



HAL
open science

Identification des intermédiaires de la réduction du dioxygène par la cytochrome c oxydase et ses modèles en faisant appel à la spectroscopie IR différentielle

Nesrine Oueslati

► **To cite this version:**

Nesrine Oueslati. Identification des intermédiaires de la réduction du dioxygène par la cytochrome c oxydase et ses modèles en faisant appel à la spectroscopie IR différentielle. Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF027 . tel-00781055

HAL Id: tel-00781055

<https://theses.hal.science/tel-00781055>

Submitted on 25 Jan 2013

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE ED 222 Sciences Chimiques

Institut de Chimie UMR 7177

THÈSE présentée par :

Nesrine OUESLATI

soutenue le : 6 juillet 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Identification des intermédiaires de la réduction
du dioxygène par la cytochrome c oxydase et
ses modèles en faisant appel à la spectroscopie
IR différentielle**

THÈSE dirigée par :

Prof. HELLWIG Petra

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Prof. MAHY Jean Pierre

Directeur de l'ICMMO, université Paris-Sud

Dr. BERTHOMIEU Catherine

Directrice de LIPM, CEA de Cadarache

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. MANDON Dominique

Directeur de recherche C.N.R.S., université de Strasbourg

Dr. VOS Marten

Chercheur C.N.R.S., école polytechnique de Paris

Remerciements

Je remercie vivement le Pr. Dr. Petra Hellwig de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans un environnement dynamique, interdisciplinaire et convivial. Merci à Petra pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa patience.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Frédéric Melin pour, ses explications, ses conseils avisés et tout ce qui a trait de près ou de loin aux modèles biomimétiques. Merci Frédéric pour ta correction critique du manuscrit et ta bonne humeur.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Un grand merci à M. Dominique Mandon et à Mme Catherine Berthomieu pour leurs remarques riches et intéressantes sur le manuscrit.

Un grand merci à Laurent Frémand pour sa disponibilité, sa patience et son aide précieuse pour régler tous les petits problèmes techniques et de montage.

Les résultats obtenus sur la photochimie des modèles doivent beaucoup aux compétences d'Aurélien Trivella. Merci à lui.

Merci à mes différents collègues ; Ruth, Yashvin, Sébastien, Mariana qui m'ont apporté leur soutien et encouragement. Un grand Merci à Youssef et Julien pour leurs nombreux conseils, leur humour et leur disponibilité pour régler mes petits soucis informatiques.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai eu la possibilité de travailler dans le cadre de la collaboration et sans qui ce travail n'aurait pas abouti :

Le groupe allemand dirigé par le Pr. Dr. Hartmut Michel (Department of Molecular Membrane Biology, Max-Planck institut, Frankfurt) qui m'a fourni l'ensemble des échantillons de l'oxydase. Un grand Merci à Heike Angerer pour m'avoir appris le protocole permettant la génération des intermédiaires de l'oxydase et de m'avoir fait visiter Francfort.

Le Dr. Jean Weiss (CLAC, UdS, Strasbourg, France) de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la réalisation des expériences sur les modèles. Merci également à tous les membres de CLAC pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Le Dr. Bernard Boitrel (ICMV, Rennes, France).

Merci aussi à Martine Heinrich pour son expertise pour l'utilisation du spectromètre de fluorescence et à sa disponibilité.

Merci à Hassen Jaafer pour son aide et ses conseils. Merci Hassen pour ton écoute et ta gentillesse.

Merci à ma famille. Merci à vous qui m'avez toujours encouragée, soutenue et accompagnée tout au long de ma vie.

Table des matières

Remerciements	I
Table des matières	III
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures.....	X
Liste des annexes.....	XVIII
Liste des abréviations	XIX
Introduction	XX
Chapitre I : La cytochrome <i>c</i> oxydase et ses modèles biomimétiques	1
I.1 Chaîne respiratoire de mitochondries et de procaryotes	2
I.2 Cytochrome <i>c</i> oxydase.....	5
I.2.1 Structure de l'oxydase <i>aa</i> ₃ de <i>Paracoccus denitrificans</i>	7
I.2.2 Mécanisme réactionnel de la CcO	10
2.2.1 Transfert de protons.....	11
2.2.2 Intermédiaires du cycle catalytique	14
I.3 Modèles biomimétiques de la cytochrome <i>c</i> oxydase.....	24
I.3.1 Modèles Fonctionnels	25
I.3.2 Modèles structuraux.....	36
3.2.1 Modèles auto-assemblés par un pont oxygène	36
3.2.2 Modèles covalents	41
I.4 Choix des modèles de la CcO étudiés.....	46
I.4.1 Modèles 4C ₂ H ₂	48
I.4.2 Modèles HI.....	48
I.4.3 Porphyrine à anse phénanthroline (<i>Porphen</i>)	49
I.5 Objectifs de la thèse	49
I.6 Généralités sur les porphyrines.....	51
I.6.1 Structure de base et nomenclature	51
I.6.2 Géométrie du cycle porphyrinique.....	52
I.6.3 Configuration électronique de l'hème	52

I.7 Techniques spectroscopiques	54
I.7.1 Spectroscopie UV-visible	55
I.7.2 Spectroscopie de fluorescence	56
7.2.1 Diagramme d'énergie et spectre de fluorescence	56
7.2.2 Rendement quantique et temps de vie de fluorescence	58
7.2.3 Fluorescence intrinsèque des protéines	59
I.7.3 Spectroscopie d'absorption infrarouge	61
7.3.1 Principe.....	61
7.3.2 Aspects théoriques.....	61
7.3.3 Analyse de spectres IR	64
7.3.4 Spectroscopie ATR-IRTF.....	65
7.3.5 Application de la spectroscopie IRTF à l'étude des hémoprotéines.....	67
I.8 Conclusion	72
Chapitre II : Matériel et méthodes	73
II.1 Cytochrome c oxydase	74
II.1.1 Préparation des échantillons	74
1.1.1 Concentration	74
1.1.2 Préparation du "Culot"	74
II.1.2 Méthodes spectroscopiques	75
1.2.1 Spectroscopie UV-visible.....	75
1.2.2 Spectroscopie de fluorescence.....	76
1.2.2.1 Mesures à l'état stationnaire.....	76
1.2.2.2 Mesures spectroscopiques résolues en temps.....	77
1.2.3 Spectroscopie ATR-FTIR en mode différentiel	78
1.2.4 Spectroscopie IRTF en mode ATR ou transmission	80
II.2 Modèles synthétiques de la CcO	81
II.2.1 Préparation des échantillons	81
2.1.1 Complexes de Fe(III).....	81
2.1.2 Complexes de Fe(II)	81
2.1.2.1 Tentative de réduction par ZnHg.....	82
2.1.2.2 Tentative de réduction par la dithionite de sodium	82
2.1.3 Complexes de Fe(II)-Cu(I).....	83
2.1.4 Complexes de Fe(II)- ¹⁶ O ₂ / ¹⁸ O ₂	83
2.1.5 Complexes de Fe ^{II} -CO et [Fe ^{II} -Cu ^I]-CO.....	83
II.2.2 Méthodes spectroscopiques	83
2.2.1 Spectroscopie ATR-FTIR.....	83

2.2.2 Spectroscopie IRTF couplée à la photochimie à basse température.....	85
Chapitre III : Étude de la cytochrome c oxydase par spectroscopie UV-Visible, de fluorescence et IR	87
III.1 Étude des espèces radicalaires.....	90
III.1.1 Spectroscopie UV-Visible.....	91
1.1.1 Formation des intermédiaires P _H , F _H et F _H	92
1.1.2 Formation de l'intermédiaire P ₁₀	94
III.1.2 Spectroscopie de fluorescence	96
1.2.1 Fluorescence statique	96
1.2.2 Déclins de fluorescence.....	100
III.2 Caractérisation des intermédiaires de la CcO par spectroscopie IR.....	102
III.2.1 Caractérisation des intermédiaires dans le domaine de l'IR moyen	103
2.1.1 Spectres préliminaires du film stable de la CcO.....	103
2.1.2 Cycles de réduction et d'oxydation	104
2.1.3 Intermédiaires P _H et F _H	106
2.1.4 Intermédiaire P ₁₀	108
III.2.2 Étude de la CcO dans l'IR lointain (700-50 cm ⁻¹)	109
2.2.1 Spectres de différence des intermédiaires de la CcO	109
2.2.2 Spectre ATR de la CcO à l'état oxydé (O).....	110
2.2.3 Comparaison des spectres en transmission et en ATR de ⁶³ Cu-CcO et ⁶⁵ Cu-CcO.....	112
2.2.4 Spectres ATR des intermédiaires de la CcO	114
2.2.5 Comparaison des spectres ATR de P _H et P ₁₀	115
III.3 Étude de la CcO en fonction du pH	117
III.4 Conclusion	118
Chapitre IV : Caractérisation des modèles de la CcO dans l'IR moyen (1800-700 cm⁻¹).....	119
IV.1 Modèles Fe(4C₂)	122
IV.1.1 Caractérisation du Complexe Fe ^{III} (4C ₂)OH.....	123
1.1.1 Modes de vibration dans le plan (1670-990 cm ⁻¹).....	124
1.1.2 Modes de vibrations hors du plan (810-700 cm ⁻¹).....	128
IV.1.2 Effet du groupement p-nitrophénol sur la structure du ligand 4C ₂	130
1.2.1 Influence du groupement p-nitrophénol sur la tren	130
1.2.2 Influence du p-nitrophénol sur la structure du complexe ferrique	132
IV.1.3 Influence de la nature du ligand proximal du fer	134
IV.2 Modèles HI.....	137

IV.2.1	Caractérisation du complexe Fe(HI50a)	137
2.1.1	Influence de l'insertion du fer et comparaison avec le spectre du Fe(4C ₂)	137
2.1.2	Modes IR du ligand axial	139
2.1.3	Variations spectrales liées à l'état redox du fer	139
IV.2.2	Caractérisation des analogues HI34a et HI29a	142
2.2.1	Modes de vibrations à l'état Fe ^{III}	142
2.2.2	Modes de vibrations à l'état Fe ^{II}	144
IV.3	Modèle à anse phénanthroline (2Pyporphen)	145
IV.3.1	Étude de la coordination distale par un ligand exogène de type imidazole	146
3.1.1	Modes redox de l'hème	149
3.1.2	Modes redox IR des ligands axiaux.....	151
IV.4	Conclusion	155
Chapitre V : Études des modèles de la CcO dans l'infrarouge lointain (700-100 cm⁻¹)		156
V.1	Comparaison des spectres ATR de la Fe(TPP)Cl et du Fe(4C₂).....	158
V.2	Modèles HI.....	161
V.2.1	Caractérisation du complexe Fe(HI50a).....	161
V.2.2	Caractérisation des analogues HI34a et HI29a.....	164
2.2.1	Modes de vibrations à l'état Fe ^{III}	164
2.2.2	Modes de vibrations à l'état Fe ^{II}	166
V.3	Étude du complexe Fe(2Pyporphen).....	167
V.3.1	Contribution de l'hème et vibrations fer-ligands	167
V.3.2	Influence de la coordination du fer.....	170
V.4	Conclusion.....	174
Chapitre VI : Réactivité des modèles de la CcO avec le monoxyde de carbone et le dioxygène		176
VI.1	Étude des complexes carbonylés.....	177
VI.1.1	Le monoxyde de carbone: une sonde du site actif des hémoprotéines	177
VI.1.2	Étude des Complexes Fe ^{II} -CO et [Fe ^{II} Cu ^I]-CO par spectroscopie ATR-IRTF..	182
1.2.1	Modèles HI.....	182
1.2.2	Modèle 2PyPorphen	189
1.2.3	Modèle 4C ₂	193
VI.1.3	Étude de transfert du CO dans les modèles par photochimie	194
1.3.1	Transfert du ligand dans la CcO.....	194
1.3.2	Étude du transfert du CO dans les complexes [Fe ^{II} -Cu ^I]-CO	196

1.3.2.1 2Pyporphén.....	196
1.3.2.2 Modèle HI.....	201
1.3.2.3 Modèle 4C ₂	202
VI.2 Étude des complexes oxygénés.....	203
VI.2.1 Modèle 2Pyporphén.....	203
VI.2.2 Modèle HI.....	207
VI.3 Conclusion.....	211
Chapitre VII : Conclusion générale et perspectives.....	213
Références bibliographiques.....	218
Annexes.....	239

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les potentiels redox du cyt c et des différents cofacteurs de la CcO obtenus au cours de transfert des électrons. ^{34,35}	11
Tableau 2 : Résumé des intermédiaires naturels et artificiels du cycle catalytique de la CcO. Les maximums des intermédiaires listés sont obtenus à partir des spectres d'absorption différentiels (moins l'état O).....	21
Tableau 3 : Modèles biomimétiques de la CcO utilisés au cours de cette étude.	47
Tableau 4 : Données spectrales des acides aminés fluorescents en solution. ^{152,153}	59
Tableau 5 : Mouvements associés aux modes normaux de vibration d'une molécule contenant 3 atomes.	62
Tableau 6 : Bandes d'absorption et vibrations des liaisons peptidiques. ^{173,174}	69
Tableau 7 : Détermination de la structure secondaire des protéines en IRTF. ^{175,176}	69
Tableau 8 : Ensemble des temps de vie extraits des déclinés de fluorescence standard de chacun des intermédiaires, obtenu par la méthode de moindres carrés.	101
Tableau 9 : Fréquences (en cm^{-1}) des bandes marqueurs IR et Raman de l'état de spin et de l'état d'oxydation du fer caractéristiques des tétraphénylporphyrines. ^{263,264}	121
Tableau 10 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ et du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ et comparaison avec la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$	129
Tableau 11 : Fréquences IR (en cm^{-1}) observées dans les spectres ATR pour les complexes $\text{Fe}(4\text{C}_2)$, $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ et leurs bases libres correspondants. ..	134
Tableau 12 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR du complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$ et comparaison avec le modèle $\text{Fe}(4\text{C}_2)$	141
Tableau 13 : Différences spectrales observées dans les spectres ATR oxydés et réduits pour les complexes $\text{Fe}(\text{HI50a})$, $\text{Fe}(\text{HI34a})$ et $\text{Fe}(\text{HI29a})$ et attributions. (ép) : épaulement. .	145
Tableau 14 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration des complexes $\text{Fe}(\text{Porphen})$ et attribution.	154
Tableau 15 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ et du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ et comparaison avec la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$	161
Tableau 16 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre $\text{H}_2(\text{HI50a})$ et du complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$ à l'état oxydé et réduit.	164

Tableau 17 : Attribution des principaux modes de vibration observés dans les spectres ATR des complexes Fe(Porphen) à l'état Fe(III) HS, Fe(II) BS et en présence d'imidazole Fe(III)-ImH et Fe(II)-ImH.....	174
Tableau 18 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration des complexes Fe(Porphen) et attribution.	191

Liste des figures

- Figure 1** : Une vue d'ensemble des complexes protéiques et des transporteurs mobiles associés dans la chaîne respiratoire mitochondriale. 3M9S (NADH : ubiquinone oxydoréductase) ; 1QLB (Succinate déshydrogénase) ; 1ZRT (complexe cytochrome bc₁) ; 3HB3 (CcO) ; 1BMF (partie F₁ de l'ATP synthase). Les flèches noires symbolisent la translocation des protons.¹⁰ 4
- Figure 2** : Modèles schématiques des sous-unités I (gris) et II (bleu) des différentes familles à "hème-cuivre".¹² A) Mitochondrial-CcO (Type A1 et A2); ba₃-CcO (Type B) et cbb₃-CcO (Type C) sont présentés selon les acides aminés qui différencient leurs canaux de transfert de protons. B) Les différents types de CcO sont présentés en fonction de leur composition hémique: Types aa₃, caa₃, ba₃ et cbb₃ (ce type d'oxydase comprend une sous-unité (SU) FixP (vert) au lieu de la SU II et une SU additionnelle (violet) contenant un hème c). L'ensemble des quatre sous-unités (4SU) aa₃-CcO de *P. denitrificans* est également représenté. 6
- Figure 3** : Modèle du 4 SU-CcO (*P. denitrificans*, pdb file 1qlr).¹² Les ions du cuivre (magenta) forment le centre dinucléaire Cu_A localisé dans la sous-unité II. Deux hèmes de type a (bleu foncé) situés dans la sous-unité I constituant l'hème a et le site actif a₃-Cu_B. 8
- Figure 4** : Représentation des centres métalliques de la CcO de *P. denitrificans* et du cyt c soluble.¹² Les deux SU I et II contiennent quatre centres redox actifs situés proche des autres cofacteurs inactifs (les deux hèmes a et a₃ (gris) ; Cu (magenta) ; Ca (bleu) et Mn/Mg (vert)). Le centre dinucléaire Cu_A reçoit les électrons du cyt c et l'hème a₃-Cu_B constitue le centre binucléaire où la réduction du dioxygène a lieu. Les résidus D124 et K354 représentent des résidus clés pour les canaux ioniques D et K. 9
- Figure 5** : Transfert de protons à deux canaux (K et D) dans la CcO de *P. denitrificans*.¹² Les acides aminés jouant un rôle fonctionnel dans le transfert de protons sont montrés sur la figure (pbd-file 1ar1)¹⁷. Les résidus du canal D sont les suivants : D124, N131, N199, G196, S193, E278 (W164). Le canal K est formé à partir des résidus K354, T351 et Y280. Un canal de sortie, comprenant les propionates des hèmes, R373/374, les ions Mg/Mn, T329 et D399, a été proposé. 12
- Figure 6** : Schéma du cycle de réduction de l'oxygène par la CcO à partir de l'état redox (MV). Les différents intermédiaires sont nommés par les lettres en majuscules ; les cadres présentent une vue schématique du site actif avec le fer de l'hème a₃, le Cu_B et la tyrosine

280. L'intermédiaire O représente l'état oxydé, E est un état partiellement réduit, R est l'état réduit du site actif, A représente l'intermédiaire suivant la fixation du dioxygène, P désigne l'intermédiaire « peroxy » et F ferrique.....	15
Figure 7 : Modèle schématique proposant la formation d'une espèce transitoire de type peroxy entre les deux intermédiaires A et P_M . ^{73,74}	17
Figure 8 : Cycle catalytique des intermédiaires de la CcO de <i>P. denitrificans</i> . (A) spectres d'absorption différentiels des intermédiaires (moins l'état O). ¹² (B), à partir de l'état O , l'état E est formé par l'entrée d'un e ⁻ . Le transfert d'un 2 ^{ème} e ⁻ conduit à la formation de l'état R . L'état A est généré après la fixation de l'oxygène. Une rupture de la liaison O-O résulte en l'état P et une étape de protonation entraîne la formation de l'état F . Le transfert de deux autres e ⁻ au site actif conduit à l'état F qui se relaxe à l'état O . ¹²	19
Figure 9 : Site actif de la CcO de <i>P. denitrificans</i> (la liaison covalente entre Y280 et H276 est représentée par une flèche bleue). ¹²	20
Figure 10 : Modèle d'un pont peroxyde complexé entre les deux centres métalliques oxydés du site binucléaire. Y-OH représente la tyrosine 280. La charge totale du site binucléaire est $\sum Q = +1$	22
Figure 11 : Premier modèle fonctionnel de la CcO à pH physiologique. ¹⁰³	26
Figure 12 : Schéma d'une électrode rotative «disque-anneau» (RDE). ¹⁰⁴	26
Figure 13 : Modèle à chapeau TACN avec une base azotée en position axiale.....	27
Figure 14 : Modèle à chapeau TBTrén avec une base axiale embarquée. ¹⁰⁴	28
Figure 15 : Série de modèles « très biomimétique » de Collman et coll. ¹⁰⁸	29
Figure 16 : Réaction intermoléculaire entre l'adduit superoxo et deux phénols mimant la Tyr 280 de la CcO. ¹¹¹	30
Figure 17 : Formation des intermédiaires oxy et oxoferryl à partir d'un modèle très semblable.....	31
Figure 18 : Modèles tripodales (Boitrel et coll.). ¹¹⁵	32
Figure 19 : 1,2-dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (PC). ¹¹⁷	33
Figure 20 : Modèle fonctionnel (11) de la CcO immobilisé sur une électrode d'or. ¹¹⁹	34
Figure 21 : Effet des centres redox Cu(I) et phénol sur la formation de PROS. ¹²⁰	35
Figure 22 : Formation d'un adduit peroxy à partir d'un modèle structural dans lequel le cuivre est coordonné par un ligand tétradentate. ¹²¹	37
Figure 23 : Formation des adduits peroxy à partir de deux modèles structuraux dans lequel le cuivre est coordonné par un ligand tridentate (La Figure est modifiée par rapport à l'original). ¹²⁴	38

Figure 24 : Formation d'un adduit peroxy à partir d'un Modèle structural possédant un groupement phénol mimant la Tyr 280. ¹²⁶	39
Figure 25 : Réaction d'un adduit peroxy à bas spin avec un groupement phénol mimant la Tyr 280. ¹²⁷	40
Figure 26 : Modèle covalent possédant un ligand tétradentate pour le cuivre (La figure est modifiée par rapport à l'originale). ¹²⁸	41
Figure 27 : Modèle covalent possédant un ligand tridentate pour le cuivre (la figure est modifiée par rapport à l'originale). ¹³⁰	42
Figure 28 : Modèle covalent avec un ligand tétradentate pour le cuivre. ¹⁰⁴	43
Figure 29 : Modèles covalents avec une base axiale de type pyridine de Karlin et coll. ¹⁰²	44
Figure 30 : Modèle covalent avec une base axiale de type imidazole de Naruta et coll. ¹⁰⁴	45
Figure 31 : Mise en évidence du système π à 18 électrons et nomenclature IUPAC des carbones caractéristiques. ¹⁴⁰	51
Figure 32 : conformations possibles du cycle porphyrinique. ¹⁰⁴	52
Figure 33 : Etats de spin d'une porphyrine de fer(II), B est un ligand à champ faible.	53
Figure 34 : Spectre électromagnétique montrant le domaine infrarouge qui regroupe les longueurs d'ondes comprises entre 14000 cm^{-1} et 10 cm^{-1}	54
Figure 35 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les phénomènes photophysiques possibles dans un état excité.....	57
Figure 36 : Courbe de potentiel harmonique et anharmonique d'une molécule. ¹⁵⁹	63
Figure 37 : schéma du principe de l'accessoire ATR diamant. ¹⁵⁹ L'accessoire ATR diamant est en réalité constitué de deux cristaux joints ayant le même indice de réfraction (l'un en ZnSe et l'autre en diamant). Le faisceau IR incident pénètre successivement à l'intérieur du ZnSe, puis à l'intérieur du diamant. Le faisceau réfléchi repasse ensuite dans ZnSe pour arriver au détecteur du spectromètre.	66
Figure 38 : Schéma de la cellule à circulation ATR. Les flèches à l'intérieur de la cellule représentent le sens de circulation des différentes solutions tampons.	79
Figure 39 : une photo du montage expérimental utilisé lors des expériences de formation et suivi des intermédiaires de la CcO. Le circuit fermé se compose (de gauche à droite) : d'un flacon contenant la solution du tampon, d'une pompe assurant un débit constant égal à 0.2 ml/min et de la cellule à circulation disposée à l'intérieur du spectromètre Bruker. Les différents éléments sont reliés par des tuyaux en silicone.....	80
Figure 40 : une photo du montage expérimental utilisé lors des mesures des spectres de complexes Fe(II) , $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{I}}$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$	84

Figure 41 : Formation des intermédiaires artificiels P _H , F _H et F _H par réaction avec le peroxyde d'hydrogène.....	89
Figure 42 : section de la structure cristalline de la CcO montrant la localisation des principaux cofacteurs tels que les résidus tyrosine, tryptophane, arginine et histidine 276 par rapport au centre binucléaire (PDB file 1QLE). ¹³	90
Figure 43 : Spectres UV-Vis de la CcO native de <i>P. denitrificans</i> , sous forme oxydée et réduite par un excès de dithionite (20 mM). La protéine est à 3 µM dans du tampon 20 mM KPi pH 9 0.05 % DDM. Figure en médaillon : spectre de l'oxydase obtenu par différence entre le spectre de la forme réduite et celui de la forme oxydée.....	92
Figure 44 : Spectres d'absorption différentiels des intermédiaires P _H , F _H et F _H (moins l'état O). L'état P _H est formé par un mélange de 5 équivalents de H ₂ O ₂ à une solution contenant 3 µM de la CcO dans 50 mM, KPi pH 9, 0.05 % DDM. L'ajout de 20 µl du Mes-OH pH 6 à la concentration finale de 50 mM permet d'obtenir l'état F _H . l'intermédiaire F _H est formé par ajout d'un large excès de H ₂ O ₂ (1:500).....	93
Figure 45 : Spectres d'absorption différentiels des états P ₁₀ et P _H (moins l'état O) de la CcO. L'état P ₁₀ est obtenu à partir d'un mélange de 3 µM de CcO à l'état oxydé dans un tampon KPi 10 mM, pH 8, 0.05 % DDM avec un tampon glycine-OH de concentration finale de 120 mM à pH 10. L'état P _H est formé par addition d'un excès de H ₂ O ₂ (1:5) à une solution de CcO de 3 µM dans un tampon KPi 20 mM, pH 9, 0.05 % DDM.....	95
Figure 46 : Spectres d'absorption différentiels des états P ₁₀ et P _H (moins l'état O). L'état P ₁₀ est formé par un mélange de 10 µM de CcO, suspendu dans un tampon KPi 10 mM, pH 8, 0.05 % DDM, avec un tampon glycine-OH de concentration finale de 120 mM à pH 10. L'état P _H est formé par addition d'un léger excès de H ₂ O ₂ (1:5) à une solution de CcO de 10 µM suspendu dans un tampon KPi 20 mM pH 9 0.05 % DDM.....	96
Figure 47 : Spectre d'émission de la fluorescence de la CcO de <i>P. denitrificans</i> à l'état O. En bleu le spectre d'émission de la CcO obtenu à partir d'une excitation à 275 nm (S1). En rouge le spectre d'émission de la CcO obtenu par excitation à 300 nm (S2). Les spectres S1 et S2 ont été normalisés à λ = 400 nm afin de mettre en évidence la contribution des résidus de tyrosine qui fluorescent.	97
Figure 48 : Spectres différentiels d'émission de fluorescence des intermédiaires P _H et P ₁₀ obtenus par excitation à 275 nm. (A) P _H , 3 µM de CcO dans 20 mM KPi, pH 9, 0.05 % DDM et 5 équivalents de H ₂ O ₂ . (B) P ₁₀ , 3 µM de CcO dans 10 mM KPi, pH 8, 0.05 % DDM et 120 mM glycine-OH, pH 10.	100
Figure 49 : Étude standard de declins de fluorescence de l'intermédiaire O. Le graphe montre en haut le déclin de fluorescence mesuré (points) et calculé (traits continus), et en	

bas la courbe de distribution des résidus. L'acquisition de déclin de fluorescence a été réalisée par la méthode de comptage de photons uniques corrélés en temps dont le principe de cette technique est présenté dans le chapitre II matériel et méthode p 76..... 101

Figure 50 : Spectres ATR-IRTF de la CcO de *P. denitrificans* obtenus durant la phase de la préparation du film réhydraté. Spectre (a) est enregistré immédiatement après le dépôt de l'échantillon sur la surface du silicium. Spectre (b) est enregistré après le séchage de l'échantillon à l'air. Spectre (c) est enregistré après la réhydratation du film avec 20-30 µl du tampon KPi 50 mM pH 9. 104

Figure 51 : Spectres ATR-IRTF de différence de la CcO de *P. denitrificans* dans un tampon KPi 50 mM pH 9. (a), le spectre réduit moins oxydé (R-O) obtenu par la perfusion de la dithionite. (b), le spectre oxydé moins réduit (O-R) obtenu par la perfusion du ferricyanure. 105

Figure 52 : Spectres ATR-IRTF de différence de la CcO de *P. denitrificans* obtenus par la perfusion du tampon KPi 50 mM pH 9 contenant 0.5 mM de H₂O₂. (a) Spectre différentiel de P_H (moins l'état O) obtenu après une perfusion du tampon contenant 0.5 mM de H₂O₂ pendant 30s. (b) Spectre différentiel de F_H (moins l'état O) obtenu après la perfusion du même tampon pendant 60s. (c) Spectre différentiel (moins l'état O) après un transition du tampon contenant H₂O₂ pendant 120s..... 107

Figure 53 : Spectre ATR-IRTF de la CcO à l'état oxydé à température ambiante. 110

Figure 54 : Spectre ATR-IRTF du tampon CHES 20 mM pH 9 0.01 % DDM..... 111

Figure 55 : Spectres enregistrés en ATR et en transmission pour les isotopes ⁶³Cu_B-CcO et ⁶⁵Cu_B-CcO à l'état oxydé. A) enregistré en ATR, B) enregistré en transmission (fenêtre de polyéthylène) et C) enregistré en transmission (fenêtre de silicium). 112

Figure 56 : Spectres ATR-IRTF des intermédiaires de la CcO native. (a) O, état oxydé 20 mM CHES pH 9 0.01% DDM. (b) P_H, état peroxy obtenu à pH 9, 1:5/Cco:H₂O₂. (c) F, état ferryl formé par ajout de H₂O₂ en large excès. 114

Figure 57 : Spectres ATR-IRTF des intermédiaires P_H et P₁₀. (a) P_H, obtenu dans le tampon CHES 20 mM pH à 9 0.01 % DDM, 1:5/Cco:H₂O₂. (b) P₁₀, obtenu dans le tampon CHES à pH 10. 116

Figure 58 : Spectre ATR-IRTF du tampon CHES 1M pH 10..... 116

Figure 59 : A) Spectres ATR-IRTF de la CcO en fonction du pH. (a) pH 6, 20 mM H₂PO₄²⁻, 0.01 % DDM. (b) pH 9, 20 mM CHES, 0.01 % DDM. (c), pH 10, 20 mM CHES, 0.01 % DDM. B) Spectres ATR-IRTF des tampons utilisés. 117

Figure 60 : Spectres ATR-IRTF (a) de la base libre H₂(4C₂) et des complexes (b) Fe(4C₂)OH et (c) Fe(TPP)Cl, enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. 123

Figure 61 : Agrandissement des spectres ATR entre 1480 et 1420 cm^{-1} pour les composés $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ (a), $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ (b) et $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ (c).	126
Figure 62 : Effet des groupements p-nitrophénol sur les spectres des bases libres $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ (a), $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ (b) et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ (c). Les spectres sont enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR.	130
Figure 63 : Effet des groupements p-nitrophénol sur la région des hautes fréquences du spectre IR des complexes 4C_2 (a), $4\text{C}_2\text{-NO}_2$ (b) et $4\text{C}_2\text{-diNO}_2$ (c) à l'état Fe^{III}	132
Figure 64 : Spectre d'absorption UV-Vis du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ dans le dichlorométhane. Les spectres des composés $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2\text{-di-NO}_2)$ ne sont pas montrés car ils sont similaires à celui du $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ dans cette gamme de fréquence.....	135
Figure 65 : Spectre d'absorption UV-Vis du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ oxydé et réduit enregistrés dans la pyridine.	136
Figure 66 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) $\text{H}_2(\text{HI50a})$, (b) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})\text{OH}$ et (c) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$	137
Figure 67 : Agrandissement du spectre ATR-IRTF de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ entre 1400-1200 cm^{-1} . .	140
Figure 68 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a, HI29a et HI34a à l'état Fe^{III} enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$, (b) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI34})$ et (c) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI29a})$	142
Figure 69 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a, HI29a et HI34a à l'état Fe^{II} enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$, (b) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34})$ et (c) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})$	144
Figure 70 : Spectres ATR-IRTF de la porphyrine à anse phénanthroline $\text{Fe}(\text{Porphen})$. A) spectres entre 1700-700 cm^{-1} , B) zoom sur la zone entre 1700-1400 cm^{-1} , C) zoom sur la zone entre 1400-990 et D) zoom sur la zone entre 975-700 cm^{-1} . Les spectres sont normalisés par rapport à la bande située à 1585 cm^{-1}	147
Figure 71 : Spectres ATR-IRTF de la base libre et l'anse phénanthroline (2,9-bis (p-bromophényl)-1,10-phénanthroline). A) $\text{H}_2(\text{Porphen})$ et B) anse phénanthroline.....	152
Figure 72 : Formation de la liaison hydrogène bifurquée lors de la coordination de l'imidazole sur le fer de la porphyrine du complexe 2Pyporphen.	153
Figure 73 : Spectres ATR-IRTF des composés $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ (a), $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ (b) et $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ (c) enregistrés sous forme des films secs sur l'ATR.	158
Figure 74 : Spectres ATR-IRTF du composé HI50a enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) $\text{H}_2(\text{HI50a})$, (b) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$, (c) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$	162
Figure 75 : Spectres ATR-IRTF enregistrés à l'état $\text{Fe}(\text{III})$. (a) HI50a, (b) HI29a, (c) HI34a.....	165

Figure 76 : Spectres ATR-IRTF enregistrés à l'état fer(II). (a) HI50a, (b) HI29a, (c) HI34a.....	166
Figure 77 : Spectres ATR-IRTF du modèle 2Pyporphén. (a) H ₂ (Porphén), (b) Fe ^{III} (Porphén) et (c) Fe ^{II} (Porphén)(py) ₂ . A) Agrandissement de la zone 690-490 cm ⁻¹ . B) Agrandissement de la zone 490-150 cm ⁻¹	167
Figure 78 : Spectre ATR-IRTF de l'anse phénanthroline 2,9-bis (p-bromophényl)-1,10-phénanthroline).....	168
Figure 79 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe ^{III} (Porphén)-ImH(2éq) (a) et Fe ^{II} (Porphén)-ImH(2éq) (b).	171
Figure 80 : Agrandissement des spectres ATR entre 500 et 200 cm ⁻¹ pour les complexes Fe ^{III} (Porphén)-ImH (a) et Fe ^{II} (Porphén)-ImH (b).	172
Figure 81 : Représentation schématique des interactions orbitales stabilisantes entre l'hème Fe ^{II} plan carré et le ligand CO. ²⁹⁸	178
Figure 82 : Influence de la polarité distale et du ligand proximal sur ν_{CO}	180
Figure 83 : Modes de déformations possibles de l'entité Fe-C-O.	180
Figure 84 : Spectres ATR-IRTF du complexe Fe(HI50a) enregistrés dans l'IR moyen. (a) Fe ^{II} (HI50a), (b) Fe ^{II} (HI50a)-CO et (c) [Fe ^{II} (HI50a)Cu ^I]-CO.....	183
Figure 85 : Spectres ATR-IRTF du complexe Fe(HI34a) enregistrés dans l'IR moyen. (a) Fe ^{II} (HI34a), (b) Fe ^{II} (HI34a)-CO et (c) [Fe ^{II} (HI34a)Cu ^I]-CO. S désigne le solvant (CH ₂ Cl ₂).	185
Figure 86 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe(HI50a) enregistrés dans l'IR lointain. (a) Fe ^{II} (HI50a), (b) Fe ^{II} (HI50a)-CO et (c) [Fe ^{II} (HI50a)Cu ^I]-CO.	187
Figure 87 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe(HI34a) enregistrés dans l'IR lointain. (a) Fe ^{II} (HI34a), (b) Fe ^{II} (HI34a)Cu ^I et (c) [Fe ^{II} (HI34a)Cu ^I]-CO.	188
Figure 88 : Spectres ATR-IRTF des complexes 2Pyporphén enregistrés dans l'IR moyen. (a) Fe ^{II} (Porphén)(py) ₂ , (b) Fe ^{II} (Porphén)-CO et (c) [Fe ^{II} (Porphén)Cu ^I]-CO.	189
Figure 89 : A) Spectres ATR-IRTF des complexes 2Pyporphén enregistrés dans l'IR lointain. (a) Fe ^{II} (Porphén)(py) ₂ , (b) Fe ^{II} (Porphén)-CO et (c) [Fe ^{II} (Porphén)Cu ^I]-CO. B) agrandissement de la zone 530-100 cm ⁻¹	192
Figure 90 : Spectre IR du complexe [Fe ^{II} (4C ₂)Cu ^I]-CO enregistré en transmission.	193
Figure 91 : Spectre différentiel d'absorption de la CcO (absorbance sans illumination moins absorbance avec illumination). Les deux bandes à 1952 et 2043 cm ⁻¹ sont attribuées à des conformations minoritaires de la protéine. ²²⁹	195
Figure 92 : Spectres IR dans le domaine $\nu(C=O)$ des complexes Fe ^{II} (Porphén)-CO et [Fe ^{II} (Porphén)Cu ^I]-CO piégés en matrice d'Hélium avant irradiation UV à T = 17K.	196

Figure 93 : Spectre IR du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ piégés en matrice d'hélium à 17K. A) avant irradiation UV (spectre noir), après 78 minutes d'irradiation à 532 nm (spectre rouge). B) après 78 minutes - avant irradiation (spectre bleu).....	198
Figure 94 : Spectres différentiels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ piégés en matrice d'hélium à 17K. Après 78 minutes d'irradiation à 532 nm - avant irradiation UV (spectre noir), réchauffement à 60K (l'échantillon est réchauffé à 60K puis le spectre est enregistré à 17K) – après irradiation (spectre rouge).....	199
Figure 95 : Spectres transitoires induits par un échantillon du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ à différents délais d'irradiation à 532 nm – spectre obtenu avant irradiation à 17K.....	199
Figure 96 : A) Effet thermique sur le complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. B) agrandissement de la zone 2150 et 2040 cm^{-1} . L'échantillon est réchauffé à une température donnée et le spectre correspondant est enregistré à 17K.....	200
Figure 97 : Spectres différentiels d'absorption (absorbance avec illumination moins absorbance sans illumination à 532 nm, T=18K) des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-CO}$ (a), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (c).....	201
Figure 98 : Spectre différentiel du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (spectre après 50 minutes d'irradiation-spectre avant) à 18K.....	202
Figure 99 : Spectres ATR-IRTF des complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ (a) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.	204
Figure 100 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante.....	206
Figure 101 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante.....	207
Figure 102 : A) Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{18}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante. B) Agrandissement de la zone 565-505 cm^{-1}	208
Figure 103 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})$ (a) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.....	210
Figure 104 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ (a) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.	210

Liste des annexes

Annexe 1: Structure chimique des hèmes les plus fréquemment rencontrés.....	240
Annexe 2: Modèles du mécanisme catalytique	241
Annexe 3: spectroscopie IRTF	244
Annexe 4: Les vingt Acides aminés	247

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adenosine 5' -triphosphate
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection- Infrarouge à Transformé de Fourier
BS	Bas spin
CHES	Acide N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic
CcO	Cytochrome <i>c</i> oxydase
Cyt <i>c</i>	Cytochrome <i>c</i>
CO	Monoxyde de carbone
Da	Dalton
DDM	n-dodecyl- β -D-maltoside
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
FR	Forme totalement réduite
Gly	Glutamate
H	Histidine
HS	Haut spin
IR	Infrarouge
IRTF	Infrarouge à transformé de Fourier
KPi	Phosphate inorganique de potassium
LIR	Lointain-infrarouge
ImH	Imidazole
MeImH	Methyleimidazole
MIR	Moyen-infrarouge
MV	Valence mixte
RR	Résonance Raman
Redox	Oxydoréduction
SU	Sous-unité
TPP	Tetraphénylporphyrine
Try	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
WT	Enzyme sauvage (wild type)
Y	Tyrosine

Introduction

De nombreux processus cellulaires mettent en jeu des protéines membranaires. Par exemple, les protéines transmembranaires de la chaîne respiratoire localisées dans la membrane interne des mitochondries ou dans la membrane plasmique des bactéries jouent un rôle fondamental dans la formation du potentiel chimio-osmotique qui règle la conversion d'énergie dans les cellules. Parmi les quatre métalloprotéines (complexe I, II, III et IV) qui assurent le transport des électrons dans la chaîne respiratoire, la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) catalyse la réduction du dioxygène moléculaire en eau et participe également à la formation de la force proton-motrice nécessaire à la synthèse d'ATP, en pompant quatre protons supplémentaires par molécule de dioxygène réduit. La réduction à quatre électrons du dioxygène en eau a lieu au niveau d'un site actif qui inclut un hème surmonté d'un complexe de cuivre B, et appartient ainsi à la super-famille des oxydases à hème cuivre. Ces deux cofacteurs peuvent fixer, outre l'O₂, d'autres ligands diatomiques impliqués dans la signalisation tels que le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO).

La résolution de la structure de la CcO a suscité l'intérêt des chimistes de synthèse pour l'élaboration des modèles bimétalliques Fe-Cu mimant son site actif. Leur relative simplicité au regard du site naturel a permis d'étudier l'influence de la modification des sites de coordination, des ligands ou de l'environnement sur leur activité.

Dans l'objectif de mieux cerner les relations structure-fonction qui régissent la réactivité de la cytochrome *c* oxydase, mon travail de thèse consiste à utiliser la technique originale que constitue la spectroscopie IR différentielle pour apporter des informations précieuses concernant les propriétés du site actif et le rôle d'acides aminés de la protéine dans le mécanisme réactionnel en alliant deux approches complémentaires : l'étude de l'enzyme naturelle et celle de systèmes modèles.

Le travail présenté dans ce mémoire s'articule autour de sept chapitres.

Le chapitre I est consacré, dans premier temps à un rappel bibliographique concernant la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative, suivie d'une présentation de la structure et du mécanisme de la CcO. Les différents systèmes biomimétiques de la CcO sont ensuite présentés, ainsi que le choix des modèles qui sont étudiés par la suite. Les objectifs de la thèse sont alors précisés. Ce chapitre se termine par une présentation générale sur les porphyrines ainsi que les différentes techniques spectroscopiques utilisées pour les étudier.

Le chapitre II décrit la préparation des différents échantillons puis les différentes techniques spectroscopiques utilisées. La première partie de ce chapitre concernant la

préparation des échantillons de la CcO suivie de l'étude par spectroscopies UV-visible, fluorescence et ATR-FTIR différentiel. La deuxième partie concernant la préparation de différents complexes de fer(III), fer(II) et fer(II)-Cu(I) et leurs complexes avec des ligands de type O₂ et CO, suivie de leur étude par ATR-FTIR et IRTF couplée à la photochimie à basse température.

Le chapitre III montre la caractérisation par spectroscopies UV-visible, de fluorescence résolue en temps et ATR-IRTF les propriétés électroniques et vibrationnelles de certains intermédiaires du cycle catalytique de la CcO. L'analyse de son site actif grâce à des substitutions isotopiques du CuB ainsi que l'influence du pH sur sa structure sont également présentées.

Dans les chapitres IV et V nous présenterons une étude systématique des modes de vibration des porphyrines (ligands libres, complexes ferriques et ferreux) dans les différents modèles choisis afin d'identifier de modes IR sensibles à la structure du ligand et la conformation de la porphyrine ainsi qu'aux propriétés de coordination distale dans les complexes synthétiques de la CcO. Cette étude a permis de proposer des attributions pour des marqueurs IR sensibles à l'état d'oxydoréduction ou de spin du fer ainsi qu'à la structure du ligand. Dans le domaine IR lointain, ce travail fournit les premières données sur des porphyrines superstructurées et sur l'influence de l'état d'oxydoréduction du fer ou de la structure des complexes sur la position et l'intensité des modes IR.

Le chapitre VI sera consacré, dans un premier temps, à l'analyse détaillée des propriétés vibrationnelles des complexes superstructurés fer(II)-ligand et fer(II)-ligand- cuivre(I) en absence et en présence de monoxyde de carbone dans les domaines IR moyen et lointain. Dans un second temps, les modes IR du monoxyde de carbone seront suivis après photodissociation. Ces expériences ont permis d'identifier un transfert du CO du fer vers le cuivre(I) dans certains complexes et d'établir des hypothèses concernant les paramètres structuraux permettant ce transfert. L'interaction de ces modèles avec le dioxygène a également pu être étudiée, des modes correspondant à une liaison fer-oxygène ayant pu être caractérisés dans certains cas.

Enfin le chapitre VII présente les conclusions et perspectives de ce travail.

**Chapitre I : La cytochrome *c* oxydase et ses
modèles biomimétiques**

Dans cette introduction bibliographique, après avoir présenté, de manière générale, le rôle de la chaîne respiratoire dans la production d'énergie nécessaire aux organismes vivants, nous détaillerons la structure de la cytochrome *c* oxydase et son mécanisme fonctionnel (les différents intermédiaires de l'enzyme et leurs caractéristiques spectroscopiques). Puis, nous rappellerons les modèles biomimétiques marquants de la CcO décrits dans la littérature. Nous terminerons par quelques rappels sur les techniques utilisées pour les caractériser (les spectroscopies UV-Visible, de fluorescence et infrarouge).

I.1 Chaîne respiratoire de mitochondries et de procaryotes

Tout organisme vivant nécessite un apport continu d'énergie pour maintenir sa croissance et sa reproduction. La majeure partie de cette énergie doit être extraite à partir des molécules organiques (comme le glucose) et convertie, ensuite, en une forme utilisable par toutes les cellules, en général en produisant de l'adénosine triphosphate (ATP), la molécule énergétique essentielle au travail cellulaire. L'hydrolyse exergonique de l'ATP, permettant la libération de l'acide adénosine diphosphorique (ADP) et de phosphate inorganique (Pi), fournit également l'énergie nécessaire aux réactions chimiques des cellules. Comme elle en consomme en permanence, la cellule doit constamment synthétiser l'ATP grâce à l'énergie fournie au cours de la respiration cellulaire.

Durant les deux premières étapes cataboliques de la respiration, la glycolyse et le cycle de Krebs, seulement quelques molécules d'ATP sont produites par le processus de phosphorylation au niveau du substrat. Il s'agit d'un transfert direct d'un groupement phosphate (Pi) à partir d'un substrat à l'ADP pour synthétiser l'ATP. La glycolyse, qui a lieu dans le cytoplasme, est un processus au cours duquel les molécules du glucose sont transformées en molécules d'acide pyruvique avec production du nicotinamide adénosine dinucléotide (NADH). Le cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale et termine la glycolyse en dégradant un dérivé de l'acide pyruvique (l'acétyl-CoA) en dioxyde de carbone avec formation de flavine adénosine dinucléotide (FADH₂) et du NADH.

Cependant, la majeure partie de l'ATP (90 %) est produite dans la membrane interne de la mitochondrie par la phosphorylation oxydative. Lors de ce processus, les électrons, mis en réserve dans les cofacteurs réduits (FADH₂ et NADH), sont transférés via une chaîne de transport d'électrons à l'oxygène, qui est l'accepteur terminal d'électrons.¹

Chez les organismes eucaryotes, l'énergie est extraite par une oxydation complète des métabolites énergétiques via la chaîne respiratoire en dioxyde de carbone et en eau. L'énergie

résultante de la réduction extrêmement exergonique de l'oxygène ($\Delta G^0 = - 2880 \text{ kJ/mol}$) est principalement emmagasinée sous forme d'un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. La théorie chimiosmotique^{2,3}, propose que l'oxydation de la chaîne de transport des électrons est couplée au transfert transmembranaire de protons, pour générer un gradient électrochimique. Le transfert des protons depuis la matrice crée une séparation de charges de part et d'autre de la membrane conduisant à la formation d'une force proton-motrice permettant le retour ultérieur des protons dans la matrice. L'énergie ainsi produite par l'entrée de protons au niveau de l'ATP synthase, généralement appelé complexe V de la chaîne respiratoire, permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi).⁴

Au sein des cellules eucaryotes, les mitochondries sont des organelles qui, selon la théorie endosymbiotique, seraient issues d'une eubactérie entrée en symbiose avec un eucaryote primitif.⁵ La présence d'une double membrane mitochondriale, l'existence d'un génome ADN propre (mtADN) et d'un appareil de transcription pour la biosynthèse des protéines dans les mitochondries constituent des preuves à l'appui de cette théorie.⁶ Il a été proposé que la bactérie *Paracoccus denitrificans* est probablement l'ancêtre de la mitochondrie, car certaines voies de la respiration sont similaires à celles rencontrées dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie.⁷ La présence d'un grand nombre de sous-unités codées par l'ADN nucléaire autour du cœur fonctionnel de la CcO mitochondriale entraîne une activité enzymatique très régulée, et permet donc de fournir l'énergie nécessaire aux cellules eucaryotes. Cependant, les complexes des cellules procaryotes contiennent moins de sous-unités codées par l'ADN nucléaire autour de leurs sous-unités fonctionnelles, et présentent, donc, une activité moins régulée. Celle-ci est principalement modulée par le rapport ATP/ADP qui active la chaîne respiratoire et donc la synthèse d'ATP.⁸

De manière intéressante, plusieurs gènes présents dans les sous-unités fonctionnelles des cellules eucaryotes sont encore codés par l'ADN mitochondrial, et sont très conservés dans les organismes aérobies. L'analyse des mécanismes de la phosphorylation oxydative, par lesquels les complexes de la chaîne respiratoire assurent la production d'énergie de la cellule, est grandement facilitée par l'étude des complexes des procaryotes (bactéries et archaea) car leur composition protéique est en général plus simple. Ils ne contiennent principalement que les sous-unités fonctionnelles.

Chez les eucaryotes, la chaîne respiratoire est principalement formée de cinq complexes (Figure 1) : la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I), la Succinate

déshydrogénase (complexe II), le complexe cytochrome *bc₁* (complexe III), la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V).⁹

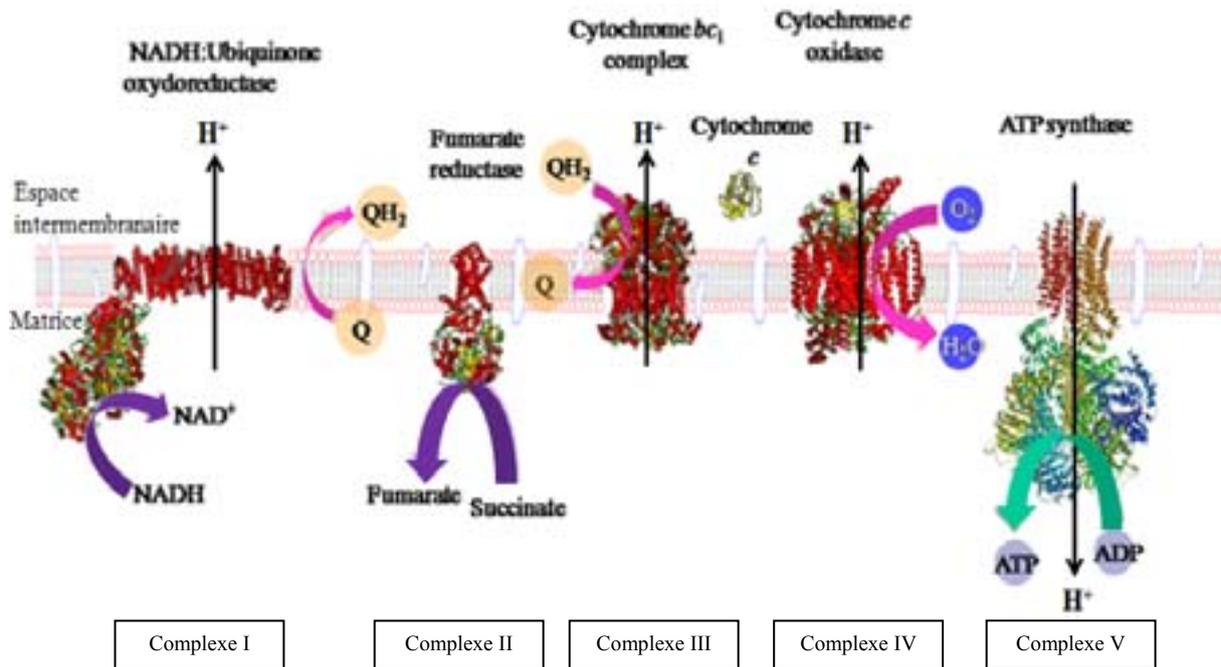


Figure 1 : Une vue d'ensemble des complexes protéiques et des transporteurs mobiles associés dans la chaîne respiratoire mitochondriale. 3M9S (NADH : ubiquinone oxydoréductase) ; 1QLB (Succinate déshydrogénase) ; 1ZRT (complexe cytochrome *bc₁*) ; 3HB3 (CcO) ; 1BMF (partie F₁ de l'ATP synthase). Les flèches noires symbolisent la translocation des protons.¹⁰

Chaque complexe contient des cofacteurs possédant une fonction d'oxydoréduction. Ils catalysent le transport des électrons provenant initialement soit du NADH soit du succinate. Les transporteurs de la chaîne respiratoire sont disposés suivant un ordre de potentiel redox croissant. Chacun est réduit par les électrons qu'il reçoit du transporteur qui le précède dans la chaîne, puis oxydé par la perte des électrons qui vont au transporteur suivant. Les complexes sont fonctionnellement reliés par des transporteurs d'électrons mobiles: soit l'ubiquinol (UQH₂) soit le cytochrome *c* (Cyt *c*) soluble.

Au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, une différence de potentiel redox est établie entre les électrons provenant du NADH réduit ($\Delta E^0 = - 0,315 \text{ V}$) et le dioxygène ($\Delta E^0 = + 0,815 \text{ V}$) et sert à fournir l'énergie nécessaire au pompage des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Parmi les quatre métalloprotéines (complexes I, II, III et IV) qui assurent le transport des électrons dans la chaîne respiratoire, seuls les complexes I, III et IV ont la capacité de pomper des protons à travers la membrane, produisant un potentiel électrochimique (force proton-motrice), tandis que le complexe II fournit des molécules de quinol qui seront oxydées par la suite par le complexe III. Le

complexe V utilise l'énergie contenue dans la différence de concentration de protons et de charge d'un côté et de l'autre de la membrane pour synthétiser une molécule riche en énergie, l'ATP en grande quantité.

I.2 Cytochrome *c* oxydase

La cytochrome *c* oxydase (CcO), aussi appelée complexe IV, est ubiquitaire chez les organismes aérobiques, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères et aux plantes supérieures. Elle catalyse la réduction de l'oxygène en eau au niveau d'un site catalytique qui contient un atome de fer hémique et un atome de cuivre. La famille de ces oxydases est ainsi appelée super famille des oxydases à "hème-cuivre". Les cytochromes *c* oxydases découvertes jusqu'ici peuvent être classées en trois principales familles, en fonction des types d'hèmes qu'elles contiennent et des acides aminés des sous-unités I et II constituant les différents canaux pour le transfert de protons¹¹: mitochondrial-CcO (Type A1 et A2); *ba*₃-CcO (Type B) et *cbb*₃-CcO (Type C) (Figure 2).

La famille A des CcO à "hème-cuivre" est divisée en deux familles de Types A1 et A2, qui se différencient par l'un de leurs deux canaux de protons, nommés K et D (Figure 2 A). Les CcO de Type A1 contiennent un résidu glutamate à la fin du canal D, tandis que celles de Type A2 comportent un motif composé de tyrosine-serine dans cette position. Dans les CcO de Type B, les résidus formant les canaux D et K ne sont plus conservés. Cependant, un canal homologue à celui du canal K est probablement présent dans cette famille d'oxydase (Figure I.2 A). Les CcO de Type C, semblent comporter uniquement une partie du canal K et un résidu tyrosine à la place du motif tyrosine-serine détecté dans la famille des oxydases de Type A2. En outre, les CcO de Type C contiennent une sous-unité nommée FixP dihémique (vert, Figure 2 A et B) au lieu de la sous-unité II des oxydases de Type A et B, ainsi qu'une sous-unité additionnelle monohémique (violet, Figure 2 A et B). (Les structures chimiques des différents types d'hèmes sont présentées dans l'annexe 1).

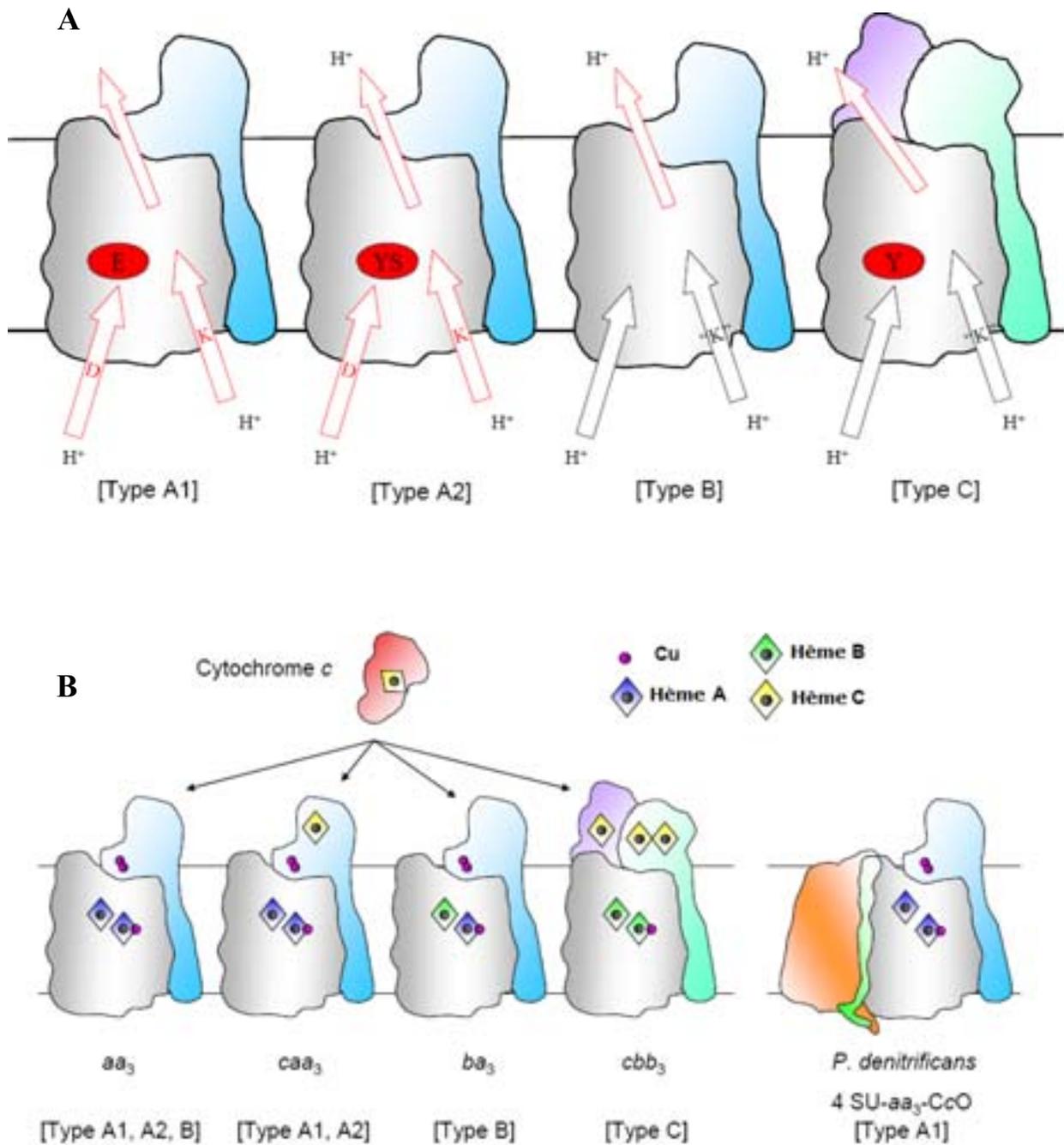


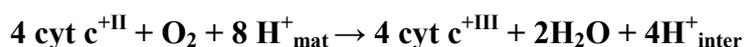
Figure 2 : Modèles schématiques des sous-unités I (gris) et II (bleu) des différentes familles à "hème-cuivre".¹² A) Mitochondrial-CcO (Type A1 et A2); ba_3 -CcO (Type B) et cbb_3 -CcO (Type C) sont présentés selon les acides aminés qui différencient leurs canaux de transfert de protons. B) Les différents types de CcO sont présentés en fonction de leur composition hémique: Types aa_3 , caa_3 , ba_3 et cbb_3 ; (ce type d'oxydase comprend une sous-unité (SU) FixP (vert) au lieu de la SU II et une SU additionnelle (violette) contenant un hème *c*). L'ensemble des quatre sous-unités (4SU) aa_3 -CcO de *P. denitrificans* est également représenté.

La CcO est l'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire. Elle catalyse la réduction à quatre électrons de l'oxygène moléculaire en eau à partir des électrons fournis par le cytochrome *c*, et utilise l'énergie libérée par cette réaction pour pomper quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.¹³ Les membres de cette famille présentent une

séquence en acides aminés de la sous-unité I très conservée, et un site catalytique bimétallique constitué d'un hème et d'un atome de cuivre.¹⁴

Pour chaque cycle catalytique de la CcO, quatre électrons sont fournis par le Cyt *c* et huit protons sont prélevés de la matrice. Quatre de ces protons et quatre électrons sont consommés par la production de deux molécules d'eau par molécule d'oxygène réduite, tandis que les quatre autres protons sont libérés dans l'espace intramembranaire.

La réaction globale peut être résumée ainsi¹⁵ :



De nombreuses structures obtenues par cristallographie aux rayons X de la cytochrome *c* oxydase à partir des mitochondries de mammifères (*cœur de bœuf*)¹⁶ et des bactéries : *Paracoccus denitrificans*¹⁷, *Rhodobacter sphaeroides*¹⁸ et *Thermus thermophilus*¹⁹ sont aujourd'hui disponibles et permettent de comprendre l'organisation protéique des oxydases.

Nous nous intéressons, dans ce travail de thèse, à l'enzyme de *P. denitrificans*. Dans un premier temps, nous décrivons la structure globale de la protéine obtenue par diffraction aux rayons X, puis nous abordons le mécanisme fonctionnel impliqué lors de la catalyse enzymatique.

I.2.1 Structure de l'oxydase *aa*₃ de *Paracoccus denitrificans*

Parmi les oxydases terminales à "hème-cuivre", la cytochrome *c* oxydase de type *aa*₃ est la mieux caractérisée, notamment chez la bactérie *P. denitrificans*. Cette enzyme a été tout d'abord isolée sous forme d'un sous-complexe fonctionnel de deux sous-unités en 1980²⁰ puis dans son ensemble de quatre sous-unités en 1988²¹. Les quatre sous-unités de la CcO de *P. denitrificans* (4 SU-CcO) montrent une masse moléculaire apparente de 126 kDa et théorique de 132 kDa.²² Les trois sous-unités (I, II et III) présentent une grande similarité avec les sous-unités (I, II et III) codées par le génome mitochondrial de l'oxydase eucaryote, tandis que la quatrième sous-unité est spécifique des oxydases bactériennes.¹³

La structure cristallographique à l'état oxydé, obtenue à la résolution de 2,8 Å¹³ (Figure 3), a permis de comprendre l'organisation protéique de l'oxydase. Elle contient quatre sous-unités transmembranaires et les cofacteurs suivants : deux hèmes de type *a*, trois atomes de cuivre répartis en deux centres, un atome de calcium et un atome de manganèse ou de magnésium. Les sous-unités I et II, qui contiennent l'ensemble des cofacteurs redox, ont été

par la suite cristallisées à la résolution de 2,4 Å¹⁷. Cette nouvelle détermination de la structure a permis de décrire le site actif avec plus de précision. Ces deux sous-unités sont considérées comme "le cœur fonctionnel" de l'oxydase puis qu'elles sont impliquées dans l'activité catalytique de l'enzyme. L'absence des sous-unités III et IV ne provoque pas un changement de cette fonction catalytique. Récemment, les sous-unités I et II ont été affinées à la résolution de 2,25 Å²³ afin d'apporter des éléments permettant une meilleure compréhension du cycle catalytique de la CcO. Compte tenu de cette nouvelle structure et de l'analyse de la densité électronique, il a été suggéré la présence d'un pont peroxy entre l'hème *a*₃ et le Cu_B dans la forme oxydée de la CcO. Il a été également proposé que le transfert de protons dans le canal D est bloqué par les chaînes latérales des trois résidus asparagine localisés à proximité de la porte d'entrée des protons dans ce canal. En outre, l'analyse du réseau de liaisons hydrogène formé autour des propionates de l'hème *a*₃ suggère que l'imidazole de l'histidine 326 est plutôt sous sa forme neutre, contrairement aux résultats obtenus auparavant qui ont proposé que la chaîne latérale de l'histidine 326 présente un imidazolate (charge négative) et peut être considéré comme un site de pompage de protons.²⁴

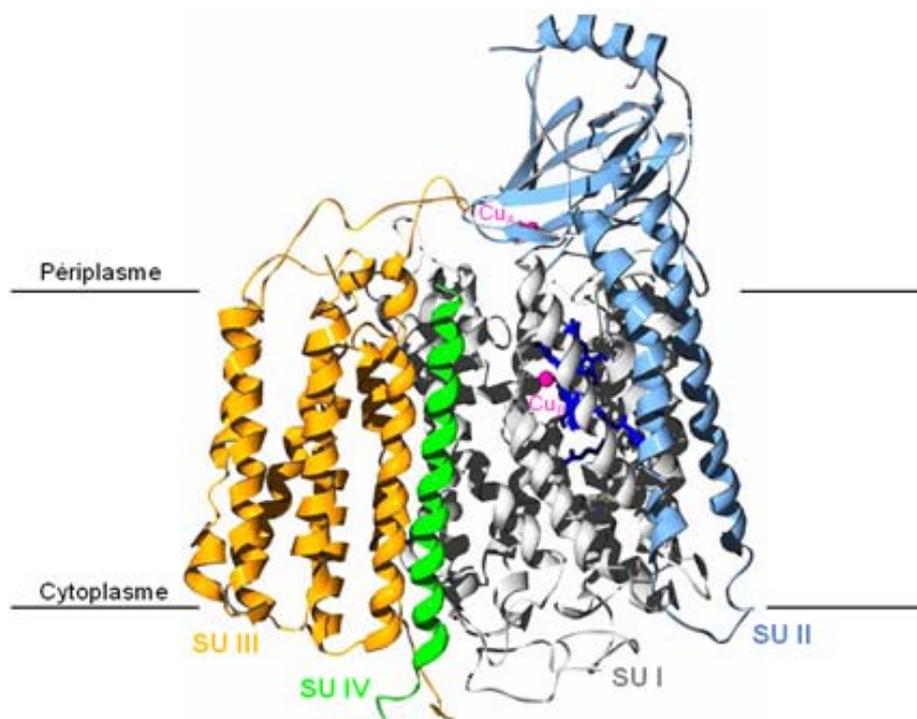


Figure 3 : Modèle du 4 SU-CcO (*P. denitrificans*, pdb file 1qlr).¹² Les ions du cuivre (magenta) forment le centre dinucléaire Cu_A localisé dans la sous-unité II. Deux hèmes de type *a* (bleu foncé) situés dans la sous-unité I constituent l'hème *a* et le site actif *a*₃-Cu_B.

La sous-unité I (SU I) est composée de douze hélices hydrophobes et forme des canaux hydrophiles permettant le transfert de protons. La SU I contient l'hème *a*, de bas spin, et le

site catalytique constitué de l'hème a_3 , de haut spin, et du centre Cu_B . L'hème a_3 est ancré dans la protéine par une histidine (His 411) qui sert de ligand proximal au fer. L'autre site de coordination de l'hème a_3 libre pour la liaison avec l'oxygène est également accessible à d'autres ligands exogènes compétitifs comme le monoxyde de carbone, le monoxyde d'azote ou le cyanure. Outre les cofacteurs cités précédemment, des sites de fixation de magnésium²⁵ et de calcium²⁶ sans fonction oxydo-réductrice ont été découverts dans la SU I.

L'hème a_3 et le Cu_B situé à proximité constituent le centre binucléaire de l'enzyme (Figure 4) où l'oxygène se fixe, avant d'être réduit en eau. Le Cu_B , distant du fer de l'hème a_3 de 5,2 Å, est lié à trois histidines. L'une de ces histidines (His 276) forme une liaison covalente inhabituelle avec une tyrosine (Tyr 280). La présence de cette liaison dans le site actif de la CcO fait la particularité de ce site catalytique. De nombreuses études menées sur différentes familles des oxydases à "hème-cuivre" ont recherché à élucider le rôle de cette liaison dans le mécanisme à quatre électrons de la réduction de l'oxygène en eau.^{17,27,28}

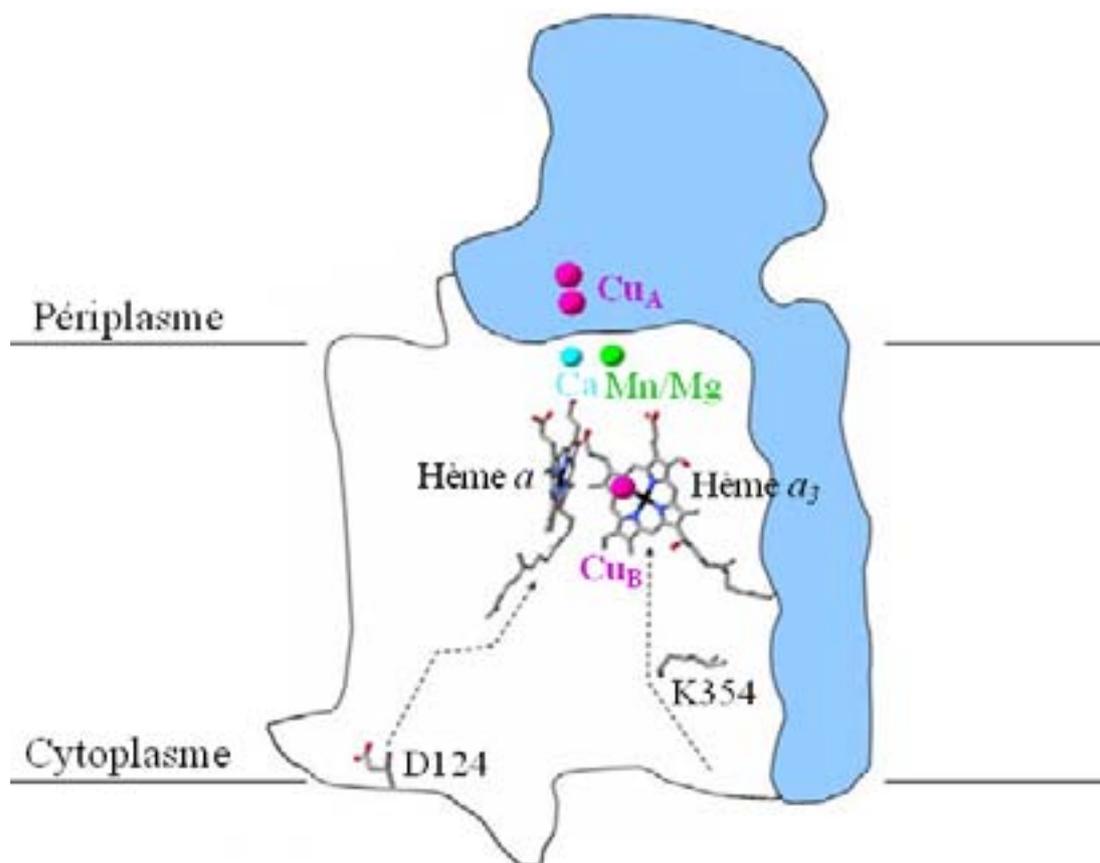


Figure 4 : Représentation des centres métalliques de la CcO de *P. denitrificans* et du cyt *c* soluble.¹² Les deux SU I et II contiennent quatre centres redox actifs situés proche des autres cofacteurs inactifs (les deux hèmes a et a_3 (gris) ; Cu (magenta) ; Ca (bleu) et Mn/Mg (vert)). Le centre dinucléaire Cu_A reçoit les électrons du cyt *c* et l'hème a_3 - Cu_B constitue le centre binucléaire où la réduction du dioxygène a lieu. Les résidus D124 et K354 représentent des résidus clés pour les canaux ioniques D et K.

Il a été démontré que ce pontage servirait à maintenir l'architecture du site actif et à moduler les propriétés de la tyrosine en diminuant le pKa du phénol, facilitant ainsi la formation du radical tyrosyle.

La sous-unité II (SU II) est formée de deux hélices transmembranaires dans sa partie N-terminale et d'un domaine hydrophile contenant le centre cuivre Cu_A du côté périplasmique. Ce centre (Cu_A) est constitué de deux atomes de cuivre distant de 2,6 Å, dans un état de valence mixte (Cu^I-Cu^{II}) lorsqu'il est oxydé. Il est l'accepteur immédiat des électrons provenant du cytochrome *c*.

La sous-unité III (SU III) est composée de sept hélices transmembranaires réparties en deux groupes de deux et cinq hélices α en V et ne fixe aucun centre redox. Son rôle reste encore un sujet à débat. Il a été suggéré que la SU III constitue un canal d'accès conduisant l'oxygène au site actif²⁹ ou qu'elle stabilise la structure de l'oxydase au cours du cycle catalytique. Cette dernière hypothèse découle de la dénaturation du complexe 2 SU-CcO pendant un cycle continu de la réduction de l'oxygène.^{30,31} La perte de la fonction enzymatique peut être due à un changement structural ou à une augmentation de la flexibilité du centre binucléaire en absence de la SU III.

La sous-unité IV (SU IV) a été découverte dans certains complexes bactériens cristallisés. Elle est constituée d'une seule hélice transmembranaire en contact avec les SU I et III. La délétion de son gène donne un complexe à 3 sous-unités et ne montre aucun effet sur l'activité enzymatique.³² Bien que son rôle ne soit pas encore déterminé, la SU IV, entourée par des molécules de lipides, peut être impliquée dans la structuration du complexe dans son environnement hydrophobe.¹³

I.2.2 Mécanisme réactionnel de la CcO

L'activité principale des oxydases mitochondriales et bactériennes est la réduction du dioxygène en eau. Cette réduction est complexe car elle implique le transfert de 4 e^- et nécessite donc un catalyseur. Par ailleurs, le couplage avec la synthèse d'ATP n'est pas direct mais passe par un couplage des réactions redox avec la formation de gradient de pH à travers la membrane, de sorte que la CcO est non seulement un système de transfert d'électrons mais aussi une pompe à protons. La compréhension des mécanismes de transfert d'électrons et de transfert de protons, qui constituent encore à l'heure actuelle des sujets de recherche très controversés et très activement développés, a fait l'objet de nombreuses études sur les

différents types d'oxydases. La caractérisation des intermédiaires du cycle catalytique a fait l'objet de mon travail de thèse.

2.2.1 Transfert de protons

De nombreuses études sont menées afin de déterminer le cheminement des électrons et leur vitesse de transfert d'un cofacteur à l'autre. Quatre molécules de cyt *c* réduits et de potentiel redox de 0.235 V (Tableau 1) se fixent successivement à un site présent sur la SU II de l'oxydase. Un électron est donc transféré depuis l'hème de chaque cyt *c*, d'abord vers le centre Cu_A de potentiel redox plus élevé, puis vers l'hème *a* lié à la SU I et enfin vers le centre binucléaire (le Cu_B et l'hème *a*₃) de l'enzyme. Le dioxygène se réduit en eau grâce à son potentiel d'oxydoréduction élevé,³³ et permet ainsi aux organismes de disposer d'énergie.

	ΔE°	Référence
Cyt <i>c</i>	0.235	Voet <i>et coll.</i> , 1999
Centre Cu _A	0.245	Voet <i>et coll.</i> , 1999
Hème <i>a</i>	0.22 +/- 0.04	Hellwig <i>et coll.</i> , 1999
Hème <i>a</i> ₃	-0.03 +/- 0.01	Hellwig <i>et coll.</i> , 1999
Cu _B	0.34	Voet <i>et coll.</i> , 1999
O ₂	0.815	Voet <i>et coll.</i> , 1999

Tableau 1 : Les potentiels redox du cyt *c* et des différents cofacteurs de la CcO obtenus au cours de transfert des électrons.^{34,35}

Lors de la réduction du dioxygène, huit protons sont prélevés du cytoplasme. La moitié sert à la formation d'eau, les protons chimiques, et les quatre autres, les protons pompés, sont rejetés de l'autre côté de la membrane.

L'alignement des séquences des acides aminés de la CcO a montré que certains résidus tels que : D124, N131, E278, K354 et Y280 sont extrêmement bien conservés, et a suggéré des sites de liaison entre ces résidus et les ions métalliques (Figure 5).^{11,14,36} En se basant sur les études par mutagenèse dirigée et l'analyse de la structure par diffraction aux rayons X, deux canaux K et D ont été identifiés chacun comme une chaîne d'acides aminés protonables pouvant établir entre eux des liaisons hydrogène et permettant ainsi le transfert des protons (les protons chimiques et pompés) au sein de la CcO.

La caractérisation des acides aminés décrivant ces canaux a fait l'objet de très nombreuses études.³⁷⁻³⁹ En particulier, la lysine K354 a été définie comme la porte d'entrée du canal K des

protons chimiques.³⁷ Il a été également proposé que ce résidu permet de relayer l'arrivée des protons chimiques de la membrane cytoplasmique jusqu'à l'hème a_3 par un réseau de liaisons hydrogène comprenant les résidus : T351 et Y280.^{27,28} En effet, toute mutation d'un des résidus du canal K empêche la réduction de l'oxygène au niveau du centre binucléaire. Cependant, il a été suggéré que ce canal peut fournir un à deux protons au site actif durant la phase de réduction du cycle catalytique, puisque cette phase est bloquée uniquement dans le cas de la mutation du résidu lysine K354.^{40,41}

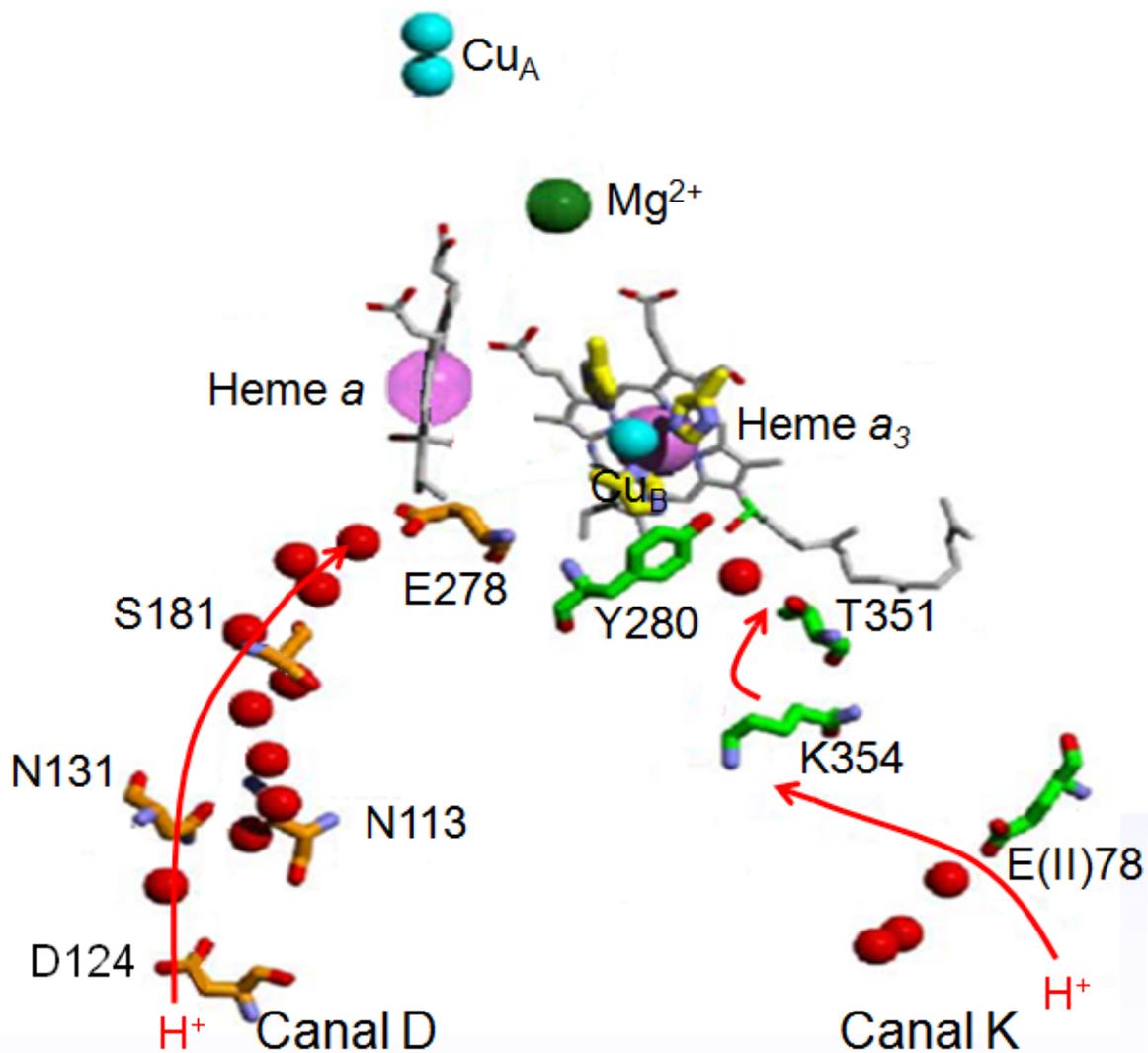


Figure 5 : Transfert de protons à deux canaux (K et D) dans la CcO de *P. denitrificans*.¹² Les acides aminés jouant un rôle fonctionnel dans le transfert de protons sont montrés sur la figure (pbd-file 1ar1)¹⁷. Les résidus du canal D sont les suivants : D124, N131, N199, G196, S193, E278 (W164). Le canal K est formé à partir des résidus K354, T351 et Y280. Un canal de sortie, comprenant les propionates des hèmes, R373/374, les ions Mg/Mn, T329 et D399, a été proposé.

Le canal D dont la porte d'entrée est un résidu aspartate D124^{13,39,42,43} permet la translocation vectorielle des protons à partir de la membrane cytoplasmique. De plus, Les

données obtenues par diffractions des rayons X montrent qu'une chaîne de molécules d'eau, mettant en jeu des liaisons hydrogène, s'établit entre le résidu D124 et les résidus asparagine N131, N113 et N199. Ces derniers sont aussi en interaction avec le résidu glutamate (E278) par le biais d'une autre chaîne de molécules d'eau produisant un réseau de relais de charge, et donc permettant de transférer les protons.^{38,44,45} Puisqu'il a été postulé que tous les protons pompés et au moins deux protons chimiques sont transférés à travers le canal D, il existe donc un site de branchement permettant de distribuer les protons soit vers le centre binucléaire soit vers le site de pompage.⁴⁶ Des études récentes ont suggéré que l'entrée de chaque électron dans le site actif est couplée d'une part à une consommation d'un proton chimique et d'autre part à une translocation d'un proton à travers la membrane au niveau du résidu E278.⁴⁷

Afin de révéler la manière dont cette translocation de protons s'effectue, certains résidus localisés au sein de la SU I ont été mutés ; les résidus D124 et N131 ont été identifiés d'avoir un rôle fonctionnel important dans la consommation et le pompage de protons, respectivement. La variante D124N a perdu la majorité de son activité catalytique puisque l'oxydation du cyt *c* et le pompage de protons sont quasiment déficients. Ces résultats ont été récemment confirmés par l'utilisation de la spectroscopie ATR-FTIR.⁴⁸ D'autre part, l'étude du mutant N131D s'est révélée particulièrement intéressante car celui-ci présente une activité totale de la réduction de l'oxygène, tandis qu'il ne montre aucun pompage de protons. Ce mutant est donc désigné par la variante découplée.³⁷ La mesure des valeurs du pKa des acides aminés chargés peut jouer un rôle important dans l'élucidation des résidus impliqués dans la translocation de protons. Dans ce cadre, des expériences de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont déterminé les états de protonation du résidu E278 de la CcO sauvage⁴⁴ et du mutant N131D⁴⁹ dans l'état totalement réduit de l'oxydase (état **P_R**). Les résultats obtenus montrent que la valeur du pKa du résidu E278 augmente de deux unités, de pKa = 9 pour l'enzyme native au pKa = 11 pour la variante N131D. En effet, l'introduction d'une charge négative (N→D) semble distribuer le couplage électrostatique au sein du canal D, ce qui induit la variation des valeurs de pKa des acides aminés et la perturbation des liaisons hydrogène établies entre les molécules d'eau. Il a été également suggéré que la déficience du mutant N131D peut avoir une influence directe sur le résidu E278. E278 a été proposé d'être le site de branchement de protons : les protons chimiques sont transférés vers le centre binucléaire, tandis que les protons pompés sont transférés vers le site de pompage. L'analyse de la structure du mutant N131D a suggéré que l'énergie électrochimique de la réduction du dioxygène pourrait être couplée aux réseaux de liaisons hydrogène, et donc ceci

pourrait induire différentes conformations au résidu E278 afin de pomper les protons à travers la membrane.⁵⁰

De manière intéressante, la variante doublement mutée N131D/D124N s'est révélée capable de pomper les protons et ne présente aucune modification de la valeur du pKa du résidu E278 lors de l'état **P_R**, mais elle ne catalyse plus la réduction de l'oxygène en eau. Ces résultats ont été interprétés en terme de la suppression d'une charge négative (D → N) au sein du canal D de la variante N131D/D124N qui peut restaurer la valeur du pKa du résidu E278 à la valeur typique de la CcO native.⁵¹ Il a été postulé que la distorsion de charges négatives au sein du canal D diminue la capacité de l'oxydase à réduire le dioxygène en eau.⁵²

Bien que le résidu W164 est localisé au dessus de E278 qui constitue le site terminal du canal D, l'étude du mutant W164F a montré que ce canal ne permet plus la translocation de protons à travers la membrane.⁵³ Ces résultats ont suggéré donc la présence d'un canal de sortie passant par le résidu W164. Un troisième canal H de transfert de protons a été proposé chez l'enzyme de cœur de bœuf⁵⁴⁻⁵⁶, tandis qu'il n'est pas admis pour les enzymes bactériennes.

La réduction de l'oxygène moléculaire en eau est couplée au pompage de protons, mais la chronologie des différentes étapes de la réaction et de cette translocation reste encore controversée. Ainsi, une meilleure connaissance des étapes de transfert de protons vers le site actif au cours du cycle catalytique permettrait une meilleure compréhension de la réduction du dioxygène par les CcO.

2.2.2 Intermédiaires du cycle catalytique

La cytochrome *c* oxydase est une métalloprotéine contenant deux métaux de transition au niveau du site actif, et qui doit son activité au changement d'état d'oxydation de ces métaux. Elle est directement impliquée dans une chaîne de transfert d'électrons par le changement réversible de la valence des métaux Fe(IV)/Fe(III)/Fe(II) et Cu(II)/Cu(I).

Le mécanisme de la réduction du dioxygène a été étudié selon trois états redox différents de l'enzyme au départ : l'état complètement réduit (**FR**) ($[\text{Cu}^{\text{I}} \text{Cu}^{\text{I}}]_{\text{A}}, \text{Fe}^{\text{II}}_{\text{a}}, \text{Fe}^{\text{II}}_{\text{a3}}, \text{Cu}^{\text{I}}_{\text{B}}$), l'état dit à "valence mixte" (**MV**) ($[\text{Cu}^{\text{I}} \text{Cu}^{\text{II}}]_{\text{A}}, \text{Fe}^{\text{III}}_{\text{a}}, \text{Fe}^{\text{II}}_{\text{a3}}, \text{Cu}^{\text{I}}_{\text{B}}$) et l'état complètement oxydé (**O**) ($[\text{Cu}^{\text{I}} \text{Cu}^{\text{II}}]_{\text{A}}, \text{Fe}^{\text{III}}_{\text{a}}, \text{Fe}^{\text{III}}_{\text{a3}}, \text{Cu}^{\text{II}}_{\text{B}}$).

Réactivité des états complètement réduit et à valence mixte avec l'oxygène

L'étude des réactions des états redox (MV)⁵⁷ et (FR)⁵⁸ de l'enzyme avec le dioxygène a été principalement réalisée par la méthode de flow flash mis au point par Gibson.⁵⁹ Cette méthode consiste à photodissocier la protéine ligandée avec le CO en présence d'oxygène pour induire la réaction. En effet, la photodissociation du CO libère le site catalytique de l'enzyme et permet ainsi à l'oxygène de s'y fixer pour être réduit. Les différents intermédiaires de réaction sont alors suivis et identifiés par différentes techniques. La spectroscopie d'absorption⁶⁰ permet de distinguer et mesurer le temps de transfert d'un intermédiaire à l'autre. La spectroscopie de résonance Raman (RR) est utilisée ensuite afin d'identifier avec plus de précision ces intermédiaires.^{61,62} Actuellement, le schéma réactionnel de la réduction de dioxygène par CcO peut être décrit de la façon suivante à partir de l'état redox (MV)^{63,64} (Figure 6):

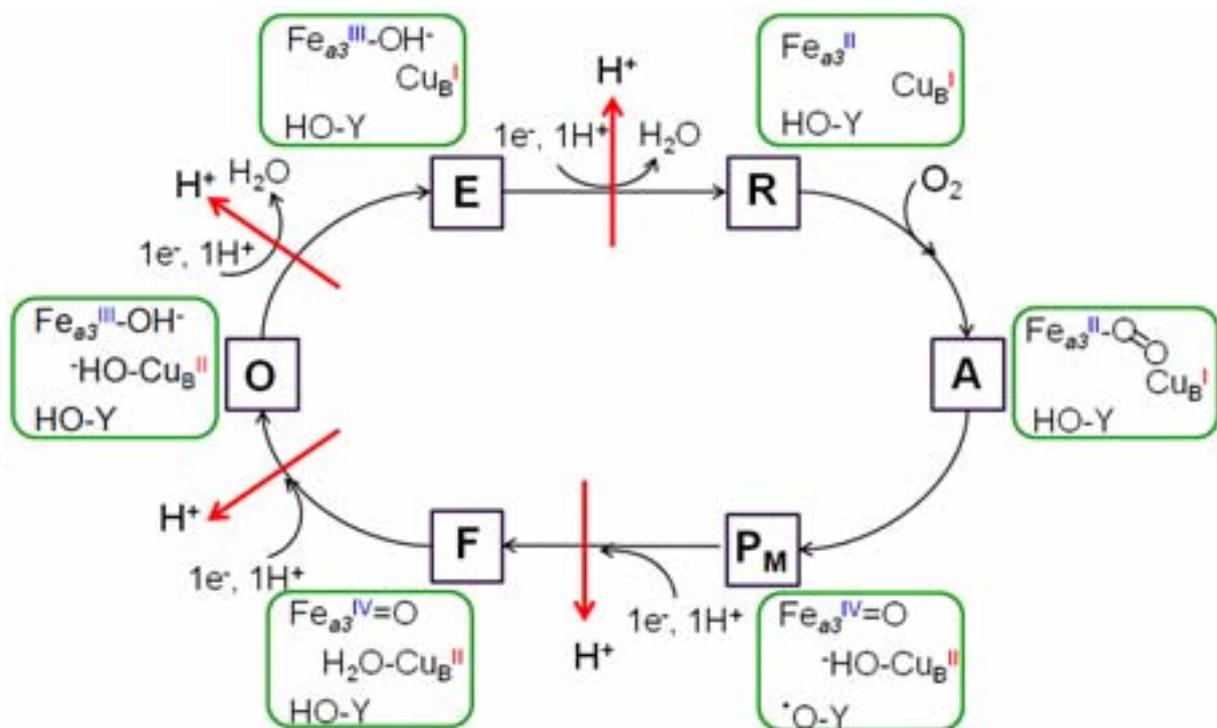


Figure 6 : Schéma du cycle de réduction de l'oxygène par la CcO à partir de l'état redox (MV). Les différents intermédiaires sont nommés par les lettres en majuscules ; les cadres présentent une vue schématique du site actif avec le fer de l'hème a_3 , le Cu_B et la tyrosine 280. L'intermédiaire **O** représente l'état oxydé, **E** est un état partiellement réduit, **R** est l'état réduit du site actif, **A** représente l'intermédiaire suivant la fixation du dioxygène, **P** désigne l'intermédiaire « peroxy » et **F** ferrique.

D'une manière générale, le cycle catalytique de la CcO se déclenche lorsque l'état oxydé **O** de l'enzyme reçoit un électron du cytochrome *c* et deux protons chimiques de l'espace intermembranaire pour former l'intermédiaire **E**.⁶⁵ Le pompage d'un proton a été observé pour cette transition.

L'entrée d'un second électron dans le site actif ainsi que le transfert de deux autres protons entraîne la formation de l'intermédiaire réduit **R**. Un proton semble être libéré à l'extérieur pendant la transition **E**→**R**.

Malgré les différences redox de ces deux intermédiaires (l'hème *a* et le Cu_A sont réduits pour l'état (**FR**) et sont oxydés pour l'état (**MV**)), leur réactivité vis-à-vis de l'oxygène est la même. Ils permettent tous les deux la formation du premier intermédiaire réactionnel, le composé **A** (Fe^{II}-O₂)⁶⁶, présentant un maximum d'absorption à 595 nm et une bande Raman⁶⁷ à 571 cm⁻¹. Dans le cas de la CcO, ce complexe Fe^{II}-O₂ est relativement instable et donc il n'est observable qu'à basse température. Cette étape est suivie par la rupture hétérolytique de la liaison O-O en moins de 200 μs pour former le second intermédiaire **P_M** (Fe^{IV}=O)⁶¹, caractérisé par un maximum d'absorption à 607 nm et une bande RR à 804 cm⁻¹. Une des questions essentielles posées par ce mécanisme est la provenance des quatre électrons nécessaires à cette réaction. Deux proviennent de l'oxydation du Fe^{II} en Fe^{IV}, un de l'oxydation du Cu^I en Cu^{II} mais l'origine du quatrième électron est moins évidente.

Les structures cristallographiques des oxydases de *P. denitrificans* et des mitochondries montrent que l'une des histidines liées au Cu_B (His 276) forme une liaison covalente avec une tyrosine (Y280). L'étude de l'intermédiaire **P_M** par spectroscopie RPE a montré que cette tyrosine émettait un signal caractéristique d'un radical.⁶⁸ La tyrosine passerait d'une forme OH à une forme O[·] en libérant un électron et un proton. L'électron ainsi libéré permettrait la réduction de l'oxygène en une seule étape, évitant ainsi la formation d'intermédiaires radicalaires toxiques.⁶⁹ Par ailleurs, l'étude du mutant Y280H chez *P. denitrificans* a montré l'importance de cette liaison dans le maintien de la distance entre les deux métaux du centre binucléaire.²⁸

Cependant, lorsque la catalyse commence par l'état complètement réduit de l'enzyme, le quatrième électron est directement fourni par l'hème *a* (**P_R**). La durée de la transition **A**→**P** est de l'ordre de 170 μs pour l'état à mixte valence (**P_M**) et de 30 μs pour l'état complètement réduit (**P_R**).⁷⁰ Cette différence au niveau de la durée de la transition entre **A**→**P_R** et **A**→**P_M** a été reliée à la vitesse du transfert du quatrième électron au site actif. Les constantes de temps trouvées pour le transfert des électrons entre les hèmes (*a* et *a*₃) sont très inférieures à celles obtenues entre la Tyr280 et l'hème *a*₃. Dans le cas de l'état **P_R**, le transfert électronique se fait en même temps que l'extinction du composé **A**. Ainsi, la disponibilité de l'électron dans l'hème *a* est à l'origine de la différence de réactivité entre l'état complètement réduit et l'état

à valence mixte.⁷¹ Il a été proposé que l'état **P_R** présente un tyrosinate au lieu d'un radical tyrosine dans le centre binucléaire.⁷²

Par ailleurs, la modélisation du site actif de l'enzyme à l'état réduit et l'étude du mécanisme de la rupture de la liaison O-O par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont apporté des informations supplémentaires sur la transition **A**→**P**. Le modèle utilisé comporte une porphyrine de fer avec un imidazole proximal et un atome de cuivre lié à trois autres imidazoles, dont l'un porte un groupe phénol, analogue de la tyrosine 280. En effet, ces travaux ont suggéré que le chemin réactionnel pour lequel l'enthalpie libre d'activation calculée est la plus proche de la valeur expérimentale passe par une espèce transitoire du type μ -hydroperoxo ($\text{Fe}_{a_3}^{\text{III}}(\text{OO}(\text{H})\text{Cu}_b^{\text{II}})$) (Figure 7).^{73,74} Dans ce scénario, les auteurs en déduisent que le transfert d'un proton au dioxygène coordonné à l'hème Fe_{a_3} est une étape préalable et nécessaire à la rupture de la liaison O-O.

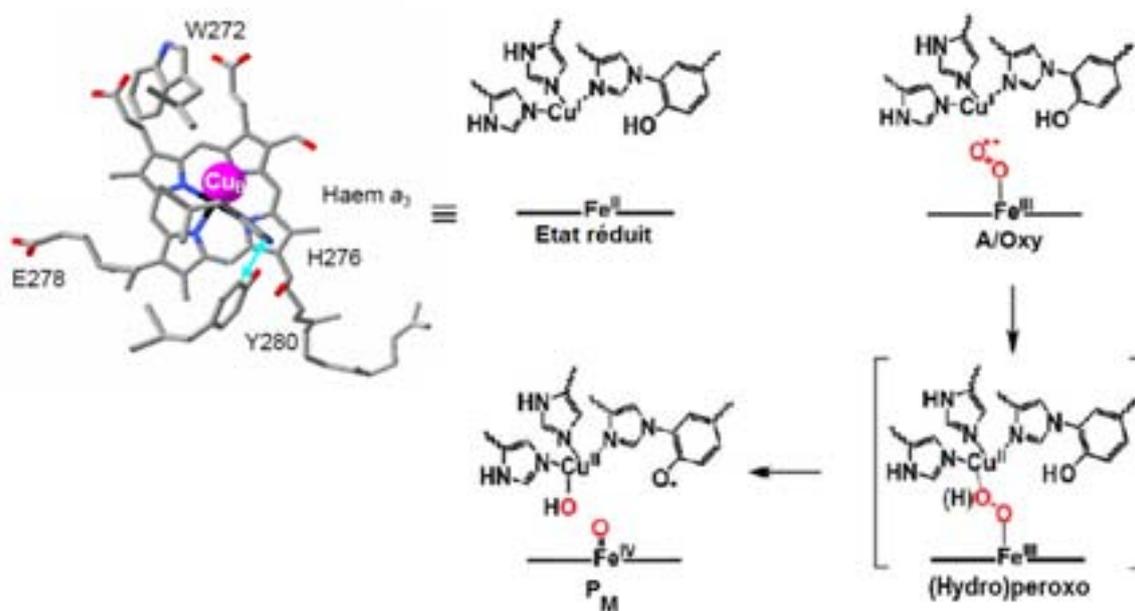


Figure 7 : Modèle schématique proposant la formation d'une espèce transitoire de type peroxo entre les deux intermédiaires **A** et **P_M**.^{73,74}

On suppose aussi la formation d'un pont peroxo transitoire entre les deux centres métalliques ($\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}_2^{2-})\text{Cu}^{\text{II}}$) à très faible durée de vie, lors de la transition de l'état **A** à l'état **P_M**.^{61,75} Les calculs de la mécanique moléculaire menés sur le composé **A** ont suggéré la formation de l'espèce ($\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}_2^-)\cdots\text{Cu}^{\text{I}}$), ce qui indique que le cuivre se trouve à proximité de l'atome d'oxygène du superoxo ($\text{Cu}\cdots\text{O} = 2.12 \text{ \AA}$).⁷⁶ Ces résultats appuient également l'hypothèse de la formation d'une espèce transitoire de type peroxo lors de la transition de l'état **A** à l'état **P**.

Pour poursuivre le cycle catalytique, le composé $\mathbf{P_M}$ reçoit un électron supplémentaire et se convertit en un autre état oxoferryl \mathbf{F}^{77} , caractérisé par un maximum d'absorption à 580 nm et une bande Raman à 785^{78} cm^{-1} . Il a été montré que l'électron nécessaire pour la transition $\mathbf{P_M} \rightarrow \mathbf{F}$ n'est pas transféré directement au site actif mais plutôt, du Cu_A à l'hème *a*. Contrairement à l'état $\mathbf{P_M}$, l'état redox de l'intermédiaire \mathbf{F} peut contenir un proton supplémentaire avec une liaison hydrogène liée au $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$.⁶¹ Cependant, le site exact de cette protonation n'est pas encore clairement déterminé mais pourrait correspondre à un tyrosinate ou un ligand hydroxyde lié au Cu_B . Il a été montré que cette transition est couplée à une translocation d'un proton.⁷⁹

L'entrée du quatrième électron et proton au site actif de l'enzyme accompagné par la libération d'un proton, clôt le cycle catalytique en restaurant l'état oxydé \mathbf{O} de départ. La nature exacte de ce premier intermédiaire n'est pas encore clairement définie mais pourrait correspondre à une espèce hydroxy ferrique, comme nous en discuterons plus loin. Sa formation est dépendante du pH.

La méconnaissance du mécanisme de réduction de l'oxygène par la CcO provient fondamentalement de la méconnaissance des étapes de transfert de protons vers le site actif. La stœchiométrie de la réaction de réduction de l'oxygène en eau oblige en effet à considérer que quatre protons doivent à un moment ou un autre être ajoutés aux réactifs et parallèlement quatre autres devraient être pompés à l'extérieur de la membrane. Ce sont précisément les paramètres de ces étapes de transfert de protons (nombre de protons, source, géométrie du transfert) qui déterminent l'évolution de l'état \mathbf{O} vers l'une ou l'autre des espèces proposées. Le couplage du transfert d'électrons et de protons dans la CcO est toujours sujette à discussion (les différents mécanismes proposés sont présentés dans l'annexe 2).

Réaction de l'état complètement oxydé avec le peroxyde d'hydrogène

L'état réduit \mathbf{R} peut réagir avec le dioxygène quelque soit son mode de formation. Il a été montré que l'état \mathbf{P} peut être généré à partir de la forme oxydée par : "ATP-energised mitochondria" (l'état $\mathbf{P_M}$)⁸⁰, par la réaction avec CO-O_2 (l'état $\mathbf{P_{CO}}$)⁸¹, par l'oxygénation de l'état totalement réduit (l'état $\mathbf{P_R}$)⁷⁷ ou encore par l'ajout de quantités équimolaires de peroxyde d'hydrogène (l'état $\mathbf{P_H}$).^{82,83}

Les études de spectroscopies de résonance Raman et d'absorption UV-Vis confirment que l'intermédiaire obtenu à partir de la réaction CcO-oxydée/ H_2O_2 est identique à l'état $\mathbf{P_M}$ formé lors de la réaction CcO-MV/ O_2 . De plus, ces études ont montré que trois intermédiaires

peuvent être générés artificiellement à partir de la CcO oxydée du cœur de bœuf en modulant simplement la concentration de H₂O₂ et/ou en modifiant le pH du milieu : l'état P_H, l'état F'_H et l'état F_H (Figure 8 A).⁸⁴

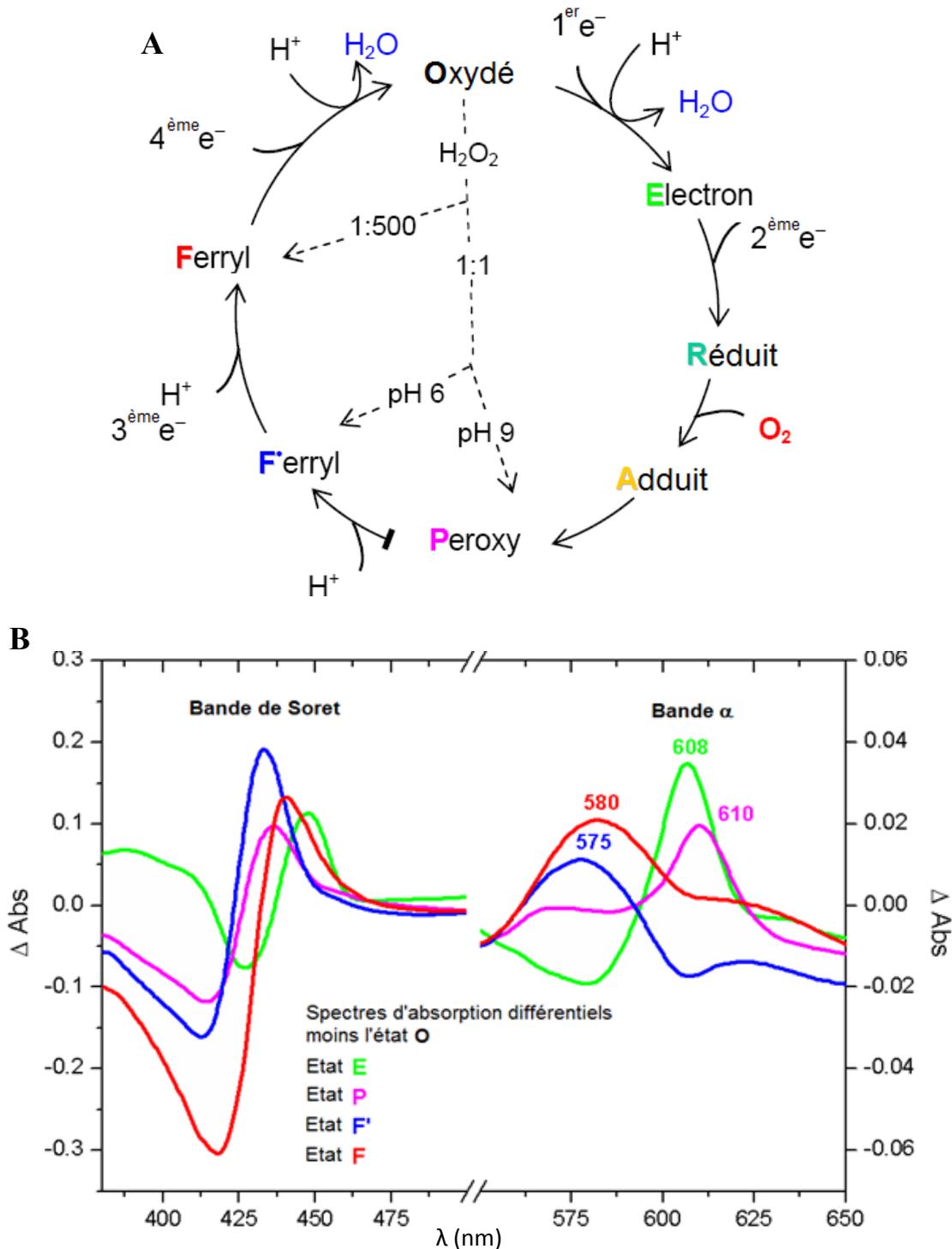


Figure 8 : Cycle catalytique des intermédiaires de la CcO de *P. denitrificans*. (A) spectres d'absorption différentiels des intermédiaires (moins l'état O).¹² (B), à partir de l'état O, l'état E est formé par l'entrée d'un e⁻. Le transfert d'un 2^{ème} e⁻ conduit à la formation de l'état R. L'état A est généré après la fixation de l'oxygène. Une rupture de la liaison O-O résulte en l'état P et une étape de protonation entraîne la formation de l'état F'. Le transfert de deux autres e⁻ au site actif conduit à l'état F qui se relaxe à l'état O.¹²

Ces intermédiaires se différencient par leurs spectres d'absorption de différence (spectre de l'oxydase obtenu par différence entre le spectre de l'intermédiaire et celui de la forme oxydée **O**), notamment, au niveau de la bande α (Figure 8 B). L'état **P_H**, généré par une quantité équimolaire de H₂O₂ à pH 9, est caractérisé par un maximum d'absorption à 610 nm. Cet intermédiaire peut se convertir en une seconde espèce isoélectronique (l'état **F_H**) mais avec un maximum d'absorption à 575 nm, par une simple diminution du pH à pH 6.⁸⁵ L'addition d'un grand excès de H₂O₂ (rapport molaire 1:500) à chacune de ces deux espèces entraîne la formation de l'état **F_H** dont le maximum d'absorption est observé à 580 nm.⁸⁶

De plus, des études de spectroscopie RPE ont permis de mettre en évidence la présence d'un radical tyrosyl Y167 dans les deux espèces **P_H** et **F_H**^{87,88} (Figure 9). Cette tyrosine Y167 est située assez loin du site actif de la CcO pour être considérée comme le donneur direct du quatrième électron manquant pour la réduction de l'oxygène en eau, et donc il a été proposé que le premier donneur de cet électron puisse être un résidu tryptophane.⁸⁹

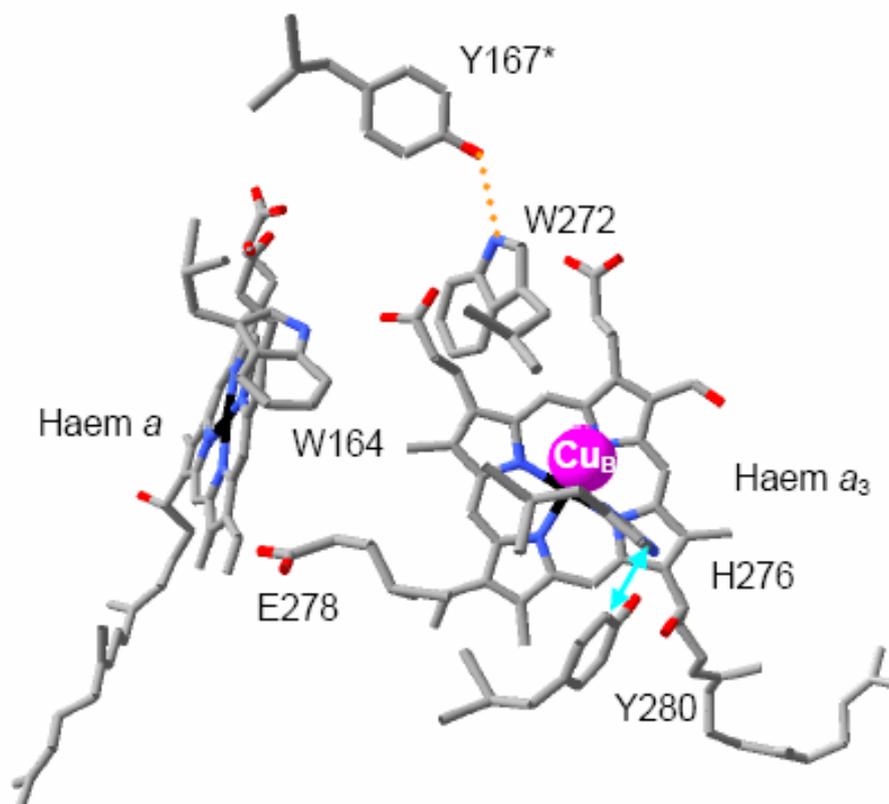


Figure 9 : Site actif de la CcO de *P. denitrificans* (la liaison covalente entre Y280 et H276 est représentée par une flèche bleue).¹²

Récemment, des résultats de spectroscopie "microsecond freeze hyperquenching" (MHQ) ont montré que la densité électronique est localisée à la fois sur les deux résidus tyrosine et

tryptophane et non uniquement sur le système π ou l'oxygène phénolique de la tyrosine.⁸⁹ Les auteurs suggèrent un transfert électronique rapide entre un radical cation $\text{Trp}^{\cdot+}$ et un radical Tyr^{\cdot} . D'après la structure cristallographique du site actif de la CcO (Figure I.9), les auteurs proposent de désigner Trp 272 comme candidat potentiel de la formation de ce radical cation, qui pourrait être un intermédiaire entre le donneur original de l'électron manquant, Tyr 167, et le complexe $[\text{Fe}_{a_3}^{\text{II}}-\text{O}_2/\text{Cu}_B^{\text{I}}]$. Ce résidu est localisé à une distance de 3 Å de la tyrosine 167 et permet de lier directement cette dernière au centre binucléaire. Cependant, les études réalisées par diffraction des rayons X suggèrent que la tyrosine Y280, liée d'une manière covalente avec l'histidine H276, forme un radical tyrosyl durant le cycle catalytique naturel de la CcO. Le Tableau 2 présente tous les intermédiaires introduits dans cette partie.

	Etat de Réduction	Site bimétallique	Mode de production	Maximum d'absorption	Références
Etat O	-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{III})$ $\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280	"As isolated"	601 nm	
Etat E	réduit à 1 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{III})$ $\text{Cu}_B(\text{I})$ Y280	Complexes de ruthénium ou état F + CO	608 nm	Witt et Chan, 1987
Etat R	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{II})$ $\text{Cu}_B(\text{I})$ Y280		-	Morgan, 1996
Etat A	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{II})-\text{O}_2$ $\text{Cu}_B(\text{I})$ Y280	totalemnt réduit + O_2	590 nm	Chance, 1975
Etat P	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{HO}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280*	"Energised mitochondria"	607 nm	Wikström, 1981
Etat P _{CO}	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{HO}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280	$\text{CO} + \text{O}_2$	607 nm	Chance, 1975
Etat P _R	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{HO}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280	totalemnt réduit + O_2	607 nm	Morgan, 1996
Etat P _H	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{HO}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y167*	Quantité équimolaire de H_2O_2 , pH 9	610 nm	Bickar, 1982
Etat F _H	réduit à 2 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{H}_2\text{O}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y167*	Quantité équimolaire de H_2O_2 , pH 6	575 nm	Fabien, 1995
Etat F	réduit à 3 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{H}_2\text{O}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280	"Energised mitochondria"	580 nm	Wikström, 1981
Etat F _H	réduit à 3 e^-	$\text{Fe}_{a_3}(\text{IV})=\text{O}$ $\text{H}_2\text{O}-\text{Cu}_B(\text{II})$ Y280	Excès de H_2O_2	580 nm	Bickar, 1982

Tableau 2 : Résumé des intermédiaires naturels et artificiels du cycle catalytique de la CcO. Les maximums des intermédiaires listés sont obtenus à partir des spectres d'absorption différentiels (moins l'état O).

Nature du premier intermédiaire (état O)

À la différence des intermédiaires **P_M** et **F** où les spectres d'absorbance ont clairement permis de définir leur nature ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), le spectre de l'état oxydé **O** ne permet pas clairement son identification. Plusieurs propositions ont été faites sur la nature du premier intermédiaire :

Il est proposé que l'intermédiaire **O** pourrait être espèce hydroxyde ferrique. Les études de spectroscopie Raman réalisées sur cet état ont montré la présence d'une bande caractéristique d'une espèce hydroxyde ferrique à 450 cm^{-1} .^{90,91}

Cependant, d'autres études apportent des résultats contradictoires avec cette hypothèse et tendent à montrer que l'espèce oxydée ne serait pas le complexe hydroxyde ferrique. En effet, des études de susceptibilité magnétique ($S_{\text{tot}} = 2$), de RPE et de Mössbauer ont montré un couplage antiferromagnétique entre le fer(III) et le Cu(II) du site actif de l'enzyme à l'état natif.⁹² Il a été suggéré qu'un ligand pontant sert de médiateur à ce couplage magnétique. Il pourrait s'agir d'un ion oxyde (O^{2-}), hydroxyde (OH^-), un superoxyde (O_2^{2-}), d'une espèce ($\text{H}_2\text{O}\cdots\text{OH}$), Cl^- ...

De plus, l'étude de plusieurs structures cristallines de la CcO à l'état oxydé a révélé la présence d'une densité électronique entre les deux centres métalliques Fe_A^{3+} et Cu_B^{2+} du site actif.^{17,54} Afin de déterminer les espèces qui peuvent être à l'origine de cette densité, la modélisation de certaines espèces (une seule molécule H_2O , un pont peroxy (O^-O^-) ou une molécule de dioxygène ($\text{O}=\text{O}$), $2\text{H}_2\text{O}$, $1\text{H}_2\text{O} + \text{OH}^-$, CO_3^{2-} , Cl^-) a été effectuée. Il s'avère que les ions Cl^- et O^-O^- permettent une meilleure modélisation de cette densité électronique. De plus, les deux charges négatives portées par l'ion O^-O^- peuvent neutraliser l'excès de charge positive localisé dans les deux centres métalliques (Figure 10). Il est important de noter que selon la nature du premier intermédiaire, le mécanisme conduisant à la réduction de dioxygène sera différent.

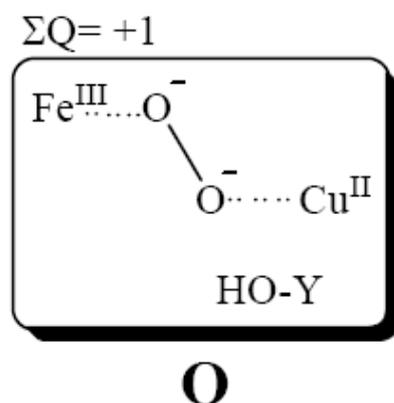


Figure 10 : Modèle d'un pont peroxyde complexé entre les deux centres métalliques oxydés du site binucléaire. Y-OH représente la tyrosine 280. La charge totale du site binucléaire est $\Sigma Q = +1$.

Rôle du Cu_B et de son environnement dans l'activité catalytique des CcO

Les données obtenues par diffraction des rayons X montrent que le Cu_B est un centre unique des oxydases à "hème-cuivre" et qu'il est différent des autres sites cuivriques communément découverts (les centres de cuivre de type I-III)^{93,94}, même si les centres de cuivre de type II rencontrés dans les oxydases de galactose, dopamine β-monooxygénase et laccase sont également coordonnés à trois ligands histidine.^{93,94} Il a été suggéré que la liaison particulière His-Tyr située au voisinage du centre Cu_B diminue l'affinité du proton de la tyrosine 280 (numérotation CcO de *Bos taurus*, entrée PDB 1V54⁹⁵). Des études réalisées sur des composés modèles tel 2-imidazole-1-yl-4-méthylphénol, révèlent que la liaison covalente établie entre l'imidazole et le cycle du phénol provoque une diminution du pKa du proton phénolique par 1.6 pour obtenir un pKa = 8.6, et une augmentation de 66 mV du potentiel redox pour le radical formé (~750 mV (E_{m,7})).⁹⁶ Des travaux de chimie quantique effectués sur un système modélisant le complexe imidazole-phénol, ont montré également que la liaison formée entre ces deux cycles aromatiques contribue significativement aux affinités d'électrons et de protons, tandis que, l'atome de cuivre, simulé comme une particule de charge, contribue plutôt aux propriétés thermodynamiques du phénol.⁹⁷ Compte tenu des études de DFT, Daskalakis *et coll.* ont proposé récemment que la liaison covalente His-Tyr est importante pour la fixation du centre Cu_B dans une certaine configuration par rapport à l'hème *a*₃.⁹⁸ Toutefois cette étude est focalisée sur les états de coordination du monoxyde de carbone au centre Cu_B et leurs vibrations infrarouge sans considérer les contraintes structurales imposées par la chaîne polypeptidique de la protéine. D'autres études de chimie quantique décrivant la structure électronique et énergétique du site Cu_B dans différents états redox et de coordination du mécanisme fonctionnel ont été réalisées afin de mesurer l'importance de ce centre métallique dans l'activité catalytique des oxydases.⁹⁹ Les résultats obtenus au cours de ces études montrent que la liaison His-Tyr provoque une diminution de l'affinité des protons et un accroissement de celle des électrons pour le résidu Tyr280 et le Cu_B. De plus, un équilibre électronique entre ces deux derniers a été observé et semble être lié à la structure unique de ce système. Il a été suggéré que cet équilibre électronique peut être sensible à la présence d'une charge positive située à 10 Å du centre Cu_B. Des études de mécanique quantique/mécanique moléculaire (QM/MM) et de dynamique moléculaire (MD) ont permis de prédire des propriétés vibrationnelles de l'unité His-Fe^{IV}=O des intermédiaires oxoferryl de la CcO.¹⁰⁰ Ces résultats ont montré une dépendance entre les fréquences vibrationnelles de cette unité et la distance séparant le Cu_B et l'atome du fer de l'hème *a*₃. Cette distance semble être associée à l'état de protonation du propionate A de l'hème *a*₃ et

peut jouer un rôle crucial dans le mécanisme fonctionnel de l'oxydase. Ces études suggèrent qu'un tel mouvement ayant lieu à proximité du Cu_B est capable de moduler les équilibres redox permettant à ce site d'injecter des électrons au substrat.

À partir des différentes informations structurales et spectroscopiques citées plus haut, plusieurs mécanismes possibles de réduction de l'oxygène par l'enzyme ont été postulés et aucun consensus n'a été atteint jusqu'à aujourd'hui. De plus, peu d'informations existent sur les propriétés fonctionnelles des processus de protonation/déprotonation qui peuvent jouer ou non des rôles fondamentaux dans la distribution des protons nécessaires pour la réduction de l'oxygène et le pompage de protons. Enfin, il faut noter que les propositions sur la nature chimique des intermédiaires réactionnels restent aussi des hypothèses. Un moyen d'apporter des informations sur le mécanisme catalytique de la cytochrome *c* oxydase, consiste à élaborer des modèles synthétiques, reproduisant la fonction du site actif: c'est l'approche biomimétique.

Dans la suite de ce chapitre introductif, nous analyserons l'évolution structurale des modèles biomimétiques et nous nous intéresserons plus particulièrement aux conséquences de petites modifications structurales de ces modèles sur les propriétés catalytiques du système et/ou sur les adduits oxygénés formés lors de réactions avec l'oxygène moléculaire. Nous introduirons ensuite les modèles étudiés au cours de cette thèse.

I.3 Modèles biomimétiques de la cytochrome *c* oxydase

Les modèles biomimétiques synthétisés par les chimistes s'attachent à reproduire les caractéristiques géométriques et électroniques du site actif de l'enzyme en mettant en évidence des relations structure-fonction.

Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour les modèles biomimétique de la cytochrome *c* oxydase ne cessant d'augmenter, de nombreuses stratégies de synthèse ont été élaborées et des avancées considérables dans la compréhension des interactions hème/Cu/O₂ ont été obtenues via l'isolation d'intermédiaires réactionnels et leurs caractérisations. Ainsi deux grands types de modèles ont été développés.

- Les modèles fonctionnels visant à reproduire l'activité catalytique de la CcO qui est la réduction à quatre électrons de l'oxygène.¹⁰¹

- Les modèles structuraux reproduisant un état spécifique du site actif de l'enzyme sont principalement désignés pour l'étude des interactions qui peuvent avoir lieu entre d'une part hème/O₂ et d'autre part Cu/O₂.¹⁰²

Cependant, il serait inconcevable de les séparer, puisque un grand nombre des modèles structuraux sont aussi fonctionnels.

La modélisation du site actif de la CcO requiert de rassembler, pour une même molécule, un ensemble de critères distincts. Le premier d'entre eux est d'utiliser un ligand support susceptible de former un complexe de Fe(II) tétravalent-plan, permettant au métal de fixer différents coordinats exogènes sur ces positions axiales laissées encore vacantes. Dans cette optique, le ligand porphyrine s'impose immédiatement : il est le plus proche des systèmes naturels modélisés, il est de synthèse aisée et possède plusieurs positions accessibles permettant, dans la plupart des cas, la complexation du cuivre sur la face distale en vue d'une fonctionnalisation.

Depuis la résolution de la structure de la CcO en 1995, de nombreux modèles ont été décrits dans la littérature. Il paraît impossible de tous les énumérer dans ce manuscrit, nous nous contenterons de décrire un nombre restreint de modèles de la CcO que nous jugeons significatifs.

I.3.1 Modèles Fonctionnels

Un des objectifs de l'approche biomimétique est de mettre en relation structure et activité de l'enzyme afin de synthétiser des catalyseurs qui conduiront à une meilleure compréhension au niveau moléculaire des facteurs qui contrôlent la réduction tétraélectronique de l'oxygène en eau.

En 1997, l'équipe de Collman a publié le premier modèle fonctionnel de la cytochrome *c* oxydase capable de fixer irréversiblement le dioxygène à pH physiologique, avec un rapport molaire de 1:1 (Figure 11).¹⁰³ Ce système associe une porphyrine de Cobalt(II) et un chapeau triazacyclononane (TACN) permettant la coordination du cuivre. Les deux sites de complexation sont reliés par des liaisons amide permettant de maintenir la distance cobalt-cuivre entre 4.5 et 5.5 Å. Ce modèle comporte une base axiale de type imidazole imitant l'histidine proximale du système naturel.

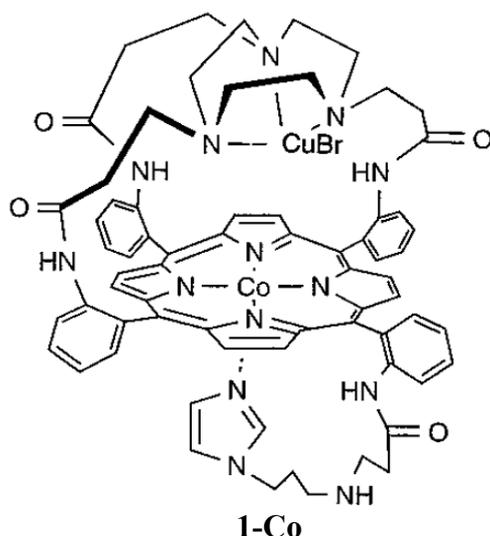


Figure 11: Premier modèle fonctionnel de la CcO à pH physiologique.¹⁰³

Afin d'étudier le comportement biomimétique des modèles hème/cuivre, l'électrocatalyse sur électrode rotative «disque-anneau» s'est révélée être une méthode de choix. L'électrode, qui sert à la fois de support de catalyseur et de donneur d'électrons est formée d'un disque de graphite entouré d'un anneau de platine (Figure 12).



Figure 12 : Schéma d'une électrode rotative «disque-anneau» (RDE).¹⁰⁴

Le principe de cette technique est basé sur l'adsorption des catalyseurs insolubles dans l'eau sur le disque de graphite, puis l'introduction cet ensemble dans une solution aqueuse saturée en dioxygène et tamponnée à un pH proche des valeurs physiologiques. Le potentiel de l'anneau est fixé de façon qu'il puisse réoxyder en oxygène les espèces partiellement réduites du dioxygène, tandis que le potentiel du disque est balayé afin de déterminer le potentiel de réduction de l'oxygène. L'efficacité du catalyseur pour la réduction de l'oxygène en eau est déterminée en fonction de la quantité de d'espèces partiellement réduites formées.¹⁰¹

Le complexe Co(II)-Cu(I) du modèle (**1-Co**) montre en électrocatalyse une réduction tétraélectronique du dioxygène en eau avec production négligeable d'espèces partiellement réduites (peroxyde d'hydrogène). Cependant les études d'électrocatalyse réalisées sur les complexes 1-Co(II) sans cuivre et Co(II)-Cu(I) en absence de la base axiale proximale révèlent une réduction à deux électrons du dioxygène en peroxyde d'hydrogène. Ces résultats suggèrent que l'atome de cuivre et la base axiale sont directement impliqués dans la réduction à quatre électrons par ce modèle. Bien que ce modèle contienne un atome de cobalt au lieu d'un atome de fer comme dans le système naturel, il est connu que le comportement de ces deux atomes vis-à-vis de l'oxygène est similaire.

De manière surprenante, le modèle Fe(II)-Cu(I) (**1-Fe**) analogue du composé (**1-Co**) (Figure 13) entraîne une réduction diélectronique du dioxygène avec production de peroxyde d'hydrogène.¹⁰⁵ Cette différence de réactivité a été expliquée en termes de différence de potentiel d'oxydoréduction du fer et du cobalt. Dans le complexe de cobalt, le potentiel du couple Co(III)/Co(II) est plus élevé que le potentiel Cu(II)/Cu(I) et donc la réduction du cobalt se produit avant celle du cuivre, tandis que dans le complexe de fer, le potentiel du couple Fe(III)/Fe(II) est moins élevé que celui du Cu(II)/Cu(I), ce qui provoque probablement la fixation du dioxygène sur le cuivre au lieu du fer et il en résulte une réduction diélectronique.

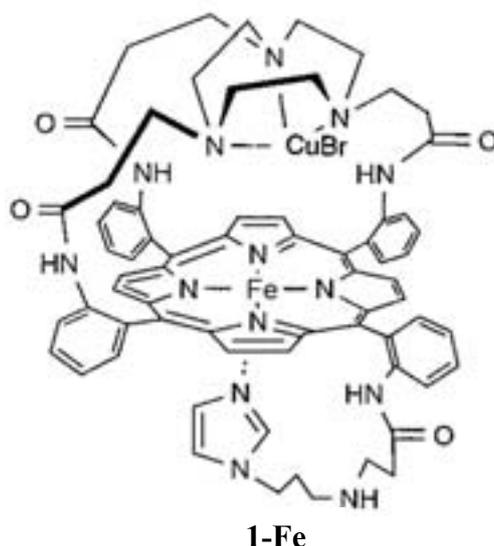


Figure 13: Modèle à chapeau TACN avec une base azotée en position axiale.

Afin de bénéficier d'un modèle Fe(II)-Cu(I) permettant une réduction tétraélectronique du dioxygène en eau, le chapeau TACN a été remplacé par un chapeau *Tribenzyl-tris(aminoéthyl)amine* (TBTren). Le nouveau modèle (**2**) (Figure I.14) ainsi obtenu permet

dans les conditions physiologiques de réaliser une réduction tétraélectronique du dioxygène en eau.¹⁰⁶

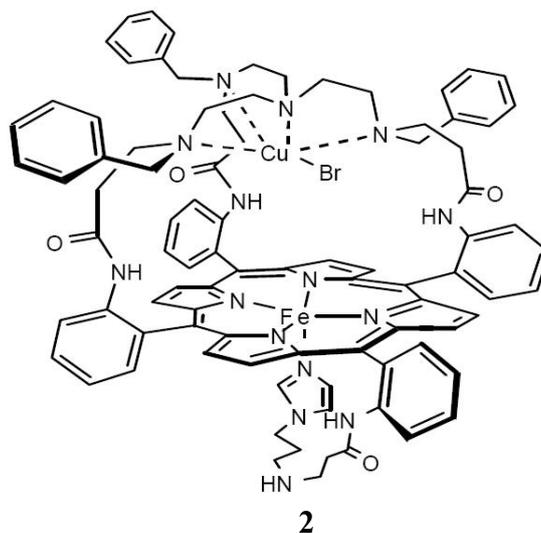


Figure 14 : Modèle à chapeau TBTren avec une base axiale embarquée.¹⁰⁴

Bien que les spectres RMN des modèles **1** et **2** révèlent un couplage antiferromagnétique, indiquant la formation d'un pont μ -peroxo entre les centres métalliques ($\text{Fe}^{\text{III}}-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}$), les études de l'électrocatalyse montrent une réactivité différente avec l'oxygène. Ces résultats indiquent donc l'influence de l'environnement distal sur l'état peroxo formé et montrent notamment le rôle important du potentiel redox du cuivre dans la distinction de la réduction diélectronique ou tétraélectronique de l'oxygène. Dans le chapeau TACN, le cuivre(I) est coordonné par trois atomes d'azote, ce qui rend l'état oxydé cuivre(II) moins stable que celui du chapeau TBTren, où il est coordonné avec quatre atomes d'azote. Cet encombrement stérique autour du cuivre du chapeau TBTren entraîne une réduction du centre ferrique en premier pour fixer le dioxygène dans la cavité distale puis le cuivre se lie à son tour au dioxygène pour s'oxyder.

Le remplacement de la base proximale de **1-Fe** par une base de type pyridinique ou par une base de type N-benzylimidazole plus rigide a montré en électrocatalyse une réduction à quatre électrons avec une formation négligeable d'eau oxygénée.¹⁰⁷ Ces résultats montrent qu'un léger changement structural de la base proximale de la porphyrine peut affecter également les propriétés catalytiques.

En 2002, le groupe de Collman décrit la synthèse d'une série de complexes **3**, **4** et **5** (Figure 15), possédant trois imidazoles dans le site distal permettant la complexation du cuivre et une base axiale proximale de type imidazole coordonnant le fer.¹⁰⁸

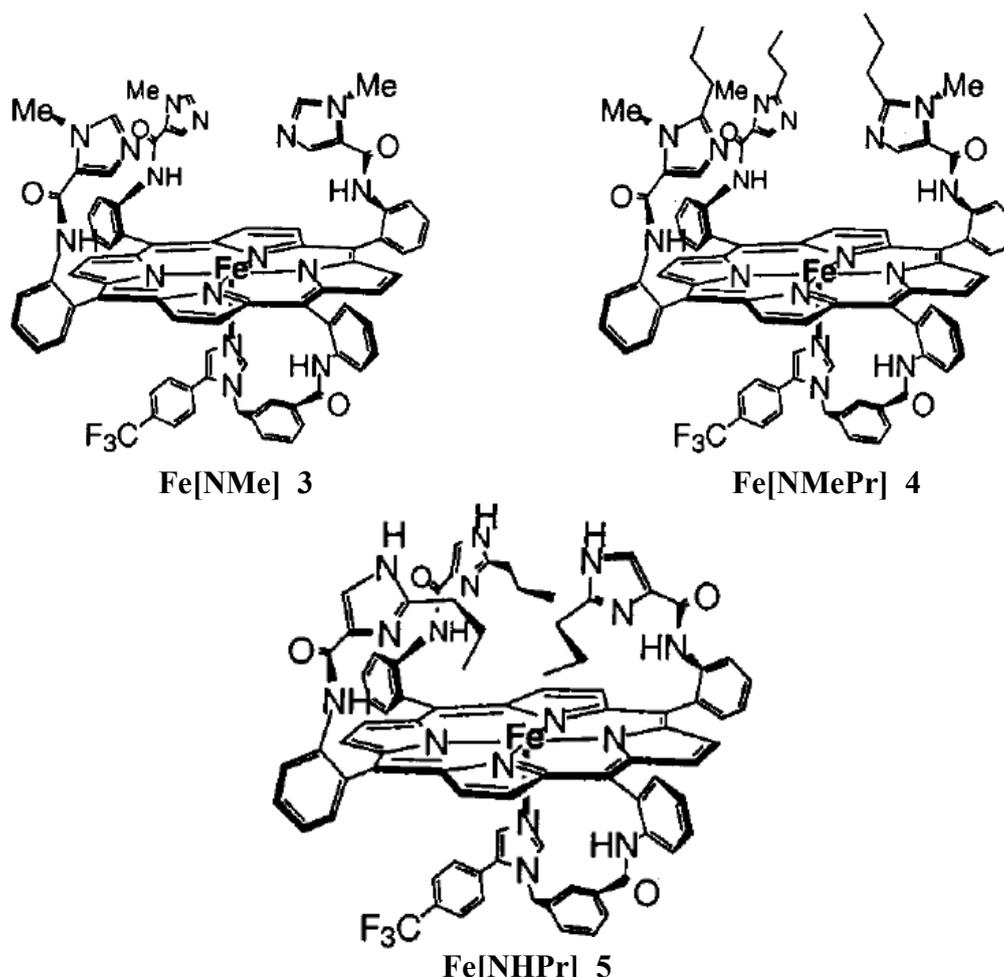


Figure 15 : Série de modèles « très biomimétique » de Collman *et coll.*¹⁰⁸

Les deux sites de complexation sont reliés par des liaisons amides permettant de maintenir la distance fer-cuivre de ~ 5 Å. Le ligand utilisé possède des propriétés électroniques et structurales (ligands de type imidazole) qui modélisent plus fidèlement celles de la cavité distale du site actif de la CcO. Les résidus histidines complexant le cuivre possèdent des groupes NH qui pourraient jouer un rôle important dans l'activité catalytique de l'enzyme. Ainsi, les groupements imidazole-NH contenus dans ces modèles sont susceptibles d'élucider la contribution de la liaison hydrogène dans le fonctionnement de la CcO.

Bien que les modèles **3**, **4** et **5** soient des catalyseurs à quatre électrons pour la réduction de l'oxygène moléculaire, leur réactivité vis-à-vis de l'oxygène est bien différente.¹⁰⁹ La réactivité des complexes **3** et **5** avec le dioxygène induit la génération d'un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ μ -peroxo, tandis que celle du composé $\text{Fe}/\text{Cu}[\text{NMePr}]^+$ (**4**) conduit à la formation d'un superoxyde stable $[\text{Fe}_{\text{a}_3}^{\text{III}}\text{O}_2^-/\text{Cu}^{\text{I}}]$ à température ambiante (Figure I.15).¹¹⁰ Malgré que les centres redox hème/Cu réduits sont placés à une distance Fe-Cu et dans une sphère de coordination similaires à celles de l'enzyme, ils n'entraînent pas la formation d'un complexe

oxygéné contenant un pont peroxyde entre l'hème et le cuivre, comme cela a été largement observé pour les autres modèles de la CcO synthétisés auparavant. Le complexe 4-O₂ présente le premier modèle mimétique de l'intermédiaire oxy (**A**) de la CcO.

Étonnamment, les complexes Fe/Cu[NMePr]⁺ et Fe/[NMePr] présentent une affinité différente pour le dioxygène. L'adduit FeO₂/Cu[NMePr]⁺ peut être formé rapidement à température ambiante, tandis que l'adduit FeO₂/[NMePr] se dissocie et ne fixe complètement l'oxygène qu'à basse température. De plus, le superoxyde Fe/Cu est beaucoup plus stable que celui du fer seul qui se dégrade rapidement. Ces études suggèrent que dans un régime de flux d'électrons rapide le Cu(I) assure la fixation de dioxygène sur le fer et le maintien de sa stabilité en éliminant les peroxydes formés responsables de l'auto oxydation de l'adduit O₂-catalyseur.

Afin de mimer le groupement OH de la tyrosine 280 présent dans le site actif de la CcO, le groupe de Collman a étudié la réaction intermoléculaire entre l'adduit superoxyde 4-O₂ et deux phénols stériquement encombrés (**5** ou **6**) (Figure 16).¹¹¹ Cette étude a révélé la formation d'un radical phénoxy à température ambiante, ce qui démontre le même type de réactivité que la CcO. Ces résultats ont également fourni une grande évidence sur la formation d'un intermédiaire de type hydroperoxo et d'un adduit oxoferryl, analogue de l'état **P** de la CcO, à partir de ce modèle.

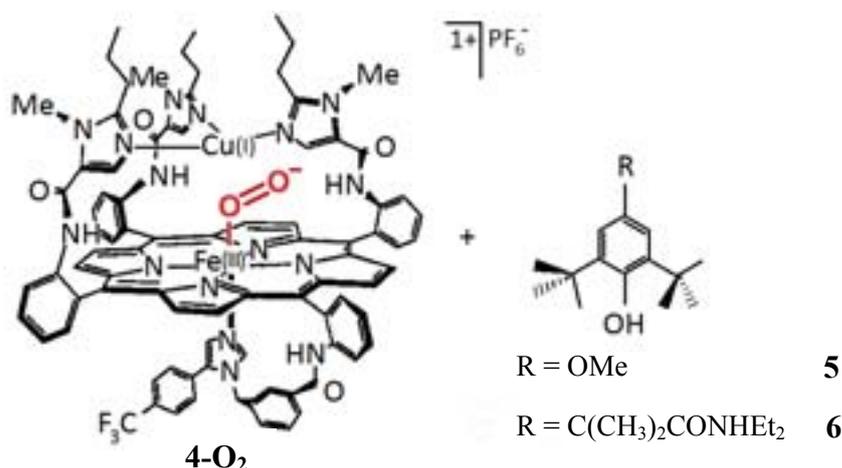


Figure 16 : Réaction intermoléculaire entre l'adduit superoxo et deux phénols mimant la Tyr 280 de la CcO.¹¹¹

En 2004, l'équipe de Collman est parvenue à synthétiser un complexe binucléaire qui réunit les principales caractéristiques du site actif. Ce modèle **7** est marqué par l'introduction

d'un phénol lié de manière covalente à un des imidazoles du site distal. Il constitue l'un des premiers modèles reproduisant le plus fidèlement le site actif de la CcO (Figure 17).¹¹²

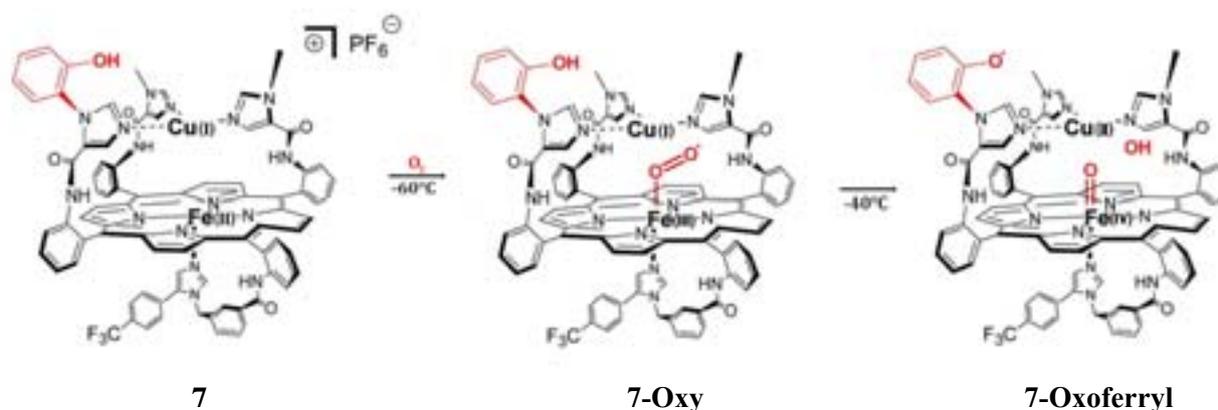


Figure 17: Formation des intermédiaires oxy et oxoferryl à partir d'un modèle très semblable du site actif de l'enzyme.¹¹²

Par l'ajout de l'oxygène au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ du modèle **7** à -60°C , une espèce Fe^{III} -superoxyde- Cu^{I} (**7-Oxy**) a pu être piégée et caractérisée. La spectroscopie de résonance Raman a mis en évidence une bande à $575/549\text{ cm}^{-1}$ ($^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$) sensible au marquage isotopique de l'oxygène, et donc elle a été attribuée à la vibration d'élongation $\nu(\text{Fe}-\text{O})$ des espèces hème-superoxyde (*Oxy*).^{111,113} Lors du réchauffement de la température à -40°C , l'adduit **7-Oxy** subit un processus redox intramoléculaire permettant la formation d'un intermédiaire oxoferryl mimant l'état **P** (Figure 17). Dans ce processus conduisant à l'espèce **7-Oxoferryl**, le site Cu^{I} distal s'oxyde pour donner un complexe du Cu^{II} hydroxo ou aqueux ; le Fe^{III} s'oxyde en un oxoferryl Fe^{IV} et le phénol se transforme en un radical phénoxy. À partir de l'intermédiaire **7-Oxy**, l'apport d'un proton et d'un électron entraîne une rupture hétérolytique de la liaison O-O, tel que cela a été observé pour la CcO.¹¹⁴

D'autres systèmes ont également pour ambition de reproduire la réduction tétraélectronique de l'oxygène de la CcO. Parmi ceux-ci nous citerons les porphyrines de fer synthétisées comme modèles de la CcO par l'équipe de Boitrel^{115,116} ; leur activité, en tant que catalyseur de la réduction à $4e^-$ de l'oxygène a été étudiée à pH 7. Ces composés ont été obtenus par greffage de motifs structuraux très différents sur la même porphyrine de fer, afin de modifier l'environnement de celle-ci par des tétraamines tripodales, des piquets, et des anses. Dans le cas des porphyrines portant un tripode, les amines secondaires du complexe ont été alkylées par différents substituants afin de modifier l'environnement électronique de la poche distale. Ces composés portent une base axiale exogène dans le site proximal de la porphyrine (Figure 18).

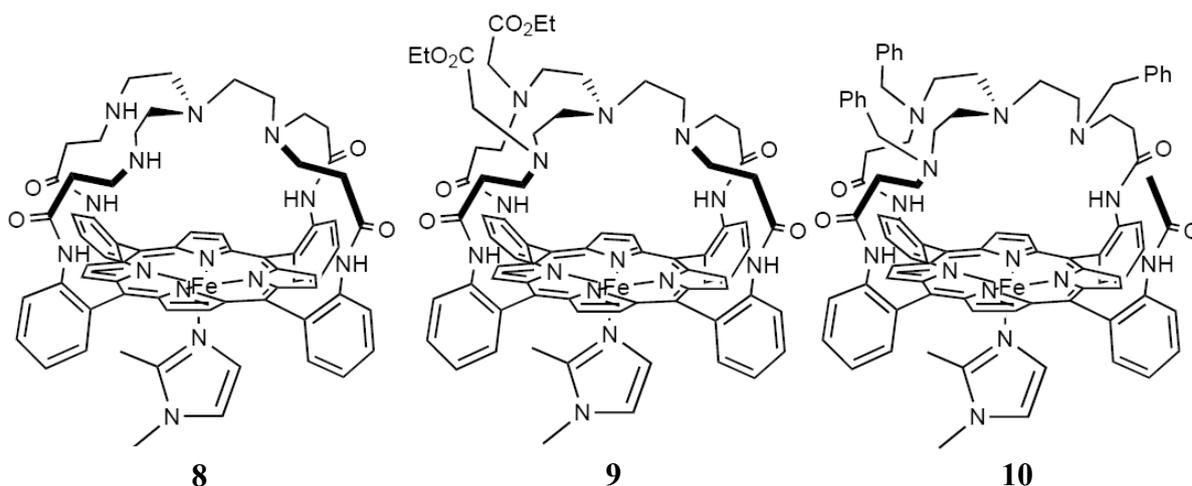


Figure 18 : Modèles tripodales (Boitrel *et coll.*).¹¹⁵

L'électrocatalyse de la réduction du dioxygène pour les complexes **8**, **9** et **10** et leurs analogues du cuivre a été réalisée en milieu aqueux. Le potentiel de l'anneau de platine est fixé à 0,8 V par rapport à la référence AgCl/Ag, potentiel pour lequel les espèces partiellement réduites de l'oxygène éventuellement libérées lors de la réaction sur le disque sont réoxydées. De façon surprenante, les complexes obtenus en absence de cuivre présentent une activité biomimétique, puisqu'ils catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire avec une très faible production de peroxyde d'hydrogène. Malgré les différences structurales de ces complexes, leur réactivité avec l'oxygène est la même. Ils permettent tous les trois la formation d'un intermédiaire oxygéné stable à température ambiante. Ces études montrent également que la coordination intramoléculaire d'une base azotée aux modèles **8**, **9** et **10** n'est pas nécessaire pour la réduction à $4e^-$ de l'oxygène.

Au vue de ces résultats, on peut penser que la présence du cuivre dans la réduction de l'oxygène ne semble pas être déterminante car à un pH proche des valeurs physiologiques, la porphyrine de fer, en elle-même, est un catalyseur efficace pour la réduction de l'oxygène en eau. Ces résultats soulèvent la question du rôle exact du cuivre qui semble loin d'être évident.

Les études évoquées précédemment utilisent des porphyrines de fer adsorbées sur une électrode afin de modéliser le comportement catalytique de la CcO. Bien que ces modèles soient des catalyseurs intrinsèquement efficaces pour la réduction, ils ne permettent pas de mettre en évidence les rôles du Cu_B et de la Tyr280. La réduction nécessite la fixation de l'oxygène sur une porphyrine de fer et exige des électrons et des protons transférés rapidement au complexe oxygéné. Ces conditions sont *à priori* satisfaites lorsqu'une électrode modifiée par une porphyrine de fer se trouve en contact avec une solution aqueuse à pH 7. La

principale différence entre l'activité électrocatalytique des modèles synthétiques de la CcO adsorbés sur une électrode et celle de l'enzyme provient de la vitesse des électrons délivrés aux centres métalliques. Dans le cas des modèles, les électrons sont instantanément disponibles en grand excès à la surface de l'électrode, tandis que dans la CcO, les électrons sont transférés séquentiellement (un par un) du cytochrome *c* au centre binucléaire. De plus, la grande concentration des sites redox contenus dans les films des catalyseurs adsorbés sur l'électrode crée un environnement qui diffère notablement de celui de l'enzyme et dépend significativement de l'état redox global du film.¹⁰⁹ Ainsi, le rôle du Cu_B dans le fonctionnement de l'enzyme doit être élucidé et confirmé par différentes approches expérimentales.

Afin de contrôler le flux d'électron pendant l'électrocatalyse et de mimer la structure protéique autour de l'hème certains modèles notamment ceux développés par le groupe de Collman ont subi des changements structuraux ou ont été incorporés dans des matrices.

De manière intéressante, l'étude de l'électrocatalyse des modèles synthétiques à hème/Cu (**3** et **5**, Figure 15) incorporés dans une matrice 1,2-dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (PC) (Figure 19), un des constituants majoritaire de la membrane mitochondriale, a montré une réduction de l'oxygène sous des conditions plus biologiques : aux potentiels physiologiques, sous une diffusion limitée du flux d'électrons et sans libération des espèces oxygénées partiellement réduites dans le milieu. Les résultats obtenus montrent que, contrairement aux systèmes adsorbés sur l'électrode, les analogues hème/Cu et hème seul se différencient par leur comportement catalytique vis à vis l'oxygène. En effet, le complexe hème/Cu réduit de manière très efficace le dioxygène sans production des espèces partiellement réduites, tandis que le complexe de fer seul se dégrade rapidement.¹¹⁷ Ainsi, ce système permet de mimer et confirmer le rôle proposé pour le cuivre en tant que réservoir d'électrons au cours du cycle catalytique de l'enzyme.

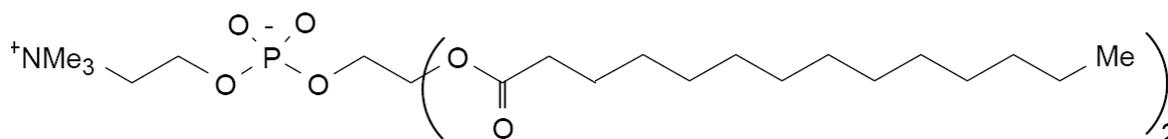


Figure 19 : 1,2-dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (PC).¹¹⁷

Le groupe de Collman a développé une nouvelle méthode électrochimique en liant de manière covalente les catalyseurs à un film organique immobilisé sur la surface d'une électrode d'or.¹¹⁸ Cette méthode consiste à préparer des « SAMs » (self-assembled-monolayers) par l'adsorption d'une longue chaîne d'alkyle de thiol sur le disque de l'électrode d'or. La vitesse de transfert d'électrons à travers le film SAM aux catalyseurs peut être contrôlée et mesurée. L'étape suivante nécessite un couplage covalent des modèles fonctionnels de l'oxydase à l'ensemble film- électrode (SAM). Afin de l'efficacité de cette réaction, particulièrement pour la fonctionnalisation de la surface d'électrode, l'équipe de Collman a choisi d'incorporer une fonction alcyne terminale sur la cinquième position de l'imidazole de la base axiale du catalyseur **11**. L'alcyne est ensuite attachée de manière covalente à une fonction azide rattachée à un film « SAM » déposé sur une électrode d'or, par une réaction de cycloaddition catalysée par du cuivre(I) (Figure 20).

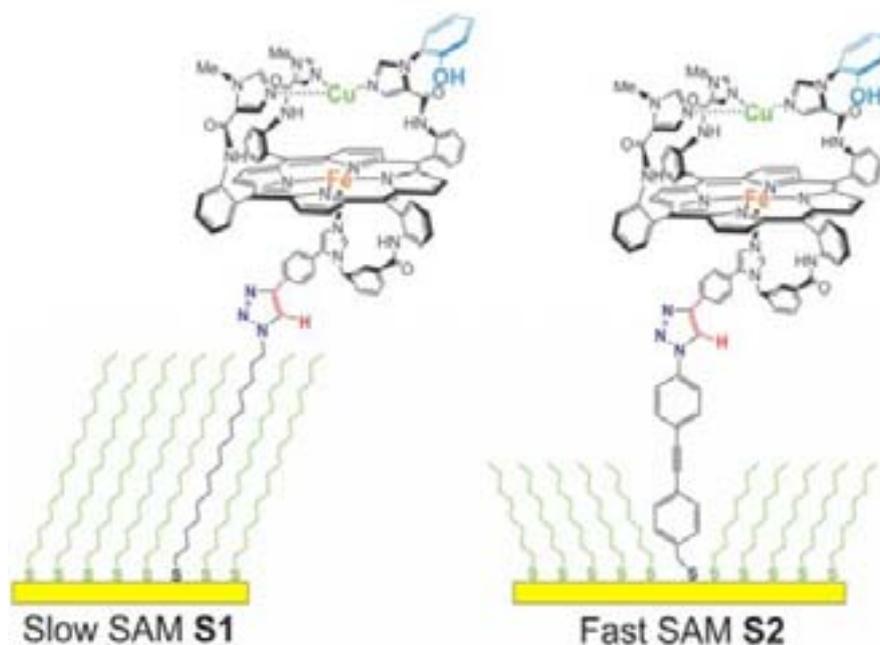


Figure 20 : Modèle fonctionnel (**11**) de la CcO immobilisé sur une électrode d'or.¹¹⁹

Les résultats obtenus indiquent que lorsque le transfert d'électron est rapide (S2), l'analogue du fer seul réduit l'oxygène en eau avec une sélectivité de $89 \pm 2\%$ (d'électrons utilisés pour la formation de l'eau). De manière intéressante, les catalyseurs hème/Cu et hème/Cu/phénol rattachés au film « SAM » (S2) montrent uniquement une légère augmentation de la sélectivité d'électrons utilisés pour la formation de l'eau. Les auteurs proposent que l'absence d'une influence significative du groupement phénol électroactif résulte probablement de la capacité de l'électrode à délivrer un électron supplémentaire assez

rapidement à travers le film « SAM » (S2). Ce résultat démontre que la Tyr 280 n'est pas nécessaire lorsqu'un quatrième électron peut être rapidement délivré à l'intermédiaire oxygéné partiellement réduit. Cependant le transfert d'électron est lent (S1), le complexe hème/Cu/phénol catalyse la réduction de l'oxygène avec une très grande sélectivité (96%), tandis que le complexe de fer seul subit une dégradation.

Afin d'obtenir une détection plus efficace des espèces oxygénés partiellement réduits (PROS) formées lors de la réduction electrocatalytique de l'oxygène, ainsi que d'empêcher un éventuel dommage du film « SAM » dû aux grandes vitesses de rotation de l'électrode, l'équipe de Collman a étudié plusieurs porphyrines superstructurées immobilisées sur des électrodes d'or-platine (IDAs) "interdigitated-array".¹²⁰ Ces électrodes IDAs permettent des collections efficaces des espèces partiellement réduites de l'oxygène (PROS) de l'ordre de 65-90% par rapport à des valeurs inférieures à 20% pour les électrodes RDE. Les complexes étudiés (Figure 21) sont également immobilisés par une réaction catalysée par le cuivre(I) entre l'azide terminal du «SAM» et la fonction alcyne des modèles.

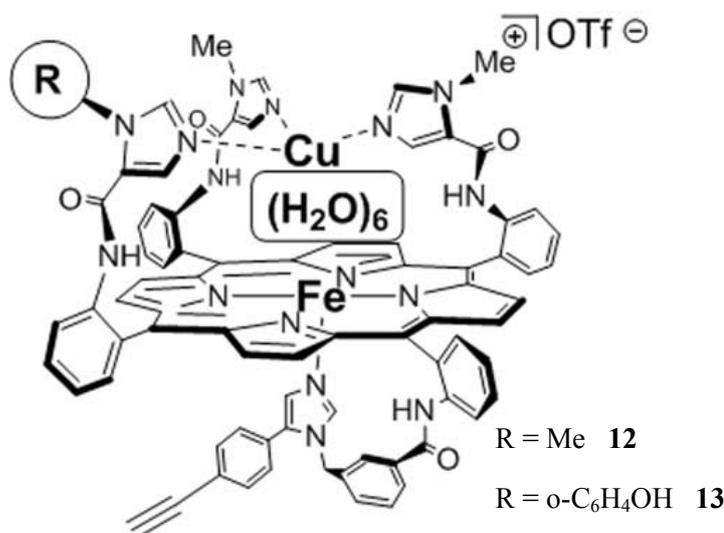


Figure 21 : Effet des centres redox Cu(I) et phénol sur la formation de PROS.¹²⁰

L'emploi des conditions mimant la vitesse de transfert d'électrons du cytochrome *c* à la CcO (2 s^{-1}) montre que le catalyseur contenant deux centres redox distaux (Cu(I) et un groupement imidazole-phénol liés de manière covalente) génère uniquement $5 \pm 1\%$ de PROS, ce qui indique une efficacité de 95% dans la réduction à $4e^-$ de l'oxygène. Cependant, si un des centres redox est éliminé, la quantité de PROS augmente de $10 \pm 1\%$ en absence du groupement mimant la Tyr280 et de $20 \pm 1\%$ en absence du Cu(I). Dans le cas où le catalyseur n'est pas réduit, la quantité de PROS augmente significativement mais lorsque le

transfert d'électrons est rapide, cette quantité diminue à $10 \pm 1\%$. Ces résultats corroborent bien avec ceux obtenus avec les électrodes RDE.

Les nouvelles approches développées par le groupe de Collman ont mis également en évidence un rôle crucial du cuivre et du phénol dans la réduction tétraélectronique de l'oxygène. Selon plusieurs auteurs, le cuivre joue un rôle essentiel dans l'activité catalytique de l'enzyme de façon à ce qu'un modèle ne peut être considéré biomimétique que s'il comprend une porphyrine de fer et un complexe de cuivre mais les études obtenues jusqu'à ce jour ne permettent pas encore de détecter un rôle direct du Cu^I dans l'activation de la liaison O-O.

I.3.2 Modèles structuraux

Bien que certaines caractéristiques principales du site actif des oxydases que les modèles fonctionnels s'attachent à reproduire, les paramètres géométriques ainsi que les propriétés électroniques (degrés d'oxydation), spectroscopiques (bandes de vibration Raman et IR par exemple) et magnétiques sont d'autres éléments que les modèles structuraux visent à reproduire, tous ces aspects étant liés les uns aux autres. Un des objectifs principaux pour un modèle structural est d'élucider les aspects fondamentaux des interactions de l'oxygène avec les sites hémique et cuivrique. Parmi ceux-ci, nous citerons les travaux de Karlin et Naruta qui ont développé plusieurs complexes de type Fe(III)-X-Cu(II) en suivant deux approches synthétiques de modèles structuraux : modèles auto-assemblés et modèles covalents.

3.2.1 Modèles auto-assemblés par un pont oxygène

Dans ces modèles, les deux sites de coordination hémique et cuivrique sont reliés par un pont oxygéné. En faisant réagir un équivalent de dioxygène avec des quantités équimolaires de la porphyrine $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{F}_8\text{TPP})$ (**14**) et du ligand tétradentate $[(\text{TMPA})\text{Cu}^{\text{I}}(\text{RCN})]^+$ (**15**), Karlin *et coll.* ont pu isoler un complexe Fe^{III}-peroxo-Cu^{II} $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{F}_8\text{TPP})-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TMPA})]^+$ (**16'**) à basse température (Figure 22).¹²¹

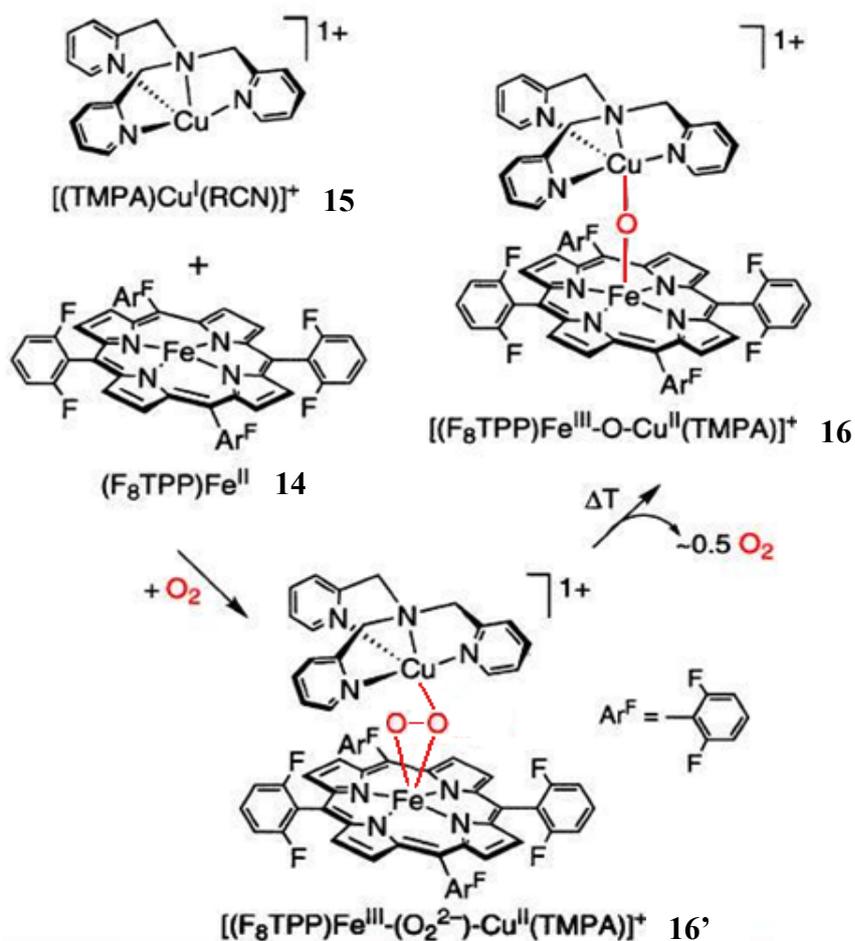


Figure 22 : Formation d'un adduit peroxy à partir d'un modèle structural dans lequel le cuivre est coordonné par un ligand tétradentate.¹²¹

La caractérisation structurale de ce complexe (**16'**) par spectroscopies de résonance Raman et d'absorption de rayons X ainsi que des calculs théoriques DFT a montré que le peroxyde formé est lié de manière "side-on" à l'atome du fer et "end-on" à celui du cuivre. Ainsi, l'intermédiaire obtenu est de type $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1\text{-peroxo}$ (**16'**)^{122,123} dont la fréquence d'élongation $\nu(\text{O-O})$ est observée à 808 cm^{-1} . Le retour à température ambiante de la solution contenant l'espèce **16'** entraîne l'obtention d'un intermédiaire $\mu\text{-oxo}$ **16** (Figure 22).

Deux autres complexes auto-assemblés par un pont oxygéné mais comprenant un ligand tridentate autour du cuivre ont été synthétisés par cette même équipe. Leur réaction avec l'oxygène à basse température génère également des intermédiaires de type hème-peroxo-cuivre. Les deux complexes **19** et **20** sont obtenus en faisant réagir, en présence d'un équivalent de dioxygène, la porphyrine de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{F}_8)$ **14** avec des quantités stœchiométriques des complexes de cuivre(I) : $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{AN})]^+$ **17** ou $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L}^{\text{Me}_2\text{N}})]^+$ **18** (Figure 23).¹²⁴

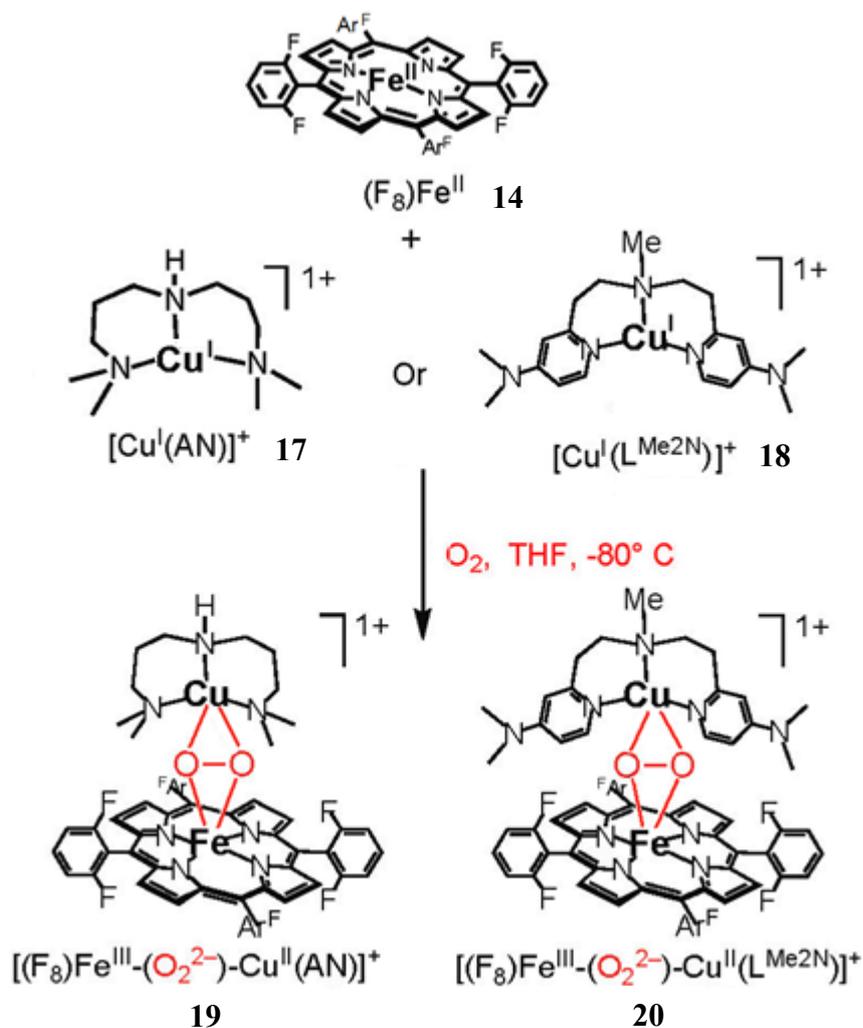


Figure 23 : Formation des adduits peroxy à partir de deux modèles structuraux dans lequel le cuivre est coordonné par un ligand tridentate (La Figure est modifiée par rapport à l'original).¹²⁴

Dans le spectre Raman du complexe (20), deux bandes à 752 et 767 cm^{-1} ont été attribuées au mode $\nu(O-O)$, tandis que dans celui du (19), une seule bande a été identifiée à 756 cm^{-1} . Ces observations montrent que selon la nature du ligand distal différents intermédiaires peuvent être formés au cours de la réaction avec l'oxygène. De plus, le déplacement vers les basses fréquences observé pour la vibration $\nu(O-O)$ en comparaison avec celle obtenue pour l'adduit (16') indique clairement un différent mode de coordination de l'oxygène par rapport aux ions du fer et du cuivre. Dans le cas du ligand tridentate (18), deux intermédiaires $\mu-\eta^2:\eta^2$ -peroxy et $\mu-\eta^2:\eta^1$ -peroxy¹²⁴ ont été observés, tandis que dans le cas du ligand (17), un seul intermédiaire de type $\mu-\eta^2:\eta^2$ -peroxy a été obtenu.¹²⁵

L'équipe de Karlin a également synthétisé un complexe analogue à (15), dans lequel une des pyridines a été remplacée par un imidazole couplé à un phénol afin d'élucider le rôle de la liaison covalente His-Tyr du site actif de la CcO (Figure 24).¹²⁶

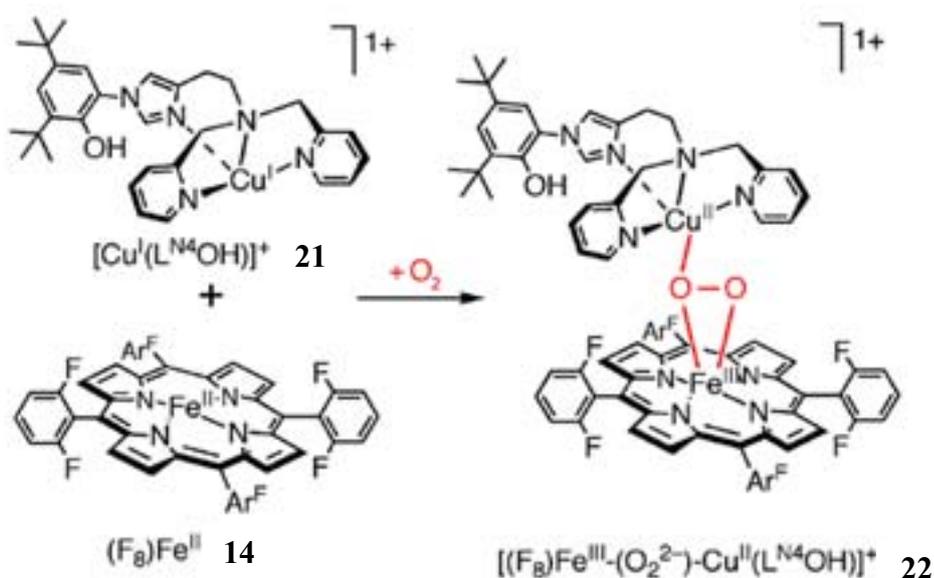


Figure 24 : Formation d'un adduit peroxy à partir d'un Modèle structural possédant un groupement phénol mimant la Tyr 280.¹²⁶

L'oxygénation du produit $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L}^{\text{N4}}\text{OH})]^+$ (**21**) en présence du site hémique $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{F}_8)$ (**14**) génère, à basse température, un adduit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{F}_8\text{TPP})-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^{\text{N4}}\text{OH})]^+$ (**22**) stable. Ce complexe de spin $S = 2$ forme un pont peroxyde qui assure un couplage antiferromagnétique entre les deux centres métalliques de haut spin, Fe(III) et Cu(II). Un complexe hème-peroxy-Cu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{F}_8\text{TPP})-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^{\text{N4}}\text{OMe})]^+$ (**24**) très similaire (propriété spectroscopiques et stabilité thermique) au complexe (**22**) a pu être généré en utilisant le ligand $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L}^{\text{N4}}\text{OMe})]^+$ (**23**). Ces résultats indiquent que la liaison covalente du phénol ne présente aucune interaction avec le peroxyde formé dans le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{F}_8\text{TPP})-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^{\text{N4}}\text{OH})]^+$ (**22**). La spectroscopie de résonance Raman a également confirmé ces observations puisque les fréquences de la vibration $\nu(\text{O}-\text{O})$ observées à 813 et 815 cm^{-1} pour les complexes (**22**) et (**24**), respectivement, sont très similaires à celle obtenu pour le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{F}_8\text{TPP})-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TMPA})]^+$ (**16'**) où la liaison covalente du phénol est absente.¹²⁶

En 2010, le groupe de Karlin a publié la synthèse du complexe hème-peroxy-cuivre à bas spin $[\text{DCHIm}(\text{F}_8)\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}_2^{2-})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{AN})]^+$ (**25**) obtenu par addition d'un équivalent de 1,5-dicyclohexyllimidazole (DCHIm) à une solution contenant l'adduit peroxy de haut spin (**19**) dans le THF à $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 25).¹²⁷

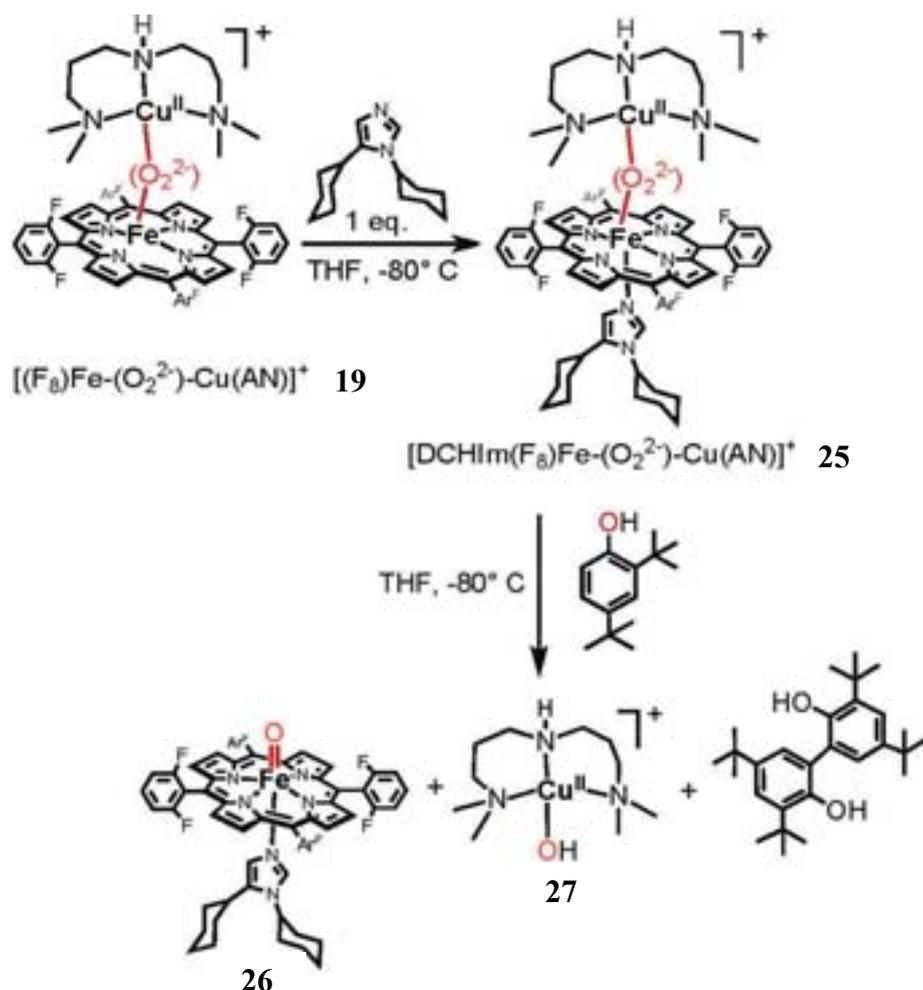


Figure 25 : Réaction d'un adduit peroxy à bas spin avec un groupement phénol mimant la Tyr 280.¹²⁷

La caractérisation du composé (**25**) par différentes techniques spectroscopiques a suggéré la présence d'un couplage antiferromagnétique entre les centres Fe^{III} hexacoordiné ($S = 1/2$) et Cu^{II} ($S = 1/2$) et la formation d'un pont peroxy. Cette équipe a également étudié la réactivité de ce complexe peroxy de bas spin (**25**) avec un groupement phénol (2,4-di-tert-butylphénol) dans les mêmes conditions utilisées (THF, $-80^\circ C$), cette réaction a conduit à la formation d'un produit du phénol couplé (3,3', 5, 5',-tetra-tert-butyl-2,2'-dihydroxybiphényl) accompagné d'une rupture réductrice du pont peroxy aboutissant à la formation d'un complexe hydroxyde du cuivre (II) $[Cu^{II}(AN)(OH)]^+$ (**27**) et d'un hème oxoferryl (**26**) (Figure 25). Ces résultats ont mis clairement en évidence la donation d'un proton et d'un électron du groupement phénol aux centres métalliques.

L'intérêt de cette série de modèles structuraux provient de la variété de géométries qu'ils présentent autour du cuivre ; en effet ces études mettent en évidence le rôle fondamental de l'architecture du ligand cuivrique dans la distinction de la nature des espèces formées au cours de la réaction des modèles avec l'oxygène moléculaire.

3.2.2 Modèles covalents

La synthèse de plusieurs autres composés dans lesquels le ligand complexant le cuivre est lié de manière covalente à la porphyrine de Fe(II) par une seule liaison ont été décrits en particulier par les équipes de Karlin et Naruta.

Le groupe de Karlin est parvenu, en 2005, à synthétiser le premier complexe hème/cuivre μ -peroxo à haut spin $[(^6L)Fe^{III}-(O_2^{2-})-Cu^{II}]^+$ (**29**).¹²⁸ Il est obtenu à partir de la réaction d'un modèle binucléaire covalent (**28**), analogue aux systèmes (**14**) et (**15**), avec l'oxygène à basse température (Figure 26).

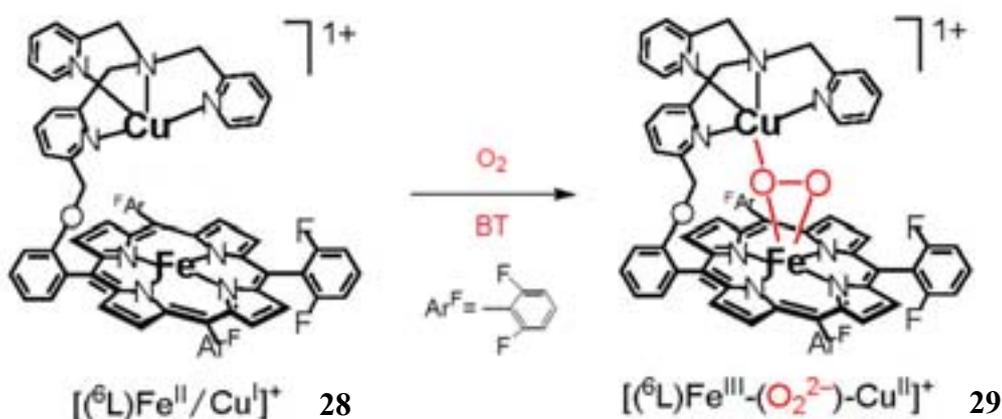


Figure 26 : Modèle covalent possédant un ligand tétradentate pour le cuivre (La figure est modifiée par rapport à l'originale).¹²⁸

Dans cet édifice (**29**), le complexe de cuivre est lié de manière covalente à la porphyrine de $(^6L)Fe^{II}$ par une liaison éther en cinquième position d'une pyridine. Les études réalisées par spectroscopie de RMN ont mis en évidence une signature spécifique d'une espèce présentant un pont antiferromagnétique peroxo- ou oxo-hème-Cu de la forme $PFe^{III}-X-Cu^{II}$, où $X = O_2^{2-}$, O^2- . Le spectre de résonance Raman montre une bande à 788 cm^{-1} sensible au marquage isotopique de l'oxygène $^{16}O_2/^{18}O_2$. Ce signal a été attribué à un mode $\nu(O-O)$ caractéristique d'un adduit μ -peroxo. Lors du retour à la température ambiante, le complexe (**29**) se transforme en une espèce μ -oxo $[(^6L)Fe^{III}-O-Cu^{II}]^+$.¹²¹

Selon la réduction par le cobaltocène $Co(Cp)_2$, l'état haut spin du complexe $[(^6L)Fe^{III}-(O_2^{2-})-Cu^{II}]^+$ (**29**) entraîne une réactivité catalytique différente par rapport à celle observée pour les autres complexes hème-peroxo-Cu synthétisés auparavant. Lorsque le complexe (**29**) est exposé à un excès de $Co(Cp)_2$, il subit immédiatement une réduction à $2 e^-$ et se transforme en $[(^6L)Fe^{III}-O-Cu^{II}]^+$ à 233K, tandis que les systèmes peroxo synthétisés par Collman *et coll.*

présentent une réduction complète à $4e^-$ et reviennent à leurs formes désoxygénées initiales Fe^{II}/Cu^I .

Par cette même approche (modèle covalent), l'équipe de Karlin a décrit un modèle (**30**) du site actif de la CcO dans lequel le cuivre est complexé par un ligand tridentate lié par un espaceur amide à la porphyrine (Figure 27).¹²⁹

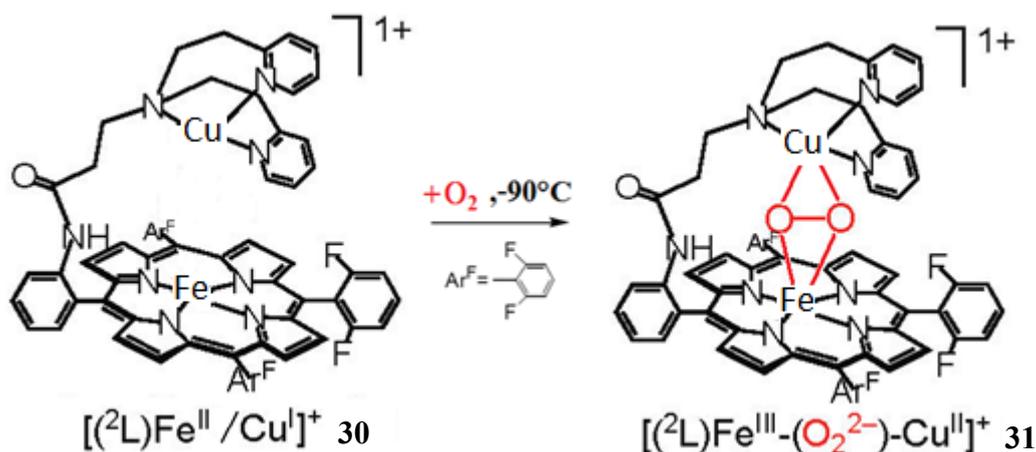


Figure 27 : Modèle covalent possédant un ligand tridentate pour le cuivre (la figure est modifiée par rapport à l'originale).¹³⁰

L'addition de l'oxygène à basse température au modèle $[(^2L)Fe^{II}/Cu^I]^+$ (**30**) conduit à la formation du complexe hème-peroxo-cuivre (**31**). Dans ce composé, la distance Fe-Cu est de l'ordre de 3,6 Å et le mode $\nu(O-O)$ est observé à 747 cm^{-1} , ce qui indique la formation d'un pont peroxy de type $\eta^2:\eta^2$ entre les ions du fer et du cuivre. Afin de mieux comprendre le rôle du cuivre ainsi que l'influence de son environnement dans la réaction hème/Cu/O₂, le groupe de Karlin a étudié séparément les réactions hème/O₂ et Cu/O₂. Lorsque la porphyrine (F₈)Fe^{II} réagit seule avec l'oxygène, deux intermédiaires peuvent être générés selon le solvant utilisé. Dans la réaction Cu/O₂, il a été montré que le ligand $[(L^R)-Cu^I]^+$ (L = N,N-bis[(2-(2-pyridyl)thyl)méthylamine], où R = H, -OMe, -NMe₂; les substituants en position para de la pyridine] réagit avec l'oxygène et donne un mélange de deux adduits en équilibre : $[(L^R)-Cu)_2(O_2)]^{2+}$, ($\eta^2:\eta^2$ -peroxy) dicuivre(II) et bis(μ -oxo) dicuivre(III).¹³¹ Il est important de remarquer que le complexe hétérobinucléaire hème-cuivre $[(^2L)Fe^{II}Cu^I]^+$ (**30**) entraîne la formation d'un nouvel intermédiaire qui ne pourrait pas être obtenu individuellement à partir de chaque compartiment.

Dans cette optique, Naruta *et coll.* ont synthétisé un modèle covalent dans lequel les deux sites de coordination sont également reliés par une fonction amide mais la sphère de coordination du cuivre comporte un ligand tétradentate (Figure 28).¹³²

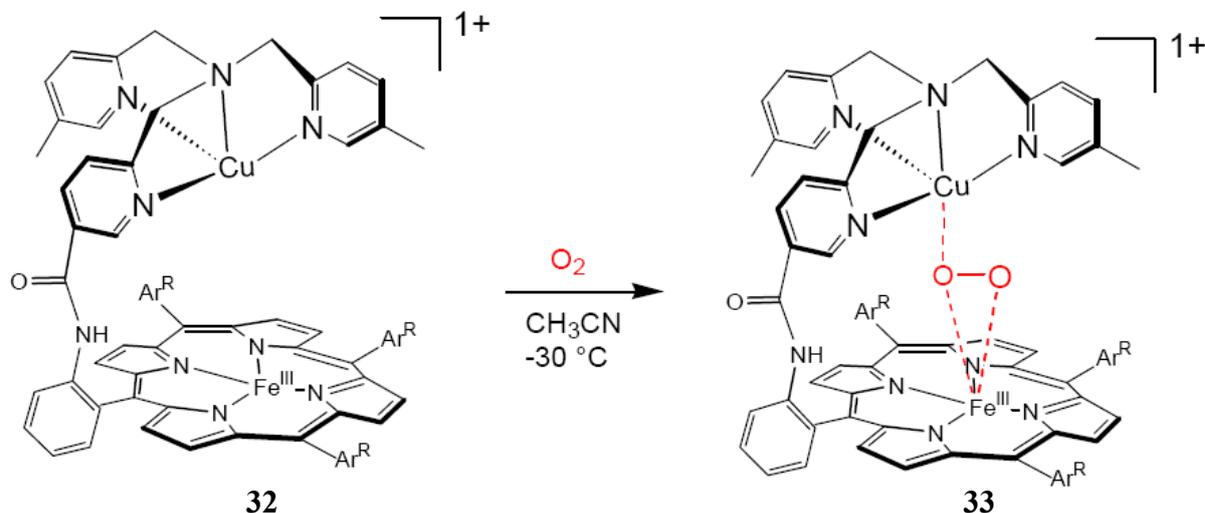


Figure 28 : Modèle covalent avec un ligand tétradentate pour le cuivre.¹⁰⁴

La réaction du complexe (32) à l'état réduit avec le dioxygène a conduit à la formation d'une espèce de type hème-peroxo-cuivre (33). Cet intermédiaire a été étudié par plusieurs techniques spectroscopiques, et sa structure établie par rayons X à $-30^\circ C$ a révélé une coordination de type peroxo « side-on » pour le fer et « end-on » pour le cuivre.¹³³

D'autres systèmes covalents possédant une base azotée en position axiale imitant l'histidine proximale de la CcO ont été développés. Nous nous intéresserons plus particulièrement à deux complexes synthétisés par l'équipe de Karlin,¹³⁴ comportant chacun une base axiale de type pyridine et un site tridentate de complexation du cuivre. Les deux composés ne diffèrent que par le nombre de liaison maintenant la PY2 et la base axiale à la porphyrine (Figure 29).

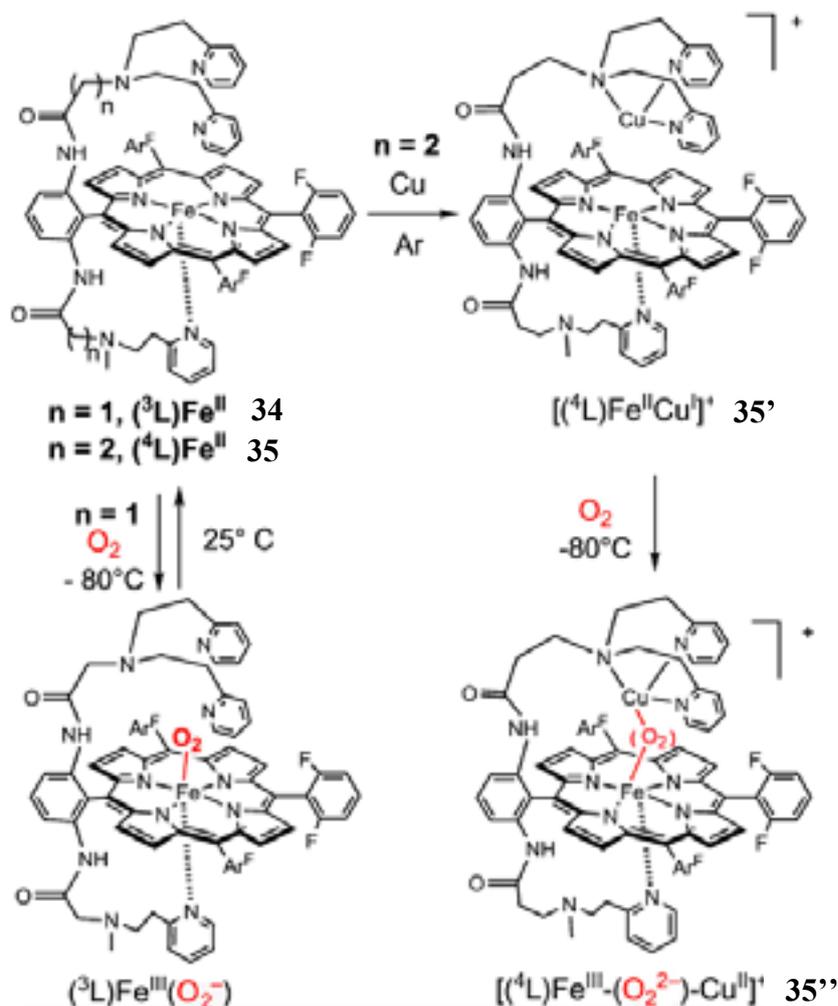


Figure 29 : Modèles covalents avec une base axiale de type pyridine de Karlin *et coll.*¹⁰²

Les analogues du fer seul $(^3\text{L})\text{Fe}^{\text{II}}$ (**34**) et $(^4\text{L})\text{Fe}^{\text{II}}$ (**35**) montrent une réactivité différente avec l'oxygène. En effet, le complexe (**34**) fixe réversiblement l'oxygène, tandis que le composé (**35**) le fixe de manière irréversible. Toutefois, les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$ (**34'**) et (**35'**) réagissent irréversiblement avec l'oxygène et permettent de former des adduits oxygénés stables à basse température. Des études complémentaires de RMN et RPE ont montré la formation des adduits peroxy (**34''**) et (**35''**) diamagnétiques et de stœchiométrie 1:1. Cependant, le réchauffement des solutions contenant (**34''**) et (**35''**) provoque l'apparition de produits thermiquement différents. Pour l'adduit (**35''**), la majorité des espèces (>70%) se transforme en des complexes μ -oxo $[(^4\text{L})\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Cu}^{\text{I}}]^+$. Cependant, aucune espèce μ -oxo n'a été observée pour la réaction du complexe $[(^3\text{L})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ (**34'**) avec l'oxygène, ce qui indique l'influence de l'architecture du ligand sur la réactivité des systèmes hème/ O_2 et hème/ Cu/O_2 .

Naruta *et coll.* ont utilisé un modèle covalent (**36**) avec une sphère de coordination autour du cuivre (un site distal contenant deux molécules d'imidazoles) dans laquelle a été introduit un groupement phénol jouant le rôle de donneur de protons et d'électrons pour la rupture hétérolytique de la liaison O-O. Ce site protonable modélise la tyr 280 présente au site actif des oxydases et impliquée dans le mécanisme catalytique proposé pour l'enzyme. De plus, ce modèle comprend une base proximale de type imidazole (Figure 30).

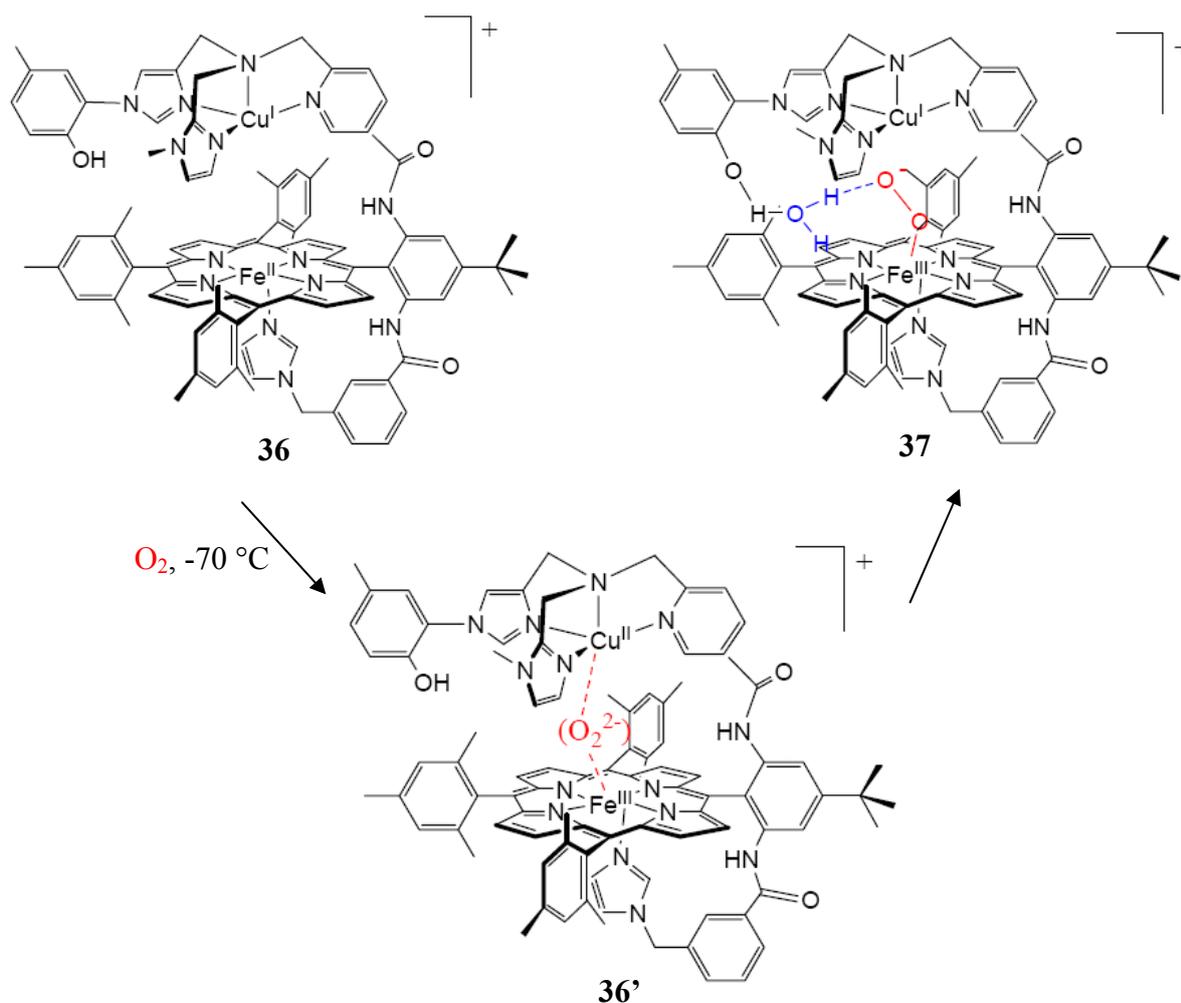


Figure 30 : Modèle covalent avec une base axiale de type imidazole de Naruta *et coll.*¹⁰⁴

La réaction du complexe (**36**) avec le dioxygène produit un intermédiaire hème-superoxo-Cu(I) (**37**) à -70°C. Les auteurs ont détecté la formation d'un adduit (**36'**) de type hème- μ -peroxo-Cu(II) avec une durée de demi-vie de 30 minutes avant l'obtention du composé (**37**). Il présente beaucoup de similitude avec l'intermédiaire **A** du cycle catalytique de la CcO.¹³⁵

Au vue de ces résultats, il est probable que la transition **A**→**P** doit aboutir à la formation d'une espèce μ -peroxo Fe^{III}-(O₂²⁻)-Cu^{II}. Or, celle-ci n'a pas été observée expérimentalement dans le cycle catalytique de la CcO. Il est possible que cette étape soit très rapide et donc

cinétiquement non limitante. Cependant, l'existence d'un pont μ -peroxo ou d'une espèce hydroperoxo est fortement suggérée par les travaux de mécanique quantique réalisés sur un site actif de l'oxydase modélisé à l'état réduit.^{61,76,136}

Les modèles fonctionnels et structuraux synthétisés et étudiés à ce jour ont donc clairement mis en évidence l'influence de la base axiale proximale et de l'environnement du site distal sur l'efficacité du catalyseur. Ils ont aussi apportés des éléments de réponses intéressants sur le rôle du cuivre et de la tyrosine 280 mais rien à ce sujet n'est encore établi de manière certaine. De nombreux modèles fonctionnels doivent encore être étudiés pour espérer comprendre la réduction tétraélectronique de l'oxygène.

I.4 Choix des modèles de la CcO étudiés

Nous avons choisi d'étudier une série d'analogues de la CcO qui possèdent tous une porphyrine de fer rattachée à des ligands azotés prévus pour la complexation de cuivre sur la face distale: une porphyrine à anse phénanthroline et des porphyrines tripodales possédant un groupe de petite taille plus ou moins électro-attracteur sur le site distal (Tableau 3). Les différents substituants ont été choisis de manière à moduler la densité électronique sur la fonction de l'analogue: le groupe méthoxy est moyennement électro-attracteur, tandis que le groupe NO₂ est fortement électro-attracteur, ce qui permet d'obtenir des analogues de la CcO avec des pKa très différents.

La sixième position de coordination est occupée par un ion chlorure ou hydroxyde qui peuvent être aisément remplacés par des ligands exogènes de nature variable. Cette particularité des modèles permet d'analyser différents motifs de coordination de l'hème, et offre ainsi la possibilité de mieux comprendre les relations structure-fonctions au sein de la cytochrome *c* oxydase.

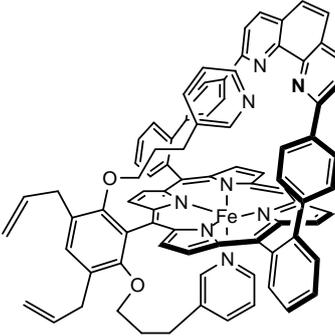
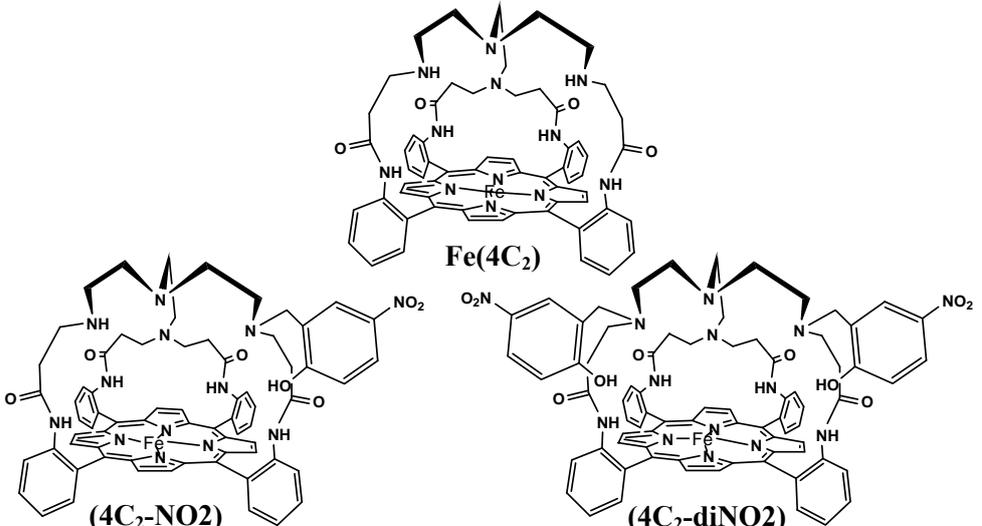
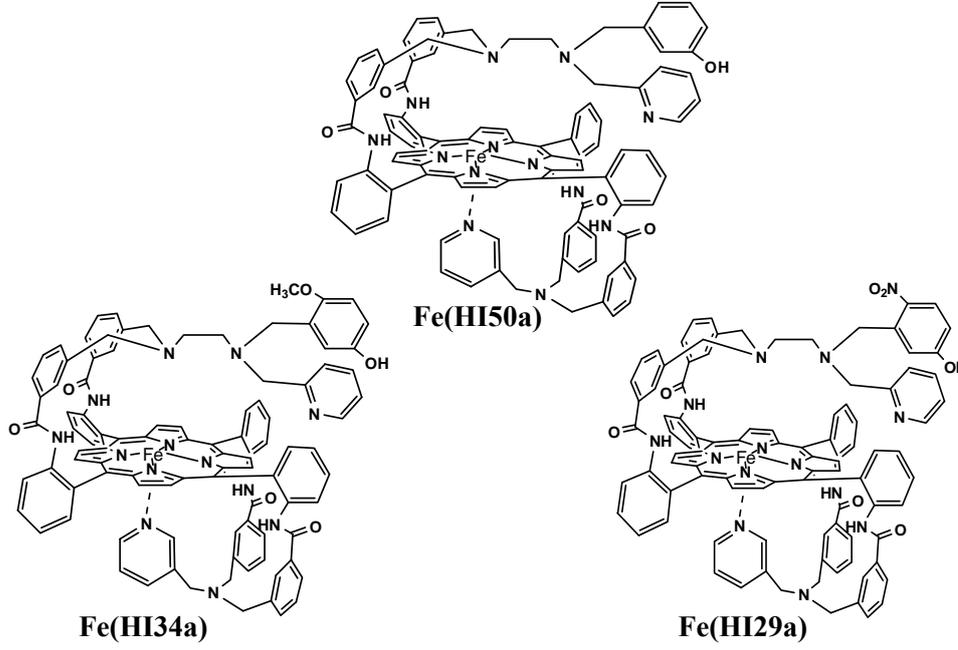
<p>Modèle porphyrine à anse phénanthroline (Weiss et coll.)</p>	 <p style="text-align: center;">2Pyporphen</p>
<p>Modèles 4C₂ (Boitrel et coll.)</p>	 <p style="text-align: center;">Fe(4C₂)</p> <p style="text-align: center;">(4C₂-NO₂)</p> <p style="text-align: center;">(4C₂-diNO₂)</p>
<p>Modèles HI (Boitrel et coll.)</p>	 <p style="text-align: center;">Fe(HI50a)</p> <p style="text-align: center;">Fe(HI34a)</p> <p style="text-align: center;">Fe(HI29a)</p>

Tableau 3 : Modèles biomimétiques de la CcO utilisés au cours de cette étude.

I.4.1 Modèles 4C₂H₂

Le complexe 4C₂H₂ a été synthétisé par l'équipe de Boitrel comme modèle fonctionnel de la CcO.^{115,137} Son hypothèse était la suivante : la synthèse d'une tétraphénylporphyrine de Fe(II) possédant un tripode tris(2-aminoethyl)-amine (tren) localisé sur la face distale de la porphyrine permettrait de créer une « poche protégée » et de coordonner un atome de cuivre. L'autre face est laissée libre dans l'optique d'y ajouter un ligand encombré de type imidazole. Ainsi, cette « clôture » offre une excellente protection contre l'oxydation tout en maintenant une accessibilité au dioxygène. Ce composé présente une très forte affinité pour le dioxygène et le monoxyde de carbone. Son affinité pour le dioxygène s'avère être 100 fois supérieure à la porphyrine dendrimère 4' et à l'hémoglobine du Ver *Ascaris*.

Plus récemment, le modèle 4C₂H₂ a subi quelques petites modifications dans sa partie distale. Les deux nouveaux modèles ainsi obtenus comportent chacun au moins un groupement nitro-phénol. Le dérivé 4C₂mononitro a été obtenu par une introduction d'un groupement de type nitro-phénol sur une des fonctions amine de la tren. Cette substitution permet de mimer le groupement OH de la Tyrosine 280 présent dans la cytochrome *c* oxydase. En effet, des études spectroscopiques réalisées par Yoshikawa *et coll.*¹⁶ suggèrent une protonation du dérivé peroxy par le groupe hydroxyle du résidu Try280 pour donner un adduit hydroperoxy. La formation d'une liaison post-transcriptionnelle entre la fonction orthophénolique et une histidine coordonnant le cuivre entraîne une diminution du pKa de la tyrosine. En vue de reproduire cet abaissement de pKa, l'équipe de Boitrel a utilisé un phénol substitué en position para par un groupement nitro, ce qui permet de diminuer théoriquement son pKa d'environ trois unités par rapport au phénol. Le dérivé 4C₂dinitro comporte deux groupements nitro-phénol, ce qui a pour effet d'augmenter l'encombrement stérique dans le site distal.

I.4.2 Modèles HI

Le groupe de Boitrel a développé une série de trois complexes très semblables avec de petites variations structurales. Dans ces nouveaux édifices, les deux sites de coordination cuivrique et hémique sont reliés par deux fonctions amide choisies pour leur flexibilité bien qu'elles limitent la libre rotation. Ces modèles sont marqués par l'introduction d'une base axiale intramoléculaire de type 3-(aminométhyl)pyridine liée aussi avec deux fonctions amides au cycle porphyrinique. L'intérêt de cette série de modèles structuraux provient de la variété de substituants qu'ils présentent autour du cuivre.

I.4.3 Porphyrine à anse phénanthroline (*Porphen*)

Le ligand synthétisé par l'équipe de J. Weiss est constitué d'une porphyrine superstructurée à anse phénanthroline, appelé *Porphen*.¹³⁸ L'originalité de ce composé modèle réside dans le fait que le site de coordination prévu pour le cuivre (phénanthroline) et la porphyrine sont maintenus dans une géométrie contrôlée. Il a été préparé par l'introduction de deux bras pyridiniques en positions distale et proximale. L'étude du complexe de fer(III) par spectroscopie RPE a révélé une géométrie pentacoordinée. Il a été montré que la fixation de dioxygène sur cet édifice nécessite une occupation préalable du bras pyridinique en position distale. Les études de l'électrocatalyse du système fer-cuivre catalyse plus efficacement l'électroréduction du dioxygène en eau en milieux aqueux tamponné à pH = 7 que le modèle fer seul.

L'étude des complexes de la CcO va permettre d'analyser l'influence de certains de ces facteurs (état électronique, coordination axiale, polarité de l'environnement de l'hème, le rôle du cuivre et de la tyrosine...) sur leur réactivité avec l'oxygène et le monoxyde de carbone. Par ailleurs, pour pouvoir mettre en évidence des marqueurs IR de la coordination ou de l'état de spin du fer, il faut pouvoir caractériser de façon précise les propriétés électroniques de l'hème du complexe considéré.

I.5 Objectifs de la thèse

La CcO catalyse une réaction complexe, la réduction moléculaire de l'oxygène en eau, et physiologiquement essentielle car cette réaction permet la production de l'ATP en grosses quantités, source universelle d'énergie cellulaire. Malgré le grand nombre d'études réalisées au sujet du mécanisme de la réduction du dioxygène en eau par la CcO, celui-ci présente encore de nombreuses zones d'incertitude. En particulier, le couplage du transfert d'électrons et de protons, le rôle du Cu_B et l'état de protonation de certains acides aminés impliqués dans le mécanisme réactionnel restent largement méconnus et des hypothèses contradictoires ont été proposées dans les différentes études publiées. Dans le but de mieux comprendre les relations structure-fonction qui régissent la réactivité de la cytochrome *c* oxydase, mon travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des intermédiaires de cette métalloprotéine et de ses modèles biomimétiques par spectroscopies infrarouge, UV-Vis et de fluorescence résolue en temps.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons essayé de développer l'approche par spectroscopie IR différentielle couplée à une cellule de perfusion d'abord dans l'IR moyen

puis dans un domaine spectral peu exploré par cette technique : le domaine de l'IR lointain, où sont prévus les modes de vibration impliquant les interactions métal-ligands. L'application de cette technique à l'étude de la CcO dans le domaine des basses fréquences permettrait de découvrir des modes de vibration traduisant les propriétés et la structure du centre binucléaire des différents intermédiaires du cycle catalytique. Ainsi, l'analyse des modifications structurales liées au changement de l'état d'oxydoréduction du Cu_B pourrait apporter une meilleure connaissance de la nature des espèces impliquées dans la réduction de l'oxygène par la CcO.

Il a été proposé que les résidus Tyr 280 et/ou Tyr 167, ainsi que le Trp 272 peuvent être impliqués dans le transfert électronique au cours du mécanisme réactionnel de la CcO. Un des objectifs de ce travail est de déterminer les sites de formation des radicaux (Tyr[•] et/ou Trp^{•+}), ainsi que de mieux évaluer leur rôle au cours du cycle catalytique. Pour cela, nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps pour analyser la contribution des résidus tyrosine et tryptophane.

Dans l'objectif de discerner dans l'infrarouge moyen et lointain les bandes provenant de la porphyrine de celle de la chaîne polypeptidique, à mettre en évidence des marqueurs de l'état d'oxydation et de l'état de spin du fer ainsi que les modes de vibration impliquant le métal et ses ligands, nous avons en parallèle caractérisé les propriétés vibrationnelles des modèles synthétiques de la CcO. Ces modèles, synthétisés par les équipes du Dr J. Weiss (la porphyrine à anse phénanthroline) et du Dr B. Boitrel (les porphyrines « à poche » ou « Capped porphyrins »), conservent l'hème, la coordination fer-histidine du site proximal et le ligand complexant le cuivre du site distal de la CcO. Ils se différencient notamment par leur environnement autour de l'atome de cuivre et par leur rigidité.

Afin de mieux comprendre la nature des modifications que les modèles synthétiques de la CcO sont capables d'induire au niveau de la partie distale de la porphyrine du fer et de comprendre comment ces modifications, en particulier le rôle du cuivre, peuvent être responsables des différences de réactivité observées entre ces analogues, nous avons réalisé l'étude des interactions entre la partie distale et la porphyrine en utilisant le complexe Fe^{II}-CO comme sonde de la partie distale des modèles synthétiques de la CcO étudiés. La compréhension des processus de transfert du monoxyde de carbone au sein des modèles synthétiques, autre sujet étudié dans cette thèse, est donc un point clé de l'élucidation du mécanisme de réduction de l'oxygène par la CcO. L'étude de la réactivité de ces modèles vis-à-vis de l'oxygène a été également entreprise dans ce travail.

Dans la suite, nous présenterons les propriétés structurales et électroniques de l'hème, puis les techniques spectroscopiques utilisées dans ce travail de thèse.

I.6 Généralités sur les porphyrines

Les propriétés structurales et physico-chimiques des porphyrines ont fait l'objet de très nombreuses études.¹³⁹ Nous allons rappeler brièvement quelques propriétés importantes des porphyrines.

I.6.1 Structure de base et nomenclature

Une porphyrine est constituée de quatre unités pyrroliques reliées entre elles par quatre ponts méthènes. C'est un système aromatique de 22 électrons π dont 18 d'entre eux sont impliqués dans l'aromaticité conformément à la règle de Hückel (Figure 31). Cette forte conjugaison confère aux porphyrines une grande stabilité ainsi qu'une forte absorption dans le visible.

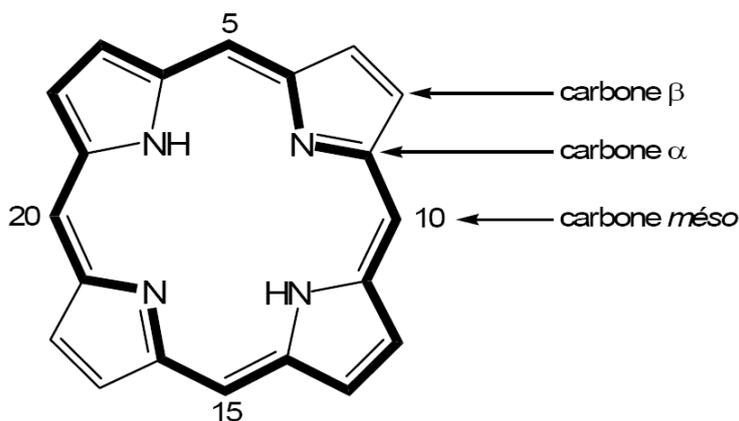


Figure 31 : Mise en évidence du système π à 18 électrons et nomenclature IUPAC des carbones caractéristiques.¹⁴⁰

La fonctionnalisation des positions périphériques du macrocycle, les positions β pyrroliques et *méso*, permet notamment de moduler les propriétés électroniques de celui-ci. De plus en fonction du pH, les porphyrines se comportent comme des diacides ou des dibases et peuvent former des complexes avec presque tous les métaux du tableau de la classification périodique. Les porphyrines métallées sont appelés métalloporphyrines et porphyrines bases libres dans le cas contraire.

I.6.2 Géométrie du cycle porphyrinique

Malgré le système aromatique et les échanges tautomériques, le macrocycle porphyrinique est relativement flexible et peut adopter dans certains cas des conformations non planes. La substitution par des groupements volumineux en position méso et/ou en β , la métallation, la protonation des deux azotes, ou la présence de ligands axiaux, sont autant de facteurs qui peuvent entraîner la distorsion du macrocycle porphyrinique. Des études structurales en phase solide ont mis en évidence l'existence de différentes conformations possibles pour ce macrocycle (Figure 32).¹⁴¹

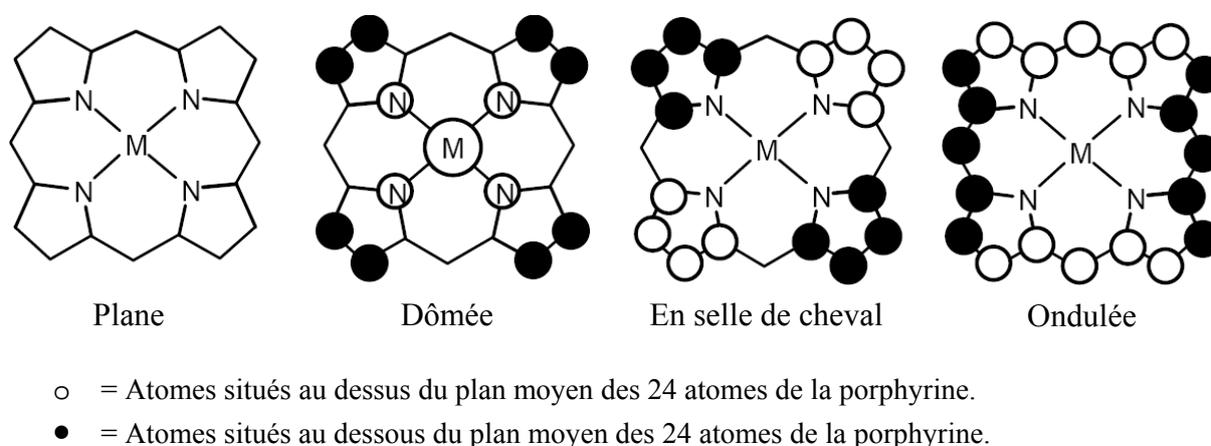


Figure 32 : conformations possibles du cycle porphyrinique.¹⁰⁴

I.6.3 Configuration électronique de l'hème

Tout comme les complexes de Fe(III), les porphyrines de Fe(II) existent dans différents états de spin, déterminés par le champ de ligand au voisinage du métal. Il existe 5 orbitales 3d, chacune d'entre elles capable d'accueillir 2 électrons. La distribution des électrons au sein de ces orbitales déterminera les propriétés électroniques du fer.

La sphère de coordination des porphyrines de Fe (II) peut être plan carré (absence de ligand axial : fer tétracoordiné), pyramide à base carrée (un ligand axial : fer pentacoordiné) ou octaédrique (deux ligands axiaux : fer hexacoordiné) (Figure 33).

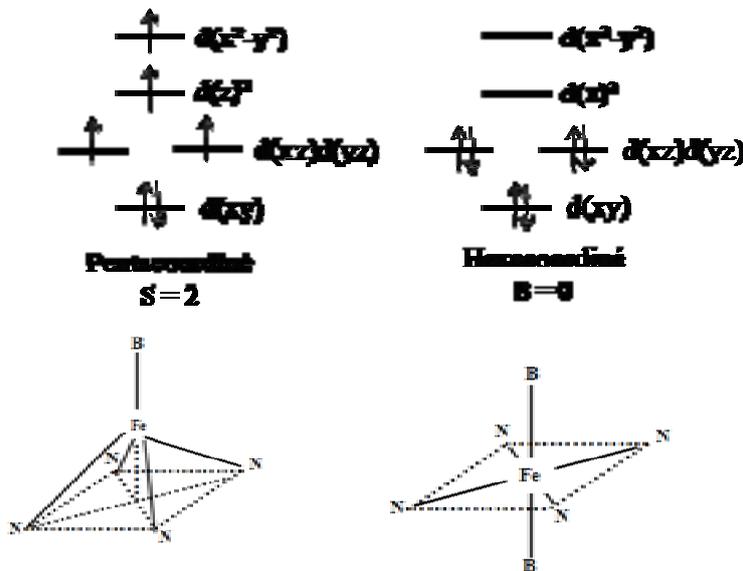


Figure 33 : Etats de spin d'une porphyrine de fer(II), B est un ligand à champ faible.

Les complexes tétracoordinés, obtenus par réduction des hémimes ($P(Fe^{III})^+$) en milieu non coordinant, constituent des intermédiaires incontournables vers la synthèse des complexes diamagnétiques. Ils sont connus pour être généralement de spin intermédiaire^{142,143} ($S = 1$) avec deux électrons non appariés dans les orbitales $d(xy)$ et $d(yz)$. L'ion ferreux est parfaitement dans le plan de la porphyrine. Les complexes pentacoordinés obtenus par l'occupation d'un des sites axiaux du fer sont généralement de haut spin ($S = 2$). Du fait de l'occupation partielle des orbitales $d(x^2-y^2)$ et $d(z^2)$, les distances fer-ligand sont augmentées et les liaisons sont plus faibles. De ce fait, mais également afin de minimiser les interactions d'ordre stérique, l'ion ferreux se retrouve en dehors du plan moyen de la porphyrine, du côté du ligand axial. Quelques complexes pentacoordinés obtenus de spin faible sont cependant connus, ils sont observés dans le cas de l'occupation du site axial par un ligand à champ fort (CO, NO...). Les complexes hexacoordinés possèdent pour la plupart un état de spin ($S = 0$) et forment des dérivés ferreux diamagnétiques thermodynamiquement et cinétiquement stables.

L'activité de la cytochrome *c* oxydase et la nature des réactions qu'elle catalyse sont donc fortement liées aux propriétés des sites métalliques. Pour comprendre le rôle du Fer et/ou du Cuivre dans le contrôle de la réactivité de cette métalloprotéine, il est important de connaître la structure du site actif (géométrie, nature des ligands, structure électronique du métal, force de la liaison métal-ligand...) et déterminer comment celle-ci évolue lors du mécanisme catalytique. Ces informations peuvent être fournies par l'analyse spectroscopique des sites métalliques. La partie suivante va nous permettre de présenter les moyens spectroscopiques à notre disposition pour l'étude de la cytochrome *c* oxydase et ses modèles.

I.7 Techniques spectroscopiques

La spectroscopie met à profit l'interaction molécules-radiations électromagnétiques. L'énergie d'une molécule résulte de quatre contributions : l'énergie des électrons (E_e), l'énergie de translation (E_t), l'énergie de vibration (E_v) et l'énergie de rotation (E_r). Ces énergies sont quantifiées. Une onde électromagnétique est constituée de photons, d'énergie $E = h\nu$, qui se propagent dans une direction donnée, à la vitesse de la lumière. Une absorption de la radiation par la molécule n'est possible que si l'énergie de la radiation coïncide avec la différence d'énergie entre les niveaux quantifiés de la molécule (ΔE). Ainsi, par action d'une radiation lumineuse, il est possible de faire passer une molécule d'un état d'énergie E_1 vers un état d'énergie supérieur E_2 .

Les ondes électromagnétiques sont des variations périodiques du champ électrique et du champ magnétique. Elles peuvent être classées en fonction de leur énergie, de leur fréquence ou de leur longueur d'onde ce qui donne lieu à différents types d'ondes présentées sur la Figure 34, avec leurs effets mentionnés sur les molécules. Si le rayonnement incident est de forte énergie (visible et proche ultra-violet), le spectre obtenu est en général complexe en raison de la superposition de transitions de vibration et de rotation. Si le rayonnement incident est dans l'infrarouge, les énergies mises en jeu sont principalement des énergies de vibration (infrarouge proche) et de rotation (infrarouge lointain).

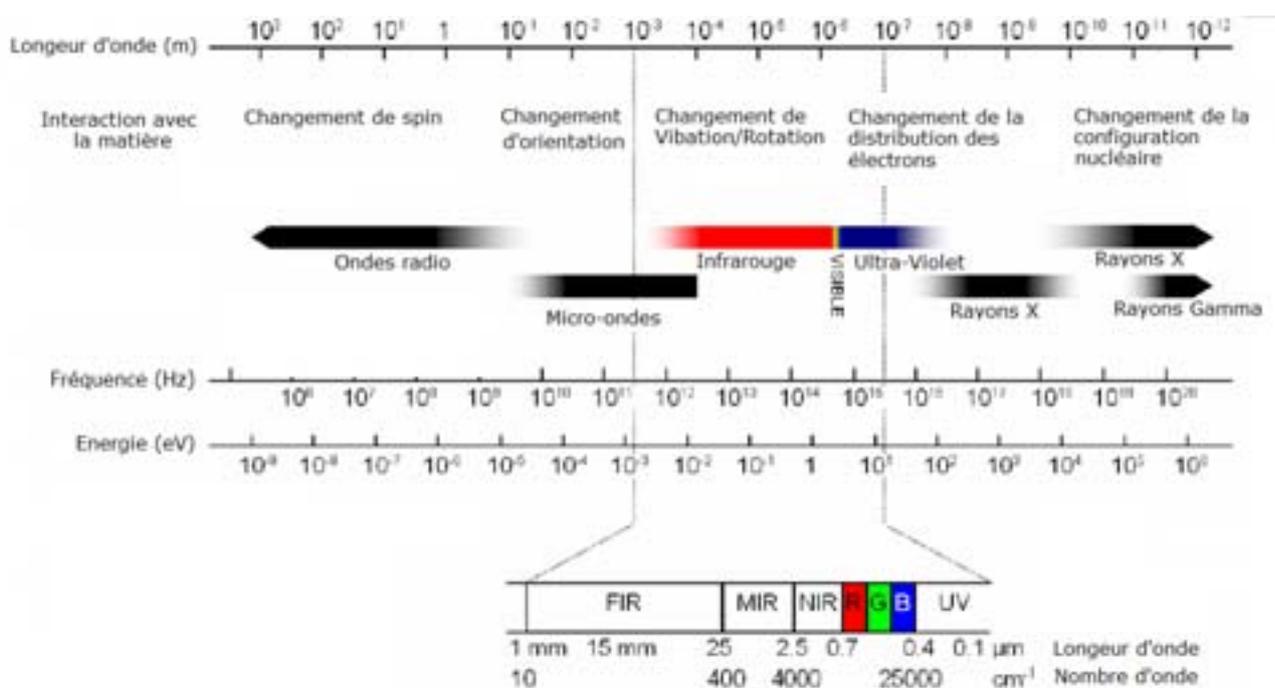


Figure 34 : Spectre électromagnétique montrant le domaine infrarouge qui regroupe les longueurs d'ondes comprises entre 14000 cm^{-1} et 10 cm^{-1} .

I.7.1 Spectroscopie UV-visible

L'absorption des radiations UV par une molécule, entraîne des transitions électroniques. Il s'ensuit qu'au cours de ces transitions, une modification de la configuration électronique de la molécule est observée. La spectroscopie UV-visible mesure les transitions entre les différents états électroniques occupés par les molécules.

En raison de leur structure électronique conjuguée, les porphyrines font preuve d'une forte coloration. Elles absorbent dans le domaine du visible et du proche UV et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Celui-ci résulte de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et se compose d'une bande intense entre 390-430 nm (proche UV), la bande de Soret (ou bande B) et de quatre autres bandes de plus faible intensité situées entre 480-700 nm (visible), les bandes Q. La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible, aux variations de structures, renseigne sur la substitution du macrocycle. En effet, les quatre bandes Q numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives et leur positionnement varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants¹⁴⁴, du métal (son degré d'oxydation), des ligands additionnels sur ce dernier et du solvant. Le nombre de bandes Q permet généralement de distinguer les porphyrines bases libres des métallo-porphyrines. Les bases libres présentent généralement quatre bandes Q alors que les métalloporphyrines, à la symétrie plus grande, n'en ont que deux en général (α et β).

Ces bandes d'absorption peuvent être expliquées en faisant appel au modèle à quatre orbitales développé par Gouterman en 1961.¹⁴⁵ Ces orbitales frontières sont constituées par deux orbitales LUMO (e_{gx} et e_{gy}) et deux orbitales HOMO (a_{1u} et a_{2u}). La bande de Soret correspond à une transition d'un électron de l'orbitale a_{1u} vers les orbitales e_g , alors que les bandes Q correspondent à une transition d'un électron de l'orbitale a_{2u} vers les orbitales e_g .

Dans le cas d'une porphyrine de symétrie D_{4h} , les deux bandes Q observées correspondent aux deux transitions vibrationnelles 0-0 et 0-1. Dans le cas d'une porphyrine moins symétrique où les deux axes x et y ne sont plus équivalents, chaque bande Q est dédoublée en deux bandes Q_x et Q_y .

L'ordre énergétique de ces orbitales dépend des substitutions des positions méso ou β -pyrroliques de la porphyrine. Par exemple lorsque la métalloporphyrine est symétrique (symétrie D_{4h}), les deux LUMO e_{gx} et e_{gy} sont dégénérées, et lorsqu'elle est substituée en

position meso par des groupes phényles ou alkyles, la HOMO a_{2u} est généralement plus haute en énergie que l'orbitale a_{1u} .

Le spectre UV-visible de la cytochrome *c* oxydase est constitué essentiellement des contributions des hèmes *a* et a_3 , et il est caractérisé par deux bandes d'absorption : la bande de Soret vers 427 nm et la bande α vers 600 nm.¹⁴⁶ Ces bandes correspondent à des transitions électroniques π - π^* du système aromatique des hèmes *a* et a_3 . Elles suivent la loi de Beer-Lambert et sont sensibles à la fois à l'état de spin du fer et à son degré d'oxydation.

I.7.2 Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est basée sur la mesure des caractéristiques de fluorescence d'une molécule après excitation par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet.¹⁴⁷

Du fait de la haute sensibilité des propriétés de fluorescence au milieu chimique et physique de la molécule ainsi qu'aux interactions avec le proche environnement, la spectroscopie de fluorescence est devenue un moyen d'étude très précieux des systèmes biologiques et chimiques. Elle est utilisée comme outil de caractérisation ou comme sonde locale apportant ainsi des informations sur la dynamique moléculaire, tels que le transfert de charge, le transfert d'énergie et la dynamique de solvation. Les paramètres les plus souvent utilisés sont : les spectres d'émission et d'excitation, l'efficacité de fluorescence (rendement quantique) et le temps de vie de fluorescence. En outre, le spectre d'absorption de la molécule est fondamental puisqu'il détermine ses conditions d'excitation, notamment la longueur d'onde. Dans le paragraphe suivant, nous présenterons un bref descriptif de ces notions.^{148,149}

7.2.1 Diagramme d'énergie et spectre de fluorescence

Les transitions entre les différents niveaux d'énergie électronique (états fondamentaux et excités) et de la sous-structure vibrationnelle propre à chaque état électronique d'un fluorophore peuvent être décrites à partir du diagramme de Jablonski (Figure 35).

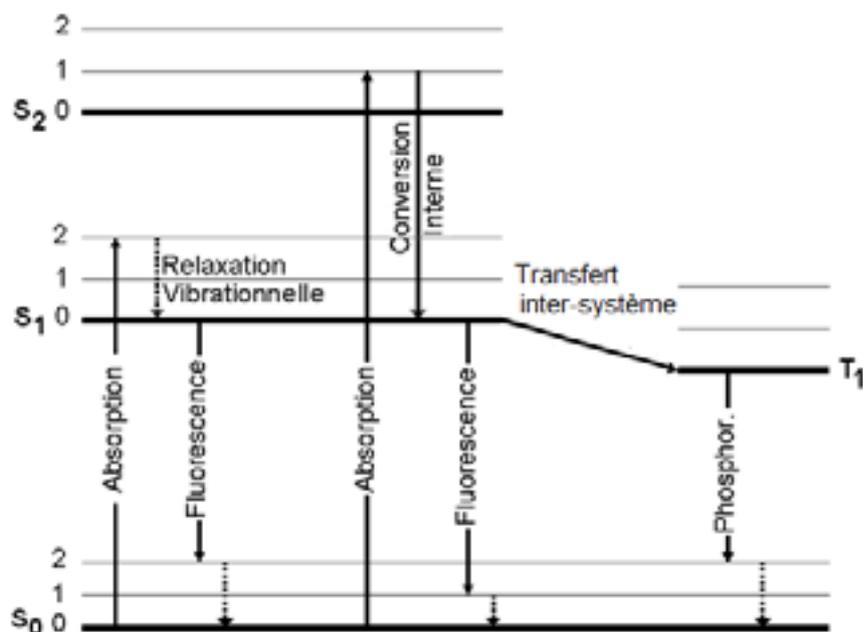


Figure 35 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les phénomènes photophysiques possibles dans un état excité.

Lorsqu'un photon incident est absorbé par la molécule, elle est portée dans l'un des niveaux d'énergie électronique et vibrationnellement excité tel S_1 ou S_2 , puis assez rapidement (10^{12} - 10^{13} s $^{-1}$) la molécule est conduite vers le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité S_1 . Les processus responsables de cette transition peuvent être intramoléculaires, comme la relaxation électronique et/ou vibrationnelle, le transfert de charge et surtout le changement conformationnel. Ils peuvent également être intermoléculaires comme la dynamique de solvation et la formation ou la rupture de liaisons hydrogène. Cette transition, dite conversion interne ou relaxation vibrationnelle, est un processus non radiatif. A la suite de ces différentes relaxations, la molécule est conduite vers un niveau vibrationnel de l'état fondamental en émettant les photons de fluorescence. Cette émission de lumière résulte de transitions radiatives (Figure 35) et génère donc un spectre de fluorescence. Compte tenu de la perte d'énergie lors de la conversion interne et des relaxations vibrationnelles qui suivent l'absorption d'un photon, la longueur d'onde du photon de fluorescence est typiquement moins énergétique, et donc plus grande que celle de la lumière excitante. Le spectre de fluorescence correspond donc à une gamme de longueurs d'ondes plus élevée que celle du spectre d'absorption. Ce décalage vers le rouge peut être quantifié par l'écart entre la position de la première bande d'absorption et celle du spectre de fluorescence, appelé déplacement de Stokes. Il représente l'énergie qui est perdue pendant l'excitation et la désexcitation de la molécule.

L'allure et la position du spectre d'émission sont sensibles aux propriétés du milieu environnant du fait de la perturbation des niveaux d'énergie du fluorophore par les interactions dipolaires et électrostatiques existant entre les molécules de solvant et le fluorophore. En général, ces interactions augmentent avec la polarité du solvant, elles déplacent les spectres d'absorption et d'émission vers les grandes longueurs d'onde et élargissent les bandes vibrationnelles.

Plusieurs phénomènes peuvent entrer en compétition avec l'émission de fluorescence : la conversion interne entre l'état S_1 et l'état S_0 ou désactivation par collision des molécules, les transferts intersystèmes entre l'état S_1 et l'état triplet T_1 et la photo-décomposition des molécules fluorescentes. Ces processus non radiatifs sont souvent nommés processus de désactivation de la fluorescence (en anglais on parle de *quenching*) et sont conditionnés par de nombreux facteurs comme la température, les effets des substituants et du solvant. En plus, selon la molécule et l'environnement physicochimique, un autre processus de désexcitation visible peut aussi avoir lieu. Ce phénomène, désigné par la phosphorescence, est observé lorsque l'émission d'un photon provient d'une molécule excitée qui se trouve dans un état triplet et non dans un état singulet comme pour la fluorescence.

7.2.2 Rendement quantique et temps de vie de fluorescence

Le rendement quantique rend compte de la compétition entre les processus de désexcitation radiatifs et non radiatifs, toutes les molécules excitées n'émettent pas de photons de fluorescence. En d'autres termes, le rendement quantique représente la probabilité pour qu'un fluorophore excité émette un photon. Il est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbé. Puisqu'un seul photon absorbé ne peut causer l'émission que d'un seul photon, le rendement quantique est toujours inférieur ou égal à 1. Le rendement quantique varie selon les facteurs environnementaux comme le pH, la concentration ou la polarité du solvant.

La durée de vie de fluorescence constitue une des caractéristiques les plus importantes de la fluorescence. Elle caractérise le temps pendant lequel une molécule reste à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Les durées de vie de fluorescence dépendent, très souvent de manière spécifique, de la molécule émissive et de toute modification de son environnement immédiat. Elles sont donc considérées comme une source riche d'information sur les processus moléculaires. Les durées de vie peuvent, par exemple, servir à étudier les

interactions de deux protéines, à mesurer des distances intramoléculaires ou à analyser le changement conformationnel d'une molécule.

Le déclin de fluorescence $I(t)$ décrit l'évolution temporelle de la concentration de molécules fluorescentes dans l'état excité depuis le moment d'excitation. En général, le déclin de fluorescence d'une molécule est exponentiel, d'expression :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Où I_0 est une constante réelle et τ est le temps de vie de fluorescence.

Deux types de méthode permettant la mesure et l'étude de la fluorescence sont disponibles. La spectrofluorimétrie stationnaire repose sur la mesure de l'intensité de la fluorescence et des longueurs d'onde d'émission en utilisant une source lumineuse continue.¹⁵⁰ La fluorimétrie résolue en temps vise plutôt à déterminer les durées de vie de fluorescence en mesurant l'évolution temporelle de la lumière émise par un système moléculaire après une photo-excitation brève.¹⁵¹ En général, des techniques résolues en temps apportent beaucoup plus d'informations sur les processus intra- et intermoléculaires que la spectrofluorimétrie stationnaire.

7.2.3 Fluorescence intrinsèque des protéines

La technique de fluorescence résolue en temps, utilisant la fluorescence intrinsèque des protéines, permet d'obtenir différentes informations dynamiques à des échelles de temps allant d'une dizaine de picosecondes à quelques nanosecondes. La fluorescence intrinsèque des protéines est due majoritairement aux trois acides aminés possédant un noyau aromatique. Ces noyaux confèrent aux résidus tryptophane, tyrosine et phénylalanine la propriété d'absorber dans l'UV et de réémettre des photons de fluorescence (Tableau 4).

Acide aminé	Absorption		Fluorescence		
	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\varepsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	ϕ	$\tau_{\text{moy}}(\text{ns})$
Trp(W)	280	5600	348	0.2	2.6
Tyr(Y)	274	1400	303	0.14	3.6
Phe(F)	257	200	282	0.04	6.4

Tableau 4 : Données spectrales des acides aminés fluorescents en solution.^{152,153}

Bien que Les résidus tyrosines sont généralement plus nombreux dans une telle protéine, ils sont souvent éteints (*quenching*) par la proximité des tryptophanes. Les phénylalanines, quant à elles, ont un rendement quantique extrêmement faible qui rend les mesures de fluorescence difficiles. En raison de la grande différence de leur rendement quantique et de leur durée de vie de fluorescence, ainsi que de leur transfert d'énergie, la fluorescence de la plupart des protéines est celle déterminée par les résidus tryptophane. Les tryptophanes se caractérisent par un pic d'absorbance à 280 nm et un pic d'émission de fluorescence allant de 300 à 350 nm en fonction de la polarité de l'environnement local. Son intensité de fluorescence, son rendement quantique et sa longueur d'onde d'émission sont fortement influencés par la nature du solvant utilisé. Plus le solvant environnant les résidus tryptophane est polaire plus l'intensité de fluorescence est importante et la longueur d'onde d'émission est déplacée vers le rouge. Plus les résidus tryptophane sont enfouis dans un milieu hydrophobe de la protéine plus la longueur d'onde d'émission est déplacée vers le bleu. Plus les résidus tryptophane sont exposés au solvant plus la longueur d'onde d'émission est déplacée vers le rouge. Par conséquent, cette forte sensibilité est à l'origine du rôle de sonde intrinsèque que peut jouer la fluorescence du tryptophane apportant ainsi des informations sur la nature du micro-environnement et la dynamique moléculaire de ce résidu.¹⁵⁴

Dans une protéine contenant plusieurs tryptophanes, l'analyse des durées de vie de fluorescence se complique d'avantage. La difficulté d'expliquer et d'interpréter un déclin de fluorescence d'une protéine est souvent liée à l'hétérogénéité de la cinétique de l'état excité du résidu tryptophane. Les déclins de fluorescence observés sont généralement multi-exponentiels même pour des protéines ne contenant qu'un seul tryptophane.¹⁵⁵ Ce comportement des tryptophanes peut être expliqué par les propriétés du groupe indole. Le spectre d'absorption de l'indole dans l'UV proche présente une bande large et structurée, correspondant à deux transitions : $^1A \rightarrow ^1L_a$ et $^1A \rightarrow ^1L_b$ où 1L_a et 1L_b sont les deux états électroniques excités de plus basse énergie et 1A indique l'état singulet fondamental.¹⁵⁶ Les deux états excités sont caractérisés par des énergies très proches mais leurs dipôles de transition sont perpendiculaires. Un transfert d'énergie entre ces deux transitions peut expliquer l'hétérogénéité des durées de vie observées pour le tryptophane.¹⁵⁷ En dehors de ces propriétés photophysiques complexes, la réorientation du solvant et la présence de groupes chimiques appartenant à la protéine, au voisinage du fluorophore excité, peuvent également expliquer la multiplicité des durées de vie.¹⁵⁸ L'existence pour ce résidu de trois rotamères a été établie ; la multiplicité des états fondamentaux due à chacun de ces rotamères pourrait, de nouveau expliquer les durées de vie multiples observées.¹⁵⁸

I.7.3 Spectroscopie d'absorption infrarouge

La spectroscopie d'absorption infrarouge est l'une des méthodes spectroscopiques de détection et d'analyse les plus sensibles et les plus fiables, avec plusieurs domaines d'application, notamment en biologie. Elle permet via une observation directe des fréquences caractéristiques des modes de vibration d'une molécule, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans la molécule.

7.3.1 Principe

L'absorption d'un rayonnement infrarouge provoque une excitation des transitions vibrationnelles des molécules. La transition entre deux états d'un mode de vibration peut se produire uniquement si ce mode induit un changement dans le moment dipolaire de la molécule et donc l'interaction entre le dipôle et le champ électrique de l'onde électromagnétique. En conséquence, seules les vibrations impliquant une variation du moment dipolaire sont actives en infrarouge.

Le spectre infrarouge est la représentation graphique de l'intensité de la lumière absorbée en fonction de la fréquence (ou du nombre d'onde exprimé en cm^{-1}) de l'onde incidente. Le domaine spectral de l'infrarouge est subdivisé en proche, moyen et lointain infrarouge (Figure I.34). Le proche infrarouge s'étendant de 14000 à 4000 cm^{-1} est le plus énergétique et permet d'exciter les vibrations harmoniques. L'infrarouge moyen, s'étend de 4000 à 400 cm^{-1} et met en évidence les modes de vibration des chaînes latérales d'acides aminés ainsi que des modes IR pouvant être reliés à la structure secondaire des métalloprotéines. L'infrarouge lointain, allant de 400 à 10 cm^{-1} , a une énergie faible et permet d'étudier la structure rotationnelle des molécules, ainsi que des modes de vibration impliquant directement le métal et ses ligands.

7.3.2 Aspects théoriques

Modes normaux de vibration

Une molécule lorsqu'elle reçoit suffisamment d'énergie peut se déplacer, tourner selon des axes de rotation bien particuliers et vibrer. Les mouvements élémentaires pour lesquels tous les atomes se déplacent simultanément et sans modifier la position du centre de gravité de la molécule prennent le nom de modes normaux de vibration. Une molécule polyatomique, comportant n atomes, possède $3n-6$ modes normaux de vibrations et $3n-5$ lorsqu'elle est linéaire. Les vibrations peuvent être classées en deux catégories : dans le plan et hors du plan.

Dans le plan : on distingue l'élongation (ν) et la déformation angulaire (δ) qui peuvent être soit symétrique (δ_s et ν_s), soit antisymétrique (δ_{as} et ν_{as}). Les déformations angulaires symétriques et antisymétriques correspondent à des mouvements de cisaillement ou de rotation de trois atomes formant l'angle θ (Tableau 5).

Hors du plan : Il s'agit des déformations angulaires hors d'un plan moléculaire qui peuvent induire un mouvement collectif de la molécule correspondant à des mouvements de torsion (τ) ou de balancement (γ).

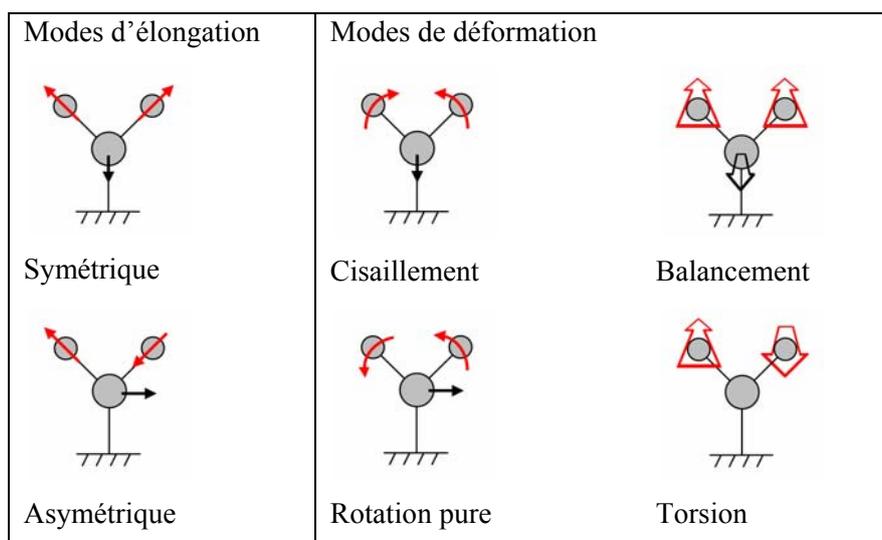


Tableau 5 : Mouvements associés aux modes normaux de vibration d'une molécule contenant 3 atomes.

Modèle de l'oscillateur harmonique

En première approximation, un mode normal de vibration peut être décrit comme un oscillateur harmonique, dans lequel deux masses réunies par un ressort représentent de manière satisfaisante une liaison covalente. Dans le cas d'une molécule diatomique, par exemple, la fréquence de vibration d'un tel oscillateur dépend de la masse des atomes et de la force de la liaison par l'intermédiaire de la valeur de sa constante de raideur k . Si l'oscillateur est harmonique, c'est-à-dire que l'élongation est proportionnelle à la force exercée, alors son énergie est quantifiée et la fréquence ν de la vibration, donnée par la loi de Hooke, est :

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad \text{avec } n \in \mathbb{N} \quad \nu = \frac{1}{2\pi C} \sqrt{\frac{k(m_1+m_2)}{(m_1 \times m_2)}}$$

Cette équation permet de calculer la position approximative d'une bande fondamentale lorsque les valeurs de la constante de force k et les masses de deux atomes sont connus. Elle

permet également de donner une approximation du déplacement d'une bande lors de la substitution d'un atome par un de ses isotopes.

Pour l'oscillateur harmonique, la courbe représentative de l'énergie potentielle en fonction de la distance internucléaire (r) est une parabole avec un minimum nul pour $r = r_e$ (Figure 36).

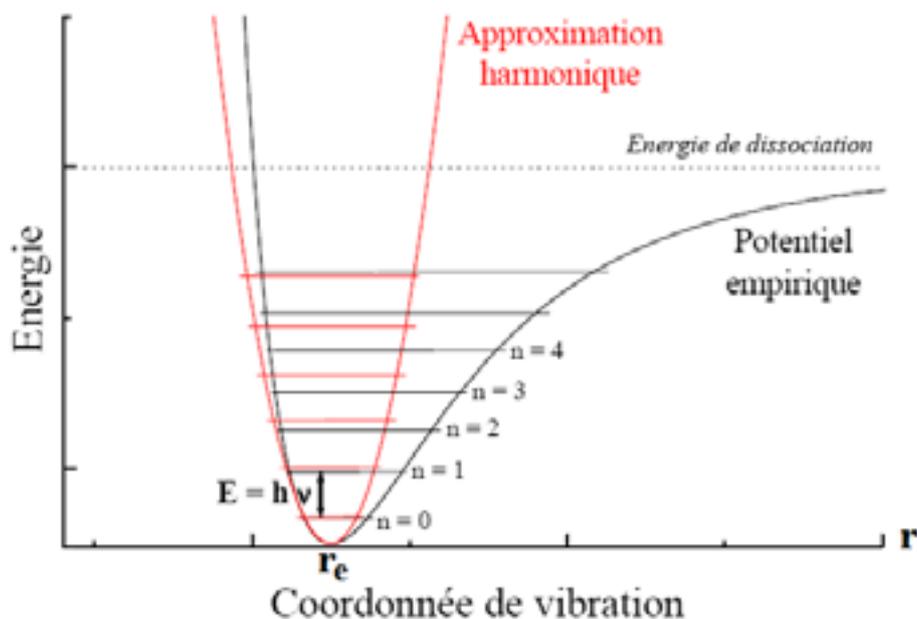


Figure 36 : Courbe de potentiel harmonique et anharmonique d'une molécule.¹⁵⁹

La différence d'énergie entre deux niveaux vibrationnels adjacents est constante et la règle de sélection pour une transition vibrationnelle $\Delta v = \pm 1$ montre que toutes les transitions possibles ont lieu à une même fréquence.

En réalité, la représentation du spectre infrarouge des molécules montre l'existence de nombreuses bandes qui ne sont pas espacées entre elles d'une manière égale mais qui décroissent lentement. Ces observations indiquent que la vibration n'est pas strictement harmonique puisque la force exercée par l'oscillateur n'est plus uniquement proportionnelle au déplacement. Une conséquence de l'anharmonicité de l'oscillateur est que les niveaux vibrationnels ne sont pas tout à fait équidistants (puisque les niveaux se resserrent quand l'énergie augmente). Elle a aussi pour conséquence de provoquer l'apparition de bandes harmoniques, dont la fréquence est un multiple entier de la fréquence de la vibration fondamentale et leur intensité est plus faible par rapport à celle des bandes de valence. Une autre conséquence de l'anharmonicité est l'apparition de bandes de combinaison qui résultent d'un couplage de deux vibrations de fréquences ν_1 et ν_2 en une vibration de fréquence somme ou différence.

7.3.3 Analyse de spectres IR

L'analyse d'un spectre IR le plus souvent réalisé en solution ou à l'état solide fait apparaître qu'un certain nombre de facteurs influencent les fréquences de vibration ainsi que leurs intensités.

L'intensité des bandes dépend de la nature et de la polarité de la liaison. La fréquence de vibration, quant à elle dépend des atomes constituant la liaison, de la multiplicité de la liaison et de son environnement. D'une manière générale, Les liaisons entre atomes légers vibrent à plus haute fréquence que les liaisons entre atomes plus lourds. Plus la constante k est importante et plus la fréquence de vibration est élevée. L'environnement de la liaison peut avoir une incidence électronique ou mécanique sur la vibration de cette fréquence. Nous allons citer quelques exemples :

Effets électriques : Les effets d'électronégativité et de conjugaison peuvent entraîner des déplacements importants des fréquences de vibration.

Liaison hydrogène : Pour certaines fonctions telles que $-OH$, $-NH$, SH , il y a possibilité de formation de liaison hydrogène lorsque ces dernières perçoivent dans leur voisinage moléculaire la présence d'un atome électronégatif. Ceci se traduit par un allongement de la liaison $X-H$ et donc un affaiblissement de sa constante de force.

Effets stériques : La fréquence d'une vibration dépend des contraintes stériques associées à ce vibreur. La vibration $\nu(C=O)$ apparaît à une fréquence d'autant plus haute que l'angle de valence COC est petit.

Couplage mécanique : Lorsque dans une molécule des vibreurs de même nature se trouvent au voisinage l'un de l'autre, en ayant un atome en commun par exemple, ils ne vibrent pas indépendamment l'un de l'autre. Il en résulte que les fréquences sont affectées par rapport à celles généralement observées. Ce phénomène est dû à l'existence d'un couplage mécanique.

La spectroscopie infrarouge a pendant longtemps été limitée du fait de la lenteur d'acquisition des spectres et de la médiocre sensibilité des spectromètres du moyen infrarouge. Le premier dispositif utilisé pour déterminer les fréquences de vibration se repose sur des mesures successives du rapport entre l'intensité de la lumière transmise et celle de la lumière incidente pour chaque longueur d'onde par un monochromateur dispersif (prisme ou réseau). Ce dispositif est actuellement abandonné.

Grâce à l'avènement de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), le temps d'acquisition pour obtenir un spectre complet devient faible, et donc la sensibilité de la détection des fréquences de vibration devient plus importante. Ce deuxième dispositif consiste à envoyer sur l'échantillon une lumière infrarouge incidente à travers d'un interféromètre, ce qui permet de mesurer toutes les longueurs d'onde simultanément en accélérant considérablement le temps d'acquisition nécessaire à l'établissement de l'interférogramme. L'application, ensuite, de la transformée de Fourier permet la résolution rapide en temps réel de l'interférogramme et donne directement le spectre final de l'échantillon. L'interférométrie, basée sur la génération d'interférences constructives et destructives, via un interféromètre de Michelson, permet de calculer précisément l'intensité de chacune de longueur d'onde du rayonnement par l'application de la transformée de Fourier. (Le principe de cette technique est présenté dans l'annexe 3).

7.3.4 Spectroscopie ATR-IRTF

La technique ATR-FTIR (Attenuated Total Reflexion-Fourier Transformed Infrared) est très utilisée en tant qu'outil de caractérisation d'échantillons biologiques de nature variée. Elle présente les avantages de suivre les changements chimiques ayant lieu au niveau de l'interface cristal/solution, sur une épaisseur d'environ 1 μm , de manière non destructive et en temps réel et ne nécessite pas une grande quantité d'échantillon (1-2 μL).

Principe

Le principe de l'ATR consiste à faire subir au faisceau IR une ou plusieurs réflexions à l'interface entre un matériau transparent dans l'IR, d'indice de réfraction élevé, et l'échantillon en contact intime avec le cristal. Pour un angle d'incidence supérieur à un angle critique ($\sin \theta_c = n_2/n_1$; n_1 étant l'indice du support et n_2 celui de l'échantillon étudié), le faisceau subit une réflexion totale à l'interface.¹⁶⁰

À chaque réflexion, une onde évanescente est générée au niveau de l'échantillon au contact du cristal. Elle pénètre faiblement dans l'échantillon à une profondeur qui dépend de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon et de l'angle de l'incidence. Il se produit ainsi la réflexion interne. Le principe de la spectroscopie ATR est présenté à la Figure 37.

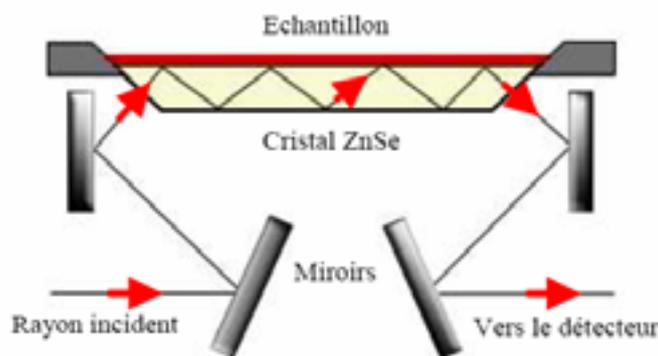


Figure 37 : schéma du principe de l'accessoire ATR diamant.¹⁵⁹ L'accessoire ATR diamant est en réalité constitué de deux cristaux joints ayant le même indice de réfraction (l'un en ZnSe et l'autre en diamant). Le faisceau IR incident pénètre successivement à l'intérieur du ZnSe, puis à l'intérieur du diamant. Le faisceau réfléchi repasse ensuite dans ZnSe pour arriver au détecteur du spectromètre.

Les conditions de continuité du champ électrique vont cependant imposer la décroissance exponentielle de l'amplitude de l'onde évanescente. La profondeur de pénétration (dp) pour laquelle l'amplitude du champ électrique subit une atténuation de $1/e$ est donnée par la relation suivante¹⁶¹ :

$$dp = \frac{\lambda/n_1}{\sqrt{2\pi(\sin^2\theta - (\frac{n_2}{n_1})^2)}}$$

λ = longueur d'onde considérée,

θ = angle d'incidence du faisceau IR,

n_1 = indice de réfraction du cristal

n_2 = indice de réfraction de l'échantillon.

En appliquant cette relation à une longueur d'onde ($\lambda = 10^{-5}$ m) pour des cristaux ATR de ZnSe et de diamant d'indice de réfraction ($n_1 \sim 2,417$) avec un angle d'incidence de 45° , et en considérant un indice de réfraction ($n_2 \sim 1,33$) pour l'eau, on obtient une amplitude de pénétration de $1.6 \mu\text{m}$. Le faisceau IR subira, dans ce cas, 6 à 8 réflexions internes, soit une profondeur de pénétration cumulée à l'intérieur de l'échantillon d'environ $10 \mu\text{m}$.

Spectroscopie ATR-IRTF en mode différentiel

Le spectre d'absorption IR d'une protéine en solution est dominé par les contributions de l'eau et des fonctions amides provenant des liaisons peptidiques.¹⁶²⁻¹⁶⁴ À l'opposé, le spectre IR de différence, quant à lui, permet l'observation des changements structuraux très fin (de l'ordre de 0.1% de l'absorption totale du spectre IR) affectant les acides aminés de la protéine.

La mesure du spectre IR différentiel nécessite la mise en œuvre de techniques performantes de spectroscopie IRTF en mode différentiel (électrochimie, photochimie (flow-flash), mélange rapide (stopped flow)).¹⁶⁵⁻¹⁶⁹ En général, ces techniques se reposent sur l'enregistrement d'un spectre IR de la protéine avant de subir une perturbation et après la perturbation, puis le spectre de différence est calculé entre les deux états. Ce spectre permet donc de mettre en évidence uniquement les changements structuraux induits par la perturbation.

Durant les dix dernières années, l'utilisation de la spectroscopie ATR-IRTF en mode différentiel pour l'analyse des protéines s'est considérablement développée dans le domaine IR moyen. Grâce au développement d'une cellule ATR-IRTF de perfusion, des protéines membranaires ont pu être étudiées de façon précise : cytochrome *c* oxydase^{170,171}, NADH:ubiquinone oxydoreductase¹⁷²...

Cette technique permet non seulement d'identifier les modifications des propriétés du site actif dues au changement d'état d'oxydoréduction, mais aussi les changements structuraux affectant la protéine à plus longue distance du métal.

L'utilisation d'une cellule d'ATR-IRTF de perfusion dont les spécificités techniques sont détaillées dans la partie "Matériel et méthodes" nécessite l'adhésion de la protéine à la surface du cristal afin de pouvoir faire circuler différentes solutions de tampons sur le même échantillon. Le changement du pH ou de la composition des solutions tampons permettent d'effectuer le changement d'état sur le même échantillon et d'obtenir donc des spectres différentiels mettant en évidence les réarrangements structuraux et conformationnels ayant lieu au cours du mécanisme catalytique des protéines membranaires.

7.3.5 Application de la spectroscopie IRTF à l'étude des hémoprotéines

Grâce aux propriétés optiques de l'hème, la méthode de spectroscopie vibrationnelle s'est avérée adaptée à l'observation des modifications structurales internes des hémoprotéines et l'exploration de leurs sites actifs. Ce type de spectroscopie, comprenant la spectroscopie infrarouge et de résonance Raman, permet, via la détection de modes de vibration sensibles à l'état redox, de spin et de coordination de l'hème, d'apporter des informations déterminantes sur les interactions impliquant le métal et son environnement.

La spectroscopie de résonance Raman est très employée pour étudier les hémoprotéines. L'excitation de la bande d'absorption de Soret permet en effet d'exalter et d'observer sélectivement les modes de vibration de l'hème. De cette manière, les modes de vibration de la porphyrine et les ligands directs du fer peuvent être détectés, tandis que les modes associés

au reste de la protéine ou au solvant ne sont pas observés. Il est ainsi possible d'observer spécifiquement le comportement vibrationnel de l'hème et son environnement protéique immédiat. Cependant, il est difficile d'effectuer ce type d'analyse sur des protéines ne contenant pas de bandes d'absorption UV-Visible ou des protéines à fer non hémique. En outre, le spectre de résonance Raman permet de détecter uniquement les fréquences associées aux vibrations métal-ligands qui sont permises par les règles de sélection de cette technique.

En revanche, puisque la spectroscopie IR est basée sur des règles de sélection différentes de celles de la spectroscopie Raman, elle permet d'identifier les modes de vibration des centres métalliques mais aussi de la chaîne polypeptidique à plus longue distance du métal. En effet, l'absorption du rayonnement infrarouge ne peut avoir lieu que si le mouvement du mode considéré induit une variation du moment dipolaire électrique de la molécule, tandis que la diffusion Raman a lieu lorsque le mouvement de vibration entraîne une variation de la polarisabilité moléculaire. La spectroscopie IR présente l'avantage d'être appliquée à l'étude de tous types de protéine (présentant ou non un chromophore).

Le domaine de l'infrarouge permettant d'apporter des renseignements précieux à l'étude et l'analyse structurale des hémoprotéines s'étend approximativement de 3500 à 50 cm^{-1} . La gamme spectrale entre 3500 et 450 cm^{-1} , correspondant au domaine du moyen infrarouge, permet d'observer les modes de vibration reflétant la structure secondaires des hémoprotéines ainsi que les fréquences de vibration associées à l'état de protonation d'acides aminés particuliers. La gamme de fréquence 450-50 cm^{-1} correspond au domaine des basses fréquences infrarouge ou lointain infrarouge. Malgré qu'il est moins bien décrit jusqu'à présent, ce domaine met en évidence les modes de vibration impliquant le métal et ses ligands et les liaisons hydrogènes.

Vibrations des liaisons peptidiques

La spectroscopie infrarouge permet d'étudier les changements de conformation des protéines en interaction avec leur environnement. La liaison peptidique possède de nombreux modes de vibration et donne 9 bandes (notées amide I à amide VII et amide A et B). Les bandes amide I, II et III sont très actives en infrarouge et ont été particulièrement étudiées (Tableau 6).

Désignation	Fréquences (cm ⁻¹)	Attributions
Amide A	3250-3300	$\nu(\text{N-H})$
Amide B	3090-3100	résonance de Fermi $\nu(\text{N-H})$ avec amide II
Amide I	1610-1690	$\nu(\text{C=O})$ couplé avec $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$
Amide II	1480-1575	$\delta(\text{N-H})$ couple avec $\nu(\text{C-N})$
Amide III	1220-1320	$\delta(\text{O=C-N})$ et autres modes
Amide IV	625-765	$\delta(\text{O=C-N})$ et autres modes
Amide V	625-800	$\delta(\text{N-H})$
Amide VI	605-635	$\delta(\text{C=O/C-C-N})$
Amide VII	~ 200	torsion du squelette

ν vibration d'élongation, δ vibration de déformation

Tableau 6 : Bandes d'absorption et vibrations des liaisons peptidiques.^{173,174}

L'analyse fine de la position et de la structure de ces bandes donne des informations sur la structure primaire et secondaire de la protéine étudiée. Ainsi les différentes conformations secondaires de type hélice α , feuillet β , coude β ou pelote statistique peuvent être estimées (Tableau 7). Outre cet aspect d'analyse structurale, la spectroscopie infrarouge peut aussi renseigner sur certains acides aminés impliqués dans la structure primaire d'une protéine.

Conformation	Nombre d'onde /cm ⁻¹		
	Calculé	Expérimental	
		H ₂ O	D ₂ O
Chaîne peptidique	1621-1627	1618-1628	1610-1620
Feuillet β	1628-1640	1625-1640	1620-1635
Random Coil	1641-1647	1652-1660	1640-1650
Hélice α	1651-1657	1648-1660	1650-1658
Rotation / déformation	1651-1657	1660-1697	1655-1685
Feuillet β à haute fréquence	1658-1696	1675-1695	1680-1695

Tableau 7 : Détermination de la structure secondaire des protéines en IRTF.^{175,176}

Modes de vibration des hèmes

Les modes normaux de l'hème dépendent de différents paramètres (masse des atomes, forces de liaison interatomique, géométrie de la molécule) et donc les fréquences de leurs vibrations donnent des informations sur la géométrie, les propriétés électroniques et l'environnement de l'hème.

La spectroscopie infrarouge, en particulier l'infrarouge lointain, a été très peu utilisée pour la caractérisation des porphyrines. Par ailleurs, la majorité des travaux sont effectués en spectroscopie Raman. Bien qu'elle permette d'obtenir comme pour la spectrométrie IR les fréquences de vibration des molécules, les règles de sélection entre ces deux méthodes sont différentes. L'absorption IR est permise lorsque la vibration provoque une variation du moment dipolaire électrique de la molécule, alors que la diffusion Raman se produit lorsque la vibration entraîne une variation de la polarisabilité moléculaire. Cette complémentarité entre spectroscopie infrarouge et Raman se révèle de manière encore plus importante sur l'allure des spectres : par exemple, dans le cas de molécules possédant un centre de symétrie : les modes actifs en Raman sont inactifs en infrarouge, et *vice versa*. Ainsi, l'étude comparée des spectres IR et Raman ne peut être que fructueuse pour une caractérisation vibrationnelle détaillée et les deux techniques sont donc souvent nécessaires pour connaître l'ensemble des fréquences caractéristiques d'une molécule.

Dés le début des années 1970, la spectroscopie Raman joue un rôle crucial dans la caractérisation des hémoprotéines.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ Cela est rendu possible grâce aux perfectionnements des techniques de la spectroscopie Raman mais aussi aux nombreux travaux menés sur des métalloporphyrines^{181,182} de géométrie simple. En effet, l'analyse des spectres de résonance Raman (RR) de ces modèles synthétiques a apporté des informations importantes sur les modes de vibrations impliquant l'hème et ses ligands axiaux.

Composés modèles des hémoprotéines, les complexes de Ni(II) [Ni(OEP) et Ni(TPP)], ont suscité de nombreux travaux. L'attribution des modes de vibrations de leur cycle porphyrinique a été réalisée par comparaison des données expérimentales RR et/ou IR à des calculs théoriques de modes normaux. Kitagawa *et coll.* ont attribué la plupart des modes Raman et IR dans le plan en utilisant des longueurs d'onde d'excitation variables de RR, des substitutions isotopiques et des calculs théoriques.¹⁸³ Spiro *et coll.* ont ensuite développé un champ de force empirique appliqué aux porphyrines de nickel (porphine, OEP et TPP) avec différents substituants.¹⁸⁴ Les spectres de résonance Raman de Ni(TPP) ont été donc complètement attribués grâce à des substitutions isotopiques associées à des calculs théoriques de modes normaux.¹⁸⁴

Grâce aux données obtenues avec des porphyrines de nickel, les spectres de RR de plusieurs hémoprotéines, comme la microperoxydase-11 et le cytochrome *c* ont été attribués en détail.^{78,185,186}

Cependant, seulement quelques données ont été obtenues par spectroscopie IR ; Rush III *et coll.* ont attribué les modes de vibrations IR de la Ni(TPP) en utilisant la DFT (théorie de la fonctionnelle de la densité).¹⁸⁷ Paulat *et coll.* ont étudié des complexes de la TPP avec différents métaux en position centrale de l'hème (Fe, Mn et Co) possédant un ion chlorure en cinquième position de coordination de l'hème. Les attributions des modes d'hème et de ses substituants ont été réalisées par comparaison des données IR et Raman aux calculs de la DFT des modes normaux.¹⁸⁸

L'équipe de Berthomieu a caractérisé divers complexes de la MP8, un modèle des hémoprotéines de type *c*, par spectroscopie IR couplée à l'électrochimie. Cette étude a permis de mettre en évidence des modes IR redox spécifiques de l'hème, dont certains sont sensibles à l'état de spin du fer.^{189,190}

Des données IR ont également été obtenues dans les basses fréquences sur des hémoprotéines telles la cytochrome *c* oxydase, le cytochrome *c* et la microperoxydase-11 et des composés modèles, l'hémimine et l'hématine.¹⁹¹

Vibrations métal-ligand

Les vibrations métal-ligand sont détectées dans le domaine des basses fréquences, entre 700 et 50 cm^{-1} . Les fréquences de ces vibrations permettent de détecter les interactions hème-ligand-protéine et de mesurer leur force ; elles sont également corrélées au potentiel redox des hémoprotéines et vraisemblablement, à leur fonction biologique.

Les oxydases, comme l'hémoglobine et la myoglobine, possèdent une histidine comme ligand proximal. Ce ligand proximal joue un rôle majeur dans les propriétés catalytiques des hémoprotéines. En effet, la liaison covalente Fe-Histidine est très sensible aux changements structuraux et dynamiques de la protéine.^{192,193}

Dès lors, les propriétés vibrationnelles de cette liaison ont été largement étudiées par spectroscopie de résonance Raman. Son mode vibrationnel $\nu(\text{Fe-His})$ a été observé entre 250 et 200 cm^{-1} .¹⁹⁴ La position et l'intensité de cette bande dépend essentiellement de la nature et la conformation de la protéine ainsi que l'environnement du métal. Il a été montré que cette vibration peut être corrélée à la coordination de l'hème dans la cytochrome *c* oxydase.¹⁹⁵ La vibration d'élongation antisymétrique IR active $\nu(\text{Fe-His})_{\text{as}}$ a été attribuée à 381 cm^{-1} dans le spectre IR du complexe bis(His-méthylester)Fe-PPIX.¹⁹⁶

L'analyse des spectres IR de la TPP et ses complexes métalliques a mis en évidence des bandes sensibles au métal.¹⁹⁷ L'équipe de Nakamoto a détecté une vibration caractéristique de la liaison azote-métal entre 330 et 180 cm^{-1} pour les complexes $\text{M}(\text{TPP})$.¹⁹⁸

L'étude des intermédiaires de la CcO par spectroscopie Raman a permis de détecter les vibrations caractéristiques des liaisons $\nu(\text{Fe-O})$ à 571 cm^{-1} pour l'intermédiaire oxy (**A**)⁶⁷ et $\nu(\text{Fe=O})$ à 804 et 785 cm^{-1} pour les intermédiaires oxoferryl **P_M**⁶¹ et **F**⁷⁸, respectivement.

I.8 Conclusion

D'importants progrès dans la compréhension des mécanismes de réduction tétraélectronique de l'oxygène en eau par la CcO ont été faits au cours des dernières années, et ce grâce aux résultats obtenus à la fois en biologie structurale, spectroscopie, électrochimie, chimie de synthèse et chimie théorique. Les modèles structuraux, qui s'attachent à reproduire le plus fidèlement possible les caractéristiques géométriques et électroniques du site actif, et les modèles fonctionnels, qui ont été adaptés afin de présenter une activité de type oxydase apportent des informations utiles pour la compréhension du mécanisme de réduction de dioxygène en eau par la CcO.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 Cytochrome *c* oxydase

II.1.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de la CcO (native et les isotopes $^{63}\text{Cu}_B$ et $^{65}\text{Cu}_B$) en solution, utilisés dans nos expériences de spectroscopie, sont obtenus par purification à partir de *Paracoccus denitrificans* par l'équipe du Pr. Hartmut Michel (laboratoire de Biophysique, Max Planck/Francfort). Elles sont conditionnées dans une solution saline (KPi, 10mM, NaCl, 20 mM) à pH 8, contenant 0.01 % DDM.

1.1.1 Concentration

Les expériences de spectroscopie ATR-IRTF nécessitent des concentrations élevées en protéines (~250 μM), la solution est donc concentrée par centrifugation.

Les concentrateurs Amicon, Ultra-0.5 (Millipore) utilisés comportent une membrane de cellulose de coupure 100 kDa, qui retient la CcO bactérienne (masse moléculaire supérieure de 126 kDa) et laisse passer le tampon lors de la centrifugation. Afin d'éviter que la protéine membranaire n'obture les pores de la membrane lors de ce processus, la membrane est préalablement trempée dans le tampon CHES (Fluka $\geq 99,0$ %) 20 mM, pH 9, DDM 0,01% et la centrifugation qui suit est fractionnée en sessions de 20 minutes entre lesquelles la protéine est remuée.

La concentration en protéine est mesurée au cours de cette étape à partir des spectres d'absorption enregistrés dans le visible. Effectivement, cette concentration est reliée à la densité optique de l'échantillon de protéines par la loi de Beer Lambert :

$$A = (\lambda) l c$$

Où l est l'épaisseur de l'échantillon et (λ) son coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ .

1.1.2 Préparation du "Culot"

Les expériences de spectroscopie ATR-IRTF en mode différentiel consistent à circuler des solutions tampons de composition différente sur un même échantillon de protéine, ce qui nécessite l'adhésion de celui-ci à la surface hydrophobe du cristal (silicium) de la cellule ATR. Cependant, les molécules de détergent (DDM) qui entourent la protéine en interagissant avec ses parties hydrophobes, empêchent cette adhésion. En effet, les protéines membranaires

possèdent une grande affinité pour les détergents hydrophobes non ioniques avec lesquels elles forment des micelles. Ainsi, l'élimination du détergent permet à la protéine de former un film hydrophobe adhérent au cristal de l'ATR.

Avant chaque expérience, l'échantillon de la CcO utilisé subit quatre cycles de lavage : dilution dans le tampon KPi 50 mM, pH 9 et concentration en Ultra-15 (Millipore) à 5000 tr.min⁻¹ pendant 15 min à 4°C. Trois cycles de lavage supplémentaires pour lesquels la concentration de la protéine est réalisée en Ultra-0.5 (Millipore) pendant 10 min. Ces dernières étapes de lavage permettent à la fois d'éliminer le détergent et de conditionner la protéine dans le tampon final au pH souhaité. La solution diluée est ensuite concentrée à 5000 tr.min⁻¹ pendant 5 min.

Le "culot" formé à l'intérieur de "l'ependorf" est prélevé par pipetage, et déposée immédiatement sur le cristal ATR pour être analysé en IR et de se prémunir d'une éventuelle dénaturation.

II.1.2 Méthodes spectroscopiques

1.2.1 Spectroscopie UV-visible

La formation des intermédiaires de la CcO est suivie par spectroscopie UV-visible. Les spectres d'absorption sont enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique avec un spectrophotomètre Cary 300 SCAN (Varian) à double faisceau. La mesure de la ligne de base s'effectue en comparant la cuve de référence à celle de mesure, ne contenant que du tampon.

La différence entre le spectre réduit et le spectre oxydé est mesurée. L'oxydase oxydée est obtenue en ajoutant une très faible quantité de ferricyanure ($K_3Fe(CN)_6$) et la réduite par ajout d'hydrosulfite ($Na_2S_2O_4$). La concentration de la protéine est estimée en utilisant le coefficient d'absorption molaire de la bande de Soret à 425 nm ($\epsilon_{ox425nm}=158 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Les spectres de différence des intermédiaires P_H , F_H et F_H (moins l'état O) sont enregistrés après addition soit d'une quantité équimolaire, soit d'un excès de H_2O_2 ($\epsilon_{240nm}=40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'intermédiaire P_H est généré par l'ajout de 1 à 5 équivalents de H_2O_2 (Sigma Aldrich 30%) à une solution contenant 10 μM de la CcO oxydée dans un tampon KPi (Fluka $\geq 99,0$ %) 50 mM, pH 9 et 0,05 % DDM. Le mélange est ensuite incubé pendant 3 minutes. La

diminution du pH à 6 de la solution précédente par l'ajout d'une solution de Mes-OH (Sigma Aldrich) pH 6 à la concentration finale de 50 mM entraîne la formation de l'état F_H . Après une incubation d'environ 3 minutes, l'ajout d'un grand excès de H_2O_2 (1:500) à cette solution permet la formation de l'intermédiaire F_H . Ce dernier peut être également généré dans un tampon KPi 50 mM, pH 9 et 0,05 % DDM. Sa formation est indépendante du pH.

Le spectre d'absorption de différence de l'intermédiaire P_{10} (moins l'état O) est enregistré lorsque le pH de la solution de la CcO passe de 8 à 10. 10 μ M de la CcO oxydée dans un tampon KPi 10 mM à pH 8 et 0,05 % DDM est mélangé avec une solution de glycine-OH (Sigma Aldrich ≥ 99 %), pH 10 à la concentration finale 120 mM. La stabilité de l'état P_{10} est suivie sur 30 minutes d'incubation. Une caractérisation spectrale est effectuée à différents intervalles de temps t (0, 1, 5, 10, ...30 min).

1.2.2 Spectroscopie de fluorescence

Lors des expériences de fluorescence, les échantillons des différents intermédiaires sont préparés selon le protocole utilisé pour l'UV-Visible. Les spectres de fluorescence sont enregistrés au service commun d'analyses, de mesures physiques et de spectroscopie optique (Université de Strasbourg).

1.2.2.1 Mesures à l'état stationnaire

Les expériences de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Jobin-Yvon Horiba Fluorolog FL3-22, équipé d'un porte-échantillon thermostaté, dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique.

Ce fluorimètre est un instrument à comptage de photons présentant une réponse linéaire pour des intensités inférieures à 2 Mcps. La source d'excitation est une lampe à Xenon de puissance 450 W et le détecteur est un TBX 04 (Horiba Jobin Yvon). La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée par un monochromateur double réseau à deux fentes réglables. L'instabilité du faisceau d'excitation due aux fluctuations de la lampe est corrigée à l'aide d'une photodiode calibrée. Les fonctions de correction, à l'excitation comme à l'émission, et notamment la courbe de réponse du photomultiplicateur, sont définies par le constructeur et incorporées dans le logiciel de l'appareil (FluorEssence). Les spectres de fluorescence sont donc automatiquement corrigés. La largeur des fentes d'entrée et de sortie de chaque monochromateur est réglée afin d'obtenir le meilleur rapport signal/ bruit.

Après introduction du tampon KPi, 20 mM, pH 9 et 0.05 % DDM dans la cuvette, un aliquot de la protéine de la solution stock est ajouté pour obtenir une concentration finale de 3 μ M environ. La concentration de la protéine ainsi que la formation de chaque intermédiaire sont vérifiées par l'enregistrement des spectres d'absorption entre 230 et 800 nm.

Dans ce travail, nous avons enregistré uniquement des spectres d'émission de fluorescence pour chacun des intermédiaires de la CcO (**O**, **P_H**, **F'_H**, **F_H** et **P₁₀**) formés. Ces mesures sont effectuées à 5°C et en utilisant deux longueurs d'onde d'excitation différentes.

La longueur d'excitation pour le tryptophane est de 300 nm et les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés entre 310 et 500 nm. L'excitation à 300 nm permet d'étudier sélectivement la fluorescence des tryptophanes de la protéine.

La longueur d'onde d'excitation pour la tyrosine est de 275 nm et les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés entre 290 et 500 nm. Cependant, cette longueur d'onde permet d'étudier la fluorescence des résidus tyrosine et tryptophane.

Les bandes passantes sont de 3 nm en excitation et en émission. Le temps d'intégration est de 0.1s. Les spectres contrôles (tampons) seuls sont réalisés dans les mêmes conditions, et soustraits à ceux des échantillons nécessaires.

1.2.2.2 Mesures spectroscopiques résolues en temps

Les courbes de déclin de fluorescence sont obtenues en utilisant la technique impulsionnelle selon la méthode du comptage de photon unique. Cette méthode consiste à exciter le fluorophore dans des conditions où l'on ne détecte qu'un seul photon de fluorescence (moins de 5 photons de fluorescence détectés par 100 impulsions d'excitation). L'intervalle de temps mesuré entre l'impulsion initiale et la détection du photon correspond au temps passé par une molécule à l'état excité.

La source d'excitation est constituée par une diode électroluminescente (NanoLED-295, Horib Jobin Yvon) émettant à 295 nm, ce qui permet d'étudier sélectivement la fluorescence des résidus tryptophane.

Les photons de fluorescence émis par l'échantillon sont détectés dans une direction perpendiculaire à l'excitation par un photomultiplicateur. Le gain du photomultiplicateur est tel qu'un seul photon génère une impulsion électrique d'anode mesurable (repère temporel). L'amplitude de cette impulsion est analysée par un analyseur multicanaux et le contenu du

canal correspondant est incrémenté d'une unité. Nous utilisons 2048 canaux pour l'analyse de l'amplitude, ce qui est combiné à l'échelle de temps de 50 ns. L'analyseur multicanaux est piloté par un ordinateur à l'aide d'une interface électronique gérée par le logiciel DataStation.

Afin de reconstruire l'histogramme de la probabilité d'émission de fluorescence, il est nécessaire de répéter plusieurs fois la même mesure avec une grande vitesse de répétition. L'acquisition est généralement effectuée en régime de pré-comptage où le nombre total de photons à accumuler est fixé (typiquement 10000 événements).

Les paramètres optiques utilisés pour l'ensemble des mesures effectuées avec cet appareillage sont résumés ici :

- Longueur d'onde d'excitation à 295 nm,
- Longueur d'onde d'émission à 330 nm,
- Taux de répétition des impulsions d'excitation : 1 MHz,
- Largeur temporelle par canal de 14.5 nm avec un nombre total de canaux de 2048, Nombre total de coups par déclin : 1.10^4 ,
- La mesure de l'étalon, une solution Ludox (une solution de silice colloïdale, 40 % de suspension dans l'eau, provenant de Sigma-Aldrich) diluée à 0.01 %, prise comme référence, est effectuée avec le même de comptage que dans la mesure de l'échantillon,
- Fentes du photomultiplicateur d'émission : 14.5 nm.

L'analyse des déclin de fluorescence est effectuée par la méthode de statistique des moindres carrés en utilisant le logiciel DAS6 (Decay Analysis Software), provenant de Horiba Jovin Yvon.

Dans cette analyse, on suppose que la loi de fluorescence correspond à la relation suivante où τ_i correspond aux temps de vie de fluorescence.

$$F(t) = \alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + \alpha_3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right) + \dots + \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

1.2.3 Spectroscopie ATR-FTIR en mode différentiel

Les spectres IRTF de différence sont enregistrés avec un spectromètre Bruker IFS 28 équipé d'une séparatrice KBr et d'un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure) et couplé à une cellule ATR de perfusion (BioATR II unit) provenant de Bruker (Karlsruhe, Allemagne). Cet accessoire ATR-perfusion à faible trajet optique (6-8 nm) est en réalité constitué de deux cristaux joints (l'un en ZnSe et l'autre en silicium) et permet les mesures uniquement dans le moyen IR (4000-800 cm^{-1}).

Le cristal de silicium, possédant une surface hydrophobe, est en contact direct avec l'échantillon. Cette cellule peut être connectée à un thermostat permettant de réaliser les expériences à basse température. Elle est composée d'un compartiment supérieur qui permet de fermer la cellule hermétiquement (Figure 38). L'ensemble est purgé de manière continue avec de l'air séché afin d'éviter les interférences qui peuvent être causées par la vapeur d'eau.

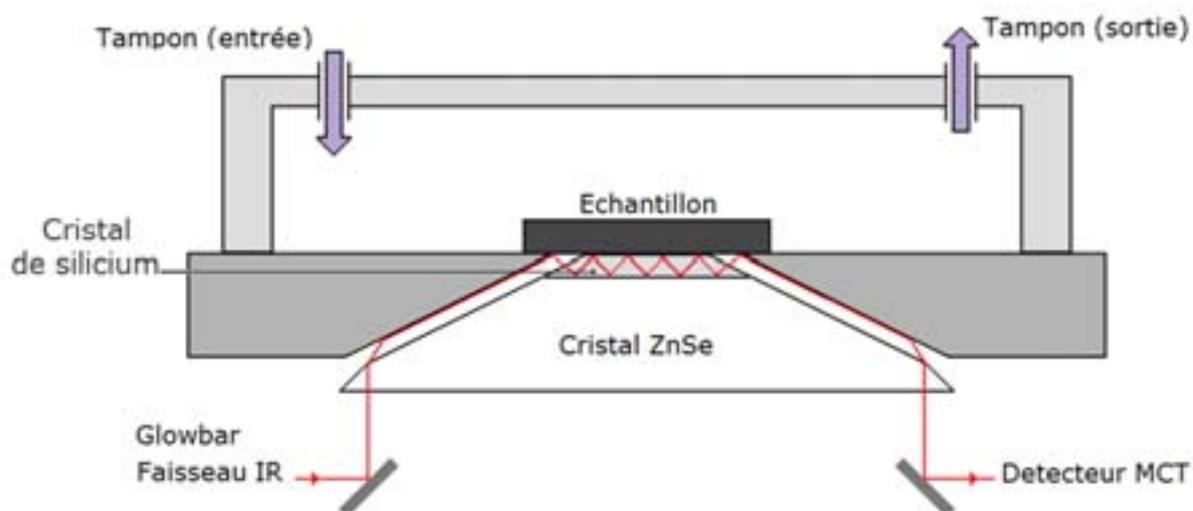


Figure 38 : Schéma de la cellule à circulation ATR. Les flèches à l'intérieur de la cellule représentent le sens de circulation des différentes solutions tampons.

Dépôt du "culot"

Le culot de 1.5 μl est déposé sur le cristal de silicium et séchée pendant 1h. Elle est ensuite réhydratée avec 30 μl de tampon KPi 50 mM, pH 9. Puis, la cellule est fermée et la perfusion de la solution tampon est maintenue d'une manière continue à travers le cristal à l'aide d'une pompe assurant un débit de 0.2 ml/min.

Génération des intermédiaires

Dans un premier temps, un cycle d'oxydoréduction est effectué afin de maintenir la protéine dans son état activé en circulant d'abord une solution de tampon contenant de la dithionite (3mM) puis suivie par une autre solution contenant du ferricyanure (1mM). La formation des intermédiaires P_H et F_H s'effectue en circulant une solution de tampon contenant du peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0.5 mM.



Figure 39 : une photo du montage expérimental utilisé lors des expériences de formation et suivi des intermédiaires de la CcO. Le circuit fermé se compose (de gauche à droite) : d'un flacon contenant la solution du tampon, d'une pompe assurant un débit constant égal à 0.2 ml/min et de la cellule à circulation disposée à l'intérieur du spectromètre Bruker. Les différents éléments sont reliés par des tuyaux en silicone.

Acquisition des spectres différentiels

Les spectres ATR-IRTF de différence sont obtenus avec le même échantillon de CcO et résultent de la moyenne de 3 cycles redox indépendants. Ils sont enregistrés avec 128 scans, à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} et à 7°C .

Le spectromètre est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel OPUS (OPTics Users Software, Bruker). Il permet de corriger la ligne de base des spectres et d'éliminer la contribution de la vapeur d'eau au signal.

1.2.4 Spectroscopie IRTF en mode ATR ou transmission

Les spectres de l'infrarouge lointain des intermédiaires de la CcO sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Vertex 70, équipé d'une séparatrice Silicium et d'un détecteur DTGS (Deuterated Tri-Glycine Sulfate).

Mode ATR

Les spectres ATR-IRTF sont obtenus à l'aide d'une unité ATR (Harrick unit) couplée au spectromètre. L'échantillon de $2\ \mu\text{l}$ est déposé sur le cristal (Diamant) de l'ATR, puis il est

séché avec un faible flux d'argon. Les spectres sont enregistrés dans les conditions suivantes : 128 scans, à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} et à température ambiante.

Mode transmission

L'échantillon de $4\ \mu\text{l}$ est déposé sur une fenêtre de silicium ou de polyéthylène entourée de 6 joints très fins et placée dans un support en métal. Le support est ensuite placé à l'intérieur du spectromètre et relié au thermostat. Les spectres sont enregistrés dans les conditions suivantes : 64 scans, à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} et à 6°C .

II.2 Modèles synthétiques de la CcO

II.2.1 Préparation des échantillons

2.1.1 Complexes de Fe(III)

Toutes les solutions de Fe(III) sont obtenues en dissolvant une masse de l'ordre de 0.35-0.45 mg de composé dans 1 ml de dichlorométhane (Sigma Aldrich > 99.9 %) à l'exclusion des porphyrines $4\text{C}_2\text{-NO}_2$ et $4\text{C}_2\text{-diNO}_2$, qui sont solubles uniquement dans un mélange de dichlorométhane et d'éthanol.

2.1.2 Complexes de Fe(II)

La difficulté de la préparation d'une porphyrine de Fe(II) réside dans le fait qu'elle est très sensible à l'oxygène de l'air. Exposée à l'air, elle s'oxyde spontanément en quelques secondes en porphyrine de Fe(III), en dimère $\mu\text{-oxo}$... C'est pourquoi, pour toutes les synthèses décrites ci-après, le milieu réactionnel est toujours conservé sous atmosphère inerte (argon) et les solvants utilisés sont systématiquement dégazés.

Le choix du réactif adéquat pour réduire le Fe(III) en Fe(II) est gouverné par plusieurs critères. Ce réactif doit être commercial ou aisément synthétisable et posséder un pouvoir réducteur adapté tel qu'il puisse réduire l'ion ferrique sans endommager la porphyrine. En effet, le macrocycle porphyrinique est potentiellement réductible.

Nous avons essayé l'amalgame de zinc (ZnHg), appelé réducteur de Jones, qui répond à ces critères et présente l'avantage d'être utilisé en milieu hétérogène. La réduction devrait, dans ces conditions, être douce et le réducteur facile à séparer de la porphyrine par filtration.

2.1.2.1 Tentative de réduction par ZnHg

La synthèse de réducteur de Jones¹⁹⁹ nécessite de faire percoler sur des copeaux de zinc (1 g) une solution aqueuse d'acide sulfurique à 25 % (50 cm³) afin de décaper la fine couche d'oxyde de zinc qui les recouvre. Les granules de zinc prennent alors une teinte métallique brillante. Une solution de mercure (100 g) est ensuite versée sur ces copeaux brillants ce qui a pour effet de les rendre gris foncé. Le mélange est ensuite maintenu sous agitation pendant toute la nuit. L'amalgame obtenu est filtré afin d'éliminer la phase d'acide et subit ensuite des cycles de lavage avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre. Puis une solution de mercure (5 ml) est ajoutée. L'amalgame résultant est filtré sur un papier filtre et lavé avec une solution distillée de THF. Après un séchage sous flux d'argon pendant une nuit, les copeaux sont prêts à l'emploi pour la réduction.

Nous procédons ensuite à la réduction du complexe de Fe(III) en solution dans le dichlorométhane avec quelques gouttes de zinc amalgamé. La réaction attendue est la suivante :



Le milieu réactionnel est agité sous flux d'argon pendant 20 min. La couleur de la solution du complexe considéré passe de brun au vert dans le cas du modèle 2Pyporphen. Ce produit vert ne montre plus la bande de Soret sur le spectre UV-visible et les bandes caractéristiques de la porphyrine sur le spectre IR. Il y a eu probablement une réduction du complexe porphyrinique. Dans le cas des modèles HI, la couleur passe du brun au rouge-brun.

Nous avons varié les conditions opératoires de la réaction entre le complexe Fe^{III}(2Pyporphen)Cl et ZnHg. Nous avons aussi essayé de réduire trois autres modèles sans succès. Il s'avère qu'en définitive la réaction donne systématiquement lieu à la réduction en Fe(II) immédiatement suivie d'une réduction du macrocycle porphyrinique. La méthode de réduction par la dithionite de sodium a donc été utilisée.

La réduction de l'espèce Fe(III) par l'amalgame Zn/Hg n'a pas permis d'obtenir le complexe porphyrinique de Fe(II).

2.1.2.2 Tentative de réduction par la dithionite de sodium

Les complexes porphyriniques de Fe(III) sont dissous dans le dichlorométhane. Cette solution est congelée dans l'azote liquide et dégazée sous vide. Nous avons ensuite procédé à une réaction sous flux d'argon en milieu biphasique avec dans la phase aqueuse la dithionite

et dans la phase organique (dichlorométhane) la porphyrine de Fe(III). L'ensemble est agité vigoureusement pendant 20 min pour réduire tout le fer de la porphyrine. La couleur de la solution évolue du brun au rouge pourpre. La phase aqueuse est alors canulée vers l'extérieur.

2.1.3 Complexes de Fe(II)-Cu(I)

L'insertion du cuivre est effectuée par un mélange, sous atmosphère inerte, d'une solution de porphyrine de Fe(III) dans le dichlorométhane avec une solution désoxygénée de cuivre (I) ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4 \text{PF}_6$) dissous dans l'acétonitrile (Sigma Aldrich > 99.9 %). Les deux solutions sont refroidies à -78°C (mélange carboglace/acétone) puis dégazées chacune par trois cycles successifs de vide d'argon pour enlever toute trace d'oxygène. Une fois revenue à température ambiante, un équivalent de la solution de cuivre(I) est ajouté à la solution de porphyrine de fer(III) qui se trouve dans le Schlenk. Le complexe fer(II)-cuivre(I) est obtenu par un transfert de la solution d'hydrosulfite de sodium via une canule à la solution préparée précédemment (porphyrine de fer(III)-cuivre(I)).

2.1.4 Complexes de Fe(II)- $^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$

Dès que l'échantillon est réduit, la phase aqueuse est canulée vers l'extérieur puis la solution de la porphyrine est transférée dans un autre schlenk contenant du sulfate de magnésium anhydre (MgSO_4) afin de sécher les traces d'eau. Le dioxygène ($^{16}\text{O}_2$ ou $^{18}\text{O}_2$) est ajouté directement par courant gazeux (bullage) dans la solution pendant une minute environ.

2.1.5 Complexes de Fe^{II}-CO et [Fe^{II}-Cu^I]-CO

Les échantillons de modèles de la CcO utilisés lors des expériences ATR-IRTF et de photolyse destinées au suivi du transfert de ligand doivent être réduits afin de pouvoir fixer le ligand CO.

Dans un premier temps, le fer de l'hème est réduit par de la dithionite en excès, selon la même procédure décrite précédemment, puis le complexe porphyrinique considéré Fe(II) ou Fe(II)-Cu(I) est exposé à un flux de CO pendant 3 minutes environ.

II.2.2 Méthodes spectroscopiques

2.2.1 Spectroscopie ATR-FTIR

Les spectres de tous les composés modèles étudiés sont enregistrés à température ambiante avec un spectromètre IRTF Bruker *Vertex 70* couplé à une unité ATR (Harrick unit).

Le détecteur et la séparatrice dépendent de la gamme de fréquence étudiée. Le détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure), refroidi à l'azote liquide, et la séparatrice KBr permettent d'obtenir des données IR dans la gamme spectrale de 4000 à 400 cm^{-1} . Le détecteur DTGS (Deuterated Tri-Glycine Sulfate) ainsi que la séparatrice Silicium permettent d'accéder à des fréquences IR plus basses (400-50 cm^{-1}).

Pour chaque échantillon, 2 μl ont été déposés sur le cristal en diamant de la cellule ATR et séchés à l'air libre ou sous atmosphère d'argon dans le cas des complexes de Fe(II) en utilisant un sac à gants placé sur l'unité de l'ATR (Figure 40).

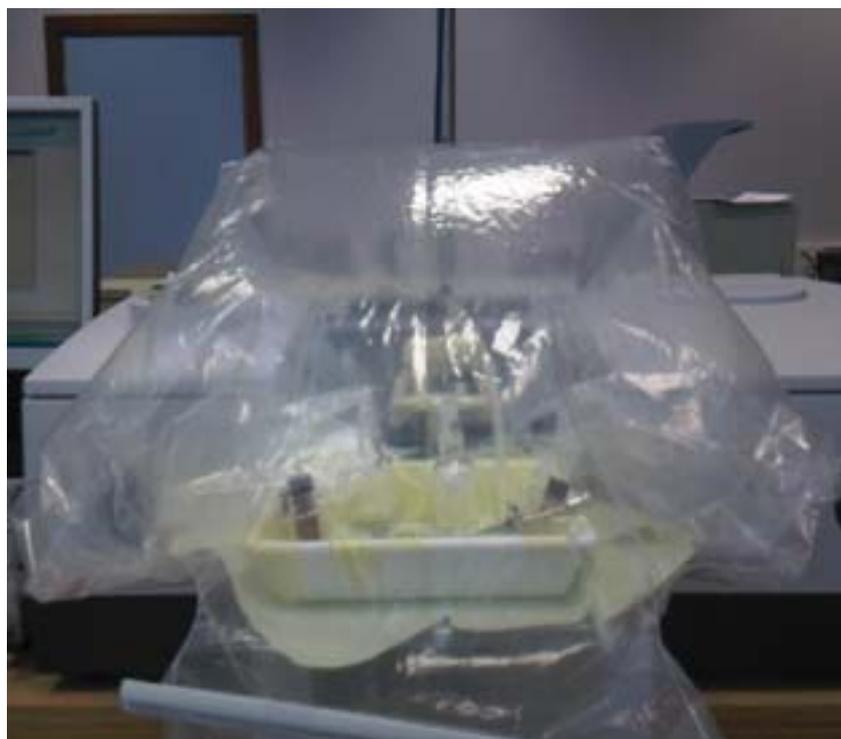


Figure 40 : une photo du montage expérimental utilisé lors des mesures des spectres de complexes Fe(II), Fe^{II}-Cu^I, Fe^{II}-O₂ et Fe^{II}-CO.

Le sac à gants est aménagé de manière à laisser passer un fin tuyau en caoutchouc qui sert d'arrivée pour la circulation du courant d'argon. Le maintien strict de l'ensemble du montage sous atmosphère d'argon pendant le temps de mesure permet d'éviter les réactions parasites avec le dioxygène de l'air.

Lorsque le sac à gants est purgé de toute trace de dioxygène (au bout de 30 min environ), on réalise les spectres de références jusqu'à l'obtention d'un spectre sans humidité. On dépose alors l'échantillon de complexe de Fe(II) concentré sur le diamant grâce à une seringue.

Chaque spectre enregistré est le résultat de 256 scans à une résolution de 2 cm^{-1} pour les mesures en MIR et 128 scans à une résolution de 4 cm^{-1} pour celui effectué à basse fréquences. Selon la qualité du rapport signal/bruit, on réalise ensuite une moyenne de 2 à 6 spectres afin d'obtenir le spectre moyen final. On réalise également un enregistrement de la chambre du spectromètre à vide, ce qui permet d'obtenir le spectre de la vapeur d'eau.

2.2.2 Spectroscopie IRTF couplée à la photochimie à basse température

La technique est basée sur la rupture de la liaison entre le fer de la porphyrine et son ligand CO induite par l'absorption d'un photon. Les études de photochimie ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Aurélien Trivella, ancien chercheur postdoctoral dans le laboratoire.

Montage expérimental

Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ ou $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ est déposé entre deux fenêtres de fluorure de calcium (CaF_2) placées dans un sac à gants sous atmosphère argon puis fixées au porte échantillon du cryostat (modèle DE-202 AE, Advanced Research Scientific, Allentown, PA, USA) permettant de réaliser des spectres à des températures comprises entre 10K et 300K.

Le cryostat est composé d'un compresseur, d'un cryogénérateur et d'un système de pompage.

- Le compresseur est refroidi par de l'eau et fonctionne en circuit fermé. Environ 15 bar d'hélium purifié se détendent dans la tête froide via des lignes puis sont renvoyés vers le système de compression.
- Le cryogénérateur utilisé produit du froid par compression et détente de gaz. La durée de fonctionnement nécessaire à l'obtention de la température minimale est de 1h. La température est mesurée par une diode de silicium calibrée avec une précision de 0,5 K fixée sur le porte échantillon.
- Le groupe de pompage est constitué d'une pompe (PFEIFFER VACUUM) pré-pompé par une pompe à palettes. Ce système permet de maintenir un vide secondaire ($P \leq 10^{-7}$ mbar) dans l'enceinte cryostatique. Le pompage permet d'éviter la présence de l'oxygène et de limiter les échanges de chaleur entre la paroi métallique du cryostat et la surface de dépôt.

La température de la surface de dépôt peut être réglée par l'intermédiaire d'un contrôleur de température (modèle 9700-1-1 Scientific Instruments West palm Beach, FL, USA). Pour

nos expériences, nous avons travaillé dans une plage de température comprise entre 15 et 150 K.

La source d'excitation étant un laser Nd:YAG (grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme) émettant à 1064 nm et provenant du Modèle MiniliteTM, Continuum, Central Expressway, Santa Clara. Il est pulsé à 10 Hz délivrant des trains d'impulsions nanosecondes.

La longueur d'onde de l'impulsion est modifiée de sorte qu'elle puisse exciter spécifiquement l'échantillon. Dans le cas des modèles étudiés, le maximum de l'impulsion est choisi à 532 nm, cette longueur d'onde est la plus favorable pour exciter préférentiellement les porphyrines. La puissance moyenne reçue par les échantillons étudiés est comprise entre 200-250 mW.

Les spectres IR sont enregistrés en mode transmission sur des échantillons orientés à l'aide d'un spectromètre Bruker *Vertex 70*. L'acquisition des spectres est effectuée entre 4000 et 1200 cm^{-1} en moyennant 256 scans à une résolution de 2 cm^{-1} et 10 kHz pour la vitesse de balayage.

**Chapitre III : Étude de la cytochrome *c* oxydase
par spectroscopie UV-Visible, de fluorescence et
IR**

La cytochrome *c* oxydase (CcO) catalyse la réduction de l'oxygène en eau, une réaction qui utilise quatre électrons et quatre protons. Ce mécanisme débute par la réduction du centre binucléaire $[\text{Fe}_{\text{a}_3}^{\text{III}}/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{II}}]$ en $[\text{Fe}_{\text{a}_3}^{\text{II}}/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{I}}]$ immédiatement suivie de la fixation de dioxygène pour former le complexe $[\text{Fe}_{\text{a}_3}^{\text{II}}\text{-O}_2/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{I}}]$.⁶⁷ Ce complexe étant le premier intermédiaire du cycle catalytique observable à basse température, les étapes suivantes du mécanisme restent encore sujettes à discussion notamment le rôle du Cu_{B} est largement méconnu.

Il est généralement proposé que le complexe $[\text{Fe}_{\text{a}_3}^{\text{II}}\text{-O}_2/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{I}}]$ donne après rupture hétérolytique de la liaison O-O un composé P_{M} de type oxoferryl possédant un radical localisé sur un résidu tyrosine $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{II}}\text{-His-Y}]$.⁶¹ Puis le transfert d'un électron et d'un proton au site actif de la protéine conduit à la formation de l'état F, dont la structure correspond à une espèce oxoferryl neutre $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}/\text{Cu}_{\text{B}}^{\text{II}}\text{-His-Y}]$.⁶¹

Les analogues des intermédiaires naturels étudiés en tant que candidats dans la caractérisation des propriétés d'un fer-oxoferryl se sont révélés être de bons outils pour l'étude des différentes étapes du mécanisme de la CcO (les intermédiaires naturels ainsi que leurs analogues artificiels sont résumés dans le tableau 2 p. 21). Du fait de la réaction très rapide de la CcO avec le dioxygène, les intermédiaires réactionnels ne peuvent pas être directement piégés afin de permettre leur caractérisation par d'autres spectroscopies plus informatives que l'absorption UV-Visible, telle la résonance Raman ou l'IR par exemple.

Pour la CcO, la formation des intermédiaires artificiels P_{M} et F par réaction avec le peroxyde d'hydrogène comme substrat a été mise en évidence par spectroscopie UV-Visible.^{87,200,201} Le peroxyde d'hydrogène, à la fois bon réducteur et donneur d'oxygène, réduit par un processus à deux électrons l'enzyme native, et permet ainsi la formation consécutive des espèces P_{H} et F_{H} caractérisées par des maximums d'absorption à 607 et 580 nm, respectivement (Figure 41). Il a été montré que leur formation est très dépendante de la concentration en substrat et du pH.

Les espèces oxoferryl ont pu être ainsi caractérisées par résonance Raman, ce qui permet d'observer les vibrations caractéristiques des liaisons Fe-O et O-O des fer-oxoferryl.^{202,203} De plus, en faisant réagir la CcO avec un équivalent ou un léger excès de H_2O_2 à pH acide, une nouvelle espèce de type fer-oxoferryl (F_{H}) a pu être piégée et caractérisée par spectroscopie Raman.^{84,204,205}

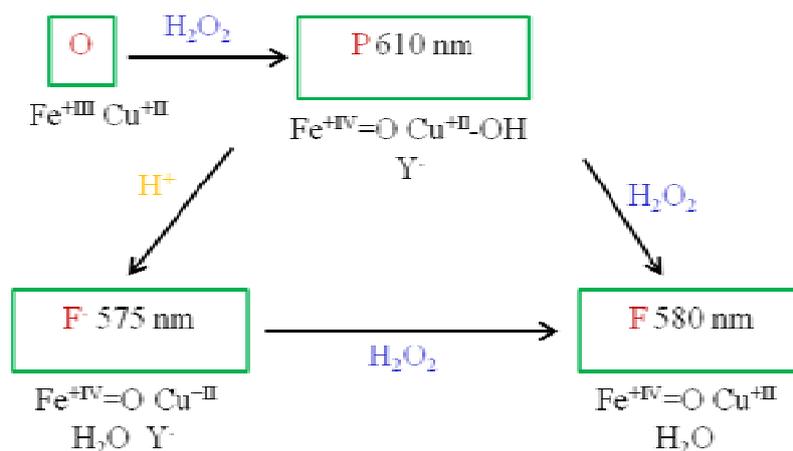


Figure 41 : Formation des intermédiaires artificiels P_H , F_H et F'_H par réaction avec le peroxyde d'hydrogène.

La génération des intermédiaires artificiels de la CcO est considérée comme indispensable à la compréhension du fonctionnement de son site actif. Dans le but de découvrir de nouvelles voies permettant la génération des autres intermédiaires de la CcO, l'équipe d'Hartmut Michel a proposé récemment la formation d'un nouvel état P_{10} .¹² Tout comme les intermédiaires P_H , P_R et P_{CO} , générés auparavant, l'état P_{10} pourrait être aussi un autre état original de l'intermédiaire P_M , représentant ainsi un intermédiaire oxoferryl.

L'intermédiaire P_{10} peut être formé lorsque le pH de la solution de l'oxydase à l'état oxydé passe de 8 à 10. Cette espèce se caractérise par une bande d'absorption centrée à 610 nm et un signal RPE correspondant à un radical tyrosyl Y167. Michel *et coll.* suggèrent que cette espèce est très similaire à l'intermédiaire P_M observé dans le cycle naturel de l'oxydase. Par ailleurs, la formation de l'état P_{10} , en absence de tout équivalent réducteur, corrobore bien l'hypothèse qu'une espèce de type peroxy pourrait ponter les deux métaux du site actif de l'oxydase de *P. denitrificans*.

D'autre part, de nombreuses études ont mis en évidence la formation des espèces radicalaires de tyrosine ou tryptophane au cours du cycle catalytique de la CcO. Cependant, la nature et la position de ces radicaux reste encore sujet à débat.

L'objectif de ce travail est d'étudier d'une part les intermédiaires (P_H , F_H , F'_H et P_{10}) par spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps afin de mieux comprendre le rôle des espèces radicalaires formées dans le cycle catalytique, et d'autre part de les caractériser par spectroscopie IR, plus précisément dans le domaine de l'infrarouge lointain, ce qui permettra d'apporter des informations sur leur nature chimique. Nous rapportons ici également l'effet du pH sur les propriétés vibrationnelles de l'oxydase.

III.1 Étude des espèces radicalaires

Dans le cycle naturel de l'oxydase, la rupture hétérolytique de la liaison O-O, permettant la formation de l'état P_M , nécessite quatre électrons dont trois d'entre eux sont fournis par les centres métalliques. Cependant, le quatrième électron manquant a été suggéré d'être donné à la suite d'un transfert électronique d'un résidu acide aminé situé à proximité du centre binucléaire. On suppose qu'un radical tyrosyle additionnel (Tyr 280) est formé et participe à la réaction de réduction du dioxygène grâce à la liaison particulière que forme cette tyrosine avec l'une des trois histidines liées au Cu_B .^{200,206} Cependant, les caractérisations spectroscopiques par RPE combinées à la mutagenèse dirigée pour les intermédiaires formés artificiellement par le peroxyde d'hydrogène ont permis de détecter d'autres espèces radicalaires, qui peuvent intervenir dans le cycle catalytique de la CcO. Ainsi elles ont mis en évidence la formation du radical tyrosyl (Tyr 167) dans les intermédiaires P_H et F_H .⁸⁸ En revanche, le radical ainsi formé ne pourrait pas être directement impliqué dans le mécanisme enzymatique en induisant la rupture de la liaison O-O, car d'une part la tyrosine 167 est située loin de l'hème a_3 de 10 Å et d'autre part sa mutation ne permet pas d'inactiver totalement la fonction de l'enzyme (Figure 42).

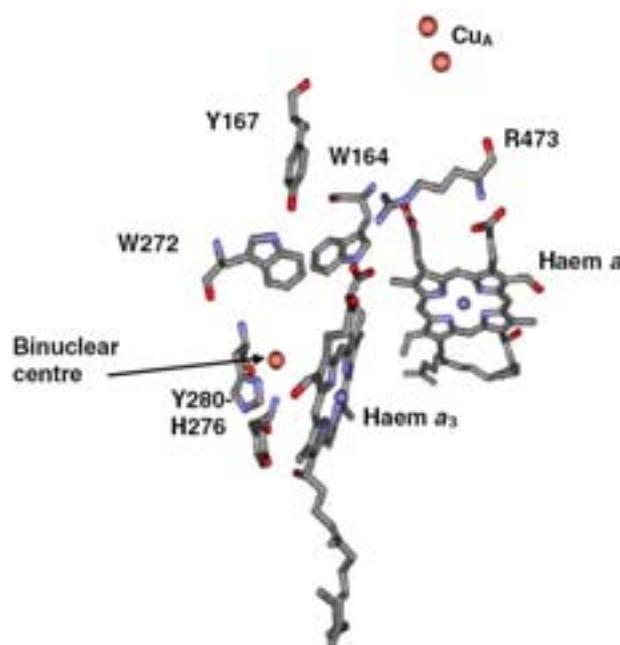


Figure 42 : section de la structure cristalline de la CcO montrant la localisation des principaux cofacteurs tels que les résidus tyrosine, tryptophane, arginine et histidine 276 par rapport au centre binucléaire (PDB file 1QLE).¹³

Récemment, des études de mutagenèse dirigée, de RPE et de spectroscopie optique ont permis d'affirmer que le tryptophane (Trp 272) joue un rôle important dans la formation des

espèces radicalaires observées dans les intermédiaires P_H et F_H générés par le peroxyde d'hydrogène.²⁰⁷ Ce résidu, localisé à une distance de 3 Å de la tyrosine 167 et avec laquelle il forme une liaison hydrogène, est relativement proche du centre binucléaire, à environ 8.5 Å de l'hème a_3 et 5 Å du Cu_B .¹³ Ces études ont permis de mettre en évidence que le deuxième radical formé lors du cycle catalytique de la CcO est un radical cation Trp^+ (Trp 272). Il y a alors transfert d'électron vers le résidu Trp 272. Celui-ci intervient dans la réduction de l'oxygène par transfert d'électron *via* un radical tyrosyle. De plus, ce tryptophane est très bien conservé chez toutes les oxydases.

Il est clair que ces résidus sont les plus utilisés par l'enzyme puisqu'ils sont parmi les plus sensibles à l'oxydation, donc les plus enclins à effectuer des transferts d'électrons. Cependant, il manque à ces arguments une preuve expérimentale irréfutable pour affirmer de manière certaine la localisation du site d'oxydation alternatif.

Afin de déterminer les sites de formation des radicaux (Tyr^{\cdot} et/ou Trp^+) et de mieux comprendre leur rôle dans le déroulement du cycle catalytique de la CcO, nous avons voulu étudier les intermédiaires générés par H_2O_2 ainsi que l'état P_{10} par la spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps. Cette technique, basée sur la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophane en particulier, permet d'obtenir différentes informations dynamiques à des échelles de temps allant d'une dizaine de picosecondes à quelques nanosecondes (méthode décrite au chapitre I). Il faut noter, en outre, qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de données de fluorescence concernant les intermédiaires de la CcO générés par H_2O_2 .

III.1.1 Spectroscopie UV-Visible

Afin de pouvoir corréler les paramètres de fluorescence à un état électronique de la CcO bien défini, les intermédiaires doivent être caractérisés dans les conditions de l'étude de fluorescence.

Dans un premier temps, nous avons optimisé les échantillons pour obtenir les intermédiaires de la CcO selon le protocole utilisé par l'équipe de Hartmut Michel²⁰⁷ mais aux faibles concentrations de la CcO nécessaires pour l'étude par spectroscopie de fluorescence. Les propriétés électroniques de ces intermédiaires ont été analysées par spectroscopie UV-visible. Nous avons ensuite analysé la contribution des résidus tyrosine et tryptophane par spectroscopie de fluorescence.

À l'état natif, c'est-à-dire en absence de substrat, les hèmes a et a_3 de la CcO sont au degré d'oxydation (+III) dont le spectre d'absorption est caractérisé par une bande de Soret à 428 nm et une bande α à 600 nm. Celle-ci est très sensible au changement de l'état d'oxydoréduction des hèmes et de leur environnement immédiat. La réduction de l'oxydase est caractérisée par un déplacement du maximum d'absorption et un affinement du pic dans la bande de Soret de 428 nm (forme oxydée) à 444 nm (forme réduite) et par une forte augmentation de l'absorption à 605 nm dans la bande α (Figure 43).

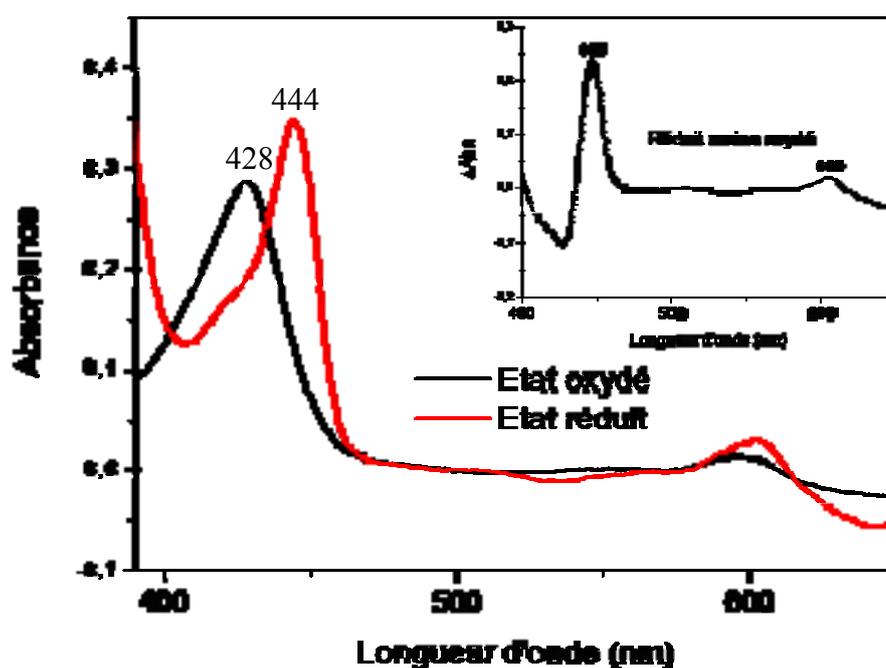


Figure 43 : Spectres UV-Vis de la CcO native de *P. denitrificans*, sous forme oxydée et réduite par un excès de dithionite (20 mM). La protéine est à 3 μ M dans du tampon 20 mM KPi pH 9 0.05 % DDM. Figure en médaillon : spectre de l'oxydase obtenu par différence entre le spectre de la forme réduite et celui de la forme oxydée.

1.1.1 Formation des intermédiaires P_H , F_H et F_H

Comme le peroxyde d'hydrogène est capable de fournir O_2 , $2 e^-$ et $2 H^+$, c'est un réactif très utilisé en lieu et place de O_2 pour générer les intermédiaires de la CcO. La réaction de H_2O_2 avec la cytochrome c oxydase se manifeste par des modifications spectrales suivies par spectroscopie d'absorption. Les spectres représentés dans la Figure 44 correspondent à la réaction de la CcO avec H_2O_2 . Ce sont des spectres de différence obtenus en soustrayant le spectre de la CcO totalement oxydée (O) par le spectre de l'intermédiaire formé, permettant de mettre en évidence les maximums d'absorption caractéristiques des intermédiaires P_H , F_H et F_H de la CcO.

Dans un premier temps, le spectre d'absorption de la CcO à l'état oxydé (état O) est enregistré dans le tampon KPi, 50 mM, pH 9, 0.05 % DDM. L'addition, ensuite, d'un excès molaire de H₂O₂ (1:1 à 1:5) à l'état oxydé conduit à la formation de l'intermédiaire P_H. Le spectre de la protéine est alors enregistré, puis le spectre de différence est calculé. Ce spectre est caractérisé par un maximum d'absorption de la bande α à 607 nm ($\epsilon_{6610-635 \text{ nm}} = 11 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁸⁰ La quantité de CcO convertie à l'état P_H peut être donnée par la Loi Beer Lambert, et elle est d'environ 35 %.

La diminution du pH à 6 entraîne la formation de l'intermédiaire F_H dont le spectre d'absorption différentiel (moins l'état O) montre un déplacement du maximum de l'absorption au niveau de la bande α à $\sim 575 \text{ nm}$ ($\epsilon_{580 \text{ nm}} = 5.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁸⁰ L'ajout d'un large excès (1:500) de H₂O₂ à la solution précédente, permet la formation de l'intermédiaire F dont le spectre différentiel (moins l'état O) est caractérisé par un maximum d'absorption de la bande α à $\sim 577 \text{ nm}$ ($\epsilon_{580 \text{ nm}} = 5.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁸⁰ La quantité de CcO convertie à l'état F_H est relativement importante, elle est estimée d'environ 60 %.

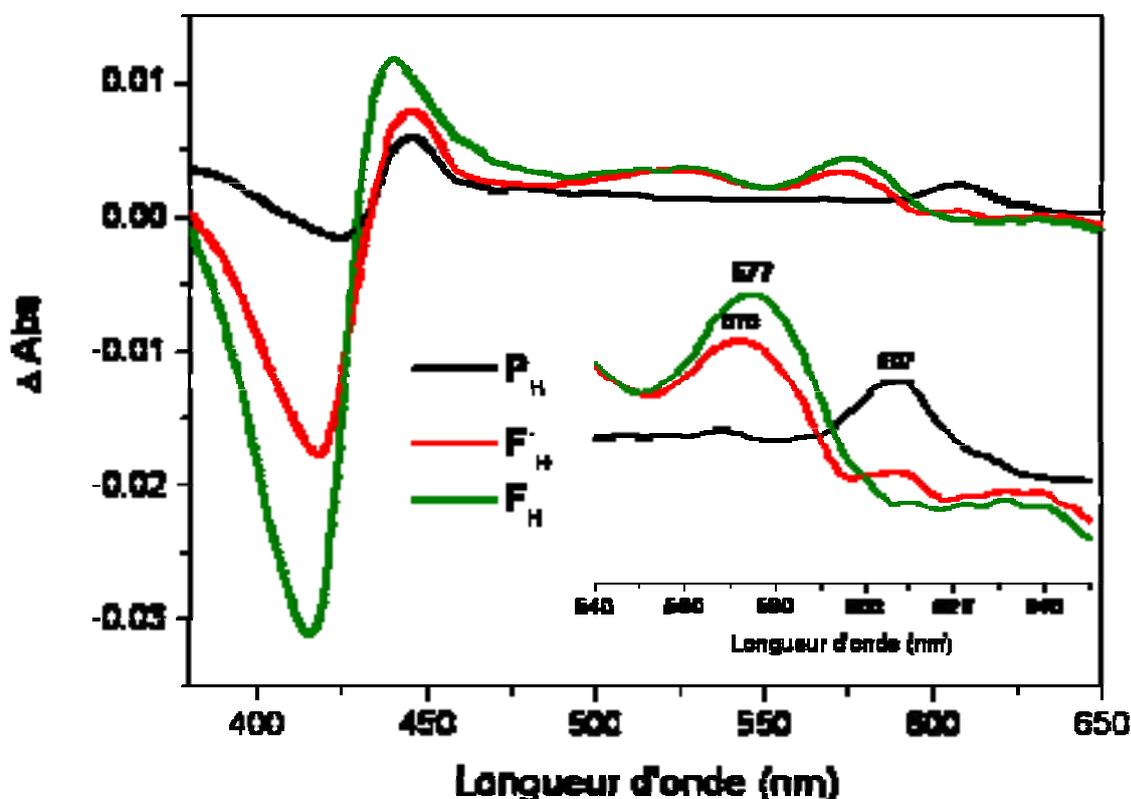


Figure 44 : Spectres d'absorption différentiels des intermédiaires P_H, F_H et F_H (moins l'état O). L'état P_H est formé par un mélange de 5 équivalents de H₂O₂ à une solution contenant 3 μM de la CcO dans 50 mM, KPi pH 9, 0.05 % DDM. L'ajout de 20 μl du Mes-OH pH 6 à la concentration finale de 50 mM permet d'obtenir l'état F_H. l'intermédiaire F_H est formé par ajout d'un large excès de H₂O₂ (1:500).

1.1.2 Formation de l'intermédiaire P₁₀

Le spectre d'absorption de la CcO à l'état oxydé présente, pour des valeurs de pH allant de 6 à 9, deux maxima à 428 et 600 nm. De manière intéressante, l'équipe d'Hartmut Michel a proposé que lorsque le pH augmente de 8 à 10 les deux maxima se déplacent vers le rouge (vers les grandes longueurs d'onde) de respectivement 15 et 10 nm (Figure 45).¹² Ce décalage est lent et se produit en environ une demi-heure. Ces résultats suggèrent que sans ajouter de réducteur, une transition apparente O → P est déterminée par spectroscopie d'absorption différentielle. Ce nouvel état formé par un ajustement de pH de 8 à 10 semble être similaire à l'état P_H, d'où il est appelé P₁₀. Ces études ont montré que la formation et la stabilité de P₁₀ dépendent de la concentration de la CcO. Plus la concentration de la CcO est élevée, plus la vitesse de la formation de l'état P₁₀ est grande, plus la dégradation de cet intermédiaire est rapide.¹² D'autre part, les études de spectroscopie RPE réalisées sur l'état P₁₀ ont révélé la présence d'un radical tyrosyle 167, tout comme pour P_H. Les données obtenues par cette technique indiquent que les deux intermédiaires P_H et P₁₀ sont identiques.¹²

Afin d'évaluer la pertinence de cette hypothèse, nous avons reproduit, dans un premier temps, l'expérience menant à la formation de P₁₀ mais à faible concentration (environ 3 μM) nécessaire pour les études de spectroscopie de fluorescence tout comme la génération des intermédiaires P_H, F_H et F_H.

La Figure 45, montre les spectres d'absorption UV-Vis des intermédiaires P₁₀ et P_H obtenus à partir de 3 μM de CcO dans 10 mM, KPi pH 8, 0.05 % DDM et 50 mM KPi pH 9 0.05% DDM, respectivement.

L'intermédiaire P₁₀ présente un spectre d'absorption semblable à celui de P_H avec un pic d'absorption caractéristique à 610 nm, ce qui indique que la formation de cet état est encore observable à des concentrations faibles de la CcO.

Comme le spectre UV-visible des espèces radicalaires diffère énormément de la forme réduite de l'acide aminé, il est possible de vérifier la présence d'un radical par spectroscopie UV-visible. Il a été montré que la bande à 410 nm observée sur le spectre UV-visible de la RNR (sous-unité R2) est caractéristique du radical tyrosyle, présent en grande quantité dans cet enzyme.²⁰⁸ Toutefois, la détection d'une telle bande vers 410 nm n'est pas possible sur le spectre UV-visible de CcO en raison de la grande absorbance des hèmes dans cette gamme spectrale.

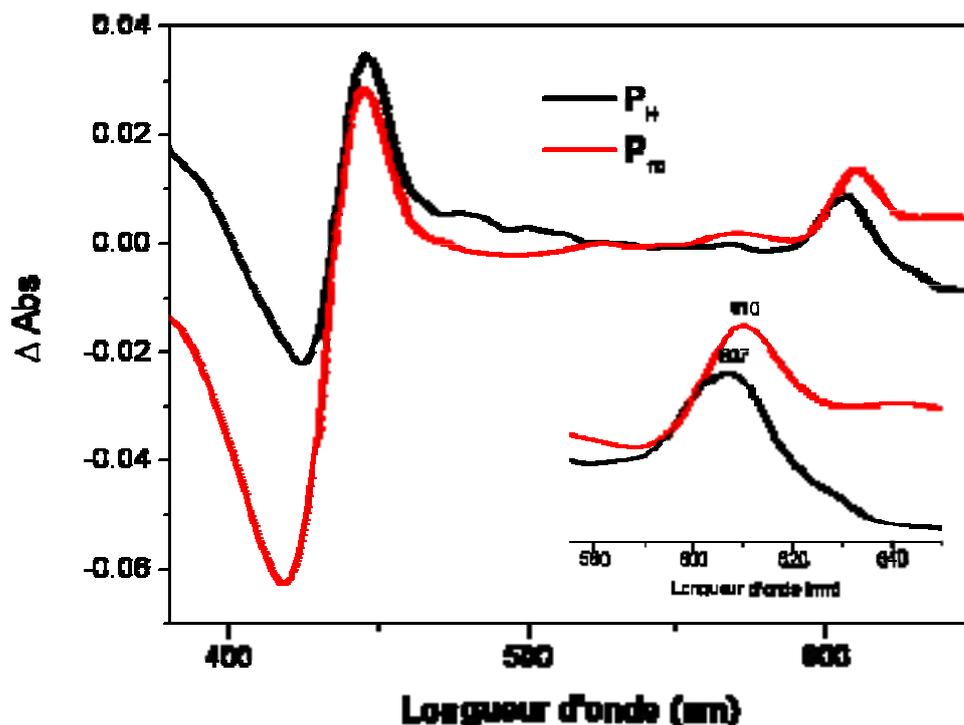


Figure 45 : Spectres d'absorption différentiels des états P_{10} et P_H (moins l'état O) de la CcO. L'état P_{10} est obtenu à partir d'un mélange de $3 \mu\text{M}$ de CcO à l'état oxydé dans un tampon KPi 10 mM , pH 8, 0.05% DDM avec un tampon glycine-OH de concentration finale de 120 mM à pH 10. L'état P_H est formé par addition d'un excès de H_2O_2 (1:5) à une solution de CcO de $3 \mu\text{M}$ dans un tampon KPi 20 mM , pH 9, 0.05% DDM.

Du fait que le tryptophane et la tyrosine absorbent principalement à 280 nm ,¹⁵² nous avons voulu comparer les spectres des états P_H et P_{10} dans cette gamme spectrale. De manière surprenante, la superposition des spectres d'absorption différentiels de P_{10} et P_H (moins l'état O), obtenus avec les mêmes conditions que précédemment mais à une concentration de $10 \mu\text{M}$ de CcO, entre 230 et 340 nm montre distinctement deux pics d'absorption (Figure 46).

La Figure III.6 montre clairement la différence entre les spectres de P_{10} et P_H dans cette zone de fréquences. La bande observée à 293 nm dans le spectre de P_H est déplacée à 282 nm et diminuée en intensité dans le spectre de P_{10} , ce qui suggère un environnement différent des résidus tyrosine et tryptophane entre les deux intermédiaires. Étant donné que la phénylalanine absorbe entre 230 et 260 nm , la bande observée à 245 nm dans les deux spectres mais avec une intensité différente peut correspondre à cet acide aminé. Toutefois, la contribution des hèmes et de la protéine dans cette zone de fréquences rendent l'attribution de ces bandes difficile. Ainsi, l'utilisation d'une technique plus sensible à l'analyse des résidus tryptophanes et tyrosines dans la protéine serait indispensable.

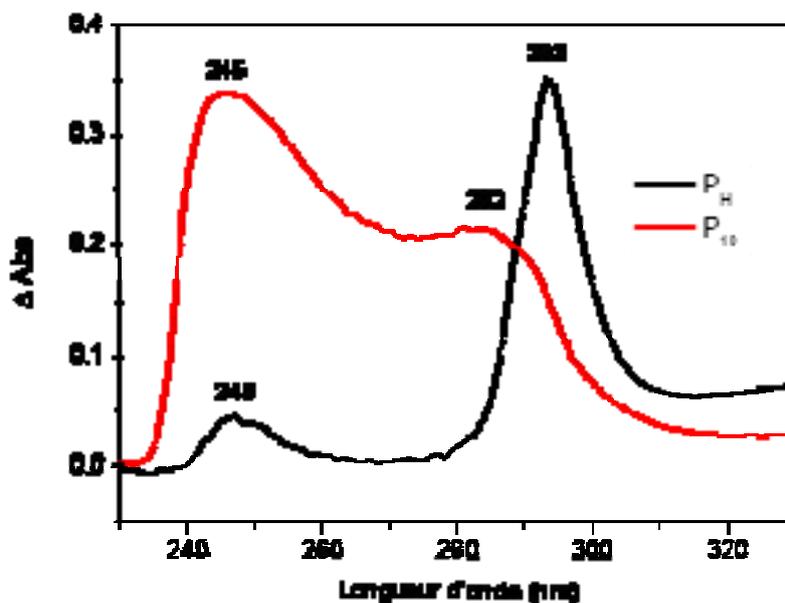


Figure 46 : Spectres d'absorption différentiels des états P_{10} et P_H (moins l'état O). L'état P_{10} est formé par un mélange de 10 μM de CcO, suspendu dans un tampon KPi 10 mM, pH 8, 0.05 % DDM, avec un tampon glycine-OH de concentration finale de 120 mM à pH 10. L'état P_H est formé par addition d'un léger excès de H_2O_2 (1:5) à une solution de CcO de 10 μM suspendu dans un tampon KPi 20 mM pH 9 0.05 % DDM.

III.1.2 Spectroscopie de fluorescence

Par son noyau indole, le tryptophane présente une émission de fluorescence dont les caractéristiques, longueur d'onde et intensité, peuvent être largement modulées par l'environnement de ce noyau. Dès lors, tout évènement qui modifie l'exposition d'un tryptophane tel qu'un changement de conformation ou la liaison d'un ligand a pour effet de modifier sa fluorescence. Avec les outils de la spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire et résolue en temps, nous avons étudié l'influence de la formation des intermédiaires sur l'émission de la fluorescence et les temps de vie de résidus tryptophane, afin d'interpréter le rôle des espèces radicalaires lors de la réaction de la CcO avec H_2O_2 . En outre, l'étude de l'état P_{10} peut donner des informations intéressantes concernant la formation de l'état peroxy. Les études de fluorescence ont été réalisées en collaboration avec Dr. Mariana Voicescu (ancien chercheur dans le laboratoire).

1.2.1 Fluorescence statique

L'étude des interactions protéine-substrat par fluorimétrie repose sur le changement des spectres d'émission des fluorophores (voir chapitre I) dans la protéine lors de la fixation d'un substrat à proximité des fluorophores. La fixation du substrat conduit soit à un changement en

intensité du maximum du spectre d'émission, soit un déplacement du maximum du spectre d'émission.

- Spectres d'émission de la CcO à l'état oxydé (O)

L'excitation de la CcO à 275 nm et à 300 nm donne une émission de fluorescence, dont le maximum est de 326 et 330 nm respectivement (Figure 47). Ces valeurs sont typiques de la présence de la majorité des résidus tryptophane en milieu hydrophobe²⁰⁹ et sont en bon accord avec celles décrites pour la CcO de *cœur de bœuf*, à l'état oxydé.^{210,211} La fluorescence de la CcO, comme celle généralement de la plupart des protéines, est due à la désexcitation des résidus tryptophane. Cependant, ce processus n'est pas simple, la CcO contient d'autres résidus aromatiques (tyrosine et phénylalanine), qui contribuent également à l'absorption et dont les caractéristiques spectrales sont telles qu'un transfert d'énergie sur le tryptophane peut avoir lieu par résonance.

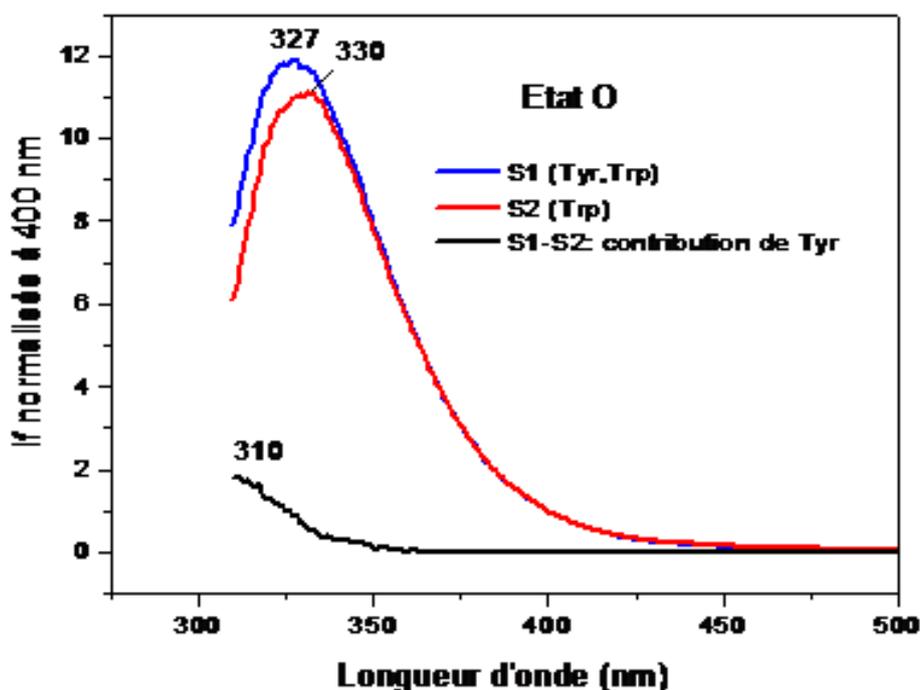


Figure 47 : Spectre d'émission de la fluorescence de la CcO de *P. denitrificans* à l'état O. En bleu le spectre d'émission de la CcO obtenu à partir d'une excitation à 275 nm (S1). En rouge le spectre d'émission de la CcO obtenu par excitation à 300 nm (S2). Les spectres S1 et S2 ont été normalisés à $\lambda = 400$ nm afin de mettre en évidence la contribution des résidus de tyrosine qui fluorescent.

La migration d'énergie est un processus qui a déjà été mis en évidence pour de nombreuses protéines, notamment par l'étude de la dépolarisation de la fluorescence émise.^{212,213} Parmi les différents types de transfert d'énergie possible à l'intérieur d'une protéine, le transfert

tyrosine-tryptophane est particulièrement possible ; son existence a été démontrée dans des protéines telles que la papaïne²¹⁴ et la ribonucléase²¹⁵ et, d'après certains auteurs, il constituerait même une propriété générale de toutes les protéines natives.²¹⁶

Ainsi, pour comprendre et interpréter les données obtenues expérimentalement, il est nécessaire de déterminer d'abord la contribution des résidus tyrosine qui fluorescent à l'état O.

Théoriquement, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de la molécule excitée, en absence d'effet d'écran. Le spectre S1 (ex = 275 nm) correspond à l'émission de fluorescence des résidus Tyr et Trp, tandis que le spectre S2 (ex = 300 nm) permet d'étudier sélectivement l'émission de résidus Trp. Etant donné que l'émission des tryptophanes est observée uniquement entre 320 et 350 nm, donc la normalisation des spectres S1 et S2 à 400 nm suivie par le calcul de différence (S1-S2) permettra d'obtenir le spectre d'émission correspondant uniquement aux résidus tyrosine. Ce spectre est caractérisé par un maximum d'émission à 313 nm. L'étude de plusieurs protéines contenant une tyrosine par spectroscopie de fluorescence a montré que leurs spectres d'émission sont caractérisés par des bandes observées à des longueurs d'onde supérieures à 303 nm. Les maximums d'émission de certaines protéines dépourvues de tryptophane ont été observés à 315 nm pour « parsley plastocyanin »²¹⁷, à 345 nm pour « Indian-cobra-venom cytotoxins »²¹⁸, à 331 nm pour « cow adrenodoxin »²¹⁹...

La contribution des résidus tyrosine qui subissent le processus de fluorescence dans la CcO est estimée à environ 18 %. Cette contribution est trop faible pour détecter des radicaux tyrosyles dans la CcO.

- Spectres d'émission des intermédiaires de la CcO

La même expérience menée sur l'état O a été refaite, en mesurant cette fois la fluorescence intrinsèque des intermédiaires générés artificiellement soit par le peroxyde d'hydrogène (P_H , F'_H et F_H), soit par augmentation de pH (P_{10}).

Les spectres d'émission de fluorescence de différents intermédiaires étudiés, obtenus par excitation à 275 et 300 nm, sont similaires à ceux obtenus pour l'état O (spectres non montrés). En effet, aucun déplacement du maximum d'émission n'a été observé en présence des excès molaires variables de H_2O_2 (1:5 et 1:500) ou en modifiant le pH du milieu (pH 6, 8, 9 et 10). De plus, la contribution de résidus tyrosine qui fluorescent dans

les différents intermédiaires est aussi estimée à environ 20 %. Toutefois, des changements minimes dans l'intensité de fluorescence ont été observés, et qui peuvent résulter d'artefacts de mesures.

Le même phénomène a été observé lors de l'étude de l'interaction du cytochrome *c* avec la cytochrome *c* oxydase du cœur de bœuf par la spectroscopie de fluorescence intrinsèque de tryptophane.²¹¹ En effet, les auteurs suggèrent que l'absence de toute influence de cette interaction sur l'émission du tryptophane est due à une extinction de fluorescence (désignée en anglais par quenching) par transfert de l'énergie de Förster aux hèmes de l'oxydase. La théorie de Förster propose un traitement quantique au phénomène d'interaction entre le dipôle de transition électronique d'émission du donneur et le dipôle de transition électronique d'absorption de l'accepteur. Le transfert d'énergie a lieu lorsque la résonance des deux dipôles se trouve mutuellement perturbée. L'énergie d'interaction dipôle-dipôle décroît suivant le cube de la distance entre les dipôles et dépend de leurs orientations relatives. En outre, ils ont trouvé que l'émission de fluorescence observée est due principalement aux résidus tryptophane situés à une distance supérieure ou égale à 30 Å par rapport aux hèmes. Dans le cas de la CcO de *P. denitrificans*, les résidus Trp 272, Trp 164 et Tyr 167 en question sont localisés à une distance très courte de l'hème a_3 ($d_{\text{Trp } 272\text{-Fe}a_3} = 8,5 \text{ \AA}$, $d_{\text{Trp } 164\text{-Fe}a_3} = 10 \text{ \AA}$ et $d_{\text{Tyr } 167\text{-Fe}a_3} = 10 \text{ \AA}$). Ainsi, si ce transfert d'énergie de Förster est suffisamment efficace entre les hèmes (a et a_3) et les résidus Trp 272, Trp 164 et Tyr 167, il peut entraîner une extinction statique importante de la fluorescence de ces derniers.

Une autre raison peut être envisagée pour expliquer la similarité des spectres des différents intermédiaires est la formation possible d'un anion superoxyde lors de la réaction de la CcO avec H_2O_2 . Il empêche généralement le transfert de proton, ce qui induit à son tour une perturbation du transfert d'électron. En effet, l'initiation des radicaux de tyrosine et de tryptophane au sein des enzymes et leur propagation procèdent majoritairement via le mécanisme de transfert d'électron couplé à un transfert de proton.²²⁰

Nous nous sommes penchés sur la détermination des différences, si elles ont lieu, entre l'état P_H et l'état P_{10} en calculant les spectres différentiels de fluorescence (moins l'état O). La Figure 48 montre les spectres différentiels de fluorescence de P_H et P_{10} obtenus par excitation à 275 nm.

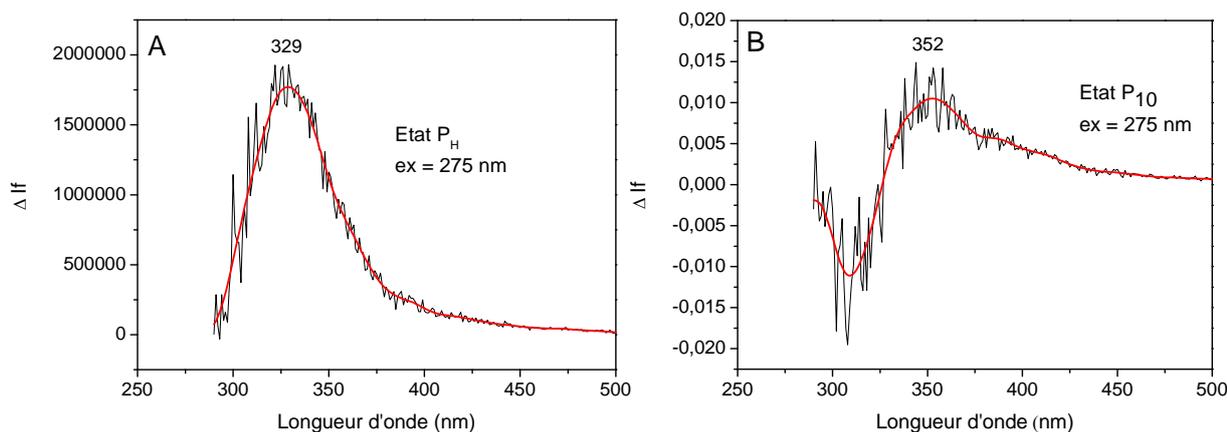


Figure 48 : Spectres différentiels d'émission de fluorescence des intermédiaires P_H et P_{10} obtenus par excitation à 275 nm. (A) P_H , 3 μM de CcO dans 20 mM KPi, pH 9, 0.05 % DDM et 5 équivalents de H_2O_2 . (B) P_{10} , 3 μM de CcO dans 10 mM KPi, pH 8, 0.05 % DDM et 120 mM glycine-OH, pH 10.

Ces données contrastent avec les spectres absolus de fluorescence obtenus pour P_H et P_{10} . Les λ_{max} d'émission (329 nm P_H pour et 352 nm pour P_{10}) montrent bien la différence en terme de polarité de l'environnement locale des résidus Trp dans ces deux intermédiaires. Plus λ_{max} est déplacée vers le rouge plus l'état fluorescent est relaxé, et donc l'environnement du résidu Trp est plus polaire.²²¹ D'après ces observations il semblerait que dans l'état P_{10} , les résidus Trp sont totalement exposés au tampon alors que dans l'état de P_H ils sont enfouis dans la protéine.

Cependant, les spectres différentiels de fluorescence (moins l'état O) des intermédiaires F_H et F_H obtenus par excitation à 275 nm ainsi que tous les spectres de différence calculés pour la longueur d'excitation à 300 nm ne montrent pas de différences significatives.

1.2.2 Déclins de fluorescence

L'étude de la fluorescence temporelle des intermédiaires de la CcO permet, dans un premier temps, d'avoir une idée globale sur le degré d'hétérogénéité (nombre de composante dans le déclin de fluorescence) de leur cinétique de fluorescence correspondante.

Dans les mêmes conditions, nous avons mesuré le déclin de fluorescence pour chacun des intermédiaires. Pour un meilleur ajustement des déclins, jugé par le test statistique réduit χ^2 , les graphes des distributions des résidus montrent une répartition aléatoire des résidus. Ceci est valable pour toutes les expériences menées sur les déclins de fluorescence. Nous nous contenterons ici de présenter le profil de distribution des durées de vie de l'intermédiaire O

sur la Figure 49. Le tableau regroupe tous les paramètres d'un déclin de fluorescence ainsi extraits pour chaque intermédiaire.

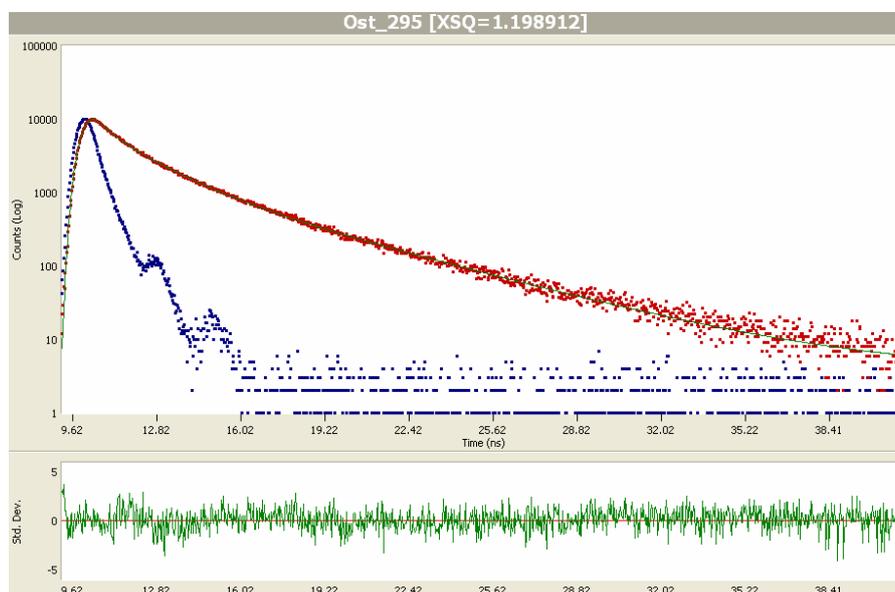


Figure 49 : Étude standard de déclin de fluorescence de l'intermédiaire O. Le graphe montre en haut le déclin de fluorescence mesuré (points) et calculé (traits continus), et en bas la courbe de distribution des résidus. L'acquisition de déclin de fluorescence a été réalisée par la méthode de comptage de photons uniques corrélés en temps dont le principe de cette technique est présenté dans le chapitre II matériel et méthode p 77.

Intermédiaires	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
Etat O	1.67	0.30	4.59	1.19
Etat P_H	1.69	0.30	4.61	1.31
Etat F_H	1.34	0.22	4.07	1.23
Etat F_H	1.19	0.15	3.90	1.25
Etat P₁₀	1.53	0.25	4.54	1.30

Tableau 8 : Ensemble des temps de vie extraits des déclin de fluorescence standard de chacun des intermédiaires, obtenu par la méthode de moindres carrés.

Le déclin de fluorescence du Trp, dans les différents intermédiaires de la CcO obtenus, est triexponentiel. Cela signifie qu'il est caractérisé par trois durées de vie qui peuvent être attribuées à des classes de conformères où les résidus Trp ont des positions différentes par rapport aux groupements inhibiteurs de fluorescence.

L'origine de l'hétérogénéité de la cinétique à l'état excité du résidu tryptophane dans les protéines reste un débat très ouvert. Parmi les modèles qui ont été proposés pour justifier cette hétérogénéité, le plus couramment admis est celui de l'équilibre conformationnel à l'état fondamental ou modèle des rotamères.^{222,223} Ce modèle propose que les rotamères de la chaîne latérale du Trp s'interconvertissent lentement par rapport à la durée de vie de l'état excité. Par conséquent, à chaque rotamère est associée une durée de vie de fluorescence qui résulte de l'interaction avec des groupements inhibiteurs proches.

La comparaison des temps de vie des différents intermédiaires indique que les durées de vie longues, intermédiaires et courtes sont très similaires, ce qui suggère que l'intensité de fluorescence des résidus tryptophane en question, à savoir Trp 272 et Trp 164, n'est pas affectée lors de la réaction de la CcO avec H₂O₂ ou lors de la formation de P₁₀.

Une autre fois, les résultats de la fluorescence temporelle nous ramènent à la même conclusion déjà évoquée avec la fluorescence statique, à savoir que l'extinction de la fluorescence par des processus non radiatifs lié directement au degré d'accessibilité du résidu Trp en question au solvant est très importante.

III.2 Caractérisation des intermédiaires de la CcO par spectroscopie IR

De nombreuses études menées sur la CcO par spectroscopie IRTF couplée à l'électrochimie ou à la photochimie dans l'IR moyen (1800-1000 cm⁻¹) ont mis en évidence des variations de l'état de protonation de certains acides aminés liées au changement de l'état d'oxydoréduction des centres métalliques, et ont permis de suivre les modifications structurales internes qui surviennent lorsque la protéine accomplit ses fonctions catalytiques.²²⁴⁻²³⁰

Bien que la spectroscopie ATR-IRTF couplée à la perfusion des solutions tampons de compositions ou de pH différents soit une technique particulièrement adaptée pour mettre en évidence les modifications structurales des protéines, provoquées par le changement d'état redox des centres métalliques ou par les transitions entre les intermédiaires du mécanisme enzymatique, peu de données existent sur les modes IR spécifiques des états de protonation des acides aminés et des interactions métal-ligands des intermédiaires de la CcO générés par le peroxyde d'hydrogène. Certains modes IR de l'état P_H ont été attribués grâce à des substitutions isotopiques, tandis que ceux de l'état F_H et F'_H sont largement méconnus.^{171,231-}

²³³ De plus, les études récentes, fort rares sur les intermédiaires de la CcO dans le domaine de l'infrarouge lointain, n'ont pas à notre connaissance, permis de distinguer de telles vibrations.

L'application de la spectroscopie ATR-IRTF couplée à la perfusion à l'étude de la CcO dans le domaine des basses fréquences pourrait compléter les données existantes sur les modes de vibration métal-ligands, obtenues par spectroscopie de RR, et apporterait des informations nouvelles sur des contributions des acides aminés ou de la chaîne polypeptidique non accessibles à la spectroscopie de RR. En outre, les modifications structurales du site actif liées au changement de l'état d'oxydoréduction du Cu_B au cours du mécanisme réactionnel peuvent être élucidées.

Afin d'identifier avec certitude les modes de vibrations cuivre-histidine et pour mieux comprendre les propriétés vibrationnelles des interactions cuivre-ligands, nous avons étudié deux variantes de la CcO reconstituées avec les isotopes purs du cuivre 63 et 65 (⁶³Cu_B-CcO et ⁶⁵Cu_B-CcO).

III.2.1 Caractérisation des intermédiaires dans le domaine de l'IR moyen

Afin de valider l'approche par spectroscopie IR différentielle couplée à la perfusion pour l'analyse des intermédiaires de la CcO dans les basses fréquences, nous nous sommes tout d'abord intéressés à étudier ces intermédiaires dans le domaine de l'IR moyen.

2.1.1 Spectres préliminaires du film stable de la CcO

Comme nous l'avons vu dans le chapitre introduction, l'obtention d'un film dépourvu de détergent ("culot") est un prérequis pour les expériences d'ATR-IRTF de perfusion. La préparation du culot est détaillée dans le chapitre matériel et méthodes.

Au début de notre expérience, il nous a été nécessaire de vérifier l'adhésion du film de la CcO sur le cristal de l'ATR et de contrôler sa stabilité par spectroscopie IR. La Figure 50 montre les spectres ATR-IRTF d'absorption enregistrés pendant la phase d'obtention d'un film réhydraté de la CcO.

Lorsqu'on dépose le culot sur le cristal de l'ATR, on observe un spectre (a) essentiellement dominé par l'absorption de l'eau. Après séchage, on retrouve un spectre (b) brut caractéristique des protéines avec les bandes amides I et II ayant leurs pics respectifs à 1650 et 1539 cm⁻¹. L'échantillon séché est ensuite réhydraté avec du tampon 50 mM KPi à pH 9, ce qui entraîne à nouveau l'apparition des bandes de l'eau aux dépens de celles de la

protéine qui se retrouvent diminuées (c). Cependant, l'intensité des bandes de la protéine se stabilise rapidement et la perfusion continue du tampon 50 mM KPi à pH 9 pendant environ 1h permet la stabilisation et l'adhésion du film sur le cristal de la cellule ATR.

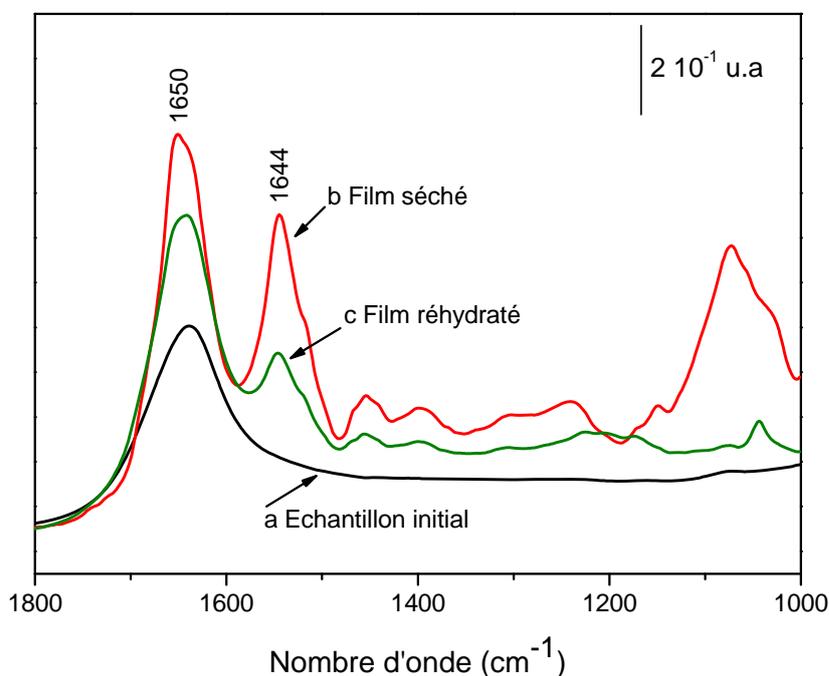


Figure 50 : Spectres ATR-IRTF de la CcO de *P. denitrificans* obtenus durant la phase de la préparation du film réhydraté. Spectre (a) est enregistré immédiatement après le dépôt de l'échantillon sur la surface du silicium. Spectre (b) est enregistré après le séchage de l'échantillon à l'air. Spectre (c) est enregistré après la réhydratation du film avec 20-30 μl du tampon KPi 50 mM pH 9.

2.1.2 Cycles de réduction et d'oxydation

Afin de s'assurer que l'oxydase se trouve dans son état activé permettant la génération des intermédiaires, un cycle de réduction et de réoxydation du film réhydraté est réalisé par la perfusion d'une solution de dithionite suivie par celle de ferricyanure ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$).

Les spectres ATR-IRTF de différence réduit moins oxydé de la CcO de *P. denitrificans* sont enregistrés entre 1800 et 1000 cm^{-1} (Figure 51). Les spectres ATR-IRTF présentés ci-avant sont le résultat de la moyenne de deux cycles redox indépendants. Dans le spectre réduit moins oxydé (R-O), les signaux négatifs correspondent à la forme oxydée et les bandes positives à la forme réduite de la protéine. Le spectre de différence oxydé moins réduit correspondant à l'oxydation de la CcO est réversible, ce qui indique que les bandes présentes sur le spectre de différence sont dues spécifiquement à des modes de la CcO sensibles à l'état d'oxydoréduction des hèmes *a* et *a₃* et de la chaîne peptidique.

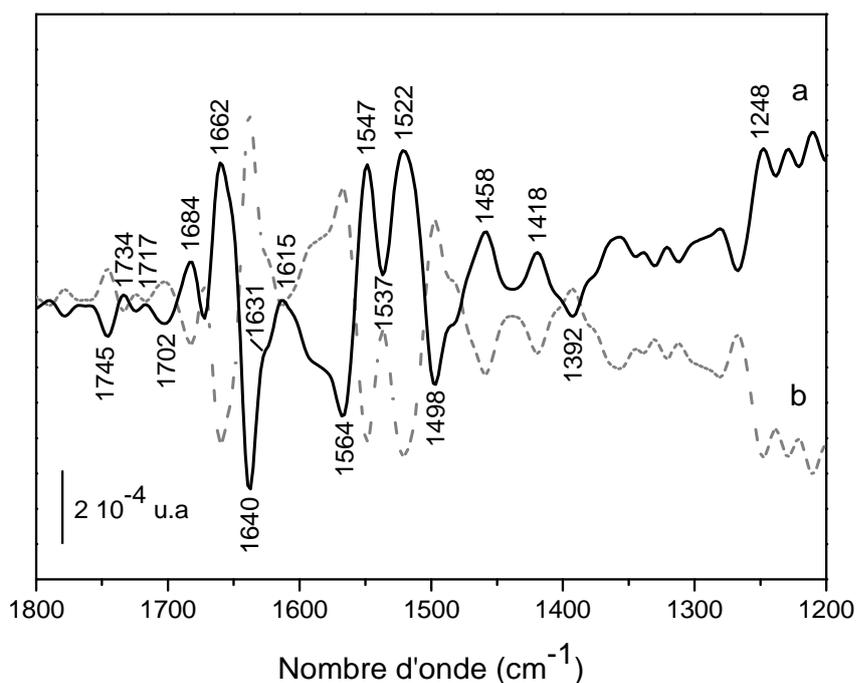


Figure 51 : Spectres ATR-IRTF de différence de la CcO de *P. denitrificans* dans un tampon KPi 50 mM pH 9. (a), le spectre réduit moins oxydé (R-O) obtenu par la perfusion de la dithionite. (b), le spectre oxydé moins réduit (O-R) obtenu par la perfusion du ferricyanure.

Le spectre R-O obtenu est très proche de celui publié pour la CcO de *P. denitrificans*.^{170,234,235} Ces études ont montré que ce spectre était dominé par le changement des modes IR spécifiques de la chaîne polypeptidique des amides I et II, observés entre 1700-1610 et 1570-1500 cm^{-1} , respectivement. Toutefois, des modes de vibrations impliquant l'hème et ses substituants ont été également détectés dans ce spectre,²³⁶⁻²³⁸ incluant les bandes observées à 1640(-) et 1631(+) attribuées à des vibrations d'un groupement formyle de l'hème a_3 .²³³ La bande à 1615(+) cm^{-1} a été attribuée à une vibration d'élongation $\nu(\text{C}=\text{C})$ du groupement vinyle de l'hème a_3 .²³⁹ La bande positive à 1684 cm^{-1} a été associée à une contribution de l'acide propionique.²³⁵ Certaines bandes observées dans les zones de fréquences 1550-1380, 1370-1340 et 1250-1210 cm^{-1} sont également affectées par le changement de l'état d'oxydoréduction du fer, et sont donc attribuées à des modes de vibration des hèmes. La bande à 1564 cm^{-1} est associée au mode ν_{38x} des hèmes a et a_3 .³⁵ Les bandes à 1547 et 1522 cm^{-1} sont respectivement attribuées à au mode ν_{38y} de l'hème a et l'hème a_3 lorsque le fer est sous la forme Fe(II).³⁵ La bande positive à 1662 cm^{-1} correspond au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ d'un groupement CHO de l'hème a_3 .³⁵ La bande à 1745(-)/1734(+) a été attribuée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ d'un groupement carboxylique, provenant du Glu 278.^{44,224,240} Le signal à 1702 cm^{-1} (-) est également associé au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ des acides aminés aspartate (Asp) ou glutamate (Glu). La bande à 1498 cm^{-1} est attribuée au mode ν_{19} , la vibration (CC)

de Tyr-O⁻.^{241,242} La bande à 1248 cm⁻¹ pourrait provenir de la contribution des vibrations d'élongation $\nu_{7'a}(\text{CO})$ et de déformation $\delta(\text{COH})$ de la chaîne latérale de la tyrosine.²⁴³

Les bandes obtenues dans la zone de fréquences 1460-1200 cm⁻¹ contrastent avec celles obtenues dans le spectre R-O publié.²³³ Certains modes observés dans cette région ne sont pas détectés dans le spectre obtenu (Figure 51 a). Ceci peut être dû à la différence de la ligne de base entre 1400 et 1200 cm⁻¹. Une bande à 1420 cm⁻¹ dans le spectre IRTF de différence de la CcO avait été attribuée au mode ν_{19} , la vibration (CC) du cycle de la Tyr-D₄.²⁴³ Nous avons proposé que la bande observée à 1418 cm⁻¹ corresponde au mode ν_{19} .

2.1.3 Intermédiaires P_H et F_H

La formation des intermédiaires P_H et F_H par la perfusion d'un tampon contenant du H₂O₂ sur un film de la CcO à l'état O activé a été mise en évidence dans un premier temps par spectroscopie UV-Vis.^{83,231,244} Toutefois, ces études ont montré que la perfusion d'un tampon contenant une concentration élevée de peroxyde d'hydrogène provoque la dégradation des hèmes, et empêchent donc la formation des intermédiaires, notamment l'état F_H.⁶⁸ Ainsi, les meilleures conditions pour éviter des telles réactions défavorables et obtenir un rendement maximal des intermédiaires nécessitent la perfusion d'un tampon contenant une concentration relativement faible de H₂O₂ (~0.5 mM) pendant un temps très bref (~30s). Ces conditions ont permis d'obtenir un rendement maximum de 30-40 % en P_H et de 60-75 % en F_H.^{170,231}

Afin de pouvoir corréler les modes IR observés à un état de la CcO bien défini, les auteurs ont développé un montage permettant d'enregistrer les spectres ATR-FTIR et ceux d'absorption UV-Vis correspondant simultanément. Les spectres d'absorption UV-Vis absolus ou de différence sont enregistrés à l'aide d'une fibre optique permettant de délivrer un faisceau lumineux collimaté à travers le film réhydraté de CcO déposé sur le cristal de la cellule de perfusion.²⁴⁵

Nous avons donc essayé de reproduire ces conditions pour générer les intermédiaires P_H et F_H. Étant donné que le spectromètre utilisé ne permet pas de réaliser les mesures des spectres IR et UV-Vis simultanément, les spectres obtenus des intermédiaires P_H et F_H seront comparés avec les données de la littérature.^{170,231} Pour ce faire, nous avons circulé le tampon KPi 50 mM, pH 9 à travers le film de la CcO déposé sur le cristal de l'ATR jusqu'à la stabilisation de la ligne de base. Un spectre de référence est ensuite enregistré puis la perfusion du tampon contenant 0.5 mM de H₂O₂ pendant 30 s devrait engendrer le spectre différentiel de P_H (moins l'état O). De la même façon que précédemment, le spectre

différentiel de F_H (moins l'état O) devrait être obtenu après une perfusion de H_2O_2 (0.5 mM) pendant 60s. Ces spectres de différence permettent d'observer directement les modifications induites par les intermédiaires par rapport à l'état oxydé de la CcO. Les 7 échantillons que nous avons utilisés lors de cette étude ont permis de réaliser deux à trois cycles de perfusion de tampon sur le même échantillon. La majorité des acquisitions se sont révélées inutilisables du fait d'un rapport signal/bruit trop faible ou l'observation d'une bande large et intense aux alentours de 1636 cm^{-1} caractéristique de la vibration de déformation de l'eau.

La Figure 52 montre les spectres ATR-IRTF de différence enregistrés après une perfusion de tampon 0.5 mM H_2O_2 pendant 30s (spectre a), 60s (spectre b) et 120s (spectre c). Ces spectres sont le résultat de l'accumulation de 64 à 128 scans.

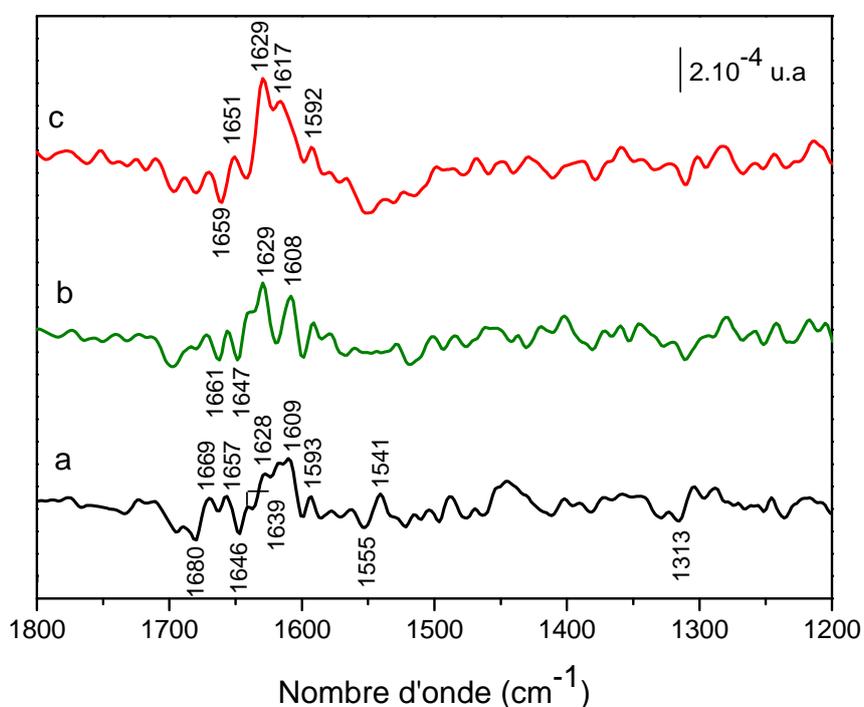


Figure 52 : Spectres ATR-IRTF de différence de la CcO de *P. denitrificans* obtenus par la perfusion du tampon KPi 50 mM pH 9 contenant 0.5 mM de H_2O_2 . (a) Spectre différentiel de P_H (moins l'état O) obtenu après une perfusion du tampon contenant 0.5 mM de H_2O_2 pendant 30s. (b) Spectre différentiel de F_H (moins l'état O) obtenu après la perfusion du même tampon pendant 60s. (c) Spectre différentiel (moins l'état O) après un transition du tampon contenant H_2O_2 pendant 120s.

Bien que le rapport signal sur bruit est faible, il est possible de détecter la présence de certaines bandes notamment dans la zone des fréquences $1680\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$. Les signaux observés à 1680, 1669, 1657, 1646, 1639, 1609, 1593, 1555, 1541 et 1313 cm^{-1} dans le spectre (a) se retrouvent dans celui de l'état P_H publié^{170,233} à des fréquences légèrement différentes, ce qui suggère que le spectre (a) peut correspondre à l'état P_H .

Les bandes à 1680 (-) et 1669 (+) cm^{-1} sont attribuées au mode formyle de l'hème a_3 .²³⁹ La bande à 1639 (+) cm^{-1} est attribuée à une vibration spécifique de la tyrosine (Tyr amide I).²⁴⁵ Le signal à 1657 cm^{-1} peut provenir d'une contribution de l'arginine (Arg). Une bande similaire a été observée à 1611 cm^{-1} dans le spectre de l'intermédiaire P_M (moins l'état O) de la CcO du *cœur de bœuf*, mais elle était absente dans le spectre de l'état F.¹⁷⁰ Ces observations suggèrent que l'analyse de cette bande dans les spectres des différents intermédiaires peut révéler des détails sur les changements conformationnels qui peuvent avoir lieu au niveau du site actif. L'attribution de la bande à 1541 cm^{-1} n'est pas encore définitive, mais les auteurs proposent qu'elle provient soit d'une contribution de l'hème a_3 soit d'une liaison C-N de His-Tyr. Grâce aux données fournies par les composés modèles, la bande observée à 1313(-) a été attribuée à la déprotonation du groupe phénol de His-Tyr.²³⁹

Par comparaison du spectre de l'intermédiaire F_H publié¹⁷⁰ aux spectres (b) et (c), il semble que l'allure du signal du spectre (c) est voisin celui de l'état F_H . De plus, la bande observée à 1659 (-) dans le spectre (c) est similaire à celle reportée pour l'état F_H . En raison de la compétition entre les deux réactions, l'une permettant la formation des intermédiaires et l'autre conduisant à la dégradation des hèmes, il est important de visualiser si la réaction souhaitée de la formation des intermédiaires, notamment l'état F_H , par la perfusion de H_2O_2 est effective.

La difficulté pour obtenir des spectres à la fois spécifiques et reproductibles des intermédiaires P_H et F_H provient manifestement de la difficulté d'effectuer un grand nombre de cycles permettant d'améliorer la qualité du rapport signal/bruit.

2.1.4 Intermédiaire P_{10}

Nous avons ensuite tenté d'obtenir l'intermédiaire P_{10} en utilisant le même protocole, mais en faisant circuler une solution de tampon 100 mM CHES à pH 10 sur un échantillon de la CcO adhérent à la surface du cristal. Le spectre obtenu ne correspond pas à un spectre différentiel, dans lequel les contributions de groupes chimiques spécifiques peuvent être détectées. Il est dominé par les bandes amide I et II observées à 1655 et 1544 cm^{-1} (spectre non montré).

La comparaison du spectre obtenu avec celui du tampon CHES 100 mM pH 10 enregistré sur ATR montre que le CHES présente des signaux intenses qui recouvrent partiellement le signal de la protéine. Théoriquement, l'acquisition des spectres en mode différentiel devrait annuler l'absorption du tampon. Cette observation est probablement due à la difficulté de

recouvrir toute la surface du cristal de l'ATR par la protéine du fait de la faible quantité obtenue du culot. En effet, la quantité d'enzyme nécessaire pour recouvrir toute la surface de l'ATR de la cellule de perfusion est de l'ordre de 5 μl , tandis que, le protocole utilisé pour obtenir de la protéine dépourvu de détergent permet d'avoir au maximum 2 μl du culot.

III.2.2 Étude de la CcO dans l'IR lointain (700-50 cm^{-1})

Le domaine spectral de l'IR lointain est un outil de caractérisation précieux permettant d'obtenir de nouvelles informations sur des processus physiques et chimiques. Cependant, peu d'études existent sur les modes IR des protéines dans le domaine des basses fréquences. Le domaine de l'IR lointain comprend, comme dans l'IR classique, des contributions peptidiques, nommés amide IV, V et VI (800-500 cm^{-1}) et amide VII (au dessous de 250 cm^{-1}). Des modes de vibration impliquant le métal et ses ligands ont été également détectés entre 500 et 250 cm^{-1} . Ces vibrations de faible énergie, devraient apporter des informations déterminantes pour l'étude des liaisons chimiques et des interactions entre le métal et son environnement. L'application de la spectroscopie IR à l'étude structurale de la CcO, comme toute hémoprotéine, en solution nécessite cependant quelques adaptations techniques qui sont détaillées dans le paragraphe suivant.

2.2.1 Spectres de différence des intermédiaires de la CcO

La cellule ATR de perfusion utilisée dans le domaine de l'IR moyen ne transmet plus le faisceau IR pour des fréquences inférieures à 1000 cm^{-1} . Ainsi, il est nécessaire d'adapter l'appareillage optique à l'exploration d'un domaine de fréquence où sont mises en jeu des vibrations de faible énergie.

Afin d'accéder à des spectres de la protéine dans le domaine des basses fréquences, nous avons utilisé un accessoire ATR diamant muni d'un support métallique permettant la circulation des différents tampons. Les tentatives pour obtenir des spectres en mode différentiel dans ce domaine se sont également soldées par des échecs. Lors de la perfusion du tampon, nous avons constaté la diminution progressive de l'intensité de la bande amide II, jusqu'à sa disparition totale en quelques minutes. Ce phénomène indique que la protéine n'adhère pas sur le cristal de diamant comme dans le cas du cristal de silicium. Si la protéine est concentrée d'avantage pour enlever toute trace du détergent, celle-ci peut se dénaturer.

Face à ces difficultés pour obtenir les intermédiaires de la CcO en utilisant la spectroscopie IR en mode différentiel, nous avons envisagé d'étudier les intermédiaires de la

CcO native et ses isotopes de cuivre par l'acquisition des spectres d'absorption IR dans les basses fréquences en utilisant deux types de techniques IR: la technique ATR et la technique transmission.

2.2.2 Spectre ATR de la CcO à l'état oxydé (O)

La Figure 53 présente le spectre ATR-IRTF de la CcO à l'état oxydé. Le spectre ATR est enregistré immédiatement après avoir séché la protéine, déposée à la surface du cristal diamant, avec un léger flux d'argon (Figure 53).

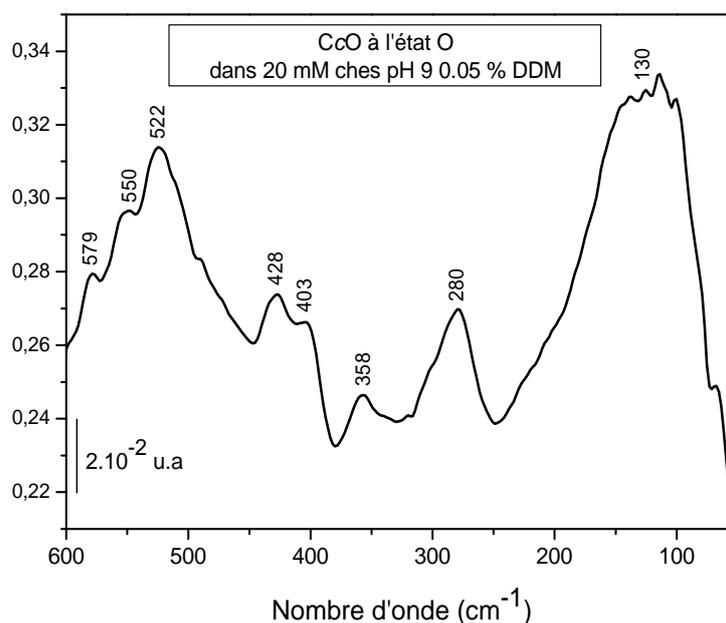


Figure 53 : Spectre ATR-IRTF de la CcO à l'état oxydé à température ambiante.

Le spectre ATR de la CcO enregistré dans les basses fréquences (Figure 53) présente un profil caractéristique de protéine. Dans la zone de fréquences 700-500 cm⁻¹, les bandes des amides IV et VI sont attendus. Ces deux bandes ont été attribuées à un couplage des vibrations de déformation dans le plan du mode C=O du groupe CONH et de déformation des liaisons C-C-N et C-C de la chaîne protéique.²⁴⁶⁻²⁴⁸ D'une manière générale, les bandes des amides IV et VI ne sont pas observées dans le spectre de résonance Raman.

Une bande large attribuée à l'amide VI et sensible au changement de la structure secondaire a été détectée à 580-450 cm⁻¹ dans les spectres ATR-IRTF de nombreuses hémoprotéines, incluant la cytochrome *c* oxydase, le complexe cytochrome *bc*₁, le complexe I, ainsi que la Rieske.¹⁰ Dans le spectre ATR de la CcO, la région de l'amide VI présente un signal intense à 522 cm⁻¹, un épaulement vers 550 cm⁻¹ et une bande de faible intensité à 579

cm^{-1} . La bande à 522 cm^{-1} a été associée à une contribution majoritaire de l'hélice α , tandis que l'épaule vers 550 cm^{-1} est attribué à un feuillet β .¹⁰

Au dessous de 300 cm^{-1} , les vibrations des mouvements collectifs dus aux liaisons hydrogène sont généralement attendus. La bande large observée à 130 cm^{-1} avec une intensité très élevée dans le spectre de la CcO (Figure 52) pourrait correspondre à des contributions de liaisons hydrogène formées dans la structure de la CcO à l'état oxydé. Il est important de noter que le spectre ATR de la CcO est dominé par l'absorption par la contribution du tampon (CHES, 20 mM) et de détergent (DDM, 0.01 %) malgré les faibles concentrations utilisées de ces derniers (Figure 54).

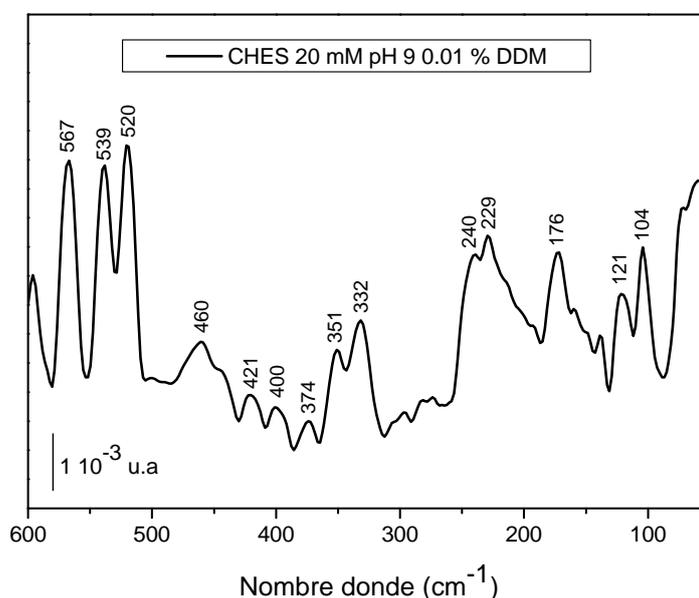


Figure 54 : Spectre ATR-IR du tampon CHES 20 mM pH 9 0.01 % DDM.

Les spectres IR des modèles synthétiques des hémoprotéines ont montré que les bandes correspondant aux modes de vibrations d'hème et des liaisons métal-ligands étaient comprises entre 500 et 350 cm^{-1} . Ainsi, les bandes observées à 428 , 403 et 358 cm^{-1} dans le spectre ATR de la CcO à l'état oxydé pourraient provenir des modes IR impliquant les hèmes a et a_3 et leurs ligands axiaux. Cependant, l'origine de la bande à 280 cm^{-1} est loin d'être évidente. Elle peut s'agir soit modes provenant de la chaîne polypeptidique (amide VII), soit de modes couplés impliquant les hèmes et leurs ligands axiaux. Des études menées par spectroscopie de résonance Raman sur la CcO ont permis d'identifier le mode de vibration symétrique $\nu(\text{Fe-His})$ à $\sim 213 \text{ cm}^{-1}$ pour les oxydases de type aa_3 .²⁴⁹ Les vibrations métal-ligands observée en IR sont théoriquement antisymétriques et sont donc attendues à des fréquences plus élevées que celles actives en Raman.²⁵⁰

2.2.3 Comparaison des spectres en transmission et en ATR de $^{63}\text{Cu-CcO}$ et $^{65}\text{Cu-CcO}$

La Figure 55 présente les spectres IR typiques, en transmission et ATR, de deux isotopes du Cu_B (63 et 65) de la CcO à l'état oxydé. Les spectres ATR ont été enregistrés immédiatement après avoir séché la protéine, déposée à la surface du cristal diamant, avec un faible flux d'argon (Figure 55 A) et à température ambiante. Les spectres en transmission ont été enregistrés après avoir déposé la protéine soit sur une fenêtre de polyéthylène (Figure 55 B), soit sur une fenêtre de silicium (Figure 55 C) et à 6°C.

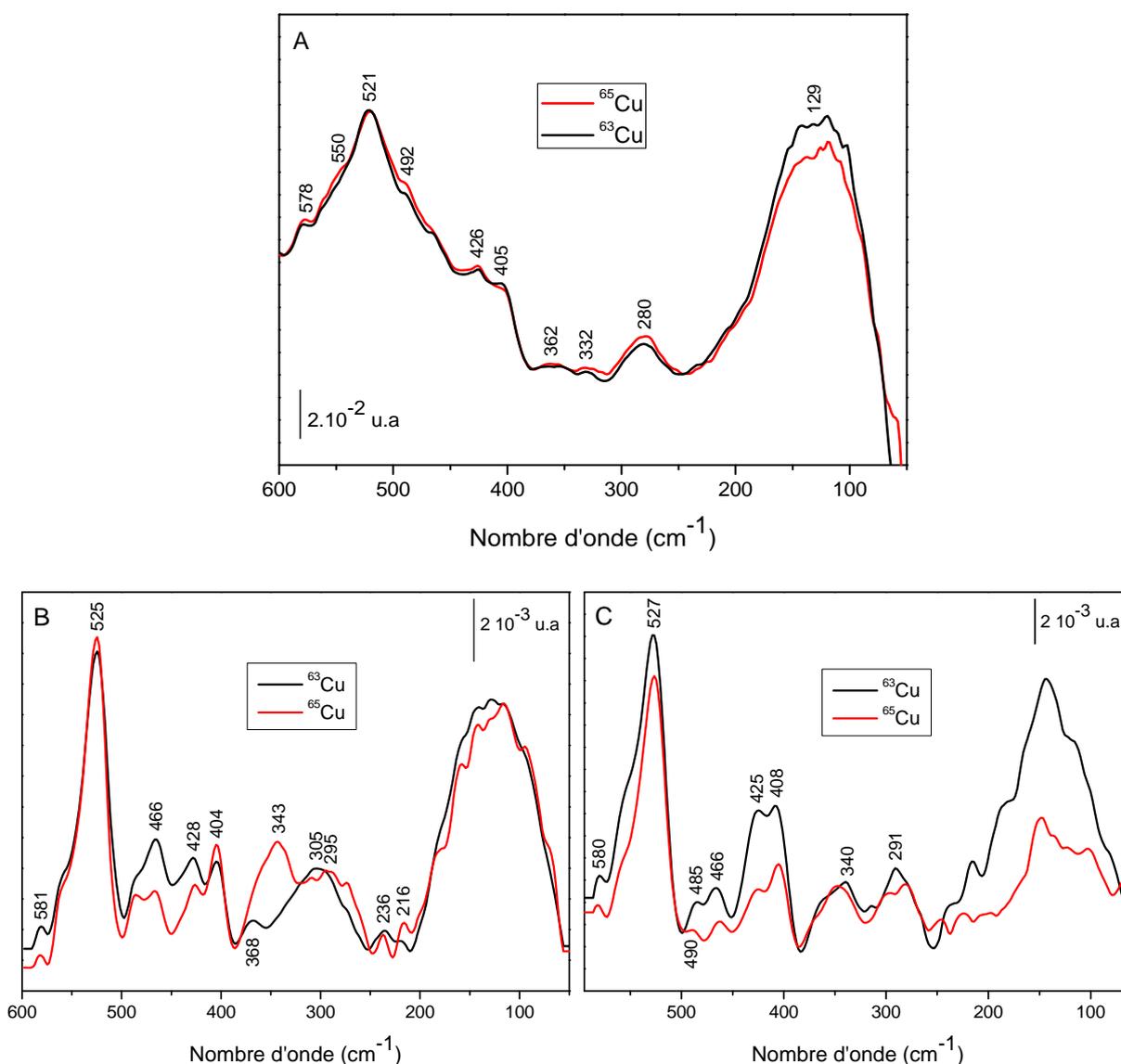


Figure 55 : Spectres enregistrés en ATR et en transmission pour les isotopes $^{63}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ et $^{65}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ à l'état oxydé. A) enregistré en ATR, B) enregistré en transmission (fenêtre de polyéthylène) et C) enregistré en transmission (fenêtre de silicium).

Les modes de vibration métal-ligands sont sensibles à la nature et à la masse des métaux, donc les spectres des CcO modifiées par le marquage isotopique du Cu_B devraient permettre

d'identifier les bandes IR correspondant aux modes impliquant le cuivre et ses ligands. La Figure 55A montre les spectres ATR de deux isotopes du Cu_B de la CcO ($^{63}\text{Cu-CcO}$ et $^{65}\text{Cu-CcO}$) enregistrés dans le tampon CHES 20 mM pH 9 0.01 % DDM. Ces deux spectres ne montrent aucune différence significative sur toute la gamme de fréquences de 600 à 50 cm^{-1} , malgré la différence de la ligne de base. Dans les complexes $\text{Cu}(\text{ImH})_2\text{Cl}_2$ et $\text{Cu}(\text{ImH})_4\text{Cl}_2$, le déplacement isotopique $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ du mode Cu-N-ImH détecté est d'environ 3 à 4 cm^{-1} .²⁵¹ Le déplacement isotopique provoqué par la substitution du cuivre par le ^{63}Cu et ^{65}Cu pour la CcO est donc trop faible pour pouvoir être détecté dans les spectres ATR de résolution 4 cm^{-1} . Lorsque la résolution est augmentée à 2 cm^{-1} , de même aucun effet du marquage isotopique du cuivre n'a été observé.

Dans les spectres IR de la CcO, enregistrés en transmission (Figure 55 B et C), La bande à 525-527 cm^{-1} impliquant la contribution de l'amide VI apparaît plus intense avec un largeur de bande à mi-hauteur plus faible par rapport à celle observée dans le spectre ATR (Figure 55 A), ce qui a permis la détection de deux nouvelles bandes aux alentours de 485 et 466 cm^{-1} .

Ces différences relevées en ce qui concerne les profils (aires position, intensité et largeur à mi-hauteur) des bandes observées dans les spectres ATR et celles en transmission sont dues essentiellement à un effet d'interaction avec la surface du matériel. De telles observations ont également été relatées par Pevsner et Diem²⁵² qui attribuent ces changements à la solvation des groupes amides par les molécules d'eau ainsi que des effets d'orientation des protéines par rapport à la surface du matériel.

La comparaison des spectres de $^{63}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ et $^{65}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ enregistrés sur la même fenêtre de polyéthylène ou de silicium montre des différences notables, notamment dans la zone de fréquences 500-200 cm^{-1} . Cependant, des bandes observées dans la gamme 500-400 cm^{-1} , à 485, 428 et 405 cm^{-1} sont *a priori* spécifiques du spectre de la CcO. La bande à 466 cm^{-1} est quant à elle observée dans le spectre du tampon CHES (Figure 54).

Dans le spectre de l'isotope $^{63}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ (Figure 55 B), l'intensité des bandes observées à 428 et 404 cm^{-1} est équivalente, tandis que dans le spectre de l'isotope $^{65}\text{Cu}_B\text{-CcO}$, l'intensité de la bande à 428 cm^{-1} est nettement diminuée. Cet effet est également observé dans les spectres des échantillons $^{63}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ et $^{65}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ enregistrés sur la fenêtre de silicium (Figure 55 C). De plus, la comparaison de trois spectres enregistrés séparément pour chaque isotope du Cu_B montre un effet reproductible concernant l'intensité de ces deux bandes. Cette observation semble surprenante car d'une part les bandes affectées par le marquage isotopique subissent généralement des déplacements de nombre d'onde soit vers les hautes fréquences

soit vers les basses fréquences plutôt qu'un changement d'intensité, et d'autre part les modes de vibration impliquant le cuivre et ses ligands sont observés dans les fréquences IR comprises entre 313 et 130 cm^{-1} dans les spectres de complexes de cuivre-polyhistidine²⁵³ et cuivre-imidazole.^{251,254} Ainsi, il est peu probable que l'intensité de la bande observée à 428-425 cm^{-1} dans les spectres de l'isotope $^{65}\text{Cu}_B\text{-CcO}$ (Figure 55 B et C) soit affectée par le marquage isotopique du Cu_B .

Bien qu'il soit difficile de donner une explication claire sur ces différences, on peut penser notamment que les spectres enregistrés en transmission ne présentent pas un rapport signal sur bruit satisfaisant. De plus, la répétition des acquisitions n'a pas permis d'améliorer la qualité des signaux. Par ailleurs, compte tenu de la largeur de l'échantillon, et de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, on peut affirmer que l'on détecte par la méthode d'ATR quasiment la même chose pour les deux isotopes de la CcO.

En raison des problèmes de la ligne de base, la contribution de tampon, la gestion de la vapeur d'eau et la connaissance de sa quantité dans les échantillons ne sont pas aisées. Notre analyse a donc été limitée à l'étude de la CcO par la méthode d'ATR.

2.2.4 Spectres ATR des intermédiaires de la CcO

La formation des intermédiaires P_H et F_H est détaillée dans la partie « Matériel et Méthodes ». Leurs spectres IR ont été enregistrés en mode ATR et sont la moyenne de deux expériences différentes. Ils sont présentés sur la Figure 56.

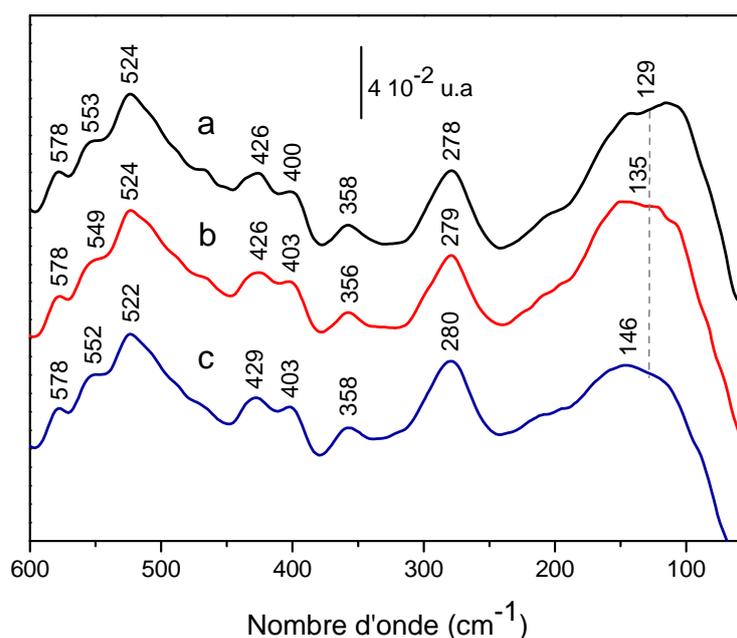


Figure 56 : Spectres ATR-IR des intermédiaires de la CcO native. (a) O, état oxydé 20 mM CHES pH 9 0.01% DDM. (b) P_H , état peroxy obtenu à pH 9, 1:5/Cco:H₂O₂. (c) F, état ferryl formé par ajout de H₂O₂ en large excès.

Les intermédiaires O, P_H et F_H présentent des spectres IR qui semblent *à priori* très similaires, à l'exception de la bande large détectée à 130 et 135 cm⁻¹ dans les spectres ATR des intermédiaires O et P_H, respectivement. Cette bande associée à la contribution des liaisons hydrogène, mais également à la contribution du tampon et du sel est déplacée à 146 cm⁻¹ dans le spectre de l'état F_H. La différence de 11 cm⁻¹ observée entre P_H et F_H, nous semble être non négligeable si l'on se réfère à l'absence de déplacement de cette bande, déjà constaté, pour les différents isotopes de la CcO.

Cette observation suggère que les intermédiaires O, P_H et F_H révèlent des différences fines qui impliquent l'organisation du réseau de liaisons hydrogène autour des acides aminés. Cependant, la position et l'intensité du signal correspondant aux liaisons hydrogène observé au dessous de 300 cm⁻¹ peuvent être fortement influencées par la polarisabilité de cette bande,²⁵⁵ et donc il est difficile de conclure de manière certaine sur le déplacement observé lors de la transition P_H→F_H.

Il a été suggéré que la conversion de l'état P_H en F_H est due à un changement structural impliquant des différences de liaisons hydrogène du site distal et des variations de la basicité du ligand proximal His 411 de l'hème Fea₃. Des études de spectroscopie de résonance Raman menées sur les espèces oxoferryl P_H et F_H de la CcO de *P. denitrificans* ont suggéré que la transition de l'état P_H à l'intermédiaire F_H provoque un changement des liaisons hydrogène dans l'environnement distal de l'hème Fea₃, ce qui induit une réorganisation du réseau de liaisons hydrogène dans le site proximal provoquant ainsi une perturbation de la force de la liaison hydrogène de l'His 411.²⁰² Les auteurs proposent, en se basant sur la structure cristallographique de la CcO, que l'His 411 forme une liaison hydrogène avec le Glu 378 dans l'état F_H, et donc la formation de cette liaison hydrogène est la raison la plus probable de la différence des propriétés vibrationnelles observées pour les deux espèces oxoferryl.²⁰²

2.2.5 Comparaison des spectres ATR de P_H et P₁₀

La Figure 57 présente le spectre ATR de l'intermédiaire P₁₀ en comparaison avec celui de l'état P_H.

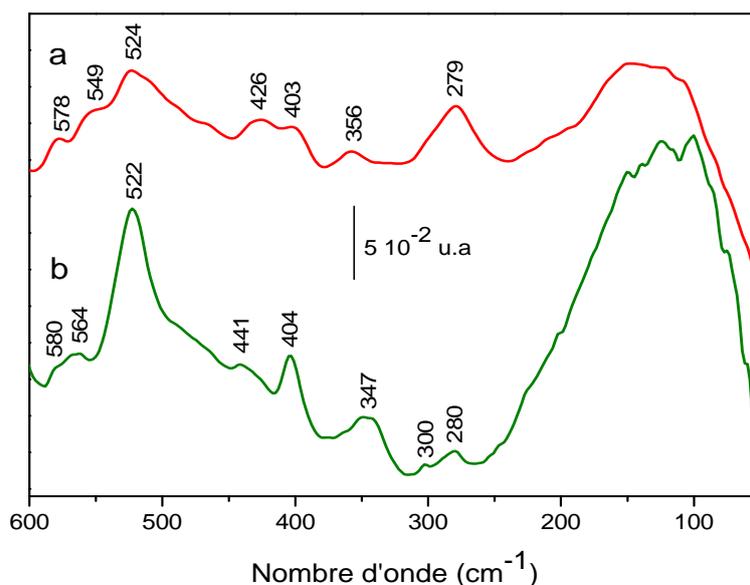


Figure 57 : Spectres ATR-IRTF des intermédiaires P_H et P_{10} . (a) P_H , obtenu dans le tampon CHES 20 mM pH à 9 0.01 % DDM, 1:5/Cco:H₂O₂. (b) P_{10} , obtenu dans le tampon CHES à pH 10.

La comparaison des spectres ATR des intermédiaires P_H et P_{10} (Figure 57 a et b) montre des différences significatives. Par comparaison du spectre de P_{10} (Figure 57b) avec celui du tampon CHES (Figure 58), nous avons constaté que certains modes du tampon CHES se retrouvent également dans le spectre de P_{10} à des fréquences légèrement différentes. La formation de l'état P_{10} nécessite une concentration plus importante du tampon CHES afin d'augmenter le pH de la solution de la CcO à 10.

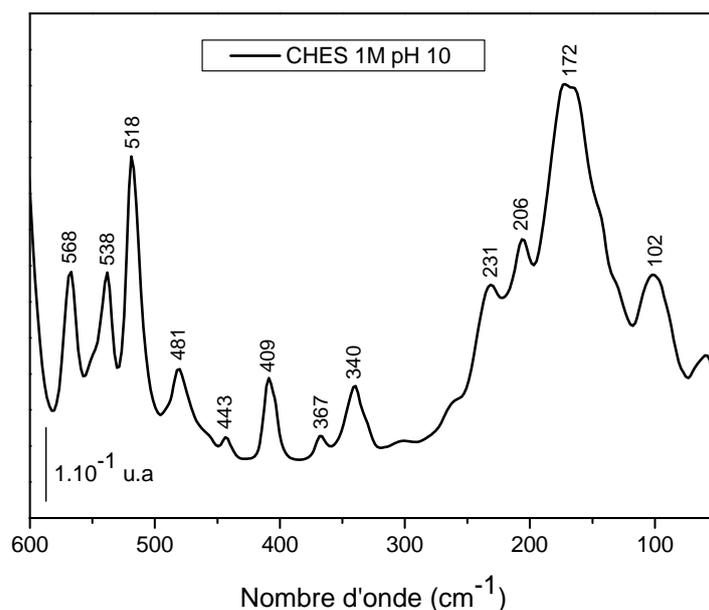


Figure 58 : Spectre ATR-IRTF du tampon CHES 1M pH 10.

III.3 Étude de la CcO en fonction du pH

Les spectres ATR-IRTF de la CcO ont été enregistrés en fonction du pH dans la gamme de fréquence 700-50 cm^{-1} et présentés sur la Figure 59.

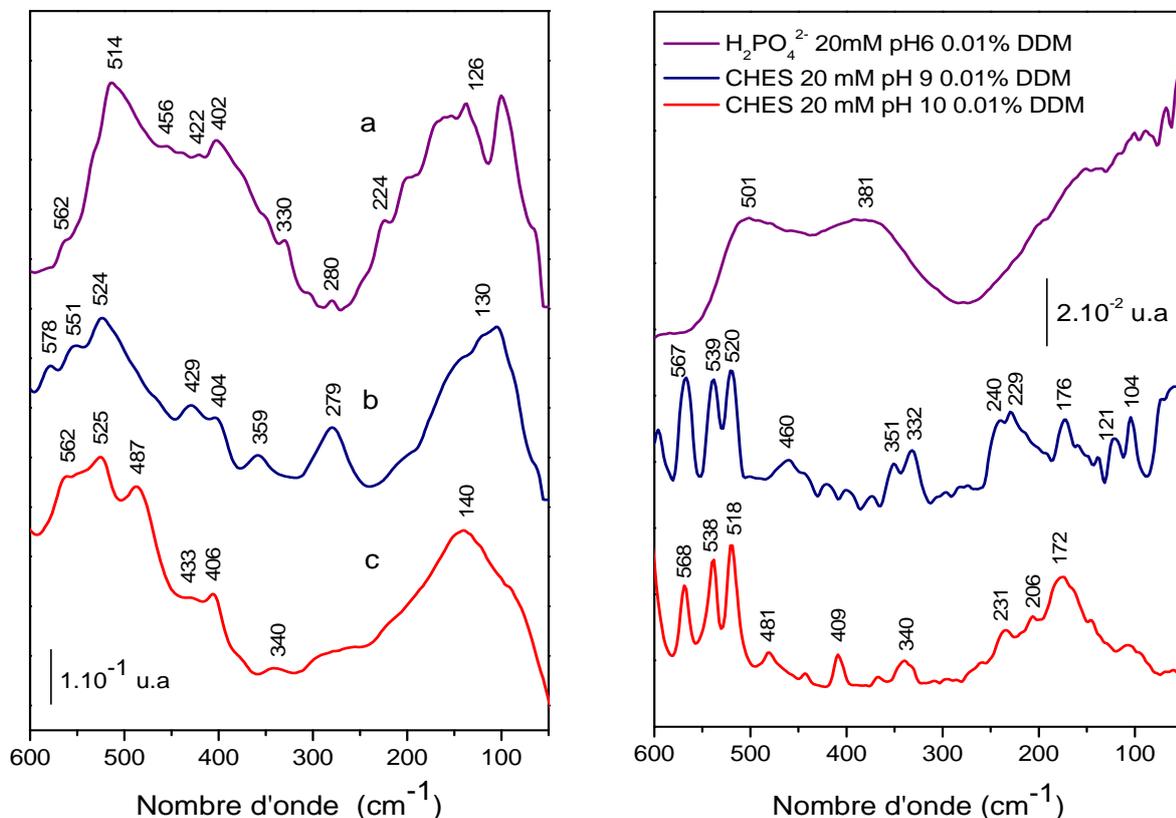


Figure 59 : A) Spectres ATR-IRTF de la CcO en fonction du pH. (a) pH 6, 20 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, 0.01 % DDM. (b) pH 9, 20 mM CHES, 0.01 % DDM. (c), pH 10, 20 mM CHES, 0.01 % DDM. B) Spectres ATR-IRTF des tampons utilisés.

L'augmentation ou la diminution du pH (spectres a et c de la Figure 59 A) provoque la disparition des bandes observées à 578 et 280 cm^{-1} dans le spectre de la CcO enregistré à pH 9 et le déplacement de l'épaule à 551(b) à 562 cm^{-1} dans les spectres de la CcO enregistrés à pH 6 et 10. L'augmentation du pH à 10 n'affecte pas la fréquence de la bande à 524 cm^{-1} (b), tandis que la décroissance du pH provoque un déplacement vers les basses fréquences.

Une bande observée à 487 cm^{-1} est spécifique dans le spectre de la CcO à pH 10. Ce mode de vibration pourrait être à l'origine soit d'une contribution du tampon CHES soit d'un mode spécifique de la CcO. La bande détectée à 359 cm^{-1} dans le spectre enregistré à pH 9 est déplacée à 340 et 330 cm^{-1} dans les spectres de la CcO à pH 10 et 6, respectivement.

Ainsi à partir de ces spectres ATR, s'il semble assez clair que le pH a un effet sur les vibrations de la CcO, il est plus difficile de décrire qualitativement l'origine de ces effets. Il

est nécessaire de faire d'autres expériences plus spécifiques pour pouvoir comprendre l'impact du pH sur la structure de la CcO.

III.4 Conclusion

La détection des modes de vibrations impliquant le fer et le cuivre et leurs ligands dans la cytochrome *c* oxydase ne peut pas être obtenue à partir des spectres ATR. L'acquisition des spectres IRTF de différence devrait soustraire les contributions du tampon, de détergent et de sel, et permettra donc d'observer les modes de vibration spécifiques de la CcO. De plus, le marquage isotopique à l'azote ^{15}N du ligand proximal des hèmes Fe_a et Fe_a_3 ainsi que l'utilisation des mutants, aiderait à mettre en évidence les vibrations fer-ligands. Malheureusement, l'étude de deux isotopes de Cu_B n'a pas permis d'observer de telles vibrations associées au cuivre et ses ligands.

Chapitre IV : Caractérisation des modèles de la CcO dans l'IR moyen (1800-700 cm⁻¹)

Le macrocycle porphyrinique joue un rôle essentiel dans les milieux vivants, notamment dans les réactions catalysées par les hémoprotéines. La fixation d'un métal divalent (fer) au centre du tétrapyrrole lui confère des propriétés de transfert d'électrons, de réaction d'oxydation et de capacité à fixer de l'oxygène (lorsque le fer est à l'état réduit), le CO, ou le NO. La porphyrine de fer participe donc à de nombreux paramètres déterminants pour la catalyse comme l'énergie des orbitales d du fer, l'affinité pour les ligands axiaux ou le potentiel d'oxydoréduction. Des études cristallographiques obtenues sur les structures d'hémoprotéines ont permis de montrer que l'hème possède rarement une conformation complètement plane. Certains facteurs peuvent entraîner des déformations du macrocycle, tels que les interactions que peut établir la porphyrine avec certains résidus de l'enzyme.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Ces interactions sont capables de provoquer des distorsions de l'hème et donc de moduler ses propriétés électroniques.

Dans le cas de la CcO, différentes études ont suggéré qu'un changement de la polarité ayant lieu au voisinage du centre binucléaire entraîne un changement conformationnel global de la protéine.²⁵⁹ Il a été proposé que cette modification conformationnelle se trouve à proximité du Cu_B et affecte principalement la distance entre les deux centres métalliques du site actif.^{28,98}

Dans l'hypothèse où les environnements distaux seraient capables de modifier la conformation de l'hème dans les modèles synthétiques de la CcO, ces changements de conformation pourraient entraîner des modifications des différentes propriétés électroniques de l'hème comme l'énergie des orbitales π , son potentiel d'oxydoréduction ou la force du lien proximal ce qui pourrait expliquer les différences de réactivité observées entre les modèles de la CcO. Nous avons donc étudié les modes de vibration de l'hème.

D'autre part, les différentes étapes de transfert d'électrons sont d'une importance cruciale pour le bon déroulement du cycle catalytique de la CcO. En particulier, le contrôle précis de la réduction de l'hème Fe^{III} en hème Fe^{II} constitue un élément essentiel dans la régulation de l'activité de l'oxydase, cette étape étant à la fois la première étape et l'étape cinétiquement déterminante du cycle catalytique qui mène à la réduction du dioxygène en eau et à la translocation de protons à l'extérieur de la membrane. La caractérisation de l'hème réduit permet d'avoir accès aux changements structuraux qui interviennent dans cette première étape. Il est donc intéressant de réaliser une caractérisation de l'hème réduit chez les différents analogues de la CcO possédant un site distal afin de vérifier si les différences de réactivité du

complexe Fe^{II}-O₂ observées sont ou non reliées à des modifications dans la structure de l'hème.

De nombreuses études menées par spectroscopie de résonance Raman sur des métalloporphyrines et des hémoprotéines ont montré la présence de modes d'hème spécifiques de l'état d'oxydoréduction et de l'état de spin du fer.^{179,260-262} Des travaux obtenus sur des complexes de Fe(TPP)LL' par résonance Raman ont permis de mettre en évidence plusieurs bandes très sensibles à l'état d'oxydation et de coordination de l'hème.^{263,264} En particulier la bande A, généralement observée entre 1370 et 1345 cm⁻¹, est sensible à la fois à l'état de spin et d'oxydation alors que les bandes C (1545-1498 cm⁻¹) et D (1565-1540 cm⁻¹) sont sensibles uniquement à l'état de spin. La bande B, observée entre 1379 et 1365 cm⁻¹ est caractéristique d'un schéma de pentacoordination en série tétraphénylporphyrinique. La bande E est quand à elle observée dans le domaine des basses fréquences (391-376 cm⁻¹) est un marqueur Raman intense de l'état d'oxydation (Tableau 9).

		Haut spin		Bas spin		Modes normaux
		Fe(III)	Fe(II)	Fe(III)	Fe(II)	
IR	Bande I, spin	1330-1341		1350-1343		v ₄₁
	Bande II, ox	806-800	800-795	806-800	793-790	γ ₅
	Bande III, spin	435-432		469-461		v ₄₉
RR	Bande A, ox et spin	1360	1345	1370	1369-1364	v ₄
	Bande B	1370		1370		v ₂₉
	Bande C, spin	1516-1500		1545-1538		v ₁₉
	Bande D, spin	1554-1542		1572-1560		v ₂
	Bande E, ox	391-388	384-376	391-388	384-376	v ₈

Bande B, caractéristique d'un schéma de pentacoordination.

Tableau 9 : Fréquences (en cm⁻¹) des bandes marqueurs IR et Raman de l'état de spin et de l'état d'oxydation du fer caractéristiques des tétraphénylporphyrines.^{263,264}

La spectroscopie d'absorption infrarouge ATR-IRTF peut être aussi une technique particulièrement adaptée pour étudier les modes de vibration de l'hème chez les métalloporphyrines. Contrairement aux hémoprotéines où les modes de vibrations de l'hème peuvent être masqués sous les très nombreux modes de vibration de la chaîne polypeptidique, elle permet de mettre en évidence les modifications de l'hème, engendrées par le changement d'état d'oxydation du métal et la coordination des ligands axiaux, dans le cas des métalloporphyrines. Toutefois, peu de données existent sur les modes IR d'hème sensibles à l'état de spin ou à l'état redox du fer, ainsi que sur les changements structuraux affectant des

ligands axiaux sur les spectres IR des métalloporphyrines. Les modèles synthétiques de la CcO sont généralement conçus à partir de la tétraphénylporphyrinique (TPP). Une étude menée par spectroscopie IR sur des complexes de Fe(TPP)LL', a cependant permis de détecter des marqueurs redox IR et de spin de ce type d'hème.²⁶³ En particulier, la bande II, généralement observée entre 806 et 790 cm^{-1} , est très sensible à la densité électronique sur le macrocycle et constitue un bon indicateur de l'état d'oxydation du fer alors que le mode de vibration I, généralement observé entre 1350 et 1330 cm^{-1} , reflète surtout l'état de spin. Par ailleurs, la bande II peut dépendre légèrement de l'état de spin uniquement dans l'état de Fe(II). La bande III, observée dans le domaine des basses fréquences entre 469 et 432 cm^{-1} , est un marqueur IR intense de l'état de spin (Tableau 9).

De plus, le spectre IR des bases libres est peu étudié et les études récentes, fort rares sur les porphyrines superstructurées en spectroscopie infrarouge, n'ont pas à notre connaissance, permis de distinguer de telles vibrations sensibles à l'état redox de l'hème, aux interactions métal-ligand et au squelette organique des modèles. Les fréquences et les intensités associées aux différents modes de vibration de l'hème dépendent étroitement à la fois des propriétés intrinsèques de l'hème et son environnement. Ainsi, l'étude des spectres IR des modèles de la CcO possédant des polarités et des géométries distales différentes pourra donc fournir de nombreux renseignements sur les effets de l'environnement distal sur la structure et la conformation de l'hème.

Afin de mettre en évidence des modes IR caractéristiques des hèmes superstructurés sensibles à l'état redox du fer ou à l'état de spin, ainsi que les modes IR spécifiques des ligands axiaux dans le domaine de l'infrarouge moyen, nous avons entrepris l'étude systématique des spectres de la base libre, de la forme ferrique et ferreuse et de leurs propriétés de coordination distale ou proximale avec des ligands exogènes de type N-donneur (imidazole et pyridine) des modèles synthétiques de la CcO. Cette étude est basée sur la comparaison possible avec les données de résonance Raman et infrarouge existant sur les modèles simples.

IV.1 Modèles Fe(4C₂)

Les trois composés étudiés de cette famille sont de structure très proche. La seule différence entre 4C₂H₂, 4C₂mononitro et 4C₂dinitro est l'existence de deux fonctions amines dans H₂(4C₂), sur lesquelles sont greffées un ou deux groupement (s) nitrophénol dans H₂(4C₂-NO₂) et H₂(4C₂-diNO₂), respectivement (Tableau 3 p 47). La structure de cette série

de modèle offre la possibilité d'ajouter deux ligands axiaux exogènes en cinquième et sixième position de coordination du fer. Cette particularité permet d'obtenir des complexes aux propriétés électroniques différentes, selon la présence et la nature de ces ligands axiaux de l'hème. En outre, ces composés possèdent des groupes carbonyles actifs en infrarouge et potentiellement sensibles à la symétrie de leur environnement.⁶ Dans un premier temps, nous avons caractérisé le complexe Fe(4C₂)OH en comparant les données obtenues sur ce modèle avec le spectre IR du complexe Fe(TPP)Cl afin de discriminer les contributions de l'hème, des groupements phényles et du squelette organique à plus longue distance du métal. Nous avons ensuite analysé l'effet du groupement nitrophénol sur la structure du complexe Fe(4C₂).

IV.1.1 Caractérisation du Complexe Fe^{III} (4C₂)OH

La Figure 60 montre les spectres ATR-IRTF de la base libre (a), et ceux des complexes Fe(4C₂)OH (b) et Fe(TPP)Cl (c) enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR.

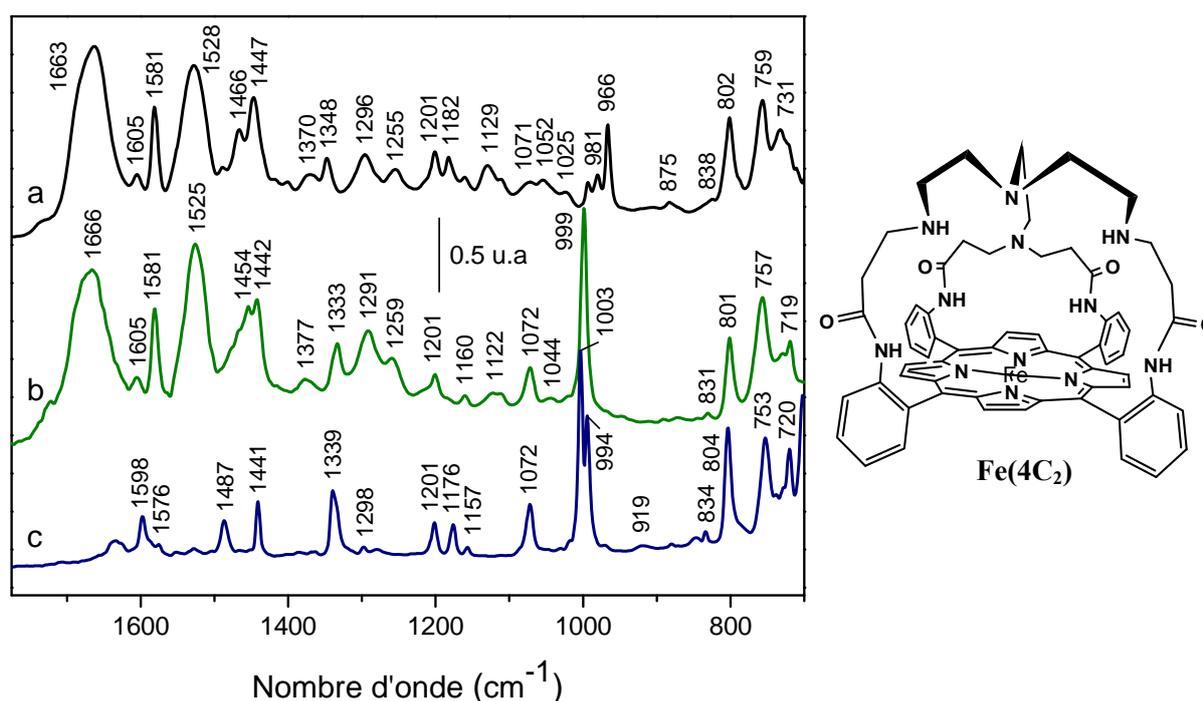


Figure 60 : Spectres ATR-IRTF (a) de la base libre H₂(4C₂) et des complexes (b) Fe(4C₂)OH et (c) Fe(TPP)Cl, enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR.

L'analyse par IRTF du complexe Fe(TPP)Cl a révélé que les modes de vibration dans le plan des groupes phényles et du macrocycle porphyrinique sont principalement situés dans la zone 1600-1400 cm⁻¹ et 1350-990 cm⁻¹ respectivement, tandis que les modes vibrationnels hors du plan contribuaient essentiellement dans la gamme de fréquence 810-700 cm⁻¹.

L'attribution des différentes fréquences du spectre de Fe(4C₂)OH a été faite par comparaison avec les données de RR, IR et les calculs de modes normaux réalisées sur les complexes Fe(TPP)Cl et Ni(TPP).^{188,265} La nomenclature des atomes de l'hème et de groupes phényles de Fe(4C₂)OH est celle utilisée pour décrire les modes de vibration de Ni(TPP). Les attributions proposées pour le complexe Fe(4C₂)OH et la base libre sont consignées dans le Tableau 10.

1.1.1 Modes de vibration dans le plan (1670-990 cm⁻¹)

Les vibrations dans le plan de l'hème, des groupes phényles et de la tren sont attendues dans la gamme spectrale 1670-990 cm⁻¹. La comparaison du spectre du complexe Fe(4C₂) avec celui de la base libre correspondant montre que certaines bandes du composé H₂(4C₂) subissent une diminution ou une augmentation d'intensité, tandis que d'autres un déplacement par suite de la liaison de la porphyrine avec le fer (Figure 60). D'autre part, le spectre du complexe Fe(4C₂)OH présente dans cette zone de fréquence de nombreuses bandes spécifiques qui ne sont pas détectées dans le spectre du complexe Fe(TPP)Cl. La majorité des signaux observés dans le spectre du complexe Fe(TPP)Cl se retrouvent dans celui du Fe(4C₂) à des fréquences légèrement différentes.

Un signal intense, attribué à la vibration d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ des fonctions carbonyles de la tren, est détecté dans le spectre du complexe Fe(4C₂)OH à 1666 cm⁻¹ (spectre b).

La bande à 1605 cm⁻¹ peut être attribuée à ϕ_4'' , mode associé à la vibration $\nu_{\text{sym}}(\text{C}-\text{C})$ des phényles. Ce mode est détecté à 1598 cm⁻¹ dans le spectre IR de la Fe(TPP)Cl. L'intensité de ce signal est plus forte pour la Fe(TPP)Cl que pour le complexe Fe(4C₂)OH.

Une bande de très faible intensité à 1576 cm⁻¹ dans le spectre de la Fe(TPP)Cl avait été attribuée au mode ψ_3' , associé à la vibration $\nu_3(\text{C}-\text{C})$ des phényles couplée à $\nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha-\text{C}_m)$ du cycle porphyrinique. La détection d'une bande à 1581 cm⁻¹ dans le spectre du composé Fe(4C₂)OH pourrait correspondre à ce mode. Toutefois, étant donné que le mode ψ_3' est de symétrie ("breaking") qui ne pourra être obtenu qu'avec une très faible intensité,¹⁸⁸ la bande observée à 1581 cm⁻¹ d'intensité nettement augmentée dans le spectre du complexe Fe(4C₂) ne peut être à l'origine de ce mode.

On note : ν_i , les modes de vibration du macrocycle porphyrinique.

ϕ et ψ , les modes de vibration dans le plan des groupes phényles parallèle et perpendiculaire à la liaison phényle-porphyrine, respectivement.

La bande à 1487 cm^{-1} correspondant au mode ϕ_5'' des groupes phényles ne se retrouve pas non plus pour le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$. Cette première comparaison montre que les modes IR des groupements phényles sont très affectés par l'introduction du site distal dans le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$. L'origine de ces différences peut être due au fait que dans la TPP, les phényles sont monosubstitués, tandis que dans le 4C_2 ils sont disubstitués.

La bande intense observée à $1528\text{--}25\text{ cm}^{-1}$ dans les spectres de $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ se situe dans la gamme de fréquence où sont attendues les vibrations de déformation dans le plan des liaisons N-H. Elle pourrait être attribuée à la vibration de déformation des liaisons N-H des fonctions amides du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$. Le spectre de la base libre $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ présente une bande à 1466 cm^{-1} ; à cette fréquence le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ ne présente qu'un épaulement. Un mode détecté à 1474 cm^{-1} dans le spectre IR de la base libre tétraphénylporphine est attribué à une vibration d'élongation $\nu(\text{C}=\text{N}-)$ des pyrroles.²⁶⁶ La bande observée à 1466 cm^{-1} peut donc correspondre à cette vibration.

Dans cette région, un autre mode IR des groupes phényles a été observé à 1441 cm^{-1} dans le spectre de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$, le mode ψ_4' attribué aux vibrations $\nu_{\text{asym}}(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{C}-\text{H})$. Une bande équivalente est observée de manière reproductible à 1442 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$. Elle aurait aussi bien pu être attribuée au mode ψ_4' des groupements phényles. Or cette bande apparaît à 1447 cm^{-1} dans le spectre de la base libre $\text{H}_2(4\text{C}_2)$, ce déplacement de 5 cm^{-1} vers les basses fréquences en présence du fer peut soulever des doutes sur l'origine de cette bande. En outre, une bande à 1454 cm^{-1} qui apparaît clairement sur le spectre du $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ n'est pas du tout retrouvée pour les deux autres composés étudiés.

La Figure 61 montre la comparaison de ces trois spectres dans un agrandissement de la zone spectrale $1480\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$. Le signal observé dans le spectre du $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ à $1454/1442\text{ cm}^{-1}$ dont l'intensité et l'allure sont sensibles à la présence du fer pourrait être à l'origine d'un dédoublement de la bande large à 1447 cm^{-1} , où elle est éclatée en deux bandes à 1454 et 1442 cm^{-1} . L'interprétation de ces bandes spécifiques du composé $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ est assez difficile. Il serait intéressant de savoir s'il s'agit des vibrations du squelette organique déplacées par l'influence qu'exerce le métal et les liaisons qu'il contracte avec lui, ou bien s'il s'agit des vibrations de l'hème. Deux bandes observées à $1450/1438\text{ cm}^{-1}$ dans le spectre IR de la protoporphyrine IX ont été attribuées aux vibrations $\nu_{\text{asym}}(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{C}-\text{H})$.¹⁹¹ Ainsi, les bandes à $1442/1454\text{ cm}^{-1}$ ne peuvent pas être attribuées de manière certaine puisqu'il peut s'agir du mode IR impliquant soit les vibrations des pyrroles, soit celles des phényles ou des deux.

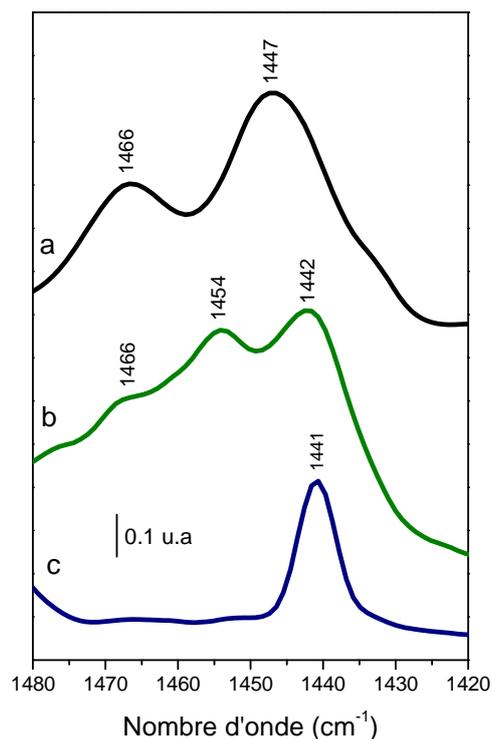


Figure 61 : Agrandissement des spectres ATR entre 1480 et 1420 cm^{-1} pour les composés $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ (a), $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ (b) et $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ (c).

Les bandes IR du composé $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ observées à 1333, 1201, 1161 et 1072 cm^{-1} sont similaires à celles reportées pour la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$. La bande à 1333 cm^{-1} , observée à 1340 cm^{-1} accompagné d'un épaulement à 1334 cm^{-1} dans la TPP, est attribuée au mode ν_{41} . Ce couplage de vibrations $\delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta)$, est un marqueur IR intense de l'état de spin du fer (bande I). La bande I est observée dans la région des complexes de $\text{Fe}(\text{III})$ haut spin (Tableau IV.1). La bande à 1201 cm^{-1} , commune à tous les spectres, est attribuée au mode ν_{36} . Cette absorption serait celle de la vibration $\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$. La bande à 1160 cm^{-1} , dans le spectre du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$, correspond à celle observée à 1157 cm^{-1} dans le complexe $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$. Cette bande serait due à une vibration $\delta_{\text{sym}}(\text{C-C-H})$ correspondant au mode Φ_6'' des phényles. L'attribution de la bande observée à 1072 cm^{-1} n'est pas encore claire. Elle pourrait correspondre à une vibration du macrocycle porphyrinique $\delta_{\text{sym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$ ou à une vibration des phényles $\nu_{\text{asym}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$. L'intensité de ce pic varie selon la présence ou non du métal et est plus importante dans les spectres des espèces métallées.

Les bandes sensibles à la coordination du fer observées pour le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ à 1456/1442, 1377, 1291, 1259, 1122, 1044 et 872 cm^{-1} , sont absentes du spectre de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$. Nous avons attribué les bandes à 1456/1442 cm^{-1} au mode IR impliquant des

pyrroles (voir précédemment). La bande observée à 1377 cm^{-1} peut correspondre au mode ν_{29} de symétrie B_{2g} actif en Raman et détecté à 1371 et 1377 cm^{-1} dans les spectres de RR de la Fe(TPP)Cl et la Ni(TPP),^{188,265} respectivement. Ce mode est en principe inactif en IR, mais il peut être activé par abaissement de symétrie.

Dans le spectre de RR du complexe Ni(TPP), une bande à 1302 cm^{-1} a été attribuée au mode ν_{12} correspondant à la vibration $\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half-ring})$. La bande détectée à 1291 cm^{-1} dans le spectre du complexe Fe(4C₂)OH pourrait correspondre à ce mode. La bande à 1259 cm^{-1} , observée à 1269 cm^{-1} dans le spectre de RR de la Ni(TPP), est associée au mode ν_{27} , la vibration $\nu(\text{C}_m\text{-Ph})$.

L'attribution des deux modes observés à 1122 et 1044 cm^{-1} est plus délicate en l'absence d'études isotopiques. Dans la gamme de fréquence $1150\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$, peu de modes sont détectés dans les spectres de Ni et Fe-tétraphénylporphyrines. Nous proposons d'attribuer la bande à 1122 cm^{-1} à ν_{44} , le mode de vibration antisymétrique $\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{N})$ des pyrroles,²⁶⁷ tandis que la bande à 1044 cm^{-1} correspondrait à ν_{52} , la vibration de déformation $\delta_{\text{sym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$.²⁶⁵ La bande de faible intensité à 872 cm^{-1} , observée à 880 cm^{-1} dans la Ni(TPP), est attribuée au mode ν_{48} de symétrie Eu impliquant la déformation des pyrroles.

L'attribution définitive de ces bandes IR à des modes de vibration impliquant l'hème, ne pourra être établie qu'à l'aide de données obtenues sur des porphyrines marquées et des calculs théoriques.

Dans le spectre IR de la Fe(TPP)Cl, deux bandes à 1003 et 994 cm^{-1} ont été attribuées aux modes Φ_8'' et ν_{47} , respectivement. Le mode Φ_8'' correspond principalement aux vibrations des groupes phényles ($\delta_{\text{sym}}(\text{C-C-C}) + \nu(\text{Pyr. breathing}) + \nu_{\text{asym}}(\text{Pyr. half-ring})$), tandis que le mode ν_{47} implique essentiellement les vibrations du cycle porphyrinique ($(\text{Pyr. breathing}) + \delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. deformation}) + \nu_{\text{breathing}}(\text{C-C})$). La bande observée à 999 cm^{-1} de manière reproductible dans le spectre de Fe(4C₂)OH pourrait correspondre à un de ces modes.

Par ailleurs, la disparition des bandes observées à 993 , 980 et 966 cm^{-1} lors de la métallation du H₂(4C₂) semble être corrélée à l'apparition du signal particulièrement intense à 999 cm^{-1} (spectre b). Les bandes à 993 , 980 et 966 cm^{-1} se situent dans la gamme de fréquence où sont attendues les vibrations de déformation hors du plan des liaisons N-H des pyrroles.¹⁹⁷ Nous attribuons ainsi la bande à 999 cm^{-1} au mode de vibration ν_{47} impliquant les vibrations du cycle porphyrinique. De plus, l'apparition de la même bande a été également observée sur les spectres IR des complexes de tétraphénylporphines avec différents métaux.²⁶⁸

La bande observée à 999 cm^{-1} dans les spectres de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ et $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ pourrait ainsi être attribuée à un mode IR marqueur des hèmes de type tétraphénylporphyrinique.

1.1.2 Modes de vibrations hors du plan ($810\text{-}700\text{ cm}^{-1}$)

L'étude de cette région spectrale est susceptible d'apporter des renseignements intéressants car elle comprend des modes de déformation hors du plan de la porphyrine et de ses substituants.²⁶⁹ Du fait de leur nature, ces modes sont très sensibles à la conformation de la porphyrine et permettent de déterminer les propriétés des interactions hème-protéine.¹⁷⁷

Contrairement à ce qui a été observé dans la gamme spectrale $1600\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ (Figure 60), Les spectres des deux complexes $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ et $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ sont semblables dans la zone des fréquences $810\text{-}700\text{ cm}^{-1}$. En effet, les bandes IR du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ observées à 801 , 757 , 729 et 719 cm^{-1} sont similaires à celles reportées pour la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ à 804 , 753 , 728 et 720 cm^{-1} . Ces bandes sont attribuées à des modes de vibration de déformation hors du plan de l'hème et des groupes phényles. La bande à 801 cm^{-1} , communes à tous les spectres, est attribuée au mode γ_5 du macrocycle porphyrinique. Cette vibration $\gamma(\text{H}_\beta) + \gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$ est un marqueur IR intense de l'état redox du fer.

La bande à 757 cm^{-1} est attribué au mode π_3'' , la vibration $\gamma_1(\text{H})$ du groupe phényle. La bande à 729 cm^{-1} correspond au mode γ_{20} , associé à un couplage de vibrations $\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma_{\text{asym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(\text{H}_\beta)$. La bande à 719 cm^{-1} est attribuée à γ_8 , le mode de vibration couplé $\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(\text{H}_\beta)$.

II et γ , les modes de vibration hors du plan de groupes phényles.

$H_2(4C_2)$	$Fe(4C_2)OH$	$Fe(TPP)Cl$	Modes normaux	Attributions proposées	Références
1663	1666			$\nu(C=O)$	
1605	1605	1598	Φ_4''	$\nu_{sym}(C-C)$	188
1528	1525			$\delta(N-H) ?$	
1466	1466			$-C=N-$	266
1447	1456/1442	1441	$\psi_4'/\text{pyrroles}$	$\nu_{aym3}(C-C) + \delta(C-C-H)$	
1370	1377		ν_{29}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(C_m\text{-Ph})$	188, 265
1348	1333	1339	ν_{41}	$\delta_{asym}(C_\beta\text{-H}) + \nu(C_m\text{-Ph}) + \nu_{sym}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{asym}(C_\alpha\text{-}C_\beta)$	188
1296	1291		ν_{12}	$\nu_{sym}(\text{Pyr. half -ring})$	265
1255	1259		ν_{27}	$\nu(C_m\text{-Ph})$	265
1201	1201	1201	ν_{36}	$\nu_{sym}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{sym}(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(C_m\text{-Ph})$	188
1182		1176	ν_{51}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{Pyr. breathing})$	188
1160	1160	1157	Φ_6''	$\delta_{sym}(C-C-H)$	188
1129	1122		ν_{44}	$\nu_{asym}(C_\beta C_\alpha N)$	267
1072	1072	1072	ψ_8'/ν_{52}	$\nu_{asym}(C-C) + \delta(C-C-H)/\delta_{sym}(C_\beta\text{-}H)$	188
1052	1044		ν_{52}	$\delta_{sym}(C_\beta\text{-}H)$	265
	999	994	ν_{47}	$\nu(\text{Pyr. breathing}) + \delta_{asym}(\text{Pyr. Deformation}) + \delta_{sym}(C-C-C)$	188
993 981 966				$\delta(N-H)$ des pyrroles	197
882	872		ν_{48}	$\delta_{sym}(\text{Pyr. Deformation})$	265
802	801	804	γ_5	$\gamma(H_\beta) + \gamma_{sym}(\text{Pyr. Folding})$	188
759	757	753	π_3''	$\gamma_1(H)$	188
731	729	727	γ_{20}	$\gamma_{sym}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma_{asym}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(H_\beta)$	188
	719	720	γ_8	$\gamma_{sym}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(H_\beta)$	188

Tableau 10 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre $H_2(4C_2)$ et du complexe $Fe(4C_2)OH$ et comparaison avec la $Fe(TPP)Cl$.

IV.1.2 Effet du groupement p-nitrophénol sur la structure du ligand $4C_2$

Afin d'étudier l'effet du groupement p-nitrophénol sur l'environnement distal du composé $4C_2$, nous avons tout d'abord réalisé les spectres MIR des bases libres $H_2(4C_2)$, $H_2(4C_2-NO_2)$ et $H_2(4C_2-diNO_2)$ puis en présence du fer. Dans ces spectres caractéristiques d'hémoprotéines, nous attendons les contributions des groupements p-nitrophénol et leur influence sur la structure du modèle du site actif de la CcO.

1.2.1 Influence du groupement p-nitrophénol sur la tren

La Figure 62 montre les spectres ATR des composés $4C_2$ enregistrés sans p-nitrophénol (a) et en présence d'un groupement p-nitrophénol (b) et deux substituants p-nitrophénol sur les deux fonctions amine de la tren (c). Dans le Tableau 11 sont rassemblées les bandes qui ont une différence structurale entre les analogues de $4C_2$.

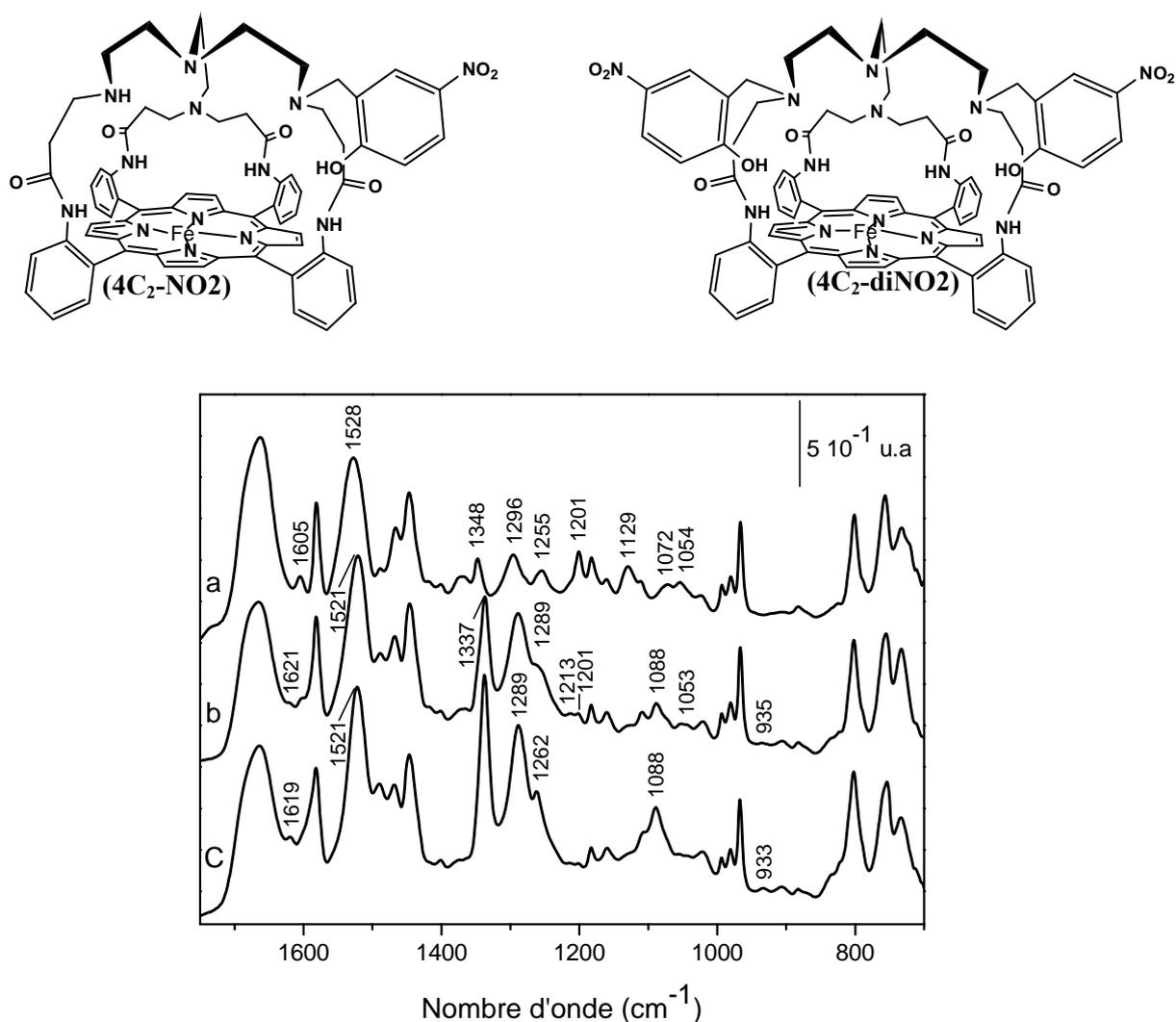


Figure 62 : Effet des groupements p-nitrophénol sur les spectres des bases libres $H_2(4C_2)$ (a), $H_2(4C_2-NO_2)$ (b) et $H_2(4C_2-diNO_2)$ (c). Les spectres sont enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR.

Le groupement p-nitrophénol devrait se manifester par deux bandes vers 1350 et 1539 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique du groupe NO_2 , respectivement, ainsi que par une vibration dans le plan $\delta(\text{O-H})$ observée vers 1189 cm^{-1} et une vibration d'élongation $\nu(\text{C-O})$ à 1268 cm^{-1} .²⁷⁰ Les modes impliquant le cycle aromatique du groupement p-nitrophénol sont observés à 1053, 1163, 1295 et 1485 cm^{-1} pour les déformations dans le plan $\delta(\text{C-H})$ et à 1620 cm^{-1} pour les vibrations d'élongation $\nu(\text{C=C})$.²⁷¹

La comparaison des spectres ATR de la Figure 62 ne montre pas de contributions significatives des modes du groupement p-nitrophénol, mis à part de l'apparition d'une bande de très faible intensité à 935-933 cm^{-1} , qui pourrait être attribuée au mode Q20 correspondant à la déformation hors du plan ($\gamma\text{C}_5\text{H}_{11} + \gamma\text{C}_6\text{H}_{12}$) du cycle aromatique du p-nitrophénol.²⁷¹ Les modes du groupement p-nitrophénol n'ont pas pu être détectés dans les spectres ATR obtenus car ils sont probablement masqués par les bandes des phényles du modèle. Cependant, des différences significatives ont été observées notamment dans la gamme des fréquences 1350-1030 cm^{-1} .

Le déplacement du signal intense à 1528 cm^{-1} vers les basses fréquences à 1521 cm^{-1} dans les spectres des ligands libres $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ indique que cette bande est sensible à l'introduction des groupements p-nitrophénol, et confirme donc que celle-ci provient du mode $\delta(\text{N-H})$ des amides.

La bande observée à 1348 cm^{-1} dans le spectre du $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ et attribuée au mode ν_{41} , la vibration du macrocycle porphyrinique et marqueur IR intense de l'état de spin, est déplacée à 1337 cm^{-1} pour $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. En outre, la comparaison des spectres de la Figure 62 montre que l'intensité de ce mode est fortement augmentée dans les spectres des ligands $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. Ces observations laissent suggérer que cette bande provient plutôt d'un mode de la tren, puisqu'il est peu probable de corréliser ce déplacement à l'effet des p-nitrophénol sur les modes de la porphyrine, vue sa position éloignée par rapport à celle-ci. De façon analogue, le déplacement de la bande à 1296 à 1289 cm^{-1} accompagné d'une augmentation de l'intensité observée pour $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ par rapport à $\text{H}_2(4\text{C}_2)$, semble être aussi une conséquence de la liaison du groupement p-nitrophénol au site distal du composé 4C_2 . La présence d'une bande à 1262 cm^{-1} sur le spectre du $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ a suggéré l'éventualité d'une participation d'une liaison C-O, mais la présence de cette bande dans le spectre du $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ à 1255 cm^{-1} réduit l'hypothèse d'une contribution du groupement p-nitrophénol. Le comportement de ces bandes suggère que celles-ci proviennent des modes de vibration du squelette organique du 4C_2 , excluant la contribution de l'hème.

L'intensité du mode à 1201 cm^{-1} diminue nettement après introduction du groupement p-nitrophénol (Figure 62 b et c), tandis qu'une bande de très faible intensité apparaît à 1213 cm^{-1} . Les bandes à 1129 et 1072 cm^{-1} disparaissent également pour les composés $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. Par ailleurs, une bande à 1088 cm^{-1} apparaît avec une intensité deux fois plus importante pour $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. La bande à 1054 cm^{-1} est également présente dans le spectre de $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$, tandis qu'elle disparaît totalement dans le cas de $\text{H}_2(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. En revanche, au dessous de 900 cm^{-1} , les trois spectres sont similaires.

Les spectres des bases libres obtenus en présence de groupement p-nitrophénol présentent des variations significatives par rapport au spectre de $\text{H}_2(4\text{C}_2)$, en particulier dans la région spectrale ($1530\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) correspondant aux modes de vibration dans le plan (Figure 62 et Tableau 11). Lorsque les groupements p-nitrophénol sont insérés dans le site distal, nous attendons des perturbations affectant majoritairement des bandes impliquant les vibrations de la tren, tandis que celles des phényles et de la porphyrine devraient être moins affectées.

1.2.2 Influence du p-nitrophénol sur la structure du complexe ferrique

Les spectres ATR obtenus pour les complexes $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$, $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)\text{OH}$ et $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)\text{OH}$ sont représentés dans la Figure 63.

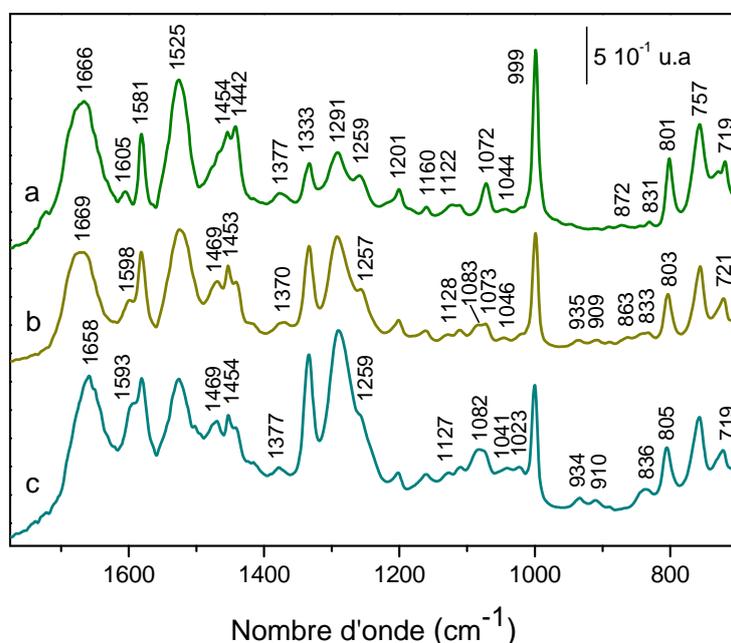


Figure 63 : Effet des groupements p-nitrophénol sur la région des hautes fréquences du spectre IR des complexes 4C_2 (a), $4\text{C}_2\text{-NO}_2$ (b) et $4\text{C}_2\text{-diNO}_2$ (c) à l'état Fe^{III} .

Contrairement à ce qui avait été observé dans la gamme spectrale $1350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ des bases libres (Figure 62), les spectres des composés 4C_2 , $4\text{C}_2\text{-NO}_2$ et $4\text{C}_2\text{-diNO}_2$ à l'état Fe^{III}

présentent de nombreuses bandes communes qui ne sont pas perturbées par l'introduction du groupement p-nitrophénol (Figure 63), à l'exception de la bande à 1072 cm^{-1} dont l'intensité diminue nettement, tandis qu'une bande apparaît à $1083\text{-}82\text{ cm}^{-1}$. Étant donné que ce mode n'est pas influencé par l'insertion du fer dans la porphyrine mais plutôt qu'il est perturbé par l'addition des groupements p-nitrophénol dans le site distal, nous proposons d'attribuer cette bande au mode ψ_8' impliquant les vibrations d'élongation et de déformation des phényles.

Cependant, les régions de fréquences $1700\text{-}1400$ et $1000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ sont plus perturbées. Ainsi, le mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ des groupements carbonyles observé à 1666 cm^{-1} dans le spectre du $\text{Fe}(4\text{C}_2)\text{OH}$ est déplacé vers les plus basses fréquences pour le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)\text{OH}$ (spectre c), tandis qu'il est légèrement déplacé vers les hautes fréquences dans le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)\text{OH}$ (spectre b). Or, la fréquence et l'intensité relative de cette bande ne sont pas influencées par l'insertion du groupement p-nitrophénol dans les spectres des bases libres (Figure 63). De plus, si le déplacement du mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ à 1658 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ est dû à des interactions des carbonyles de la tren avec le ligand hydroxyle coordonné à l'atome du fer, nous devrions observer le même effet pour les deux autres modèles. Il est donc probable que ce déplacement est dû plutôt à l'interaction avec le p-nitrophénol. Il est possible que l'insertion du fer dans la base libre ($4\text{C}_2\text{-diNO}_2$) provoque un changement conformationnel de la porphyrine permettant une meilleure interaction entre $\text{C}=\text{O}$ et p-nitrophénol.

Dans cette région, le mode Φ_4'' ($\nu_{\text{sym}}(\text{C}-\text{C})$) à 1605 cm^{-1} des groupements phényles ainsi que l'allure du signal observé dans la zone $1470\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ sont affectés de façon significative par la présence du (ou des) groupement (s) p-nitrophénol. En effet, la bande à 1605 se retrouve déplacée à 1598 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et à 1594 cm^{-1} sous forme d'un épaulement pour $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$. Cette différence peut être due à un changement d'orientation des groupes phényles par rapport au plan moyen de la porphyrine en raison d'une gêne stérique provoquée par les groupements p-nitrophénol. Le massif $1454\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ subit les mêmes modifications observées dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ suite à la liaison du fer à la porphyrine, mis à part, l'inversion de l'intensité de ces deux bandes, ce qui confirme la contribution des modes dans le plan d'élongation et/ou de déformation de l'hème. Cependant, la disparition de la bande à 1466 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ n'est pas due uniquement à la présence du fer dans la porphyrine, mais probablement à une distorsion du macrocycle porphyrinique dans le complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)$.

Dans la gamme des fréquences 900-700 cm^{-1} , des faibles différences spectrales sont associées à l'introduction des substituants p-nitrophénol dans la poche distale. Elles consistent en un déplacement des bandes à 872 et 801 cm^{-1} à 863 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et à 805 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$, respectivement, et en la disparition de la bande à 729 cm^{-1} correspondant au mode γ_{20} du macrocycle porphyrinique pour les deux composés.

4C_2		$4\text{C}_2\text{-NO}_2$		$4\text{C}_2\text{-diNO}_2$		Modes normaux	Attributions proposées	Références
H_2	Fe^{III}	H_2	Fe^{III}	H_2	Fe^{III}			
1663	1666	1665	1670	1664	1658		$\nu(\text{C}=\text{O})$	
1605	1605	1601	1598		1594	ϕ_4''	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}-\text{C})/\text{p-nitrophénol ?}$	188
1528	1526	1521	1525	1522	1526		$\delta(\text{N}-\text{H})$	
1370	1377	1366	1370		1378	ν_{29}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	188, 265
1348	1333	1337	1333	1337	1334	ν_{41}/tren	$\delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$ $\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta) / \text{tren}$	188
1296	1291	1289	1292	1289	1290	ν_{12}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring})$	265
1201	1201		1201		1200	ν_{36}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	188
1255	1259		1257	1262		ν_{27}	$\nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	265
1072	1072	1088	1083	1089	1082	ψ_8'	$\nu_{\text{asym}}(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{C}-\text{H})$	188
		935	935	933	934	Q20	$\gamma\text{C}_5\text{H}_{11} + \gamma\text{C}_6\text{H}_{12}$	271
892	872	883	863	883		ν_{48}	$\delta_{\text{sym}}(\text{Pyr. def})$	265

Tableau 11: Fréquences IR (en cm^{-1}) observées dans les spectres ATR pour les complexes $\text{Fe}(4\text{C}_2)$, $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-NO}_2)$ et $\text{Fe}(4\text{C}_2\text{-diNO}_2)$ et leurs bases libres correspondants.

I.V.1.3 Influence de la nature du ligand proximal du fer

Afin d'obtenir des modèles de la cytochrome *c* oxydase possédant un ligand proximal, nous avons étudié les complexes de 4C_2 avec des ligands azotés en cinquième position de coordination. L'analyse de ces complexes dans l'IR lointain permettrait en effet de mettre en évidence les modes de vibrations fer-ligand. De plus, la manipulation des porphyrines de fer(II) en absence de base axiale se révèle extrêmement délicate dans la mesure où ces dérivés évoluent pour former au final des dimères à pont μ -oxo par oxydation rapide.

Dans un premier temps, nous avons déterminé par spectroscopie UV-Vis la concentration de base axiale nécessaire pour avoir une coordination totale sur le fer. Les spectres ATR-IRTF ont ensuite été enregistrés dans le domaine de l'IR moyen.

Afin de mimer la coordination N-His de la CcO nous avons choisi d'ajouter un ligand axial exogène de type 2-méthylimidazole (2-MeImH) en cinquième position de coordination du fer. Les complexes $\text{Fe}(4\text{C}_2/\text{NO}_2/\text{di-NO}_2)$ avec les bases azotées serviront de modèles simplifiés permettant de distinguer les modes dus aux vibrations métal-ligands de ceux associés à la chaîne protéique de la CcO dans les basses fréquences.

Les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2/\text{NO}_2/\text{di-NO}_2)$ présentent un spectre UV-Vis typique d'un état pentacoordiné (Figure 64). Au niveau des bandes Q l'apparition de la bande à 510 nm et de l'épaulement vers 652 nm sont caractéristiques de la formation d'une espèce pentacoordinée de fer(III).

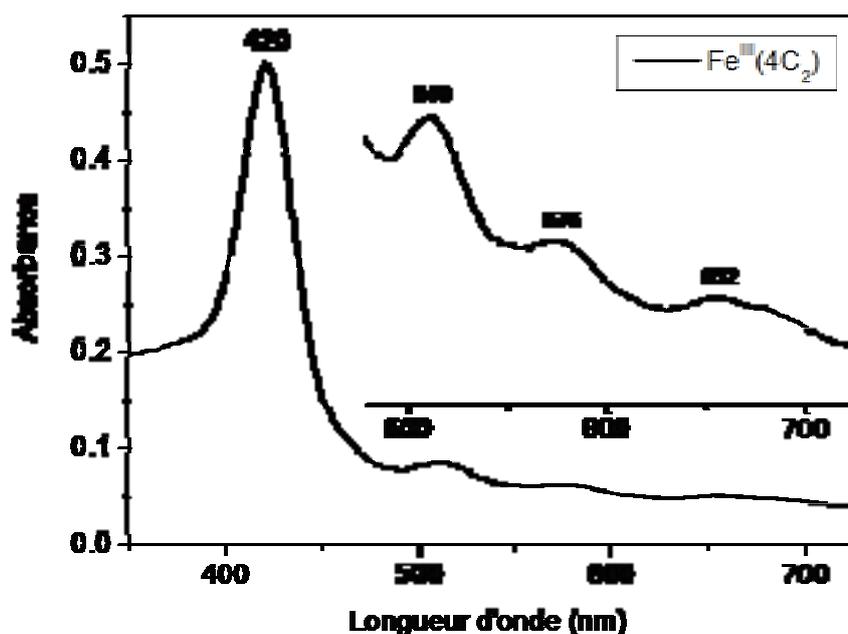


Figure 64 : Spectre d'absorption UV-Vis du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ dans le dichlorométhane. Les spectres des composés $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2/\text{NO}_2)$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2/\text{di-NO}_2)$ ne sont pas montrés car ils sont similaires à celui du $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ dans cette gamme de fréquence.

IL s'avère que la cinquième position de coordination est occupée par une molécule d'hydroxo qui peut être aisément remplacée par des ligands exogènes de nature variable. Les spectres obtenus après addition de 10 équivalents de 2-MeImH aux complexes ferriques ne montrent aucun changement significatif comparés aux spectres des composés sans ligand axial exogène, étant donné que la formation des espèces pentacoordinées à partir des composés $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ nécessite un large excès (100 à 1000 fois) de 2-MeImH.²⁷² Dans ce cas, le

spectre ATR correspondant serait dominé par les bandes du ligand 2-MeImH. L'impossibilité d'obtenir des spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2/\text{NO}_2/\text{di-NO}_2)$ à coordination N-His avec la base 2-MeImH ainsi que des porphyrines de fer(II) nous a conduit à opter pour un autre ligand azoté.

Nous avons alors utilisé la pyridine servant à la fois de solvant et de base axiale. L'empreinte d'un dérivé pentacoordiné est observée (Figure 65), à savoir une bande Q vers 572 nm. En ajoutant une quantité donnée de solution saturée en dithionite de sodium, nous observons un déplacement bathochrome de la bande de Soret de 421 à 426 nm et de la bande Q de 572 à 535 nm. Cette évolution traduit la formation du complexe de fer (II). Cependant, le spectre ATR de fer(II) obtenu avec ce complexe possède des bandes larges et intenses dans la zone $1233\text{-}960\text{ cm}^{-1}$, associées à la présence de la dithionite (non montré).

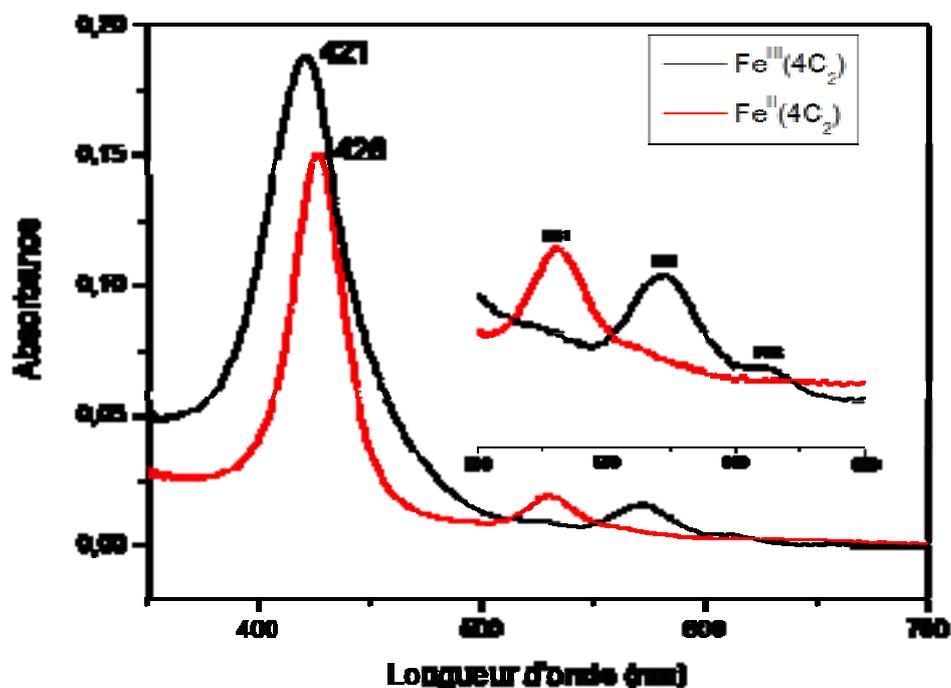


Figure 65 : Spectre d'absorption UV-Vis du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ oxydé et réduit enregistrés dans la pyridine.

Les tentatives pour obtenir les complexes de 4C_2 avec la pyridine se sont également soldées par des échecs. Lors de la réduction du complexe $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ avec la dithionite, la porphyrine précipite, ce qui ne nous a pas permis d'enregistrer des spectres propres de la porphyrine. De plus, l'utilisation de la pyridine comme solvant ne permet plus la séparation des phases aqueuse (solution de la dithionite) et organique (porphyrine), et donc le spectre ATR-IRTF obtenu est dominé par les bandes de la dithionite.

IV.2 Modèles HI

Contrairement aux complexes de la famille 4C₂, les composés de la famille HI (Tableau 3 p 47) présentent une structure plus ouverte et comportent une base axiale intramoléculaire de type pyridine en cinquième position de coordination de fer, ce qui simplifie les études.

Afin de mettre en évidence les modes IR de l'hème et du ligand proximal sensibles d'une part à la présence du fer dans le cycle porphyrinique et d'autre part au changement de l'état redox du fer, nous avons caractérisé les spectres des composés HI50a, Fe^{III}(HI50a)OH et Fe^{II}(HI50a). Nous avons dans un deuxième temps étudié les analogues HI29a et HI34a afin d'analyser l'influence des substituants Me-O et NO₂ sur les modes redox de l'hème, le ligand proximal et le site distal.

IV.2.1 Caractérisation du complexe Fe(HI50a)

La Figure 66 montre les spectres ATR-IRTF obtenus pour la base libre H₂(HI50a) et les complexes ferrique Fe^{III}(HI50a) et ferreux Fe^{II}(HI50a).

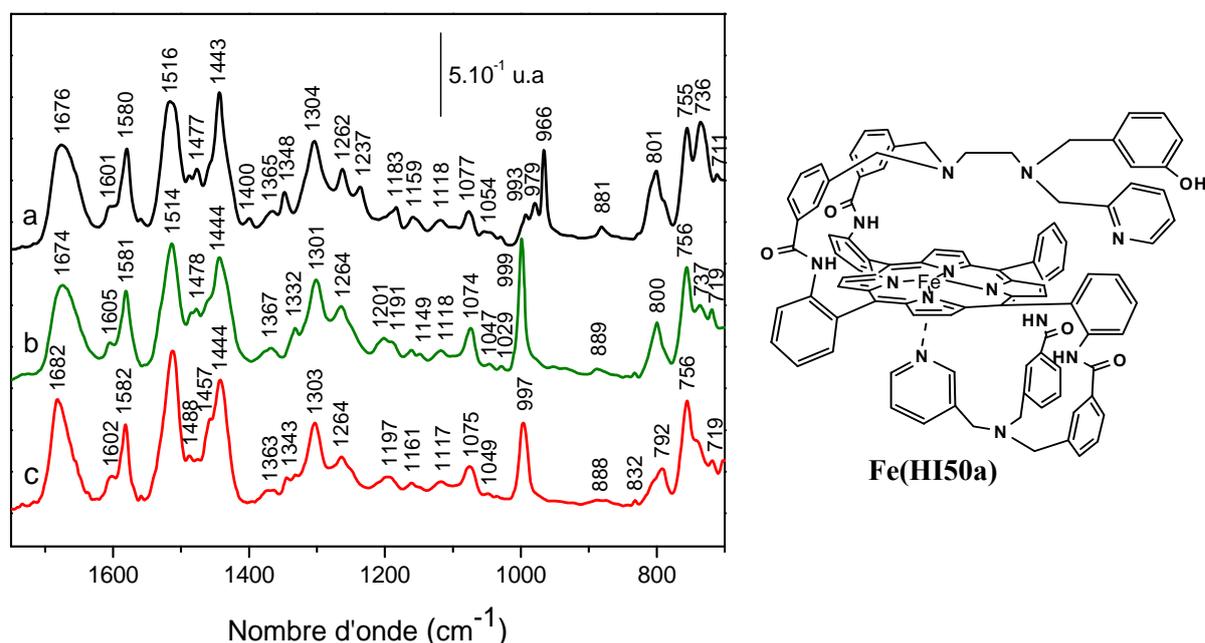


Figure 66 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) H₂(HI50a), (b) Fe^{III}(HI50a)OH et (c) Fe^{II}(HI50a).

2.1.1 Influence de l'insertion du fer et comparaison avec le spectre du Fe(4C₂)

La comparaison des spectres ATR de la base libre HI50a (a) et du complexe Fe^{III}(HI50a)OH (b) correspondant montre que l'insertion du fer dans ce modèle affecte

principalement la zone spectrale 1350-700 cm^{-1} , où sont attendues les bandes correspondant aux modes de vibration de l'hème et les ligands axiaux, tandis que les bandes IR entre 1680-1350 cm^{-1} , associées aux modes de vibrations des carbonyles et des groupements phényles, ne sont que faiblement affectées.

Les bandes IR du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ sensibles à l'insertion du fer et observées à 1332, 1201, 1047, 888, 737 et 719 cm^{-1} sont similaires à celles reportées pour le composé $\text{Fe}^{\text{III}}(4\text{C}_2)$ à 1333, 1201, 1044, 872, 729 et 719 cm^{-1} , tandis que les bandes correspondant à la base $\text{H}_2(\text{HI50a})$ détectées à 1488, 1400, 1348, 1183, 1054, 881, 735 et 711 cm^{-1} correspondent à celles observées à 1489, 1400, 1348, 1182, 1054, 882, 732 et 711 cm^{-1} dans le spectre de la base $\text{H}_2(4\text{C}_2)$.

Ces bandes sont attribuées à des modes de vibration de l'hème, sensibles à la liaison du fer dans la porphyrine. Dans le Tableau 12 sont rassemblées les données spectrales des bases libres $\text{H}_2(4\text{C}_2)$ et $\text{H}_2(\text{HI50a})$ et les complexes du fer correspondants, ainsi que les données de la littérature utilisées comme référence.

L'allure du massif à 993-979-966 cm^{-1} est également modifiée lors de l'insertion du fer dans la porphyrine HI50a. En effet, ces trois bandes ont également disparues au profit de l'apparition d'un signal intense à 999 cm^{-1} , attribué au mode ν_{47} (voir précédemment).

Les modes γ_{20} et ν_{48} associés au macrocycle porphyrinique, observés à 737 et 888 cm^{-1} respectivement dans le spectre du $\text{Fe}(\text{HI50a})$ sont déplacés à 729 et 872 cm^{-1} dans le spectre du $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ (Figure 60). En revanche, les fréquences de ces deux modes ne montrent pas de variations significatives dans les spectres des bases libres $\text{H}_2(\text{HI50a})$ et $\text{H}_2(4\text{C}_2)$, ce qui indique que les modes γ_{20} et ν_{48} sont également affectés par la coordination du ligand proximal au fer dans le complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$.

Des bandes observées à 1513, 1368, 1301, 1264 cm^{-1} dans le spectre du complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$ sont également présentes dans le spectre du $\text{Fe}(4\text{C}_2)$ mais à des fréquences différentes. Il peut s'agir soit de modes provenant de la chaîne organique incluant les phényles, les fonctions amides et les liaisons C-N du complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$, soit de modes d'hèmes fortement couplés et qui doivent être affectés par l'environnement distal et/ou proximal de la porphyrine.

Une bande à 1441 cm^{-1} dans le spectre de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ avait été attribuée au mode ψ_4' , la vibration $\nu_{\text{aym}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$ des groupes phényles. Une bande équivalente est observée de

manière reproductible à 1442 cm^{-1} dans le spectre de Fe(HI50a) qui pourrait correspondre à ce mode. Au dessous de 1000 cm^{-1} , les deux spectres ne présentent pas de différence notable.

2.1.2 Modes IR du ligand axial

Les modes impliquant les pyridines substituées par des groupements alkyles sont observés principalement dans les zones des fréquences $1280\text{-}1330$, $1253\text{-}1222$ et $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$.²⁷³ Dans cette dernière région, des modes caractéristiques des groupements 2-alkyle pyridine sont détectés à 1050 cm^{-1} et $1146\text{-}1152\text{ cm}^{-1}$, tandis que ceux des groupements 3-alkyle pyridine sont observés à $1117\text{-}1131\text{ cm}^{-1}$ et $1180\text{-}1196\text{ cm}^{-1}$.²⁷³ Dans le modèle HI50a, la pyridine proximale est 3-monosubstituée alors que la pyridine distale est 2-monosubstituée. Le spectre ATR du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ présente un mode à 1191 cm^{-1} , qui pourrait être attribué aux vibrations de déformation dans le plan des hydrogènes $\delta(\text{C-H})$ du cycle de la pyridine proximale. La bande de très faible intensité détectée à 1149 cm^{-1} dans les spectres du Fe^{III} et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ pourrait correspondre au mode $\delta(\text{C-H})$ de la pyridine distale.

2.1.3 Variations spectrales liées à l'état redox du fer

Modes de vibration des groupements carbonyles

Le spectre ATR du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ présente une bande large à 1674 cm^{-1} , associée au mode d'élongation des groupements carbonyles $\nu(\text{C=O})$. Dans le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$, cette bande est déplacée à 1682 cm^{-1} . Nous pouvons raisonnablement penser que la plus faible fréquence observée pour le complexe Fe(III) est due à une interaction privilégiée entre le ligand hydroxo coordonné au Fe(III) et un des carbonyles du site distal, situé du même côté du plan. En effet, l'influence de liaisons hydrogène sur un groupe carbonyle abaisse la fréquence du mode de vibration C=O en abaissant sa constante de force. Cependant, la réduction du complexe de Fe(III) en Fe(II) aboutit à une décoordination du ligand hydroxo, ce qui supprime cette liaison hydrogène.

Modes redox de l'hème

Même si les spectres ATR du Fe(HI50a) réduit et oxydé (Figure 66 b et c) sont assez semblables, des différences intéressantes sont à signaler.

Pour le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})\text{OH}$, la bande II caractéristique de l'état d'oxydation en série tétraphénylporphyrinique est observée à 800 cm^{-1} , tandis que la bande I sensible à l'état de spin apparaît à 1332 cm^{-1} dans la région des complexes de fer(III) haut spin.

Le mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ correspondant aux groupements carbonyles observé à 1674 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})\text{OH}$ est déplacé à 1682 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ est probablement associé à la suppression d'une liaison hydrogène établie entre le ligand hydroxo et un des carbonyles du site distal.

La réduction du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ montre un déplacement de la bande II à 792 cm^{-1} sur le spectre (Figure 66 c), ce qui conduit à affirmer que l'atome de fer(III) est réduit en fer(II). Toutefois, l'observation de deux bandes à 1343 et 1332 cm^{-1} dans la zone spectrale où attendue la bande I paraît surprenante (Figure 67).

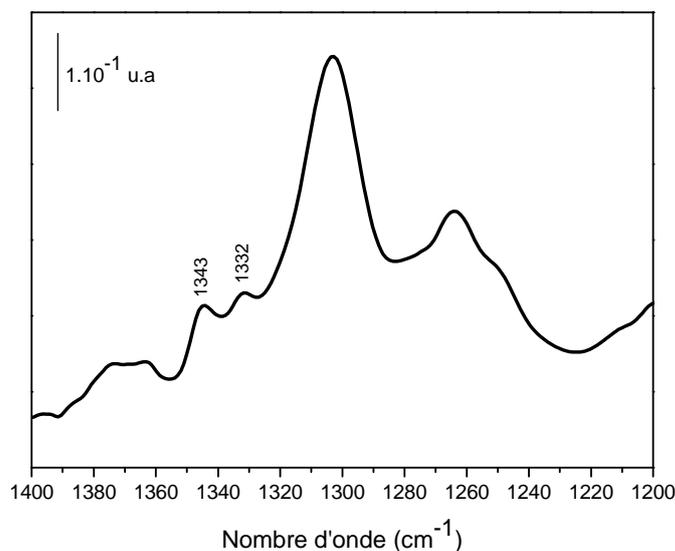


Figure 67 : Agrandissement du spectre ATR-IRTF de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ entre $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$.

Dans les spectres IR des différents complexes de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})(\text{L})_2$ où L pourrait être $(\text{py})_2$, $(\text{pip})_2$ ou $(\text{N-MeIm})_2$, la bande I est observée à $1343\text{-}47\text{ cm}^{-1}$.^{274,275} Ces observations suggèrent la présence de deux proportions différentes du complexe $\text{Fe}(\text{II})$: une proportion majoritaire à l'état bas spin et une autre minoritaire à l'état haut spin.

Certaines bandes du complexe $\text{Fe}(\text{HI50a})$ subissent des variations spectrales dues au changement de l'état d'oxydoréduction du fer. C'est ainsi que le mode ν_{36} , observé à 1201 cm^{-1} est déplacé à 1197 cm^{-1} dans le cas du $\text{Fe}(\text{II})$. La bande à 1029 cm^{-1} est légèrement déplacée vers les hautes fréquences à 1035 cm^{-1} , tandis que l'intensité du signal à 999 cm^{-1} est nettement diminuée. Le mode γ_{20} à 737 cm^{-1} est aussi atténué dans le complexe de fer(II) par rapport à celui du fer (III). Un épaulement qui apparaît à 742 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ pourrait correspondre à ce mode. La bande observée à 1457 cm^{-1} est spécifique du spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$. Il peut d'agir d'un mode d'hème qui est activé dans la

forme réduite du fait d'une symétrie un peu différente de celle de la forme oxydée. Un mode de symétrie Eu observé à 1456 cm⁻¹ dans le spectre de la Ni(TPP) est attribué à ν_{39} , la vibration $\nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$.²⁶⁵ Cette bande pourrait être attribuée à ce mode.

HI50a		4C2			Modes normaux	Attributions proposées	Référence
H ₂	Fe ^{III}	Fe ^{II}	H ₂	Fe ^{III}			
1676	1674	1682	1663	1666		$\nu(\text{C=O})$	
1601	1605	1602	1605	1605	$\Phi_{4''}$	$\nu_{\text{sym}}(\text{C-C})$	188
1516	1514	1512	1528	1525		$\delta(\text{N-H})$	
		1457		1454	ν_{39}	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$	265
1443	1444	1442	1447	1442	$\Psi_{4'}$	$\nu_{\text{asym}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$	188
1365	1367	1363	1370	1377	ν_{29}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	265
1348	1332	1344	1348	1333	ν_{41}	$\delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta)$	188
1304	1301	1303	1296	1291	ν_{12}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring})$	265
	1201	1197	1201	1201	ν_{36}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	188
	1191	1189				$\delta(\text{C-H})$ Pyr.proximale	25
1183			1182		ν_{51}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{Pyr.breathing})$	265
1159	1161	1161	1160	1160	$\Phi_{6''}$	$\delta_{\text{sym}}(\text{C-C-H})$	188
	1149					$\delta(\text{C-H})$ de la Pyr. distale	273
1118	1118	1117		1122			
1077	1074	1075	1072	1072	$\Psi_{8'}$	$\nu_{\text{asym1}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$	188
1054	1047	1048	1052	1044	ν_{52}	$\delta_{\text{sym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$	265
	999	997		999	ν_{47}	$\nu(\text{Pyr.breathing}) + \delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. Deformation}) + \delta_{\text{sym}}(\text{C-C-C})$	188
993	}			993	}	$\delta(\text{N-H})$ des pyrroles	197
979				981			
966				966			
881	889	888	882	872	ν_{48}	$\delta_{\text{sym}}(\text{Pyr. Deformation})$	265
801	800	792	801	801	γ_5	$\gamma(\text{H}_\beta) + \gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$	188
755	756	755	759	757	π_3''	$\gamma_1(\text{H})$	188
736	737	742	731	729	γ_{20}	$\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma_{\text{asym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(\text{H}_\beta)$	188
711	719	719	711	719	γ_8	$\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(\text{H}_\beta)$	188

Tableau 12 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR du complexe Fe(HI50a) et comparaison avec le modèle Fe(4C₂).

IV.2.2 Caractérisation des analogues HI34a et HI29a

2.2.1 Modes de vibrations à l'état Fe^{III}

Afin d'étudier l'effet des substituants Me-O et NO₂ sur la structure du modèle HI50a, nous avons tout d'abord analysé les différences spectrales entre le complexe HI50a et ses analogues HI29a et HI34a à l'état Fe(III) puis à l'état Fe(II). Les spectres ATR-IRTF correspondants sont présentés sur la Figure 68 et 69. Sur ces spectres sont reprises les données relatives du complexe Fe(HI50a) afin d'établir une comparaison entre ce composé et ses analogues.

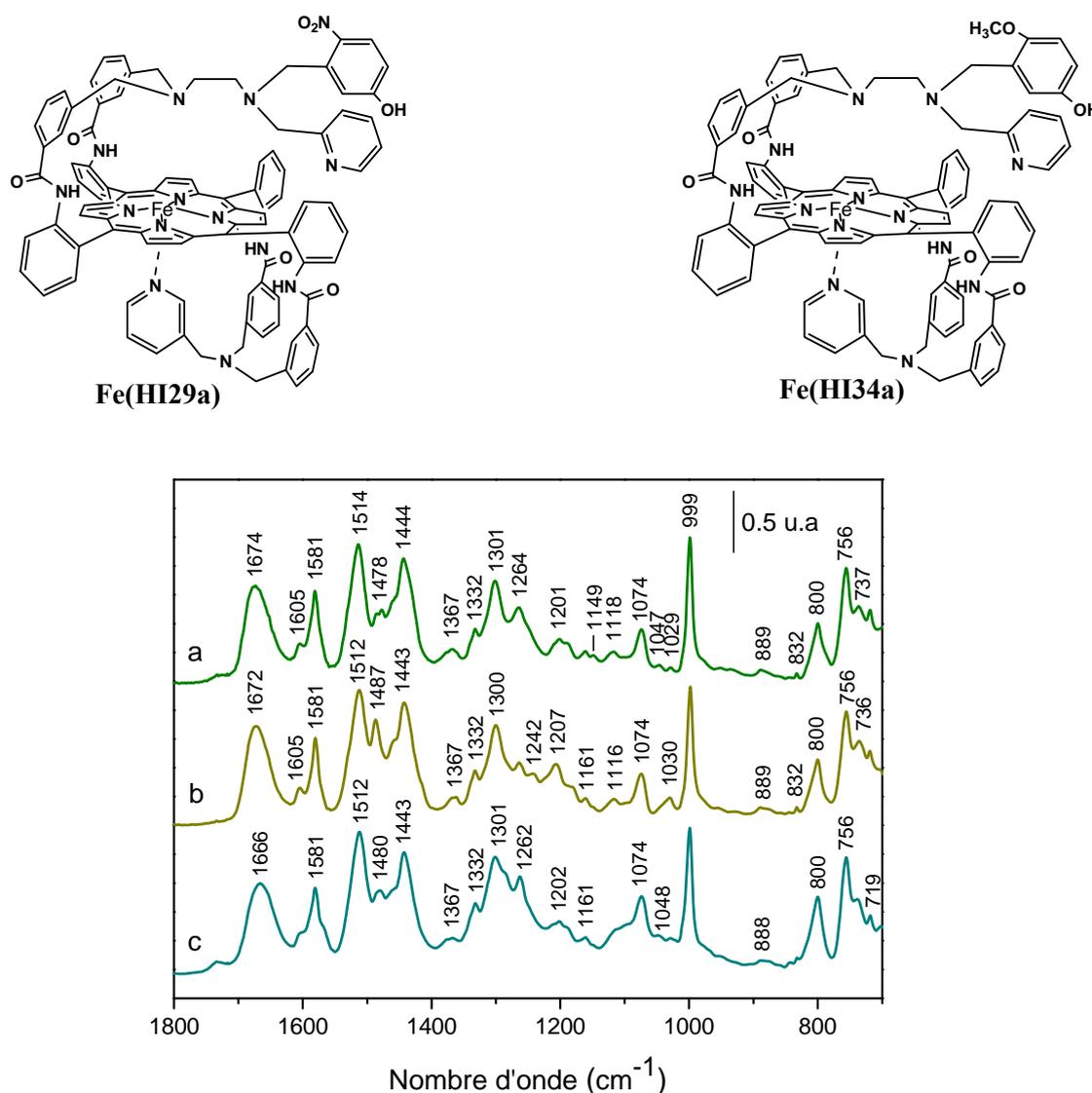


Figure 68 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a, HI29a et HI34a à l'état Fe^{III} enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) Fe^{III}(HI50a), (b) Fe^{III}(HI34a) et (c) Fe^{III}(HI29a).

Les spectres obtenus des analogues Fe(HI34a) et Fe(HI29a) sont très similaires au spectre décrit pour le complexe Fe(HI50a). En présence de Me-O ou NO₂, les modes de vibration ν_{41} (bande I) et γ_5 (Bande II) sont observés à 1332 et 800 cm⁻¹ respectivement, ce qui indique que

les composés HI34a et HI29a sont à l'état d'oxydation Fe(III) sous la forme pentacoordinée haut spin. Les différences spectrales associées au substituant OMe du phénol du site distal consistent en l'augmentation de l'intensité relative des bandes à 1487 et 1030 cm^{-1} , en l'apparition de la bande à 1242 cm^{-1} , et en un déplacement de la bande à 1201 vers les hautes fréquences à 1207 cm^{-1} . La bande à 1242 cm^{-1} n'est observée que dans le complexe HI34a. Il peut s'agir d'un mode d'élongation $\nu(\text{C-O})$ du groupe métoxy.²⁶⁸

La substitution par un groupement nitro dans le site distal entraîne un léger déplacement vers les basses fréquences de 1674 à 1666 cm^{-1} du mode des carbonyles, traduisant la formation d'une liaison hydrogène du phénol avec l'un des carbonyles du site distal. Cette observation peut vraisemblablement s'expliquer par le fait qu'un phénol substitué en position para par un groupement nitro induit une acidité importante du groupe hydroxyle, ce qui augmente sa tendance à former une liaison hydrogène par rapport au groupement phénol. En effet, le cycle aromatique est ici appauvri en électrons à cause de l'effet attracteur du groupement nitro, produisant une charge positive au voisinage du groupe hydroxyle. La bande à 1485 cm^{-1} du complexe HI50a est déplacée à 1480 cm^{-1} pour le composé HI29a. Le tableau 13 présente une synthèse des attributions des modes IR qui ont une différence spectrale pour les complexes Fe(HI50a), Fe(HI34a) et Fe(HI29a).

Comme attendu, les spectres obtenus en présence de Me-O et NO₂ ne présentent aucune variation significative par rapport au spectre obtenu pour le complexe Fe(HI50a), ce qui suggère que les analogues de HI50a étudiés ne perturbent pas les conformations de l'hème à l'état Fe(III).

2.2.2 Modes de vibrations à l'état Fe^{II}

Les spectres des complexes de HI50a, HI34a et HI29a à l'état Fe(II) sont présentés sur la Figure 69 et les différences spectrales dues à l'introduction des groupements méthoxy et nitro sont rassemblées dans le tableau 13.

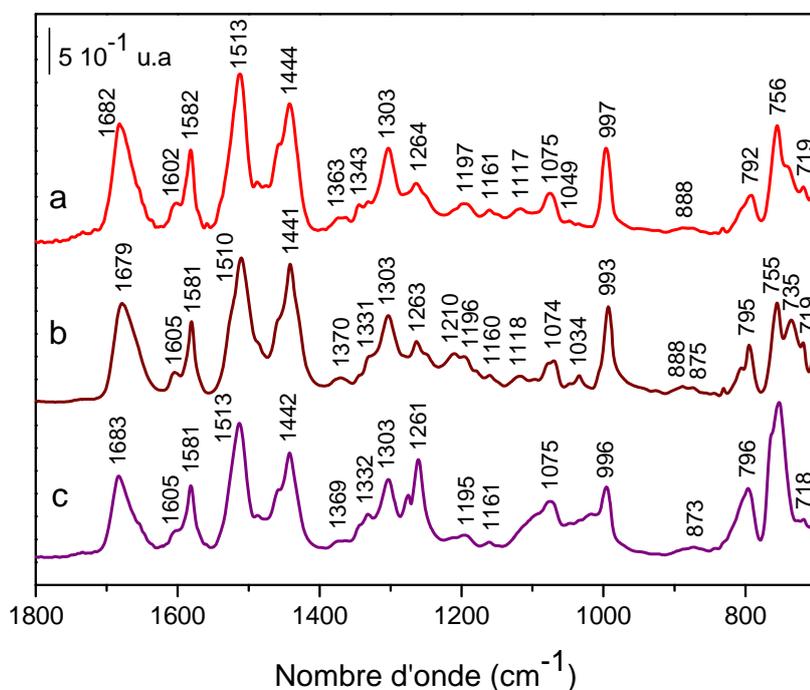


Figure 69 : Spectres ATR-IRTF des complexes de HI50a, HI29a et HI34a à l'état Fe^{II} enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) Fe^{II}(HI50a), (b) Fe^{II}(HI34) et (c) Fe^{II}(HI29a).

Les spectres obtenus sont très similaires au spectre décrit pour le complexe Fe^{II}(HI50a). Les deux modes IR de HI50a les plus sensibles au changement de l'état redox et de spin du fer, γ_5 et ν_{41} , sont également observés dans les spectres de HI29A et HI34a, à 795-96 et 1331-32 cm⁻¹, respectivement. Cependant, la bande à 1343 cm⁻¹ dans le spectre de Fe^{II}(HI50a) n'est pas observée dans les spectres de HI29A et HI34a.

Ces données montrent que la substitution des groupements méthoxy et nitro au sein du site distal des modèles HI n'induit aucune variation significative de la géométrie de l'hème ni à l'état d'oxydation Fe(III) ni à l'état Fe(II) par comparaison avec le composé HI50a. Ces résultats indiquent également que les interactions entre l'hème et le site distal sont similaires en présence des groupements méthoxy ou nitro, ce qui suggère que les propriétés de l'hème sont les mêmes quelque soit le substituant fixé. Ces résultats indiquent donc que les différences de réactivité observées entre les analogues de HI50a ne sont manifestement pas reliées à des modifications de la conformation de l'hème.

HI50a		HI29a		HI34a		Modes normaux	Attributions proposées	Références
Fe ^{III}	Fe ^{II}	Fe ^{III}	Fe ^{II}	Fe ^{III}	Fe ^{II}			
1674	1682	1666	1683	1672	1679		v(C=O)	
				1242	1251		v(C-O)méthoxy ?	268
1331	1344	1332	1332	1332	1330	v ₄₁	δ _{asym} (C _β -H) + v(C _m -Ph) + v _{sym} (Pyr. half -ring) + v _{asym} (C _α -C _β)	188
1201	1197	1202	1195/ 1110	1207	1210/ 1196	v ₃₆	v _{sym} (Pyr. half -ring) + v _{sym} (Pyr. quarter-ring) + v(C _m -Ph)	188
999	997	999	996	999	993	v ₄₇	v(Pyr.breathing) + δ _{asym} (Pyr. Deformation) + δ _{sym} (C-C-C)	188
1029	1035	1029	1035	1030	1034		Pyr ?	
800	792	800	796	800	795	γ ₅	γ(H _β) γ _{sym} (Pyr. Folding)	+ 188

Tableau 13 : Différences spectrales observées dans les spectres ATR oxydés et réduits pour les complexes Fe(HI50a), Fe(HI34a) et Fe(HI29a) et attributions. (ép) : épaulement.

IV.3 Modèle à anse phénanthroline (2Pyporphen)

Modèle générique de la CcO, le 2PyPorphen (Tableau 3 p 47) a suscité peu de travaux¹³⁸ mais la caractérisation structurale est très récente et son comportement physicochimique est apparu tout à fait original. En effet, l'équipe de Dr. Weiss a montré, à l'aide de la RPE, UV-Vis et RMN du proton, que le complexe de fer(III) est caractérisé par un environnement pentacoordiné proximal autour de l'atome de fer, tandis que le complexe de fer (II), obtenu par réduction chimique, présente une géométrie hexacoordinée autour de l'ion ferreux. Il a pu être montré que la fixation d'oxygène moléculaire nécessite une occupation préalable du bras pyridinique en position distale.¹⁰⁴ Afin d'éviter la fixation de la pyridine distale dans le complexe du fer(II), deux stratégies permettant de générer les complexes de fer(II) pentacoordiné *in situ* ont été proposées.

La première stratégie consiste à utiliser les propriétés des complexes de fer(III) de fixer les bases de type imidazole dans le site distal pour former des espèces hexacoordinées. Dans ce cas, la réduction du complexe de fer(III) est effectuée après complexation préalable de l'imidazole. Elle conduit au complexe hexacoordiné de fer(II) correspondant et la labilité relative du sixième ligand exogène permet d'observer l'oxygénation du complexe par déplacement de l'imidazole. La seconde stratégie utilise l'implication du bras pyridinique distal dans la complexation du cuivre (I) dans le site de l'anse phénanthroline.

Afin de lever toute ambiguïté structurale et de pouvoir corrélérer les modes IR observés à un état électronique de l'hème bien défini, nous avons analysé l'influence de l'état de spin et de la coordination du fer sur les modes redox de l'hème et de ses ligands axiaux.

IV.3.1 Étude de la coordination distale par un ligand exogène de type imidazole

Les propriétés de coordination distale avec des ligands exogènes de type imidazole ont été analysées par spectroscopie UV-Vis et RPE au cours de la thèse de Mamadou Lo.¹⁰⁴ Ces études ont permis d'identifier trois états de coordination différents :

(i) Sans sixième ligand axial exogène, où le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ est à l'état pentacoordiné haut-spin (5c-HS). Le spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})\text{Cl}$ enregistré à 4,2K dans le dichlorométhane montre la présence d'une symétrie axiale dont les paramètres obtenus sont les suivants : $g_{\parallel} = 2,05$ et $g_{\perp} = 5,89$. Ce spectre est donc caractéristique d'un complexe de fer(III) haut spin ($S = 5/2$) pentacoordiné.

(ii) Un équivalent d'imidazole, où un mélange des formes (5c-HS) et de complexe de fer(III) de spin intermédiaire $S = 3/2$ est obtenu. L'addition d'un équivalent d'imidazole fait apparaître sur le spectre RPE non seulement les signaux correspondant au complexe de fer(III) haut spin mais aussi de nouveaux signaux ($g = 4,29$ et $g = 2,00$) correspondant au complexe de fer(III) de spin intermédiaire $S = 3/2$.²⁷⁶

(iii) Deux équivalents d'imidazole, où le complexe de fer(III) hexacoordiné est formé majoritairement. Dès l'addition de 2 équivalents d'imidazole le spectre RPE montre la disparition des signaux du fer(III) haut spin et l'apparition de nouveaux signaux ($g = 3,05$ et $g = 2,29$) attribués au complexe de fer(III) bas spin de symétrie rhombique $S = 1/2$.²⁷⁷

Afin d'analyser l'influence de l'état de coordination et de l'état de spin du fer sur les modes redox des complexes du 2Pyporphén, nous avons étudié ces trois états de coordination différents de 2Pyporphén par spectroscopie ATR-IRTF dans le domaine de l'IR moyen, puis dans l'IR lointain.

La Figure 70 montre les spectres ATR-IRTF des complexes de 2Pyporphen enregistrés à l'état Fe^{III} (a) et Fe^{II} (b) et en présence de l'imidazole (c, d, et e). Dans ces spectres caractéristiques d'hémoprotéines 5c-HS et 6c-BS, nous attendons les contributions de l'hème, des ligands axiaux et de la chaîne organique du ligand.

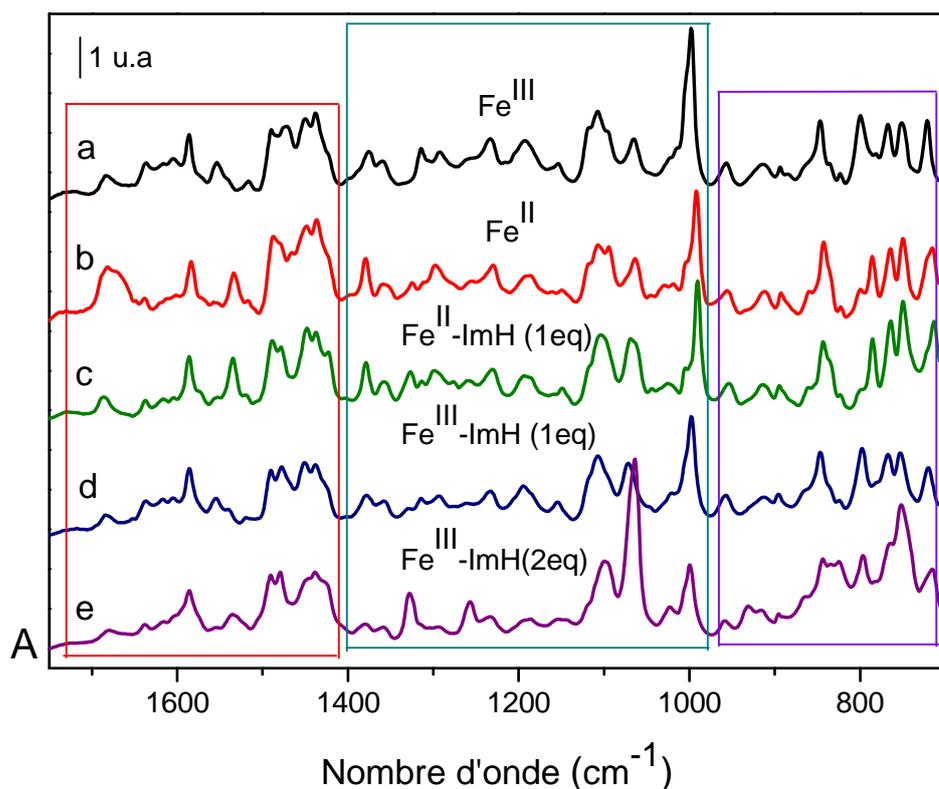
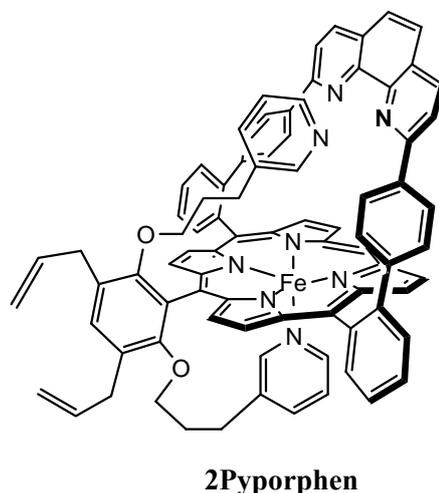
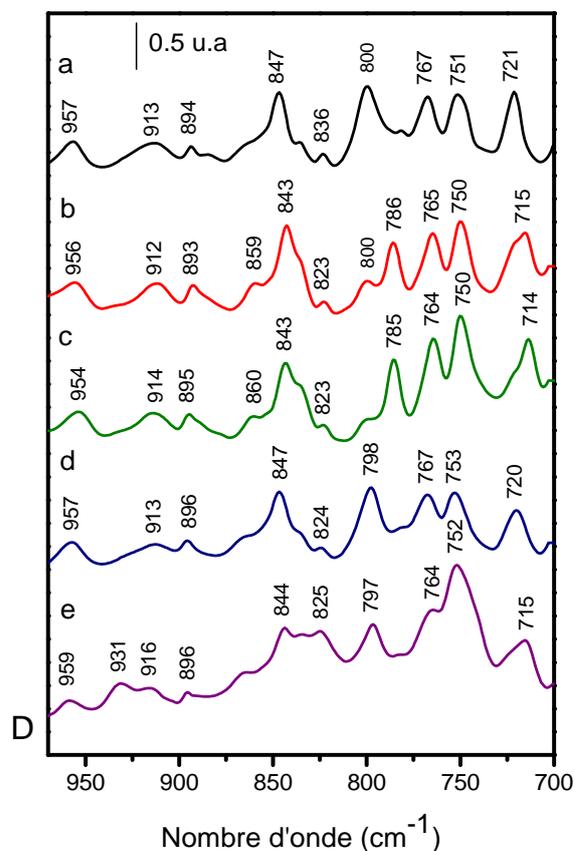
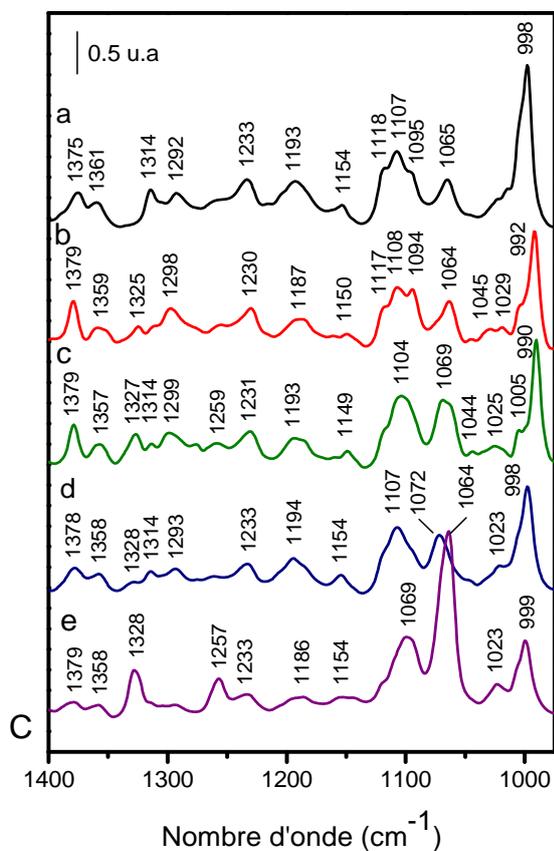
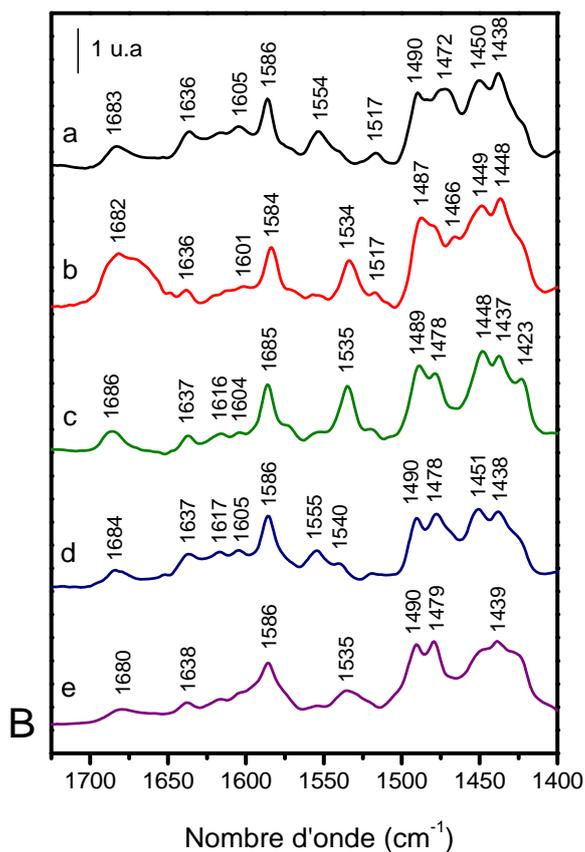


Figure 70 : Spectres ATR-IRTF de la porphyrine à anse phénanthroline Fe(Porphen). A) spectres entre $1700\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, B) zoom sur la zone entre $1700\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, C) zoom sur la zone entre $1400\text{-}990$ et D) zoom sur la zone entre $975\text{-}700\text{ cm}^{-1}$. Les spectres sont normalisés par rapport à la bande située à 1585 cm^{-1} .



(a) Fe^{III}(Porphen), (b) Fe^{II}(Porphen), (c) Fe^{II}(Porphen)-ImH, (d) Fe^{III}(Porphen)-ImH(1éq) et (e) Fe^{III}(Porphen)-ImH(2éq).

Les spectres des composés Fe(Porphen) présentent de nombreuses bandes spécifiques qui ne sont pas détectées dans les spectres des complexes HI et 4C₂.

3.1.1 Modes redox de l'hème

Les signaux observés à 1554 et 1555 cm⁻¹ dans les spectres des complexes Fe^{III}(Porphen) (**a**) et Fe^{III}(Porphen)-ImH(1éq) (**d**) respectivement, pourraient être attribués à ν_2 , le mode de vibration $\nu(C_{\beta}-C_{\beta}) + \nu_{\text{sym}}(C_{\alpha}-C_m) + \delta_{\text{asym}}(C_{\beta}-H)$.¹⁸⁸ Ce mode est un marqueur Raman de l'état de spin (bande D). La bande D est observée dans la région des complexes de fer(III) haut spin. Ces observations ne sont pas surprenantes dans la mesure où la pyridine proximale, comme le chlore, un ligand électroattracteur favorisant l'état haut spin du complexe et les études RPE ont par ailleurs confirmé cette configuration électronique. et l'examen de la bande C doit nous préciser l'état de spin.

Une bande de faible intensité, observée à 1517 cm⁻¹ dans le spectre du complexe Fe^{III}(Porphen), pourrait être attribuée au mode ν_{19} .²⁷⁴ Ce mode correspondant à un couplage de vibrations $\nu_{\text{asym}}(C_{\alpha}-C_m) + \nu_{\text{asym}}(C_{\alpha}-C_{\beta}) + \delta_{\text{asym}}(C_{\beta}-H)$ est le deuxième marqueur Raman intense de l'état de spin du fer des complexes tétraphénylporphyriniques (bande C). Cette donnée spectroscopique conduit à affirmer que l'atome de fer (III) de ce complexe est pentacoordiné. Cependant, un signal à 1541cm⁻¹ est détecté dans le spectre de Fe^{III}(Porphen)-ImH(1éq). Une bande à 1540 cm⁻¹ dans le spectre de la Fe(TPP)(N-MeIm)₂ avait été attribuée à la bande C caractéristique d'un état bas spin.²⁷⁸ Or le spectre du composé Fe^{III}(Porphen)-ImH(2éq) (**e**) qui est *a priori* sous la forme hexacoordiné présente uniquement la bande à 1536 cm⁻¹. De plus, une bande fine et d'intensité plus élevée est observée à 1534-1535 cm⁻¹ dans les spectres de Fe^{II}(Pporphen)(Py)₂ (**b**) et Fe^{II}(Phen)(Py)(ImH) (**c**). Un mode observé à 1531 cm⁻¹ dans le spectre de résonance Raman du complexe Fe^{II}(TPP)(Py)₂²⁷⁴ est attribué à ν_{19} , la bande C.

L'absence de la bande D à ~ 1554 cm⁻¹ et la présence de la bande C à ~ 1535 cm⁻¹ dans les spectres IR des complexes Fe^{III}(Porphen)-ImH(2éq), Fe^{II}(Pporphen)(Py)₂ et Fe^{II}(Porphen)(Py)(ImH) indiquent clairement la coordination hexacoordinée de ces composés, tandis que l'apparition des bandes D et C à 1555 et 1540 cm⁻¹, respectivement dans le spectre de Fe^{III}(Porphen)-ImH(1éq) indique la présence d'un mélange de deux états de spin. Ces observations sont en bon accord avec les résultats de la RPE et l'UV-visible, obtenus par l'équipe de J. Weiss (Strasbourg).

Une bande à 1487 cm⁻¹ dans le spectre de la Fe(TPP)Cl avait été attribuée aux groupements phényles.¹⁸⁸ Une bande équivalente est observée de manière reproductible à

1490(III)/1487(II) cm^{-1} dans les spectres des complexes Fe(Porphen), mais l'absence de ce mode dans les spectres des complexes Fe(HI50a) et Fe(4C₂) exclue la contribution de modes des phényles. Nous avons attribué cette bande au mode ν_{28} , la vibration symétrique $\nu(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$ des pyrroles.²⁶⁵

Dans les spectres IR obtenus avec les complexes du Fe(Porphen), la bande à 1472 cm^{-1} est déplacée à 1479 cm^{-1} en présence d'imidazole ou de la pyridine en sixième position de coordination (Figure 70 B). Le mode ν_3 impliquant la vibration $\nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$ sur le spectre de la Ni(TPP) est attendu dans cette gamme de fréquences et peut également contribuer à cette bande.²⁶⁵

Dans le spectre IR de protoporphyrine-IX, deux bandes à 1450-1434 cm^{-1} ont été attribuées au mode $\nu_{\text{asym}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$ impliquant les pyrroles.²⁷⁹ Les bandes observées à 1458-1438 cm^{-1} de manière reproductible dans les spectres des complexes de Fe(Porphen) pourraient correspondre à ce mode. De plus, la comparaison des spectres de la base libre H₂(Porphen) et ses analogues de fer montre clairement le dédoublement de la bande à 1444 cm^{-1} en deux bandes à 1450 et 1438 cm^{-1} , excluant ainsi la contribution de modes des phényles. Cette observation laisse suggérer que ce dédoublement est lié à une distorsion géométrique induite par la présence de l'atome de fer dans la porphyrine.

Le signal à 1375(III)/1379(II) cm^{-1} peut être attribué à ν_{29} , le mode de vibration $\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$. L'intensité de ce mode varie selon l'état redox du fer et est plus importante dans le spectre des espèces réduites (**b** et **c**).²⁶⁵

La présence du mode ν_{12} à 1294 cm^{-1} n'est pas influencée par la présence d'un sixième ligand axial de l'hème, puisqu'il se retrouve aussi bien dans le spectre de la forme hexacoordinée Fe^{III}(Porphen)-ImH (Figure 70 C **e**) que dans celui de l'espèce pentacoordinée Fe^{III}(Porphen) (Figure 70 C **a**). Cependant, ce mode subit un déplacement vers les hautes fréquences lorsque le complexe est réduit en Fe(II) (**b** et **c**).

Le signal intense à 998(III)/992(II) cm^{-1} pourrait être attribué à ν_{47} , la vibration du macrocycle porphyrinique. La comparaison des spectres de la Figure 70 C montre que l'intensité de ce mode est sensible à l'état de spin et de coordination du fer pour les complexes Fe^{III}(Porphen). En effet, son intensité est intense dans le spectre enregistré avec le composé Fe^{III}(Porphen), tandis qu'elle est fortement diminuée dans les spectres des complexes Fe^{III}(Porphen)-ImH (**d** et **e**). De plus, cette bande est déplacée vers les basses fréquences pour les complexes Fe^{II}(Porphen). Ce signal IR intense est directement corrélé à la structure et les propriétés électroniques de l'hème de la porphyrine.

La bande à 847(HS)/843(BS) cm^{-1} , observée à 840 cm^{-1} dans le spectre IR de la Ni(TPP), est attribuée au mode ν_{46} , la vibration $\delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. Deformation})$ des pyrroles.²⁶⁵

Dans le domaine de fréquence 810-700 cm^{-1} , associé à des modes de vibration hors du plan de la porphyrine, les spectres des différents complexes de 2Pyporphén (Figure 70 D) sont très proches de ceux étudiés pour les complexes Fe(4C₂) et Fe(HI50a).

Le mode γ_5 associé aux vibrations de déformations hors du plan des pyrroles, observé à 800(III)/793(II) dans le spectre du complexe Fe(HI50a) (Figure 66) est également présent dans les spectres de Fe(Porphén) à 800(III)/786(II). Lors de la réduction du Fe^{III}(Porphén) en Fe^{II}(Porphén), le déplacement de la bande II vers les basses fréquences indiquent clairement que la configuration électronique du fer évolue vers celle caractéristique d'un état bas spin.²⁶³ La bande II a été considérée légèrement sensible à l'état de spin dans les complexes de fer(II). Un léger déplacement vers les basses fréquences est pourtant observé dans le spectre de Fe^{III}(phen)-ImH(2éq) (e), suggérant également la sensibilité de cette bande à l'état de spin pour les complexes de Fe(III).

Le mode γ_8 est situé à 715-14 cm^{-1} pour toutes les formes hexacoordinées du composé Fe(Porphén), tandis que le complexe pentacoordiné Fe^{III}(Porphén) présente ce mode à 720 cm^{-1} . Cette bande est également observée à 720 cm^{-1} dans le spectre IR de Fe(TPP)Cl¹⁸⁸, ce qui suggère que l'atome de fer dans le complexe pentacoordiné Fe^{III}(Porphén) serait légèrement sorti du plan macrocyclique.

3.1.2 Modes redox IR des ligands axiaux

La bande observée à 1314 cm^{-1} dans le spectre de Fe^{III}(Porphén) est déplacée à 1325 cm^{-1} dans le spectre de Fe^{II}(Porphén)(Py)₂, où la pyridine distale coordonne le fer. Ce mode aurait bien pu être attribué aux vibrations de déformation des hydrogènes du cycle pyridinique. Or le déplacement de cette bande est observée de manière reproductible à 1328 cm^{-1} , mais avec une intensité plus importante dans les spectres de Fe^{III}(Porphén)-ImH(2éq) et Fe^{II}(Porphén)-ImH, excluant la contribution de modes de la pyridine labile du site distal. De plus cette bande est présente dans le spectre de la phénanthroline et de la base libre à 1310 et 1314 cm^{-1} , respectivement (Figure 71 B). Cette bande pourrait correspondre à une vibration impliquant l'anse phénanthroline.

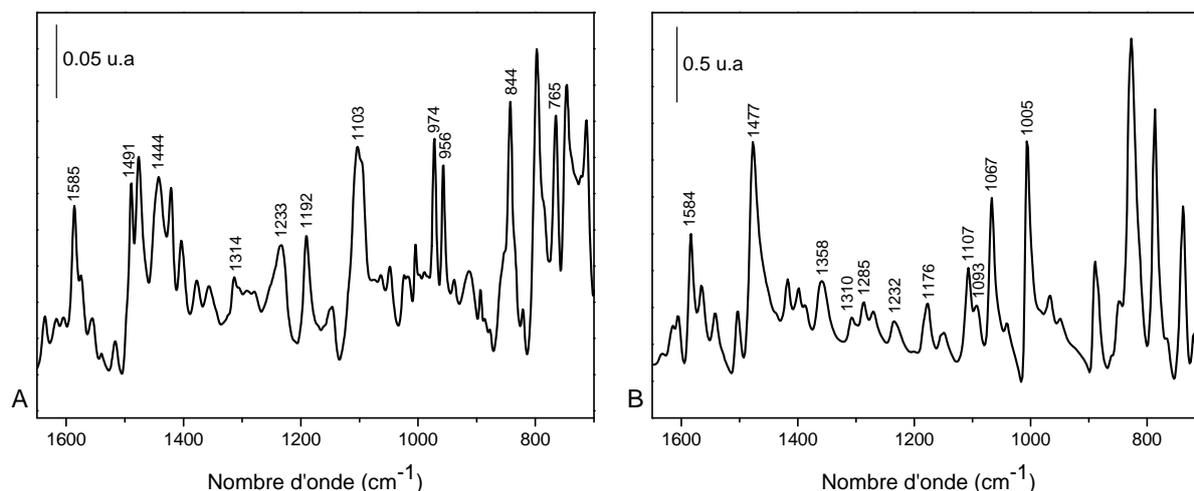


Figure 71 : Spectres ATR-IRTF de la base libre et l'anse phénanthroline (2,9-bis (p-bromophényl)-1,10-phénanthroline). A) H₂(Porphen) et B) anse phénanthroline.

Une bande, associée aux vibrations d'élongation et de déformation du cycle de la pyridine, est observée à 1123 cm⁻¹ dans le spectre IR du composé 3-Mepyridine.²⁸⁰ L'épaule observé 1118 cm⁻¹ dans les spectres des complexes Fe(Porphen) pourrait correspondre à ce mode. Étant donné que ce mode est absent des spectres de la phénanthroline et de la base libre H₂(Porphen), il pourrait être attribué aux vibrations de la pyridine proximale.

Un signal intense est détecté dans le spectre de la phénanthroline à 1107/1093 cm⁻¹ (spectre B). L'allure de ce signal est similaire à celle du signal à 1103/1095 cm⁻¹ dans la base libre H₂(Porphen) (spectre A). Les intensités relatives et les fréquences des bandes composant ce signal se trouvent affectées dans le spectre de H₂(Porphen). En revanche, il n'y a pas d'effet significatif de l'insertion du fer et sa réduction sur les bandes 1103/ 1095 cm⁻¹, mise à part le léger déplacement de la bande à 1103 à 1107 cm⁻¹. Cependant, une modification de l'allure de ce signal est observée dans les spectres des complexes Fe^{III/II}(Porphen)-ImH, où une seule bande large est détectée. Nous proposons que les bandes à 1103 et 1095 cm⁻¹ correspondent aux modes de déformations des hydrogènes des cycles des deux pyridines rigides de l'anse.²⁷³ Nous pensons que cette modification a pour origine la formation de la liaison hydrogène bifurquée entre le proton porté par l'azote de L'imidazole et les deux azotes de la phénanthroline (Figure 72).

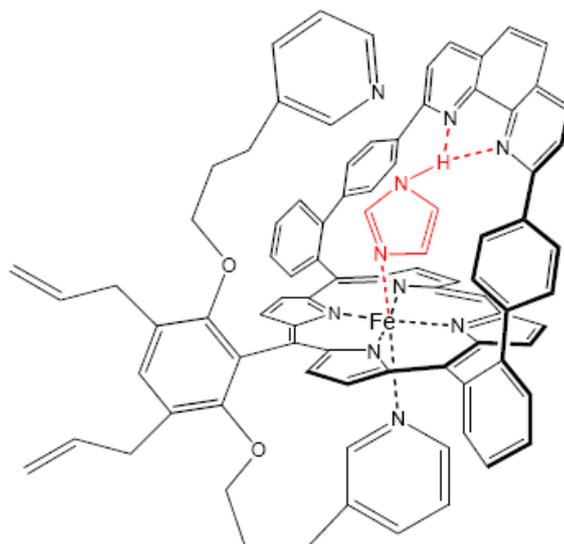


Figure 72 : Formation de la liaison hydrogène bifurquée lors de la coordination de l'imidazole sur le fer de la porphyrine du complexe 2Pyporphen.

Le mode associé à la déformation des hydrogènes a été attribuée à 1068 cm^{-1} dans le spectre de RR de la pyridine.²⁸¹ La fréquence du mode (C_5N_r) de l'imidazole est également observée à 1066 cm^{-1} et il est déplacé à 1074 cm^{-1} lorsque l'imidazole coordonne le fer dans les complexes de Im-Fe(III)PPIX²³⁶ et Im-Fe(III)MP8.¹⁸⁹ Le spectre ATR du complexe Fe(Porphen) présente une bande à $1065(\text{III})/1064(\text{II})\text{ cm}^{-1}$, attribué au mode de vibration des pyridines. Par ailleurs, ce signal montre des différences notables après l'addition de l'imidazole. En effet, cette bande est particulièrement intense et large en présence de deux équivalents d'imidazole comme le montre la comparaison des spectres du complexe Fe(Porphen) (Figure 70), tandis qu'elle est déplacée à 1072 cm^{-1} pour le complexe Fe^{III}(Porphen)-ImH(1éq) et à 1068 cm^{-1} pour le complexe Fe^{II}(Porphen)-ImH.

Un mode observé à 1029 cm^{-1} dans le spectre de RR de la pyridine est déplacée à 1042 cm^{-1} dans le spectre de RR du complexe Fe(OEP)(Py)₂.¹⁸¹ Les spectres IR des complexes Fe^{II}(Porphen)(py)₂ et Fe^{II}(Porphen)-ImH présentent un mode de faible intensité à 1044 cm^{-1} qui pourrait être attribué au mode de vibration de la pyridine.

Le Tableau 14 regroupe les attributions que nous proposons pour les complexes de 2Pyporphén.

Sans ImH		Avec ImH			Modes normaux	Attributions proposées	Références
Fe ^{III}	Fe ^{II}	Fe ^{III} (1éq)	Fe ^{III} (2éq)	Fe ^{II}			
1605	1601	1605	1603	1604	Φ_4''	$\nu_{\text{sym}}(\text{C-C})$	188
1554		1555			ν_2	$\nu(\text{C}_\beta\text{-C}_\beta) + \nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m) + \delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$	274, 188
1517	1534	1540	1536	1535	ν_{19}	$\nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m) + \nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta) + \delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$	274
1490	1487	1490	1490	1489	ν_{28}	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$	265
1472	1466	1477	1479	1478	ν_3	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)$	265
1450/ 1438	1449/ 1437	1448/ 1438	1447/ 1438	1448/ 1437		$\nu_{\text{asym}}(\text{C-C}) + \delta(\text{C-C-H})$	279
1375	1379	1379	1379	1379	ν_{29}	$\nu(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	265
1361	1359	1358	1358	1357			
1314	1325	1328/ 1314	1328	1327		Anse phénanthroline ?	
1292	1298	1294	1294	1299	ν_{12}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring})$	265
	1255	1256	1256	1259	ν_{27}	$\nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	265
1233	1230	1232	1232	1231			
1193	1187	1194	1187		ν_{36}	$\nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. half -ring}) + \nu_{\text{sym}}(\text{Pyr. quarter-ring}) + \nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	184
1154	1150	1154	1154	1149	Φ_6''	$\delta_{\text{sym}}(\text{C-C-H})$	188
1118	1117	1117				Déformation du cycle de Pyr ?	280
1107	1107	1107	1101	1104		$\delta(\text{C-H})$ des pyr de l'anse ?	273
1095	1094					$\delta(\text{C-H})$ des pyr de l'anse ?	273
1065	1064	1072	1069	1069		Pyr	281
1029	1045	1023	1023	1044/ 1025		Pyr?	181
998	992	999	999	990	ν_{47}	$\nu(\text{Pyr.breathing}) + \delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. Deformation}) + \delta_{\text{sym}}(\text{C-C-C})$	188
847	843	844	844	843	ν_{46}	$\delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. Deformation})$	265
800	786	798	796	785	γ_5	$\gamma(\text{H}_\beta) + \gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$	188
752	750	752	752	750	π_3''	$\gamma_1(\text{H})$	188
721	715	714	715	714	γ_8	$\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma(\text{H}_\beta)$	188

Tableau 14 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration des complexes Fe(Porphén) et attribution.

IV.4 Conclusion

Nous avons procédé, dans ce chapitre, à l'étude comparative détaillée par spectroscopie ATR-IRTF dans le domaine de l'IR moyen de modèles biomimétiques de la CcO qui se différencient notamment par leur environnement du site distal. Cette étude a permis de mettre en évidence des modes IR redox spécifiques de l'hème, dont certains sont sensibles à l'état de spin du fer. Elle a également permis de corrélérer des modes IR caractéristiques de la chaîne organique et sensibles à l'état redox du fer à la conformation de l'hème et à son état de coordination. Il est cependant nécessaire de mener plus de mesures et surtout de comparer les données expérimentales à des calculs théoriques pour valider les attributions proposées lors de cette étude.

**Chapitre V : Études des modèles de la CcO dans
l'infrarouge lointain (700-100 cm⁻¹)**

La région des basses fréquences du spectre IR (600-100 cm^{-1}) comporte les modes de vibration spécifiques de l'élongation et de la déformation angulaire de la liaison entre les centres métalliques et leurs ligands axiaux ou équatoriaux, ce qui permet d'identifier la nature de la conformation de ces ligands. Lorsque l'hème présente des déformations hors du plan ou dans le plan, la région des basses fréquences du spectre comporte également de nombreux modes de vibration associés à ces distorsions.^{282,283} En outre, les fréquences des modes impliquant les vibrations métal-ligands de l'hème sont très sensibles à l'état d'ionisation des ligands et à la force de la liaison métal-ligand, ce qui permet de déterminer les propriétés redox de l'hème et les propriétés électroniques des ligands.²⁶⁹

Boucher *et coll.* ont comparé les spectres IR de différentes métalloporphyrines en vue d'observer une vibration caractéristique de la liaison azote-métal. Ils ont proposé que la bande observée vers 350 cm^{-1} résulte d'un couplage des vibrations d'élongation azote-métal et de déformation du macrocycle porphyrinique.²⁸⁴ Des travaux menés sur des complexes de porphyrine dans les basses fréquences IR par Oshio *et coll.* ont montré l'existence d'un mode IR très sensible à l'état de spin de l'hème.²⁶³ L'analyse du complexe $[(\text{ImH})_2\text{Fe}^{\text{III}}\text{OEP}]\text{ClO}_4$ modifié par des substituants isotopiques a mis en évidence des modes de vibration impliquant le fer et ses ligands axiaux.²⁸⁵ Des modes d'hème sensibles à la nature du métal dans le domaine des basses fréquences ont également été observés.^{286,287} Récemment, une étude menée sur des complexes imidazole et imidazolate de la Fe-protoporphyrine IX (FePP) et de la microperoxydase-8 (MP8) par spectroscopie IR en mode différentiel a permis l'identification des modes sensibles à l'état redox de l'hème dans le domaine des basses fréquences (670-50 cm^{-1}).¹⁹⁰ Certains modes des cycles pyrroliques de l'hème (420-370 cm^{-1}), des modes internes des ligands axiaux (670-680 cm^{-1}) et un mode d'élongation antisymétrique des liaisons $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PP})(\text{Im}^-)_2$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{MP8})\text{Im}$ -histidinate (340-310 cm^{-1}) ont été plus particulièrement caractérisés. Par contre peu de complexes de tétraphénylporphyrines réduites ont fait l'objet de travaux approfondis.^{274,288}

Afin de mettre en évidence les modes IR de l'hème et des ligands axiaux sensibles au changement de l'état redox du fer dans le domaine des basses fréquences IR, nous avons également enregistré les spectres ATR des modèles de la CcO précédemment étudiés dans la gamme de fréquence 700-50 cm^{-1} . Il s'agit des premières études détaillées en mode ATR dans le domaine IR lointain sur des porphyrines superstructurées.

V.1 Comparaison des spectres ATR de la Fe(TPP)Cl et du Fe(4C₂)

Afin de poursuivre l'étude de l'influence de la tren sur les modes de vibration de l'hème, nous avons également comparé le spectre IR du complexe Fe(4C₂) obtenu dans les basses fréquences avec celui du Fe(TPP)Cl publié.¹⁸⁸ Nous avons vu dans le chapitre IV que la présence du fer dans les porphyrines se manifeste par un ensemble de modifications spectrales par rapport aux porphyrines sans fer. Certaines bandes d'absorption subissent des variations d'intensité ; c'est le cas de quelques vibrations de déformation du macrocycle porphyrinique qui s'atténuent pour les complexes de fer ; des vibrations de déformation du cycle pyrrolique dans le plan s'accroissent par contre. Dans cette partie, nous nous intéressons plutôt aux perturbations affectant majoritairement des bandes impliquant les vibrations du fer et ses ligands.

La Figure 73 montre les spectres ATR-IRTF de la base libre H₂(4C₂) (a), du complexe Fe(4C₂) (b) et Fe(TPP)Cl (c) enregistrés dans la gamme spectrale 650-150 cm⁻¹.

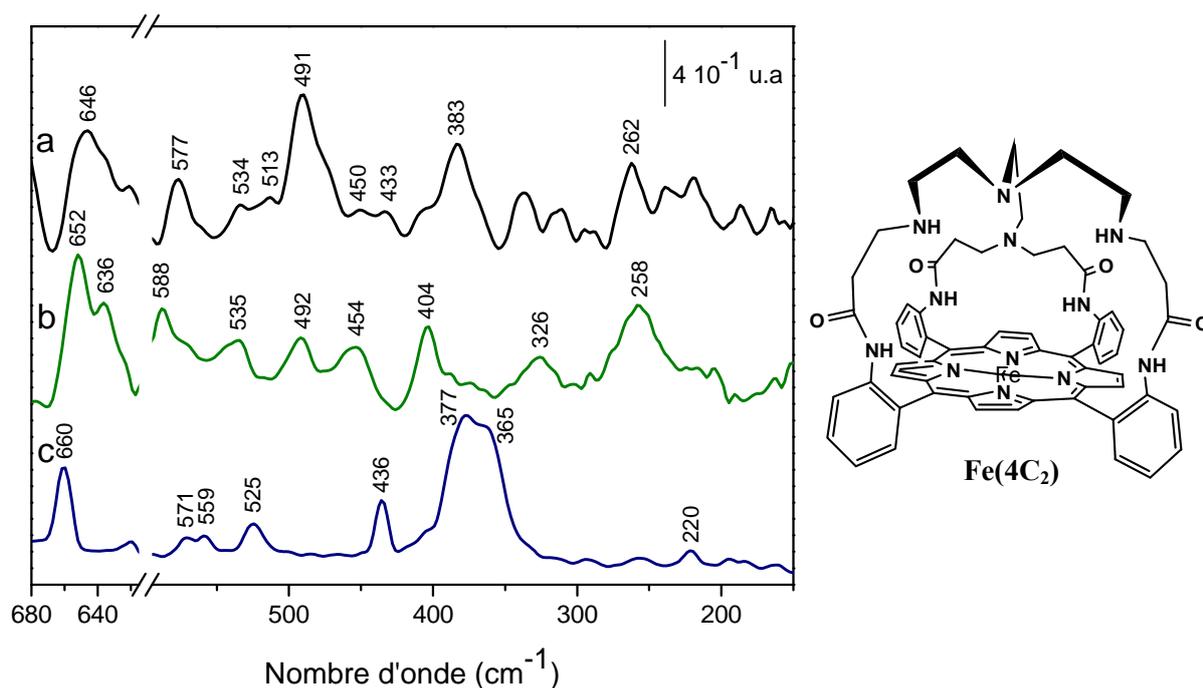


Figure 73 : Spectres ATR-IRTF des composés H₂(4C₂) (a), Fe(4C₂) (b) et Fe(TPP)Cl (c) enregistrés sous forme de films secs sur l'ATR.

La zone spectrale des fréquences supérieures à 500 cm⁻¹ du spectre de la Fe(TPP)Cl (c) met en jeu principalement les vibrations hors du plan. La bande observée à 525 cm⁻¹ est attribuée au mode π_5'' de vibration hors-du plan $\gamma_1(C) + \delta(\text{Pyr. translation})$, tandis que la bande observée à 660 cm⁻¹ correspond au mode de déformation dans le plan Φ_9'' des groupes phényles, $\delta_2(C-C-C) + \delta(\text{Pyr. rotation})$.¹⁸⁸ Dans le spectre IR du complexe Fe(4C₂) (b), les

signaux observés à 652 et 535 cm^{-1} correspondent vraisemblablement au mode ϕ_9'' et π_5'' , respectivement.

Le spectre de résonance Raman du complexe Fe(TPP)Cl présente une bande à 639 cm^{-1} , attribuée à la déformation du cycle des phényles $\delta_2(\text{C-C-C})$ du mode ϕ_9 .²⁶⁵ La bande détectée à 636 cm^{-1} dans le spectre du complexe Fe(4C₂) pourrait correspondre à ce mode.

Le mode γ_7 associé aux vibrations de déformation hors du plan du macrocycle porphyrinique, observé à 571 cm^{-1} dans le spectre de la Fe(TPP)Cl semble également présent dans le spectre du complexe Fe(4C₂) à 588 cm^{-1} .

Les différences de fréquences observées pour ces signaux provenant de modes de nature similaire indiquent que les modes de vibration observés dans les basses fréquences IR sont extrêmement sensibles à la nature et à la conformation de la porphyrine et reflètent la différence de structure entre ces deux modèles d'hémoprotéines ou de l'absorption du ligand distal.

Les bandes observées à 492 et 454 cm^{-1} sont spécifiques du spectre ATR du complexe Fe(4C₂). Il peut s'agir soit de modes provenant du squelette organique, soit de modes d'hèmes qui sont activés dans le complexe Fe(4C₂) du fait d'une symétrie différente de celle de la Fe(TPP)Cl. L'attribution de ces deux modes est cependant délicate. Dans la gamme de fréquence 500-450 cm^{-1} , peu de modes sont détectés dans les spectres IR des complexes Fe(TPP). Bien qu'il est difficile de comparer les intensités des spectres du Fe(4C₂) et de la base libre H₂(4C₂) enregistrés sur l'ATR, les intensités relatives des deux bandes à 492 et 454 cm^{-1} semble être sensibles à la liaison du fer dans la porphyrine. En particulier, l'intensité de la bande à 491 cm^{-1} est visiblement diminuée en présence du fer (spectres a et b). Cette observation peut vraisemblablement s'expliquer par le fait que l'hème du Fe(4C₂) est plus contraint que celui de la base libre, du fait de la présence du fer. Il est plus probable que les pyrroles de la base libre H₂(4C₂) sont plus sensible aux déformations hors-du plan. La bande observée à 492 cm^{-1} peut être attribuée soit à un mode de déformation hors du plan de la porphyrine, soit à un mode de la tren.

Un mode observé à 450 cm^{-1} dans le spectre de résonance Raman de la Ni(TPP) est attribué à ν_{33} , la vibration $\delta(\text{Pyr rot})$ dans le plan de l'hème.²⁶⁵ La bande observée à 454 cm^{-1} pourrait être à l'origine du mode ν_{33} . Afin de réaliser les attributions de manière définitive, il faudrait cependant poursuivre l'identification des modes IR par l'étude de porphyrines marquées.

La zone des fréquences entre 450-350 cm^{-1} des spectres IR et Raman des complexes Fe(TPP)Cl comprend des modes de déformation dans le plan de la porphyrine, d'élongation du fer et des ligands axiaux $\nu(\text{M-L})$ ainsi que le mode ν_{50} d'élongation $\nu(\text{M-Npyr})$ impliquant le fer et les pyrroles.

Le mode ν_{49} attribué à la vibration $\delta(\text{Pyr.rotation})$ et observé à 436 cm^{-1} dans le spectre de Fe(TPP)Cl est absent du spectre du complexe Fe(4C₂). Ce mode, désignée par la bande III, est un marqueur IR intense de l'état de spin dans le domaine des basses fréquences.¹⁸⁸

Le mode $\nu(\text{M-Npyr})$ a été attribué à 420-400 cm^{-1} dans les spectres IR du complexe Fe(TPP)Cl et Ni(TPP).^{188,265} Dans le spectre IR de la base libre H₂(4C₂), la bande à 383 cm^{-1} est très faible, tandis qu'une bande intense apparaît à 404 cm^{-1} dans le spectre de Fe(4C₂). Cette bande pourrait correspondre au mode ν_{50} de vibration impliquant le fer et les pyrroles ($\nu(\text{Fe-N}) + \delta(\text{Pyr.translation})$).¹⁸⁸

Le massif à 377/365 cm^{-1} , observé dans le spectre du complexe Fe(TPP)Cl (c), est associé à la contribution du ligand axial Cl coordonné en cinquième position du fer. En effet, le mode $\nu(\text{Fe-Cl})$ a été attribué à 378 cm^{-1} dans le spectre du complexe Fe(TPP)Cl.¹⁸⁸ L'absence de ce massif sur le spectre de Fe(4C₂) confirme que la coordination axiale du fer n'est pas assurée par le chlore.

Le spectre du complexe Fe(4C₂) obtenu dans le domaine IR moyen a suggéré une géométrie pentacoordinée autour du fer. D'après les résultats obtenus par l'équipe de Dr. Boitrel, la coordination axiale de ce complexe est assurée par un composé hydroxo. Le mode associé à la vibration $\nu(\text{Fe-OH})$ a été attribué à 350 cm^{-1} dans le spectre IR de la protoporphyrine IX.²⁸⁹ Nous n'avons pas identifié de mode IR qui pourrait être associé à une vibration $\nu(\text{Fe-OH})$ dans le spectre enregistré pour le complexe Fe(4C₂).

Deux bandes détectées dans la région 330-250 cm^{-1} (à 326 et 258 cm^{-1}) sont également spécifiques du spectre du complexe Fe(4C₂). Un mode observé à 321 cm^{-1} dans le spectre IR de la Ni(TPP) a été attribué à γ_6 , une vibration (*Pyrrole tilt*) hors du plan de l'hème.²⁶⁵ Des bandes à 327-333 cm^{-1} ont été également détectées dans les spectres IR des dérivées de la PP-IX et MP-11 et ont été attribuées à $\delta(\text{C-N})$.²⁷⁹ Ainsi, l'attribution de cette bande reste délicate. La bande large à 258 cm^{-1} pourrait correspondre au mode γ_{16} associée à la vibration (*Pyrrole tilt*) hors-du plan.²⁶⁵

Ces observations montrent que les fréquences et les intensités relatives des signaux de l'hème et de groupes phényles d'une porphyrine superstructurée comme Fe(4C₂) sont assez différentes de celles d'une porphyrine simple comme la Fe(TPP)Cl.

Les attributions proposées pour le complexe Fe(4C₂) et la base libre correspondante dans la gamme spectrale 650-150 cm⁻¹ sont consignées dans le Tableau 15.

H ₂ (4C ₂)	Fe(4C ₂) OH	Fe(TPP) Cl	Modes normaux	Attributions proposées	Références
646	652	660	φ ₉ "	δ ₂ (C-C-C) + δ(Pyr.rotation)	188
	636		φ ₉	δ ₂ (C-C-C)	265
577	588	571	γ ₇	γ(C _α -C _m) + γ _{asym} (Pyr. Folding) + γ _{sym} (Pyr. Folding)	188
534	535	525	π ₅ "	γ ₁ (C) + δ(Pyr.translation)	188
491	492			Porphyrine ou tren ?	
450	454		v ₃₃	δ(Pyr rot) ?	265
433		436	v ₄₉	δ(Pyr.rotation)	188
383	404		v ₅₀	v(Fe-N) + δ(Pyr.translation) ou tren ?	188
		377	Fe-Cl	v(Fe-Cl)	188
330/320	326		γ ₆	Pyr tilt ou δ(C-N) ou tren ?	265, 279
262	258		γ ₁₆	Pyr tilt ou tren ?	265

Tableau 15 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre H₂(4C₂) et du complexe Fe(4C₂)OH et comparaison avec la Fe(TPP)Cl.

V.2 Modèles HI

V.2.1 Caractérisation du complexe Fe(HI50a)

La Figure 74 montre les spectres ATR-IRTF de la base libre H₂(HI50a) (a), Fe^{III}(HI50a) (b) et Fe^{II}(HI50a) (c). Dans ces spectres, nous attendons en outre des contributions de l'hème et du squelette organique, les modes de vibration du cycle pyridinique et fer-pyridine.

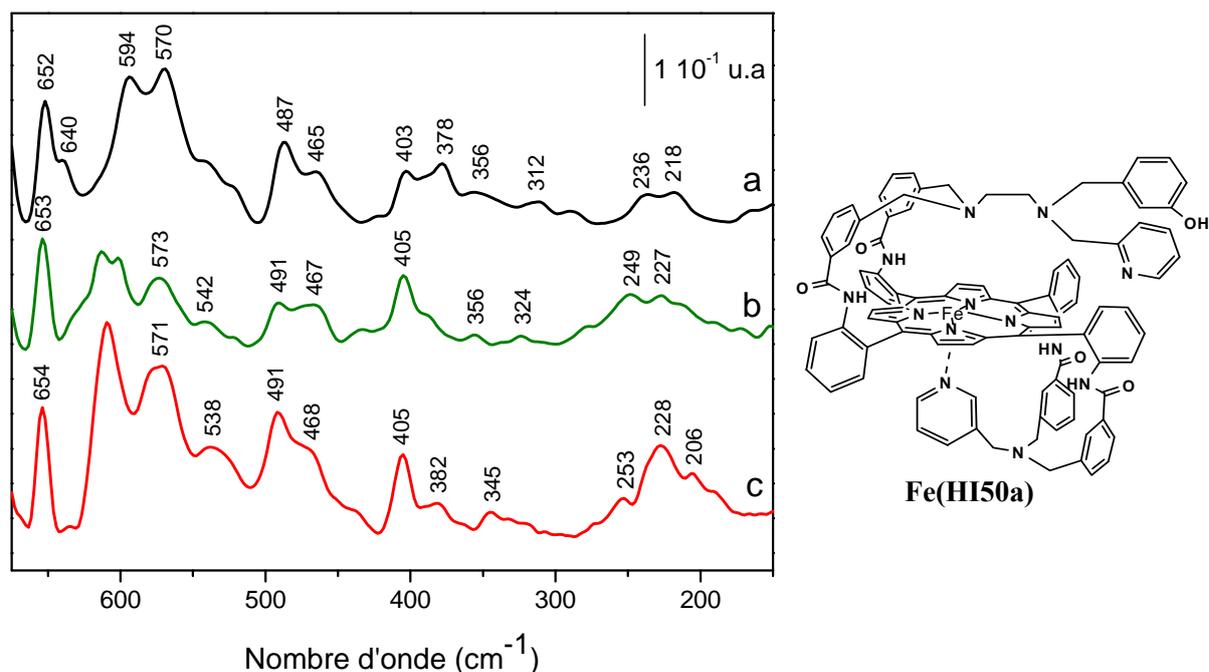


Figure 74 : Spectres ATR-IRTF du composé HI50a enregistrés sous forme d'un film sec sur l'ATR. (a) $H_2(HI50a)$, (b) $Fe^{III}(HI50a)$, (c) $Fe^{II}(HI50a)$.

Les bandes IR du complexe $Fe^{III}(HI50a)$ observées à 653, 573, 542, 491, 467, 405 et 249 cm^{-1} sont similaires à celles reportées pour le composé $Fe^{III}(4C_2)$ à 652, 588, 535, 492, 454, 404 et 258 cm^{-1} . Ces bandes sont attribuées à des modes de vibration de l'hème et des groupes phényles. Il est important de remarquer que certains modes impliquant les vibrations des pyrroles hors-du plan du composé $Fe^{III}(HI50a)$ ont subi des déplacements de fréquences par rapport à ceux du modèle $Fe^{III}(4C_2)$.

En particulier le mode à 588 cm^{-1} (Figure 73 b) est déplacé vers les basses fréquences pour le complexe $Fe(HI50a)$ (Figure 74 b). Le déplacement observé pour γ_7 dans le spectre de $Fe(HI50a)$ est proche de celui rencontré pour ce même mode dans le complexe $Fe(PPP)Cl$.¹⁸⁸ la bande attribuée au mode ν_{33} est déplacée à 466 cm^{-1} . Cette différence est probablement due au changement de conformation de l'hème. En effet, dans le complexe $Fe(HI50a)$, le fer est lié à cinq atomes d'azote, quatre provenant de la porphyrine et un de la pyridine en position proximale. La géométrie pentacoordinée autour du fer peut induire une déformation du macrocycle porphyrinique où l'hème est légèrement bombé et le fer est situé hors du plan de l'hème.¹⁸⁸

Les modes d'hème observés à 491 et 405 cm^{-1} ne sont quant à eux pas ou peu déplacés lors du changement de l'environnement de l'hème. Toutefois, là aussi l'intensité de la bande à 491 cm^{-1} est diminuée lors de la liaison du fer à la porphyrine. Le comportement de cette bande

confirme que celle-ci provient d'un mode impliquant une vibration de l'hème plutôt qu'une contribution du ligand des complexes HI50a et 4C₂. Bien que l'apparition d'une bande à 403 cm⁻¹ dans le spectre de la base libre, la bande observée à 405 cm⁻¹ avec une intensité plus élevée dans les spectres de Fe(HI50a) (b et c) est attribuée au mode ν_{50} . Il est vraisemblable que ce signal est superposé à des modes de vibration impliquant l'hème et ses groupements périphériques.

Les trois spectres de la Figure 74 sont caractérisés par un signal commun vers 600 cm⁻¹ et par la présence d'un massif intense dans la zone 300-180 cm⁻¹, dont l'intensité et l'allure sont sensibles à la présence du fer dans la porphyrine, la coordination du ligand proximal et la réduction de l'atome de fer. Le signal observé à 594 cm⁻¹ dans le spectre de la base libre H₂(HI50a) (a) est déplacé à 602(III)/609(II) cm⁻¹ dans les complexes de Fe(HI50a) (b et c). Un mode impliquant une déformation dans le plan du cycle pyridinique est observé à 605 cm⁻¹ dans le spectre de RR de la pyridine.^{281,290} La fréquence de ce mode est déplacée à 634 cm⁻¹ lorsque deux ligands de pyridine coordonnent le fer dans les complexes (Py)₂Fe(II)-MPIX¹⁷⁹ et (Py)₂Fe(II)-(OEP).¹⁸¹ Les bandes observées à 602(III)/609(II) cm⁻¹ dans les spectres des formes oxydée et réduite du composé HI50a pourraient être attribuées à un mode du cycle de la pyridine, sensible à l'état redox du fer.

Une bande de faible intensité à 434 cm⁻¹ est spécifique du spectre enregistré avec le complexe Fe^{III}(HI50a) (b). Ce signal est probablement la bande III caractéristique du mode ν_{49} correspondant à la vibration δ (Pyr. rotation) et traduisant un état haut spin des complexes de Fe(III).

Un signal de très faible intensité observé à 382 cm⁻¹ dans le spectre du complexe Fe(HI50a) à l'état réduit (c). L'allure de ce signal semble être similaire à celle de l'épaule à 391 cm⁻¹ dans le spectre de Fe(HI50a) à l'état oxydé (b). L'attribution de cette bande est cependant délicate. La vibration ν (Fe-Npy) a été attribuée à 374-385 cm⁻¹ dans les spectres IR des complexes de fer et de la bipyridine.^{291,292} Nous proposons que le signal à 391(III)/382(II) cm⁻¹ correspond à un mode impliquant la vibration ν (Fe-Npy). Cependant, le déplacement de 9 cm⁻¹ observé dans le spectre de la forme réduite laisse suggérer un schéma de coordination différent lorsque le fer est sous la forme Fe(II). De plus, les bandes observées dans la zone 280-200 cm⁻¹ sont affectées de façon significative par la réduction de Fe(III) en Fe(II). L'intensité de la bande à 228 cm⁻¹ est plus intense dans le spectre obtenu avec Fe(II) que dans celui enregistré avec Fe(III), tandis que le signal à 206 cm⁻¹ est détecté uniquement dans le spectre de Fe(II), ce qui suggère également une géométrie de la forme réduite

différente de celle de la forme oxydée. Cependant, seule l'utilisation du marquage isotopique de la pyridine proximale devrait permettre de différencier les modes de vibration associés à chacun des deux ligands axiaux.

En revanche, il n'y a pas d'effet significatif de la réduction du fer dans la zone 370-280 cm^{-1} , mis à part le déplacement de la bande à 356 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ à 345 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$. Ce mode est situé dans une gamme spectrale où les vibrations hors du plan de la porphyrine, le mode $\nu(\text{Fe-Npyr})$ et les vibrations (Fe-L) sont attendus.

HI50a			Modes normaux	Attributions proposées	Références
H ₂	Fe ^{III}	Fe ^{II}			
652	653	654	ϕ_9''	$\delta_2(\text{C-C-C}) + \delta(\text{Pyr.rotation})$	188
594	602	609		cycle Pyridine	281, 290
570	573	571	γ_7	$\gamma(\text{C}_\alpha\text{-C}_m) + \gamma_{\text{asym}}(\text{Pyr. Folding}) + \gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$	188
	542	538	π_5''	$\gamma_1(\text{C}) + \delta(\text{Pyr.translation})$	188
487	491	491		déformation des pyrroles hors-du plan ?	
465	467	468	ν_{33}	$\delta(\text{Pyr rot})$	265
403	405	405	ν_{50}	$\nu(\text{Fe-N}) + \delta(\text{Pyr.translation})$	188
378	378	382		Fe-Npyr ?	291, 292
356	356	345		déformation de la porphyrine + $\nu(\text{Fe-N})$?	
312	324		γ_6	Pyr tilt ou $\delta(\text{C-N})$?	265,279
236	249	253	γ_{16}	Pyr tilt	265

Tableau 16 : Attribution des modes de vibration observés dans les spectres ATR de la base libre H₂(HI50a) et du complexe Fe(HI50a) à l'état oxydé et réduit.

V.2.2 Caractérisation des analogues HI34a et HI29a

2.2.1 Modes de vibrations à l'état Fe^{III}

La Figure 75 montre les spectres ATR-IRTF enregistrés avec Fe(HI50a) (a), Fe(HI29a) (b) et Fe(HI34a) (c). Les trois spectres obtenus sont similaires dans toute la gamme de fréquences comprises entre 680 et 150 cm^{-1} . La similarité de ces trois spectres dans un domaine de fréquences très sensible à la conformation et à la structure des hémoprotéines semble

confirmer que les substituants introduits dans le site distal de l'hème n'entraînent pas des modifications structurales.

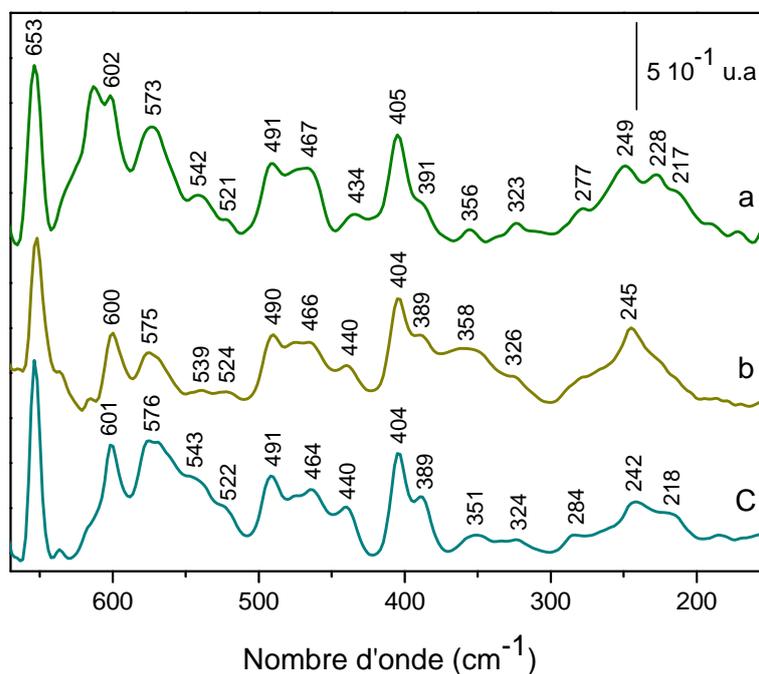


Figure 75 : Spectres ATR-IRTF enregistrés à l'état Fe(III). (a) HI50a, (b) HI29a, (c) HI34a.

Les différences spectrales associées à l'insertion du groupement nitro dans la poche distale de l'hème à l'état fer(III) (spectre b) consistent en un déplacement de la bande à 434 à 440 cm^{-1} , et en un changement de l'allure du massif à 277, 249, 228 et 217 cm^{-1} .

Les différences observées sur le spectre enregistré pour l'analogue Fe(HI34a) possédant un groupement méthoxy dans le site distal (spectre c) consistent en un déplacement des bandes à 434 et 356 cm^{-1} à 440 et 351 cm^{-1} respectivement. L'allure du massif à 277, 249, 228 et 217 cm^{-1} est également modifiée.

Ces observations montrent que peu de signaux correspondant aux modes de la porphyrine sont modifiés par l'insertion des substituants nitro et méthoxy dans le site distal des complexes $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI29a})$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI34a})$, ce qui indique que la conformation de l'hème est maintenue. Toutefois, les seules modifications qu'on peut attendre sont celles correspondant aux vibrations hors du plan du phénol.

2.2.2 Modes de vibrations à l'état Fe^{II}

La Figure 76 montre les spectres ATR-IRTF du complexe Fe(HI50a) (a) et ses analogues Fe(HI29a) (b), et Fe(HI34a) (c). Les spectres obtenus pour les analogues Fe^{II}(HI29a) et Fe^{II}(HI34a) sont similaires à celui obtenu pour le complexe Fe^{II}(HI50a).

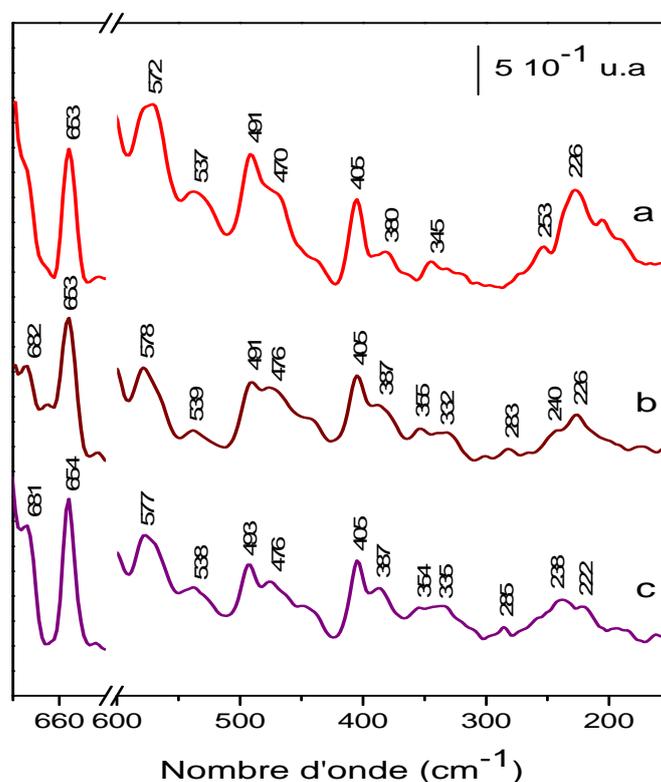


Figure 76 : Spectres ATR-IRTF enregistrés à l'état fer(II). (a) HI50a, (b) HI29a, (c) HI34a.

Les bandes observées à 380 et 345 cm⁻¹ dans le spectre de Fe^{II}(HI50a) sont déplacées vers les hautes fréquences à 387 et 354 cm⁻¹ dans les spectres des analogues Fe^{II}(HI29a) et Fe^{II}(HI34a). La bande à 387 peut être attribuée à une vibration $\nu(\text{Fe-Npyr})$, tandis que la bande à 354 cm⁻¹ implique probablement les modes de vibrations $\nu(\text{Fe-Pyrroles})$ et $\nu(\text{Fe-Npyr})$. Toutefois, la contribution des modes associés à des déformations hors du plan de la porphyrine et à des vibrations des substituants de l'hème peuvent être également attendus dans cette région, ce qui rend l'attribution définitive de ces signaux très difficile. Les différences de fréquences observées pour ces signaux provenant de modes de nature similaire suggèrent une structure de Fe^{II}(HI50a) peu différente de celles de Fe^{II}(HI29a) et Fe^{II}(HI34a).

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que l'introduction des groupements méthoxy et nitro n'induit aucune modification significative de la géométrie de l'hème par comparaison avec le complexe HI50a, que l'hème soit à l'état d'oxydation Fe(III) ou Fe(II).

Comme attendu, nous pouvons en conclure que la nature et le positionnement des substituants que nous avons étudiés n'ont pas d'influence directe et significative sur l'hème ni sur les interactions de l'hème avec le site distal.

V.3 Étude du complexe Fe(2Pyporphen)

V.3.1 Contribution de l'hème et vibrations fer-ligands

La Figure 77 montre les spectres ATR-IRTF de la base libre $H_2(\text{Porphen})$ (a), $Fe^{III}(\text{Porphen})$ (b) et $Fe^{II}(\text{Porphen})$ (c). Nous avons vu dans le chapitre précédent que la forme oxydée de ce modèle est caractérisée par une géométrie pentacoordinée autour du fer, tandis que la forme réduite est caractérisée par une géométrie hexacoordinée, où la pyridine distale est coordonnée en sixième position de coordination du fer.

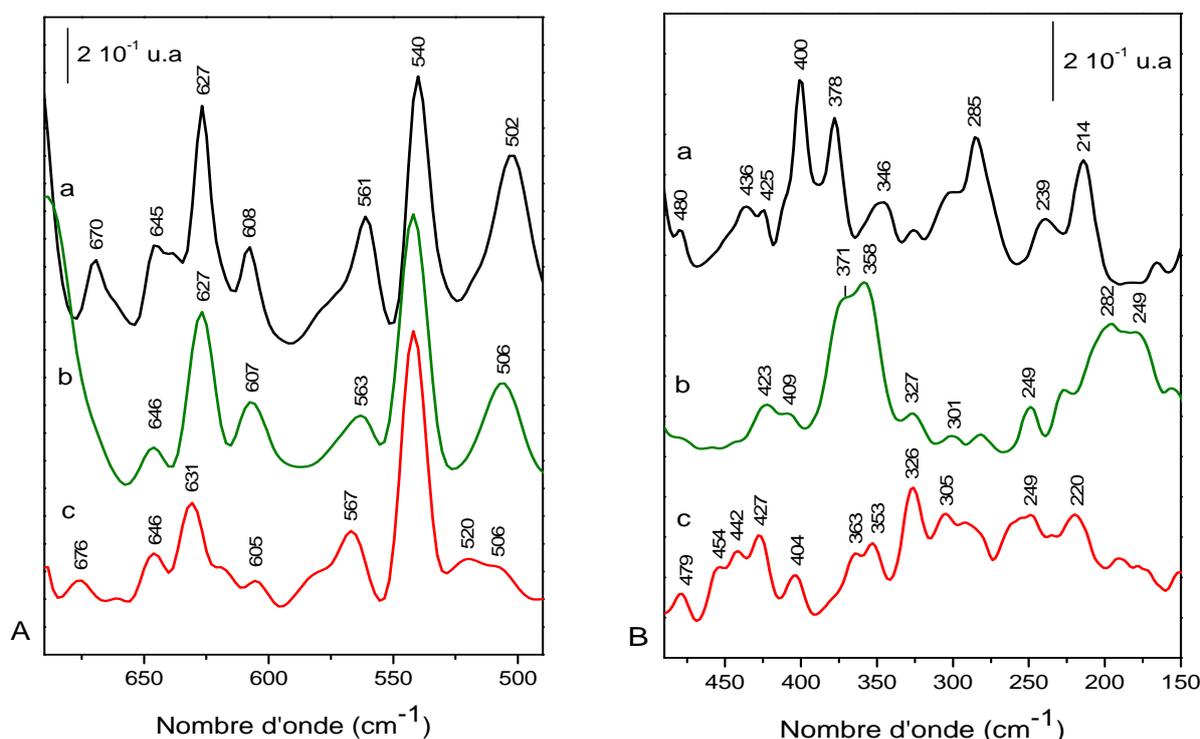


Figure 77 : Spectres ATR-IRTF du modèle 2Pyporphen. (a) $H_2(\text{Porphen})$, (b) $Fe^{III}(\text{Porphen})$ et (c) $Fe^{II}(\text{Porphen})(py)_2$. A) Agrandissement de la zone 690-490 cm^{-1} . B) Agrandissement de la zone 490-150 cm^{-1} .

Dans la gamme spectrale 680-550 cm^{-1} , où les vibrations hors du plan des phényles et les vibrations internes des ligands axiaux sont généralement observées, les trois spectres de la Figure 77 A sont caractérisés par des signaux communs à ~ 646 , 631, 607 et 540 cm^{-1} . Les bandes à 646, 607 et 540 cm^{-1} sont insensibles au changement de l'état redox du fer. Dans le spectre IR de l'anse phénanthroline (Figure 78), des bandes observées à 638, 598 et 543 cm^{-1}

semblent être similaires à celle observées à 631-27, 608-05 et 540 cm^{-1} dans les spectres des composés (2Pyporphen), même si la plupart des IR du sont légèrement déplacées de quelques cm^{-1} . Ces bandes pourraient donc provenir des modes de vibration du ligand, et plus particulièrement de l'anse phénanthroline.

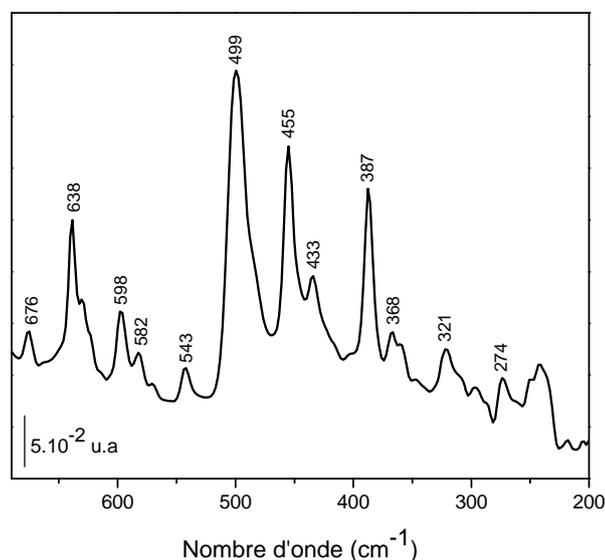


Figure 78 : Spectre ATR-IRTF de l'anse phénanthroline 2,9-bis (p-bromophényl)-1,10-phénanthroline).

Cependant, ces données contrastent avec les spectres IR obtenus avec le complexe Fe(HI50a) qui ont montré que la fréquence de la bande à $\sim 607 \text{ cm}^{-1}$ était sensible à la variation de l'état d'oxydation du fer.

La bande observée à 670 cm^{-1} dans le spectre de la base libre est déplacée à 676 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$, tandis qu'elle est absente du spectre $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$. Une bande à 675 cm^{-1} a été observée dans le spectre d'absorption IR de la pyridine.²⁹³ Ainsi, les bandes à $670\text{-}675 \text{ cm}^{-1}$ pourraient correspondre à un mode du cycle de la pyridine. Le signal à $627(\text{III})/631(\text{II}) \text{ cm}^{-1}$ est attribué au mode ϕ_9 , observé dans le spectre de RR de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$.¹⁸⁸ Le mode γ_7 associé aux vibrations de déformation hors du plan du cycle porphyrinique à 571 cm^{-1} dans le spectre IR de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ (Figure 73) est également présent dans le spectre des complexes $\text{Fe}(\text{Porphen})$ à $563(\text{III})/567(\text{II}) \text{ cm}^{-1}$.

Le signal observé à 502 cm^{-1} dans le spectre de la base libre $\text{H}_2(\text{Porphen})$ (a) est légèrement déplacé à 506 cm^{-1} dans le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ (b), tandis que l'intensité de cette bande décroît pour n'être plus qu'un simple épaulement dans le spectre de

$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$, et parallèlement une bande large et de faible intensité apparaît à 520 cm^{-1} . Cette bande est attribuée à une vibration (*Pyrroles folding*) hors-du plan de l'hème.²⁹⁴

Contrairement à ce qui avait été observé dans la gamme spectrale $680\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 77 A), l'allure des trois spectres est nettement différente pour les composés $\text{H}_2(\text{Porphen})$ (a), $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ (b) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})$ (c) dans la zone de fréquences inférieures à 500 cm^{-1} (Figure 77 B), où les modes IR de déformation de l'hème et les vibrations métal-ligands sont attendus. Cette première comparaison montre que cette région $520\text{-}150 \text{ cm}^{-1}$ est bien plus spécifique de la structure de ce modèle que la zone $700\text{-}520 \text{ cm}^{-1}$ et met en jeu des vibrations de plus faible énergie pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})$.

La bande détectée à 479 cm^{-1} dans les spectres de la base libre $\text{H}_2(\text{Porphen})$ et de la forme réduite hexacoordinée est absente du spectre de la forme oxydée pentacoordinée. Ce mode est attribué à la vibration (*Pyrroles folding*).^{294,295}

Les bandes observées à 450 et 442 cm^{-1} sont quant à elles observées uniquement lorsque la pyridine distale est ajoutée en sixième position de coordination de l'hème (c). Ces bandes proviennent manifestement des contributions de l'hème et ses substituants affectés par le changement de l'état d'oxydation et de coordination du fer. Nous proposons donc que la vibration $\nu(\text{Fe-Py}_{\text{distale}})$ contribue à ces deux modes 450 et 442 cm^{-1} . Le couplage des modes de vibration impliquant le fer et ses ligands axiaux à des modes de déformation des pyrroles est probable dans cette zone de fréquences.

Le spectre IR du ligand phen libre présente des bandes dans la gamme de fréquences $430\text{-}411 \text{ cm}^{-1}$,²⁹¹ le signal observé à $425(\text{H}_2)/423(\text{III})/427(\text{II}) \text{ cm}^{-1}$ pourrait correspondre à une des bandes du ligand phen.

Le mode ν_{50} de vibration $\nu(\text{Fe-N}_{\text{pyr}}) + \delta(\text{Pyr.translation})$ pourrait être à l'origine de la bande à $400(\text{H}_2)/409(\text{III})/404(\text{II}) \text{ cm}^{-1}$. En effet, la vibration ν_{50} a été observée à 402 cm^{-1} dans le spectre IR de la $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$.¹⁸⁸

Un signal intense est détecté dans le spectre ATR du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ à $371\text{-}358 \text{ cm}^{-1}$ (spectre b). l'allure de ce signal semble être similaire à celle du signal à $363\text{-}353 \text{ cm}^{-1}$ dans le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{Py})_2$. Les intensités relatives et les fréquences des bandes composant ce signal, constitué de mode fortement couplés, doivent être affectées par la structure fine de l'hème et par la nature des ligands axiaux du fer. Le déplacement respectif de 8 et 5 cm^{-1} vers les basses fréquences ainsi que la diminution de l'intensité de ce signal dans

le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{Py})_2$ suggère donc qu'un mode impliquant la vibration $\nu(\text{Fe-N-Py})$ contribue aux bandes à 371(III)/ 363(II) et 358(III)/353(II) cm^{-1} .

Cependant, il est important de remarquer que l'allure du signal à 371-358 cm^{-1} pour le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ (Figure 77 B) ne s'accorde pas avec celui enregistré dans le spectre du modèle $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$ (Figure 74), où une bande peu intense à 356 cm^{-1} est observée. Les deux complexes sont supposés d'adopter une géométrie pentacoordinée (2PyPorphen) et hexacoordinée (HI50a) autour du fer, dont la coordination proximale est assurée par la pyridine. Cette différence est vraisemblablement due au ligand distal du fer. Dans le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HI50a})$, le sixième site de fixation du fer est coordonné par un ligand hydroxo, tandis que dans celui de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$, il est probablement lié à un chlore. En effet, la vibration $\nu(\text{Fe-Cl})$ est détectée à 378 cm^{-1} dans le spectre de la $\text{Fe}(\text{TPPCI})$.¹⁸⁸

Dans les spectres IR des complexes $[\text{Fe}(\text{bipy})_3](\text{ClO}_4)_2$, les modes de vibrations $\nu(\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Npy})$ et $\nu(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Npy})$ ont été proposés à 381/374 et 384/367 cm^{-1} , respectivement, tandis que dans les spectres IR des complexes $[\text{Fe}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2$, les vibrations $\nu(\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Npy})$ et $\nu(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Npy})$ ont été détectées à 374/359 cm^{-1} et 374/354 cm^{-1} , respectivement.²⁹² Nous pouvons cependant proposer que les bandes à 363 et 353 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{Py})_2$ correspondent au modes de déformation de la porphyrine hors du plan, probablement couplés à un mode impliquant les ligands axiaux $\nu(\text{Fe-Npy})$ et $\nu(\text{Npy-Fe-Npy})$.

L'intensité de la bande à 327(III)/326(II) cm^{-1} est sensible à l'état redox du fer, elle est visiblement augmentée dans le spectre de la forme réduite. Une bande observée à 333-327 cm^{-1} dans le spectre IR des complexes $\text{Fe}(\text{III})\text{-PPIX}$ et $\text{Fe}(\text{III})\text{-MP11}$ avait été attribuée aux vibrations de déformation $\delta(\text{C-N})$ des pyrroles.²⁸⁹

Bien que la réduction de l'hème du complexe $\text{Fe}(\text{Porphen})$ induise des changements spectraux importants dans la zone spectrale 520-200 cm^{-1} , nous ne sommes pas encore en mesure d'identifier clairement les modes de vibration responsables de ces bandes IR fortement sensibles à l'état d'oxydation et de coordination du fer. Des marquages isotopiques seront nécessaires pour compéter cette étude.

V.3.2 Influence de la coordination du fer

Afin de préciser l'interprétation des spectres obtenus dans le domaine IR lointain pour les formes oxydée et réduite du complexe $\text{Fe}(\text{Porphen})$, nous avons étudié les complexes $\text{Fe}^{\text{III/II}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$.

La Figure 79 montre les spectres ATR-IRTF des complexes Fe(Porphen)-ImH enregistrés à l'état Fe(III) (a) et Fe(II) (b).

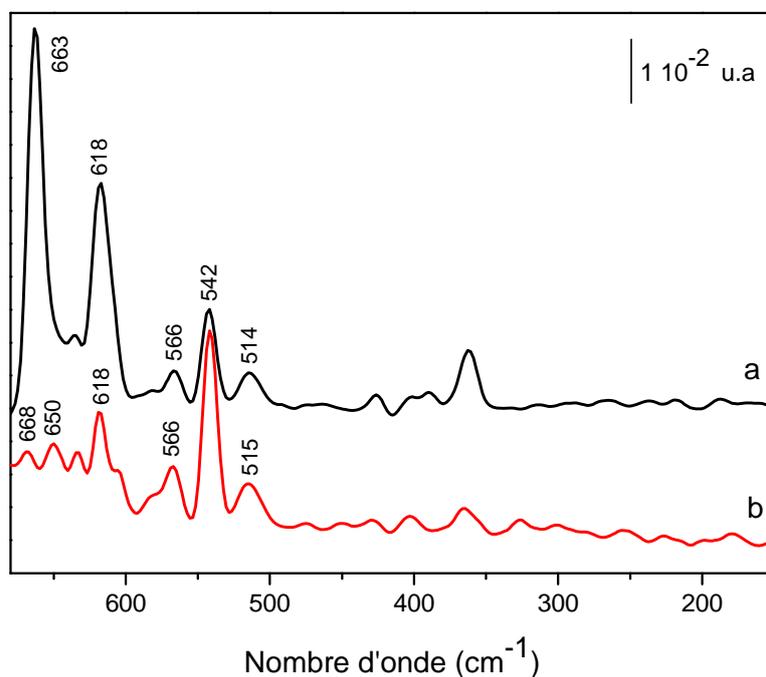


Figure 79 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe^{III}(Porphen)-ImH(2éq) (a) et Fe^{II}(Porphen)-ImH(2éq) (b).

À l'exception de la zone spectrale 680-650 cm⁻¹, les deux spectres obtenus avec les complexes Fe^{III}(Porphen)-ImH et Fe^{II}(Porphen)-ImH présentent une similitude frappante compte tenu de la variation significative des modes IR impliquant l'hème et ses ligands axiaux (520-300 cm⁻¹) observée dans les spectres (a et b) de la Figure 77.

Dans le spectre IR du complexe Fe^{III}(Porphen)-ImH (Figure 79 a), deux bandes intenses apparaissent à 663 et 618 cm⁻¹. La bande à 618 cm⁻¹ est également observée dans le spectre du complexe Fe^{II}(Porphen)-ImH, tandis que le signal intense à 663 cm⁻¹ du Fe^{III}(Porphen)-ImH est remplacé par deux bandes de faible intensité à 668 et 650 cm⁻¹.

Le spectre d'absorption IR de l'imidazole présente dans la gamme de fréquence 690-550 cm⁻¹ deux bandes à 657 et 619 cm⁻¹. Des calculs des modes normaux ont attribué la bande à 657 cm⁻¹ au mode ν_{25} associé aux vibrations d'élongation et de déformation du cycle de l'imidazole, tandis que la bande à 619 cm⁻¹ a été attribuée au mode ν_{26} proviendrait de la torsion hors du plan du cycle imidazole et de balancement de la liaison C₄-C₆.²⁹⁶

La bande observée à 663(III)/668(II) cm^{-1} dans les spectres des états oxydé et réduit du complexe Fe(Porphen) est donc attribuée au mode ν_{25} du cycle imidazole, sensible à l'état redox du fer, tandis que la bande à 618 cm^{-1} est associée au mode ν_{26} .

La bande observée à 506(III) et 520-506(II) cm^{-1} dans les spectres enregistrés avec les complexes Fe^{III} (Porphen) et Fe^{II} (Porphen) respectivement et associée à la vibration (*Pyr folding*) (Figure 77) est déplacée à $\sim 515 \text{ cm}^{-1}$ dans les spectres des composés Fe^{III} (Porphen)-ImH et Fe^{II} (Porphen)-ImH. La comparaison des spectres de la Figure 77 et 79 montre que la fréquence de ce mode est sensible à l'état de spin et de coordination du fer pour les complexes Fe^{III} et Fe^{II} (Porphen). En effet, sa fréquence est située vers 506 cm^{-1} dans le spectre enregistré avec la forme pentacoordinée Fe(Porphen) (Figure 77 b), tandis qu'elle est déplacée vers les hautes fréquences à 515-520 cm^{-1} dans les spectres des complexes hexacoordinés de Fe(Porphen)-ImH et Fe(Porphen)(py)₂. Cette expérience semble mettre en évidence un premier marqueur de l'état de spin dans les complexes de 2Pyporphen dans les basses fréquences IR.

La Figure 80 montre les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{III/II}}$ (Porphen)-ImH dans un agrandissement de la zone spectrale 500-200 cm^{-1} .

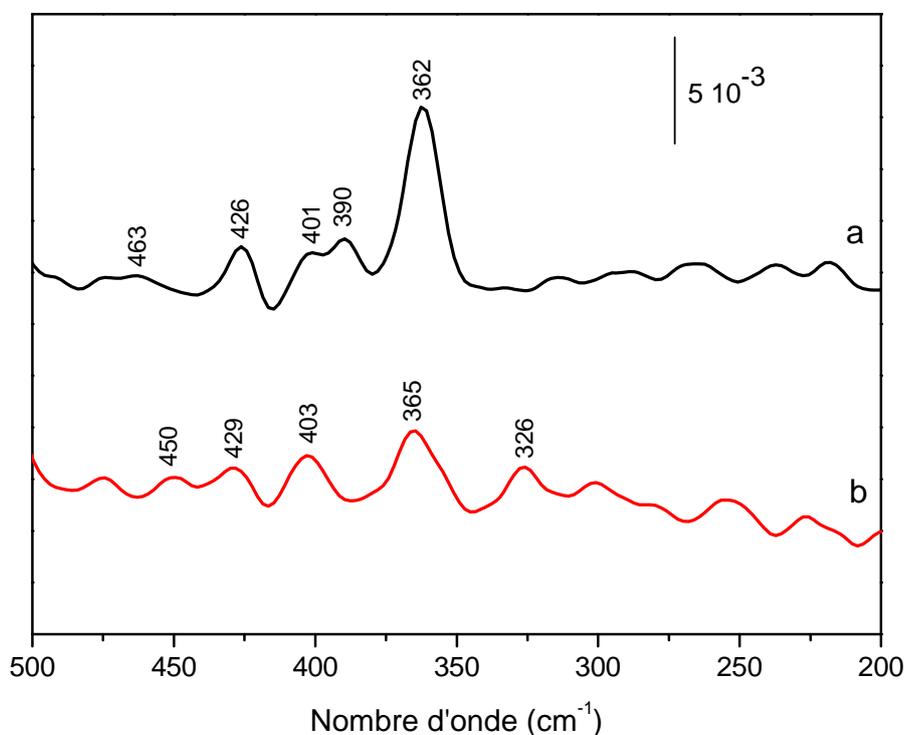


Figure 80 : Agrandissement des spectres ATR entre 500 et 200 cm^{-1} pour les complexes Fe^{III} (Porphen)-ImH (a) et Fe^{II} (Porphen)-ImH (b).

Le signal observé à 362 cm^{-1} dans le spectre du complexe $\text{ImH-Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ (a) est légèrement déplacé à 365 avec une intensité nettement plus faible dans le spectre de $\text{ImH-Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})$ (b). L'apparition de la bande à 390 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$ peut être corrélée à la disparition de la bande à 326 cm^{-1} . En effet, ce signal est présent dans les spectres de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{Py})_2$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$.

La contribution de la vibration d'élongation antisymétrique $\nu(\text{Fe-ImH})_{\text{as}}$ du complexe $\text{bis}(\text{ImH})\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PPIX}$ a été attribuée à 396 , 387 et 378 cm^{-1} .²⁸⁹ La bande à 390 cm^{-1} , observée uniquement dans le spectre ATR du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$, peut être associée à la contribution du ligand axial ImH lorsque le fer est sous la forme Fe(III). La disparition de la bande à $358(\text{III})/353(\text{II})$ correspondant probablement à des vibrations de déformation de la porphyrine hors du plan, couplés à un mode impliquant les ligands axiaux $\nu(\text{Fe-Npy})$ indique que la pyridine axiale est remplacée par un ligand de nature différente.

Le Tableau 17 récapitule les attributions que nous proposons pour les complexes de Fe(Porphen).

Sans ImH		avec ImH		Modes normaux	Attributions proposées	Références
Fe ^{III}	Fe ^{II}	Fe ^{III}	Fe ^{II}			
	676				Cycle Pyridine	293
		663	668	ν_{25}	Cycle ImH	296
		618	618	ν_{26}	Cycle ImH	296
646	646		650		Anse phénanthroline	
627	631			ϕ_9	$\delta_2(\text{C-C-C})$	188
563	567	566	566	γ_7	$\gamma(\text{C}_\alpha\text{-C}_m)^+$ $\gamma_{\text{asym}}(\text{Pyr. Folding})$ + $\gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$	188
542	542	542	542		Anse phenanthroline	
506	520/506	514	514		Pyr folding	294
	479				Pyr. folding	294, 295
	450/442				Pyr. folding + $\nu(\text{Npy-Fe-Npy})$?	294
423	427	426	429		Phen	291
409	404	401	403	ν_{50}	$\nu(\text{Fe-N}_{\text{pyr}})$ + $\delta(\text{Pyr.translation})$	188
		390			$\nu(\text{Fe-ImH})_{\text{as}}$	289
371					$\nu(\text{Fe-Cl})$?	188
	363	362	365		$\nu(\text{Fe-Npy})$ + (Pyrr tilting) ?	292
358	353				$\nu(\text{Fe-Npy})$?	
327	326		326		Pyr tilt ou $\delta(\text{C-N})$	289

Tableau 17 : Attribution des principaux modes de vibration observés dans les spectres ATR des complexes Fe(Porphen) à l'état Fe(III) HS, Fe(II) BS et en présence d'imidazole Fe(III)-ImH et Fe(II)-ImH.

V.4 Conclusion

Cette première étude ATR-IRTF des modèles superstructurés de la CcO révèle bien des modifications spectrales associées à l'introduction du site distal. Cependant, les bandes correspondant aux modes de vibration fer-ligands axiaux des modèles étudiés ne peuvent pas être attribuées de façon définitive à partir de ces spectres, même si les changements de

coordination du fer se traduisent par une modification des modes de la porphyrine dans la région 440-320 cm^{-1} . En raison de la présence d'un fort couplage entre les différents modes de vibrations observés dans les basses fréquences, même l'utilisation des porphyrines marquées ne permet pas leurs attributions de façon évidente. Cependant, la comparaison des données expérimentales avec des calculs de chimie théorique pourrait être une aide précieuse à identifier les contributions des modes de vibration métal-ligands observés dans les spectres IR.

Le développement d'une base de données avec de petits modèles mimant l'état de coordination des centres métalliques des différents intermédiaires de la CcO peut constituer un outil simple et efficace pour mettre en évidence les vibrations métal-ligands. Dans ce travail, nous avons débuté l'analyse des vibrations métal-ligands pour les formes oxydés et réduites. Malheureusement, il est difficile d'obtenir les complexes de la famille $4C_2$ avec des ligands exogènes tels que le 2-méthylimidazole et la pyridine aux concentrations nécessaires pour obtenir des spectres ATR correspondants aux formes pentacoordinées et hexacoordinées, puisqu'il est indispensable de rajouter 1000 équivalents de la base azoté exogène au complexe tétracoordiné, et donc les spectres obtenus sont dominés par la contribution de l'imidazole. Le 2Pyporphén offre ainsi un bon modèle d'étude permettant d'évaluer l'influence de la modification de la coordination axiale de l'hème sur les spectres ATR.

**Chapitre VI : Réactivité des modèles de la Cco
avec le monoxyde de carbone et le dioxygène**

Au niveau moléculaire, la régulation de l'activité catalytique de la cytochrome *c* oxydase dépend de façon directe de la structure protéique et de la dynamique des ligands imposée par cette structure. La compréhension des facteurs qui influencent la fixation de l'oxygène moléculaire et du monoxyde de carbone constitue une étape nécessaire pour comprendre le fonctionnement de cette protéine.

L'étude des caractéristiques biomimétiques des différents modèles synthétiques passe par celle de leurs complexes de Fe(II), seul état d'oxydation représentatif des espèces naturelles sous leurs formes actives. Disposant de sites de coordination axiaux différenciés par leur hydrophobicité, leur rigidité ou par leur aptitude à former des liaisons faibles (liais. H), les complexes de Fe(II) des modèles 4C₂, HI50a et 2Pyporphen ont été préparés et testés vis-à-vis de la fixation de deux ligands exogènes à champ forts: le monoxyde de carbone et le dioxygène, modélisant le site distal de la CcO sous sa forme carbonylée et oxygénée.

L'un des objectifs de cette étude est l'évaluation des influences stériques distales, exercées par l'atome de cuivre, sur la régiosélectivité de différentes réactions d'addition impliquant les complexes de fer de 4C₂, HI et 2Pyporphen. Dans le cas d'une coordination distale, nous nous sommes attachés à estimer l'intensité de la perturbation causée par l'entrée du ligand exogène dans la cavité distale porphyrinique. Deux techniques ont été utilisées: La spectroscopie ATR-IRTF et la photochimie dans le cas d'espèces carbonylées. L'utilisation de cette dernière dans des conditions d'analyse optimales nécessite l'emploi d'un spectromètre FTIR couplé à la fois à un laser Nd-Yag pulsé et un cryostat permettant d'effectuer les mesures à très basse température.

Dans une première partie, la réactivité des complexes de Fe(II) vis-à-vis du monoxyde de carbone sera étudiée par spectroscopie ATR-IRTF puis, par l'analyse de leurs données obtenues après la photolyse, ils seront comparés en vue d'estimer les différentes perturbations distales rencontrées tandis que la seconde partie de ce chapitre concernera la caractérisation des complexes oxygénés.

VI.1 Étude des complexes carbonylés

VI.1.1 Le monoxyde de carbone: une sonde du site actif des hémoprotéines

L'insertion de CO et l'étude des complexes Fe^{II}-CO sont très largement utilisées pour appréhender les relations structures-fonctions des hémoprotéines.²⁹⁷ Les fréquences d'élongation de la liaison Fe-C et la liaison C-O, dépendant non seulement des interactions

électrostatiques et polaires de l'environnement distal de l'hème, mais aussi de l'effet donneur σ du ligand proximal, sont une source riche d'information sur les processus moléculaires. Cette forte sensibilité résulte principalement du rôle important que peut jouer la structure électronique (" π back-bonding") du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ dans les caractéristiques vibrationnelles du CO lorsqu'il est lié au fer. La rétrodonation π est un mécanisme dans lequel le monoxyde de carbone se fixe au fer de l'hème par une interaction de donation des électrons de la paire non-liante n_{CO} du carbone vers l'orbitale vide d_z^2 du fer (liaison σ) et par une interaction de rétrodonation des électrons des orbitales d_{xz} et d_{yz} du fer vers les orbitales vides π_x et π_y anti-liantes de CO (liaison π) (Figure 81). Ces deux effets ont en particulier comme conséquence de stabiliser la liaison Fe-CO par opposition à la liaison CO qui se trouve affaiblie. Il s'ensuit alors une augmentation de la distance C-O et une baisse de la fréquence de résonance du CO lié au fer par rapport à la fréquence du CO libre.

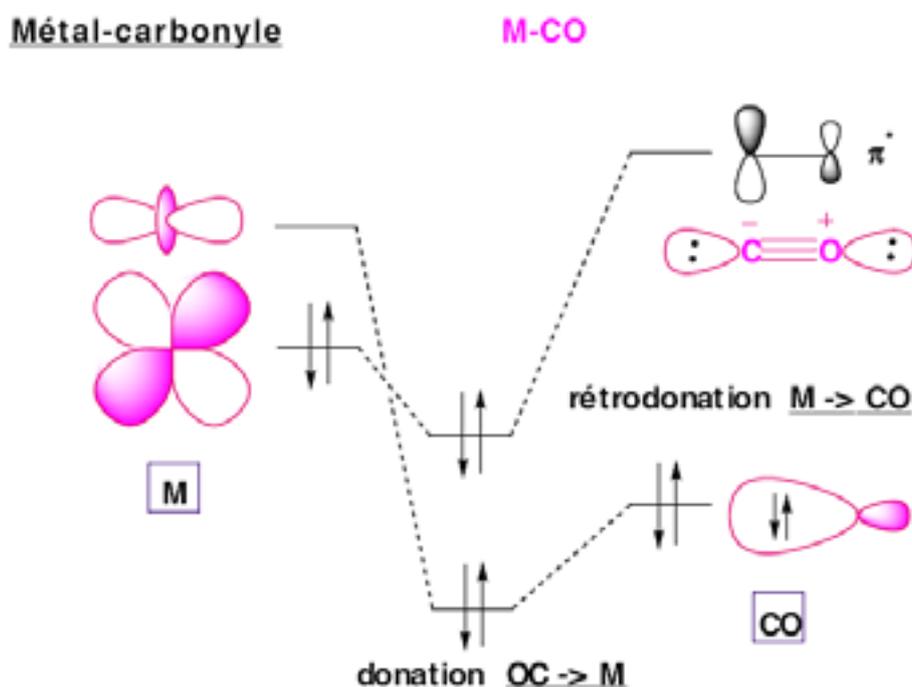


Figure 81 : Représentation schématique des interactions orbitales stabilisantes entre l'hème Fe^{II} plan carré et le ligand CO.²⁹⁸

De ce fait, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ est très utilisé comme sonde de l'environnement proche de l'hème. Il permet ainsi d'apporter des informations sur les interactions entre l'hème, le ligand distal du fer, les acides aminés du site actif et le composé éventuellement fixé à proximité du fer.

Influence de l'environnement distal

L'interaction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ avec l'environnement distal de l'hème s'établit principalement par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène du ligand CO. Ainsi, la présence d'un environnement distal possédant un caractère électrostatique positif autour du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ entraîne l'apparition d'une charge partielle négative sur l'atome d'oxygène, et donc une augmentation de la densité électronique au niveau des orbitales π^* de CO. Du fait du mécanisme de rétrodonation qui consiste en un transfert d'électrons du Fer au ligand, il en résulte un renforcement de la liaison Fe-C et un affaiblissement simultané de la liaison C-O (l'orbital π^* du CO possède un fort caractère antilient). Par conséquent, un environnement distal positif entraîne donc une augmentation de la fréquence de la vibration $\nu(\text{Fe-CO})$ et une diminution de la fréquence du mode $\nu(\text{C=O})$. Toutefois, un environnement distal présentant un caractère électrostatique négatif, comme le voisinage d'un groupe aromatique parallèle au plan porphyrinique, avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ favorise l'apparition d'une charge positive sur l'oxygène. Ceci entraîne donc une augmentation du mode $\nu(\text{C=O})$ et une diminution du mode $\nu(\text{Fe-CO})$.²⁹⁹ Ce phénomène de rétrodonation, est à l'origine de la corrélation inverse entre les fréquences $\nu(\text{Fe-CO})$ et $\nu(\text{C=O})$ qui a été observée pour de nombreuses métalloporphyrines et hémoprotéines.^{300,301}

Influence du ligand proximal

La vibration du mode $\nu(\text{C=O})$ est également influencée par la nature du ligand axial en trans de l'adduit hème-CO.³⁰² Le ligand proximal et le ligand distal sont en compétition pour établir une liaison σ avec le fer par l'intermédiaire de son orbitale vide d_z^2 : plus le ligand proximal est un bon σ donneur, plus la liaison σ entre le fer et le ligand distal CO est faible. Mais, comme le système π de la liaison Fe-C n'est pas affecté par l'interaction entre le fer et le ligand proximal, la force de la liaison CO n'est pas modifiée. Dans ce cas, l'étude de la fréquence du mode $\nu(\text{C=O})$ ne permet pas seule de discriminer les effets dus au ligand proximal de ceux du ligand distal, et la mesure de la fréquence associée à la vibration $\nu(\text{Fe-CO})$ est donc nécessaire pour identifier la nature et l'origine de ces effets.³⁰² Cependant, il est difficile de détecter la vibration $\nu(\text{Fe-CO})$ dans un spectre IR, mais elle est facilement observée dans un spectre Raman.³⁰³

La Figure 82 représente deux cas extrêmes de l'influence du ligand proximal. La fréquence d'élongation est d'autant plus élevée que la basicité du ligand azoté est faible. Une augmentation de cette basicité fait croître la densité électronique au niveau du métal, lequel

augmente par rétrodonation son ordre de liaison avec l'atome de carbone. Par antagonisme, l'ordre de la liaison C-O et la fréquence d'élongation associée diminuent. Ce comportement est appelé "effet trans".³⁰⁴

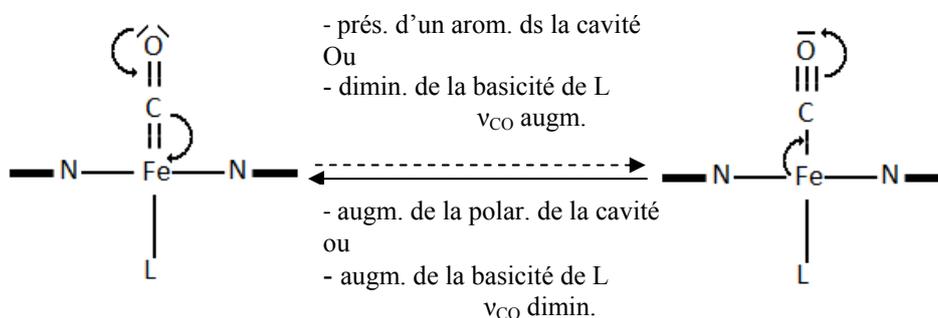


Figure 82 : Influence de la polarité distale et du ligand proximal sur ν_{CO} .

Des ligands anioniques plus fortement donneurs que l'imidazole comme les imidazolates ou les thiolates augmentent la rétrodonation du Fe(II) vers le CO. Il devrait en résulter une augmentation de l'ordre de la liaison Fe-C et donc une augmentation de la fréquence d'élongation de cette liaison.

L'analyse de la fréquence ν_{CO} conjointe avec les fréquences ν_{Fe-CO} et δ_{Fe-C-O} accessibles en RR, permet d'obtenir des renseignements sur la polarité de l'environnement distal de l'hème et sur la force de la liaison entre le fer et son ligand distal ou proximal, qui sont deux paramètres essentiels au contrôle de la réactivité du complexe $Fe^{II}-O_2$ au cours du cycle catalytique des CcO.

Existence de plusieurs conformations

La géométrie de l'entité Fe-C-O est linéaire en l'absence de contraintes stériques. Les effets conjugués du ligand axial sur le fer, de la déformation de la porphyrine, de l'environnement polaire et de l'encombrement stérique autour du CO peuvent entraîner une déformation de cette entité. Trois déformations possibles du fragment Fe-C-O ont été envisagées par Spiro *et coll.* (Figure 83).³⁰⁴

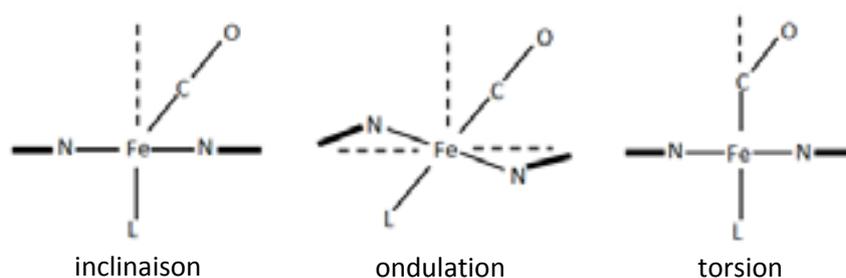


Figure 83 : Modes de déformations possibles de l'entité Fe-C-O.

L'énergie requise pour déplacer l'atome d'oxygène en dehors de l'axe Fe-C-O perpendiculaire au plan moyen de la porphyrine est la plus forte dans le cas du mode de torsion. Ce mode est donc le moins probable. Il semble que la nature des déformations de l'entité Fe-C-O soit formée d'une composante d'inclinaison où la colinéarité Fe-C-O est conservée et d'une composante porphyrinique où les contraintes imposées au carbonyle soient absorbées par le macrocycle. Ces trois modes de déformations contribuent à la distorsion du monoxyde de carbone dans les complexes synthétiques et les molécules biologiques.

L'étude des fréquences $\nu(\text{Fe-CO})$ et $\nu(\text{C=O})$ de l'adduit carbonylé chez la famille des NO-synthase (NOS) a suggéré qu'en absence de substrat et de cofacteur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ existe sous deux conformations distinctes : une conformation « ouverte » où la structure de la protéine serait relâchée avec un environnement distal de l'hème faiblement électropositif qui correspond à une fréquence de vibration Fe-CO basse et une fréquence de vibration C-O élevée, et une conformation « fermée » où la structure de la protéine serait plus resserrée ce qui entraînerait une augmentation de la polarité de l'environnement distal de l'hème et qui correspond à une fréquence de vibration Fe-CO élevée et une fréquence de vibration C-O basse.^{305,306}

Dans le cas des oxydases, il a été proposé que le complexe $[\text{Fea}_3^{\text{II}} \text{Cu}_B^{\text{I}}]\text{-CO}$ existe sous deux conformations majoritaires et distinctes: une conformation α où la structure de la poche de l'hème serrait plus resserrée et donc l'hème Fea_3 et le Cu_B seront situés à proximité, et une conformation β où la poche de l'hème est « ouverte » avec une position du Cu_B située plus loin du l'hème Fea_3 . Il a été également suggéré que la forme α est le conformère le plus stable dans plusieurs oxydases du fait de la proximité des atomes du fer et de cuivre. Ainsi, le CO ne pourrait probablement se coordiner à l'hème Fea_3 sans l'établissement des fortes interactions distales polaires ou stériques entre le Cu_B et le CO. Ces contraintes imposées au carbonyle provoquent l'inclinaison ou la torsion de l'entité Fe-C-O, tandis que dans la conformation β , celle-ci est moins inclinée, ce qui explique l'observation des fréquences de vibration $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ à des valeurs plus basses que celles obtenues dans la conformation α .^{28,243,307,308} De plus, deux autres conformations minoritaires (les formes δ et γ) ont été également identifiées dans certaines oxydases et sous certaines conditions.^{28,309} Le rôle fonctionnel de la présence de différentes conformations à pH physiologique, entraînant l'observation de plusieurs fréquences ν_{CO} , reste encore un sujet de controverse. Il a été suggéré que les effets stériques et/ou électroniques de la poche distale du site actif de la CcO sont probablement à l'origine de différents modes Fe-C-O observés dans les oxydases.^{28,309} Il a été également proposé que la

variation de la distance entre l'hème Fea_3 et le Cu_B induit l'apparition des conformations α , β et γ .^{227,307}

Bien que les ligands CO et O_2 ont différentes géométries lorsqu'ils sont coordonnés à l'atome de fer (Fe-C-O est relativement linéaire, Fe-O-O est plus coudé), l'étude du complexe Fe^{II} -CO permet, de manière indirecte, de mettre en évidence les interactions susceptibles d'exister entre l'environnement distal du site et le complexe Fe^{II} - O_2 . Ceci a pour conséquence de mieux comprendre l'effet de l'environnement distal sur la réactivité et la stabilité du complexe Fe^{II} - O_2 .³¹⁰ L'utilisation du complexe Fe^{II} -CO comme sonde des modèles de la CcO permet de rendre compte de la nature des interactions qui s'établissent entre les différents éléments du site actif de l'enzyme et le ligand distal du fer.

VI.1.2 Étude des Complexes Fe^{II} -CO et $[Fe^{II}Cu^I]$ -CO par spectroscopie ATR-IRTF

Divers complexes carbonylés en présence et en absence du cuivre(I) ont été formés pour les porphyrines 4C₂, HI et 2Pyporphen. Ceux-ci ont été préparés après réduction des complexes de fer(III) de la manière décrite en partie expérimentale et ont été caractérisés en spectroscopie ATR-IRTF, dans le sac à gants. Les signaux IR des différents complexes de fer(II) étudiés étant attribués individuellement (chapitres IV et V), il nous a paru intéressant dans cette partie d'estimer l'importance de la perturbation stérique ou électrostatique causée par le cuivre(I) sur le ligand distal du fer.

1.2.1 Modèles HI

La présence de la fréquence d'élongation du mode $\nu(C=O)$ des complexes Fe^{II} -CO dans une région caractéristique du spectre IR (~ 1950 - 2000 cm^{-1}), et sa forte absorption, permettent de mesurer $\nu(C=O)$ tant pour les composés modèles que pour les hémoprotéines. La Figure 84 regroupe les spectres ATR des espèces $Fe^{II}(\text{HI50a})\text{-CO}$ et $[Fe^{II}(\text{HI50a})Cu^I]\text{-CO}$. Ils sont comparés à celui du complexe ferreux correspondant $Fe^{II}(\text{HI50a})$.

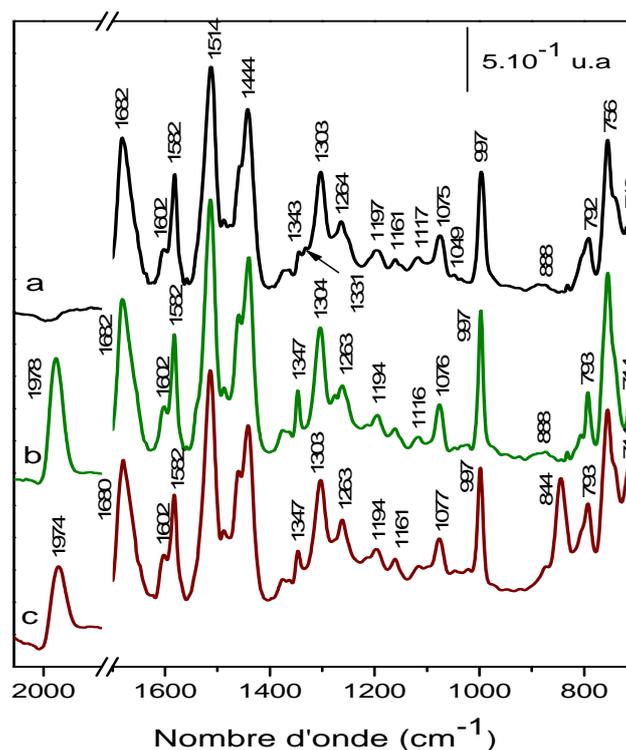


Figure 84 : Spectres ATR-IRTF du complexe Fe(HI50a) enregistrés dans l'IR moyen. (a) Fe^{II}(HI50a), (b) Fe^{II}(HI50a)-CO et (c) [Fe^{II}(HI50a)Cu^I]-CO.

Ces trois spectres présentent une similarité remarquable. Le spectre du complexe Fe^{II}-CO du modèle HI50a enregistré en l'absence du cuivre(I) présente un signal intense à 1978 cm⁻¹ correspondant au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ du monoxyde de carbone coordonné à l'atome du fer. La fréquence observée est en bon accord avec les données de la littérature pour le complexe Fe^{II}(TPP)pyr-CO où la vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ est observée à 1976 cm⁻¹.³¹¹

La disparition des bandes de faible intensité à 1344 et 1331 cm⁻¹ au profit de l'apparition de celle à 1347 cm⁻¹, et le déplacement du mode γ_8 à 714 cm⁻¹ dans le spectre du complexe hexacoordiné Fe^{II}(HI50a)-CO (b), constituent les seules différences notables par rapport au spectre du complexe Fe^{II}(HI50a) (a).

Nous avons vu dans le chapitre IV que le mode ν_{41} est sensible à l'état de spin où la région 1349-1343 cm⁻¹ correspond aux complexes de fer à l'état bas spin, alors que la gamme 1341-1333 cm⁻¹ correspond plutôt aux complexes à l'état haut spin. Les bandes observées à 1344 et 1331 cm⁻¹ dans le spectre du Fe^{II}(HI50a) nous paraissent imputables à l'existence d'un équilibre rapide mettant en jeu une espèce pentacoordinée et une autre hexacoordinée. Toutefois, l'addition du CO au complexe Fe^{II}(HI50a) entraîne la formation d'une seule espèce hexacoordinée Fe^{II}(HI50a)(py)CO, caractérisée par une bande à 1347 cm⁻¹.

Il a été montré que le mode ν_{41} (voir Tableau 13 p145) reflète le transfert de charge entre la porphyrine et le ligand CO. Ce mode subit un déplacement vers les hautes fréquences ($\sim 7 \text{ cm}^{-1}$) dans les spectres IR des complexes Ru(TPP)CO, Ni(TPP)CO et Cu(TPP)CO. Cet effet a été expliqué par la compétition des électrons entre le métal et le ligand CO qui réduit le transfert de charge du métal au macrocycle porphyrinique.³¹²

Inversement, la fréquence du mode γ_8 hors-du plan augmente lorsque la quantité du transfert de charge augmente.³¹² Dans le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})(\text{py})\text{CO}$, la fréquence de ce mode est diminuée de 5 cm^{-1} , ce qui indique la réduction du transfert de charge du fer au cycle porphyrinique.

L'insertion du cuivre(I) dans le site distal provoque un léger déplacement du mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ à 1974 cm^{-1} et l'apparition d'une bande intense à 844 cm^{-1} . Par comparaison avec le spectre de la solution du cuivre(I) ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$), nous avons pu attribuer la bande à 844 cm^{-1} à la contribution de l'anion PF_6^- . La vibration d'élongation $\nu(\text{P}-\text{F})$ est généralement observée à 830 cm^{-1} .³¹³ Le léger déplacement de la fréquence $\nu(\text{C}=\text{O})$ vers les basses fréquences indique que le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ ressent une influence électropositive faible de son environnement distal, probablement due à la charge positive portée par l'atome du cuivre.

La comparaison des spectres ATR des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ de l'analogue HI34a (Figure 85), possédant un groupement méthoxy dans le site distal du modèle HI50a, montre également le mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ à 1979 cm^{-1} , dont la fréquence est diminuée de 5 cm^{-1} en présence du cuivre(I).

Les fréquences des modes ν_{41} et γ_8 sont également modifiées en présence du CO, mais de manière similaire au modèle HI50a. Ces observations suggèrent que la fixation du méthoxy au niveau du site distal n'induit pas de perturbation structurale et électronique du ligand distal par rapport au modèle HI50a.

Le mode ν_{47} observé à 995 cm^{-1} dans le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ est déplacé à $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ dans les spectres de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$, ce qui suggère un faible changement conformationnel du macrocycle porphyrinique lors de la coordination du ligand CO sur le fer.

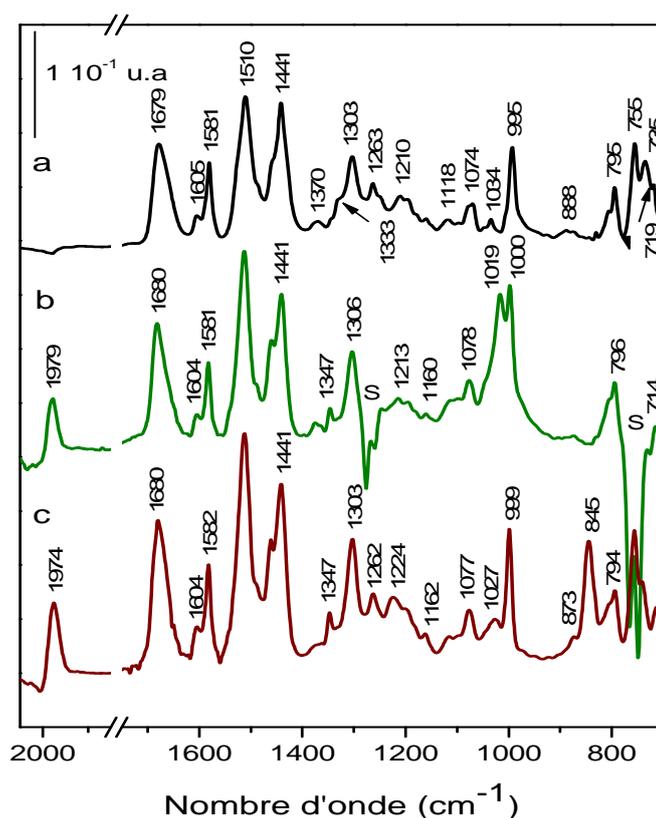


Figure 85 : Spectres ATR-IRTF du complexe Fe(HI34a) enregistrés dans l'IR moyen. (a) Fe^{II}(HI34a), (b) Fe^{II}(HI34a)-CO et (c) [Fe^{II}(HI34a)Cu^I]-CO. S désigne le solvant (CH₂Cl₂).

La bande observée à 1034 cm⁻¹ dans le spectre de Fe^{II}(HI34a) est déplacée à 1027 cm⁻¹ dans le spectre de [Fe^{II}Cu^I]-CO. Le spectre d'absorption IR de la pyridine présente un seul mode à 1027 cm⁻¹ dans la gamme de fréquences 1050-1000 cm⁻¹.²⁹³ Une bande a été également observée à 1021 cm⁻¹ dans le spectre IRTF du 3-Me-pyridine et a été attribuée aux vibrations d'élongation et de déformation du cycle pyridinique.²⁸⁰ Ce mode peut être attribué à une des pyridines du ligand porphyrinique, probablement la pyridine distale. Toutefois, seules les pyridines 3-monosubstituées présentent un mode IR dans cette gamme de fréquences 1034-1021 cm⁻¹, ce qui suggère que la bande observée dans le spectre de [Fe^{II}Cu^I]-CO correspond plutôt à la pyridine proximale. Il est donc difficile d'attribuer cette bande de façon définitive à l'une de deux pyridines. Étonnamment, une bande intense apparaît à 1019 cm⁻¹ uniquement dans le spectre de Fe^{II}-CO (Figure 85 b). Il peut s'agir soit du mode provenant du macrocycle porphyrinique, soit du mode du ligand. Un mode observé à 1023 cm⁻¹ dans le spectre IR du Ni(TPP) est attribué à ν_{44} , une vibration asymétrique de l'hème $\nu(\text{Pyr half-ring})$. Nous ne pouvons pas attribuer cette bande de manière certaine.

Ces résultats indiquent que la fixation du cuivre(I) au niveau du site distal des porphyrines HI50a et HI34a induit une légère augmentation de la polarité de l'environnement immédiat du

ligand CO. Toutefois, cet effet est faible probablement parce que le cuivre se trouve loin du fer.

En raison de l'interaction de rétrodonation entre les orbitales d du fer et les orbitales π^* de CO à l'origine de la corrélation inverse entre les fréquences ν_{CO} et $\nu_{\text{Fe-CO}}$, l'effet du cuivre que nous avons observé sur la force de la liaison devrait logiquement être observé de manière inverse sur la force de la liaison Fe-C des complexes de $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. Cependant, Les signaux associés aux modes de vibration de la liaison Fe-CO ($\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\delta_{\text{Fe-C-O}}$) ne sont pas accessibles en IR, ils sont généralement observés dans la région des basses fréquences du spectre Raman.

Le mode associé à la vibration de déformation de la liaison Fe-C-O ($\delta_{\text{Fe-C-O}}$), observé vers 570 cm^{-1} , n'est actif en spectroscopie RR que lorsque la géométrie de l'hème est nettement distordue par rapport à une symétrie plane, ce qui explique que le signal associé ne soit pas visible dans les spectres de RR de nombreuses hémoprotéines.^{303,314} Il est donc possible, selon la géométrie adoptée par l'entité Fe-C-O, d'observer le mode $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ dans les spectres IR des modèles synthétiques étudiés dans ce travail. Le mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$ est quant à lui observé entre 470 et 520 cm^{-1} dans les spectres de RR des hémoprotéines.²⁹⁷

Dans l'espoir d'observer les modes IR correspondants aux vibrations $\nu_{\text{Fe-CO}}$ et $\delta_{\text{Fe-C-O}}$, mais aussi les modifications spectrales liées à l'insertion du cuivre(I) et la coordination du ligand CO sur l'atome du fer, nous avons enregistré les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ pour les analogues HI50a et HI34a dans le domaine de l'IR lointain.

Sur la Figure 86 sont reportés les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ du modèle HI50a, tandis que ceux de son analogue HI34a sont présentés sur la Figure 87.

Le spectre IR du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ (b) présente un épaulement à 568 cm^{-1} qui n'est pas observé dans le spectre obtenu pour la forme réduite. Dans le spectre de RR des oxydases, le mode correspondant à la vibration $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ est observé à $573\text{-}578\text{ cm}^{-1}$. Nous pouvons alors proposer que le mode $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ soit à l'origine de l'épaulement à 568 cm^{-1} . L'utilisation du marquage isotopique du monoxyde de carbone permettrait d'identifier avec certitude les vibrations Fe-CO. Nous n'avons pas identifié de mode IR qui pourrait être associé à une vibration $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (c). Dans cette région, ce complexe présente une bande intense à 559 cm^{-1} attribuée à la contribution de l'anion PF_6^- de la solution du cuivre(I) ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$).³¹³ Il est possible que le mode $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ soit masqué par l'apparition de la bande à 559 cm^{-1} .

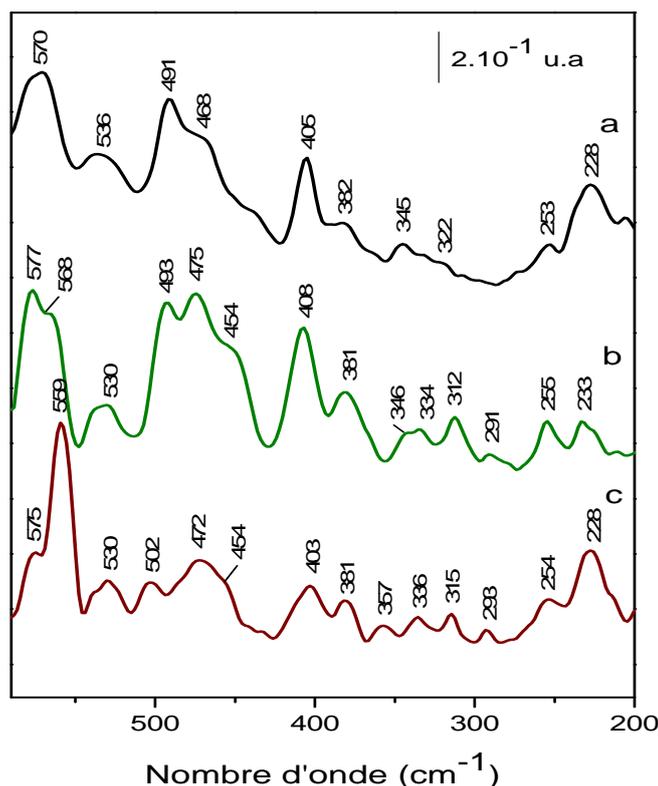


Figure 86 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe(HI50a) enregistrés dans l'IR lointain. (a) Fe^{II}(HI50a), (b) Fe^{II}(HI50a)-CO et (c) [Fe^{II}(HI50a)Cu^I]-CO.

Les trois spectres de la Figure 86 sont caractérisés par la présence d'un massif intense dans la zone 502-450 cm⁻¹, dont l'intensité et l'allure est sensible à la présence d'un sixième ligand axial du fer. Le signal observé à 491-493 cm⁻¹ dans les spectres des complexes Fe^{II}(HI50a) (a) et Fe^{II}-CO (b) est déplacé à 502 cm⁻¹ dans le spectre enregistré avec le complexe [Fe^{II}Cu^I]-CO (c). Cette bande pourrait provenir d'un mode de déformation hors du plan des pyrroles. L'apparition de la bande à 475-472 cm⁻¹ dans les spectres enregistrés en présence du ligand CO peut être corrélée à la disparition de l'épaule à 468 cm⁻¹ observé dans le spectre de la forme réduite et attribué au mode ν_{49} impliquant la vibration $\delta(\text{Pyr rot})$ (Chapitre V). Un épaule à 454 cm⁻¹, spécifique des spectres enregistrés avec les complexes Fe^{II}-CO et [Fe^{II}Cu^I]-CO (b et c), pourrait être associé à une vibration (*Pyr folding*) des pyrroles. Ce mode, de symétrie B_{2g}, est théoriquement inactif en IR, mais il peut être activé par un changement de symétrie.²⁶⁵ La coordination du ligand CO sur le fer peut provoquer une déformation du plan de la porphyrine traduit par une activation de modes inactifs en IR.

Les bandes observées à 312-315 et 291-293 cm⁻¹ sont spécifiques des spectres des complexes Fe^{II}-CO et [Fe^{II}Cu^I]-CO. Dans cette région, deux modes IR à 309 et 321 cm⁻¹ correspondants aux vibrations (*Pyr swivel*) et (*Pyr tilt*) respectivement sont observés dans le

spectre de la Ni(TPP).²⁶⁵ L'attribution définitive de ces bandes IR ne pourra être établie qu'à l'aide des données obtenues sur des porphyrines marquées et des calculs théoriques. La disparition de la bande à 345 cm^{-1} , qui peut être associée à la contribution de déformation de la porphyrine + $\nu(\text{Fe-N})$, est corrélée à l'apparition de la bande à 357 cm^{-1} dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

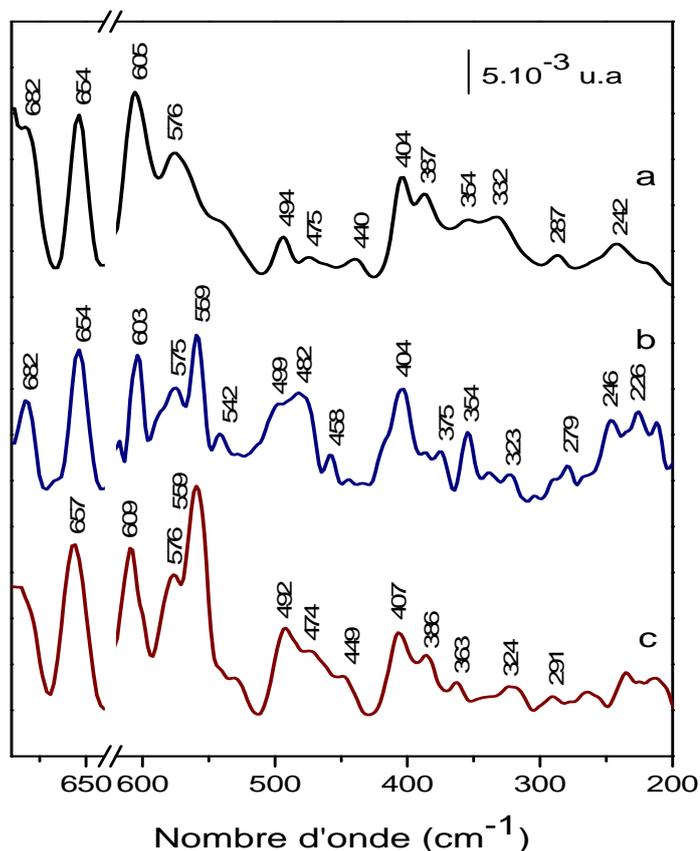


Figure 87 : Spectres ATR-IRTF des complexes Fe(HI34a) enregistrés dans l'IR lointain. (a) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$, (b) $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]$ et (c) $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

Lorsque le cuivre est inséré dans la poche distale, nous attendons des perturbations affectant majoritairement des bandes impliquant les vibrations du cuivre et de ses ligands. Les bandes à 494 , 475 et 440 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ sont déplacées à 499 , 482 et à 458 cm^{-1} dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]$, respectivement (Figure 87). Dans cette gamme de fréquence, les vibrations $\nu(\text{M-N})$ ne contribuent plus. De plus, la vibration $\nu(\text{Cu-ImH})$ a été identifiée à 306 et 286 cm^{-1} pour les complexes $\text{Cu}(\text{ImH})_2\text{Cl}_2$ et $\text{Cu}(\text{ImH})_4\text{Cl}_2$, respectivement.²⁵¹ Ces perturbations sont probablement dues à des contributions des vibrations hors du plan du site distal à ces modes.

Les spectres obtenus de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ (a) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (c) sont similaires, mais trois bandes sont nettement modifiées par la présence du CO. Les signaux à 440, 354 et 332 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ sont déplacés à 449, 363 et 324 cm^{-1} .

1.2.2 Modèle 2PyPorphen

Sur la Figure 88 sont reportés les spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ enregistrés dans l'IR moyen, tandis que la Figure VI.9 reporte les spectres des mêmes espèces dans l'IR lointain.

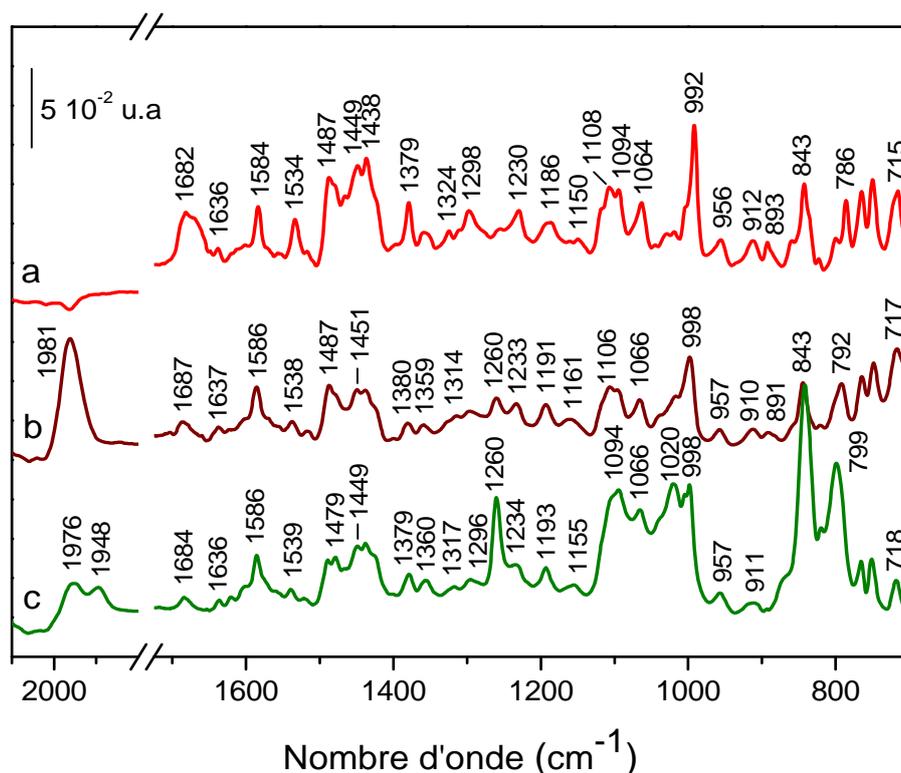


Figure 88 : Spectres ATR-IRTF des complexes 2PyPorphen enregistrés dans l'IR moyen. (a) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$, (b) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ et (c) $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

Le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ du modèle 2PyPorphen enregistré en l'absence du cuivre(I) présente un mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ à 1980 cm^{-1} similaire à celui observé dans les spectres des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ des modèles HI50a et HI34a. Cependant, l'insertion du cuivre(I) dans le site distal de la porphyrine provoque l'apparition de deux bandes d'élongation du mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ d'intensité différente à 1976 et 1948 cm^{-1} . Le spectre IR consiste par conséquent en la somme pondérée de deux espèces individuelles, où le monoxyde de carbone se trouve dans deux environnements chimiques différents. Ces deux contributions majoritaires correspondent à deux conformations différentes qui ont des effets distincts sur la polarité du site distal au

voisinage du ligand distal du fer. La conformation qui induit l'interaction polaire la plus forte comporte un signal $\nu(\text{C}=\text{O})$ à fréquence basse à 1948 cm^{-1} , et le signal $\nu(\text{C}=\text{O})$ de la conformation qui induit l'interaction polaire la plus faible apparaît à 1976 cm^{-1} . Une explication possible serait la présence d'une orientation différente de l'anse qui oriente le cuivre soit vers le CO ou non.

La diminution de la fréquence d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ de 33 cm^{-1} par rapport au complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ indique que le cuivre(I) se trouve en interaction avec l'oxygène du monoxyde de carbone. En effet, la présence des charges positives proche de l'atome d'oxygène du monoxyde de carbone stabilise la charge négative produite par la rétrodonation et polarise le monoxyde de carbone. Le même effet a été observé pour le modèle tris(imidazole)picket lors de l'insertion du cuivre(I) dans la poche distale.¹⁰⁸

La faible diminution de la fréquence $\nu(\text{C}=\text{O})$ observée à 1976 cm^{-1} pour le complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ peut être due à une faible interaction du CO avec le cuivre de sorte que, dans certaines proportions des composés 2Pyporphen, le cuivre(I) ne se trouve plus à proximité du ligand CO.

Notons également, et cela contrairement aux modèles HI possédant une structure ouverte du site distal, que la coordination du CO sur l'atome du fer du modèle 2Pyporphen provoque des modifications spectrales importantes.

Ainsi, les modes ν_{19} et ν_{47} associés à des vibrations d'élongation et de déformation du macrocycle porphyrinique, observés à 1534 et 992 cm^{-1} respectivement dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})$ (a) sont déplacés vers les hautes fréquences à 1538 et 998 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ (b). De plus, l'intensité du mode ν_{19} est visiblement diminuée dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ (b). Le mode hors du plan γ_5 détecté à 786 cm^{-1} pour la forme réduite est également déplacé vers les hautes fréquences à 792 cm^{-1} en présence du CO dans le sixième site de coordination du fer.

Les différences spectrales associées à l'insertion du cuivre(I) dans le site distal consistent en l'apparition de deux bandes à 1479 et 1020 cm^{-1} , en l'augmentation nette de la bande à 1260 cm^{-1} , et en un déplacement du mode γ_5 à 792 à 799 cm^{-1} . Les modes de vibration du cycle de la pyridine labile et le phen pourraient être à l'origine des bandes observées à 1479 et 1020 cm^{-1} . En effet, une bande vers 1475 cm^{-1} est observée dans les spectres IR de certains pyridines 2-monosubstitué, 3-monosubstitué et bisubstitué, tandis qu'une bande détectée entre $1034\text{-}1021\text{ cm}^{-1}$ est spécifique du spectre des pyridines 3-monosubstitués.^{273,315}

Le mode γ_5 hors du plan du macrocycle porphyrinique observé à 786 cm^{-1} pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ est déplacé à 792 cm^{-1} pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})\text{-CO}$ et à 798 cm^{-1} pour $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. Il semblerait que la fréquence de ce mode soit corrélée au transfert de charge entre la porphyrine et le ligand distal du fer. Il apparaît que plus le transfert de charge est important plus la fréquence du mode γ_5 est déplacée vers les hautes fréquences.

Les perturbations des modes de vibration observées dans le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ suggèrent que l'entrée du monoxyde de carbone dans la cavité induit une réorganisation importante.

Le Tableau 18 résume les différences spectrales des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{py})_2$	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$	$[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}\text{-CO}]$	Modes normaux	Attributions proposées	Références
1534	1538	1539	ν_{19}	$\nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_m) + \nu_{\text{asym}}(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta) + \delta_{\text{asym}}(\text{C}_\beta\text{-H})$	274
		1479		pyridine distale ou phen	273,315
1325	1314	1314		pyridine distal ou phen ?	273
1255	1260	1260	ν_{27}	$\nu(\text{C}_m\text{-Ph})$	265
1187	1193	1193		pyr ?	273
		1020		pyridine distale ou phen ?	273
992	998	998	ν_{47}	$\nu(\text{Pyr. breathing}) + \delta_{\text{asym}}(\text{Pyr. Deformation}) + \delta_{\text{sym}}(\text{C-C-C})$	188
786	792	799	γ_5	$\gamma(\text{H}_\beta) + \gamma_{\text{sym}}(\text{Pyr. Folding})$	188

Tableau 18 : Fréquences (en cm^{-1}) des principaux modes de vibration des complexes $\text{Fe}(\text{Porphen})$ et attribution.

Les spectres ATR-IRTF des complexes carbonylés en présence et en absence de cuivre(I) du modèle 2Pyporphén ont été aussi enregistrés dans le domaine des basses fréquences (Figure 89).

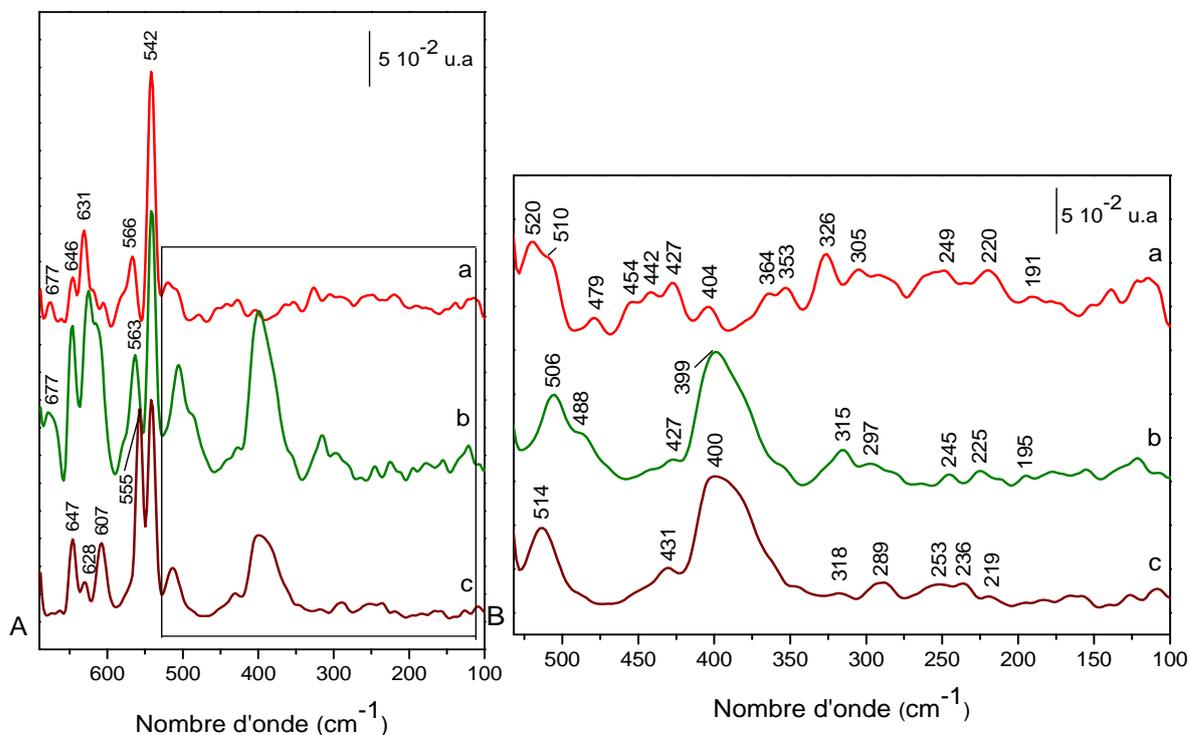


Figure 89 : **A)** Spectres ATR-IRTF des complexes 2Pyporphén enregistrés dans l'IR lointain. (a) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})(\text{py})_2$, (b) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})\text{-CO}$ et (c) $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. **B)** agrandissement de la zone 530-100 cm^{-1} .

Nous n'avons pas pu identifier la fréquence de déformation $\delta_{\text{Fe-C-O}}$ pour les complexes carbonylés du modèle 2Pyporphén du fait de la présence de contributions associées à des modes de déformation hors du plan de la porphyrine dans cette région (vers 570 cm^{-1}), tandis qu'un épaulement apparaît à 488 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})\text{-CO}$ (Figure 89 B b) et peut correspondre au mode $\nu_{\text{Fe-CO}}$.

Des signaux observés dans la gamme de fréquences 530-330 cm^{-1} à 479, 454, 442, 364 et 353 cm^{-1} dans le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})(\text{py})_2$ ne se retrouvent plus dans ceux des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})(\text{py})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$, ce qui indique la présence d'un changement structural notable lors de la coordination du monoxyde de carbone sur le fer, dû probablement à la décooordination de la pyridine distale.

Cependant, une bande large et très intense est détectée dans les spectres ATR des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphén})(\text{py})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ à 400 cm^{-1} (Figure 89 B). Ce signal est directement corrélé à la structure de l'hème et pourrait constituer des modes

fortement couplés tels le mode ν_{50} impliquant le fer et les pyrroles et le mode $\nu(\text{Fe-Npy})$ de la liaison fer-pyridine proximale. Le mode attribué à la vibration $\delta(\text{C-N})$, observé à 326 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})$ est déplacé à $318\text{-}315\text{ cm}^{-1}$ dans les spectres des complexes carbonylés.

Les résultats obtenus indiquent clairement que dans le complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$, le ligand CO peut établir des interactions spécifiques avec l'environnement distal de l'hème. Ceci se traduit par l'observation d'une bande $\nu(\text{C=O})$ présentant une fréquence de valeur nettement inférieure à celle de la bande observée en absence du cuivre. Ces résultats montrent donc que la fixation du cuivre(I) au niveau du site distal du modèle induit une augmentation de la polarité de l'environnement immédiat du ligand CO, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle le cuivre positivement chargé se place à proximité du fer de la même manière que dans l'oxydase.

1.2.3 Modèle 4C_2

Contrairement au composé $\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)$ qui a tendance à s'oxyder spontanément en solution en présence de traces de dioxygène (voir chapitre IV), le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{-CO}$ devrait être stable même en présence de dioxygène. Cependant, la solubilité de ce complexe est assez limitée, ce qui complique les études. Malgré la difficulté d'obtenir le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{-CO}$, nous avons pu enregistrer le spectre du composé $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ en transmission, visé pour une expérience de photolyse. En raison de la faible quantité disposée pour ce produit nous n'avons pas pu reproduire cette expérience. La Figure 90 présente le spectre du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ enregistré en transmission sur une fenêtre de CaF_2 .

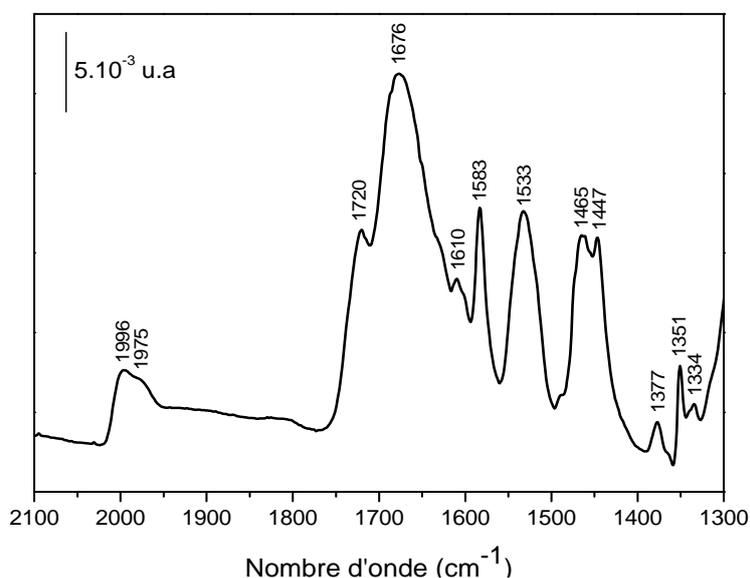


Figure 90 : Spectre IR du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ enregistré en transmission.

La bande large observée vers 2000 cm^{-1} peut être attribuée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ lié à l'atome du fer. Ce signal montre un pic à 1996 cm^{-1} et un épaulement à 1975 cm^{-1} . La formation de dérivés $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})$ sans base axiale conduit à un mélange de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})\text{CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPP})(\text{CO})_2$ dont les fréquences $\nu(\text{C}=\text{O})$ respectives sont 1973 et 2042 cm^{-1} .³¹⁶ Ainsi, l'épaulement observé à 1975 cm^{-1} dans le spectre du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ peut être attribué à une espèce monocarbonylée où le CO est fixé soit sur le site distal soit sur le site proximal de la porphyrine. Cependant, l'origine de la bande à 1996 cm^{-1} est loin d'être évidente.

Un phénomène identique a été observé pour la porphyrine $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{C}_2\text{-Cap})\text{CO}(\text{N-MeIm})$ pour laquelle la fréquence du mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ est observée à 2000 cm^{-1} .³¹⁷ Cette valeur anormalement élevée a été attribuée à la présence du nuage électronique π du cycle benzénique pontant (3\AA) de l'oxygène du CO, ce qui diminue la rétrodonation des orbitales $d\pi$ du fer vers l'orbitale π^* du CO. Dans le cas du modèle 4C_2 , l'absence d'un quelconque effet de proximité lié au voisinage du CO dans tous les cas de monocarbonylation de $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]$, nous incite à conclure à une coordination du CO à l'extérieur ou à l'intérieur de la cavité distale.

Lorsqu'un excès de 2-méthylimidazole et du cuivre(I) est ajouté au complexe 4C_2 afin de s'assurer de la coordination proximale par la base et l'insertion du cuivre dans le site distal, le spectre correspondant ne montre aucune bande associée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$. Ceci suggère que les complexes pentacoordinés montrent un caractère défavorable à l'entrée du CO dans la poche distale. Une explication nous semble raisonnable: l'espace disponible dans la cavité distale du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)$ en présence du cuivre ne permet plus la coordination du CO sans qu'il n'y ait une adaptation importante de la porphyrine. En d'autres termes, la fixation du cuivre dans le site distal peut modifier les propriétés géométriques de manière qu'elle empêche l'entrée du CO dans la cavité.

VI.1.3 Étude de transfert du CO dans les modèles par photochimie

1.3.1 Transfert du ligand dans la CcO

Le transfert de ligand jusqu'au site actif de la CcO est une étape essentielle à l'initiation de la réduction de l'oxygène. L'étude du rôle structural du site actif dans ces mécanismes de transfert contribue donc à comprendre comment la protéine assure sa fonction catalytique. Le ligand le plus étudié est le monoxyde de carbone car son transfert est plus facile à observer que celui du ligand physiologique O_2 . De plus, le ligand CO forme un complexe stable avec l'enzyme, contrairement au ligand physiologique O_2 qui est réduit dès son arrivée sur l'hème.

Ceci permet d'induire la dissociation du CO par photolyse, et de suivre ensuite son transfert au sein du site actif, sa sortie de la protéine ou sa recombinaison avec l'hème. Ce processus de photodissociation permet de générer l'état réduit de la CcO et d'étudier le transfert d'électrons et la réduction de l'oxygène.^{204,318-320}

Le ligand CO est également bien choisi pour suivre la réaction de transfert de ligand par spectroscopie infrarouge. Sa force d'oscillateur est assez importante pour que son absorption dans l'infrarouge soit détectable, et sa fréquence de vibration est sensible à son état de ligation. De plus, la sensibilité de la vibration du ligand à son environnement, à sa position dans la cage distale et aux différentes liaisons qu'il peut établir fait du domaine moyen-infrarouge une zone spectrale très intéressante, et ce qui permet de détecter les différents sites avec lesquels il interagit au cours de son déplacement dans le site actif. La formation, juste après photodissociation, d'une liaison entre le ligand CO et le cuivre du site bimétallique de la CcO a ainsi été mise en évidence par les expériences de spectroscopie infrarouge.^{229,230,321} En plus de sa fonction réductrice, le cuivre joue donc un rôle dans le transfert du CO, auquel il se lie lors de son entrée dans le site actif et de sa sortie hors du site.

Les premières expériences de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier²²⁹ menées sur la CcO ont été effectuées à basse température, en dessous de 180 K, car la recombinaison du CO avec l'hème s'effectuait trop rapidement pour être observée à température ambiante par cette méthode. Le spectre d'absorption de l'échantillon de CcO ligandée avec CO en solution est observé alternativement avec et sans illumination (Figure 91).

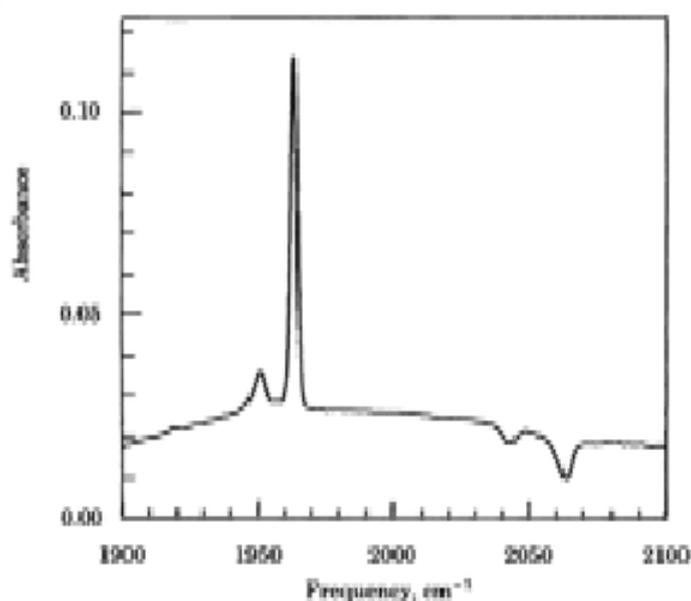


Figure 91 : Spectre différentiel d'absorption de la CcO (absorbance sans illumination moins absorbance avec illumination). Les deux bandes à 1952 et 2043 cm^{-1} sont attribuées à des conformations minoritaires de la protéine.²²⁹

Cette illumination, dans le domaine spectral visible, induit la photodissociation du CO et provoque ainsi la disparition de la bande d'absorption du CO lié au fer, de fréquence 1963 cm^{-1} , et l'apparition d'une nouvelle bande à 2062 cm^{-1} , associée à la formation d'une liaison covalente du CO avec le cuivre.

Malgré les nombreuses données qui existent, les conditions sur l'environnement du site actif qui permettent ce transfert de ligand restent méconnues. Afin de contribuer à la compréhension de ce processus nous avons étudié le transfert du ligand CO au sein des modèles HI, 4C_2 et 2Pyporphen, du fer de la porphyrine à l'atome de cuivre(I), par photochimie en utilisant un spectromètre FTIR couplé à la fois à un laser Nd-Yag pulsé et un cryostat permettant d'effectuer les mesures à très basse température.

1.3.2 Étude du transfert du CO dans les complexes $[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{I}}]-\text{CO}$

Les expériences de photochimie, réalisées sur les différents modèles, ont été effectuées à basse température, en dessous de 20 K. Le spectre IR de l'échantillon des modèles ligandés avec CO est observé alternativement avec et sans illumination. Cette illumination, dans le domaine spectral visible (irradiation à 532 nm), induit la photodissociation du CO et provoque ainsi la disparition de la bande d'absorption du CO lié au fer.

1.3.2.1 2Pyporphen

La Figure 92 montre le spectre IR des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})-\text{CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]-\text{CO}$ en matrice d'Hélium avant irradiation UV.

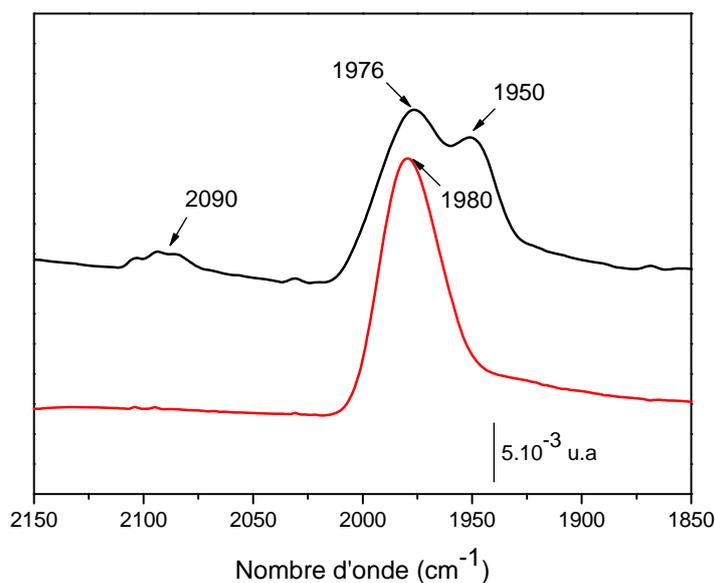


Figure 92 : Spectres IR dans le domaine $\nu(\text{C}=\text{O})$ des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})-\text{CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]-\text{CO}$ piégés en matrice d'Hélium avant irradiation UV à $T = 17\text{K}$.

Le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ présente le mode $\nu(\text{C=O})$ à 1982 cm^{-1} , tandis que celui du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ montre deux bandes à 1976 et 1950 cm^{-1} . Ces observations sont en bon accord avec les résultats obtenus par ATR.

Une bande large et très peu intense à $2091\text{-}2094\text{ cm}^{-1}$ a été attribuée au mode $\nu(\text{C=O})_{\text{Cu}}$ dans les spectres IR des complexes $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{F}_8\text{TPP})\text{-CO}\dots\text{Cu}^{\text{I}}\text{-CO}]\text{-(B(C}_6\text{F}_5)_4)$, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TMPA})\text{-CO}]\text{-(B(C}_6\text{F}_5)_4)$, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{PY1})\text{-CO}]\text{-(B(C}_6\text{F}_5)_4)$ ³²², ainsi que dans ceux des porphyrines de tetrakis(aminophényl).¹⁰⁸ Une bande équivalente est observée de manière reproductible à 2090 cm^{-1} dans le spectre du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. Nous avons donc attribuée cette bande au mode $\nu(\text{C=O})_{\text{Cu}}$.

Ainsi, le spectre du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ enregistré en transmission à 17K présente un signal $\nu(\text{C=O})$ avec la contribution majoritaires de deux bandes à 1976 et 1950 cm^{-1} correspondant respectivement à la conformation qui induit les interactions les plus faibles et à celle qui induit les interactions fortes avec le ligand distal CO, et la contribution minoritaire d'une bande à 2090 cm^{-1} qui pourrait correspondre probablement à l'espèce $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}\dots\text{Cu}^{\text{I}}\text{-CO}]$.

L'observation de la bande à 2090 cm^{-1} n'est pas toujours reproductible dans les spectres enregistrés pour le complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$, ce qui confirme que le CO sur le cuivre est labile et peut être remplacé par des molécules de solvant. Ce phénomène, déjà observé lors de l'étude du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{F}_8\text{TPP})\text{-CO}\dots\text{Cu}^{\text{I}}\text{-CO}]$ dissous dans l'acétonitrile par spectroscopie IR, a été associé au déplacement du CO coordonné au cuivre(I) par les molécules d'acétonitrile.³²² De plus, des études menées sur la coordination du cuivre(I) ont montré que l'affinité de l'acétonitrile pour ce dernier est forte, et peut déplacer le CO fixé sur le cuivre(I).³²³ Toutefois, l'espèce monocarbonylée offre un bon modèle d'étude permettant d'évaluer le transfert de ligand CO du fer au cuivre(I) par la photochimie.

Afin d'identifier les vibrations $\nu(\text{C=O})_{\text{Cu}}$ ainsi que les modifications structurales liées à l'insertion du cuivre(I) lors de la photolyse, Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ a été d'abord irradié à 532 nm . La Figure 93 A présente les spectres IR avant et après 78 minutes d'irradiation et la Figure 93 B montre le spectre différentiel obtenu.

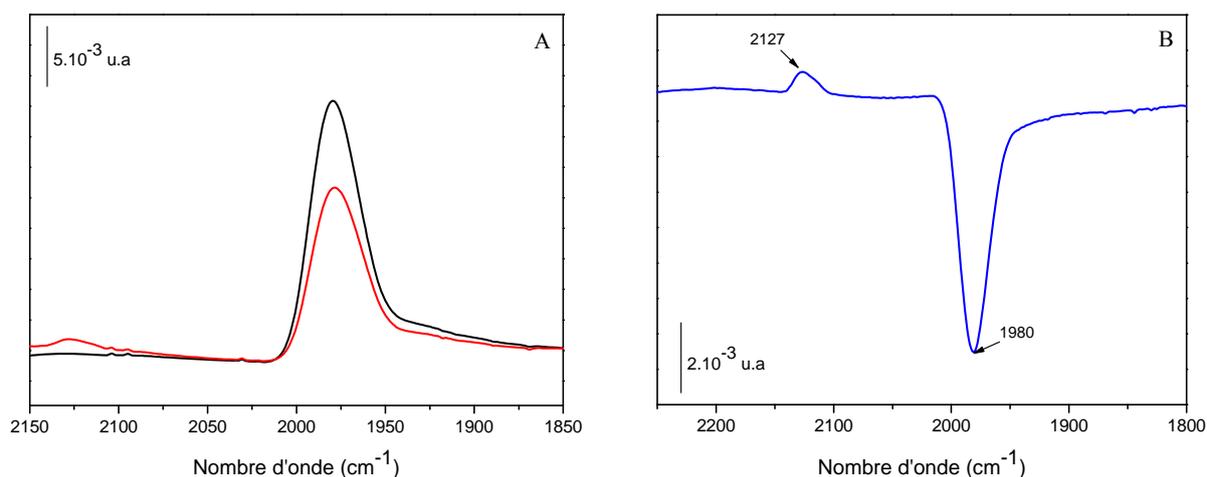


Figure 93 : Spectre IR du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ piégés en matrice d'hélium à 17K. A) avant irradiation UV (spectre noir), après 78 minutes d'irradiation à 532 nm (spectre rouge). B) après 78 minutes - avant irradiation (spectre bleu).

Rappelons que le spectre IR du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ obtenu avant irradiation à 17K montre une bande d'absorption à 1980 cm^{-1} correspondant au CO lié à l'atome de fer. l'irradiation de l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{phen})\text{-CO}$ à 532 nm et à puissance minimale entraîne une diminution de l'absorption de la bande à 1981 cm^{-1} , ce qui traduit la rupture de la liaison Fe-CO. L'amplitude de 7.10^{-3} du signal à 1980 cm^{-1} , dû aux molécules de CO dissociées de l'atome de fer, correspondant à un taux de dissociation du CO de 32 %. Pour des temps d'irradiation plus long la bande associée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ décroît en faveur de la formation d'une bande large et très peu intense à 2127 cm^{-1} . Le mode associé au monoxyde de carbone libre est observé vers 2143 cm^{-1} .³²² Ainsi, la bande à 2127 cm^{-1} pourrait être l'origine des molécules de CO peu liées dans la matrice.

Le réchauffement de l'échantillon à 60 K provoque la disparition de la bande précédemment formée à 2127 cm^{-1} , tandis que la bande du CO lié au fer a pratiquement retrouvé son absorption d'avant irradiation (Figure 94). De nouveaux spectres différentiels avec et sans photodissociation ont été ainsi enregistrés à puissance minimale (Figure 95). L'observation du même effet que lors de la première irradiation indique que la réaction de recombinaison du CO est parfaitement réversible, c'est-à-dire que le CO photodissocié retourne se lier sur le fer.

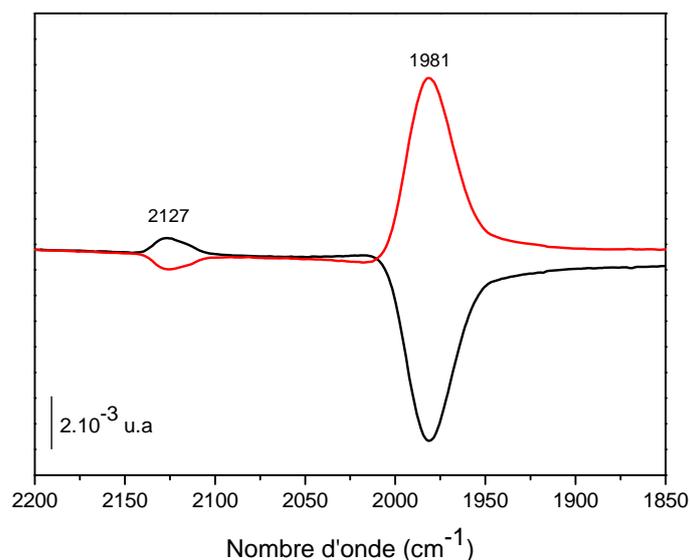


Figure 94 : Spectres différentiels du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$ piégés en matrice d'hélium à 17K. Après 78 minutes d'irradiation à 532 nm - avant irradiation UV (spectre noir), réchauffement à 60K (l'échantillon est réchauffé à 60K puis le spectre est enregistré à 17K) – après irradiation (spectre rouge).

La Figure 95 montre l'effet d'une irradiation du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ à 532 nm (P minimale).

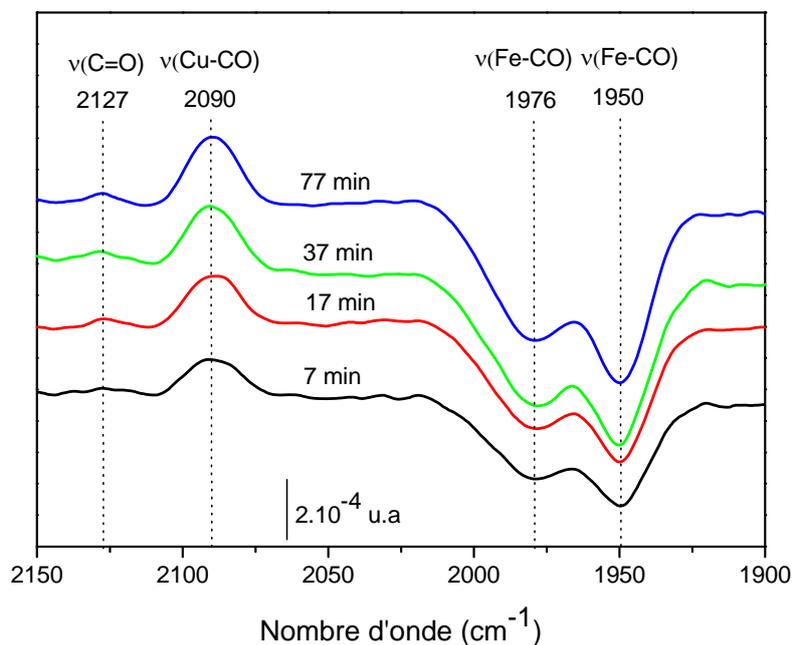


Figure 95 : Spectres transitoires induits par un échantillon du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ à différents délais d'irradiation à 532 nm – spectre obtenu avant irradiation à 17K.

Cet effet, après 7 minutes, permet de distinguer clairement la décroissance des bandes à 1976 et 1950 cm^{-1} correspondant au départ du CO de l'atome de fer, et l'apparition d'une nouvelle bande à 2090 cm^{-1} correspondant à l'arrivée du CO sur le cuivre(I). Pour des temps d'irradiation supérieurs à 7 minutes, les deux bandes associées au mode $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{Fe}}$ décroissent

au profit des bandes à 2090 et 2127 cm^{-1} . Par analogie avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-CO}$, la bande à 2127 cm^{-1} est attribuée à un mode de CO peu lié dans la matrice.

Lors de l'irradiation du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$, nous avons constaté une décroissance beaucoup plus rapide pour la bande à 1950 cm^{-1} par rapport à celle observée à 1976 cm^{-1} . Cette observation suggère que la disparition de la bande à 1950 cm^{-1} correspond à la formation de celle à 2091 cm^{-1} . Ceci indique que seule la conformation dont le cuivre se trouve à proximité de l'hème permet le transfert du ligand CO, après sa photodissociation du fer, au cuivre.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons observé les effets thermiques entre 17 et 200K. La Figure 96 montre l'effet thermique observé après l'irradiation du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

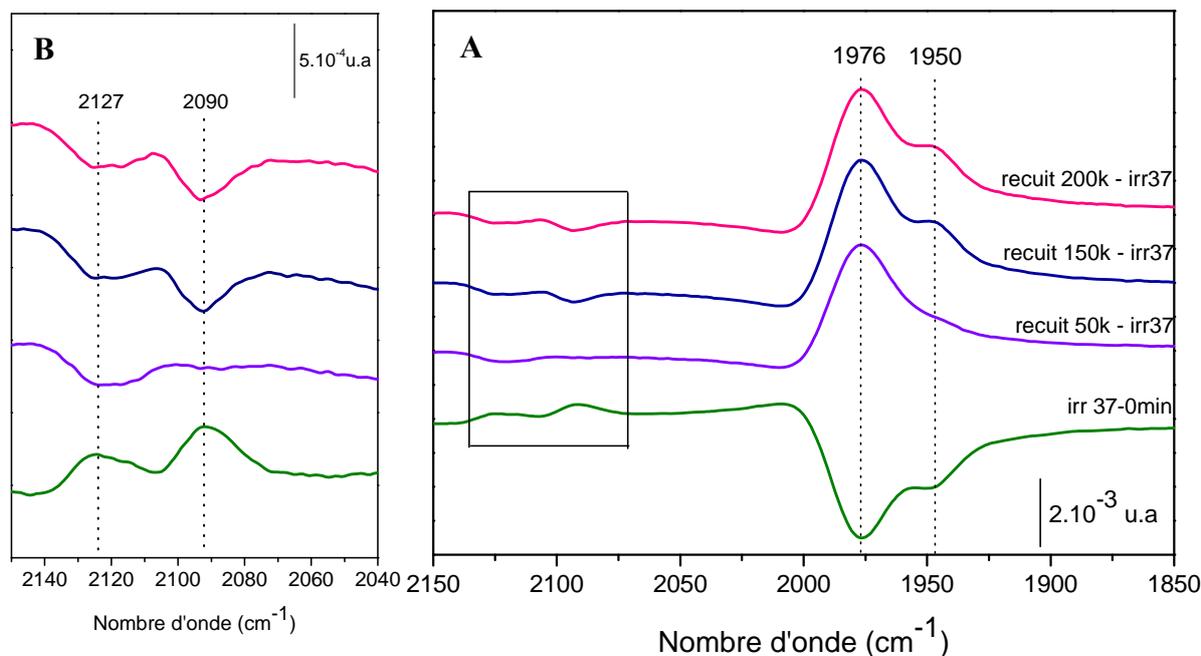


Figure 96 : **A)** Effet thermique sur le complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$. **B)** agrandissement de la zone 2150 et 2040 cm^{-1} . L'échantillon est réchauffé à une température donnée et le spectre correspondant est enregistré à 17K.

Après recuit à 50K, la bande à 2127 cm^{-1} attribuée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})$ libre a disparu, tandis que le signal à 1976 cm^{-1} a retrouvé pratiquement son absorption d'origine. Cependant, les pics à 2090 et 1950 cm^{-1} ne sont pas observés, ce qui suggère qu'il reste encore du CO sur le cuivre à cette température.

Si le recuit se poursuit pour des températures supérieures à 50K (Figure 96), la bande à 2090 cm^{-1} associée au mode $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{Cu}}$ décroît au profit de la bande à 1950 cm^{-1} . Il est clair que lorsque la bande à 2090 cm^{-1} a suffisamment diminué c'est la bande à 1950 cm^{-1} qui est

augmentée. On peut donc corrélérer les bandes à 1950 et 2090 cm^{-1} à la même conformation du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{phen})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ pour laquelle le ligand CO est coordonné à l'atome du fer soit au cuivre. De manière similaire, la bande observée à 1976 cm^{-1} est reliée à celle obtenue après la photolyse à 2127 cm^{-1} . L'irradiation après recuit provoque à nouveau la décroissance des bandes correspondantes au CO lié à l'atome du fer et l'apparition des bandes à 2090 et 2127 cm^{-1} .

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement la formation, après photodissociation, d'une liaison entre le ligand CO et le cuivre du site bimétallique. Ces données confirment que la structuration du site distal induite par la fixation du cuivre(I) serait différente, et que ces différences permettraient au CO, après photodissociation, d'emprunter deux chemins différents, l'un vers le cuivre et l'autre de sortie du site distal.

Nous pouvons en conclure que le positionnement du cuivre par rapport à l'hème a une influence directe sur le transfert du ligand entre les deux centres métalliques. Ces résultats mettent pour la première fois en évidence le transfert du ligand CO de l'hème vers le cuivre dans un modèle synthétique fonctionnel, tout comme dans la cytochrome *c* oxydase.

1.3.2.2 Modèle HI

La Figure 97 montre les spectres différentiels d'absorption (absorbance avec illumination moins absorbance sans illumination) des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-CO}$ (a), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (c).

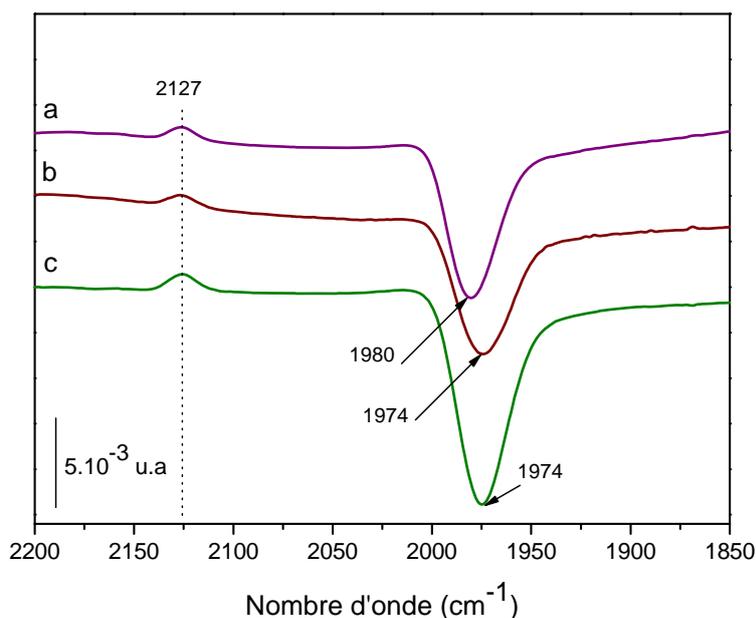


Figure 97 : Spectres différentiels d'absorption (absorbance avec illumination moins absorbance sans illumination à 532 nm, T=18K) des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-CO}$ (a), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (c).

Le mode $\nu(\text{C=O})_{\text{Fe}}$ est observé à 1980 et 1974 cm^{-1} dans les spectres IR des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-CO}$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ obtenus avant irradiation à 532 nm. Lors de la photolyse, un pic négatif correspondant au départ du CO de l'atome de fer est observé à 1980-1974 cm^{-1} et un pic positif correspondant au monoxyde de carbone peu liée dans la matrice apparaît vers 2127 cm^{-1} . Le spectre différentiel du $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ est similaire à celui du $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$.

Nous n'avons pas observé de mode IR qui pourrait être associé à une vibration $\nu(\text{C=O})_{\text{Cu}}$ dans les spectres différentiels obtenus pour les complexes bimétalliques HI50a et HI34a après la photolyse. Le ligand CO ne se lie donc pas au cuivre dans ces modèles de la CcO. Nous pensons que la flexibilité de la structure du site distal des modèles HI (lié par un seul espaceur) conduit à une distance $\text{Fe}\cdots\text{Cu}$ plus grande par rapport à celle du 2Pyporphen, ce qui explique la faible influence du cuivre sur l'hème.

1.3.2.3 Modèle 4C₂

La Figure 98 montre le spectre différentiel du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ obtenu lors de la photolyse.

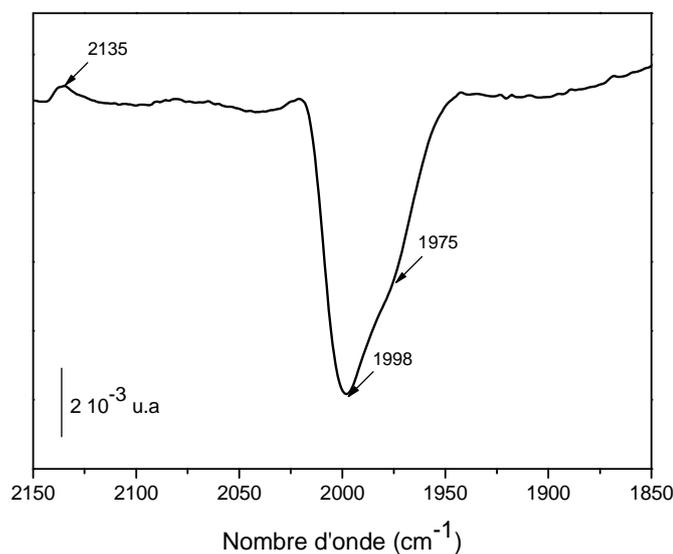


Figure 98 : Spectre différentiel du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (spectre après 50 minutes d'irradiation-spectre avant) à 18K.

Comme le montre le spectre du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}$ (Figure 98) un pic négatif à 1998 cm^{-1} avec un épaulement à 1975 cm^{-1} sont associés au départ du CO du fer, et un pic positif à 2135 cm^{-1} correspondant au CO libre dans la matrice. Aucune bande nette attribuée à la vibration $\nu(\text{C=O})_{\text{Cu}}$ n'est observée. L'empêchement du transfert du CO dans ce modèle est probablement dû à des effets stériques ayant lieu dans la poche distale.

VI.2 Étude des complexes oxygénés

Comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre introduction bibliographique, un des intérêts majeurs des modèles de la CcO réside dans la production et la caractérisation d'analogues d'intermédiaires oxygénés formés au cours du cycle catalytique de la réduction de l'oxygène en eau. Bien qu'une interaction initiale de l'oxygène avec le Cu_B a été proposée,^{324,325} la réaction métal-O₂ semble rester dominée par l'hème, où le Cu_B joue *à priori* un rôle dans le transfert d'électrons et la translocation de protons.^{319,326,327} Ainsi, l'étude de la réactivité des modèles de la forme réduite avec le dioxygène permet d'élucider des aspects fondamentaux des interactions de l'oxygène avec les centres hème-cuivre. En particulier de déterminer l'influence du cuivre sur la réaction (P)Fe^{II}/O₂, ainsi que l'impact de l'hème sur la réactivité Cu/O₂. Cette dernière partie de ce manuscrit sera alors consacrée à l'étude de la réactivité des modèles vis-à-vis de l'oxygène.

De nombreuses études menées par spectroscopie de résonance Raman sur des complexes hème-cuivre ont permis d'identifier les modes de vibration $\nu(\text{O-O})$ et $\nu(\text{Fe-O})$. Cependant, Il existe très peu de données IR sur des adduits oxygénés des métalloporphyrines.³²⁸ Ces spectres d'absorption ont été obtenus à partir de la réaction des complexes de Fe(TPP) et Mn(TPP) avec de l'oxygène dilué dans l'argon en utilisant une cellule de ("Knudsen") et un système d'isolation de la matrice permettant de réaliser les mesures à basse température (~15K).

Afin de mettre en évidence les modes IR caractéristiques de la liaison Fe-O, ainsi que les modes IR de l'hème et des ligands axiaux sensibles au changement de l'état redox du fer dans le domaine de l'IR moyen et lointain, nous avons entrepris l'étude de la réactivité des complexes de 2Pyporphen et HI50a et ses analogues avec l'oxygène.

VI.2.1 Modèle 2Pyporphen

Afin d'empêcher la coordination du fer(II) par la pyridine distale, nous avons introduit le cuivre(I) dans le site phénanthroline de l'anse. La fixation du dioxygène par le complexe Fe^{II}(Porphen)Cu^I a été confirmée par l'équipe de Dr. Weiss.¹⁰⁴

La Figure 99 montre le spectre ATR du complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]-^{16}\text{O}_2$ enregistré dans un atmosphère inerte à température ambiante.

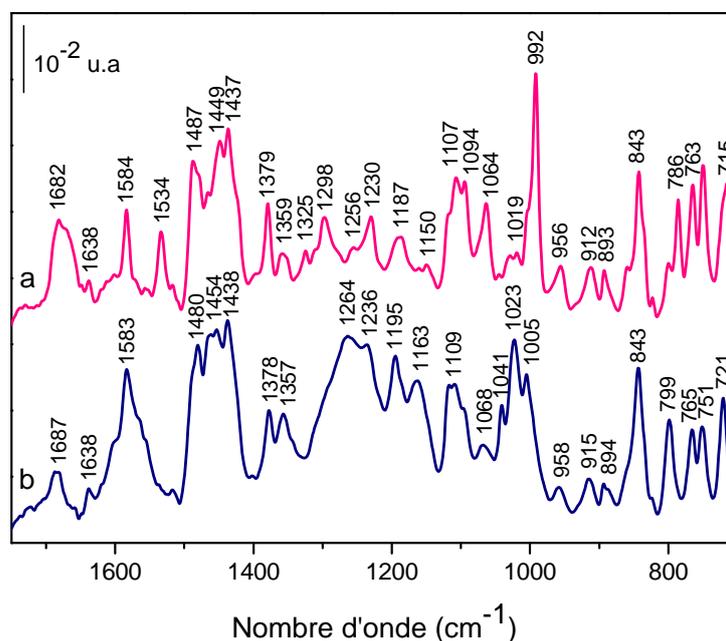


Figure 99 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ (a) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]-^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.

La région des hautes fréquences du spectre (Figure 99 b) révèle bien des modifications spectrales associées à l'insertion du cuivre(I) dans le site distal et la fixation de l'oxygène sur l'atome du fer. Le mode de vibration $\nu(^{16}\text{O}-^{16}\text{O})$ a été observé à $767-747\text{ cm}^{-1}$ dans les spectres de RR des complexes hème-Peroxo-Cu avec un ligand tridentate du cuivre.^{124,129,329} L'analyse du spectre obtenu de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]-^{16}\text{O}_2$ dans la région située entre 800 et 740 cm^{-1} ne montre aucune apparition d'une nouvelle bande qui peut être attribuée à la vibration $\nu(\text{O}-\text{O})$. Toutefois, les résultats obtenus avec la réaction de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]$ avec le monoxyde de carbone montrent clairement que pour certaines proportions de ce complexe, l'atome du cuivre se trouve à proximité du CO, et donc la formation d'une interaction entre le ligand distal et le cuivre est très probable dans ce modèle. L'absence de ce mode dans le spectre obtenu peut être due soit du fait que ce mode est inactif en IR, soit qu'il est masqué par les signaux du modèle, soit le complexe $[(\text{Porphen})\text{Fe}^{\text{III}}-(\text{O}_2^{2-})-\text{Cu}^{\text{II}}]^+$ n'est pas stable à température ambiante. En effet, les études de la réactivité $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{I}}/\text{O}_2$ révèlent la présence des intermédiaires oxygénés intéressants que lors des mesures réalisées soit à basse température soit par spectrophotométrie "stopped-flow".³³⁰

Il est également possible que la réaction de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]$ avec l'oxygène entraîne la formation d'un intermédiaire fer-oxy. Une bande observée à 1178 cm^{-1} dans le spectre de RR

du complexe $(F_8)Fe^{III}-(O_2^-)$ a été associée à la vibration $\nu(^{16}O-^{16}O)$.^{124,330} Dans le spectre IR de $Fe(TPP)O_2$ et $Fe(OEP)O_2$, deux bandes détectées à 1195-90 et 1106-04 cm^{-1} sont sensibles au marquage isotopique de $^{16}O_2$ par $^{18}O_2$, et elles sont donc attribuées à la présence de deux isomères d'adduits d'oxygène.³³¹ Le spectre IR de $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]-^{16}O_2$ montre de nouvelles bandes vers 1041 et 1023 cm^{-1} qui ne sont pas présentes dans le spectre du complexe $Fe^{II}(\text{Porphen})(py)_2$. Dans le spectre de RR du complexe $Fe(TCP-PY)-O_2$, des bandes de faible intensité à 1132, 1105, 1068 et 1050 cm^{-1} ont été proposées comme candidats potentiels pour les modes $\nu(O-O)$.³³² Toutefois, en absence de marquage isotopique de $^{16}O_2$, nous ne pouvons pas confirmer ou infirmer la contribution de la vibration $\nu(O-O)$ à ces bandes.

En présence de cuivre(I) et de $^{16}O_2$, le mode Raman ν_{19} de vibration $\nu_{\text{asym}}(C_{\alpha}-C_m) + \nu_{\text{asym}}(C_{\alpha}-C_{\beta}) + \delta_{\text{asym}}(C_{\beta}-H)$ ²⁶³ observé à 1534 cm^{-1} est disparu, ce qui confirme la décoordination de la pyridine distale. Les bandes observées à 1487 et 1150 cm^{-1} dans le spectre de $Fe^{II}(\text{Porphen})(py)_2$ et attribuées aux modes ϕ_5'' et ϕ_6'' des phényles, respectivement, sont déplacées à 1480 et 1163 cm^{-1} dans le spectre de $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]-^{16}O_2$. Les bandes à 1298, 1187 et 992 cm^{-1} associées aux modes ν_{12} , ν_{36} et ν_{47} du macrocycle porphyrinique sont également déplacées à 1264, 1195 et 1005 cm^{-1} respectivement, dans le spectre de $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]-^{16}O_2$.

Les modes de vibration hors du plan de la porphyrine γ_5 et γ_8 sont observés à 799 et 721 cm^{-1} , respectivement dans le spectre du complexe $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]-^{16}O_2$. Le mode γ_5 subit le même déplacement observé dans le complexe $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]-CO$, tandis que la fréquence du mode γ_8 est légèrement déplacée vers les hautes fréquences, traduisant une légère augmentation de la quantité de transfert de charge du fer au cycle porphyrinique.

Ces observations indiquent clairement un changement structural du modèle 2Pyporphen lors de l'introduction du cuivre et de l'oxygène. Afin de discriminer les perturbations spectrales dues à l'insertion du cuivre de celles de la fixation de l'oxygène, un spectre du complexe doit être réalisé $[Fe^{II}(\text{Porphen})Cu^I]$.

Dans la région des basses fréquences du spectre de RR obtenu pour le complexe $[(F_8)Fe^{III}-(O_2^{2-})-Cu^{II}(\text{LOH})]$, le mode de vibration $\nu(Fe-O)$ est observé à 530 cm^{-1} ,¹²⁶ tandis que pour les adduits hème-oxygène, ce mode est détecté à 568, 572 et 563 cm^{-1} pour les complexes $(F_8)Fe^{III}-(O_2^-)$ ¹²⁴, $Fe(OEP)(1-MeIm)$ ³³³ et $Fe((Piv)_2-C_8)(1-MeIm)$ ³³⁴, respectivement.

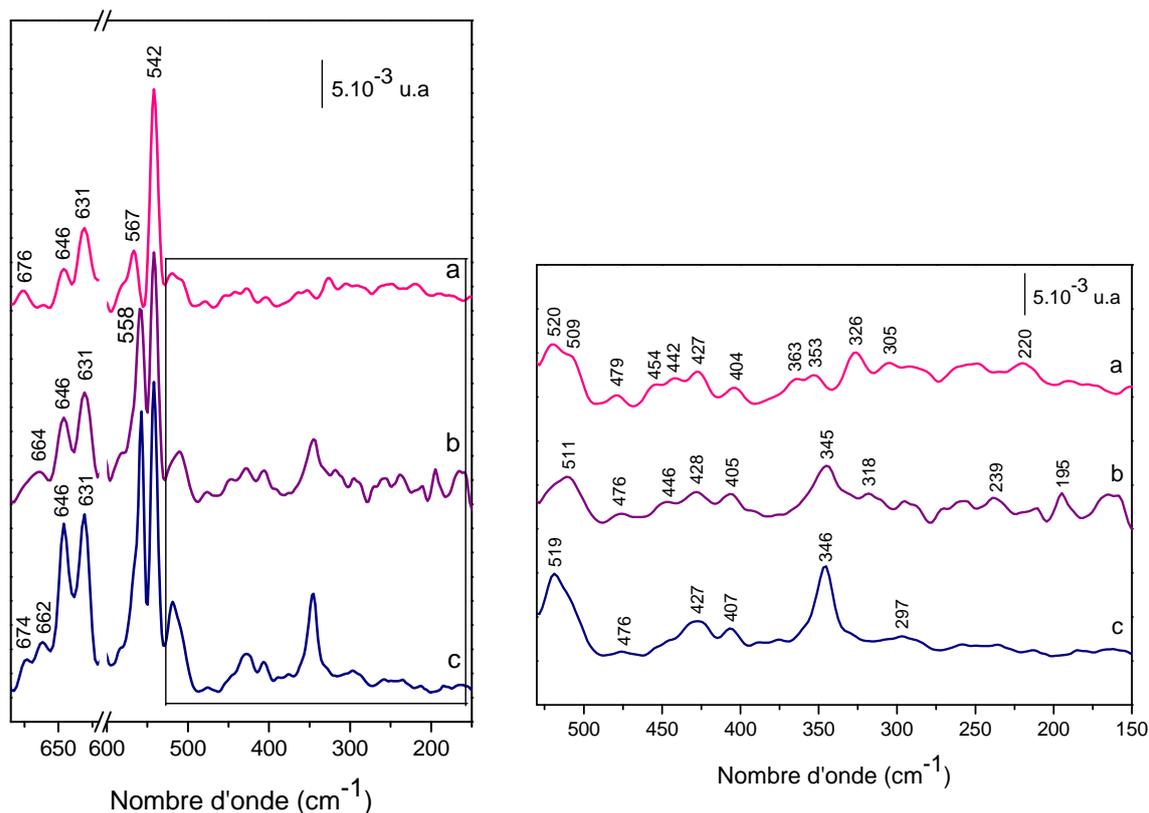


Figure 100 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante.

Nous n'avons pas identifié de mode IR qui pourrait être associé à une vibration $\nu(\text{Fe-O})$ dans le spectre enregistré en présence d'oxygène (Figure 100 c). La présence des bandes intenses attribuées aux modes hors du plan de l'hème ou du squelette organique dans la région de fréquences $570\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ peut masquer la vibration $\nu(\text{Fe-O})$.

La disparition de la bande à 676 cm^{-1} , associée à la contribution de la pyridine, peut être corrélée à l'apparition d'une bande à 664 cm^{-1} . Nous pensons attribuer cette bande à une vibration du cycle pyridinique²⁹³. Cependant, dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c), les deux bandes sont présentes à 674 et 662 cm^{-1} .

Un mode impliquant majoritairement la vibration (*Pyr folding*) a été proposé à 506 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})$ (Chapitre V). En adéquation avec les observations faites sur les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{-ImH}$, le déplacement de ce mode à 519 cm^{-1} dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c) montre que ce dernier se trouve bien dans une géométrie hexacoordinée, et confirme donc la fixation de l'oxygène sur l'atome du fer.

Les bandes observées à 363 et 353 cm^{-1} dans le spectre enregistré avec le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})(\text{py})_2$ (a) et associées probablement à $\nu(\text{Fe-Npy}) + (\text{Pyr tilting})$ et $\nu(\text{Fe-Npy})$, respectivement, sont absentes dans le spectre du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}$ (b) ou

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Porphen})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c). Ces bandes correspondent donc à une contribution majoritaire de la pyridine distale. Cette expérience montre également que la bande à 345 cm^{-1} qui apparaît lors de la coordination de la pyridine distale n'est pas affectée par la fixation de l'oxygène sur l'atome de fer. La bande à 326 cm^{-1} attribuée à la vibration $\delta(\text{C-N})$ ²⁹⁴ est également disparue lors de la fixation du cuivre ou de l'oxygène.

VI.2.2 Modèle HI

La Figure 101 montre les spectres IRTF enregistrés avec $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})^{-16}\text{O}_2$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c).

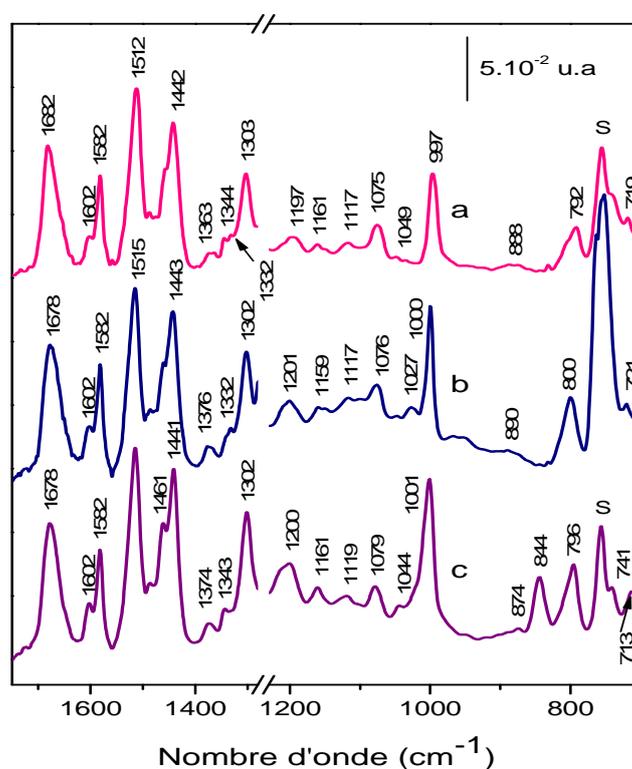


Figure 101 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})^{-16}\text{O}_2$ (b) et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante.

Contrairement au modèle 2Pyporphén, peu de différences sont détectées dans les spectres de complexes $\text{Fe}(\text{HI50a})$ en présence d'oxygène ou de cuivre, mais aucun signal correspondant à une vibration $\nu(\text{O-O})$ n'a été détecté soit dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})^{-16}\text{O}_2$ (b) soit dans celui de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$ (c).

La bande de faible intensité observée à 1363 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$, est déplacée à 1376 cm^{-1} dans les spectres de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})^{-16}\text{O}_2$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]^{-16}\text{O}_2$. Une bande similaire a été observée vers 1360 cm^{-1} dans le spectre de RR de la forme réduite de l'hémoglobine et a été associée à un déplacement de la bande à 1377 cm^{-1} de 17 cm^{-1} vers les

hautes fréquences lors de la formation de l'intermédiaire oxyhémoglobine de type superoxyde $\text{Fe}^{\text{III}}-(\text{O}_2^-)$.^{335,336} Cette bande est également considérée caractéristique de l'hème Fe(III) dans le spectre de résonance Raman des hémoprotéines.¹⁷⁷ Il est donc probable que le déplacement du mode observé à $1376\text{-}74\text{ cm}^{-1}$ est dû au changement de l'état redox du fer de Fe(II) au Fe(III) dans les complexes de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ et $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$ lors de la fixation de l'oxygène.

La présence de la bande à 1332 cm^{-1} , correspondant au mode ν_{41} lorsque le fer est dans une géométrie pentacoordinée dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$, soulève des questions sur la fixation de l'oxygène sur l'atome de fer et la stabilité du complexe formé. Étant donné que l'intensité de ce signal est très faible, il est difficile de conclure de manière certaine sur la position de cette bande. Cependant, la fréquence de ce mode est observé à 1343 cm^{-1} dans le spectre de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$. De plus, les modes hors-du plan γ_5 et γ_8 sont observés, respectivement, à 800 et 721 cm^{-1} pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$, et 796 et 713 cm^{-1} pour celui de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-}^{16}\text{O}_2$. Ces observations indiquent la présence de différences, notamment, au niveau de la configuration électronique entre ces deux complexes. En effet, le mode γ_5 est sensible de l'état redox du fer, tandis que le mode γ_8 reflète la quantité du transfert de charge entre le métal et le macrocycle porphyrinique, où la rétrodonation des électrons des orbitales liantes π de Fe(II) aux orbitales antiliantes π^* de la porphyrine dépend foretement de la compétition de ces électrons entre le métal et le ligand axial π accepteur.

La Figure 102 montre les spectres ATR-IRTF de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{18}\text{O}_2$ (c) dans le domaine de l'IR lointain.

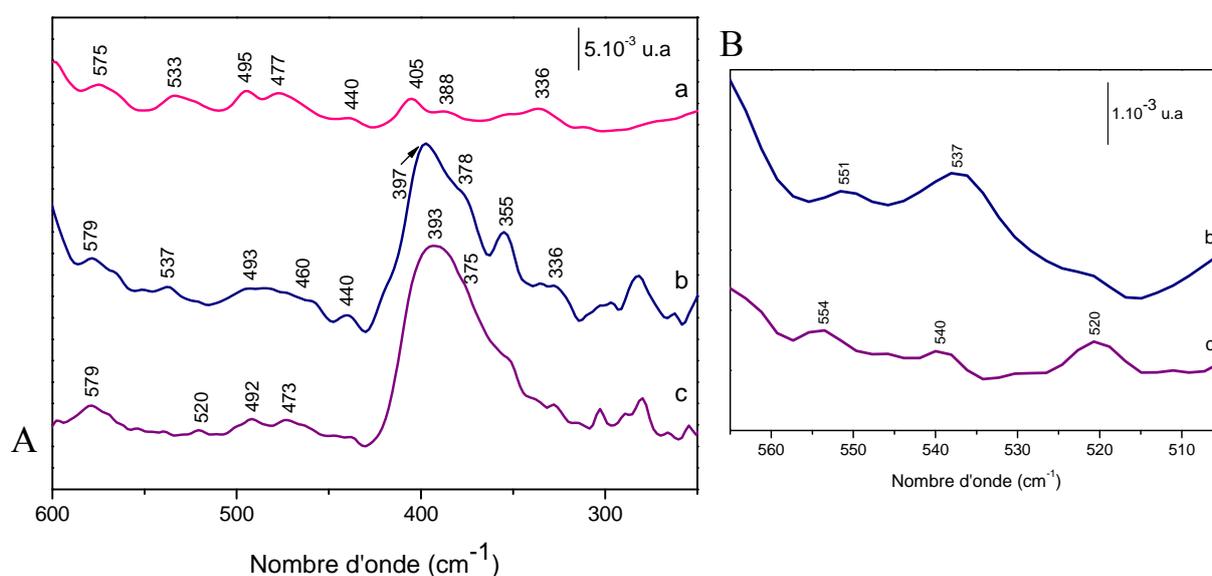


Figure 102 : A) Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$ (a), $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{18}\text{O}_2$ (c) enregistrés à température ambiante. B) Agrandissement de la zone $565\text{-}505\text{ cm}^{-1}$.

L'analyse des spectres obtenus dans la région située entre 580 et 500 cm^{-1} (Figure 102) montre une bande de très faible intensité située autour de 550 cm^{-1} présente dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) et complètement absente du spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})$, ce qui suggère d'attribuer cette bande au mode de vibration de la liaison Fe-O.

Afin de préciser l'attribution de ce mode, une expérience est réalisée avec l'oxygène $^{18}\text{O}_2$. Cependant, les mesures du spectre correspondant sont délicates à réaliser dans le sac à gants car il peut y avoir de l'oxygène $^{16}\text{O}_2$.

Pour un adduit oxygéné, la vibration $\nu(\text{Fe-}^{18}\text{O}_2)$ est attendue à des fréquences plus basses que la vibration $(\text{Fe-}^{16}\text{O}_2)$. La substitution du ^{16}O par ^{18}O provoque un léger déplacement de la bande à 551 cm^{-1} à 554 cm^{-1} et l'apparition d'une bande à 520 cm^{-1} , ce qui laisse suggérer la présence d'un mélange d'adduits de $\text{Fe}(\text{HI50a})\text{-}^{18}\text{O}_2$ et $\text{Fe}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$. En effet, la bande à 520 cm^{-1} peut être à l'origine du déplacement de la bande à 551 cm^{-1} par le marquage de $^{18}\text{O}_2$ avec $\Delta(^{18}\text{O}_2) = -31 \text{ cm}^{-1}$. Nous proposons donc d'attribuer le signal à 551 cm^{-1} à la vibration $\nu(\text{Fe-O})$.

L'oxygénation du modèle HI50a affecte principalement la zone spectrale 430-300 cm^{-1} où sont attendues les bandes correspondant aux modes de vibrations dans le plan de l'hème et des liaisons métal-ligands, tandis que les bandes IR entre 580 et 440 cm^{-1} , associées aux modes de vibration hors du plan de la porphyrine et des phényles, ne sont que faiblement affectées.

L'attribution des bandes du signal complexe observé à 397/378 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) est cependant délicate. Il correspond probablement aux vibrations $\nu(\text{Fe-Npyrrole})$, à la vibration antisymétrique $\nu(\text{Fe-Npyridine})$ et aux vibrations des pyrroles hors du plan. Une bande observée à 390 cm^{-1} est attribuée au mode γ_8 , théoriquement non-actif en IR, impliquant la vibration dans le plan de respiration des pyrroles, $\nu(\text{Fe-N-Pyrrole})$.¹⁸⁸

En revanche, il n'y a pas d'effet significatif du marquage de l'oxygène par ^{18}O sur les autres bandes du spectre, mis à part le léger déplacement du signal intense à 397 cm^{-1} à 393 cm^{-1} dans le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{18}\text{O}_2$.

La réactivité des analogues HI29a et HI34a vis-à-vis de l'oxygène a été également étudiée par spectroscopie ATR-IRTF dans le domaine de l'IR lointain. Les spectres obtenus sont présentés sur les Figures 103 et 104.

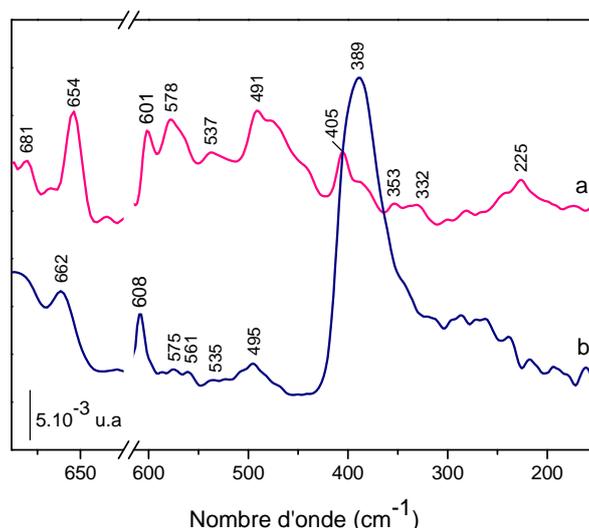


Figure 103 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})$ (a) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.

Dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})$ enregistré en présence de l'oxygène $^{16}\text{O}_2$ (Figure 103 b), l'allure du signal correspondant au mode hors du plan γ_7 du macrocycle porphyrinique est modifiée. En effet, la bande observée à 578 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})$ (a) est remplacée par deux bandes de faible intensité à 575 et 561 cm^{-1} dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI29a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b). Il est donc difficile d'attribuer la bande à 561 cm^{-1} à une vibration $\nu(\text{Fe-O})$, notamment en absence du marquage isotopique de l'oxygène par $^{18}\text{O}_2$.

Un signal intense à 389 cm^{-1} , a la même allure que celui observé dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI50a})\text{-}^{16}\text{O}_2$, même s'il est légèrement déplacé vers les basses fréquences. Le mode ϕ_9'' associé aux vibrations $\delta_2(\text{C-C-C}) + \delta(\text{Pyr.rotation})$ des phényles à 654 cm^{-1} est déplacé à 662 cm^{-1} après la réaction avec l'oxygène. Il est donc possible que la coordination de l'oxygène sur l'atome du fer induit des changements structuraux.

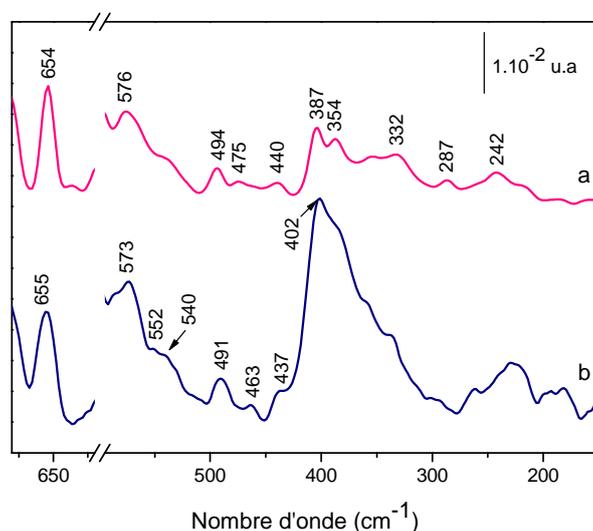


Figure 104 : Spectres ATR-IRTF des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})$ (a) et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{-}^{16}\text{O}_2$ (b) enregistrés à température ambiante.

La bande intense à 402 cm^{-1} n'est aussi observée qu'en présence d'oxygène et pourrait être associée à un déplacement de la bande à 387 cm^{-1} de 15 cm^{-1} vers les hautes fréquences. Cette bande pourrait provenir d'un mode de déformation des pyrroles hors du plan couplé à un mode de vibration impliquant les ligands axiaux. La bande à 475 cm^{-1} attribuée à la vibration (*Pyrroles folding*) est déplacée à 463, tandis que le mode ϕ_9'' des phényles n'est pas perturbé dans le spectre de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{HI34a})\text{-}^{16}\text{O}_2$.

Bien que les attributions des bandes associées aux vibrations O-O et Fe-O ne peuvent pas être réalisées de façon évidente dans le domaine de l'IR moyen ou l'IR lointain, du fait d'une intensité trop faible ou une délocalisation et donc une contribution à d'autres bandes du modèle, les spectres obtenus en absence du substituant dans le site distal (HI50a) ou en présence des groupements nitro (HI29a) et méthoxy (HI34a) par spectroscopie ATR-IRTF montrent que l'interaction hème/ O_2 est la même quel que soit le substrat fixé, ce qui suggère que la fixation des substituants au niveau du site distal n'induit pas de perturbation structurale et électronique du ligand distal.

VI.3 Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous permet de poser de nouvelles bases pour l'étude de la réactivité des modèles synthétiques de la CcO avec l'oxygène et le monoxyde de carbone. En effet, notre approche a consisté à vouloir réaliser une étude structure/fonction des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ afin de comprendre quels paramètres pouvaient régir leur réactivité.

Les résultats obtenus par spectroscopie ATR-IRTF montrent clairement que les différentes positions du cuivre par rapport au ligand CO ont des effets distincts et spécifiques sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ des différents modèles. De manière intéressante, la fixation du cuivre (I) dans le site distal du 2Pyporphén induit une interaction apparemment très forte avec le ligand distal du fer caractérisé par un signal $\nu(\text{C=O})_{\text{Fe}}$ dominé par une contribution à 1949 cm^{-1} , alors que dans les modèles HI il induit une interaction apparemment beaucoup moins intense avec une contribution à 1976 cm^{-1} . Étonnamment la porphyrine 4C_2 conduit à deux isomères caractérisés par un mode $\nu(\text{C=O})_{\text{Fe}}$ à 1998 et 1975 cm^{-1} . Dans l'hypothèse, très probable, où ces complexes sont formés sous contrôle thermodynamique plutôt que cinétique, il apparaît que $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}_{\text{out}}$ est plus stable que son isomère $[\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{C}_2)\text{Cu}^{\text{I}}]\text{-CO}_{\text{in}}$. En effet, aucune interaction de type liaison H impliquant les NH amide ou de type électrostatique incluant la charge positive du cuivre(I) n'a été mise en évidence, elle entraînerait un fort déplacement du signal CO vers les basses fréquences. Il est cependant clair que l'introduction de ce coordina

du côté distal subit des effets stériques importants qui peuvent entraîner une réorganisation importante dans la géométrie générale du ligand porphyrinique.

Ces résultats suggèrent fortement que les différences de réactivité observées entre les analogues bimétalliques Fe/Cu de la CcO, seraient dues aux différentes interactions que les poches distales induisent entre le cuivre (I) et le ligand distal du fer. L'ensemble de nos résultats montre que ces interactions dépendent directement de la position du cuivre(I) et suggère que les paramètres de réactivité du ligand distal du fer sont directement reliés à la polarité de l'environnement du site distal.

D'autre part, l'étude des modèles 2Pyporphen, HI et 4C₂ par la photolyse a mis en évidence le transfert du CO de l'hème au cuivre uniquement dans le complexe [Fe^{II}(Porphen)Cu^I]-CO. Cette observation peut vraisemblablement s'expliquer par le fait que dans le 2Pyporphen le cuivre(I) est situé à proximité de l'hème avec une distance Fe-Cu de l'ordre de 5Å, du fait de la présence d'une cavité bien construite et rigide qui empêcherait le CO photodissocié de sortir de cette poche. Dans les porphyrines bimétalliques étudiées, les molécules de CO photodissociées s'éloignent différemment de l'atome de fer, si bien qu'elles peuvent retourner se lier au fer par recuit de la température.

Cependant, les expériences menées par spectroscopie IR sur l'étude de la réactivité des modèles avec l'oxygène ne permettent pas de mettre en évidence les vibrations $\nu(\text{O-O})$ et $\nu(\text{Fe-O})$. Ainsi, ce type d'approche ne semble pas pouvoir rendre compte de la réactivité des complexes Fe^{II}-O₂ de modèles étudiés et permettre de comprendre quels paramètres contrôlent la réduction de dioxygène par la CcO.

Il semble donc qu'il faille orienter ces études vers d'autres techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie de résonance Raman qui semble être la seule à pouvoir nous apporter des informations sur la nature des intermédiaires oxygénés formés au cours de la réaction. L'instabilité des complexes Fe^{II}-O₂ rend ces expériences délicates et laborieuses. Ainsi, nous proposons parallèlement de réaliser une étude structure/fonction des différents modèles à basse température et/ou en utilisant la spectrophotométrie "stopped-flow".

Chapitre VII : Conclusion générale et perspectives

La compréhension fondamentale du mécanisme de réduction du dioxygène en eau par la cytochrome *c* oxydase constitue un sujet de recherche très actif. En effet, le déroulement précis du mécanisme présente encore de nombreuses zones d'incertitudes. En particulier, la nature des espèces radicalaires mises en jeu, le rôle du Cu_B ainsi que la manière dont ces espèces se forment. La connaissance précise du rôle du Cu_B et des espèces radicalaires formées constitue manifestement la clé de la compréhension du mécanisme de la CcO. C'est pourquoi au cours de ce travail, nous avons étudié les intermédiaires de la CcO par spectroscopie UV-visible, de fluorescence et infrarouge, afin d'apporter des éléments permettant d'éclaircir la question de formation des espèces radicalaires ainsi que l'influence du Cu_B sur la réaction hème/O₂ au cours du cycle catalytique de la CcO.

Dans un premier temps, dans l'optique d'étudier les vibrations métal-ligands au sein des intermédiaires de la CcO dans le domaine des basses fréquences IR, nous avons essayé de mettre en place les conditions expérimentales permettant d'obtenir des spectres IR en mode différentiel. Une cellule d'ATR couplée à la perfusion a été utilisée afin de générer artificiellement les intermédiaires P_H, F_H et P₁₀ en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme donneur de deux électrons à l'état oxydé de l'enzyme et/ou en modifiant le pH du milieu. Cette technique permet de mettre en évidence les modifications structurales ainsi que les changements affectant les acides aminés de la chaîne polypeptidique à plus longue distance du métal lors d'un changement de l'état d'oxydation du métal dans les métalloprotéines.

Malheureusement, l'adaptation de l'appareillage de la perfusion n'a pas permis d'obtenir des spectres IR de différence pour la CcO en solution dans le domaine des basses fréquences car la protéine n'adhère pas à la surface du diamant de l'ATR de la cellule de perfusion.

Toutefois, nous avons pu caractériser les différents intermédiaires par spectroscopie ATR-IRTF. La superposition des spectres de la forme oxydée, peroxy et ferryl obtenus ne montrent quasiment pas de variations spectrales. Les faibles différences spectrales observées à basse fréquence ne sont pas cohérentes avec les structures chimiques proposées actuellement. De telles différences entre les intermédiaires O, P_m et F n'ont pas pu être établies soit parce que les états P_m et F n'ont pas été réellement formés ou soit parce qu'il est important d'obtenir des spectres différentiels permettant de renseigner plus en détail sur la structure et la dynamique de ces intermédiaires.

L'observation directe des intermédiaires formés au cours du cycle catalytique de la CcO n'étant pas possible dans l'état actuel de nos moyens technologiques, il est nécessaire de concevoir des outils qui permettent d'étudier précisément les interactions métal-ligands qui se

forment au sein du site actif de l'enzyme, afin d'identifier avec certitude les modes de vibrations cuivre-histidine ainsi que de déterminer les paramètres qui influencent la fréquence de ces modes, et donc d'obtenir des données permettant de mieux comprendre le déroulement des étapes qui mènent à la formation des intermédiaires.

Nous avons dans un deuxième temps cherché à comprendre le rôle précis des relations liant les influences stériques distales de porphyrines superstructurées, prises comme modèles biomimétiques du site actif de la CcO ; à la réactivité et la stabilité des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$.

Nous avons entrepris d'étudier trois familles de ligands porphyriniques synthétisés par les équipes du Dr J. Weiss (la porphyrine à anse phénanthroline : 2Pyporphen) et du Dr B. Boitrel (les porphyrines « à poche » : HI50a, HI34a, HI29a, 4C₂, 4C₂-NO₂ et 4C₂-diNO₂). Ces modèles conservent l'hème, la ligation fer-histidine du site proximal et le ligand complexant le cuivre du site distal de la CcO. Ils se différencient notamment par leur environnement autour de l'atome de cuivre et par leur rigidité.

Nous avons caractérisé, dans un premier temps, les différents modèles (ligands libres et complexes ferriques en utilisant la spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR-IRTF). Dans un second temps, les complexes de Fe(II) obtenus par réduction de leurs complexes analogues de Fe(III) ont été caractérisés. L'analyse de ces complexes par spectroscopie IRTF dans le domaine du moyen infrarouge (1800-700 cm^{-1}) a permis de mettre en évidence des modes IR redox spécifiques de l'hème, dont certains sont sensibles à l'état de spin du fer. Nous avons montré également que certains modes de vibration dans l'IR lointain étaient fortement sensibles à la conformation de la métalloporphyrine considérée et que certains groupements d'atome de l'environnement distal en interaction avec les ligands axiaux ou l'hème contribuaient de manière intense au spectre IRTF. De façon plus spécifique, nous avons mis en évidence dans les complexes les modes de vibrations internes aux ligands axiaux 2-methylimidazole et pyridine.

L'étude de la complexation des complexes Fe(III) et Fe(II) par une base azotée (type imidazole) a révélé dans certains complexes leurs propriétés de coordination. Les spectres obtenus pour le modèle 2Pyporphen montrent que les porphyrines de Fe(III) sont pentacoordinées alors que les complexes de Fe(II) présentent une géométrie hexacoordinées autour du métal central. Les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge sont en accord avec les résultats de spectroscopie RPE et UV-Visible fournis par l'équipe du Dr. Jean Weiss qui montrent un complexe de Fe(III) de haut spin et un complexe de Fe(II) de bas spin.

Bien que les expériences menées par spectroscopie IR sur l'étude de la réactivité des modèles avec l'oxygène n'a pas permis de mettre en évidence les vibrations $\nu(\text{O-O})$ et $\nu(\text{Fe-O})$ pour tous les modèles étudiés, l'oxygénation de leurs complexes de Fe(II) à température ambiante a montré sur les spectres enregistrés dans le moyen et le lointain infrarouge des modifications spectrales importantes (Modèles HI et 2Pyrporphen) traduisant des changements structuraux liés à la fixation de l'oxygène. Le spectre du Modèle HI50a enregistré dans les basses fréquences montre l'apparition d'une nouvelle bande vers 550 cm^{-1} qui peut être attribuée à une vibration de valence de fer lié à l'oxygène. En revanche, les complexes de Fe(II) qui manquent de protection du cycle porphyrinique du côté opposé de la tren (Modèles 4C₂) se transforment en dimère μ -oxo de fer(III).

Nous avons aussi étudié le rôle de l'atome de cuivre sur l'environnement distal de la porphyrine en utilisant le monoxyde de carbone comme sonde. Les adduits de Fe(II) carbonylés ont été étudiés par spectroscopie IR. Tous les complexes de Fe(II)-Cu(I) carbonylés des porphyrines « Capped porphyrins » possèdent une bande d'absorption $\nu(\text{C-O})$ sauf le complexe de la porphyrine à anse phénanthroline qui en a deux. Cette espèce possède deux orientations distinctes de l'anse dont l'une oriente l'atome de cuivre à proximité du CO.

L'étude dynamique de la CcO, indispensable à la compréhension du fonctionnement de son site actif, a considérablement progressé grâce aux expériences de spectroscopie. Nous avons étudié dans ce cadre le transfert du ligand au sein des modèles, du fer de la porphyrine à l'atome de cuivre, par photochimie en utilisant un spectromètre IRTF couplé à la fois à un laser Nd-Yag pulsé et un cryostat permettant d'effectuer les mesures à très basse température (15 K). Les études de photodissociation en spectroscopie des adduits carbonylés montrent une fixation totalement réversible du CO sur l'atome de fer après illumination pour tous les modèles à l'exclusion du modèle 4C₂. De manière très intéressante, dans le cas du modèle le plus rigide (2Pyrporphen), nous avons observé en outre de la bande à 2125 cm^{-1} associée au CO libre l'apparition d'une nouvelle bande à 2092 cm^{-1} que nous avons associée à la formation d'une liaison covalente du CO sur le cuivre.

Les résultats que nous avons obtenu montrent clairement le transfert du CO du fer, après photodissociation, au cuivre tout comme dans la cytochrome *c* oxydase et soulève la question sur le rôle du cuivre sur la cinétique et la dynamique de transfert du ligand CO. Il convient également de se demander si le contrôle de l'entrée et de sortie du ligand de CO par le cuivre est un mécanisme général de l'enzyme, applicable au ligand physiologique O₂.

Il serait intéressant d'étendre ce type d'étude aux autres analogues du modèle 2Pyporphén, possédant par exemple un composé phénol mimant la tyrosine 280, afin de déterminer éventuellement son rôle dans la réduction de l'oxygène en eau. Ces différents éléments permettraient de mieux connaître le déroulement du mécanisme du transfert du ligand CO et de mieux comprendre le rôle du cuivre mais également de l'environnement distal.

Références bibliographiques

- (1) Schultz, B. E.; Chan; S. I., *Mechanism and dynamics of azobenzene photoisomerization*, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **2001**, 30, 23.
- (2) Mitchell, P., *Cooplign of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism*, *Nature* **1961**, 191, 144.
- (3) Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecl,e Science* **1999**, 283, 1488.
- (4) Walker, J. E.; Dickson, V. K., *The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase*, *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1757, 286.
- (5) Margulis, L., *Origin of Eukaryote Cells*, Yale University Press: New Haven, **1970**.
- (6) Castresana, J.; Saraste, M., *Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis Trends, Biochem Sci* **1995**, 20, 443.
- (7) John, P.; Whatley, F. R., *Paracoccus denitrificans and the evolutionary origin of the mitochondrion*, *Nature* **1975**, 254, 495.
- (8) Napiwotzski, J.; Shinzawa-Ittoh, K.; Yoshikawa, S.; Kadenbach, B., *ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity*, *Bio. Chem.* **1997**, 378, 1013.
- (9) Schagger, H., *Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria*, *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1555, 154.
- (10) El Khoury, Y., *Mid and far infrared spectroelectrochemical studies on the metal-ligand interactions in respiratory chain enzymes*, thèse de doctorat, Université de Strasbourg, **2010**, p 224.
- (11) Pereira, M. M.; Santana, M.; Teixeira, M., *A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases*, *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1505, 185.
- (12) Angerer, H., *Functional and structural studies on the Atmungsferment, Cytochrome c Oxydase from Paracoccus Denitrificans*, Max-Planck-Institut für Biophysik, **2008**, p 187.
- (13) Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H., *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*, *Nature* **1995**, 376, 660.
- (14) Garcia-Horsman, J. A.; Barquera, B.; Rumbley, J.; Ma, J.; Gennis, R. B., *The superfamily of heme-copper respiratory oxidases*, *J Bacteriol* **1994**, 176, 5587.
- (15) Wikstrom, M. K., *Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria*, *Nature* **1977**, 266, 271.
- (16) Yoshikawa, S.; Shinzawa-Ittoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libeu, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T., *Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase*, *Science* **1998**, 280, 1723.
- (17) Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H., *Structure at 2.7 Å resolution of the Paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, 10547.
- (18) Svensson-Ek, M.; Abramson, J.; Larsson, G.; Tornroth, S.; Brzezinski, P.; Iwata, S. J., *The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides*, *Mol Biol* **2002**, 321, 329.
- (19) Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Than, M. E., *Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from thermus thermophilus*, *EMBO J* **2000**, 19, 1766.
- (20) Ludwig, B.; Schatz, G., *A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from Paracoccus dentrificans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, 77, 196.

- (21) Haltia, T.; Puustinen, A.; Finel, M., *The Paracoccus denitrificans cytochrome aa3 has a third subunit*, *Eur J Biochem* **1988**, *172*, 543.
- (22) Haltia, T.; Puustinen, A.; Finel, M., *The Paracoccus denitrificans cytochrome aa3 has a third subunit*, *Eur J Biochem*. **1988**, *15*, 543.
- (23) Koepke, J.; Olkhova, E.; Angerer, H.; Muller, H.; Peng, G.; Michel, H., *High resolution crystal structure of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: new insights into the active site and the proton transfer pathways*, *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1787*, 635.
- (24) Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A., *Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome c oxidase: Coulomb pump model with kinetic gating*, *FEBS Lett* **2004**, *566*, 126.
- (25) Witt, H.; Wittershagen, A.; Bill, E.; Kolbesen, B. O.; Ludwig, B., *Asp-193 and Glu-218 of subunit II are involved in the Mn²⁺-binding of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase*, *FEBS Lett*, **1997**, *409*, 128.
- (26) Pfitzner, U.; Kirichenko, A.; Konstantinov, A. A.; Mertens, M.; Wittershagen, A.; Kolbesen, B. O.; Steffens, G. C.; Harrenga, A.; Michel, H.; Ludwig, B., *Mutations in the Ca²⁺ binding site of the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase*, *FEBS Lett*, **1999**, *456*, 365.
- (27) Buse, G.; Soulimane, T.; Dewor, M.; Meyer, H. E.; Bluggel, M., *Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase*, *Protein, Sci* **1999**, *8*, 985.
- (28) Pinakoulaki, E.; Pfitzner, U.; Ludwig, B.; Varotsis, C., *Enzyme catalysis and regulation*, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 13563.
- (29) Riistama, S.; Puustinen, A.; Garcia-Horsman, A.; Iwata, S.; Michel, H.; Wikstrom, M., *Structure and properties of the catalytic site from resonance Raman scattering Nitric-oxide reductase*, *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1275*, 1.
- (30) Bratton, M. R.; Pressler, M. A.; Hosler, J. P., *Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site* *Biochemistry* **1999**, *38*, 16236.
- (31) Mills, D. A.; Hosler, J. P., *An arginine to lysine mutation in the vicinity of the heme propionates affects the redox potentials of the hemes and associated electron and proton transfer in cytochrome c oxidase*, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4656.
- (32) Witt, H.; Ludwig, B., *Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans*, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 5514.
- (33) Moser, C. C.; Page, C. C.; Dutton, P. L., *Darwin at the molecular scale: selection and variance in electron tunnelling proteins including cytochrome c oxidase*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2006**, *361*, 1295.
- (34) Voet, V., *Pratt Fundamentals of Biochemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999.
- (35) Hellwig, P.; Grzybek, S.; Behr, J.; Ludwig, B.; Michel, H.; Mantele, W., *Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a3 redox reactions in the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: separation of heme a and a3 contributions and assignment of vibrational modes*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1685.
- (36) Chepuri, V.; Lemieux, L.; Hill, J.; Alben, J. O.; Gennis, R. B., *Recent studies of the cytochrome o terminal oxidase complex of Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta* **1990**, *1018*, 124.
- (37) Fetter, J. R.; Qian, J.; Shapleigh, J.; Thomas, J. W.; Garcia-Horsman, A.; Schmidt, E.; Hosler, J.; Babcock, G. T.; Gennis, R. B.; Ferguson-Miller, S.,

- Possible proton relay pathways in cytochrome c oxidase, Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 1604.
- (38) Adelroth, P.; Ek, M. S.; Mitchell, D. M.; Gennis, R. B.; Brzezinski, P., *Glutamate 286 in cytochrome aa3 from Rhodobacter sphaeroides is involved in proton uptake during the reaction of the fully-reduced enzyme with dioxygen, Biochemistry* **1997**, 36, 13824.
- (39) Pfitzner, U.; Hoffmeier, K.; Harrenga, A.; Kannt, A.; Michel, H.; Bamberg, E.; Richter, O. M.; Ludwig, B., *Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans, Biochemistry* **2000**, 39, 6756.
- (40) Adelroth, P.; Gennis, R. B.; Brzezinski, P., *Role of the pathway through K(I-362) in proton transfer in cytochrome c oxidase from R. sphaeroides, Biochemistry* **1998**, 37, 2470.
- (41) Branden, M.; Sigurdson, H.; Namslauer, A.; Gennis, R. B.; Adelroth, P.; Brzezinski, P., *On the role of the K-proton transfer pathway in cytochrome c oxidase, Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 5013.
- (42) Pfitzner, U.; Odenwald, A.; Ostermann, T.; Weingard, L.; Ludwig, B.; Richter, O. M., *Cytochrome c oxidase (heme aa3) from Paracoccus denitrificans: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, J Bioenerg Biomembr* **1998**, 30, 89.
- (43) Olkhova, E.; Helms, V.; Michel, H., *Titration behavior of residues at the entrance of the D-pathway of cytochrome c oxidase from paracoccus denitrificans investigated by continuum electrostatic calculations, Biophys J* **2005**, 89, 2324.
- (44) Hellwig, P.; Behr, J.; Ostermeier, C.; Richter, O. M.; Pfitzner, U.; Odenwald, A.; Ludwig, B.; Michel, H.; Mantele, W., *Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans investigated by FTIR spectroscopy, Biochemistry* **1998**, 37, 7390.
- (45) Qin, L.; Hiser, C.; Mulichak, A.; Garavito, R. M.; Ferguson-Miller, S., *Identification of conserved lipid/detergent-binding sites in a high-resolution structure of the membrane protein cytochrome c oxidase, Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 16117.
- (46) Karpefors, M.; Adelroth, P.; Brzezinski, P., *Localized control of proton transfer through the D-pathway in cytochrome c oxidase: application of the proton-inventory technique, Biochemistry* **2000**, 39, 5045.
- (47) Wikstrom, M.; Verkhovsky, M. I., *Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases, Biochim Biophys Acta* **2007**, 1767, 1200.
- (48) Gorbikova E. A., B. N. P., Wikström M., Verkhovsky M. I., *Protolytic reactions on reduction of cytochrome c oxidase studied by ATR-FTIR spectroscopy, Biochemistry* **2007**, 46, 4177.
- (49) Namslauer, A.; Aagaard, A.; Katsonouri, A.; Brzezinski, P., *Intramolecular proton-transfer reactions in a membrane-bound proton pump: the effect of pH on the peroxy to ferryl transition in cytochrome c oxidase, Biochemistry* **2003**, 42, 1488.
- (50) Tuukkanen, A., Kaila V., R., I., Laakkonen, L., Hummer, G., Wikström, M., *Dynamics of the glutamic acid 242 side chain in cytochrome c oxidase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, 1767, 1102.
- (51) Branden, G.; Pawate, A. S.; Gennis, R. B.; Brzezinski, P., *Controlled uncoupling and recoupling of proton pumping in cytochrome c oxidase, Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 317.

- (52) Han, D., Morgan, J. E., Gennis, R. B., G204D, *a mutation that blocks the proton-conducting D-channel of the aa(3)-type cytochrome c oxidase from Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12767.
- (53) Ribacka, C.; Verkhovsky, M. I.; Belevich, I.; Bloch, D. A.; Puustinen, A.; Wikstrom, M., *An elementary reaction step of the proton pump is revealed by mutation of tryptophan-164 to phenylalanine in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* **2005**, *44*, 16502.
- (54) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S., *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*, *Science* **1996**, *272*, 1136.
- (55) Gennis, R. B., *Cytochrome c oxidase: one enzyme, two mechanisms?* *Science* **1998**, *280*, 1712.
- (56) Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Tsukihara, T., *Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution*, *J Bioenerg Biomembr* **1998**, *30*, 7.
- (57) Hill, B. C.; Greenwood, C., *Low-spin ferric forms of cytochrome a₃ in mixed-ligand and partially reduced cyanide-bound derivatives of cytochrome c oxidase*, *Biochem J* **1983**, *215*, 659.
- (58) Verkhovsky, M. I.; Morgan, J. E.; Puustinen, A.; Wikstrom, M., *The "ferrous-oxy" intermediate in the reaction of dioxygen with fully reduced cytochromes aa₃ and bo₃*, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16241.
- (59) Gibson, Q. H., Greenwood, C., *Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide*, *Biochem.* **1963**, *86*, 541.
- (60) Verkhovsky, M. I.; Morgan, J. E.; Wikstrom, M., *Oxygen binding and activation: early steps in the reaction of oxygen with cytochrome c oxidase*, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3079.
- (61) Proshlyakov, D. A.; Pressler, M. A.; Babcock, G. T., *Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome c oxidase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 8020.
- (62) Han, S.; Takahashi, S.; Rousseau, D. L., *Time dependence of the catalytic intermediates in cytochrome c oxidase*, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 1910.
- (63) Wikstrom, M., *Mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase: a new four-stroke histidine cycle*, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1458*, 188.
- (64) Branden, G.; Gennis, R. B.; Brzezinski, P., *Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1757*, 1052.
- (65) Moody, A. J.; Brandt, U.; Rich, P. R., *Single electron reduction of 'slow' and 'fast' cytochrome-c oxidase*, *FEBS Lett* **1991**, *293*, 101.
- (66) Chance, B.; Saronio, C.; Leigh, J. S. Jr., *Functional intermediates in reaction of cytochrome oxidase with oxygen*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72*, 1635.
- (67) Han, S.; Ching, Y. C.; Rousseau, D. L., *Primary intermediate in the reaction of mixed-valence cytochrome c oxidase with oxygen*, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1380.
- (68) Rich, P. R.; Rigby, S. E.; Heathcote, P., *Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1554*, 137.
- (69) Proshlyakov, D. A., *UV optical absorption by protein radicals in cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1655*, 282.
- (70) Morgan, J. E.; Verkhovsky, M. I.; Palmer, G.; Wikstrom, M., *Role of the PR intermediate in the reaction of cytochrome c oxidase with O₂*, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6882.

- (71) Han, S. H.; Ching, Y. C.; Rousseau, D. L., *Metastable intermediates in myoglobin at low pH*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 8408.
- (72) Einarsdottir, O.; Szundi, I.; Van Eps, N.; Sucheta, A., *P(M) and P(R) forms of cytochrome c oxidase have different spectral properties*, *J Inorg Biochem* **2002**, *91*, 87.
- (73) Himo, F.; Siegbahn, P. E., *Quantum chemical studies of radical-containing enzymes*, *Chem Rev* **2003**, *103*, 2421.
- (74) Yoshioka, Y.; Satoh, H.; Mitani, M., *Theoretical study on electronic structures of FeOO, FeOOH, FeO(H₂O), and FeO in hemes: as intermediate models of dioxygen reduction in cytochrome c oxidase*, *J Inorg Biochem* **2007**, *101*, 1410.
- (75) Ogura, T.; Kitagawa, T., *Resonance Raman characterization of the P intermediate in the reaction of bovine cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1655*, 290.
- (76) Blomberg, L. M.; Blomberg, M. R.; Siegbahn, P. E., *A theoretical study on the binding of O(2), NO and CO to heme proteins*, *J Inorg Biochem* **2005**, *99*, 949.
- (77) Morgan, J. E.; Verkhovsky, M. I.; Wikstrom, M., *Observation and assignment of peroxy and ferryl intermediates in the reduction of dioxygen to water by cytochrome c oxidase*, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12235.
- (78) Varotsis, C.; Babcock, G. T., *Appearance of the $\nu(\text{FeIV} = \text{O})$ vibration from a ferryl-oxo intermediate in the cytochrome oxidase/dioxygen reaction*, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7357.
- (79) Wikstrom, M.; Verkhovsky, M. I., *Proton translocation by cytochrome c oxidase in different phases of the catalytic cycle*, *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1555*, 128.
- (80) Wikstrom, M.; Morgan, J. E., *The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction*, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 10266.
- (81) Chance, B.; Saronio, C.; Leigh, J. S., Jr., *Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen*, *J Biol Chem* **1975**, *250*, 9226.
- (82) Bickar, D.; Bonventura, J.; Bonventura, C., *Cytochrome c oxydase Binding of Hidrogen Peroxide*, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2661.
- (83) Weng, L. C.; Baker, G. M., *Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase*, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5727.
- (84) Junemann, S.; Heathcote, P.; Rich, P. R., *The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1456*, 56.
- (85) Brittain, T.; Little, R. H.; Greenwood, C.; Watmough, N. J., *The reaction of Escherichia coli cytochrome bo with H₂O₂: evidence for the formation of an oxyferryl species by two distinct routes*, *FEBS Lett* **1996**, *399*, 21.
- (86) Vygodina, T. V.; Konstantinov, A. A., *H₂O₂-induced conversion of cytochrome c oxidase peroxy complex to oxoferryl state*, *Ann N Y Acad Sci* **1988**, *550*, 124.
- (87) MacMillan, F.; Kannt, A.; Behr, J.; Prisner, T.; Michel, H., *Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179.
- (88) Budiman, K.; Kannt, A.; Lyubenova, S.; Richter, O. M.; Ludwig, B.; Michel, H.; MacMillan, F., *Tyrosine 167: the origin of the radical species observed in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide in Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* **2004**, *43*, 11709.
- (89) Wiertz, F. G.; Richter, O. M.; Cherepanov, A. V.; MacMillan, F.; Ludwig, B.; de Vries, S., *An oxo-ferryl tryptophan radical catalytic intermediate in*

- cytochrome c and quinol oxidases trapped by microsecond freeze-hyperquenching (MHQ)*, *FEBS Lett* **2004**, 575, 127.
- (90) Varotsis, C.; Zhang, Y.; Appelman, E. H.; Babcock, G. T., *Resolution of the reaction sequence during the reduction of O₂ by cytochrome oxidase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 237.
- (91) Han, S.; Ching, Y. C.; Rousseau, D. L., *Ferryl and hydroxy intermediates in the reaction of oxygen with reduced cytochrome c oxidase*, *Nature* **1990**, 348, 89.
- (92) Tweedle, M. F.; Wilson, L. J., *Electronic state of heme in cytochrome oxidase III. The magnetic susceptibility of beef heart cytochrome oxidase and some of its derivatives from 7-200 K. Direct evidence for an antiferromagnetically coupled Fe (III)/Cu (II) pair*, *J Biol Chem* **1978**, 253, 8065.
- (93) Solomon, E. I.; Szilagy, R. K.; DeBeer George, S.; Basumallick, L., *Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins*, *Chem Rev* **2004**, 104, 419.
- (94) Kaim, W., Schwederski, B., *Biological Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life-An Introduction and Guide*, London, 1994.
- (95) Tsukihara, T.; Shimokata, K.; Katayama, Y.; Shimada, H.; Muramoto, K.; Aoyama, H.; Mochizuki, M.; Shinzawa-Itôh, K.; Yamashita, E.; Yao, M.; Ishimura, Y.; Yoshikawa, S., *The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 15304.
- (96) McCauley, K. M.; Vrtis, J.M.; Dupont, J.; Van der Donk, W.A., *Insights into the Functional Role of the tyrosine-Histidine Linkage in cytochrome c oxidase*, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2403.
- (97) Bu, Y.; Cukier, R. I., *Structural character and energetics of tyrosyl radical formation by electron/proton transfers of a covalently linked histidine-tyrosine: a model for cytochrome C oxidase*, *J Phys Chem B* **2005**, 109, 22013.
- (98) Daskalakis, V.; Pinakoulaki, E.; Stavarakis, S.; Varotsis, C., *Probing the environment, of cu(b) in heme-copper oxidases*, *J Phys Chem B* **2007**, 111, 10502.
- (99) Kaila, V. R.; Johansson, M. P.; Sundholm, D.; Laakkonen, L.; Wikstrom, M., *The chemistry of the Cu(B) site in cytochrome c oxidase and the importance of its unique His-Tyr bond*, *Biochim Biophys Acta* **2009**.
- (100) Daskalakis, V.; Farantos, S. C.; Guallar, V.; Varotsis, C., *Vibrational resonances and CuB displacement controlled by proton motion in cytochrome c oxidase*, *J Phys Chem B* **2010**, 114, 1136.
- (101) Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L., *Functional analogues of cytochrome c oxidase, myoglobin, and hemoglobin*, *Chem Rev* **2004**, 104, 561.
- (102) Kim, E.; Chufan, E. E.; Kamaraj, K.; Karlin, K. D., *Synthetic models for heme-copper oxidases*, *Chem Rev* **2004**, 104, 1077.
- (103) Collman, J. P.; Fu, L.; Herrmann, P. C.; Zhang, X., *A functional model related to cytochrome c oxidase and its electrocatalytic four-electron reduction of O₂*, *Science* **1997**, 275, 949.
- (104) Lo, M., *vers des modèles génériques d'hémoprotéines: cas de cytochrome c oxydase*, thèse de Doctorat, université de Strasbourg, 2009, p 162.
- (105) Collman, J. P., *Functional Anamogs of heme Protein Active Sites*, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 5145.
- (106) Collman, J. P. F., L.; Herrmann, P. C.; Wang, Z.; Rapta, M.; Bröring, M.; Schwenninger, R.; Boitrel, B., *A functional model of cytochrome c oxidase: thermodynamic implications*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3397.

- (107) Collman, J. P. S., R. ; Rapta, M. ; Bröring, M. ; Fu, L., *New 1, 4, 7-triazacyclononane-based functional analogs of the Fe/Cu active site of cytochrome c oxidase: structure, spectroscopy and electrocatalytic reduction of oxygen*, *Chem. Commun.* **1999**, 137, 8.
- (108) Collman, J. P.; Sunderland, C. J.; Boulatov, R., *Biomimetic studies of terminal oxidases: trisimidazole picket metalloporphyrins*, *Inorg Chem* **2002**, 41, 2282.
- (109) Boulatov, R.; Collman, J. P.; Shiryayeva, I. M.; Sunderland, C. J., *Functional analogues of the dioxygen reduction site in cytochrome oxidase: mechanistic aspects and possible effects of Cu(B)*, *J Am Chem Soc* **2002**, 124, 11923.
- (110) Collman, J. P.; Sunderland, C. J.; Berg, K. E.; Vance, M. A.; Solomon, E. I., *Spectroscopic evidence for a heme-superoxide/Cu(I) intermediate in a functional model of cytochrome c oxidase*, *J Am. Chem. Soc* **2003**, 125, 22.
- (111) Collman, J. P.; Decreau, R. A.; Sunderland, C. J., *Single-turnover intermolecular reaction between a Fe(III)-superoxide-Cu(I) cytochrome c oxidase model and exogeneous Tyr244 mimics*, *Chem Commun (Camb)* **2006**, 3894.
- (112) Collman, J. P.; Decreau, R. A.; Zhang, C., *Synthesis of cytochrome c oxidase models bearing a Tyr244 mimic*, *J Org Chem* **2004**, 69, 3546.
- (113) Varotsis, C.; Woodruff, W. H.; Babcock, G. T., *Direct detection of a dioxygen adduct of cytochrome a₃ in the mixed valence cytochrome oxidase/dioxygen reaction*, *J Biol Chem* **1990**, 265, 11131.
- (114) Collman, J. P.; Decreau, R. A.; Yan, Y.; Yoon, J.; Solomon, E. I., *Intramolecular single-turnover reaction in a cytochrome C oxidase model bearing a Tyr244 mimic*, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 5794.
- (115) Ricard, D.; L'Her, M.; Richard, P.; Boitrel, B., *Iron porphyrins as models of cytochrome c oxidase*, *Chemistry* **2001**, 7, 3291.
- (116) Ricard, D. A., B. ; L'Her, M. ; Boitrel, B., *Electrocatalytic reduction of dioxygen to water by tren-capped porphyrins functional models of cytochrome c oxidase*, *Chem. Commun.* **1999**, 1523.
- (117) Collman, J. P.; Boulatov, R., *Distal Cu ion protects synthetic heme/Cu analogues of cytochrome oxidase against inhibition by CO and cyanide*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, 41, 3487.
- (118) Decreau, R. A.; Collman, J. P.; Yang, Y.; Yan, Y.; Devaraj, N. K., *Syntheses of hemoprotein models that can be covalently attached onto electrode surfaces by click chemistry*, *J Org Chem* **2007**, 72, 2794.
- (119) Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Decreau, R. A.; Yang, Y.; Yan, Y. L.; Ebina, W.; Eberspacher, T. A.; Chidsey, C. E., *A cytochrome C oxidase model catalyzes oxygen to water reduction under rate-limiting electron flux*, *Science* **2007**, 315, 1565.
- (120) Collman, J. P.; Decreau, R. A.; Lin, H.; Hosseini, A.; Yang, Y.; Dey, A.; Eberspacher, T. A., *O₂ reduction by a functional heme/nonheme bis-iron NOR model complex*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 7320.
- (121) Ghiladi, R. A.; Ju, T.D.; Lee, D.H.; Moenne-Loccoz, P.; Kaderli, S.; Neuhold, Y.M.; Zuberbuhler, A.D.; Woods, A.S.; Cotter, R.J.; Karlin, K.D., *Formation and Characterization of a high spin-copper (Peroxo) complex*, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9885.
- (122) Del Rio, D.; Sarangi, R.; Chufan, E. E.; Karlin, K. D.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I., *Geometric and electronic structure of the heme-peroxo-copper complex [(F8TPP)FeIII-(O₂-)-CuII(TMPA)](ClO₄)*, *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 11969.
- (123) Ghiladi, R. A.; Chufan, E. E.; del Rio, D.; Solomon, E. I.; Krebs, C.; Huynh, B. H.; Huang, H. W.; Moenne-Loccoz, P.; Kaderli, S.; Honecker, M.;

- Zuberbuhler, A. D.; Marzilli, L.; Cotter, R. J.; Karlin, K. D., *Further insights into the spectroscopic properties, electronic structure, and kinetics of formation of the heme-peroxo-copper complex [(F8TPP)FeIII-(O₂(2-)-CuII(TMPA)]⁺*, *Inorg Chem* **2007**, *46*, 3889.
- (124) Kim, E.; Helton, M. E.; Wasser, I. M.; Karlin, K. D.; Lu, S.; Huang, H. W.; Moenne-Loccoz, P.; Incarvito, C. D.; Rheingold, A. L.; Honecker, M.; Kaderli, S.; Zuberbuhler, A. D., *Superoxo, mu-peroxo, and mu-oxo complexes from heme/O₂ and heme-Cu/O₂ reactivity: copper ligand influences in cytochrome c oxidase models*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 3623.
- (125) Chufan, E. E.; Mondal, B.; Gandhi, T.; Kim, E.; Rubie, N. D.; Moenne-Loccoz, P.; Karlin, K. D., *Reactivity studies on Fe(III)-(O₂(2-))-Cu(II) compounds: influence of the ligand architecture and copper ligand denticity*, *Inorg Chem* **2007**, *46*, 6382.
- (126) Kim, E.; Kamaraj, K.; Galliker, B.; Rubie, N. D.; Moenne-Loccoz, P.; Kaderli, S.; Zuberbuhler, A. D.; Karlin, K. D., *Tridentate copper ligand influences on heme-peroxo-copper formation and properties: reduced, superoxo, and mu-peroxo iron/copper complexes*, *Inorg Chem* **2005**, *44*, 1238.
- (127) Halime, Z.; Kieber-Emmons, M. T.; Qayyum, M. F.; Mondal, B.; Gandhi, T.; Puiu, S. C.; Chufan, E. E.; Sarjeant, A. A.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D., *Heme-copper-dioxygen complexes: toward understanding ligand-environmental effects on the coordination geometry, electronic structure, and reactivity*, *Inorg Chem* **2010**, *49*, 3629.
- (128) Ghiladi, R. A.; Huang, H. W.; Moenne-Loccoz, P.; Stasser, J.; Blackburn, N. J.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Incarvito, C. D.; Rheingold, A. L.; Karlin, K. D., *Heme-copper/dioxygen adduct formation relevant to cytochrome c oxidase: spectroscopic characterization of [(6L)FeIII-(O₂(2-))-CuII]⁺*, *J Biol Inorg Chem* **2005**, *10*, 63.
- (129) Kim, E.; Shearer, J.; Lu, S.; Moenne-Loccoz, P.; Helton, M. E.; Kaderli, S.; Zuberbuhler, A. D.; Karlin, K. D., *Heme/Cu:O₂ Reactivity: change in FeIII-(O₂²⁻)-Cu^I Unit Peroxo Binding Geometry effected by tridentate copper chelation*, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 12716.
- (130) Kim, E.; Helton, M. E.; Lu, S.; Moenne-Loccoz, P.; Incarvito, C. D.; Rheingold, A. L.; Kaderli, S.; Zuberbuhler, A. D.; Karlin, K. D., *Tridentate copper ligand influences on heme-peroxo-copper formation and properties: reduced, superoxo, and mu-peroxo iron/copper complexes*, *Inorg Chem* **2005**, *44*, 7014.
- (131) Zhang, C. X.; Liang, H. C.; Kim, E. I.; Shearer, J.; Helton, M. E.; Kim, E.; Kaderli, S.; Incarvito, C. D.; Zuberbuhler, A. D.; Rheingold, A. L.; Karlin, K. D., *Tuning copper-dioxygen reactivity and exogenous substrate oxidations via alterations in ligand electronics*, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 634.
- (132) Sasaki, T.; Nakamura, N.; Naruta, Y. *Chem. Lett.* **1998**, 351.
- (133) Chishiro, T.; Shimazaki, Y.; Tani, F.; Tachi, Y.; Naruta, Y.; Karasawa, S.; Hayami, S.; Maeda, Y., *Isolation and crystal structure of a peroxo-bridged heme-copper complex*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 2788.
- (134) Kopf, M. A.; Karlin, K. D., *Dioxygen Reactivity of Reduced Heme and Heme-Copper Complexes Utilizing Tetraarylporphyrinates Tethered with Both a Pyridyl Axial Ligand and N,N-Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]amine Chelate*, *Inorg Chem* **1999**, *38*, 4922.
- (135) Liu, J. G.; Naruta, Y.; Tani, F., *A functional model of the cytochrome c oxidase active site: unique conversion of a heme-mu-peroxo-Cu(II) intermediate into heme-superoxo/Cu(I)*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 1836.

- (136) Blomberg, M. R.; Siegbahn, P. E., *Reduction of nitric oxide in bacterial nitric oxide reductase--a theoretical model study*, *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1757, 969.
- (137) Ricard, D. A. B. L. H., M.; Boitrel, B., *Electrocatalytic reduction of dioxygen to water by tren capped-porphyrins, functional models of cytochrome c oxidase*, *Chem. Commun.* **1999**, 1523.
- (138) Lo, M., Mahajan, D., Wytko, J.A., Boudon, C., Weiss, J., *Toward Generic Models of Hemoproteins*, *Org Lett* **2009**, 12, 2487.
- (139) Kadish, K. M., Smith, K.M., Guillard, R. *Porphyrin Handbook*, **2000**.
- (140) Guenet, A., *Un portail moléculaire basé sur une porphyrine à anse: synthèse, étude et premiers pas vers le développement de machines moléculaires*, université Louis Pasteur Strasbourg, **2007**.
- (141) Song, X. Z.; Jentzen, W.; Jaquinod, L.; Khoury, R. G.; Medforth, C. J.; Jia, S. L.; Ma, J. G.; Smith, K. M.; Shelnutt, J. A., *Substituent-Induced Perturbation Symmetries and Distortions of meso-tert-Butylporphyrins*, *Inorg Chem* **1998**, 37, 2117.
- (142) Goff, H.; La Mar, G. N.; Reed, C. A., *High-spin ferrous porphyrin complexes as models for deoxymyoglobin and -hemoglobin. A proton nuclear magnetic resonance study*, *J Am Chem Soc* **1977**, 99, 3641.
- (143) Mispelter, J.; Momenteau, M.; Lhoste, J. M., Proton magnetic resonance characterization of the intermediate (S=1) spin state of ferrous intermediate, *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 1003.
- (144) Gouterman, M. *J. M. Spectrosc.* **1961**, 6, 138.
- (145) Gouterman, M. *J. J. M. Spectrosc.* **1961**, 6, 131.
- (146) Keilin, D. *ON Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants*. Proceedings of the Royal Society of London, 1925; Vol. 98.
- (147) Demchenko, A. P., *Visualization and sensing of intermolecular interactions with two-color fluorescent probes*, *FEBS Lett* **2006**, 580, 2951.
- (148) Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim (Germany), 2006.
- (149) Gustafsson., MMA. T., 2006.
- (150) Royer, C. A. *Fluorescence spectroscopy. In: Protein Stability and Folding: Theory and Practice*, 1995.
- (151) Valeur, B., *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim (Germany) , 2002.
- (152) Cantor, C. R. a. P. R. S., *Techniques for study of biological structure and function*; W. H. Freeman and Company: San Francisco, 1980.
- (153) Szabo, A. G. a. D. M. R. *American Chemical Society* **1980**, 102, 554.
- (154) Callis, P. R., *Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using QM-MM simulations. Quenching by charge transfer to the peptide backbone*, *Chemical Physics Letters* **2003**, 369, 409.
- (155) Beechem, J. M.; Brand, L. *Annu Rev Biochem* **1985**, 54, 43.
- (156) Eftink, M. R., Fluorescence techniques for studying protein structure, *Methods Biochem Anal* **1991**, 35, 127.
- (157) Konev, S. V., *Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids*; S. Udenfriend Plenum Press: New York, 1967.
- (158) Ross, J. B. A., Rousslang, K.W. , Brand, L., *Time-resolved fluorescence and anisotropy decay of the tryptophan in adrenocorticotropin-(1-24)*, *Biochemistry* **1981**, 20, 4361.

- (159) Giroud, C., *Etude du mécanisme des NO Synthases: importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème*, thèse de Doctorat, Université Paris Descartes, 2008, p 296.
- (160) Goormaghtigh, E.; Raussens, V.; Ruyschaert, J. M., *Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes*, *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1422, 105.
- (161) Sevenou, O.; Hill, S. E.; Farhat, I. A.; Mitchell, J. R., *Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy*, *Int J Biol Macromol* **2002**, 31, 79.
- (162) Gerwert, K., *Molecular reaction mechanisms of proteins monitored by time-resolved FTIR-spectroscopy*, *Biol Chem* **1999**, 380, 931.
- (163) Siebert, F., *Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems*, *Methods Enzymol* **1995**, 246, 501.
- (164) Rothschild, K. J., *FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model*, *J Bioenerg Biomembr* **1992**, 24, 147.
- (165) Zscherp, C. Barth, A., *Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms*, *Biochemistry* **2000**, 40, 1876.
- (166) Hamm, P.; Zurek, M.; Mantele, W.; Meyer, M.; Scheer, H.; Zinth, W., *Femtosecond infrared spectroscopy of reaction centers from Rhodobacter sphaeroides between 1000 and 1800 cm⁻¹*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 1826.
- (167) White, A. J.; Drabble, K.; Wharton, C. W., *A stopped-flow apparatus for infrared spectroscopy of aqueous solutions*, *J Biochem* **1995**, 306 (Pt 3), 843.
- (168) Moss, D.; Nabedryk, E.; Breton, J.; Mantele, W., *Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c*, *Eur J Biochem* **1990**, 187, 565.
- (169) Hienerwadel, R.; Grzybek, S.; Fogel, C.; Kreutz, W.; Okamura, M. Y.; Paddock, M. L.; Breton, J.; Nabedryk, E.; Mantele, W., *Protonation of Glu L212 following QB- formation in the photosynthetic reaction center of Rhodobacter sphaeroides: evidence from time-resolved infrared spectroscopy*, *Biochemistry* **1995**, 34, 2832.
- (170) Iwaki, M.; Puustinen, A.; Wikstrom, M.; Rich, P. R., *Redox-induced transitions in bovine cytochrome bc₁ complex studied by perfusion-induced ATR-FTIR spectroscopy*, *Biochemistry* **2003**, 42, 8809.
- (171) Nyquist, R. M.; Heitbrink, D.; Bolwien, C.; Wells, T. A.; Gennis, R. B.; Heberle, J., *Perfusion-induced redox differences in cytochrome c oxidase: ATR/FT-IR spectroscopy*, *FEBS Lett* **2001**, 505, 63.
- (172) Marshall, D.; Fisher, N.; Grigic, L.; Zickermann, V.; Brandt, U.; Shannon, R. J.; Hirst, J.; Lawrence, R.; Rich, P. R., *ATR-FTIR redox difference spectroscopy of Yarrowia lipolytica and bovine complex I*, *Biochemistry* **2006**, 45, 5458.
- (173) Bandekar, J., *Amide modes and protein conformation*, *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1120, 123.
- (174) Jung, C., *Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy*, *J Mol Recognit* **2000**, 13, 325.
- (175) Kong, J.; Yu, S., *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2007**, 39, 549.
- (176) Stuard, B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, Chichester, 1997.
- (177) Spiro, T. G., *Resonance Raman spectroscopy of metalloproteins*, *Methods Enzymol* **1978**, 54, 233.

- (178) Spiro, T. G., *Heme proteins and the development of resonance Raman spectroscopy - A personal account*, *Current Science* **1998**, 74, 304.
- (179) Spiro, T. G.; Burke, J. M., *Protein control of porphyrin conformation. Comparison of resonance Raman spectra of heme proteins with mesoporphyrin IX analogues*, *J Am Chem Soc* **1976**, 98, 5482.
- (180) Spiro, T. G.; Smulevich, G.; Su, C., *Probing protein structure and dynamics with resonance Raman spectroscopy: cytochrome c peroxidase and hemoglobin*, *Biochemistry* **1990**, 29, 4497.
- (181) Schick, G. A.; Bocian, D.F., *Resonance Raman studies of bis(pyridine) adducts of iron(II), ruthenium(II), and osmium(II) octaethylporphyrins. Effects of heavy-metal substitution on porphyrin and axial-ligand vibrational and electronic properties*, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1682.
- (182) Picaud, T.; Le Moigne, C.; Looock, B.; Momenteau, M.; Desbois, A., *Nonplanar distortions of bis-base low-spin iron(II)-porphyrinates: absorption and resonance Raman investigations of cross-trans-linked iron(II)-basket-handle porphyrin complexes*, *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 11616.
- (183) Kitagawa, T.; Sugano, H., *Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene or diethylnitrosamine*, *Gann* **1978**, 69, 679.
- (184) Li, X. Y.; Czermuszewicz, R. S.; Kincaid, J. R.; Su, Y. O.; Spiro, T. G., *Consistent porphyrin force field. I. Normal-mode analysis for nickel porphine and nickel tetraphenylporphine from resonance Raman and infrared spectra and isotope shifts*, *J. Phys.Chem.* **1990**, 94, 31.
- (185) Spiro, T. G., *Resonance Raman spectroscopy as a probe of heme protein structure and dynamics*, *Adv. Protein. Chem.* **1985**, 57, 111.
- (186) Babcock, G. T. *Raman scattering by cytochrome c oxydase and by heme a model compounds*, in: *Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy*; Wiley and Sons: Hoboken, 1998.
- (187) Rush III, T. S., Kozlowski P. M., Piffat, Kumble, R., Zgierski, M. Z., Spiro, T.G., *Computational modeling of metalloporphyrin structure and vibrational spectra: Porphyrin ruffling in NiTPP*, *J.Phys.Chem.* **2000**, 104, 5020.
- (188) Paulat, F.; Praneeth, V. K.; Nather, C.; Lehnert, N., *Quantum chemistry-based analysis of the vibrational spectra of five-coordinate metalloporphyrins [M(TPP)Cl]*, *Inorg Chem* **2006**, 45, 2835.
- (189) Marboutin, L.; Boussac, A.; Berthomieu, C., *Redox infrared markers of the heme and axial ligands in microperoxidase: Bases for the analysis of c-type cytochromes*, *J Biol Inorg Chem* **2006**, 11, 811.
- (190) Marboutin, L.; Desbois, A.; Berthomieu, C., *Low-frequency heme, iron-ligand, and ligand modes of imidazole and imidazolate complexes of iron protoporphyrin and microperoxidase in aqueous solution. An analysis by far-infrared difference spectroscopy*, *J Phys Chem B* **2009**, 113, 4492.
- (191) Dörr, S. S., U., Hellwig, P., *Far infrared spectroscopy on hemoproteins: a model compound study from 1800-100 cm⁻¹*, *Vibrational spectroscopy* **2008**, 47, 59.
- (192) Kerr, E. A.; Yu, N. T.; Gersonde, K.; Parish, D. W.; Smith, K. M., *Iron-histidine stretching vibration in the deoxy state of insect hemoglobins with different O₂ affinities and Bohr effects*, *J Biol Chem* **1985**, 260, 12665.
- (193) Sawai, H.; Makino, M.; Mizutani, Y.; Ohta, T.; Sugimoto, H.; Uno, T.; Kawada, N.; Yoshizato, K.; Kitagawa, T.; Shiro, Y., *Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin*, *Biochemistry* **2005**, 44, 13257.

- (194) Iwaki, M.; Yakovlev, G.; Hirst, J.; Osyczka, A.; Dutton, P. L.; Marshall, D.; Rich, P. R., *Direct observation of redox-linked histidine protonation changes in the iron-sulfur protein of the cytochrome bc1 complex by ATR-FTIR spectroscopy*, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4230.
- (195) Woodruff, W. H.; Einarsdottir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; Atherton, S. J.; Goldbeck, R. A.; Dawes, T. D.; Kliger, D. S., *Nature and functional implications of the cytochrome a3 transients after photodissociation of CO-cytochrome oxidase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 2588.
- (196) Heijden, A. V. D., Peer, H.G., Vandenoo, A.H. *Chemical Society D-Chemical Communications* **1971**, 369.
- (197) Alben, J. O.; Choi, S. S.; Adler, A. D.; Caughey, W. S., *Infrared spectroscopy of porphyrins*, *Ann N Y Acad Sci* **1973**, *206*, 278.
- (198) Kincaid, J.; Nakamoto, K., *Vibrational spectra of transition metal complexes of tetraphenylporphine*, *J. inorg. nucl. Chem* **1975**, *37*, 85.
- (199) Thallaj, N. K.; Rotthaus, O.; Benhamou, L.; Humbert, N.; Elhabiri, M.; Lachkar, M.; Welter, R.; Albrecht-Gary, A. M.; Mandon, D. *Reactivity of molecular dioxygen towards a series of isostructural dichloroiron(III) complexes with tripodal tetraamine ligands: general access to mu-oxodiiron(III) complexes and effect of alpha-fluorination on the reaction kinetics*, *Chemistry* **2008**, *14*, 6742.
- (200) Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T., *Resonance Raman/absorption characterization of the oxo intermediates of cytochrome c oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H2O2 concentration dependence*, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8580.
- (201) Fabian, M.; Palmer, G., *Redox state of peroxy and ferryl intermediates in cytochrome c oxidase catalysis*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6270.
- (202) Pinakoulaki, E.; Pfitzner, U.; Ludwig, B.; Varotsis, C., *Direct detection of Fe(IV)[double bond]O intermediates in the cytochrome aa3 oxidase from Paracoccus denitrificans/H2O2 reaction*, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 18761.
- (203) Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appelman, E. H.; Kitagawa, T., *Selective resonance Raman observation of the "607 nm" form generated in the reaction of oxidized cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide*, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 29385.
- (204) Michel, H., *Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping--a discussion*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15129.
- (205) Brittain, L., Little, R.H., Greenwood, C., Watmough N.J., *The reaction of Escherichia coli cytochrome bo with H2O2: evidence for the formation of an oxyferryl species by two distinct routes*, *FEBS Lett* **1996**, *399*, 21.
- (206) Babcock, G. T.; Wikstrom, M., *Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration*, *Nature* **1992**, *356*, 301.
- (207) MacMillan, F.; Budiman, K.; Angerer, H.; Michel, H., *The role of tryptophan 272 in the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase*, *FEBS Lett* **2006**, *580*, 1345.
- (208) Ehrenberg, A.; Reichard, P., *Electron spin resonance of the Iron-containing protein B2 from Ribonucleotide Reductase*, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3485.
- (209) Periasamy, N.; Doraiswamy, S.; Maiya, G.B. and Venkataraman, B., *Diffusion controlled reactions: Fluorescence quenching of cationic dyes by charged quenchers*, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 1638.
- (210) Das, T. K.; Mazumdar, S., *Time-resolved study of tryptophan fluorescence in vesicle reconstituted cytochrome oxidase. Effect of redox transition*, *FEBS Lett* **1993**, *336*, 211.

- (211) Hill, B. C.; Horowitz, P. M.; Robinson, N. C., *Detection, characterization, and quenching of the intrinsic fluorescence of bovine heart cytochrome c oxidase*, *Biochemistry* **1986**, *25*, 2287.
- (212) Teale, F. W.; Badley, R. A., *Depolarization of the intrinsic and extrinsic fluorescence of pepsinogen and pepsin*, *Biochem J* **1970**, *116*, 341.
- (213) Badley, R. A.; Teale, F. W., *Resonance energy transfer in pepsin conjugates*, *J Mol Biol* **1969**, *44*, 71.
- (214) Weinryb, I.; Steiner, R. F., *Luminescence of the tryptophan and tyrosine residues of papain in solution*, *Biochemistry* **1970**, *9*, 135.
- (215) Longworth, J. W., *Techniques for measuring fluorescence and phosphorescence of biological materials*, *Photochem. Photobiol.* **1968**, *7*, 587.
- (216) Kronman, M. J.; Holmes, L. G.; Robbins, F. M., *Inter- and intramolecular interactions of alpha-lactalbumin X. Effect of acylation of tyrosyl and lysyl side chains on molecular conformations*, *J Biol Chem* **1971**, *246*, 1909.
- (217) Graziani, M. T.; Agro, A. F.; Rotilio, G.; Barra, D.; Mondovi, *Parsley plastocyanin. Possible presence of sulfhydryl and tyrosine in copper environment*, *B. Biochemistry* **1974**, *13*, 804.
- (218) Szabo, A. G.; Lynn, K. R.; Krajcarski, D. T.; Rayner, D. M. *FEBS Lett* **1978**, *94*, 249.
- (219) Lim, B. T.; Kimura, T., *Conformation-associated anomalous tyrosine fluorescence of adrenodoxin*, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 2440.
- (220) Chang, C. J.; Chang, M. C.; Damrauer, N. H.; Nocera, D. G., *Proton-coupled electron transfer: a unifying mechanism for biological charge transport, amino acid radical initiation and propagation, and bond making/breaking reactions of water and oxygen*, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1655*, 13.
- (221) Abdessamad, A., *Contribution à l'étude des protéines par fluorescence temporelle: étude de l'hétérogénéité des déclin de fluorescence des protéines à un seul résidu tryptophane*, thèse de doctorat, Université de Strasbourg 1, 1998, 238.
- (222) Szabo, A. G.; Rayner, D. M., *Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution*, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 554.
- (223) Petrich, J. W.; Chang, M.C; McDonal, D. B.; Fleming, G. R., *on the origin of nonexponential fluorescence decay in tryptophan and its derivatives*, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3824.
- (224) Hellwig, P.; Rost, B.; Kaiser, U.; Ostermeier, C.; Michel, H.; Mantele, W., *Carboxyl group protonation upon reduction of the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy*, *FEBS Lett* **1996**, *385*, 53.
- (225) Park, S.; Pan, L. P.; Chan, S. I.; Alben, J. O., *Photoperturbation of the heme a₃-CuB binuclear center of cytochrome c oxidase CO complex observed by Fourier transform infrared spectroscopy*, *Biophys J* **1996**, *71*, 1036.
- (226) Hellwig, P.; Rost, B.; Mantele, W., *Redox dependent conformational changes in the mixed valence form of the cytochrome c oxidase from P. denitrificans. The reorganization of glutamic acid 278 is coupled to the electron transfer from/to heme a and the binuclear center*, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2001**, *57A*, 1123.
- (227) Rost, B.; Behr, J.; Hellwig, P.; Richter, O. M.; Ludwig, B.; Michel, H.; Mantele, W., *Time-resolved FT-IR studies on the CO adduct of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: comparison of the fully reduced and the mixed valence form*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7565.

- (228) Hellwig, P.; Bohm, A.; Pfitzner, U.; Mantele, W.; Ludwig, B., *Spectroscopic study on the communication between a heme a₃ propionate, Asp399 and the binuclear center of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*, *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1777, 220.
- (229) Alben, J. O.; Moh, P. P.; Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A., *Cytochrome oxidase (a₃) heme and copper observed by low-temperature Fourier transform infrared spectroscopy of the CO complex*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78, 234.
- (230) Einarsdottir, O.; Dyer, R. B.; Lemon, D. D.; Killough, P. M.; Hubig, S. M.; Atherton, S. J.; Lopez-Garriga, J. J.; Palmer, G.; Woodruff, W. H., *Photodissociation and recombination of carbonmonoxy cytochrome oxidase: dynamics from picoseconds to kiloseconds*, *Biochemistry* **1993**, 32, 12013.
- (231) Nyquist, R. M.; Heitbrink, D.; Bolwien, C.; Gennis, R. B.; Heberle, J., *Direct observation of protonation reactions during the catalytic cycle of cytochrome c oxidase*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 8715.
- (232) Iwaki, M.; Puustinen, A.; Wikstrom, M.; Rich, P. R., *ATR-FTIR spectroscopy studies of iron-sulfur protein and cytochrome c₁ in the Rhodobacter capsulatus cytochrome b₆c₁ complex*, *Biochemistry* **2004**, 43, 14370.
- (233) Iwaki, M.; Puustinen, A.; Wikstrom, M.; Rich, P. R., *Structural and chemical changes of the P(M) intermediate of paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase revealed by IR spectroscopy with labeled tyrosines and histidine*, *Biochemistry* **2006**, 45, 10873.
- (234) Hellwig, P.; Ostermeier, C.; Michel, H.; Ludwig, B.; Mantele, W., *Electrochemically induced FT-IR difference spectra of the two- and four-subunit cytochrome c oxidase from P. denitrificans reveal identical conformational changes upon redox transitions*, *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1409, 107.
- (235) Behr, J.; Hellwig, P.; Mantele, W.; Michel, H., *Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ¹³C labeling*, *Biochemistry* **1998**, 37, 7400.
- (236) Berthomieu, C.; Boussac, A.; Mantele, W.; Breton, J.; Navedryk, E., *Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b₅₅₉ characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b₅₅₉ and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds*, *Biochemistry* **1992**, 31, 11460.
- (237) Rich, P. R.; Breton, J., *Attenuated total reflection Fourier transform infrared studies of redox changes in bovine cytochrome c oxidase: resolution of the redox Fourier transform infrared difference spectrum of heme a(3)*, *Biochemistry* **2002**, 41, 967.
- (238) Argade, P. V.; Ching, Y. C.; Rousseau, D. L., *Resonance Raman spectral isolation of the a and a₃ chromophores in cytochrome oxidase*, *Biophys J* **1986**, 50, 613.
- (239) McMahan, B. H.; Fabian, M.; Tomson, F.; Causgrove, T. P.; Bailey, J. A.; Rein, F. N.; Dyer, R. B.; Palmer, G.; Gennis, R. B.; Woodruff, W. H., *FTIR studies of internal proton transfer reactions linked to inter-heme electron transfer in bovine cytochrome c oxidase*, *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1655, 321.
- (240) Hellwig, P.; Soulimane, T.; Buse, G.; Mantele, W., *Similarities and dissimilarities in the structure-function relation between the cytochrome c*

- oxidase from bovine heart and from Paracoccus denitrificans as revealed by FT-IR difference spectroscopy, FEBS Lett* **1999**, 458, 83.
- (241) Venyaminov, S.; Kalnin, N. N., *Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands, Biopolymers* **1990**, 30, 1243.
- (242) Hienerwadel, R.; Boussac, A.; Breton, J.; Diner, B. A.; Berthomieu, C., *Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling, Biochemistry* **1997**, 36, 14712.
- (243) Hellwig, P.; Pfitzner, U.; Behr, J.; Rost, B.; Pesavento, R. P.; Donk, W. V.; Gennis, R. B.; Michel, H.; Ludwig, B.; Mantele, W., *Identification of the residues involved in stabilization of the semiquinone radical in the high-affinity ubiquinone binding site in cytochrome bo(3) from Escherichia coli by site-directed mutagenesis and EPR spectroscopy, Biochemistry* **2002**, 41, 9116.
- (244) Fabian, M.; Palmer, G., *The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relationship of compounds P and F, Biochemistry* **1995**, 34, 13802.
- (245) Iwaki, M.; Breton, J.; Rich, P. R., *ATR-FTIR difference spectroscopy of the P(M) intermediate of bovine cytochrome c oxidase, Biochim Biophys Acta* **2002**, 1555, 116.
- (246) Brame, E. G., Grasselli, J. *Infrared and Raman Spectroscopy part C* Marcel Dekker, Inc.: New York and Basel, 1971; Vol. 1.
- (247) Goormaghtigh, E.; Cabiaux, V.; Ruyschaert, J. M., *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III Secondary structures, Subcell Biochem* **1994**, 23, 405.
- (248) Maklakov, L. I., *Low-Frequency vibrational spectroscopy of amides and urethanes, Rus Chem Rev* **1997**, 66, 375.
- (249) Uchida, T.; Mogi, T.; Nakamura, H.; Kitagawa, T., *Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha, J Biol Chem* **2004**, 279, 53613.
- (250) Kitagawa, T., Osaki, Y. *Infrared and Raman spectra of metalloporphyrins; Structure and bonding: Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I: Heidelberg, Springer Berlin*, 1987.
- (251) Cornilsen, B. C., Nakamoto, K. *J. Inorg Nucl Chem* **1974**, 36, 2467.
- (252) Pevsner, A., Diem, M., *Infrared spectroscopic studies of major cellular components. Part I: the effect of hydration on the spectra of proteins, Appl. Spectrosc.* **2001**, 55, 788.
- (253) El Khoury, Y.; Hellwig, P., *Mid and Far spectroelectrochemical studies on the metal-ligand interactions in respiratory chain enzymes, J Biol Inorg Chem* **2009**, 14, 23.
- (254) Hodgson, J. B., Gordon, C.P.T.L, Thornton, D.A. *J. Mol Structure* **1980**, 66, 81.
- (255) Zundel, G. *Adv. chem. Phys* **2000**, 111, 1.
- (256) Li, H.; Raman, C. S.; Martasek, P.; Masters, B. S.; Poulos, T. L., *Crystallographic studies on endothelial nitric oxide synthase complexed with nitric oxide and mechanism-based inhibitors, Biochemistry* **2001**, 40, 5399.
- (257) Li, D.; Stuehr, D. J.; Yeh, S. R.; Rousseau, D. L., *Many amino acid substitutions in a hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1alpha-like peptide cause only minor changes in its hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases: substitution of 3,4-dehydroproline or azetidine-2-carboxylic*

- acid for the proline leads to a high rate of uncoupled 2-oxoglutarate decarboxylation, J Biol Chem* **2004**, 279, 26489.
- (258) Takahashi, S.; Yeh, S. R.; Das, T. K.; Chan, C. K.; Gottfried, D. S.; Rousseau, D. L., *Folding of cytochrome c initiated by submillisecond mixing, Nat Struct Biol* **1997**, 4, 44.
- (259) Mitchell, D. M.; Shapleigh, J. P.; Archer, A. M.; Alben, J. O.; Gennis, R. B., *A ligand-exchange mechanism of proton pumping involving tyrosine-422 of subunit I of cytochrome oxidase is ruled out, Biochemistry* **1996**, 35, 9446.
- (260) Spiro, T. G.; Streckas, T. C., *Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state, J Am Chem Soc* **1974**, 96, 338.
- (261) Burke, J. M. K., J. R.; Peters, S.; Gagne, R. R.; Collman, J. P.; Spiro, T. G., *Structure-sensitive resonance Raman bands of tetraphenyl and "picket fence" porphyrin iron complexes, including an oxyhemoglobin analog, J Am Chem Soc* **1978**, 100, 6083.
- (262) Spiro, T. G.; Stong, J. D.; Stein, P., *Porphyrin core expansion and doming in heme proteins. New evidence from resonance Raman spectra of six coordinate high spin iron(III) hemes, J Am Chem Soc* **1979**, 101, 2648.
- (263) Oshio, H. A., T.; Watanabe, T.; Kincaid, J.; Nakamoto, K. *spectrochim. Acta, Part A* **1984**, 40, 863.
- (264) Chottard, G. B., P.; Lange, M.; Mansuy, D., *Resonance Raman spectra of iron tetraphenylporphyrin complexes: characterization of structure and bonding sensitive bands, Inorg Chem* **1981**, 20, 1718.
- (265) Rush, T. S.; Kozlowski, P. M.; Piffat, C. A.; Kumble, R.; Zgierski, M. Z.; Spiro, T. G., *Computational modeling of metalloporphyrin structure and vibrational spectra: Porphyrin ruffling in NiTPP, Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, 5020.
- (266) Ueno, K.; Martell, A.E., *Vanadyl Chelates of Tetraphenylporphine and its para-Substituted Derivatives, J. Phys. Chem.* **1956**, 60, 934.
- (267) Czernuszewicz, L. X. Y.; Kinkaid, J. R.; Su, Y .O; Spiro, T.G., *Consistent porphyrin force field. 1. Normal-mode analysis for nickel porphine and nickel tetraphenylporphine from resonance Raman and infrared spectra and isotope shifts, J. Phys. Chem. B.* **1990**, 94, 31.
- (268) Thomas, D. W.; Maetell, A.E. *Organic and Biological Chemistry* **1958**, 81, 5111.
- (269) Desbois, A., *Resonance Raman spectroscopy of c-type cytochromes, Biochimie* **1994**, 76, 693.
- (270) Kishore Y, S. S. N.; Dwivedi C.P.D. *Indian J. Phys.* **1974**, 48, 412.
- (271) Agnieszka J.; Abkowicz-Bienko, Z. L.; Dariusz C.; Bienko, Danuta Michalska, *Chemical Physics* **1999**, 250, 123.
- (272) Ruzié, C., *Nouvelles porphyrines synthétiques pour la coordination du dioxygène*, thèse de doctorat, Université de Rennes 1, **2005**.
- (273) Cook, G. L.; Cheurch, F. M. **1956**, 61, 458.
- (274) Epstein, L. M.; Straud, D.K.; Maricondi, C., *Moessbauer spectra of some porphyrin complexes with pyridine, piperidine and imidazole, Inorg. Chem.* **1967**, 6, 1720.
- (275) Steffen, W. L.; Chun H.K., Hoard J.L., Reed C.A., 175th Nat. Meeting *American Chemical Society* **1978**.
- (276) Yatsunyk, L. A.; Walker, F. A., *Fe(III)Bis(4-cyanopyridine)complexes of Dodeca-substituted Porphyrins, Inorg. Chem.* **2004**, 43, 757.
- (277) Yatsunyk, L. A. S., N. V. ; Walker, F. A., *Magnetic Resonance Spectroscopic Investigations of the Electronic Ground and Excited states in strongly*

- Nonplanar Iron(III) Dodecasubstituted Porphyrins*, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 2848.
- (278) Collman, J. P.; Sorrell, T. N.; Hoffman, B. M., Letter: *Oxygen binding to iron porphyrins*, *J Am Chem Soc* **1975**, *97*, 913.
- (279) Dörr, S., Schade, U., Hellwig, P., *Far infrared spectroscopy on hemoproteins: a model compound study from 1800-100 cm⁻¹*, *Vibrational spectroscopy* **2008**, *47*, 59.
- (280) Kovacs, A., *J. of Molecular structure* **1999**, 482-483, 397.
- (281) Corrsin, L.; Fax, B.J.; Lord, R.C., *The vibrational spectra of pyridine and pyridine-d₅*, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 1170.
- (282) Wells, A. V.; Li, P.; Champion, P. M.; Martinis, S. A.; Sligar, S. G., *Resonance Raman investigations of Escherichia coli-expressed Pseudomonas putida cytochrome P450 and P420*, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4384.
- (283) Spiro, T. G.; Czernuszewicz, R. S., *Resonance Raman spectroscopy of metalloproteins*, *Methods Enzymol* **1995**, *246*, 416.
- (284) Boucher, L. J.; Katz, J. J., *The infrared spectra of metalloporphyrins (4000-160 cm⁻¹)*, *J Am Chem Soc* **1967**, *89*, 1340.
- (285) Mitchell, M. L.; Li, X. Y.; Kincaid, J. R.; Spiro, T.G., *Axial ligand and out-of-plane vibrations for bis(imidazolyl)heme: Raman and Infrared iron-54, nitrogen-15, and deuterium isotope shifts and normal coordinate calculations*, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 4690.
- (286) Kincaid, J. R., Urban, M.W., Watanabe, T., Nakamoto, K., *Infrared Spectra of Matrix of Isolated Metal Complexes of Octaethylporphine*, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3096.
- (287) Kincaid, J. N.; Nakamoto, K. *J. of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1975**, *37*, 85.
- (288) Collman, J. P.; Gagne, R. R.; Reed, C. A.; Robinson, W. T.; Rodley, G. A., *Structure of an iron(II) dioxygen complex; a model for oxygen carrying heme proteins*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 1326.
- (289) Dorr, S.; Schade, U.; Hellwig, P.; Ortolani, M., *Characterization of temperature-dependent iron-imidazole vibrational modes in far infrared*, *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 14418.
- (290) Dollish, F. R., Fately, W. G., Bentley, F.F. *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds* New York, 1974.
- (291) Hutchinson, B.; Takemoto, J.; Nakamoto, K., *Metal isotope effect on metal-ligand vibrations. II. Tris complexes of 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline*, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3335.
- (292) Saito, Y.; Takemoto, J.; Hutchins, B.; Nakamoto, K., *Infrared studies of coordination compounds containing low-oxidation-state metals. I. Tris (2,2'-bipyridine) and tris (1,10-phenanthroline) complexes*, *Inorganic Chemistry* **1972**, *11*, 2003.
- (293) Ralph A. Zingaro, W. E. T. **1959**, 1353.
- (294) Dörr, S., Schade, U., Hellwig, P., *Far infrared spectroscopy on hemoproteins: a model compound study from 1800-100 cm⁻¹*, *J. Vbrational Spectroscopy* **2008**, *47*, 59.
- (295) Abe, M., Kitagawa, T., Kyogoku, Y., *Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and 15N substituted derivatives. II. A normal cordinate analysis*, *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4526.
- (296) Hasegawa, K.; Ono, T.A.; Noguchi, T., *Ab Initio Density Functional Theory Calculations and Vibrational Analysis of Zinc-Bound 4-Mthylimidazole as a Model of a Histidine Ligand in Metalloenzymes*, *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 3377.

- (297) Spiro, T. G.; Wasbotten, I. H., *CO as a vibrational probe of heme protein active sites*, *J Inorg Biochem* **2005**, 99, 34.
- (298) Mathey, F.; Sevin, A., *Chimie Moléculaire des éléments de transition*, Ecole Polytechnique, **2000**.
- (299) Hunter, C. A.; Sandres, J.K.M., *the Nature of π - π interactions*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525.
- (300) Jung, C.; Hoa, G. H.; Schroder, K. L.; Simon, M.; Doucet, J. P., *Substrate analogue induced changes of the CO-stretching mode in the cytochrome P450cam-carbon monoxide complex*, *Biochemistry* **1992**, 31, 12855.
- (301) Jung, C.; Schulze, H.; Deprez, E., *Role of the polarity of the heme environment for the CO stretch modes in cytochrome P-450cam-CO*, *Biochemistry* **1996**, 35, 15088.
- (302) Li, X. Y.; Spiro, T. G., *Is bound carbonyl linear or bent in heme proteins? Evidence from resonance Raman and infrared spectroscopic data*, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6024.
- (303) Spiro, T.G.; Kerr, E. A., Yu, N.T., *Biological Applications of Raman Spectroscopy* Ed. New York, **1988**; Vol. 3.
- (304) Li, X. Y.; Spiro; T. G., *Is bound carbonyl linear or bent in heme proteins? Evidence from resonance Raman and infrared spectroscopic data* *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6024.
- (305) Wang J., S. D. J.; Ikeda-Saito M. and Rousseau D. L., *Heme coordination and structure of the catalytic site in nitric oxide synthase*, *The Journal of biological chemistry* **1993**, 30, 22255.
- (306) Fan, B., W. J.; Stuehr D. J. and Rousseau D. L., *NO synthase isozymes have distinct substrate binding sites*, *Biochemistry* (**1997**), 42, 12660.
- (307) Das, T. K.; Tomson, F. L.; Gennis, R. B.; Gordon, M.; Rousseau, D. L., *pH-dependent structural changes at the Heme-Copper binuclear center of cytochrome c oxidase*, *Biophys J* **2001**, 80, 2039.
- (308) Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Varotsis, C., *Structure and properties of the catalytic site from resonance Raman scatterin Nitric-oxide reductase g*, *J Biol Chem* **2002**, 277, 32867.
- (309) Das, T. K.; Pecoraro, C.; Tomson, F. L.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L., *The post-translational modification in cytochrome c oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site*, *Biochemistry* **1998**, 37, 14471.
- (310) Kerr, E. A.; Yu, N. T.; Bartnicki, D. E.; Mizukami, H., *Resonance Raman studies of CO and O₂ binding to elephant myoglobin (distal His(E7)----Gln)*, *J Biol Chem* **1985**, 260, 8360.
- (311) Peng, S. M., Ibers, J. A., *Stereochemistry of carbonylmetalloporphyrins. The structure of (pyridine) (carbonyl) (5,10, 15, 20-tetraphenylporphinato) iron(II)*, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 8032.
- (312) Krim, L.; Sorgues, S.; Soep, B.; Shafizadeh, N., *Infrared spectra of RuTPP, RuCOTPP, and Ru(CO)2TPP isolated in solid argon*, *J Phys Chem A* **2005**, 109, 8268.
- (313) Xuan, X., Wang, J., Wang, H. *Electrochimica Acta* **2005**, 50, 4196.
- (314) Ghosh, A.; Bocian, D.F., *Carbonyl Tilting and Bending Potential Energy Surface of carbon Monoxyhemes*, *J.Phys.Chem.* **1996**, 100, 6363.
- (315) Eddy, C. R., Eisner, A., *Anal. Chem* **1954**, 26, 1428.
- (316) Wayland, B. B.; Mhene, L.F.; Schwartz, J., *Mono- and biscarbonyl complexes of iron(II) tetraphenylporphyrin*, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100(8), 2379.

- (317) Kim, K.; Ibers, J. A., Structure of a carbon monoxide adduct of a "capped" porphyrin: Fe(C2-Cap)(CO)(1-methylimidazole), *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6077.
- (318) Michel, H.; Behr, J.; Harrenga, A.; Kannt, A., *Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy*, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1998**, *27*, 329.
- (319) Babcock, G. T., *How oxygen is activated and reduced in respiration*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 12971.
- (320) Kitagawa, T., *Structures of reaction intermediates of bovine cytochrome c oxidase probed by time-resolved vibrational spectroscopy*, *J Inorg Biochem* **2000**, *82*, 9.
- (321) Heitbrink, D.; Sigurdson, H.; Bolwien, C.; Brzezinski, P.; Heberle, J., *Transient binding of CO to Cu(B) in cytochrome c oxidase is dynamically linked to structural changes around a carboxyl group: a time-resolved step-scan Fourier transform infrared investigation*, *Biophys J* **2002**, *82*, 1.
- (322) Kretzer, R. M.; Ghiladi, R. A.; Lebeau, E. L.; Liang, H. C.; Karlin, K. D., *Synthesis and characterization of reduced heme and heme/copper carbonmonoxy species*, *Inorg Chem* **2003**, *42*, 3016.
- (323) Hathaway, B. J. *Comprehensive Coordination Chemistry*; Wilkinson, G.: New York, 1987; Vol. 5.
- (324) Blackmore, R. S.; Greenwood, C.; Gibson, Q. H., *Studies of the primary oxygen intermediate in the reaction of fully reduced cytochrome oxidase*, *J Biol Chem* **1991**, *266*, 19245.
- (325) Oliveberg, M.; Malmstrom, B. G., *Reaction of dioxygen with cytochrome c oxidase reduced to different degrees: indications of a transient dioxygen complex with copper-B*, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3560.
- (326) Gennis, R. B., *How does cytochrome oxidase pump protons?* *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 12747.
- (327) Michel, H., *The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase* *127e comments*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 12819.
- (328) Watanabe, T., Ama, T., Nakamoto, K. *J. Chem. Phys.* **1984**, *88*, 440.
- (329) Collman, J. P., Herrmann, P.C., Boitrel, B., Zhang, X., Eberspacher, T.A., Fu, L., Wang, J., Rousseau, D.L., Williams, E.R., *Congruent multiple Michael addition for the synthesis of biomimetic heme analogs*, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9783.
- (330) Ghiladi, R. A.; Kretzer, R. M.; Guzei, I.; Rheingold, A. L.; Neuhold, Y. M.; Hatwell, K. R.; Zuberbuhler, A. D.; Karlin, K. D., *(F(8)TPP)Fe(II)/O(2) reactivity studies [F(8)TPP = tetrakis(2,6-difluorophenyl)porphyrinate(2-)]: spectroscopic (UV-Visible and NMR) and kinetic study of solvent-dependent (Fe/O(2) = 1:1 or 2:1) reversible O(2)-reduction and ferryl formation*, *Inorg Chem* **2001**, *40*, 5754.
- (331) Watanabe, T. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **1984**, *88*, 298.
- (332) Tani, F.; Matsu-ura, M.; Ariyama, K.; Setoyama, T.; Shimada, T.; Kobayashi, S.; Hayashi, T.; Matsuo, T.; Hisaeda, Y.; Naruta, Y., *Iron twin-coronet porphyrins as models of myoglobin and hemoglobin: amphibious electrostatic effects of overhanging hydroxyl groups for successful CO/O₂ discrimination*, *Chemistry* **2003**, *9*, 862.
- (333) Lopez-Garriga, J. J.; Oertling, W. A.; Kean, R. T.; Hoogland, H.; Wever, R.; Babcock, G. T., *Metal-ligand vibrations of cyanoferric myeloperoxidase and cyanoferric horseradish peroxidase: evidence for a constrained heme pocket in myeloperoxidase*, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9387.

- (334) Desbois, A.; Tegoni, M.; Gervais, M.; Lutz, M., *Flavin and heme structures in lactate:cytochrome c oxidoreductase: a resonance Raman study*, *Biochemistry* **1989**, 28, 8011.
- (335) Yamamoto, T., Palmer, G., Gill, D., Salmeen, I.T., Rimai, L. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 5211.
- (336) Weiss, J. *Nature (London)* **1964**, 203, 83.
- (337) Belevich, I., *Proton translocation coupled electron transfert reactions in terminal oxidases*, thesis, University of Helsinki, **2007**.

Annexes

Annexe 1: Structure chimique des hèmes les plus fréquemment rencontrés

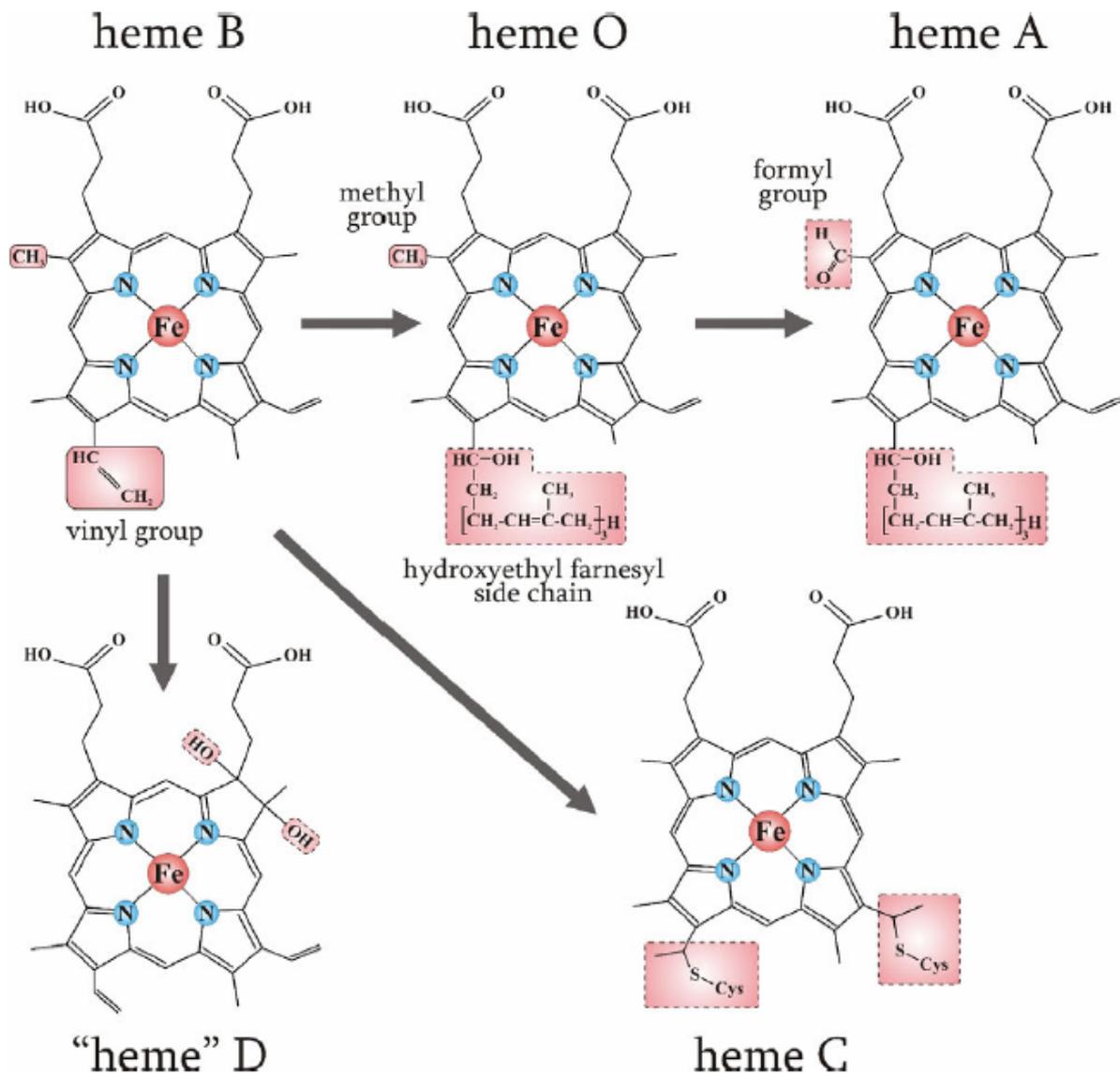


Figure 1.1: Structures chimiques des hèmes B, O, A, D (dans cet hème, une double liaison du cycle pyrrolique est réduite, il est donc une choline que plutôt un réel hème) et C (la structure de l'hème C est similaire de celle de l'hème B à l'exception de l'existence d'une bande liée de manière covalente au polypeptide par l'intermédiaire de ponts thioether).³³⁷

Annexe 2: Modèles du mécanisme catalytique

2.1 Modèle classique

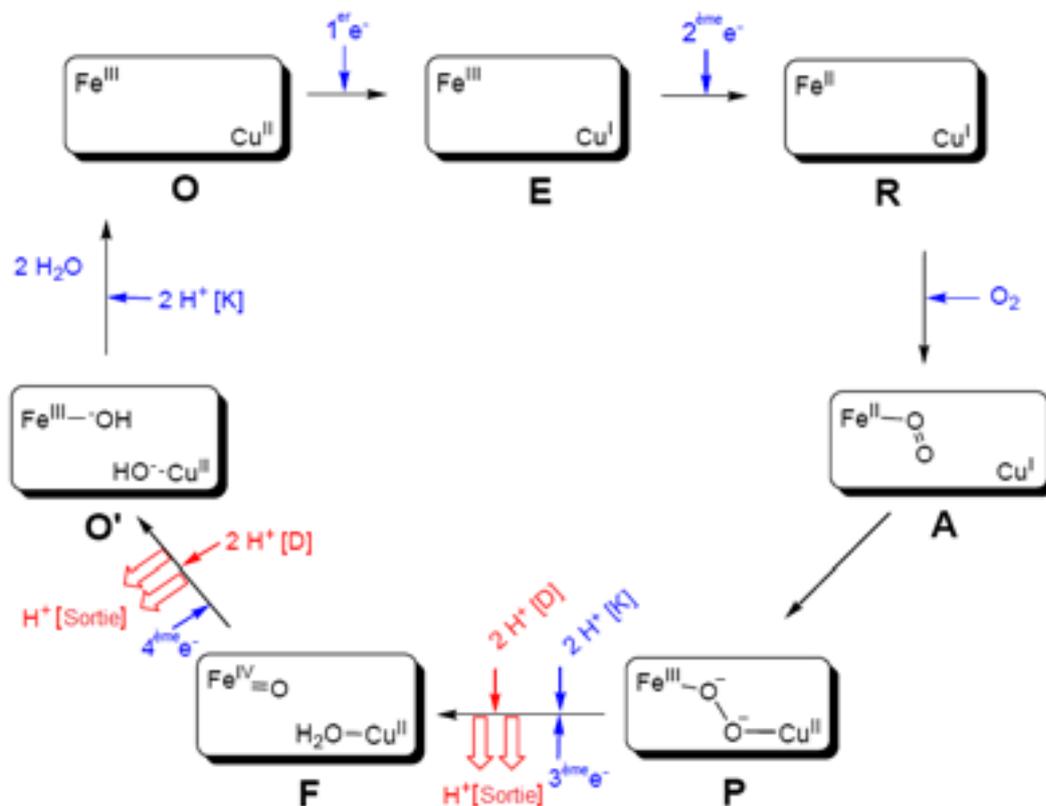


Figure 2.1: Modèle classique du cycle catalytique de la CcO. Les atomes de Fe et Cu représentent l'hème Fea_3 et le Cu_B . Les intermédiaires sont représentés au dessous des cases par les états O, E, R, A, P, F et O'. Le centre binucléaire reçoit les électrons durant la phase de réduction, ce qui entraîne la formation de l'état R réduit à deux électrons. L'oxygène peut donc se lier à l'hème Fea_3 en générant l'état A. Un réarrangement électronique induit la formation de l'intermédiaire Peroxy (état P). L'entrée d'un électron supplémentaire entraîne la formation de l'état F dont la structure est un oxoferryl. Après l'entrée d'un autre électron au site binucléaire, l'état introduit O' est caractérisé par deux groupes OH liés à l'hème Fea_3 et le Cu_B . Les liaisons des groupes OH- sont protonées ; deux molécules d'eau sont alors libérées. Le pompage de protons se produit au niveau des transitions P→F et F→O', pour lesquelles deux protons sont pompés pour chaque transition. Les petites flèches indiquent la consommation des électrons et de protons (bleu = électrons/protons chimiques, rouge = protons pompés), les grandes flèches rouges représentent les étapes de pompage de protons via des canaux de sortie. Il a été suggéré que les protons chimiques utilisent le canal K, tandis que les protons pompés utilisent le canal D.¹³ Les canaux de protons sont nommés [D], [K] pour les protons chimiques ou pompés et [sortie] pour les canaux de sortie de protons pompés, respectivement.

2.2 Modèle proposé par Michel, 1999

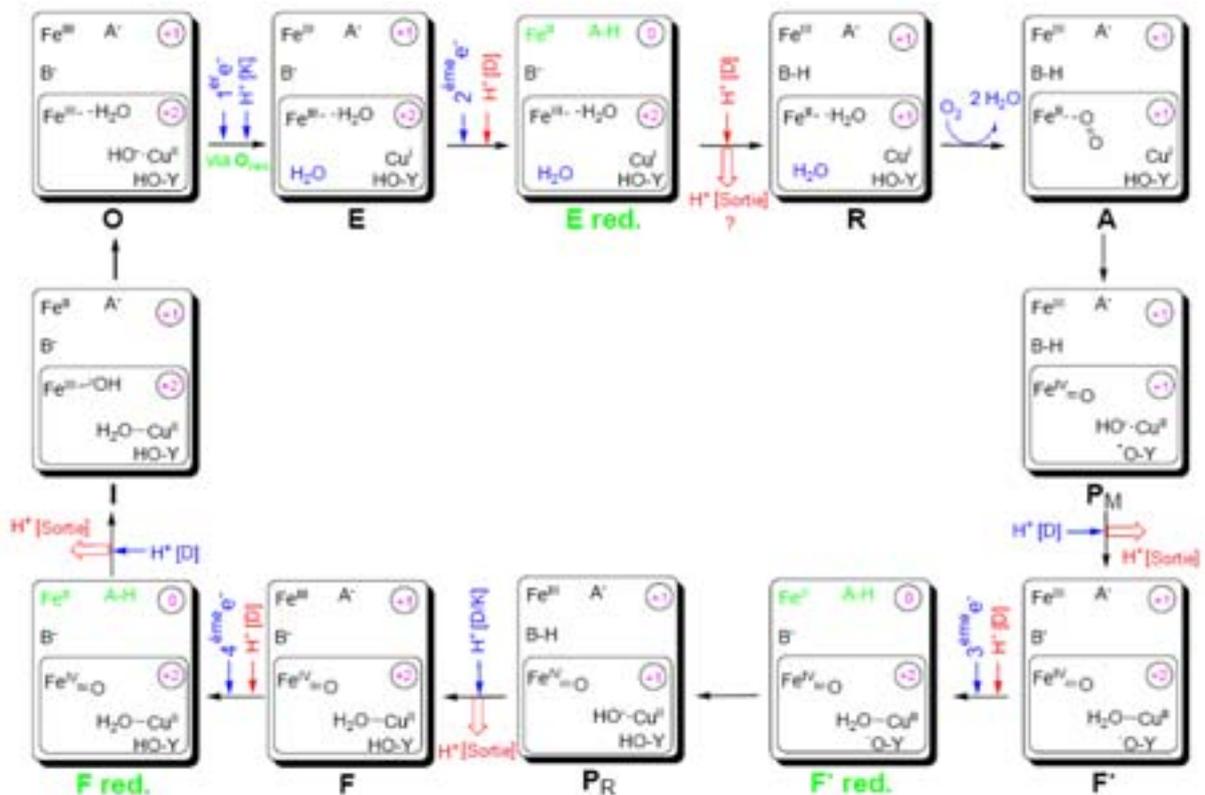


Figure 2.2: Modèle du cycle catalytique de la CcO (Michel, 1999). Les cases représentent les états d'oxydoréduction et de protonation des intermédiaires. Les cases internes décrivent les réactions ayant lieu au sein du site actif (le centre binucléaire hème a_3 -Cu_B et la Y280). Les intermédiaires sont représentés au dessous des cases par les états O, E, R, A, P_M, F', F, P_R et I. L'hème a réduit est marqué en vert pour chaque intermédiaire correspondant. Ce modèle aborde le pompage de proton en termes de répulsion électrostatique. A et B représentent des groupes protonés de propionates de l'hème a ou un site de protonation localisé à proximité du centre binucléaire, respectivement. La charge nette globale des centres pour chaque état est indiquée par la couleur magenta (la charge du cycle porphyrinique = -2, oxoferryl = 0, les sites A et B ne sont pas pris en considération). Les petites flèches indiquent la consommation des électrons et de protons (bleu = électrons/protons chimiques, rouge = protons pompés), les grandes flèches rouges représentent les étapes de pompage de protons via des canaux de sortie. Les canaux de protons sont nommés [D], [K] pour les protons chimiques ou pompés et [sortie] pour les canaux de sortie de protons pompés, respectivement.

2.3 Modèle proposé par Wikström, 2000

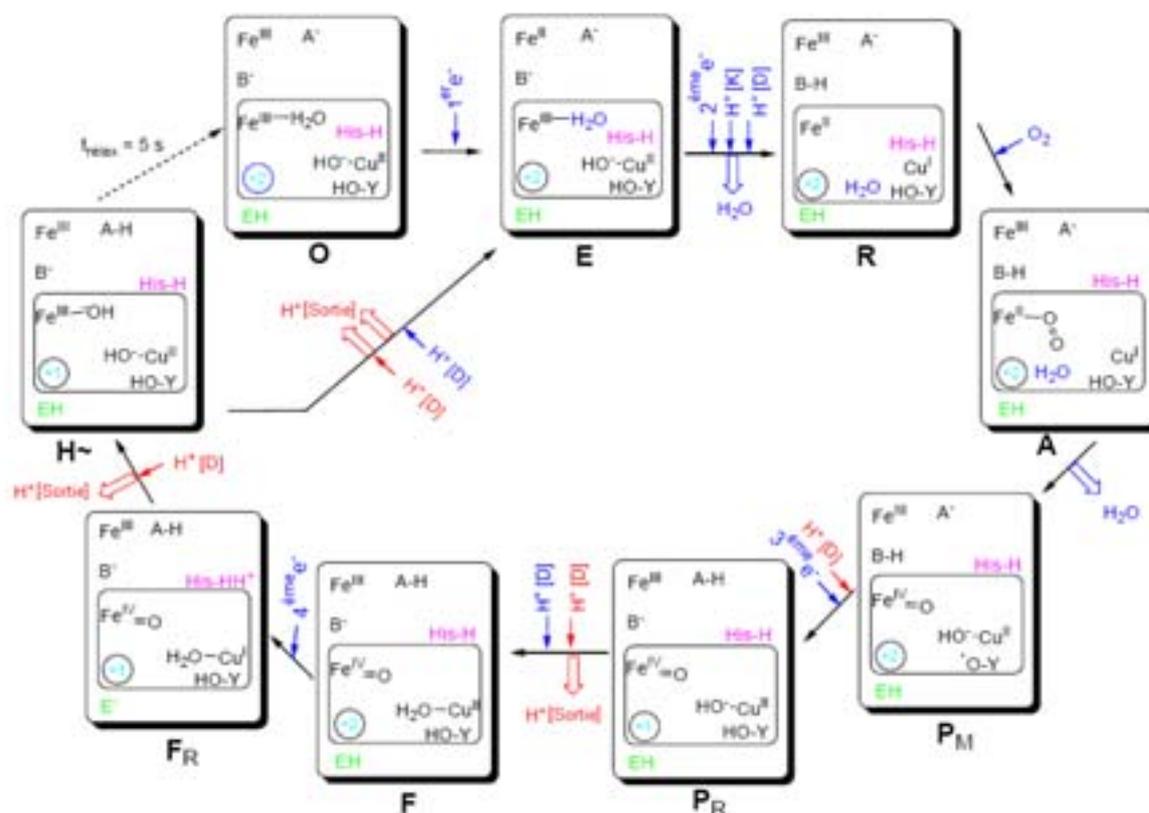


Figure 2.3: Modèle du cycle catalytique de la CcO (Wikström, 2000). Les cases représentent les états d'oxydoréduction et de protonation des intermédiaires. Les cases internes décrivent les réactions ayant lieu au sein du site actif (le centre binucléaire hème a_3 -Cu_B, la Y 280 et le ligand Histidine du Cu_B (magenta)). Les intermédiaires sont représentés au dessous des cases par les états O, E, R, A, P_M, P_R, F, F_R et H. La charge formelle du centre binucléaire est indiquée en bleu clair (porphyrine = -2, oxoferryl = 0). E représente le résidu E278 (vert). H représente un état dans lequel un ligand OH⁻ est lié à l'hème Fea₃. H est suggéré d'être un état désigné par une "énergie élevée" avec un potentiel permettant la translocation de protons. A et B représentent des groupes protonés de propionates de l'hème a ou un site de protonation localisé à proximité du centre binucléaire, respectivement. L'imidazole (ImH) de l'histidine peut se dissocier du Cu_B et se protoner pour former un cation imidazolium (ImHH⁺). Les petites flèches indiquent la consommation des électrons et de protons (bleu = électrons/protons chimiques, rouge = protons pompés), les grandes flèches rouges représentent les étapes de pompage de protons via des canaux de sortie. Les canaux de protons sont nommés [D], [K] pour les protons chimiques ou pompés et [Sortie] pour les canaux de sortie de protons pompés, respectivement.

Annexe 3: spectroscopie IRTF

3.1 Principe

La méthode la plus utilisée pour déterminer les fréquences des modes de vibration consiste à envoyer sur l'échantillon une lumière IR incidente à travers d'un interféromètre de Michelson (Figure 1). La transformée de Fourier du signal obtenu en transmission donne directement le spectre de l'échantillon. Il s'agit de spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR)

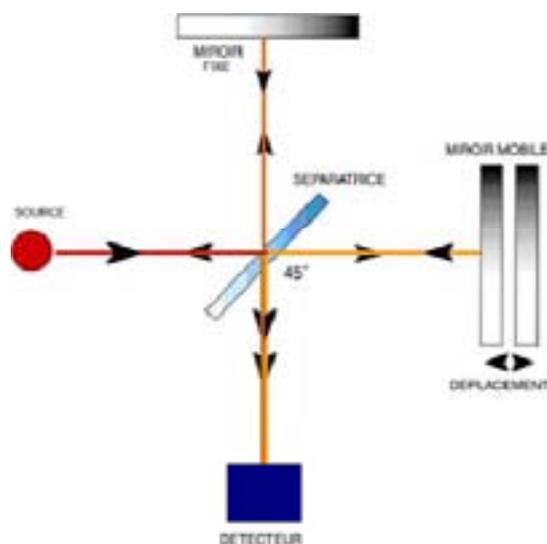


Figure 3.1: Schéma de l'interféromètre de Michelson.

L'interféromètre de Michelson est formé de deux miroirs plans perpendiculaires dont l'un est fixe (M_f) et l'autre est mobile (M_m). Une lame semi-réfléchissante, Se , appelée séparatrice, inclinée à 45° par rapport à la direction de propagation du rayonnement incident est placée au centre du montage. Dans le domaine spectral MIR (moyen infrarouge), la séparatrice est constituée d'une lame support en KBr et d'un film mince en germanium.

Si l'on fait entrer dans le dispositif un faisceau parallèle à partir d'une source ponctuelle S , la séparatrice Se dédouble le faisceau incident en un faisceau transmis d'intensité I_t (vers M_m) et un faisceau réfléchi d'intensité I_r (vers M_f). Ces deux faisceaux sont réfléchis par les miroirs M_f et M_m . À leur retour sur la séparatrice, chacun d'eux est à nouveau dédoublé en un faisceau transmis et un faisceau réfléchi. Les amplitudes des faisceaux émergents sont égales et ils peuvent interférer à la sortie de l'instrument. Si les deux miroirs sont à égale distance de la séparatrice, les chemins optiques suivis par les deux faisceaux sont identiques et ils

émergent en phase. Si, par contre, le miroir mobile est translaté de x , le chemin optique du premier trajet augmente de $2x$ et les deux faisceaux sont plus ou moins déphasés.

L'intensité du signal résultant, en fonction du déplacement δ du miroir mobile, porte le nom d'interférogramme.

L'interférogramme d'une source monochromatique est une fonction cosinus, l'interférogramme d'une source polychromatique est une somme de cosinus. Le signal en sortie du détecteur apparaît comme un interférogramme (Figure 2), c'est-à-dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau.

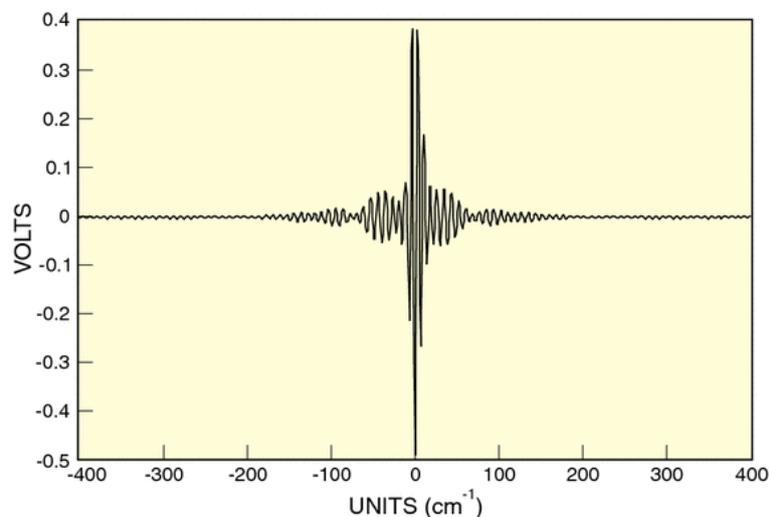


Figure 3.2: Interférogramme d'une source à large bande en sortie du détecteur.

L'objectif est d'extraire à partir de l'interférogramme $V(\delta)$: variation de l'intensité en fonction du déphasage, le spectre $I(\nu)$: variation de l'intensité en fonction du nombre d'onde. Le spectre $I(\nu)$ est calculé à partir de l'interférogramme $V(\delta)$ grâce à l'algorithme de transformation de Fourier.

$$I(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} V(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta$$

Le détecteur recevant simultanément les radiations correspondant à toutes les fréquences du spectre, on parlera de technique multiplex.

3.2 Avantages de la spectroscopie à transformée de Fourier

Les instruments IRTF possèdent plusieurs avantages comparés aux spectromètres dispersifs.

- *Avantage de Fellgett*

Cet avantage, également appelé l'avantage multiplex tient au fait que tous les éléments du spectre sont acquis simultanément alors que, dans un système dispersif, les fréquences sont mesurées de façon séquentielle. Le gain de temps ainsi obtenu permet d'augmenter le nombre d'accumulations et donc d'améliorer la qualité du signal en augmentant le rapport signal sur bruit. En effet, le rapport *Signal sur Bruit* est multiplié par \sqrt{n} pour n accumulations utilisées pour générer le spectre. D'autre part, le temps de mesure est diminué par n à rapport *Signal sur Bruit* et résolution constants ou encore une amélioration de la résolution peut-être obtenue à rapport S/B et durée de mesure donnés.

- *Avantage de Jacquinot*

Aussi nommé l'avantage du trou circulaire : pour filtrer les longueurs d'onde qui doivent parvenir au détecteur et déterminer la résolution spectrale, le spectromètre IRTF utilise non pas une fente comme sur les systèmes dispersifs mais un trou circulaire de plus fort diamètre laissant passer plus d'énergie et améliorant le rapport *Signal sur Bruit*.

- *Avantage de Connes*

L'utilisation d'un laser He-Ne pour mesurer la position du miroir mobile permet l'exacte calibration des fréquences du spectromètre. La précision atteinte est de l'ordre de $0,0002 \text{ cm}^{-1}$ pour une résolution de 2 cm^{-1} .

- *Avantage de la vitesse du miroir mobile*

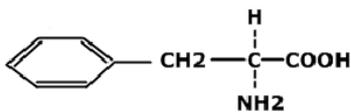
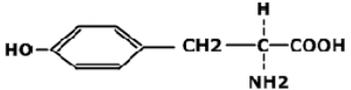
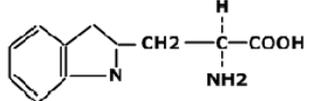
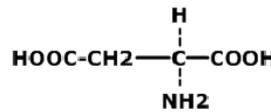
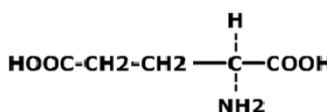
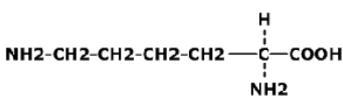
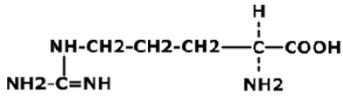
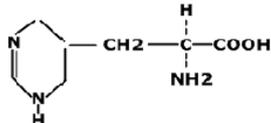
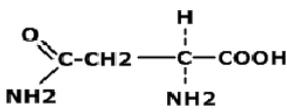
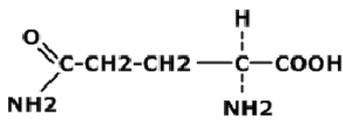
La résolution spectrale dépend du déplacement maximum du miroir et est donc indépendante de la vitesse de déplacement du miroir et de la fréquence. Plus la vitesse de déplacement du miroir est élevée, plus le nombre d'interférogrammes accumulés par unité de temps est élevé et donc le rapport *Signal sur Bruit* est meilleur sans perte de résolution spectrale.

- *Avantage de la lumière parasite*

Puisque le spectromètre mesure toutes les fréquences en même temps, la proportion de lumière parasite par rapport à l'énergie du signal est bien moindre que pour un système dispersif. Cela contribue à améliorer encore le rapport *Signal sur Bruit*.

Annexe 4: Les vingt Acides aminés

Nom (Abrv)	Représentation Graphique	Propriété(s)
Glycine (GLY)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Hydrophobe
Chaîne Latérale Carbonée (4)		
Alanine (ALA)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Hydrophobe
Valine (VAL)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	
Leucine (LEU)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	
Isoleucine (ILEU)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	
Chaîne Latérale à Fonction Alcool (2)		
Sérine (SER)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OH} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Hydrophile
Thréonine (THR)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	
Chaîne Latérale Souffrée (3)		
Cystéine (CYS)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{SH} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Hydrophile
Méthionine (MET)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Hydrophobe
Proline (PRO)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH}_2 \end{array}$	Hydrophobe

Chaine Latérale à Résidu Aromatique (3)		
Phénylalanine (PHE)		Hydrophobe Absorbe la lumière à 280nm
Tyrosine (TYR)		Hydrophile Absorbe la lumière à 280nm
Tryptophane (TRY)		Hydrophobe Absorbe la lumière à 280nm
Chaine Latérale à Fonction Acide (2)		
Acide Aspartique		Hydrophile
Acide Glutamique		Hydrophile
Chaine Latérale à Fonction Basique (5)		
Lysine (LYS)		
Arginine (ARG)		
Histidine (HIS)		
Asparagine (ASN)		
Glutamine (GLN)		

Identification des intermédiaires de la réduction du dioxygène par la cytochrome *c* oxydase et ses modèles en faisant appel à la spectroscopie IR différentielle

Résumé

La cytochrome *c* oxydase (CcO) est un complexe protéique commun à tous les organismes aérobies. Elle catalyse la réduction de l'oxygène en eau au niveau d'un site catalytique qui contient un atome de fer hémique et un atome de cuivre (Cu_B). La famille de ces oxydases est ainsi appelée super famille des oxydases à "hème-cuivre". Malgré le grand nombre d'études réalisées au sujet de l'activité catalytique des CcO, le déroulement exact des étapes de leur mécanisme reste encore mal connu. Afin de mieux cerner le problème de la relation structure-activité de cette hémoprotéine, deux approches distinctes et complémentaires ont été abordées : l'étude du système naturel et l'approche biomimétique.

Les propriétés électroniques et vibrationnelles de certains intermédiaires du cycle catalytique de la cytochrome *c* oxydase ont été caractérisées par spectroscopies UV-Visible, de fluorescence résolue en temps et infrarouge. L'analyse du site actif de la CcO par des substitutions isotopiques du Cu_B, ainsi que l'influence du pH sur la structure de cet enzyme sont discutées.

La deuxième partie de ce travail concerne l'étude du rôle de l'environnement proche de l'hème sur la réactivité des complexes Fe^{II}-CO et Fe^{II}-O₂ grâce à une série de modèles superstructurés du centre binucléaire Fe/Cu de la CcO. Ces analogues synthétiques conservent l'hème, la ligation fer-histidine du site proximal et le ligand complexant le cuivre du site distal de la CcO, mais se différencient notamment par leur environnement autour de l'atome de cuivre et par leur rigidité. Deux techniques ont été utilisées: la spectroscopie ATR-IRTF et la photochimie dans le cas d'espèces carbonylées.

L'analyse de complexes ferriques et ferreux de ces modèles dans le moyen et lointain infrarouge a permis de mettre en évidence des modes IR sensibles à l'état redox et de spin du fer. Des modes IR caractéristiques des ligands axiaux de l'hème dans les complexes étudiés ont pu être associés à l'état de coordination de l'hème. L'étude des adduits carbonylés a montré que les différentes positions du cuivre(I) par rapport au ligand CO ont des effets distincts et spécifiques sur le complexe Fe^{II}-CO des différents modèles. De manière intéressante, la fixation du cuivre(I) dans le site distal du modèle le plus rigide induit une interaction apparemment très forte avec le ligand distal du fer, alors que dans les modèles les moins rigides elle induit une interaction apparemment beaucoup moins intense. L'étude des modèles de la CcO par la photolyse a mis en évidence le transfert du CO de l'hème au cuivre uniquement dans le complexe le plus rigide. Ceci suggère que dans ce modèle, le cuivre(I) est situé à proximité de l'hème, du fait de la présence d'une cavité bien construite et rigide qui empêcherait le CO photodissocié de sortir de cette poche.

Mots Clés

Cytochrome *c* oxydase-Complexe fer-oxygène-Cuivre-Hème-Intermédiaires réactionnels
Modèles biomimétiques-Monoxyde de carbone-Spectroscopie IRTF-Vibrations métal-ligands

Abstract

Cytochrome *c* Oxidase (CcO), a member of the heme-copper oxidase superfamily, is a membrane protein in many aerobic organisms, that catalyses the reduction of dioxygen to water. Dioxygen binding and reduction occurs at a heterobinuclear site that is comprised of a heme *a*₃, and a copper atom (Cu_B) in close proximity. Despite, the CcO has been the subject of numerous biophysical and spectroscopic investigations, the detailed molecular mechanism of CcO remains still elusive. In order to better define the structure-function relationship for this hemoprotein, two distinct and complementary approaches have been employed: the study of the natural system and the biomimetic approach.

Structural changes accompanying the change in the redox state of some CcO intermediates have been characterised by UV-Visible, ATR-FTIR and time-resolved fluorescence spectroscopies. The study of the cytochrome *c* oxydase active site modified with isotopic substitutions of Cu_B, and the effect of pH on the structure are discussed.

The second part of this work is related to study the role of environment on the reactivity of Fe^{II}-CO et Fe^{II}-O₂ complexes by exploiting a series of superstructured models of the binuclear Fe/Cu active site of CcO. Based upon a porphyrin core, all these models have the iron-histidine ligation of the proximal site and the copper ligand of the distal site of CcO but they differ strongly by the environment around the copper and their rigidity.

The study of the ferric and ferrous complexes of biomimetic models in the mid infrared and far infrared region allowed us to identify redox and spin state sensitive bands. Some other redox IR bands were attributed to axial ligands and were able to be associated to the heme coordination state. Using a combination of photochemistry and infrared spectroscopy, we analyzed the influence of copper (I) on the heme-bound CO on the electrostatic properties of heme distal environment. Our results strongly suggest that the influence on the interaction of these compounds with CO are quite different from a change in the position of copper(I) with respect to the heme-bound CO. Interestingly, the more rigid model compound showed two Fe-CO stretching frequencies upon addition of copper (I), one in the same region as the model without copper and one strongly downshifted by $\sim 33 \text{ cm}^{-1}$. However, in the less rigid complexes, there is little or no influence of copper(I) on CO bound to the heme. Upon photolysis, the CO was transferred from the heme to the copper (I) ion. This was not the case for the less rigid models. Thus, the large frequency shift ascribable to the presence of copper (I) suggests that the copper ion resides in close proximity to the bound CO. We suggest that the Fe...Cu distance in the more flexible binucleating ligand is much greater than in the rigid model where the proximity of copper to the heme is relatively fixed.

Key words

Cytochrome *c* oxidase- Iron-oxygen complex-Copper-Heme-Reactionnal intermediates
Biomimetic models-Carbon monoxide-FTIR spectroscopy-Metal-ligands vibrations