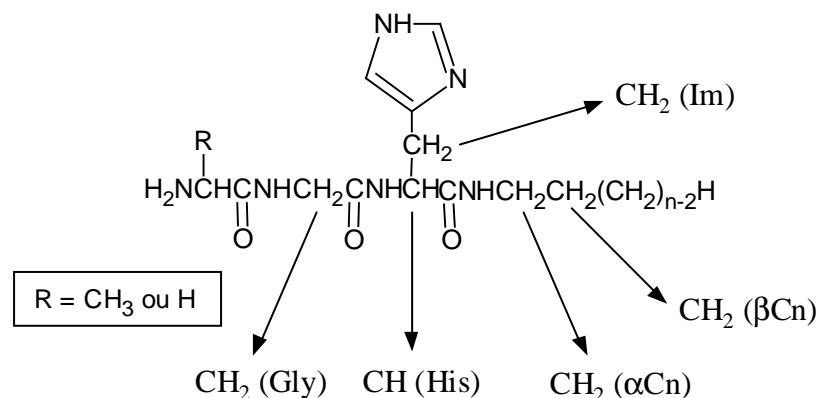
Figure IV-15 : Déconvolution du spectre des protons CH<sub>2</sub> (His) d'Ala-Gly-Ha (pH = 2,5)



#### IV.3.4.2. Cas des alkylamidopeptides

Les spectres des peptidoamines greffées Gly-Gly-His-Cn (chapitre III) ont également été analysées, en vue d'étudier les transferts protoniques sur leur fonctions amides.

Pour compléter cette étude, nous avons synthétisé plusieurs dérivés Ala-Gly-His-Cn.



**Schéma IV-5 : Notation des protons considérés lors de l'étude des alkylamidopeptides**

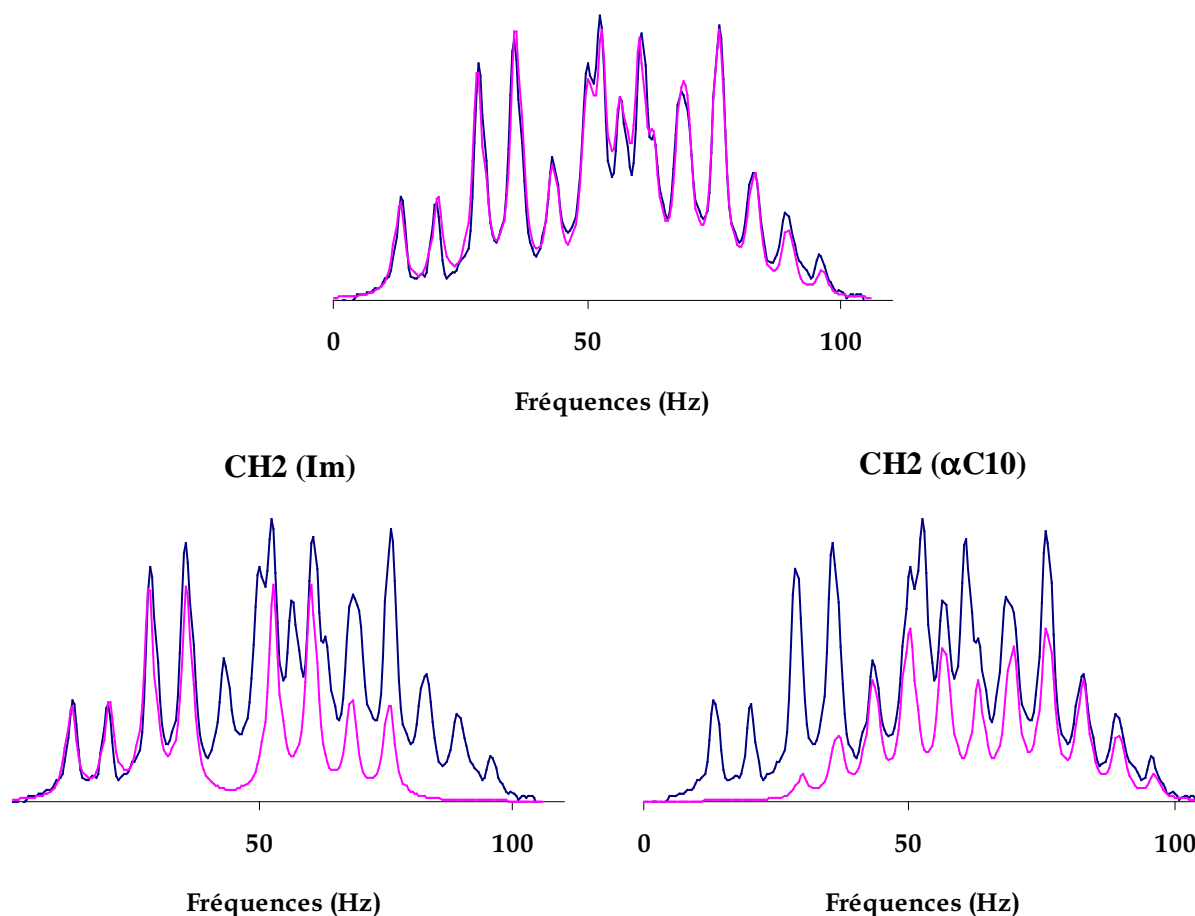
Le proton CH (His) est traité comme la partie X d'un spectre ABX (avec  $J_{AX} = J_{BX}$ ), dédoublé en échange lent par le proton NH. Les 6 raies attendues se superposent et le spectre apparent est un faux quadruplet. En échange rapide, la coalescence entre les deux triplets fournit un triplet moyen final.

Les protons CH<sub>2</sub> (Im) sont inéquivalents du fait de la présence d'un carbone asymétrique sur le résidu histidyle. Ils sont la partie AB du spectre ABX fournissant deux spectres AB identiques.

Les protons CH<sub>2</sub> (αCn) sont également inéquivalents et sont couplés aux protons du deuxième CH<sub>2</sub> de la chaîne alkyle, CH<sub>2</sub> (βCn). Ils sont donc la partie AB d'un spectre ABX2 consistant en 3 sous-spectres AB (12 raies), encore dédoublées par couplage avec le proton NH de l'amide, soit 24 raies au total, coalesçant raie à raie en un seul spectre ABX2, par élévation du pH.

Ces 24 raies sont enchevêtrées avec les 8 raies CH<sub>2</sub> (Im) ci-dessus, soit 32 raies au total. Le spectre statique a tout de même été décrypté en totalité à l'aide du programme **ECHGN** (Figure IV-16).

**Spectre total : CH<sub>2</sub> (Im) + CH<sub>2</sub> (αC10)**



**Figure IV-16 : Déconvolution des spectres enchevêtrés CH<sub>2</sub> (Im) et CH<sub>2</sub> (αCn) de Gly-Gly-His-C10 (pH = 0,7)**

### IV.3.5. Étude cinétique des échanges protoniques

Nous avons déterminé la cinétique des échanges, pour les fonctions amides des peptidoamines, à partir du modèle cinétique établi précédemment (**Équation IV-11**).

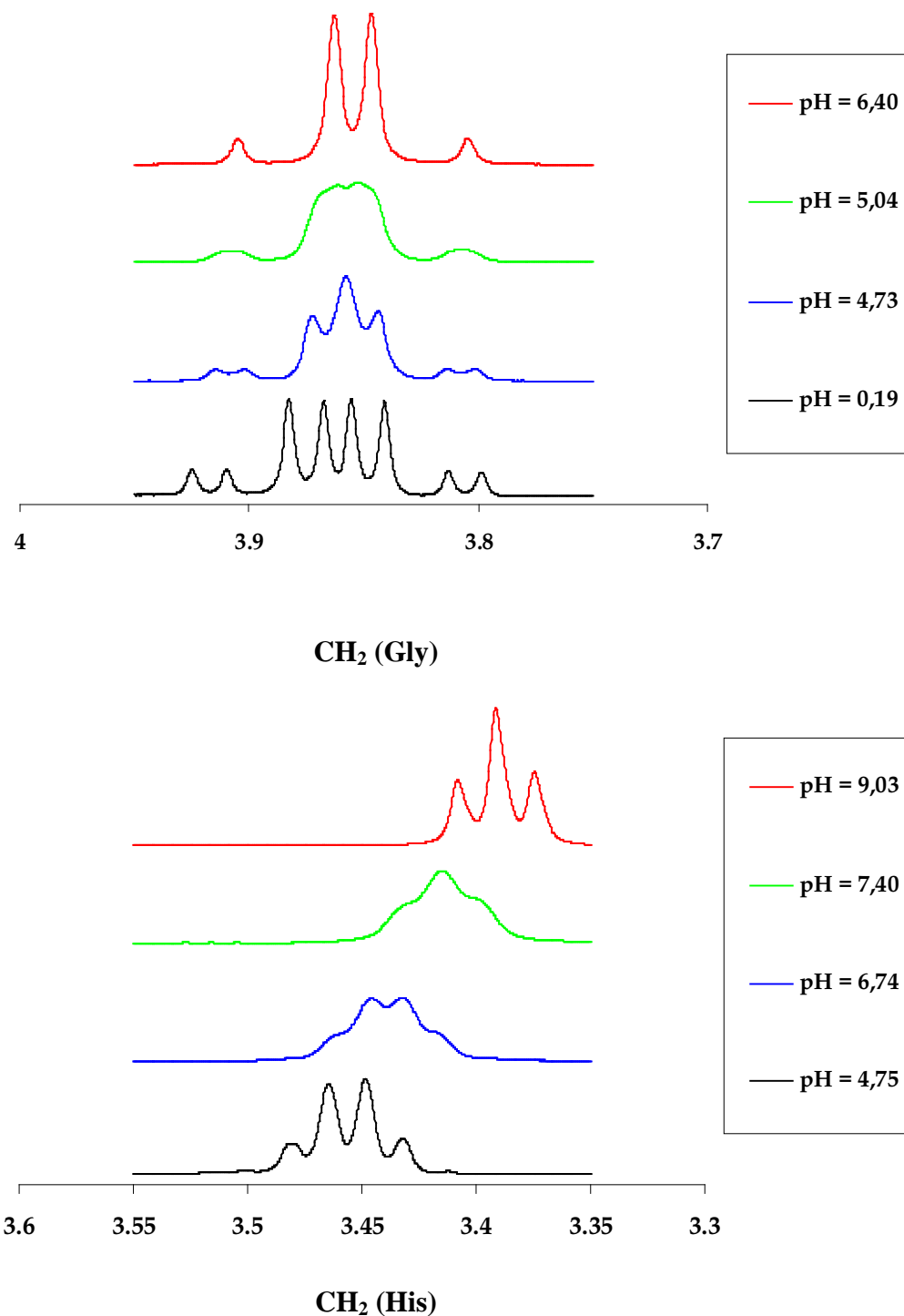
$$\frac{1}{\tau} = k_1 + \frac{k_2 K_e}{[H^+]} + \frac{(k_3 + k_4) [BH] K_a}{[H^+]}$$

Prenons une nouvelle fois l'exemple de l'alanyl-glycyl-histamine. En faisant varier le pH, on peut voir se déformer les spectres des protons CH<sub>2</sub> (Gly) et CH<sub>2</sub> (His).

En milieu très acide, l'échange des protons des fonctions amides est arrêté, le signal des protons CH<sub>2</sub> (Gly) est un spectre AB dédoublé. À partir de pH = 4, l'échange s'accélère et on

observe la coalescence des deux spectres AB. Lorsque le pH atteint 5,5, l'échange devient rapide et il n'y a plus qu'un seul spectre AB. La fenêtre spectrale s'étale entre pH = 4 et 5,5.

Pour les protons CH<sub>2</sub> (His), nous remarquons un décalage de la fenêtre spectrale de deux unités de pH (6,3 – 8). L'évolution des spectres en fonction du pH est représentée sur la **Figure IV-17**.



**Figure IV-17 : Déformation des spectres des protons CH<sub>2</sub> (Gly) et CH<sub>2</sub> (His) en fonction du pH pour Ala-Gly-Ha**

Les spectres sont simulés à l'aide du programme **ECHGN** et la durée de vie  $\tau$  est déduite de la comparaison des spectres théoriques et expérimentaux.

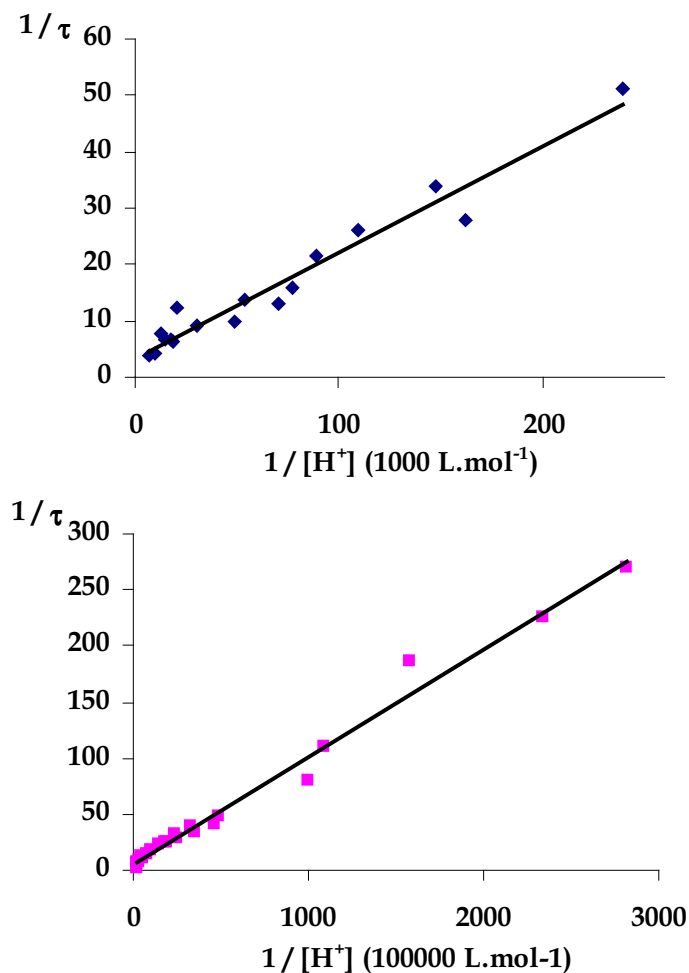
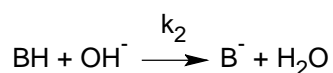
En portant  $1/\tau$  en fonction de  $1/[H^+]$ , la courbe obtenue nous donne des indications sur le mécanisme de l'échange.

Pour les deux fonctions amides, nous observons une variation linéaire en  $1/[H^+]$ , indépendante de la concentration (**Figure IV-18**).

Dans ce cas, la loi cinétique ne peut être que la suivante :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{k_2 K_e}{[H^+]}$$

Ceci montre que  $OH^-$  est la base attaquante, selon le mécanisme :



**Figure IV-18 : Cinétiques de transfert protonique pour les deux fonctions amides d'Ala-Gly-Ha ( $1/\tau$  en fonction de  $1/H^+$ )**

Pour toutes les peptidoamines étudiées, on observe la même variation linéaire en  $1/[H^+]$ , ce qui confirme le mécanisme d'attaque par  $OH^-$ .

Les fenêtres spectrales et les constantes cinétiques  $k_2$  déterminées pour les différentes fonctions amides des produits étudiés sont rassemblées dans le **Tableau IV-10** et le **Tableau IV-11** (Gly2 et Gly3 indiquent respectivement le deuxième et le troisième résidu glycyle d'une chaîne peptidique, en partant du côté N-terminal).

Composé	NH (Gly2)	NH (Gly3)	NH (His)	NH (chaîne)
Ala-Gly-Ha	4 – 5,5	—	6,3 – 8	—
Ala-Gly-His-C4	4 – 5,2	—	4,3 – 5,8	7,4 – 9
Ala-Gly-His-C12	4 – ?	—	Insolubilité	Insolubilité
Gly-Gly-Ha	4 – 5,5	—	6,3 – 7,6	—
Gly-Gly-His-C4	4,2 – 5,5	—	4,5 – 6	7,5 – 8,7
Gly-Gly-His-C10	4 – 5,7	—	4,5 – 5,9	Insolubilité
Gly-Gly-Gly-Ha	4 – 5,7	5 – 6,25	6,45 – 8,5	—

**Tableau IV-10 : Fenêtres spectrales pour les différents produits étudiés**

Composé	NH (Gly2)	NH (Gly3)	NH (His)	NH (chaîne)
Ala-Gly-Ha	$1,99.10^{10}$	—	$1,01.10^8$	—
Ala-Gly-His-C4	$3,59.10^{10}$	—	$9,41.10^9$	$9,04.10^6$
Ala-Gly-His-C12	$5,25.10^{10}$	—	Insolubilité	Insolubilité
Gly-Gly-Ha	$2,18.10^{10}$	—	$2,69.10^8$	—
Gly-Gly-His-C4	$2,35.10^{10}$	—	$8,18.10^9$	$1,19.10^7$
Gly-Gly-His-C10	$2,47.10^{10}$	—	$5,63.10^9$	Insolubilité
Gly-Gly-Gly-Ha	$3,17.10^{10}$	$3,41.10^9$	$1,60.10^8$	—

**Tableau IV-11 : Constantes cinétiques  $k_2$  des fonctions amides ( $L.mol^{-1}.s^{-1}$ )**

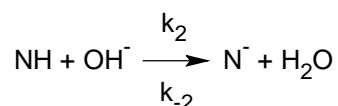
Pour Ala-Gly-Ha et Gly-Gly-Ha, les constantes de vitesse sont très proches. Nous remarquons un décalage de la fenêtre spectrale du phénomène d'échange, de deux unités de pH pour l'amide NH (His) ( $\approx 6 - 8$ ), par rapport à l'amide NH (Gly2) ( $\approx 4 - 5,5$ ). Ce décalage en pH se retrouve sur les valeurs des constantes de vitesse. En effet, les valeurs obtenues pour le premier amide du côté N-terminal, NH (Gly2) ( $\approx 2.10^{-10} L.mol^{-1}.s^{-1}$ ) sont 100 fois plus grandes que celles obtenues pour l'autre amide NH (His) ( $\approx 2.10^{-8} L.mol^{-1}.s^{-1}$ ).

Pour Gly-Gly-Gly-Ha, on observe une diminution de la constante de vitesse le long de la chaîne peptidique, en allant du côté N-terminal vers le côté C-terminal.

Pour les peptidoamine greffées, l'écart entre les constantes de vitesse de NH (Gly2) et NH (His) est beaucoup plus faible que celui mesuré pour les molécules analogues non greffées. Par contre la constante de vitesse de la fonction amide NH (chaîne) est nettement plus faible que les deux autres.

### IV.3.6. Détermination de la constante d'acidité des fonctions amides

Pour tous les systèmes étudiés, l'échange du proton se fait selon le mécanisme suivant :



Cet équilibre est géré par une constante **K**

$$K = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[N^-]}{[NH] \cdot [OH^-]} = \frac{K_a}{K_e}$$

Si on suppose que la réaction de reprotonation est limitée par la diffusion, on peut calculer le pKa de l'amide à l'aide de l'Équation IV-12 (avec  $K_e = 10^{-14}$  et  $k_{-2} = 5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$  à 25 °C).

$$pK_a = -\log k_2 + \log k_{-2} - \log K_e \quad \text{Équation IV-12}$$

Nous obtenons ainsi les valeurs des pKa des amides, les résultats sont rassemblés dans le **Tableau IV-12**.

Composé	NH (Gly2)	NH (Gly3)	NH (His)	NH (chaîne)
Ala-Gly-Ha	13,4	—	15,7	—
Ala-Gly-His-C4	13,1	—	13,7	16,7
Ala-Gly-His-C12	13,0	—	Insolubilité	Insolubilité
Gly-Gly-Ha	13,4	—	15,27	—
Gly-Gly-His-C4	13,3	—	13,8	16,6
Gly-Gly-His-C10	13,3	—	13,9	Insolubilité
Gly-Gly-Gly-Ha	13,2	14,2	15,5	—

**Tableau IV-12 : Estimation des pKa des fonctions amides**

On retrouve les différences observées pour les valeurs des constantes de vitesse d'échange sur les constantes d'acidité des fonctions amides.

Pour les pseudo-tripeptides Ala-Gly-Ha et Gly-Gly-Ha, le pKa de la fonction amide NH (Gly2) est plus faible de deux unités logarithmiques que celui de la fonction amide NH (His).

Pour le pseudo-tétrapeptide Gly-Gly-Gly-Ha, dans un ordre croissant d'acidité, on trouve la première fonction amide du côté N-terminal NH (Gly2), puis NH (Gly3) et enfin NH (His)

On peut expliquer ces différences par un effet électrostatique du groupement amino terminal qui est chargé positivement dans la zone de pH considérée.

Le proton de la fonction amide NH (Gly2) est soumis à une répulsion électrostatique de la part du groupement amino. En s'éloignant de ce groupement, la répulsion est de moins en moins sensible, ce qui fait que l'acidité diminue le long de la chaîne peptidique en partant du côté N-terminal. La charge positive sur le cycle imidazole est plus diffuse et a donc peu d'influence.

Par ailleurs, pour tous les pseudo-peptides à base d'histamine, la fonction amide NH (His) est nettement moins acide que les autres car il n'y a pas de liaison peptidique supplémentaire et donc pas d'effet électroattracteur de la part d'un groupement carbonyle, comme c'est le cas pour les autres.

Concernant les peptidoamines greffées, pour les mêmes raisons, il y a un abaissement de l'acidité lorsque l'on s'éloigne du groupement amino terminal.

Le pKa de l'amide NH (His) est moins faible que celui des molécules dérivées de l'histamine car dans ce cas, il y a un amide supplémentaire qui exerce un effet inductif qui a pour effet d'augmenter l'acidité de l'amide NH (His).

Enfin l'amide du côté C-terminal NH (chaîne) est le moins acide du fait de l'éloignement par rapport au groupement amino et de l'absence d'effet électroattracteur de la part d'un carbonyle.

### **IV.3.7. Conclusion**

Cette étude par RMN nous a permis d'accéder aux vitesses d'échange protonique intervenant sur les fonctions amides des peptidoamines.

Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux antérieurs sur les transferts protoniques en solution aqueuse. Dans tous les cas traités, l'échange de proton se fait par l'intermédiaire de OH<sup>-</sup>.

Les études de transfert protonique avec les peptidoamines tensioactives, ne permettent pas de conclure à une perturbation des échanges en milieu micellaire.

Cette étude montre pour la première fois de manière chiffrée, l'évolution de l'acidité des fonctions amides dans une chaîne peptidique.



Ces résultats peuvent apporter des informations précieuses pour interpréter les liaisons spécifiques à l'intérieur d'une protéine.

# V. CONCLUSION GÉNÉRALE



Dans ce mémoire, nous avons présenté les différents aspects physicochimiques de nouvelles molécules complexantes à base d'acides aminés. Les travaux réalisés recouvrent plusieurs domaines : la synthèse de dérivés pseudo-peptidiques de l'histamine ou de l'histidine, l'étude des propriétés physicochimiques de tensioactifs originaux, l'étude des aspects structuraux et thermodynamiques de la complexation de métaux de transition avec les molécules synthétisées et l'étude par résonance magnétique nucléaire des propriétés de protonation de ces molécules.

Selon le système envisagé, nous avons utilisé les techniques suivantes : potentiométrie, spectrophotométrie UV-visible, RMN, RPE, dichroïsme circulaire, spectrométrie de masse avec ionisation electrospray, radiocristallographie, tensiométrie, spectroscopie de fluorescence et microscopie.

Les conclusions propres à chacun des phénomènes et des systèmes étudiés, ont été formulées dans les différents chapitres. Nous nous attacherons donc ici à dégager les faits les plus marquants.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la complexation de métaux de transition par des pseudo-peptides dérivés de l'histamine. Les complexes de cuivre (II) et de nickel (II) obtenus lors de cette complexation sont très stables. L'étude de deux nouveaux ligands, l'alanyl-glycyl-histamine et l' $\alpha$ -méthyl-alanyl-histamine a permis de préciser la nature et la structure des complexes formés avec ce type de molécule.

Nous avons décrit de façon très complète la complexation des cations Cu(II) et Ni(II) avec le pseudo-tripeptide alanyl-glycyl-histamine. Les différentes techniques d'investigation ont mis en évidence la formation d'un système de complexes avec une espèce principale présente dans un large domaine de pH ( $MLH_2$ ). Cette espèce est un complexe plan carré très stable avec une coordination identique à celle du fragment N-terminal de la sérum-albumine.

L'étude du pseudo-dipeptide  $\alpha$ -méthyl-alanyl-histamine a permis de confirmer, par radiocristallographie notamment, la formation d'un complexe tétramérique ( $M_4L_4H_8$ ), où les cations occupent les sommets d'un tétraèdre déformé.

Ce chapitre a permis de décrire les propriétés générales des peptidoamines à base d'histamine et de compléter l'étude réalisée précédemment sur ce type de molécule.

Dans une seconde partie, nous avons décrit la synthèse et l'étude des propriétés physicochimiques de tensioactifs originaux dérivés de peptidoamines. Ce travail a permis de

mettre à profit les résultats précédents obtenus avec les pseudo-peptides dérivés de l'histamine.

L'introduction d'une chaîne grasse a été effectuée en substituant l'histamine par l'histidine, ceci nous a permis de conserver un motif complexant identique à celui des peptidoamines.

Différentes structures ont été envisagées dans le but de moduler la balance hydrophile lipophile des molécules synthétisées.

Les molécules synthétisées les plus hydrophobes, appelées tensioactifs bimodulaires, ont été obtenues par greffage d'une amine grasse sur des peptides dérivés de l'histidine. La méthode de synthèse du couplage au BOP a permis d'obtenir les différents composés avec de bons rendements. Les dérivés hydrophobes de deux peptidoamines élémentaires, la glycyl-glycyl-histamine et la carcinine, ont ainsi été synthétisés.

Le caractère tensioactif de ces molécules a été vérifié et nous nous sommes assuré que leur pouvoir complexant n'a pas été modifié par la présence d'une chaîne grasse. La faible solubilité, dans certains domaines de pH, de ces composés et des complexes qu'ils forment en présence d'ions métalliques, laisse envisager une méthode d'extraction sélective de métaux par précipitation, en faisant varier le pH ou la température.

Cependant, cette solubilité insuffisante ne nous a pas permis de réaliser une étude complète sur les aspects thermodynamiques de la complexation. Par ailleurs l'étude des propriétés tensioactives en milieu neutre s'est avérée impossible du fait de la précipitation. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de tensioactifs trimodulaires, comportant un module hydrophile de type polyoxyéthylène, en plus de la partie complexante et de la chaîne grasse. Plusieurs structures sont possibles, notre attention s'est portée principalement sur les tensioactifs trimodulaires dits "de type I" où le module polaire est intercalé entre le peptide complexant et la queue hydrophobe.

Dans un premier temps, les différents modules ont été connectés entre eux par l'intermédiaire de fonctions amides et ester. La présence d'un lien de type ester a rendu ces molécules relativement fragiles en solution du fait d'un risque d'hydrolyse, notamment en milieu basique. Ce qui en fait également des molécules intéressantes de par le faible impact sur l'environnement qu'elles présentent.

Nous avons ensuite synthétisé des molécules, possédant deux liens amides, moins sensibles à l'hydrolyse, qui ont conduit à la formation de gels aux propriétés intéressantes. Il est nécessaire d'effectuer une étude plus en détail de la formation et de la structure de ces gels, afin d'envisager des applications biologiques ou bien dans le domaine des cosmétiques.

Les propriétés complexantes et tensioactives des tensioactifs trimodulaires de type I ont été évaluées.

Par ailleurs, l'étude physicochimique des tensioactifs trimodulaires de type II reste à faire, de même que la synthèse des tensioactifs trimodulaires de type III. En modifiant à la fois, la longueur de la chaîne hydrophobe et la taille du motif hydrophile, il sera possible de moduler facilement la balance hydrophile/lipophile de ces composés.

Nous envisageons d'entreprendre une étude sur l'extraction sélective de métaux en phase organique. Il serait également intéressant de développer des méthodes d'extraction plus propres telles que l'ultrafiltration micellaire ou bien la séparation de phase par point de trouble. Pour cela, il sera nécessaire de déterminer auparavant les diagrammes de phase des tensioactifs trimodulaires.

L'ultime phase de notre travail a consisté à étudier les propriétés de protonation des peptidoamines synthétisées, par résonance magnétique nucléaire.

Nous avons déterminé les constantes de déprotonation et de micro-déprotonation des molécules synthétisées, à l'aide de titrages RMN. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, de manière chiffrée, la déprotonation alternative des deux fonctions azotées des peptidoamines, le cycle imidazole et l'amine terminale.

L'étude des transferts protoniques intervenant dans des solutions aqueuses de peptidoamines a permis de déterminer l'évolution des pKa des fonctions amides, le long d'une chaîne peptidique. Il reste maintenant à compléter ce travail avec les tensioactifs trimodulaires.

Enfin, il serait intéressant de poursuivre nos investigations sur les propriétés de protonation et de complexation des peptidoamines en milieu micellaire.

L'ensemble de ces travaux est au final très prometteur et ouvre un large champ à des études supplémentaires aussi bien en synthèse qu'en physicochimie.



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- <sup>(1)</sup> P. Deschamps, N. Zerrouk, I. Nicolas, T. Martens, E. Curis, M.F. Charlot, J.J. Girerd, T. Prangé, S. Benazeth, J.C. Chaumeil, A. Thomas, *Inorg. Chim. Acta*, **353**, 22 (2003)
- <sup>(2)</sup> L. Leggio, G. Addolorato, L. Abenaroli, G. Gasbarrini, *Int. J. Immuno. Pathol. Pharmacol.*, **18(1)**, 7 (2005)
- <sup>(3)</sup> D.C. Carter, J.X. Ho, *Adv. Protein. Chem.*, **45**, 153 (1994)
- <sup>(4)</sup> X.M. He, D.C. Carter, *Nature*, **358**, 209 (1992)
- <sup>(5)</sup> T Peters, Jr., *Prot. Chem.*, **37**, 161 (1985)
- <sup>(6)</sup> S.U. Patel, P.J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9285 (1993)
- <sup>(7)</sup> H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, **184**, 319 (1999)
- <sup>(8)</sup> T. Peters Jr, F.A. Blumenstock, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1574 (1967)
- <sup>(9)</sup> P.Z. Neumann, A. Sass-Kortsak, *J. Clin. Invest.*, **46**, 646 (1967)
- <sup>(10)</sup> B. Sarkar, Y. Wigfield, *Can. J. Biochem.*, **46**, 602 (1968)
- <sup>(11)</sup> J.P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry* **23**, 2832 (1984)
- <sup>(12)</sup> P.J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles, *Eur. J. Biochem.*, **220**, 193 (1994)
- <sup>(13)</sup> H. Aiba, A. Yokoyama, H. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 1437 (1974)



- 
- <sup>(14)</sup> T. Sakurai, A. Nakahara, *Inorg. Chem.*, **19**, 847 (1980)
- <sup>(15)</sup> W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Chem.*, **70**, 33 (1998)
- <sup>(16)</sup> Y. Zhang, S. Akilesh, D.E. Wilcox, *Inorg. Chem.*, **39**, 3057 (2000)
- <sup>(17)</sup> B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 89 (2001)
- <sup>(18)</sup> D. Sanna, C.G. Agoston, I. Sovago, G. Micera, *Polyhedron*, **20**, 937 (2001)
- <sup>(19)</sup> M. Sokolowska, A. Krezel, M. Dyba, Z. Szewczuk, W. Bal, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1323 (2002)
- <sup>(20)</sup> A. Hanaki, N. Ikota, J. Ueda, T. Ozawa, A. Odani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 2143 (2003)
- <sup>(21)</sup> M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozlowski, J. Brasun, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* **97**, 299 (2003)
- <sup>(22)</sup> J.M. Arnould, *Arc. Int. Physiol. Biochim.*, **93**, 351 (1985)
- <sup>(23)</sup> D.N. Brotman, L. Flancbaum, Y.E. Kang, G.F. Merrill, H. Ficher, *Crit. Car. Med.*, **18**, 317 (1990)
- <sup>(24)</sup> M. Tsuji, Y. Matsuoka, T. Nakajima. *J. Neurochem.*, **29**, 633 (1977)
- <sup>(25)</sup> K.L. Reichelt, P.D. Edminson, E. Kvamme, *J. Neurochem.*, **26**, 811 (1976)
- <sup>(26)</sup> K.L. Reichelt, P.D. Edminson, *Peptides and Neurobiology*, edition H. Gainer, Plenum Press, New York (1977)
- <sup>(27)</sup> P.J. Quinn, A.A. Boldyreb, V.E. Formazyk, *Molec. Aspects Med.*, **13**, 379 (1992)

- 
- (28) L. Flancbaum, D.N. Brotman, J.C. Fitzpatrick, T. Van Es, E. Kasziba, H. Fischer, *Life Sci.*, **47**, 1587 (1990)
- (29) T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **15**, 2313 (1992)
- (30) T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **8**, 1301 (1993)
- (31) T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, **34**, 2455 (1995)
- (32) T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, **35**, 586 (1996)
- (33) T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 157 (1994)
- (34) P. Gizzi, B. Henry, P. Rubini, S. Giroux, E. Wenger, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1182 (2005)
- (35) C. Gérardin-Charbonnier, S. Auberger, L. Molina, S. Achilefu, M.A. Manresa, P. Vinardell, M.R. Infante, C. Selve, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **29(3)** 257 (1999)
- (36) S. Auberger, C. Gérardin, L. Rodehuser, C. Finance, C. Nicolazzi, L. Perez, M.R. Infante, M.A. Manresa, C. Selve, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **118**, 145 (2001)
- (37) M.S. Ozer, C. Gérardin-Charbonnier, S. Thiébaud, L. Rodehuser, C. Selve, *Amino Acids*, **16** 381 (1999)
- (38) E. Pramauro, A. Bianco-Prevot, *A. Pure Appl. Chem.*, **67**, 551 (1995)
- (39) G. Ghirlanda, P. Scrimin, P. Tecilla, A. Toffoletti, *Langmuir*, **14**, 1646 (1998)
- (40) J. Le Moigne, J. Simon, *J. Phys. Chem.*, **84**, 170 (1980)
- (41) O. Ozeki, T. Ikewaga, S. Inokuma, T. Kuwamura, *Langmuir*, **5**, 222 (1989)
- (42) H. Coulombeau, F. Testard, T. Zemb, C. Larpent, *Langmuir*, **20**, 4840 (2004)

- 
- (43) Y.Y Luk, N.L. Abbott, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **7**, 267 (2002)
- (44) S.J. Hill, *Pharmacol. Rev.*, **42**, 45 (1990)
- (45) E. Merck, *Méthodes d'analyses complexométriques par les Titriplex®*, Merck, Darmstadt
- (46) E. Högfeltdt, *Stability constants of metal-ion complexes, Part A inorganic ligands*, Pergamon, New York, p 32 (1982)
- (47) T. Gajda, *thèse de doctorat de l'université Henri Poincaré, NancyI* (1993)
- (48) S. Giroux, *thèse de doctorat de l'université Henri Poincaré, NancyI* (1999)
- (49) L. Zekani, I. Nagypal, "PSEQUAD", *Computational methods for the determination of stability constants*, edition D.Legget, Plenum Press, New york (1985)
- (50) G.M. Sheldrick, "SHELX97" et "SHELXL97", *Program for crystal structure determination*, Université de Göttingen, Allemagne (1997)
- (51) B. Henry, T. Gajda, C. Selve, J.J. Delpuech, J.M. Arnould, *Amino Acids*, **5**, 113 (1993)
- (52) G. Ekulu, *DEA de l'université Henri Poincaré, Nancy I* (2000)
- (53) E. Prenesti, P.G. Daniele, S. Toso, *Anal. Chim. Acta*, **459**, 323 (2002)
- (54) E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, *Polyhedron*, **18**, 3233 (1999)
- (55) H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
- (56) E.J. Billo, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **10**, 613 (1974)
- (57) P. Mineo, D. Vitalini, D. La Mendola, E. Rizzarelli, E. Scamparino, G. Vecchio, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 722 (2002)

- 
- <sup>(58)</sup> H. Lavanant, H. Virelizier, Y. Hopilliard, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 1217 (1998)
- <sup>(59)</sup> S. Bruni, F. Cariati, P.G. Daniele, E. Prenesti, *Spectrochim. Acta*, **A 56**, 815 (2000)
- <sup>(60)</sup> G. Rakhit, B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.*, **15**, 233 (1981)
- <sup>(61)</sup> P. Deschamps, P.P. Kulkarni, B. Sarkar, *Inorg. Chem.*, **43**, 3338 (2004)
- <sup>(62)</sup> P. G. Jones, S. Friedrichs, *Chem. Comm.*, **20**, 2131 (1999)
- <sup>(63)</sup> H. Abe, G. P. Dobson, U. Hoeger, W. S. Parkhouse, *Amer. J. Physiol.*, **249**, 449 (1985)
- <sup>(64)</sup> G. P Zaloga, P.R. Roberts, K. W. Black, M. Lin, G. Zapata-Sudo, R.T. Sudo, T.E. Nelson, *Amer. J. Physiol.*, **272**, 462 (1997)
- <sup>(65)</sup> E. A. Decker, V. Ivanov, B.Z. Zhu, B. Frei, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 511 (2001)
- <sup>(66)</sup> T. Nagasawa, T. Yonekura, N. Nishizawa, D.D. Kitts, *Mol. Cell. Biochem.*, **222**, 29 (2001)
- <sup>(67)</sup> J. W. Lee, H. Miyawaki, E. V Bobst, J.D. Hester, M. ashraf, A.M. Bobst, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 113 (1999)
- <sup>(68)</sup> D.L. Price, P.M. Rhett, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48967 (2001)
- <sup>(69)</sup> A.R. Hipkiss, V.C. Vorthington, D.T. Himsforth, W. Herwig, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1380**, 46 (1998)
- <sup>(70)</sup> J.H. Kang, W.S. Eum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1524**, 162 (2000)
- <sup>(71)</sup> M.A. Babizhayev, V.N. Yermakova, Y.A. Semiletov, A.I. Deyev, *Biochemistry*, **65**, 588 (2000)

- 
- <sup>(72)</sup> M. Seiki, S. Ueiki, Y. Tanaka, M. Soeda, Y. Hori, H. Aita, T. Yoneta, H. morita, E. Tagashira, S. Okabe, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **95**, 257 (1990)
- <sup>(73)</sup> F. Hamdoune, C. El Moujahid, L. Rodehüser, C. Gérardin, B. Henry, M.J. Stébé, J. Amos, M. Marraha, A. Asskali, C. Selve, *New J. Chem.*, **24**, 1037 (2000)
- <sup>(74)</sup> M. Paquot, [www.fsagx.ac.be/ai/profs/journeeactu04/Texte.Paquot.pdf](http://www.fsagx.ac.be/ai/profs/journeeactu04/Texte.Paquot.pdf) (2004)
- <sup>(75)</sup> W. C. Griffin, *J. Soc. Cosmet. Chemists*, **5**, 249 (1954)
- <sup>(76)</sup> J. T. Davies, *Proc. Int. Congr. Surface Activity*, **1**, 246 London (1957)
- <sup>(77)</sup> D. Savastionnof, *Informations Chimie*, **293**, 135 (1998)
- <sup>(78)</sup> P. Le Perchec, *Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection*, CNRS Éditions Nathan (1994)
- <sup>(79)</sup> F. Krafft, H. Wiglow, *Chem. Berichte*, **28**, 2566 (1895)
- <sup>(80)</sup> B. Castro, *Tet. Letters*, **14**, 1219 (1975)
- <sup>(81)</sup> B. Malgesini, I. Verpilio, R. Duncan, P. Feruti, *Macromol. Biosci.*, **3**, 59 (2003)
- <sup>(82)</sup> L. Wilhelmy, *Am. Phys.*, **199**, 177 (1863)
- <sup>(83)</sup> J. W. Gibbs, *Collected Works*, Longman, New York, **64**, 1643 (1960)
- <sup>(84)</sup> D. W. Fuerstenau, R. Herrera-Urbina, *Surfactants Science Series - Cationic Surfactants*, (ed by D. N. Rubingh and P. M. Holland), **37**, Marcel Dekker, New York, 415 (1991)
- <sup>(85)</sup> R. W. Smith, *Reagents in mineral technology*, (ed by P. Somasundaran and B. M. Moudgil), Marcel Dekker, New York, 219 (1988)

- 
- <sup>(86)</sup> E. Fuguet, C. Rafois, M. Roses, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta*, **548**, 95 (2005)
- <sup>(87)</sup> C. Thevenot, B. Grassi, G. Bastiat, W. Binana, *Colloids surf. A*, **252**, 105 (2005)
- <sup>(88)</sup> K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2039 (1997)
- <sup>(89)</sup> K. P. Ananthapadmanabhan, E. D. Goddard, N. J. Turro, P. L. Kuo, *Langmuir*, **1**, 352 (1985)
- <sup>(90)</sup> G. A. Baker, F. V. Bright, S. Pandey, *Chem. Educator*, **6**, 1 (2001)
- <sup>(91)</sup> K. Hara, H. Susuki, N. Takisawa, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3710 (1989)
- <sup>(92)</sup> P. Yan, C. Jin, C. Wang, J. Ye, J.X. Xiao, *J. Colloid Interface Sci.*, **288**, 188 (2005)
- <sup>(93)</sup> R. G. Laughlin, *Surfactants Science Series - Cationic Surfactants*, (ed by D. N. Rubingh and P. M. Holland), **37**, Marcel Dekker, New York, 13 (1991)
- <sup>(94)</sup> F. K. Broome, C. W. Hoerr, H. J. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3350 (1951)
- <sup>(95)</sup> P. Ekwall, *Advances in liquid crystals*, **1**, Editions G.H. Brown, (1975)
- <sup>(96)</sup> L.A. Estroff, A.D. Hamilton, *Chem rev.*, **104**, 1201 (2004)
- <sup>(97)</sup> K.Y. Lee, D.J. Mooney, *Chem rev.*, **101**, 1869 (2001)
- <sup>(98)</sup> B. Xing, C.W. Yu, K.H. Chow, P.L. Ho, D. Fu, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14846 (2002)
- <sup>(99)</sup> S. Kiyonaka, K. Sugiyasu, S. Shinkai, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10954 (2002)
- <sup>(100)</sup> T. Imae, N. Hayashi, T. Matsumoto, T. Tada, M. Furusaka, *J. Colloid Interface Sci.*, **225**, 285 (2000)

- 
- <sup>(101)</sup> D.S. Wishart, B.D. Sykes, *Methods enzymol.*, **239**, 363 (1994)
- <sup>(102)</sup> Z. Szakács, M. Kraszni, B. Noszál, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1428 (2003)
- <sup>(103)</sup> T. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 48 (2002)
- <sup>(104)</sup> G. Serratrice, *Thèse obtenue à l'université Henri Poincaré, Nancy I* (1971)
- <sup>(105)</sup> J. J. Delpuech, *Molecular physics*, **14**, 567 (1968)
- <sup>(106)</sup> J. J. Delpuech, G. Serratrice, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **11**, 2500 (1974)
- <sup>(107)</sup> J. Chrisment, J. J. Delpuech, W. Rajerison, C. Selve, **42**, 4743 (1986)
- <sup>(108)</sup> J. Chrisment, J. J. Delpuech, *Langmuir*, **12**, 1441 (1996)
- <sup>(109)</sup> E. J. Milner-White, *J. Mol. Biol.*, **216**, 385 (1990)

# **VI. SYNTHÈSE ORGANIQUE :**

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**





## VI.1. INSTRUMENTS DE CARACTÉRISATION

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DRX 400 (400 MHz). Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au TMS en référence interne.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer FTIR spectrum one, sous forme de film sur pastille de NaCl pour les liquides et de dispersion dans des pastilles de KBr pour les solides.

Les points de fusion ont été mesurés sur un banc Kofler type WME.

Les analyses élémentaires des composés sont effectuées sur un appareil Thermofinnigan FlashEA 1112.

Le suivi de certaines réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM), utilisant des plaques de silice Macherey Nagel 0,20 mm (gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV<sub>254</sub>).

## VI.2. PROTOCOLES DES SYNTHÈSES

### VI.2.1 Préparation des pseudopeptides à base d'histamine

#### *Mode opératoire général : exemple du dihydrochlorure d'alanyl-glycyl-histamine*

Dans un ballon de 250 mL, 10 mmoles de BOC-alanyl-glycine (2,46 g) sont dissoutes dans 50 mL de chloroforme, sous agitation magnétique.

Puis sont ajoutées 10 mmoles de BOP (1 eq ; 1,84 g) et 10 mmoles de dihydrochlorure d'histamine (1 eq ; 1,84 g). Le milieu est rendu basique par l'ajout de 40 mmoles de N-éthyl-diisopropylamine (4 eq ; 5,17 g). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le déblocage du groupe protecteur BOC est effectué sans isolation de la BOC-alanyl-glycyl-histamine par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique anhydre dissous dans l'éther. Un produit mielleux précipite au fond du ballon, celui-ci est lavé plusieurs fois à l'éther diéthylique. Le produit blanc récupéré est dissous à chaud dans un minimum de méthanol, l'ajout goutte à goutte d'une quantité d'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention d'un trouble permet de le précipiter. Le produit obtenu est sous la forme d'un dihydrochlorure.

## Dihydrochlorure d'alanyl-glycyl-histamine : Ala-Gly-Ha

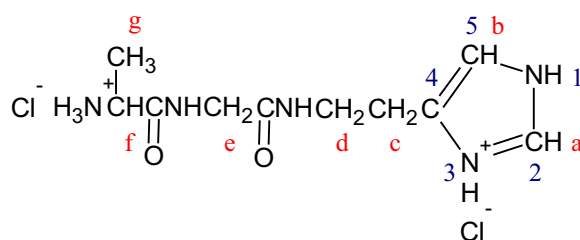
Caractéristiques générales :

Masse molaire : 312,20 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 60 %

Point de fusion : 250 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 1,57 ppm (d, <sup>3</sup>J = 7,1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> g) ; 2,99 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 3,56 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,90 ppm (AB, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 4,10 ppm (q, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> f) ; 7,53 ppm (1H, CH b) ; 8,88 ppm (1H, CH a)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 18,2 ppm (CH<sub>3</sub> g) ; 26,3 ppm (CH<sub>2</sub> c) ; 32,6 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 44,2 (CH<sub>2</sub> e) ; 118,5 ppm (C5) ; 135,3 ppm (C2) ; 136,2 ppm (C4) ; 172-173 (2C=O)

IR (KBr) : 3291 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 1683 cm<sup>-1</sup> (NH amide) ; 1638 cm<sup>-1</sup> (C=O amide)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

C : 37,96 % (38,47)    H : 6,08 % (6,13)    N : 21,87 % (22,43)

## Dihydrochlorure d' $\alpha$ -méthyl-alanyl-histamine : $\alpha$ -Me-Ala-Ha

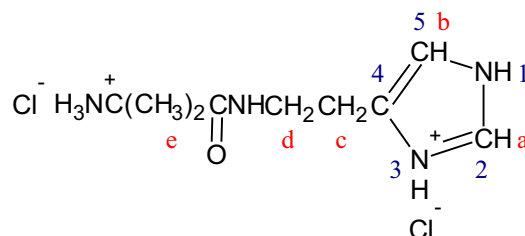
Caractéristiques générales :

Masse molaire : 269,17 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 55 %

Point de fusion : 244 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 1,58 ppm (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> e) ; 3,02 ppm ( $^3\text{J} = 6,3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 3,58 ppm ( $^3\text{J} = 6,3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,90 ppm ; 7,43 ppm (1H, CH b) ; 8,87 ppm (1H, CH a)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) 25,1 ppm (2CH<sub>3</sub> e) ; 26,2 ppm (CH<sub>2</sub> c) ; 40,1 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 59,1 ppm (

IR (KBr) : 3407  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 1681  $\text{cm}^{-1}$  (NH amide) ; 1620  $\text{cm}^{-1}$  (C=O amide)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

C : 39,18 % (40,15)    H : 6,80 % (6,74)    N : 20,05 % (20,81)

## VI.2.2 Préparation des tensioactifs bimodulaires (alkylamidopeptides)

### VI.2.2.1. Préparation des dihydrochlorures d'alkylamidohistidine (2 : His-Cn)

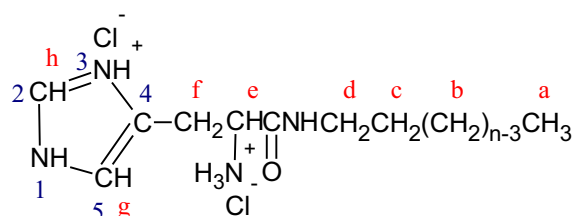
Dans un ballon de 250 ml, 7,8 mmoles de BOC-histidine (2 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,8 mmoles de BOP (1 eq ; 3,45 g), 15,6 mmoles de triéthylamine (2 eq ; 1,58 g) et enfin 7,8 mmoles (1eq) d'amine primaire. Avant même que la solubilisation des réactifs soit totale, un précipité blanc apparaît. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le précipité obtenu est filtré sur fritté de porosité 4, lavé avec 50 mL d'acétonitrile puis avec 50 mL

d'éther. On obtient un solide blanc qui est ensuite recristallisé dans l'acétonitrile. Le solide recristallisé est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique.

Caractéristiques générales :

Composé	nom	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
2a	His-C4	4	283,20	125	71
2b	His-C7	7	325,28	138	80
2c	His-C8	8	339,30	142	83
2d	His-C10	10	367,36	164	88
2e	His-C12	12	395,41	177	95
2f	His-C14	14	423,46	183	95

Caractéristiques spectrales :



Les composés **His-Cn** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, **His-C12** est donné en tant qu'exemple.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9CH<sub>2</sub> b) ; 1,51 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 3,24 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,37 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 4,24 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 1H, CH e) ; 7,54 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,97 ppm (s, 1H, CH h)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) 14,8 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-32 ppm (11CH<sub>2</sub> b, c, f) ; 41,2 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 53,8 ppm (CH e) ; 120,0 ppm (C5) ; 128,8 ppm (C4) ; 135,0 ppm (C2) ; 168,6 ppm (C=O)

IR (KBr) : 3303 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) ; 1646 cm<sup>-1</sup> (C=O amide)

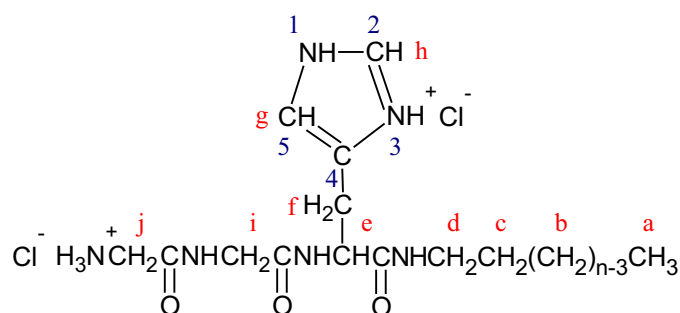
### VI.2.2.2. Préparation des dihydrochlorures d'alkylamidoglycyl-glycyl-histidine (**5** : Gly-Gly-His-Cn)

Dans un ballon de 250 ml, 7,6 mmoles de BOC-glycyl-glycine (1,76 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,6 mmoles de BOP (1 eq ; 3,36 g), 30,4 mmoles de triéthylamine (4 eq ; 3,07 g) et enfin 7,6 mmoles d'**His-Cn (2)** (1 eq). Avant même que la solubilisation des réactifs soit totale, un précipité blanc apparaît. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le précipité obtenu est filtré sur fritté de porosité 4, lavé avec 50 mL d'acétonitrile puis avec 50 mL d'éther. On obtient un solide blanc d'aspect cireux qui est ensuite recristallisé dans un mélange acétonitrile/eau 80/20 V/V. Le solide recristallisé est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit est repris dans 20 ml d'eau puis lyophilisé. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique que l'on conserve à l'abri de l'humidité et à basse température.

Caractéristiques générales :

Composé	nom	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
5a	Gly-Gly-His-C4	4	397,30	149	70
5b	Gly-Gly-His-C7	7	439,38	154	77
5c	Gly-Gly-His-C8	8	453,41	167	77
5d	Gly-Gly-His-C10	10	481,46	174	80
5e	Gly-Gly-His-C12	12	509,51	182	88
5f	Gly-Gly-His-C14	14	537,57	186	90

Caractéristiques spectrales :



Les composés **Gly-Gly-His-Cn** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, **Gly-Gly-His-C12** est donné en tant qu'exemple.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,92 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9CH<sub>2</sub> b) ; 1,52 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 3,1-3,3 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> d, f) ; 3,80 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> i) ; 3,96 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> j) ; 4,72 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH e) ; 7,40 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,85 ppm (s, 1H, CH h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-32 ppm (11CH<sub>2</sub> b, c, f) ; 34 ppm (CH<sub>2</sub> i) ; 41,5 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 44,3 ppm (CH<sub>2</sub> j) ; 54,5 ppm (CH e) ; 119,3 ppm (C5) ; 132 ppm (C4) ; 136 ppm (C2) ; 169-173 ppm (3C=O)

IR (KBr) : 3380  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2923  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) ; 1687, 1657 et 1638  $\text{cm}^{-1}$  (3C=O amide)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

<b>Gly-Gly-His-C4</b> :	C : 41,57 % (42,32)	H : 6,80 % (6,60)	N : 20,82 % (21,15)
<b>Gly-Gly-His-C7</b> :	C : 46,11 % (46,47)	H : 7,45 % (7,34)	N : 19,01 % (19,13)
<b>Gly-Gly-His-C8</b> :	C : 47,32 % (47,68)	H : 7,60 % (7,56)	N : 18,19 % (18,54)
<b>Gly-Gly-His-C10</b> :	C : 49,35 % (49,89)	H : 8,10 % (7,96)	N : 17,15 % (17,46)
<b>Gly-Gly-His-C12</b> :	C : 51,90 % (51,86)	H : 8,62 % (8,31)	N : 16,55 % (16,49)
<b>Gly-Gly-His-C14</b> :	C : 53,68 % (53,62)	H : 8,71 % (8,63)	N : 15,55 % (15,63)

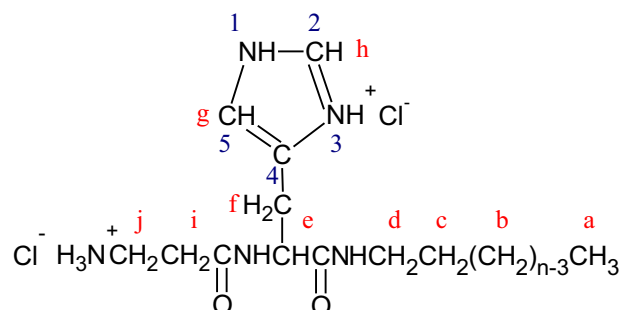
### VI.2.2.3. Préparation des dihydrochlorures d'alkylamido-β-alanyl-histidine (6 : β-Ala-His-Cn)

Le protocole est identique à celui de la synthèse des composés **Gly-Gly-His-Cn (5)**. La BOC-β-alanine remplace la BOC-glycyl-glycine. Après filtration et séchage sur CaCl<sub>2</sub> du produit de couplage qui précipite, on obtient un solide blanc qui est ensuite recristallisé dans l'acétonitrile. Le solide recristallisé est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit est repris dans 20 ml d'eau puis lyophilisé. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique que l'on conserve à l'abri de l'humidité et à basse température.

Caractéristiques générales :

Composé	nom	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
6a	β-Ala-His-C4	4	354,28	130	71
6b	β-Ala-His-C7	7	396,35	140	79
6c	β-Ala-His-C8	8	410,38	145	80
6d	β-Ala-His-C10	10	438,43	174	81
6e	β-Ala-His-C12	12	466,49	182	90
6f	β-Ala-His-C14	14	494,54	180	92

Caractéristiques spectrales :



Les composés **β-Ala-His-Cn** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, **β-Ala-His-His-C12** est donné en tant qu'exemple.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9  $\text{CH}_2$  b) ; 1,51 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  c) ; 2,72 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  i) ; 3,1-3,4 ppm (ma, 6H, 3  $\text{CH}_2$  d, f, j) ; 4,72 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH e) ; 7,41 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,88 ppm (s, 1H, CH h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,2 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-32 ppm (11  $\text{CH}_2$  b, c, f) ; 33,6 ppm ( $\text{CH}_2$  i) ; 37,7 ppm ( $\text{CH}_2$  j) ; 41,6 ppm ( $\text{CH}_2$  d) ; 54,5 ppm (CH e) ; 119,2 ppm (C5) ; 131,9 ppm (C4) ; 135,7 ppm (C2) ; 172-173 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3280  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2923  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1657 et 1637  $\text{cm}^{-1}$  (2C=O amide)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

<b><math>\beta</math>-Ala-His-C4</b> : C : 43,92 % (44,07)	H : 7,08 % (7,11)	N : 19,82 % (19,77)
<b><math>\beta</math>-Ala-His-C7</b> : C : 48,37 % (48,48)	H : 7,68 % (7,88)	N : 17,86 % (17,67)
<b><math>\beta</math>-Ala-His-C8</b> : C : 51,08 % (49,75)	H : 8,32 % (8,11)	N : 16,59 % (17,07)
<b><math>\beta</math>-Ala-His-C10</b> : C : 51,11 % (52,05)	H : 8,42 % (8,51)	N : 16,39 % (15,97)
<b><math>\beta</math>-Ala-His-C12</b> : C : 53,57 % (54,07)	H : 8,80 % (8,86)	N : 15,92 % (15,01)
<b><math>\beta</math>-Ala-His-C14</b> : C : 55,56 % (55,86)	H : 9,12 % (9,17)	N : 14,03 % (14,16)

## VI.2.3 Préparation des tensioactifs trimodulaires de type I

### VI.2.3.1. Tensioactifs trimodulaires à lien amide et ester

#### VI.2.3.1.1. Tensioactifs trimodulaires de type I.1

##### 1) Préparation des composés 7

#### *Mode opératoire général : exemple de l'hydrochlorure de décanoate d'amino-éthoxy-éthyle*

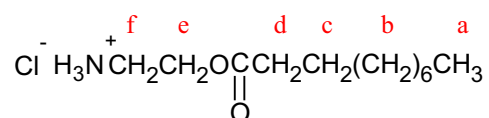
Dans un ballon de 250 ml, surmonté d'un Dean Stark et d'un réfrigérant, placé dans un bain d'huile, 10 mmoles d'acide caprique (1,72 g) sont dissoutes dans 70 mL de toluène. Puis sont introduites 10 mmoles de 2-(2-aminoéthoxy)éthanol (1 eq ; 1,05 g) ainsi que 11 mmoles d'APTS (1,1 eq ; 1,89 g). En agitant, le mélange réactionnel commence à s'homogénéiser. Après 18 heures de chauffage à reflux (120 °C) et une fois le mélange refroidi, le solvant est concentré à 50%. Un solide blanc précipite, il est repris à l'acétate d'éthyle puis filtré sur fritté de porosité 4. Ce produit est recristallisé dans l'acétate d'éthyle, puis soumis durant 30 minutes à un courant d'HCl gazeux dans 100 mL d'éther. Une poudre blanche cristalline est obtenue.

Caractéristiques générales :

Composé	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
7a	251,79	80	81
7b	295,85	90	80

Caractéristiques spectrales :

#### *Hydrochlorure de décanoate d'amino-éthyle (7a)*

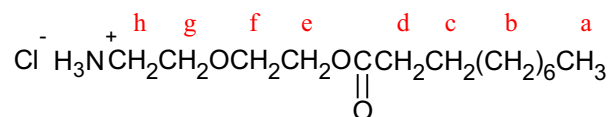


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H,  $6\text{CH}_2$  b) ; 1,6 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  c) ; 2,28 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  d) ; 3,01 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  f) ; 4,32 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  e)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-35 ppm (7  $\text{CH}_2$  b, c) ; 35,2 ppm ( $\text{CH}_2$  d) ; 40,2 ppm ( $\text{CH}_2$  f) ; 67,1 ppm ( $\text{CH}_2$  e) ; 176,4 ppm (C=O)

IR (KBr) : 3080  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ester)

***Hydrochlorure de décanoate d'amino-éthoxy-éthyle (7b)***



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H,  $6\text{CH}_2$  b) ; 1,62 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  c) ; 2,34 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  d) ; 3,12 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  h) ; 3,72 ppm (m, 4H, 2  $\text{CH}_2$  f, g) ; 4,26 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  e)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-35 ppm (7  $\text{CH}_2$  b, c) ; 35,7 ppm ( $\text{CH}_2$  d) ; 41,4 ppm ( $\text{CH}_2$  h) ; 65,1 ppm ( $\text{CH}_2$  e) ; 68,6 ppm ( $\text{CH}_2$  g) ; 71,1 ppm ( $\text{CH}_2$  f) ; 176,2 ppm (C=O)

IR (KBr) : 3080  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ester) ; 1120  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C)

## 2) Préparation des composés **9** (*His-aEO<sub>n</sub>e-Cn*)

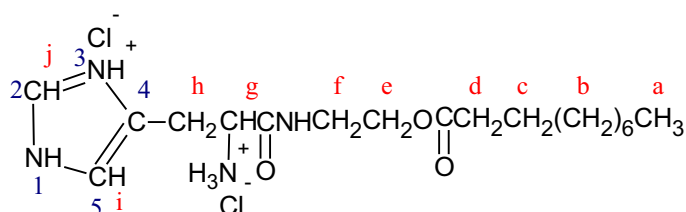
Dans un ballon de 250 ml, 7,8 mmoles de BOC-histidine (2 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,8 mmoles de BOP (1 eq ; 3,45 g), 23,4 mmoles de triéthylamine (3 eq ; 2,36 g) et enfin 7,8 mmoles du composé **7** (1 eq). Tout est solubilisé en quelques minutes, le mélange prend une coloration orangée. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, un produit visqueux contenant une phase solide est obtenu. 30 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés et le mélange est filtré à l'aide d'un fritté de porosité 4. Le filtrat est lavé successivement avec 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique.

Caractéristiques générales :

Composé	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pd (°C)	Rendement (%)
9a	425,39	120	82
9b	469,45	125	80

Caractéristiques spectrales :

### *Dihydrochlorure de décanoate d'histidyl-amido-éthyle (9a)*

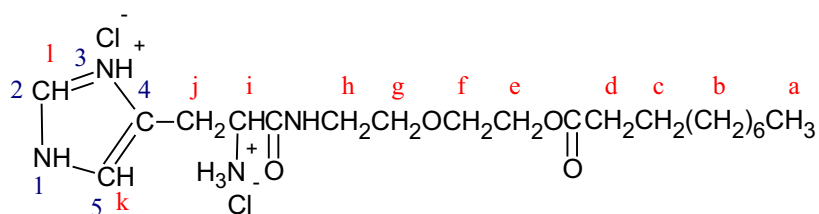


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,34 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,01 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,37 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> h) ; 4,24 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH g) ; 4,32 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 7,02 ppm (s, 1H, CH i) ; 7,45 ppm (s, 1H, CH j)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 23-36 ppm (8CH<sub>2</sub> b, c, h) ; 35,2 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 54,3 ppm (CH g) ; 55,2 ppm (CH<sub>2</sub> f) ; 63,8 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 118,82 ppm (C5) ; 134,0 ppm (C2) ; 137,18 ppm (C4) ; 175-176 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3304  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ester) ; 1648  $\text{cm}^{-1}$  (C=O amide)

***Dihydrochlorure de décanoate d'histidyl-amido-éthoxy-éthyle (9b)***



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,34 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,12 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> h) ; 3,37 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> j) ; 3,6-3,7 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> f, g) ; 4,26 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 4,34 ppm (m, 1H, CH i) ; 6,97 ppm (s, 1H, CH k) ; 7,51 ppm (s, 1H, CH l)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 23-36 ppm (8CH<sub>2</sub> b, c, j) ; 34,7 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 42,7 ppm (CH<sub>2</sub> h) ; 55,6 ppm (CH i) ; 63,8 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 70-71 (2CH<sub>2</sub> f, g) ; 118,2 ppm (C5) ; 133,4 ppm (C2) ; 137,2 ppm (C4) ; 175-176 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3330  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1737  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  ester) ; 1649  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1121  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )

### 3) Préparation des composés **12** (*Gly-Gly-His-aEO<sub>n</sub>e-Cn*)

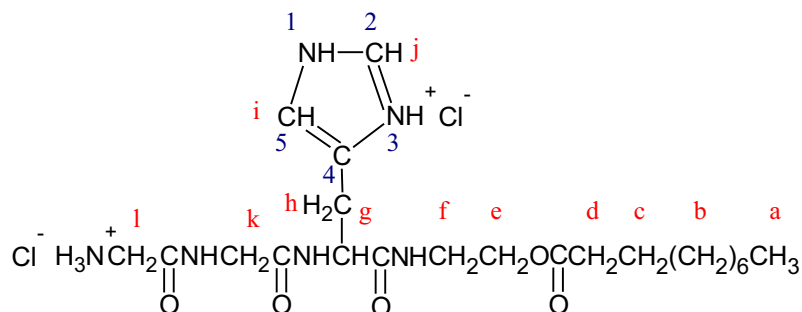
Dans un ballon de 250 ml, 7,6 mmoles de BOC-glycyl-glycine (1,76 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,6 mmoles de BOP (1 eq ; 3,36 g), 30,4 mmoles de triéthylamine (4 eq ; 3,07 g) et enfin 7,6 mmoles d'**His-aEO<sub>n</sub>e-Cn** (**9**) (1 eq). Tout est solubilisé en quelques minutes, le mélange prend une coloration orangée. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. le solvant est évaporé sous pression réduite, un produit visqueux contenant une phase solide est obtenu. 30 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés et le mélange est filtré à l'aide d'un fritté de porosité 4. Le filtrat est lavé successivement avec 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Le filtrat est lavé successivement avec 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit est repris dans 20 ml d'eau puis lyophilisé. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique que l'on conserve à l'abri de l'humidité et à basse température.

Caractéristiques générales :

Composé	M ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Pd ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendement (%)
12a	539,49	149	81
12b	583,55	152	82

Caractéristiques spectrales :

***Dihydrochlorure de décanoate de glycyl-glycyl-histidyl-amido-éthyle (12a)***

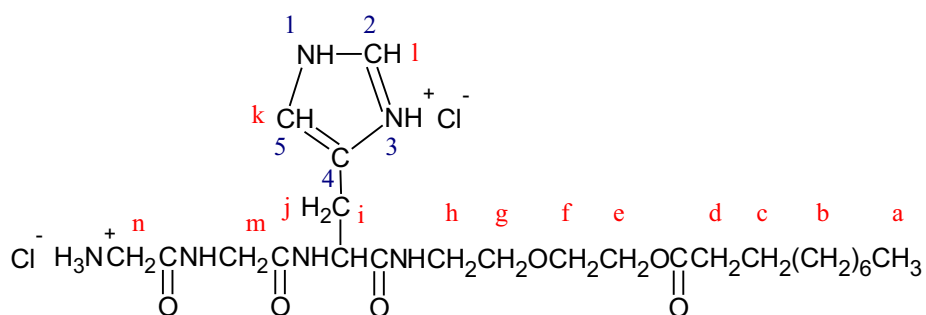


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,21 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,29 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> h) ; 3,41 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,78 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> k) ; 4,12 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> l) ; 4,34 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 4,45 ppm (m, 1H, CH g) ; 7,42 ppm (s, 1H, CH i) ; 7,83 ppm (s, 1H, CH j)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 23-36 ppm (10CH<sub>2</sub> b, c, d, h, k) ; 44,1 ppm (CH<sub>2</sub> l) ; 52,3 ppm (CH g) ; 55,3 ppm (CH<sub>2</sub> f) ; 63,6 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 120,1 ppm (C5) ; 130,2 ppm (C2) ; 147,1 ppm (C4) ; 170-176 ppm (4C=O)

IR (KBr) : 3380  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) ; 1738  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ester) ; 1686, 1649 et 1626  $\text{cm}^{-1}$  (3C=O amide)

**Dihydrochlorure de décanoate de glycyl-glycyl-histidyl-amido-éthoxy-éthyle (12b)**



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub>, b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub>, c) ; 2,21 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, d) ; 3,30 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub>, j) ; 3,45 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, h) ; 3,58 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, f) ; 3,71 (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, g) ; 3,77 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, m) ; 3,99 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub>, n) ; 4,32 ppm (m, CH<sub>2</sub>, e) ; 4,82 ppm (m, 1H, CH, i) ; 7,44 ppm (s, 1H, CH, k) ; 7,84 ppm (s, 1H, CH, l)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub>, a) ; 23-36 ppm (10CH<sub>2</sub>, b, c, d, j, m) ; 39,2 (CH<sub>2</sub>, e) ; 43,7 ppm (CH<sub>2</sub>, n) ; 53,3 ppm (CH, i) ; 63,5 ppm (CH<sub>2</sub>, h) ; 70-71 ppm (2CH<sub>2</sub>, f, g) ; 120,1 ppm (C5) ; 130,0 ppm (C2) ; 147,0 ppm (C4) ; 170-176 ppm (4C=O)

IR (KBr) : 3392 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) ; 1737 cm<sup>-1</sup> (C=O ester) ; 1686, 1649 et 1626 cm<sup>-1</sup> (3C=O amide) ; 1120 cm<sup>-1</sup> (C-O-C)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

**Gly-Gly-His-aEOe-C10** : C : 48,62 % (48,98)    H : 7,38 % (7,47)    N : 15,32 % (15,58)

**Gly-Gly-His-aEO<sub>2</sub>e-C10** : C : 48,92 % (49,40)    H : 7,48 % (7,60)    N : 14,12 % (14,40)



4) Préparation des composé **13** ( $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>n</sub>e-Cn)

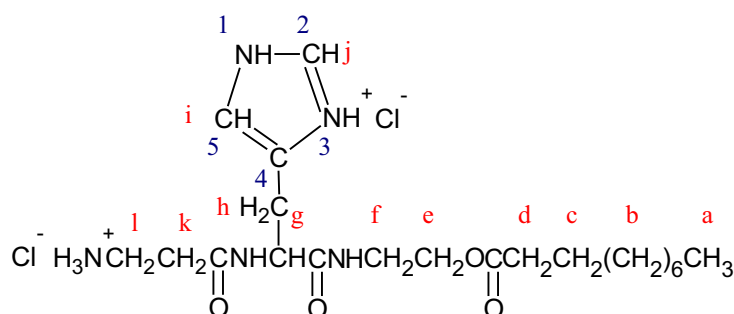
Le protocole est identique à celui de la synthèse des composés **Gly-Gly-His-aEO<sub>n</sub>e-Cn (12)**.  
La BOC- $\beta$ -alanine remplace la BOC-glycyl-glycine.

Caractéristiques générales :

Composé	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pd (°C)	Rendement (%)
13a	496,47	146	82
13b	540,53	150	84

Caractéristiques spectrales :

**Dihydrochlorure de décanoate de  $\beta$ -alanyl-histidyl-amido-éthyle (13a)**

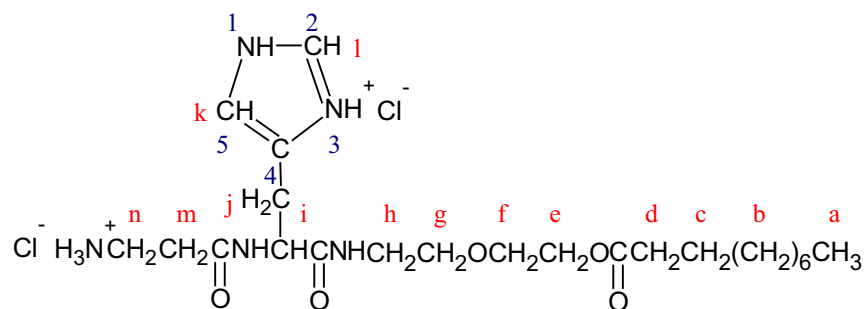


RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,48 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 2,72 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> k) ; 3,29 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> h) ; 3,41 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,70 (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> l) ; 4,33 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 4,74 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 1H, CH g) ; 7,40 ppm (s, 1H, CH i) ; 7,89 ppm (s, 1H, CH j)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 23-36 ppm (10CH<sub>2</sub> b, c, d, h, k) ; 37,7 ppm (CH<sub>2</sub> l) ; 52,3 ppm (CH g) ; 55,3 ppm (CH<sub>2</sub> f) ; 63,6 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 120,3 ppm (C5) ; 130,2 ppm (C2) ; 147 ppm (C4) ; 170-176 ppm (3C=O)

IR (KBr) : 3240  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2926  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  ester) ; 1648 et 1621  $\text{cm}^{-1}$  ( $2\text{C}=\text{O}$  amide)

***Dihydrochlorure de décanoate de  $\beta$ -alanyl-histidyl-amido-éthoxy-éthyle (13b)***



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,90 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6 $\text{CH}_2$  b) ; 1,62 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  c) ; 2,48 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  d) ; 2,72 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  m) ; 3,15-3,30 ppm (ma, 4H, 2 $\text{CH}_2$  h, j) ; 3,42 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$  g) ; 3,57 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz,  $\text{CH}_2$  f) ; 3,70 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  n) ; 4,25 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_2$  e) ; 4,75 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 1H, CH i) ; 7,41 ppm (s, 1H, CH k) ; 7,88 ppm (s, 1H, CH l)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 23-36 ppm (10 $\text{CH}_2$  b, c, d, j, m) ; 37,7 ppm ( $\text{CH}_2$  n) ; 39,2 ( $\text{CH}_2$  e) ; 52,3 ppm (CH i) ; 63,5 ppm ( $\text{CH}_2$  h) ; 70-71 ppm (2 $\text{CH}_2$  f, g) ; 120,1 ppm (C5) ; 130,2 ppm (C2) ; 147,1 ppm (C4) ; 170-176 ppm (3 $\text{C}=\text{O}$ )

IR (KBr) : 3240  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2926  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  ester) ; 1648 et 1621  $\text{cm}^{-1}$  ( $2\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1122  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

**$\beta$ -Ala-His-aEOe-C10** : C : 50,61 % (50,80) H : 7,87 % (7,92) N : 13,92 % (14,11)

**$\beta$ -Ala-His-aEO<sub>2</sub>e-C10** : C : 50,91 % (51,11) H : 7,88 % (8,02) N : 12,89 % (12,96)

#### VI.2.3.1.2. Tensioactifs trimodulaires de type I.2

##### 1) Préparation du composé **14**

Dans un cristalliseur, sont introduits 10 mmoles d'acide caprique (1,72 g) et 10 mmoles de 2-(2-aminoethoxy)éthanol (1 eq ; 1,05 g). Le mélange est homogénéisé en chauffant légèrement avec un sèche-cheveux. Le cristalliseur est placé dans un four micro-ondes dont la puissance est réglée à 350 W pendant 3 minutes, on observe un dégagement gazeux. Après refroidissement, une cire de couleur jaune est obtenue, elle est dissoute dans 60 mL d'acétate d'éthyle. Cette phase est lavée successivement avec 20 mL de solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation sous pression réduite, le solide blanc obtenu est recristallisé dans l'éther.

Caractéristiques générales :

##### **Décanamido-éthoxy-éthanol (14)**

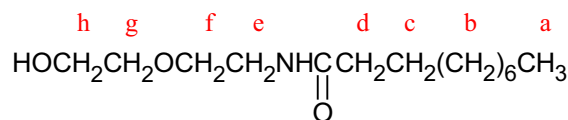
Masse molaire : 259,38 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 90 %

Point de fusion : 70 °C

CCM (SiO<sub>2</sub> ; EtOH/AcOEt 1/5 v/v) : R<sub>f</sub> = 0,65

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,64 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,29 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,40 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 3,57 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> f, g) ; 3,71 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,2 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-37,5 ppm (7  $\text{CH}_2$  b, c) ; 37,9 ppm ( $\text{CH}_2$  d) ; 41,1 ppm ( $\text{CH}_2$  e) ; 63,0 ppm ( $\text{CH}_2$  h) ; 71,4 ppm ( $\text{CH}_2$  f) ; 74,2 ppm ( $\text{CH}_2$  g) ; 177,2 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ )

IR (KBr) : 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1633  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}$  amide) ; 1131  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )

## 2) Préparation du composé **16** (*His-eEO<sub>2</sub>a-C10*)

Dans un ballon de 250 ml, 7,8 mmoles de BOC-histidine (2 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,8 mmoles de BOP (1 eq ; 3,45 g), 15,6 mmoles de triéthylamine (2 eq ; 1,57 g) et enfin 7,8 mmoles du composé **14** (1 eq ; 2,02 g). Tout est solubilisé en quelques minutes, le mélange prend une coloration orangée. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, un produit visqueux est obtenu. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle puis lavé successivement par 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , puis deux fois par 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation de la phase organique, on obtient un solide blanc qui est alors lavé par de l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique.

Caractéristiques générales :

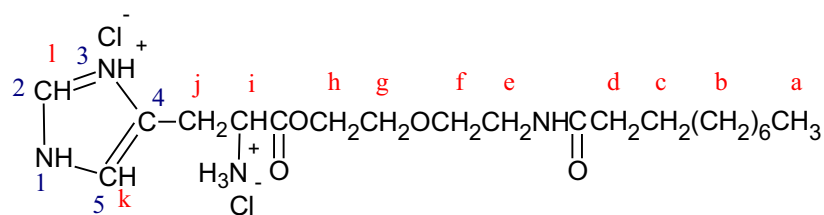
### **Dihydrochlorure d'histidinoate de décylamido-éthoxy-éthyle (16)**

Masse molaire : 469,45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 83 %

Point de décomposition : 130 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6 CH<sub>2</sub> b) ; 1,63 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,24 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,40 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> j) ; 3,47 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 3,57 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,73 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> g) ; 4,3-4,6 (ma, 3H, CH<sub>2</sub> h, CH i) ; 7,59 (s, 1H, CH k) ; 7,74 (s, 1H, CH l)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 15,2 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-38 ppm (9CH<sub>2</sub> b, c, d, j, CH, i) ; 41,1 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 63,0 ppm (CH<sub>2</sub> h) ; 70-71 ppm (2CH<sub>2</sub> f, g) ; 119,2 ppm (C5) ; 130,4 ppm (C2) ; 140,3 ppm (C4) ; 173-178 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3310 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) ; 1739 cm<sup>-1</sup> (C=O ester) ; 1642 cm<sup>-1</sup> (C=O amide) ; 1121 cm<sup>-1</sup> (C-O-C)

### 3) Préparation du composé **19** (Gly-Gly-His-eEO<sub>2a</sub>-C10)

Dans un ballon de 250 ml, 7,6 mmoles de BOC-glycyl-glycine (1,76 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,6 mmoles de BOP (1 eq ; 3,36 g), 30,4 mmoles de triéthylamine (4 eq ; 3,07 g) et enfin 7,6 mmoles d'**His-eEO<sub>2a</sub>-Cn (16)** (1 eq, 3,57 g). Tout est solubilisé en quelques minutes, le mélange prend une coloration orangée. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. le solvant est évaporé sous pression réduite, un produit visqueux contenant une phase solide est obtenu. 30 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés et le mélange est filtré à l'aide d'un fritté de porosité 4. Le filtrat est lavé successivement avec 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl.

Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Le filtrat est lavé successivement avec 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, puis deux fois avec 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit est repris dans 20 ml d'eau puis lyophilisé. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique que l'on conserve à l'abri de l'humidité et à basse température.

Caractéristiques générales :

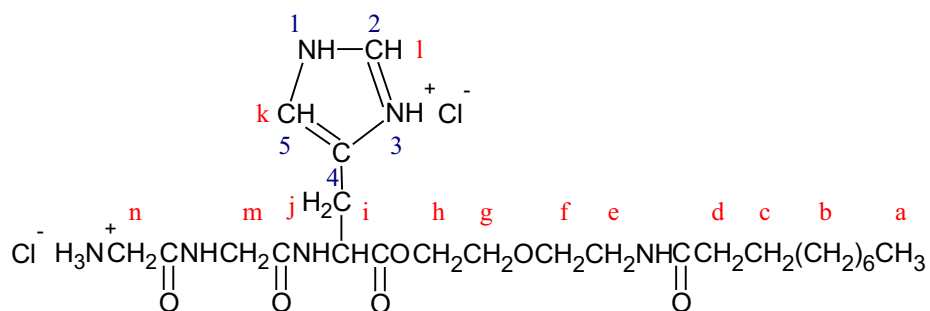
### Dihydrochlorure de glycyglycyl-histidinoate de décylamido-éthoxy-éthyle (19)

Masse molaire : 583,55 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 81 %

Point de décomposition : 140 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,92 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,61 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,22 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,35 ppm (md, 2H, CH<sub>2</sub> j) ; 3,45 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 3,58 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,71 (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> g) ; 3,77 (s, 2H, CH<sub>2</sub> m) ; 3,99 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> n) ; 4,32 ppm (m, CH<sub>2</sub> h) ; 4,79 ppm (m, 1H, CH i) ; 7,54 ppm (s, 1H, CH k) ; 7,74 ppm (s, 1H, CH l)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,2 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-36 ppm ( $10\text{CH}_2$  b, c, d, j, m) ; 42,6 ppm ( $\text{CH}_2$  e) ; 44,2 ppm ( $\text{CH}_2$  n) ; 53,8 ppm ( $\text{CH}$  i) ; 66,8 ppm ( $\text{CH}_2$  h) ; 70-72 ppm ( $2\text{CH}_2$  f, g) ; 119,8 ppm (C5) ; 131,4 ppm (C2) ; 135,9 ppm (C4) ; 169-172 ppm ( $4\text{C}=\text{O}$ )

IR (KBr) : 3225  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1739  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  ester) ; 1683, 1653 et 1618  $\text{cm}^{-1}$  ( $3\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1120  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )

Microanalyse : expérimentale (calculée)

**Gly-Gly-His-eEO<sub>2</sub>a-C10** : C : 49,11 % (49,40)    H : 7,78 % (7,60)    N : 14,23 % (14,40)

#### 4) Préparation du composé **20** ( $\beta$ -Ala-His-eEO<sub>2</sub>a-C10)

Le protocole est identique à celui de la synthèse du composé **Gly-Gly-His-eEO<sub>2</sub>a-Cn** (**19**).  
La BOC- $\beta$ -alanine remplace la BOC-glycyl-glycine.

Caractéristiques générales :

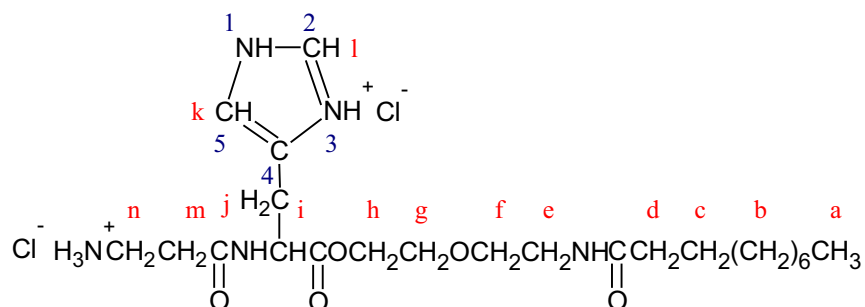
#### Dihydrochlorure de $\beta$ -alanyl-histidinoate de décylamido-éthoxy-éthyle (**20**)

Masse molaire : 540,53  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 82 %

Point de décomposition : 150 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,92 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 12H, 6CH<sub>2</sub> b) ; 1,62 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,24 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 2,72 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> m) ; 3,15-3,30 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> e, j) ; 3,44 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, CH<sub>2</sub> g) ; 3,57 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, CH<sub>2</sub> f) ; 3,70 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> n) ; 4,30 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, CH<sub>2</sub> h) ; 4,76 ppm (t,  $^3\text{J} = 7,5$  Hz, 1H, CH i) ; 7,41 ppm (s, 1H, CH k) ; 7,88 ppm (s, 1H, CH l)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 23-36 ppm (10CH<sub>2</sub> b, c, d, j, m) ; 37,7 ppm (CH<sub>2</sub> n) ; 42,6 ppm (CH<sub>2</sub> e) ; 53,2 ppm (CH i) ; 66,7 ppm (CH<sub>2</sub> h) ; 70-71 ppm (2CH<sub>2</sub> f, g) 120,1 ppm (C5) ; 130,2 ppm (C2) ; 147,1 ppm (C4) ; 170-174 ppm (3C=O)

IR (KBr) : 3250  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) ; 1737  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ester) ; 1646 et 1620  $\text{cm}^{-1}$  (2C=O amide) ; 1122  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C)

Microanalyse : expérimentale (calculée)

**$\beta$ -Ala-His-eEO<sub>2</sub>a-C10** : C : 49,11 % (49,40) H : 7,78 % (7,60) N : 14,23 % (14,40)

### VI.2.3.2. Tensioactifs trimodulaires à deux liens amides

#### VI.2.3.2.1. Préparation du composé **21**

Dans un ballon de 500 ml placé dans un bain d'eau froide, 320 mmoles d'(éthylènedioxy)bis-éthylamine sont dissoutes dans 200 ml de CHCl<sub>3</sub> sous agitation. Puis sont ajoutées pendant une heure et par portion, 27 mmoles de chlorure de triphénylméthyle en maintenant la température du bain entre 5 et 10 °C. Le mélange est agité jusqu'à ce que la température remonte à l'ambiante. Le mélange est ensuite lavé par 200 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé sous pression réduite. Un produit visqueux



de couleur jaune translucide est obtenu. Celui-ci est purifié par chromatographie sur gel de silice (élution graduée AcOEt / MeOH)

Caractéristiques générales :

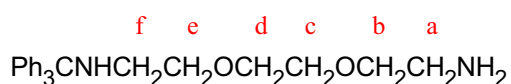
**Amino-éthoxy-éthoxy-éthyl-triphénylméthylamine (21)**

Masse molaire : 259,38 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 90 %

CCM (SiO<sub>2</sub>; AcOEt) : R<sub>f</sub> = 0,57

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 1,35 ppm (s large, 3H, NH<sub>2</sub>, NH) ; 2,02 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 2,53 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> a) ; 3,2-3,5 ppm (m, 8H b, c, d, e) ; 7-7,5 ppm (ma, 15H, protons aromatiques)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 42,0 ppm (CH<sub>2</sub> a) ; 43,3 ppm (CH<sub>2</sub> f) ; 70,4 ; 70,6 ; 71,5 ; 73,6 ppm (4 CH<sub>2</sub> b, c, d, e) ; 126,5 ; 128,1 ; 129 ppm (carbone aromatiques) ; 146,4 ppm (carbone quaternaire)

IR (KBr) : 3382 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>) ; 1120 et 1094 cm<sup>-1</sup> (C-O-C) ; 703, 743 cm<sup>-1</sup> (aromatiques)

*VI.2.3.2.2. Préparation du composé 23 (dihydrochlorure d'alkylamido-éthoxy-éthoxy-éthylamine)*

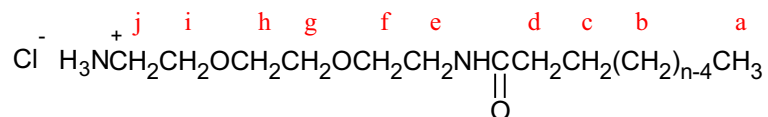
Dans un ballon de 250 ml, 10 mmoles d'acide gras sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 10 mmoles de BOP (1 eq ; 4,42 g), 20 mmoles de triéthylamine (2 eq ; 2,02 g) et enfin 10 mmoles du composé 21 (1 eq). La réaction est

laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, un liquide visqueux de couleur orange est obtenu. Il est dissous dans 30 mL d'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée successivement par 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> puis deux fois par 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et élimination de l'acétate d'éthyle, le groupement triphénylméthyle est retiré en solubilisant le liquide visqueux obtenu dans un mélange de 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40 mL de THF et 40 mL d'HCl (37%). Les solvants sont éliminés sous pression réduite, puis le solide blanc amorphe obtenu est recristallisé dans l'acétonitrile.

Caractéristiques générales :

Composé	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
23a	10	338,91	156	69
23b	12	366,97	120	76
23c	14	395,02	80	85

Caractéristiques spectrales :



Les composés **23** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, le dérivé en C12 est donné en tant qu'exemple.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 16H, 8CH<sub>2</sub> b) ; 1,64 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,23 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 2,96 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> j) ; 3,40 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> e) ; 3,58 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> f) ; 3,63 ppm (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> i) ; 3,68 ppm (s, 4H, 2CH<sub>2</sub> g,h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 15,3 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 22-38 ppm ( $10\text{CH}_2$  b, c, d) ; 40,9 et 41,5 ppm ( $2\text{CH}_2$  e, j) ; 68-72 ppm ( $4\text{CH}_2$  f, g, h, i) ; 177,2 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ )

IR (KBr) : 3256  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1633  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1125 et 1094  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )

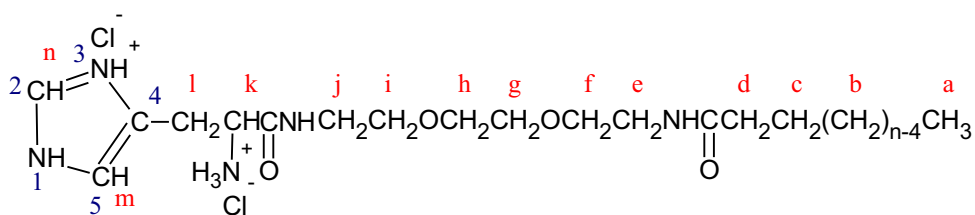
#### VI.2.3.2.3. Préparation du composé **25** (His-aE0<sub>3</sub>a-Cn : dihydrochlorure d'alkylamido-éthoxy-éthoxy-éthylamidohistidine)

Dans un ballon de 250 ml, 7,8 mmoles de BOC-histidine (2 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,8 mmoles de BOP (1 eq ; 3,45 g), 23,4 mmoles de triéthylamine (3 eq ; 2,06 g) et enfin 7,8 mmoles du composé **23** (1eq). Avant même que la solubilisation des réactifs soit totale, un précipité blanc apparaît sauf pour le dérivé C10. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Dans le cas où un précipité est obtenu, il est filtré sur fritté de porosité 4, lavé avec 50 mL d'acétonitrile puis avec 50 mL d'éther. Le solide blanc obtenu est ensuite recristallisé dans l'acétonitrile. Pour le dérivé C10, on applique la procédure de lavages habituelle (page 220). Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation sous pression réduite, on obtient un solide blanc lavé à l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique.

Caractéristiques générales :

Composé	n	M ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Pf ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendement (%)
25a	10	512,51	170	81
25b	12	540,57	134	88
25c	14	568,62	112	90

Caractéristiques spectrales :



Les composés **His-aE03a-Cn** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, **His-aE03a-C12** est donné en tant qu'exemple.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 16H, 8CH<sub>2</sub> b) ; 1,63 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,25 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,4-3,7 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> f, j) ; 4,28 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,7$  Hz, 1H, CH k) ; 7,58 ppm (s, 1H, CH m) ; 8,97 ppm (s, 1H, CH n)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 15,3 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 22-38 ppm (10CH<sub>2</sub> b, c, d, l) ; 40,9 et 41,5 ppm (2CH<sub>2</sub> e, j) ; 55,7 ppm (CH k) ; 68-72 ppm (4CH<sub>2</sub> f, g, h, i) ; 118,2 ppm (C5) ; 133,4 ppm (C2) ; 137,2 ppm (C4) ; 175-176 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3291 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) ; 1648 et 1633 cm<sup>-1</sup> (2C=O amide) ; 1122 et 1095 cm<sup>-1</sup> (C-O-C)

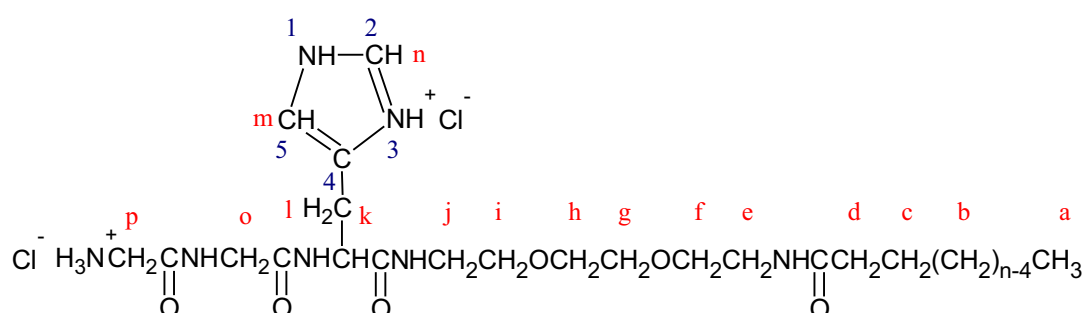
#### VI.2.3.2.4. Préparation du composé **28** (Gly-Gly-His-aE03a-Cn : dihydrochlorure d'alkylamido-éthoxy-éthoxy-éthylamidoglycyl-glycyl-histidine)

Le protocole est identique à celui de la synthèse du composé **Gly-Gly-His-Cn (5)**. Le composé **His-aE03a-Cn (25)** remplace **His-Cn (2)**

Caractéristiques générales :

Composé	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
28a	10	626,62	219	86
28b	12	654,67	210	85
28c	14	682,72	169	90

Caractéristiques spectrales :



Les composés **Gly-Gly-His-aE03a-Cn** possèdent des caractéristiques spectrales identiques, **Gly-Gly-His-aE03a-C12** est donné en tant qu'exemple.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,89 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 16H, 8CH<sub>2</sub> b) ; 1,60 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 2,23 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> d) ; 3,1-3,45 ppm (ma, 6H, 3CH<sub>2</sub> e, j, l) ; 3,5-3,6 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> f, i) ; 3,63 ppm (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>, g, h) ; 3,81 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> o) ; 3,94 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> p) ; 4,28 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,7 Hz, 1H, CH k) ; 7,42 ppm (s, 1H, CH m) ; 8,83 ppm (s, 1H, CH n)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 15,2 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-38 ppm (10CH<sub>2</sub> b, c, d, e, j, l, o) ; 44,5 ppm (CH<sub>2</sub> p) ; 54,5 ppm (CH k) ; 71-72 ppm (4CH<sub>2</sub> f, g, h, i) ; 119,4 ppm (C5) ; 131,8 ppm (C2) ; 137,2 ppm (C4) ; 169-178 ppm (4C=O)

IR (KBr) : 3286  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2916  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1685 à 1620  $\text{cm}^{-1}$  ( $4\text{C}=\text{O}$  amide) ; 1122 et 1097  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C)

Microanalyse : expérimentale (calculée)

**Gly-Gly-His-aEO<sub>3</sub>a-C10** : C : 50,07% (49,84) H : 7,99 % (7,88) N : 15,76 % (15,65)

**Gly-Gly-His-aEO<sub>3</sub>a-C12** : C : 51,02% (51,37) H : 8,36 % (8,16) N : 14,88 % (14,98)

**Gly-Gly-His-aEO<sub>3</sub>a-C14** : C : 52,67% (52,78) H : 8,48 % (8,42) N : 14,26 % (14,36)

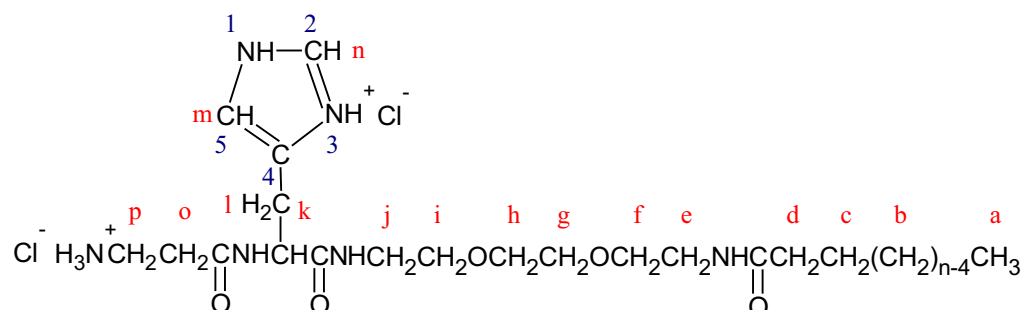
#### VI.2.3.2.5. Préparation du composé **29** ( $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>3</sub>a-Cn : dihydrochlorure d'alkylamido-éthoxy-éthoxy-éthylamido- $\beta$ -alanyl-histidine)

Le protocole est identique à celui de la synthèse du composé  $\beta$ -Ala-His-Cn (**6**).

Caractéristiques générales :

Composé	n	M (g.mol <sup>-1</sup> )	Pf (°C)	Rendement (%)
29a	10	583,59	220	87
29b	12	611,64	198	87
29c	14	639,70	224	92

Caractéristiques spectrales :



Les composés  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>3</sub>a-Cn possèdent des caractéristiques spectrales identiques,  $\beta$ -Ala-His-aEO<sub>3</sub>a-C12 est donné en tant qu'exemple.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,94 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,33 ppm (m, 16H, 8 $\text{CH}_2$  b) ; 1,63 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  c) ; 2,23 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  d) ; 2,74 ppm (m, 2H,  $\text{CH}_2$  o) ; 3,2-3,4 ppm (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$  e, f, i, p) ; 3,58 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  j) ; 3,66 ppm (s, 4H, 2 $\text{CH}_2$  g, h) ; 4,75 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz, 1H, CH k) ; 7,44 ppm (s, 1H, CH m) ; 8,89 ppm (s, 1H, CH n)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 15,5 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-38 ppm (10 $\text{CH}_2$  b, c, d, e, j, l, o) ; 44,1 ppm ( $\text{CH}_2$  p) ; 54,4 ppm (CH k) ; 71-72 ppm (4 $\text{CH}_2$  f, g, h, i) ; 119,2 ppm (C5) ; 131,7 ppm (C2) ; 135,7 ppm (C4) ; 172-177 ppm (4C=O)

IR (KBr) : 3245  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2916  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1681, 1643 et 1623  $\text{cm}^{-1}$  (C=O amide) ; 1022 et 1095  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C)

Microanalyse : expérimentale (calculée)

$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>3</sub> a-C10 :	C : 50,97% (51,45)	H : 8,18 % (8,29)	N : 14,12 % (14,40)
$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>3</sub> a-C12 :	C : 52,92% (53,02)	H : 8,49 % (8,57)	N : 13,68 % (13,74)
$\beta$ -Ala-His-aEO <sub>3</sub> a-C14 :	C : 54,62% (54,45)	H : 8,92 % (8,82)	N : 13,29 % (13,14)

## VI.2.4 Préparation des tensioactifs trimodulaires de type II

### VI.2.4.1. Préparation du dihydrochlorure de dodécylamidoglycyl-histidine (31 : Gly-His-C12)

Le protocole est identique à celui de la synthèse des composés **Gly-Gly-His-Cn (5)**. La BOC-glycine remplace la BOC-glycyl-glycine. Après filtration et séchage du produit de couplage qui précipite, on obtient un solide blanc qui est ensuite recristallisé dans l'acétonitrile. Le solide recristallisé est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à un courant d'HCl gazeux. Le produit est repris dans 20 ml d'eau puis lyophilisé. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique.

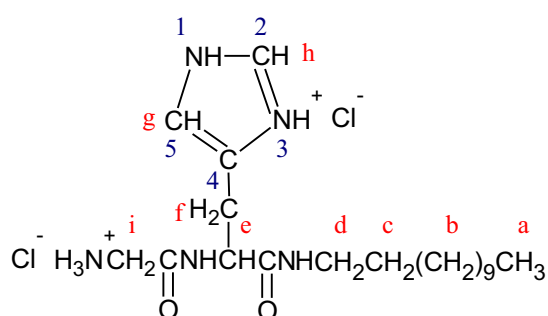
Caractéristiques générales :

Masse molaire : 452,46 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 90 %

Point de fusion : 190 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,89 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9CH<sub>2</sub> b) ; 1,52 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub> c) ; 3,1-3,3 ppm (ma, 4H, 2CH<sub>2</sub> d, f) ; 3,81 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> i) ; 4,78 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 1H, CH e) ; 7,34 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,87 ppm (s, 1H, CH h)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 15 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-34 ppm (11 CH<sub>2</sub> b, c, f) ; 34 ppm (CH<sub>2</sub> i) ; 42,5 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 54,6 ppm (CH e) ; 119,4 ppm (C5) ; 131,6 ppm (C4) ; 135,7 ppm (C2) ; 168,3 et 172,2 ppm (2C=O)

IR (KBr) : 3278 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) ; 1666 et 1643 cm<sup>-1</sup> (3C=O amide)

#### VI.2.4.2. Préparation du dodécylamido-tertbutyloxycarbonyl-lysyl-glycyl-histidine (**33** : BOC-Lys-Gly-His-C12)

Dans un ballon de 250 ml, 7,3 mmoles de BOC-lysine(Z) (2,76 g) sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7,3 mmoles de BOP (1 eq ; 3,23 g), 30,4 mmoles de triéthylamine (4 eq ; 2,95 g) et enfin 7,3 mmoles de **Gly-His-Cn (31)** (1



eq). Avant même que la solubilisation des réactifs soit totale, un précipité blanc apparaît. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le précipité obtenu est filtré sur fritté de porosité 4, lavé avec 50 mL d'acétonitrile puis avec 50 mL d'éther. On obtient un solide blanc qui est ensuite recristallisé dans l'acétonitrile. Le solide recristallisé est dissous dans 20 mL de méthanol puis la solution est introduite dans un autoclave, 0,1g de palladium activé sur charbon est ajouté. Le mélange est ensuite agité pendant 24 heures à une température de 40 °C et sous une pression de 50 bars d'hydrogène. Le catalyseur est ensuite éliminé par filtration sur célite et le solvant est évaporé sous pression réduite.

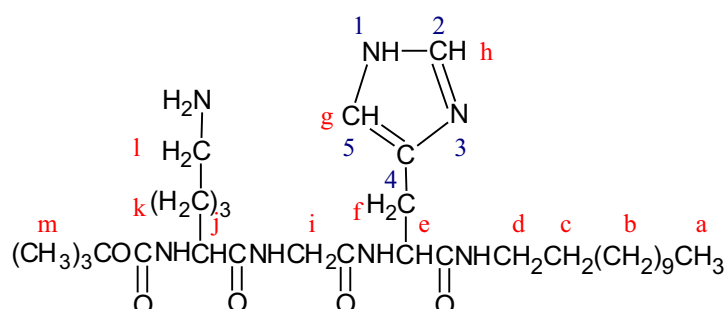
Caractéristiques générales :

Masse molaire : 607,83 g.mol<sup>-1</sup>

Rendement : 94 %

Point de fusion : 233 °C

Caractéristiques spectrales :



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) : 0,92 ppm (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9CH<sub>2</sub> b) ; 1,51 ppm (s, 9H, 3CH<sub>3</sub> m) ; 1,5-1,9 ppm (ma, 8H, 4CH<sub>2</sub> c, k) ; 3,1-3,3 ppm (ma, 6H, 3CH<sub>2</sub> d, f, l) ; 3,82 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> i) ; 4,25 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 1H, CH j) ; 4,76 ppm (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 1H, CH e) ; 7,32 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,84 ppm (s, 1H, CH h)

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD) : 14,9 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-33 ppm (15CH<sub>2</sub> b, c, f, k, m) ; 34 ppm (CH<sub>2</sub> i) ; 41,5 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 44,1 ppm (CH<sub>2</sub> l) ; 53,2 ppm (CH j) ; 54,5 ppm (CH e) ; 117,2 ppm (C5) ; 131,2

ppm (C4) ; 134,4 ppm (C2) ; 156,2 ppm (C=O) ; 169-173 ppm (3C=O)

IR (KBr) : 3380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ; 2923  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ; 1702  $\text{cm}^{-1}$  (C=O BOC) ; 1685, 1652 et 1643  $\text{cm}^{-1}$  (3C=O amide)

#### VI.2.4.3. Préparation du composé **35** (MeEO<sub>n</sub>-a-Lys-Gly-His-C12)

##### *Mode opératoire général : exemple du composé **35a***

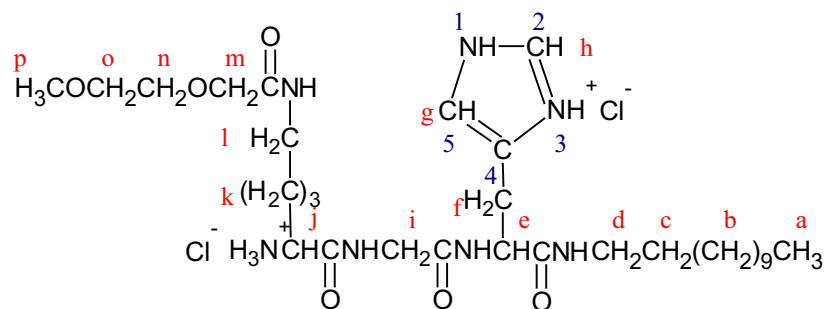
Dans un ballon de 250 ml, 7 mmoles de 2-(2-Méthoxyéthoxy)-acide acétique (0,94 g) sont diluées dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 7 mmoles de BOP (1 eq ; 3,09 g), 14 mmoles de triéthylamine (2 eq ; 1,41 g) et enfin 7 mmoles de **BOC-Lys-Gly-His-Cn (33)** (1 eq). Tout est solubilisé en quelques minutes, le mélange prend une coloration orangée. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, un produit visqueux est obtenu. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle puis lavé successivement par 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N, 20 mL de solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , puis deux fois par 20 mL de solution saturée de NaCl. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation de la phase organique, on obtient un solide blanc qui est alors lavé par de l'éther et filtré. Celui-ci est dispersé dans l'éther anhydre et soumis à de l'acide chlorhydrique gazeux, produit par la réaction de 30 mL d'acide sulfurique concentré (98%) dilué dans 10 mL d'eau sur 40 mg de chlorure de sodium. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique. Le produit final est un solide blanc plus ou moins hygroscopique que l'on conserve à l'abri de l'humidité et à basse température.

Caractéristiques générales :

Composé	M ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Pd ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendement (%)
35a	696,75	250	81
35b	740,80	260	80

Caractéristiques spectrales :

**35a :**

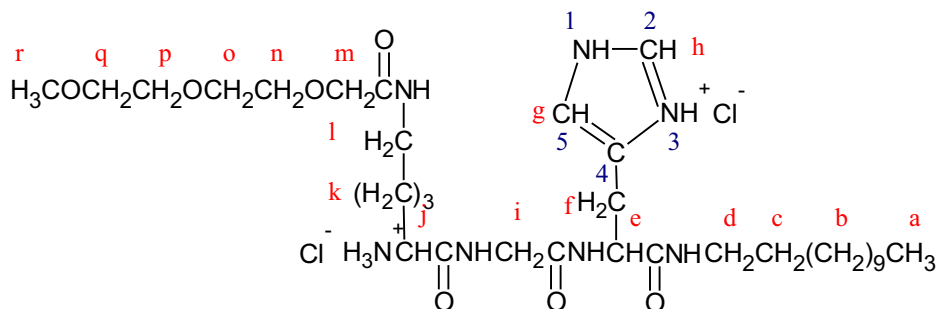


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,93 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H, 9CH<sub>2</sub> b) ; 1,5-1,9 ppm (ma, 8H, 4CH<sub>2</sub> c, k) ; 3,1-3,3 ppm (ma, 6H, 3CH<sub>2</sub> d, f, l) ; 3,35 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub> p) ; 3,58 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> o) ; 3,71 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> n) ; 3,84 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> i) ; 4,28 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH j) ; 4,39 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub> m) ; 4,76 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH e) ; 7,41 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,88 ppm (s, 1H, CH h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 14,8 ppm (CH<sub>3</sub> a) ; 24-33 ppm (15CH<sub>2</sub> b, c, f, k,) ; 34,2 ppm (CH<sub>2</sub> i) ; 41,5 ppm (CH<sub>2</sub> d) ; 44,3 ppm (CH<sub>2</sub> l) ; 53,5 ppm (CH j) ; 54,6 ppm (CH e) ; 55,7 ppm (CH m) ; 59,3 ppm (CH<sub>3</sub> p) ; 70-72 ppm (2 CH<sub>3</sub> n, o) ; 117,2 ppm (C5) ; 131,3 ppm (C4) ; 134,5 ppm (C2) ; 169-174 ppm (4C=O)

IR (KBr) : 3340  $\text{cm}^{-1}$  (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ; 2921  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) ; 1690-1620  $\text{cm}^{-1}$  (4C=O amide) ; 1115  $\text{cm}^{-1}$  (COC)

**35b :**



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD) : 0,93 ppm (t,  $^3\text{J} = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  a) ; 1,2-1,4 ppm (ma, 18H,  $9\text{CH}_2$  b) ; 1,5-1,9 ppm (ma, 8H,  $4\text{CH}_2$  c, k) ; 3,1-3,3 ppm (ma, 6H,  $3\text{CH}_2$  d, f, l) ; 3,35 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$  r) ; 3,51 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  q) ; 3,67 ppm (t,  $^3\text{J} = 5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  n) ; 3,75 ppm (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  o, p) ; 3,84 ppm (s, 2H,  $\text{CH}_2$  i) ; 4,28 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH j) ; 4,39 ppm (s, 2H,  $\text{CH}_2$  m) ; 4,76 ppm (t,  $^3\text{J} = 7$  Hz, 1H, CH e) ; 7,41 ppm (s, 1H, CH g) ; 8,88 ppm (s, 1H, CH h)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD) : 14,8 ppm ( $\text{CH}_3$  a) ; 24-33 ppm ( $15\text{CH}_2$  b, c, f, k,) ; 34,2 ppm ( $\text{CH}_2$  i) ; 41,5 ppm ( $\text{CH}_2$  d) ; 44,4 ppm ( $\text{CH}_2$  l) ; 53,5 ppm (CH j) ; 54,6 ppm (CH e) ; 55,9 ppm (CH m) ; 59,4 ppm ( $\text{CH}_3$  r) ; 70-73 ppm ( $4\text{CH}_3$  n, o, p, q) ; 117,2 ppm (C5) ; 131,3 ppm (C4) ; 134,5 ppm (C2) ; 169-174 ppm ( $4\text{C}=\text{O}$ )

IR (KBr) :  $3340\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ) ;  $2921\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) ;  $1690\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$  ( $4\text{C}=\text{O}$  amide) ;  $1115$  et  $1090\text{ cm}^{-1}$  (COC)

Microanalyses : expérimentale (calculée)

**MeEOa-Lys-Gly-His-C12** : C : 53,97% (53,44) H : 8,81 % (8,54) N : 15,16 % (14,07)

**MeEO<sub>2</sub>a-Lys-Gly-His-C12** : C : 53,67% (53,50) H : 8,67 % (8,57) N : 13,44 % (13,24)