



HAL
open science

Développement de nouveaux catalyseurs d'oxydation bioinspirés : greffage de complexes de fer(II) non hémiques sur électrodes d'or ou dans la β -lactoglobuline

Charlotte Buron

► **To cite this version:**

Charlotte Buron. Développement de nouveaux catalyseurs d'oxydation bioinspirés : greffage de complexes de fer(II) non hémiques sur électrodes d'or ou dans la β -lactoglobuline. Chimie inorganique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112148 . tel-01187434

HAL Id: tel-01187434

<https://theses.hal.science/tel-01187434>

Submitted on 26 Aug 2015

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 PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 : CHIMIE DE PARIS SUD

Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay
Equipe de Chimie Inorganique

THÈSE DE DOCTORAT CHIMIE

Soutenue le 17/07/2015

Par

Charlotte BURON

**Développement de nouveaux catalyseurs d'oxydation
bioinspirés : greffage de complexes de fer(II) non hémiques
sur électrodes d'or ou dans la β -lactoglobuline**

Composition du jury :

Rapporteurs :	Christelle Hureau Jalila Simaan	Chargée de recherche (LCC, Univ. Paul Sabatier, Toulouse) Chargée de recherche (iSm2, Aix Marseille Univ.)
Examineurs :	Bernd Schollhorn Jean-Pierre Mahy	Professeur (LEM, Univ. Paris Diderot) Professeur (ICMMO, Univ. Paris Sud)
Co-directeur de thèse :	Katell Sénéchal-David	MCF (ICMMO, Univ. Paris Sud)
Directeur de thèse :	Frédéric Banse	Professeur (ICMMO, Univ. Paris Sud)

Remerciements

C'est avec émotion que j'écris ces quelques remerciements ...

Tout d'abord, je souhaite remercier Frédéric et Katell pour m'avoir chaleureusement accueilli lors de mon stage de M2, qui s'est finalement poursuivi en une thèse (qui ne figurait pas sur mon planning de l'époque), prolongeant l'expérience de trois ans. Non, je ne regrette rien. Je me rappelle avoir longtemps hésité, mais la curiosité me poussant, j'ai fait le grand plongeon, et j'ai passé le concours de l'école doctorale. Pendant ces trois années et demie, vous avez été patients, pédagogues, et vous m'avez permis de prendre en main un projet de recherche à rebondissements multiples. La bonne ambiance dans l'équipe m'a toujours aidée à rester motivée.

Je souhaite également remercier Talal Mallah de m'avoir accueillie au LCI. L'équipe est très dynamique et sympathique. Je conserverai de bons souvenirs des repas de Noël à thème, des BBQ et des goûters d'anniversaire. Merci pour tous ces moments partagés !

Après de multiples répétitions, le jour de la soutenance est arrivé. Je voudrais remercier les rapportrices de cette thèse, Christelle Hureau et Jalila Simaan pour le temps passé et l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury, Bernd Schöllhorn et Jean-Pierre Mahy qui ont accepté de juger ce travail. J'ai passé un très bon moment à discuter avec vous des différents résultats.

Ces travaux ont été possibles grâce à un certain nombre de collaborations.

La première collaboration a été avec l'équipe du LEM (les parisiens). Merci à Sihem Groni, Claire Fave et Bernd Schöllhorn pour votre accueil et nos échanges. Les quelques semaines de manips que j'ai effectuées chez vous ont été très intéressantes, même si les résultats n'étaient pas à la hauteur de nos attentes. Merci à Sihem d'être venue à Orsay pendant ma rédaction pour terminer un certain nombre d'expériences. C'était très agréable de travailler avec toi et ta bonne humeur constante !

La seconde collaboration a été avec l'équipe du LCBB, et la proximité géographique avec cette équipe m'a permis de bien faire avancer le projet. Merci à Rémy Ricoux pour m'avoir accompagnée dans mes premiers pas vers la biologie, merci à Jean-Pierre Mahy pour les conseils et les nombreuses réunions qui m'ont permis d'y voir plus clair à certains moments.

Merci également à l'équipe de Herman van Tilbeurgh pour m'avoir accueillie à l'IBBMC et un grand merci à Ines Gallay pour m'avoir fait découvrir le domaine de la cristallographie des protéines. Lors de mon premier long passage chez vous, j'ai pu trouver des conditions de cristallisation de la BLG et du

biohybride. Merci également à Nouredine Lazar et à une ancienne élève, Maylis Lejeune, qui à travers son stage en alternance à travailler à la cristallisation de la BLG-L₅²Fe^{II}. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir une structure cristallographique avec les magnifiques cristaux obtenus !

Merci à Laura Poignez qui est intervenue sur les études de réactivité d'un nouveau complexe lors de son stage de fin d'année d'IUT.

Je souhaite également remercier Régis Guillot, qui a résolu les structures de mes complexes, et chose exceptionnelle, m'a permis d'avoir la caractérisation d'un nouveau complexe grâce à une structure par diffraction des rayons X avant même l'analyse par ESI-MS ! Merci à Tanaya Inceoglu et Delphine Arquier de la spectrométrie de masse, qui ont été très patientes, et disponibles pour passer tous mes échantillons. Merci à Jean-Pierre Baltaze et Amandine Dos Santos qui ont toujours été là pour m'aider avec la RMN. Merci à Emilie Kolodziej et à Didier Gori pour les analyses en GC et HPLC. Merci à Elisa Paredes qui a synthétisé, à un moment important de ma thèse, du ligand L₅²maléimide. Et un grand merci à Diana Dragoë, qui a pris le temps, deux semaines avant de rendre mon manuscrit, d'analyser par XPS les surfaces d'or !

Merci également aux gars de Gif ! Vincent Guérineau et Jean-Pierre Le Caer qui ont toujours été disponibles pour passer des échantillons de biohybride.

Je souhaite ensuite remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer pendant ces trois années. Je n'oublierai pas Michelle Jousset, Brigitte Dubois, Nelly Lecoeur et Stéphanie Latimier. Je remercie aussi le service achat (François Rousseau et Philippe Lemonnier), notre gardienne Mansoura Massalin, et les verriers Marc Thilloz et Florian Aubert qui sont de vrais artistes !

Merci également à Anne Léaustic qui m'a permis de faire un certain nombre d'enseignements en chimie inorganique et à Christie Aroulanda et Chloée Bournaud qui m'ont permis d'enseigner la chimie organique.

Merci également à toute l'équipe du LCBB, pour son accueil, pour l'ambiance vestiaire de foot dans le bureau de Rémy. Merci à Fabien, Fred, Alex, Yoann, Wadih, Khaled, Thibault et Virginie pour votre disponibilité ainsi que pour l'assistance GC, HPLC et centrifugeuse !

Je vais aussi remercier ma famille et mes amis pour m'avoir accompagnée lors de ces trois années et de m'avoir soutenue le jour de la soutenance. Merci aussi à Maximilien, qui m'a soutenue et aidée tout au long de cette aventure !

Et enfin, le meilleur pour la fin, merci aux jeunes du LCI. L'ambiance a été toujours très agréable, et les sorties au Bombardier très importantes pour souder le groupe. Merci à Virgile, la libellule de

l'ICMMO, d'avoir revêtu ta superbe tenue le jour de ma soutenance. Je n'aurais pas voulu rater ça !
Merci à Christian, qui malgré ton air bourru des premiers jours de colocation au laboratoire, t'es montré très sympathique. J'ai apprécié de travailler avec toi dans notre *prostibule*. On s'est bien marrés dans le laboratoire à improviser des chansons et à discuter des chromosomes XX, qui rangent les piluliers dans des boîtes ! Merci à Nathalie dont la colocation au laboratoire et dans le bureau a été super. Tu m'as beaucoup appris avant ton départ. Merci à tous les autres membres du LCI qui ont toujours été là pour raconter des blagues plus ou moins drôles, et toujours présents pour aller boire un verre sur Paris.

Et un grand merci à Yu, partenaire de quelques foulées dans la forêt orcéenne, qui est toujours de bonne humeur et taquin ! Merci Eric pour ton aide sur l'informatique et électrique du labo. Merci à Marie, ma colocataire de bureau. Tu m'as soutenue pendant la rédaction, et m'a aidée à chaque fois que je bloquais sur Word ... Merci pour tes précieux conseils et les discussions !

Merci à tous, et à bientôt !

Liste des abréviations

α -CG : α -cétoglutarate

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

AgPF₆ : hexafluorophosphate d'argent

Ala : alanine

Arg : arginine

Asp : acide aspartique

Bioh : biohybride

BLG : β -lactoglobuline

BS : bas spin

CcO : cytochrome c oxydase

cis-DMC : cis-1,2-diméthylcyclohexane

Cpd I : compound I

CS : conversion de spin

CV : voltamétrie cyclique

Cys : cystéine

δ : déplacement des protons (ppm)

Da : dalton

DIEPA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DRX : diffraction des rayons X

DTC : dithiothréitol

DTT : diéthylthiocarbamate de sodium

$E_{1/2}$: potentiel de demi-vague

EC : équilibre chimique

ECS : électrode au calomel saturé

ee : excès énantiomérique

ENDOR : electron nuclear double resonance

ENH : électrode normale à hydrogène

E_{pa} : potentiel de pic anodique

E_{pc} : potentiel de pic cathodique

éq. : équivalent

ESI-MS : spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation

EXAFS : extended X-ray absorption fine structure

g : tenseur

GC : chromatographie en phase gazeuse

Gly : glycine

h : heure

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (tampon)

His : histine

HOBT : hydroxybenzotriazole

HS : haut spin

ICP : spectrométrie d'absorption atomique

KIE : effet isotopique cinétique

LMCT : transfert de charge du ligand vers le métal

m- : méta-

Mb : myoglobine

mCPBA : acide méta-chloroperbenzoïque

MES : acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (tampon)

min : minute

MLCT : transfert de charge du métal vers le ligand

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : forme réduite de la NADP

NBIC : tampon hydrogencarbonate de sodium

NDO : naphthalène dioxygénase

o- : ortho

ol : alcool

one : cétone

OTf⁻ : ion triflate (CF₃SO₃⁻)

PAA : acide peracétique

PBS : tampon phosphate

PDB : protéine data banque

pH : potentiel hydrogène

PhIO : iodosylbenzène

ppm : partie par million

RH : substrat organique

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : espèces réactives du dioxygène

RPE : résonance paramagnétique électronique

RRDE : électrode tournante disque-anneau

SAM : couche moléculaire auto-assemblée

SH : substrat organique

TBAPF₆ : hexafluorophosphate de tétrabutylammonium

TBTU : O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium tétrafluoroborate

TON : turnover number (nombre de cycles)

Tyr : tyrosine

uma : unité de masse atomique

UV : ultra-violet

Val : valine

XPS : spectroscopie de photoélectrons X

Table des matières

Chapitre 1 : Contexte des études	7
1. Oxygénases à fer	7
1.1. Enzymes à fer hémiques : les cytochromes P450.....	8
1.2. Les dioxygénases de Rieske.....	11
1.3. Les oxygénases à fer non hémiques utilisant un cosubstrat.....	14
1.4. Conclusions	19
2. Fixation de systèmes synthétiques sur électrode d'or.....	20
2.1. Modèle de la cytochrome c oxydase (CcO).....	21
2.2. Modèles d'oxygénases.....	23
3. Les métalloenzymes artificielles	27
3.1. Concept général.....	27
3.2. Elaboration d'oxygénases artificielles.....	29
3.3. Conclusions	38
4. Systèmes bioinspirés non-hémiques pour la catalyse d'oxydation	38
4.1. Utilisation de ligands hexa- et pentadentes.....	39
4.2. Utilisation de ligands tétradentes linéaires	41
4.3. Utilisation de ligands macrocycliques.....	43
4.4. Utilisation de ligands tripodes.....	45
4.5. Conclusion.....	46
Chapitre 2 : Nouveaux complexes renforcés.....	53
1. Caractérisation.....	55
1.1. A l'état solide.....	55
1.2. Caractérisation en solution	58
2. Etude spectrophotométrique à température variable.....	65

2.1.	Evolution de la transition MLCT en fonction de la température pour les complexes à ligands de type L_6^2	66
2.2.	Evolution de la transition MLCT en fonction de la température pour les complexes à ligands de type L_4^2	67
2.3.	Rationalisation des observations.....	69
3.	Conclusion.....	72
Chapitre 3 : Réactivité des nouveaux complexes renforcés.....		75
1.	Réactivité vis-à-vis de l'eau oxygénée et de l'iodosylbenzène	75
1.1.	Caractérisation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$	76
1.2.	Caractérisation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$	79
1.3.	Formation et stabilité du complexe de $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$	82
1.4.	Conclusions	85
2.	Catalyse d'oxydation de substrats organiques par l'eau oxygénée : réactivité préliminaire	85
2.1.	Conditions expérimentales	85
2.2.	Résultats.....	86
2.3.	Une nouvelle réactivité, pour l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}-(\eta^2-O_2)]^+$	91
3.	Conclusion.....	96
Chapitre 4 : Complexes greffés sur électrodes d'or.....		99
1.	Choix du système électrochimique, et fonctionnalisation des complexes.....	99
1.1.	Caractérisation en solution	101
1.2.	Echange de ligand exogène en solution dans l'acétone à partir du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$	107
1.3.	Conclusion.....	112
2.	Mise au point et étude des monocouches de complexes autoassemblées sur or (SAMs)	112
2.1.	Mise au point des SAMs.....	112
2.2.	Etude de l'échange de ligand exogène sur la SAM.....	123

2.3. Premiers tests de réactivité de la SAM vis-à-vis du dioxygène dans l'acétonitrile.....	129
3. Conclusions	131
Chapitre 5 : Nouvelle métalloenzyme artificielle obtenue par couplage covalent entre un complexe de fer fonctionnalisé et la β -lactoglobuline bovine.....	133
1. Synthèse et caractérisation du complexe fonctionnalisé $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$	134
1.1. Synthèse du complexe	134
1.2. Caractérisation du complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$	135
1.3. Test de couplage entre le ligand maléimide et l'heptanethiol.....	142
2. Synthèse, caractérisation, quantification et réactivité de BLG- $L_5^{2Fe^{II}}$	145
2.1. Synthèse du biohybride et purification.....	145
2.2. Caractérisation spectroscopique du biohybride	146
2.3. Quantification du biohybride	154
3. Réactivité du biohybride.....	164
3.1. Génération d'intermédiaires réactionnels.....	164
3.2. Catalyse d'oxydation du thioanisole.....	168
4. Conclusion.....	170
Conclusion et perspectives.....	175
Partie expérimentale	179

Introduction

La thématique du développement durable prend aujourd'hui de plus en plus de place dans notre société. La prise en compte des contraintes environnementales nous incite à développer de nouvelles méthodes de synthèses respectueuses de l'environnement, faciles à mettre en œuvre et rentables. La chimie fine utilise des synthèses coûteuses en énergie et atomes. Dans le cas de la valorisation d'alcanes, leur oxydation en alcools (entre autres) nécessite des conditions draconiennes (température et pression élevées, utilisation de forts oxydants chimiques, et d'oxydes de métaux corrosifs). De plus, ces méthodes ne permettent pas d'obtenir une sélectivité intéressante. Dans ce contexte, notre équipe cherche à développer des catalyseurs capables de réaliser l'oxydation d'hydrocarbures dans des conditions réactionnelles douces.

Des systèmes biologiques tels que les mono- et dioxygénases catalysent l'oxydation sélective de substrats organiques en utilisant le dioxygène de l'air dans des conditions physiologiques. Le développement des techniques d'analyse (RPE, Raman, Mössbauer, EXAFS et DRX) a permis de déterminer la structure du site actif d'un grand nombre d'entre elles. Au laboratoire, une approche bio-inspirée est utilisée afin de mimer l'activité de métalloenzymes à fer.

De nombreux complexes de fer(II) ont été développés comme catalyseurs dans notre équipe lors de thèses précédentes. L'interaction d'oxydants chimiques avec ces complexes a été étudiée, et une partie de mon projet a été de modifier les ligands pour augmenter la stabilité des catalyseurs.

Deux autres parties de mon projet de recherche sont inscrites dans le projet ANR Cathyméthoxy. Ce projet ambitieux regroupe six tâches bien distinctes. Au cours de ma thèse, je me suis attelée aux tâches 3, 4, 5 et 6 (Figure 1). Les tâches 3 et 4 ont nécessité la fonctionnalisation d'un ligand utilisé communément au laboratoire pour son greffage covalent dans une protéine, et sur une électrode d'or. Ce ligand fonctionnalisé, les complexes correspondant ont été synthétisés puis greffés dans la protéine et sur électrodes (tâches 5 et 6). Les nouveaux systèmes ont été caractérisés, des études en réactivité ont été menées. La tâche 7 est le but ultime du projet ANR. Il s'agit du greffage des métalloenzymes artificielles sur électrode d'or, afin d'assurer l'activation du dioxygène par l'apport d'électrons au site actif par le biais de l'électrode, et également une sélectivité grâce à l'environnement protéique.

Le **chapitre 1** présente le contexte de l'étude en commençant par la présentation d'un certain nombre de métalloenzymes à fer capables de réaliser l'oxydation de liaisons C-H aliphatiques ; des systèmes greffés sur électrodes d'or pour l'activation du dioxygène sont ensuite présentés ; enfin des métalloenzymes artificielles qui permettent l'oxydation de molécules organiques seront présentés par

le biais des différentes stratégies de fixation des complexes métalliques au sein de protéines. Pour terminer, quelques systèmes non hémiques de fer représentatifs seront évoqués.

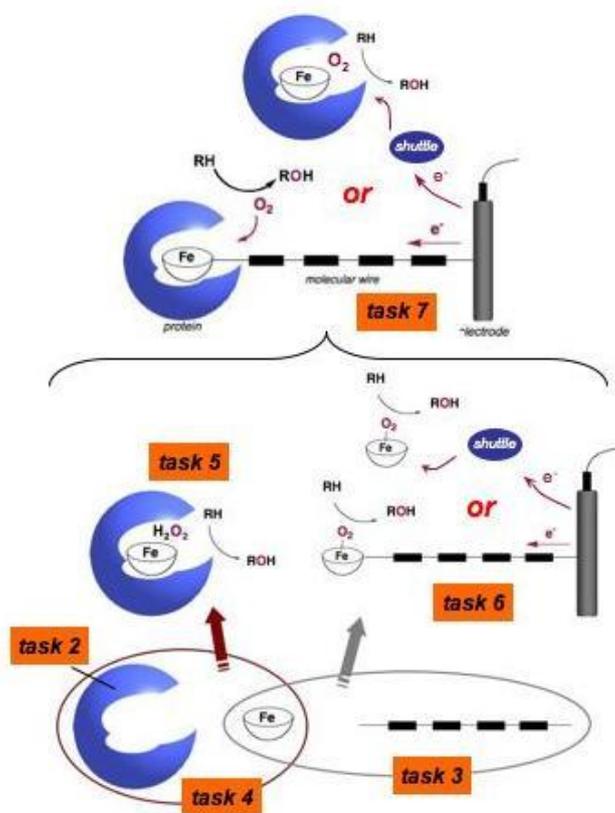


Figure 1 : Résumé des 6 tâches de l'ANR Cathyméthoxy.

Le **chapitre 2** présente la chimie de coordination de nouveaux complexes de fer(II) synthétisés, ainsi que leurs caractéristiques spectroscopiques.

L'évolution de ces complexes suite à l'ajout d'oxydants chimiques est présentée au **chapitre 3** ainsi que les premiers tests en catalyse homogène d'oxydation.

Au **chapitre 4**, la synthèse et la caractérisation du complexe fonctionnalisé pour la tâche 3 du projet ANR est présenté. Le greffage du complexe sur électrode d'or est également illustré suivant différentes techniques de dépôt. Une première étude de la réaction du dioxygène avec le complexe greffé a été réalisée.

Pour finir, le **chapitre 5** présente la synthèse et la caractérisation d'un autre complexe fonctionnalisé pour réaliser la tâche 4 du projet ANR. Le greffage covalent du complexe dans la β -lactoglobuline est présenté ainsi que les différentes méthodes de caractérisation et de quantification. Des tests de réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène ont été réalisés ainsi que des tests en catalyse d'oxydation.

Chapitre 1 : Contexte des études

Dans une problématique de plus en plus importante qui est celle du développement durable, il est aujourd'hui nécessaire d'adapter les réactions chimiques aux contraintes écologiques.

Le développement de catalyseurs existe depuis le début de la chimie. Cependant, la compréhension des mécanismes mis en jeu lors des réactions chimiques est beaucoup plus récente, et ce, grâce à l'apparition de techniques d'analyse qui permettent de sonder les systèmes à différentes étapes des réactions.

De nombreux catalyseurs moléculaires ont été développés, avec de très bons résultats au niveau des nombres de cycles catalytiques (turn over number : TON) et de la sélectivité des réactions. Toutefois, ces catalyseurs sont souvent constitués d'un centre métallique de type iridium, ruthénium, palladium, rhodium ou platine, qui sont des métaux chers non biocompatibles.¹⁻⁵

D'autre part, les oxydations sont des transformations chimiques très importantes. Les conditions de réactions sont dures, avec l'oxydant, souvent toxique ou nocif, utilisé en quantité stœchiométrique.⁵ Au contraire, des systèmes biologiques sont capables d'effectuer l'oxydation de molécules organiques en utilisant le dioxygène de l'air, en présence uniquement de protons, d'électrons, dans des conditions physiologiques. Quel grand défi pour les chimistes que d'arriver à développer des systèmes capables de mimer les systèmes biologiques, avec des catalyseurs composés de métaux biocompatibles tels que le cuivre, le manganèse et le fer.

Le développement de ces catalyseurs biomimétiques demande une très bonne compréhension des systèmes biologiques, où les première et seconde sphères de coordination sont primordiales pour la sélectivité des réactions, et où la présence d'un cosubstrat permet l'apport des électrons nécessaires à l'activation du dioxygène.

Ce chapitre présente certains systèmes enzymatiques dont le mode de fonctionnement peut servir de source d'inspiration pour les systèmes biomimétiques.

1. Oxygénases à fer

Les oxygénases à fer sont des enzymes possédant un site actif avec un ou deux atomes de fer. Ces métalloenzymes permettent la fonctionnalisation de liaisons C=C et C-H dans les hydrocarbures

saturés, insaturés et aromatiques. Ce processus a lieu grâce au transfert d'un ou deux atome(s) d'oxygène au sein de ces liaisons avec une très grande régio-, stéréo- et chimiosélectivité.

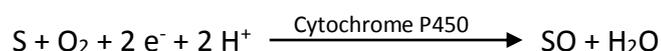
Le dioxygène paramagnétique ($S = 1$) est non réactif vis-à-vis des molécules organiques diamagnétiques. Les oxygénases sont capables de lever cette interdiction de spin en activant le dioxygène à l'aide d'une source réductrice.

Il existe de nombreuses métalloenzymes à fer qui par activation réductrice du dioxygène moléculaire conduisent à l'hydroxylation d'aromatiques, d'alcènes et d'alcanes. Dans cette partie, nous présenterons trois systèmes qui diffèrent par la structure du site actif et par leur réactivité.

1.1. Enzymes à fer hémiques : les cytochromes P450

Les cytochromes P450 constituent une grande famille d'hémoprotéines présentes dans de multiples organismes (bactéries, mammifères, plantes, champignons), notamment chez l'Homme, où ils sont principalement présents dans divers organes (intestin, reins, poumons) dont le foie, où ils participent à la dégradation de composés xénobiotiques (médicaments, polluants, et toxines). L'appellation des cytochromes P450 provient de la forte absorption à 450 nm de la forme réduite de l'hémoprotéine complexée par le monoxyde de carbone.⁶⁻⁸

Ces enzymes sont de puissants oxydants et sont capable d'effectuer des réactions d'oxydation tels que l'hydroxylation d'alcanes, l'époxydation d'une double liaison C=C, l'oxydation d'hétéroatomes, ou encore l'hydroxylation d'aromatiques. Les cytochromes P450 sont capables de catalyser l'insertion d'un atome d'oxygène du dioxygène et ce pour de nombreux substrats, et le second atome d'oxygène de O_2 est réduit pour former une molécule d'eau. Deux électrons sont nécessaires pour l'activation réductrice du dioxygène et sont apportés par la NADPH, selon l'équation bilan suivante :



a) Structure du site actif

Leur site actif contient un centre mononucléaire de fer(III) coordiné à quatre atomes d'azote d'une protoporphyrine IX, et attaché à la chaîne polypeptidique par un ligand cystéinate axial (Figure 1). La sixième position de coordination du fer est vacante ou occupée par une molécule d'eau et permet la fixation du dioxygène.

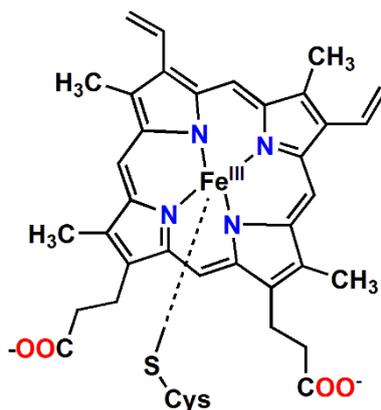


Figure 1: Structure du site actif des cytochromes P450.

Les électrons nécessaires pour l'activation du dioxygène sont apportés par le cofacteur NADPH via une réductase qui contient un cofacteur flavinique.^{6,9,10}

De nombreuses études spectroscopiques et structurales ont été menées sur les cytochromes P450. Le système le plus étudié est le cytochrome P450 du camphre dont la structure a été résolue par Poulos et al. en 1989 (Figure 2).¹¹ Le substrat est disposé du côté distal de l'hème. Le CO, qui symbolise O₂ dans cette structure, se trouve à proximité du substrat.

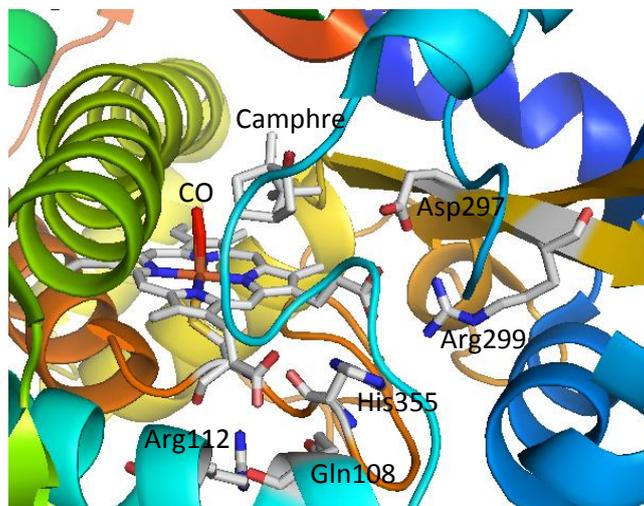


Figure 2: Structure du site actif du complexe ternaire P450-camphre-CO (PDB: 3CPP).
En gris : carbone ; en bleu : azote ; en rouge : oxygène ; en orange : fer.

b) Réactivité

Les multiples études effectuées sur ces systèmes ont permis d'établir le cycle catalytique par lequel s'effectue l'activation du dioxygène et l'oxygénation du substrat.^{6,7,12,13}

Le cycle catalytique admis aujourd'hui est présenté Figure 3.

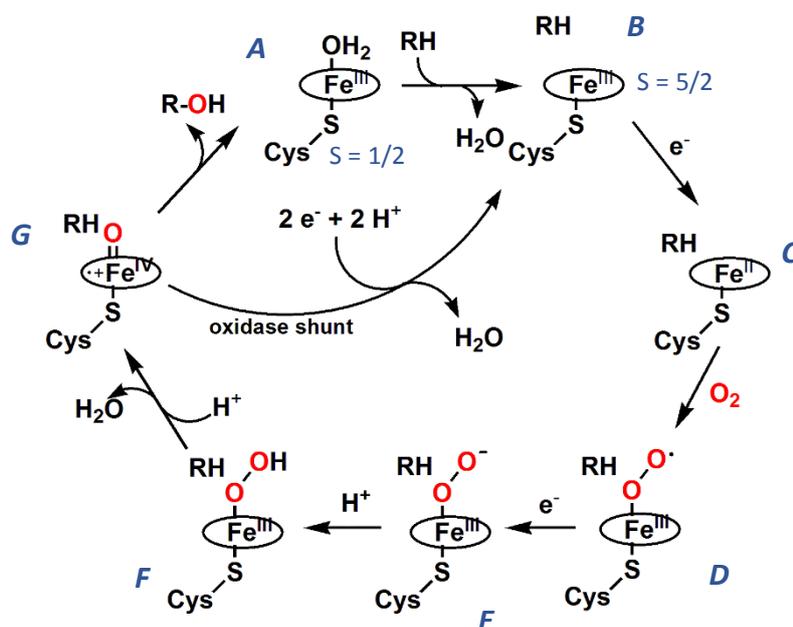


Figure 3: Mécanisme catalytique du cytochrome P450 lors de l'hydroxylation d'un alcane R-H.

Initialement, le fer est dans un état d'oxydation +III, coordiné par une molécule d'eau du côté distal (A). L'arrivée d'un substrat à proximité du site actif, conduit au départ de la molécule d'eau (B), se traduisant par un changement de l'état de spin du fer, qui passe d'un état bas spin ($S = 1/2$) à un état haut spin ($S = 5/2$). Ceci augmente le potentiel redox du système, facilitant ainsi la réduction du centre ferrique pentacoordonné par la réductase (C).¹⁴ Une molécule de dioxygène peut ensuite interagir avec l'ion Fe(II) pour donner une espèce de type Fe(III)-OO• (Fe(III)-superoxo) (D) qui a été étudiée par spectroscopie de résonance Raman, et qui montre une vibration $\nu(\text{O-O})$ à 1140 cm^{-1} .^{15,16} Une seconde réduction monoélectronique conduit à un intermédiaire Fe(III)-OO⁻ (Fe(III)-peroxy) (E) qui, après protonation donne l'intermédiaire Fe(III)-OOH (Fe(III)-hydroperoxy) (F). Les composés E et F ont été caractérisés par résonance Raman, RPE, et ENDOR lors de la cryoréduction du composé D à 77 K.¹⁷⁻¹⁹ Une seconde protonation a pour conséquence la coupure hétérolytique de la liaison O-O du Fe(III)-OOH avec la libération d'une molécule d'eau et la formation d'une espèce de type Fe(IV)=O avec un radical cation délocalisé sur l'ensemble de la porphyrine (G). Cet intermédiaire est souvent considéré comme une espèce Fe(V)=O. En 2000, Schlichting et al. ont réalisé des études structurales en parvenant à piéger certains intermédiaires du cycle catalytique du cytochrome P450 du camphre et notamment, l'espèce $\text{P}^{*+}[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]^+$ appelé Cpd I.¹⁰ De plus, en 2010, Green et al. ont caractérisé ce même intermédiaire par spectroscopies Mössbauer, RPE et UV-visible.²⁰

La réaction d'hydroxylation est réalisée très rapidement après l'injection du deuxième électron dans le cycle catalytique. Le mécanisme d'oxydation du substrat est centré sur le fer. Il est appelé

« Oxygen Rebound Mechanism » (Figure 4).²¹⁻²³ La première étape du mécanisme est la formation d'un état intermédiaire cage substrat/dérivé radicalaire, linéaire amorçant la rupture homolytique de la liaison C-H. La durée de vie de cet intermédiaire dépend du substrat ainsi que des contraintes électroniques et stériques imposées par le site actif sur le radical. La formation d'une cage radical organique/Fe(IV)-OH est en accord avec la formation d'un état de transition linéaire. Pour finir, la disparition de cet intermédiaire conduit à la formation de la liaison C-O.²³

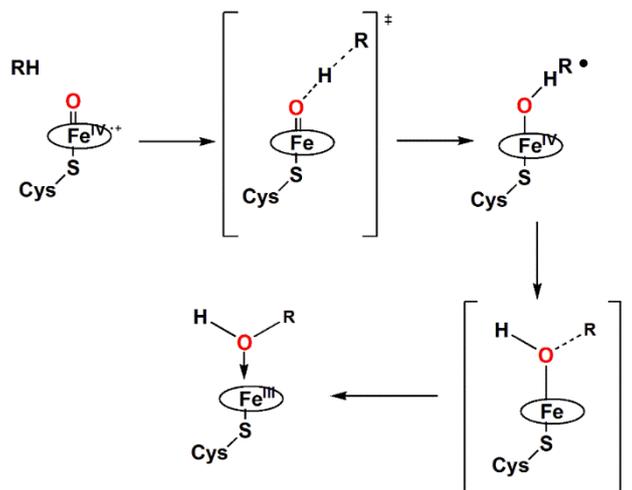


Figure 4: Mécanisme de l'« Oxygen Rebound ».²³

Des réactions de découplage, comme l'« oxidase shunt » rentrent en compétition avec l'oxydation du substrat. Ces réactions sont minimisées dans les cytochromes P450 grâce à un contrôle sophistiqué des transferts de protons et d'électrons par la protéine.²³

1.2. Les dioxygénases de Rieske

Les dioxygénases de Rieske sont des enzymes présentes dans les bactéries du sol. Elles permettent la dihydroxydation énantiospécifique d'hydrocarbures aromatiques, ce qui constitue la première étape

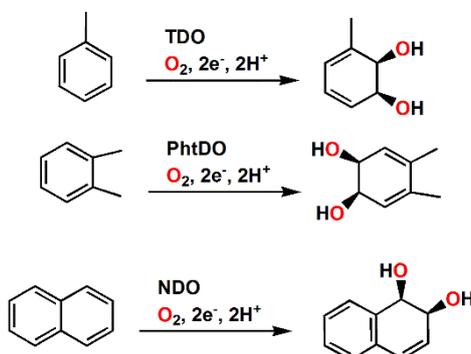


Figure 5: Exemples de réactions catalysées par les dioxygénases de Rieske.

de la biodégradation. Il existe un très grand nombre de ces enzymes dont la toluène 2,3-dioxygénase (TDO), la phtalate 4,5-dioxygénase (PhtDO) et la naphthalène 1,2-dioxygénase (NDO).²⁴⁻²⁶

La dioxygénase de Rieske la plus étudiée est la naphthalène 1,2-dioxygénase de la *Pseudomonas putida*, dont la structure a été résolue en 1998 avec une résolution de 2.25 Å.²⁵

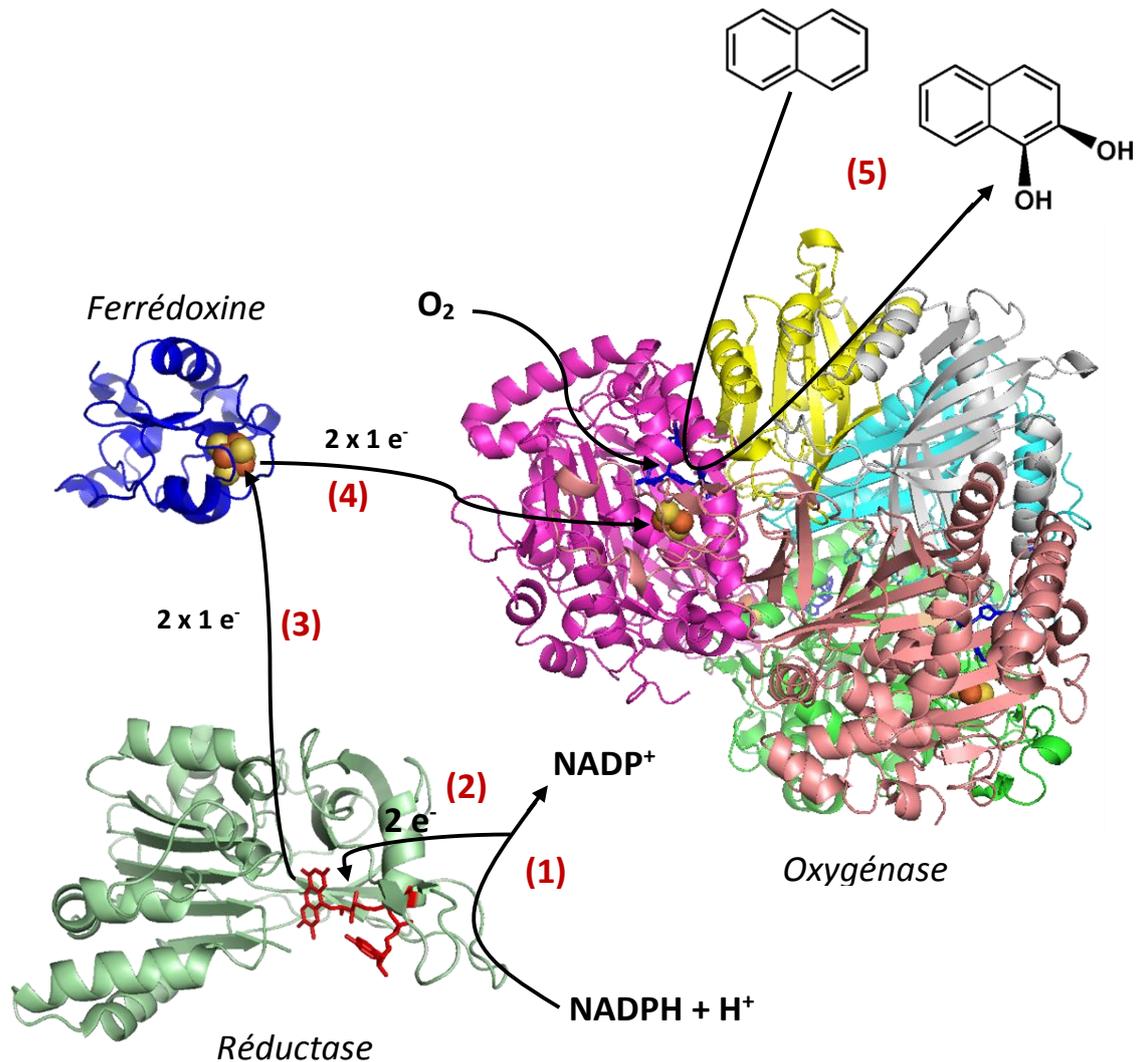


Figure 6: Organisation fonctionnelle des différentes composantes de la naphthalène 1,2-dioxygénase. La flavine est représentée par des traits rouges ; les clusters de Rieske par des sphères et le centre mononucléaire de fer est représenté par des traits bleus (PBD : 2BSA, 1NDO, 2FD2) (d'après Ferraro et al.).²⁷

Ces enzymes sont constituées de trois différentes parties. La première partie est la réductase qui récupère deux électrons en oxydant le NADPH, en les stockant sur une flavine (1 et 2, Figure 6). La seconde partie est une ferrédoxine contenant un cluster [4Fe-4S] qui permet de transférer un à un les deux électrons de la réductase vers l'oxygénase de Rieske par réduction d'un fer constituant le cluster [2Fe-2S] (3 et 4, Figure 6). La troisième partie est l'oxygénase de Rieske qui se présente sous la forme d'un hexamère $\alpha_3\beta_3$ contenant un centre [2Fe-2S] de Rieske ainsi qu'un site mononucléaire de fer localisé dans chaque sous-unité α (zoom de site actif présenté Figure 7). Les deux électrons qui sont transférés un à un de la réductase à l'oxygénase par la ferrédoxine, réduisent un centre de fer sur un des trois clusters [2Fe-2S], et le centre de fer non hémique, ce qui permet la fixation du dioxygène sur le centre actif (5, Figure 6 et Figure 7).²⁷

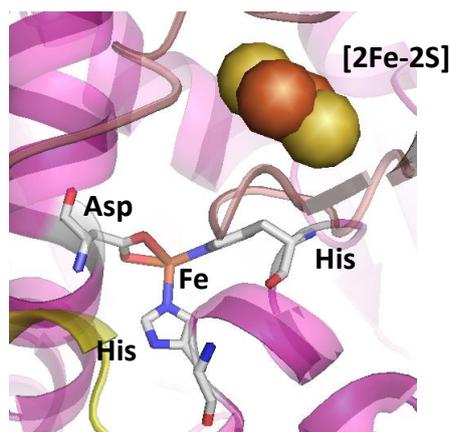


Figure 7: Site actif de l'oxygénase de Rieske (PDB : 1 NDO).

Les deux atomes d'oxygène présents dans le naphthalène *cis*-dihydrodiol proviennent de la même molécule de dioxygène, ce qui suggère une réaction concertée entre le naphthalène et l'espèce oxydante.

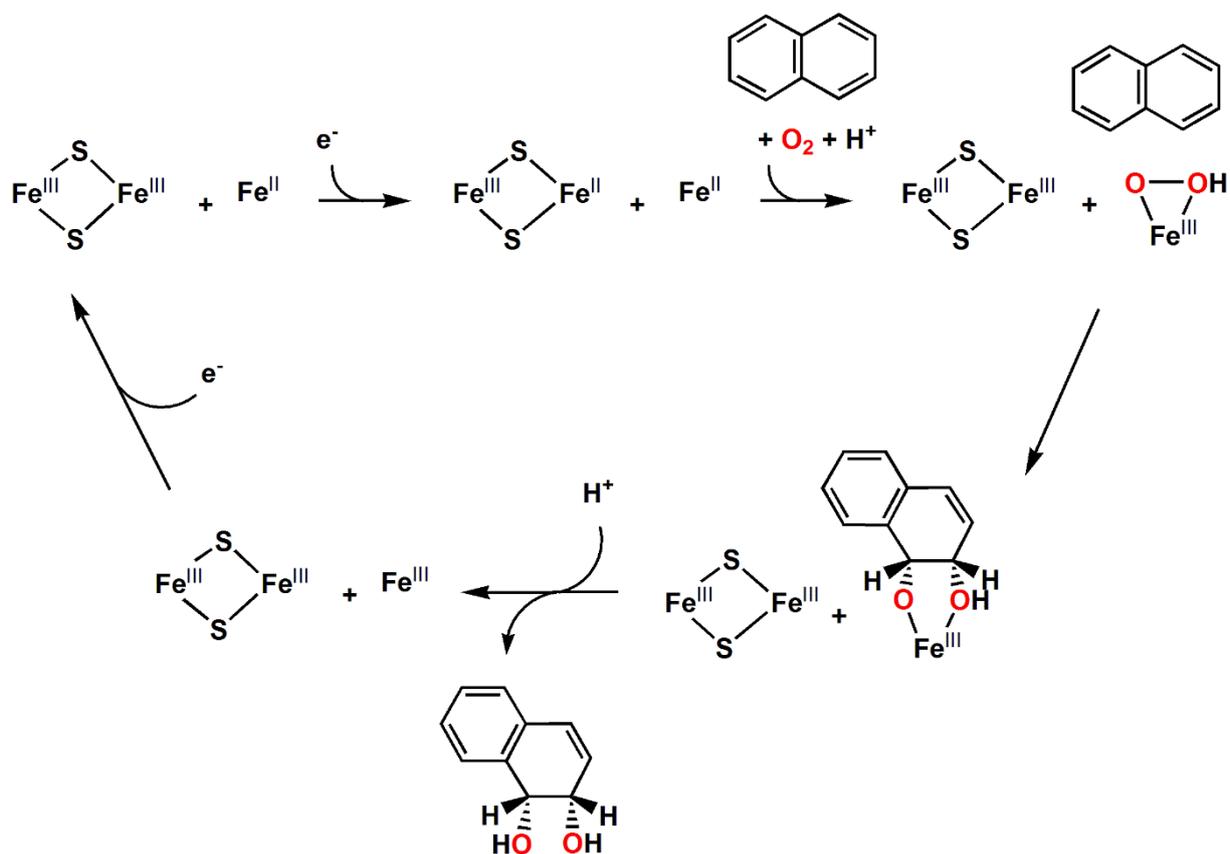


Figure 8: Cycle catalytique de la naphthalène 1,2-dioxygénase.

Des études cristallographiques sur des cristaux de NDO en présence de substrat ont montré une coordination de O_2 au centre de fer(II) non hémique sous la forme de l'adduit $Fe(\eta^2-O_2)$.²⁸ Dans le cas de la réaction entre la benzoate 1,2-dioxygénase et H_2O_2 , l'intermédiaire identifié est un complexe haut-spin $Fe^{III}(\eta^2-OOH)$ d'après des caractérisations par RPE et Mössbauer.²⁹ Cet intermédiaire $Fe^{III}(\eta^2-OOH)$ pourrait directement effectuer l'oxydation des substrats (Figure 8).³⁰

Des études ont montré que la NDO pouvait aussi catalyser la dihydroxylation du naphthalène avec H_2O_2 , qui contribue à l'apport des deux atomes d'oxygène et deux électrons nécessaires pour la réaction.³¹ Cette observation appuie l'idée que l'intermédiaire Fe(III)-OOH est l'intermédiaire clé de la réaction. Une étude de Que et al. a été effectuée sur un complexe non hémique biomimétique $[(\text{TPA})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2](\text{OTf})_2$. Une étude mécanistique utilisant de l'eau marquée ^{18}O , a permis de mettre en évidence l'insertion d'un atome d'oxygène ^{18}O dans le produit de *cis*-dihydroxylation.³² Cela met en avant que les deux atomes d'oxygène présents dans le produit ne proviennent pas uniquement du dioxygène. Un mécanisme prenant en compte ces données a été proposé dans lequel un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})$ est l'espèce active (Figure 9).³²

Le cycle catalytique commence par l'oxydation du centre métallique par H_2O_2 (**A**), puis un équivalent de H_2O_2 conduit à la formation de l'intermédiaire Fe(III)-OOH (**B**). Une molécule d'eau marquée se lie au centre métallique (**C**), et permet la protonation de l'oxygène distal de l'hydroperoxo facilitant la rupture hétérolytique de la liaison O-O conduisant à la formation de l'intermédiaire $\text{Fe(V)}(\text{O})(\text{OH})$ avec le départ d'une molécule d'eau (**D**). L'espèce de haute valence $\text{Fe(V)}(\text{O})(\text{OH})$ attaque le naphthalène pour former le produit de *cis*-dihydroxylation (**F**). Dans ces conditions, un atome d'oxygène inséré provient de l'oxydant, et le second du solvant. Ce mécanisme ne semble pas compatible avec les expériences par marquage isotopique effectuées sur la NDO.^{31,33}

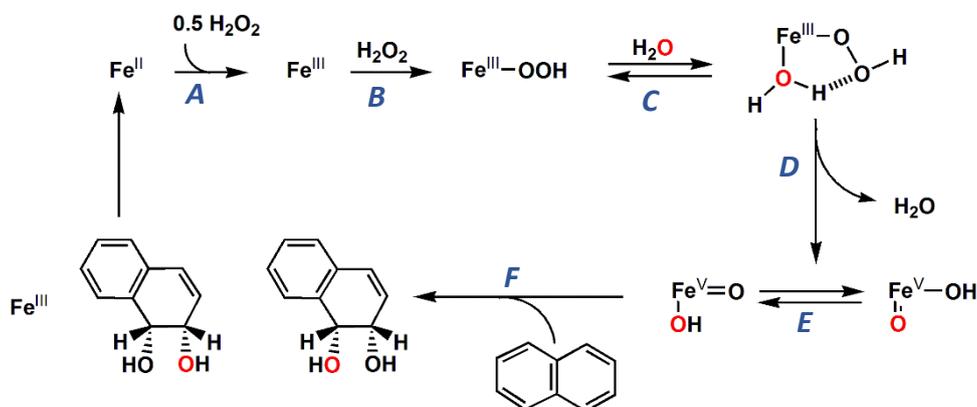


Figure 9: Mécanisme proposé pour la *cis*-dihydroxylation du naphthalène catalysé par le complexe $[(\text{TPA})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2](\text{OTf})_2$. L'atome d'oxygène rouge est ^{18}O .

1.3. Les oxygénases à fer non hémiques utilisant un cosubstrat

La famille des oxygénases à fer non hémiques combinant l'oxydation du substrat avec celle d'un cofacteur est très vaste. Ces enzymes comportent une structure du site actif et une réactivité variées. Contrairement aux cytochromes P450, le fer est initialement dans un état d'oxydation +II, dans une géométrie pseudo octaédrique et il est coordonné par trois acides aminés qui sont deux histidines et un aspartate ou glutamate, ce qui constitue une face de l'octaèdre de coordination. La sphère de

coordination est complétée par trois molécules d'eau. Malgré la multitude d'enzymes constituant cette grande famille, des études spectroscopiques et cristallographiques ont permis de déterminer un mécanisme global analogue dans le site actif (Figure 10).

Au cours de ces études, il a été montré que le fer est très peu réactif vis-à-vis du dioxygène.^{34,35} Ces enzymes utilisent un cofacteur qui permet d'activer le fer, en se liant à ce dernier, ce qui conduit au départ de deux ligands exogènes. Le fer(II) devient pentacoordiné et plus réactif vis-à-vis du dioxygène. La liaison formée entre le fer et le dioxygène initie le déclenchement du cycle catalytique, dont les étapes suivantes diffèrent selon les sous-familles.³⁶

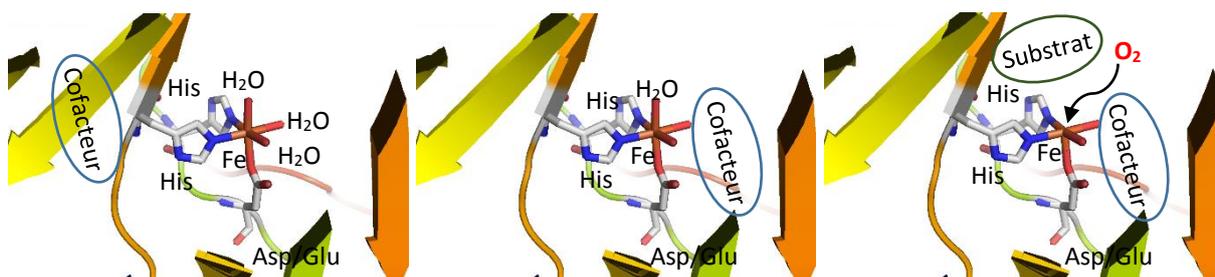


Figure 10: Mécanisme global proposé pour les métalloenzymes à fer(II) non hémiques avec une face de l'octèdre constituée de 2 histidines et de 1 aspartate ou glutamate (adapté de la structure PDB : 1RXF).

Il est possible de distinguer deux sous familles ; elles sont définies selon le cofacteur utilisé pour l'activation du fer.

1.3.1. Les dioxygénases α -cétooglutarate-dépendantes

Ces enzymes font partie de la très grande famille des enzymes à fer(II) non hémiques et nécessitent pour l'activation du fer vis-à-vis du dioxygène de l' α -cétooglutarate (α -CG) comme cosubstrat.

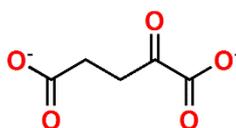


Figure 11: α -cétooglutarate (α -CG).

Cette sous-famille est très grande, et rassemble un grand nombre d'enzymes mononucléaires de fer présentes dans des microorganismes, plantes et animaux. Elles sont d'une grande importance dans les domaines de l'environnement, pharmaceutique et de la médecine.³⁷

Le mécanisme de fonctionnement général de ces enzymes est présenté Figure 12.³⁶

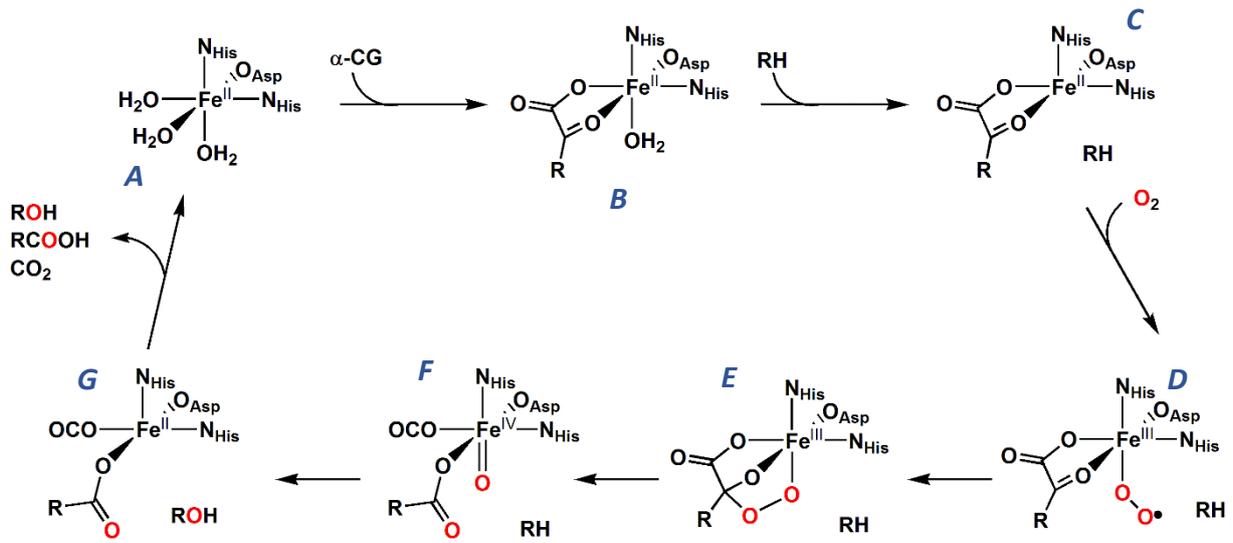


Figure 12: Mécanisme proposé des enzymes α -CG dépendantes. RH désigne le substrat.

L'état initial de l'enzyme correspond à un Fe(II) coordonné par trois molécules d'eau, deux histidines et un carboxylate, qui contient le motif de la triade faciale (A). La sphère de coordination du fer(II) a été établie à froid par EXAFS et dichroïsme circulaire pour différentes enzymes.³⁸⁻⁴⁰ La coordination bidentate de l' α -CG conduit à la décoordination de deux molécules d'eau (B).⁴¹⁻⁴⁵ Le départ de la troisième molécule d'eau lors de l'entrée du substrat au niveau du site actif, laisse le centre actif dans une géométrie pyramidale à base carrée (C), qui est hautement réactif vis-à-vis de l'oxygène moléculaire (D). La coordination du dioxygène au fer conduit à une oxydation du centre métallique et à la formation de l'intermédiaire Fe(III)-superoxo (Fe(III)-OO[•]). Ainsi, l'attaque du dioxygène sur l' α -CG qui est coordonné au fer conduit à la formation d'un intermédiaire (E), qui par rupture hétérolytique de la liaison O-O conduit à la formation d'un intermédiaire Fe(IV)-oxo (Fe(IV)=O) et à la décarboxylation concomitante du cofacteur (F). Cet intermédiaire Fe(IV)=O hautement réactif a été identifié par différentes équipes.⁴⁶⁻⁴⁸ Il contient un ion Fe(IV) haut spin ($S = 2$). Il oxyde le substrat (F → G) selon un mécanisme de type « rebound mechanism ». Le cycle est bouclé après élimination des produits de la réaction (ROH, CO₂, cofacteur décarboxylé). Dans le cas de la TauD, la taurine est hydroxylée avec un effet cinétique isotopique (k_H/k_D) de 37.⁴⁹

1.3.2. Les hydroxylases ptérine dépendantes

Les hydroxylases ptérine dépendantes sont des enzymes qui constituent une petite famille de monooxygénases à fer non hémiques. Elles sont très importantes au niveau de la physiologie des mammifères et utilisent la tétrahydrobioptérin (BH₄) comme cofacteur donneur de deux électrons (Figure 13).

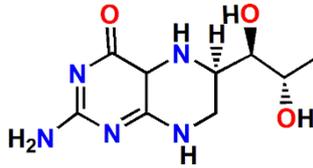


Figure 13: Cofacteur tétrahydrobioptérin (BH₄).

Ces enzymes sont importantes car elles participent à la biosynthèse de neurotransmetteurs. Parmi elles, se trouve la phénylalanine (PheH), la tyrosine (TyrH) et la tryptophane (TrpH) hydroxylases, qui permettent l'hydroxylation régiosélective des trois acides aminés correspondants.

Ces trois enzymes sont connues pour partager de nombreuses propriétés physiques, structurales et catalytiques.⁵⁰

La phénylalanine hydroxylase est présente principalement dans le foie. Cette enzyme permet d'éviter l'accumulation de L-phénylalanine qui peut être métabolisée en phénylpyruvate qui est hautement neurotoxique. La transformation de la L-phénylalanine en L-tyrosine correspond à la première étape du catabolisme. Les tyrosine et tryptophane hydroxylases se trouvent au niveau du système nerveux central et périphérique (Figure 14).

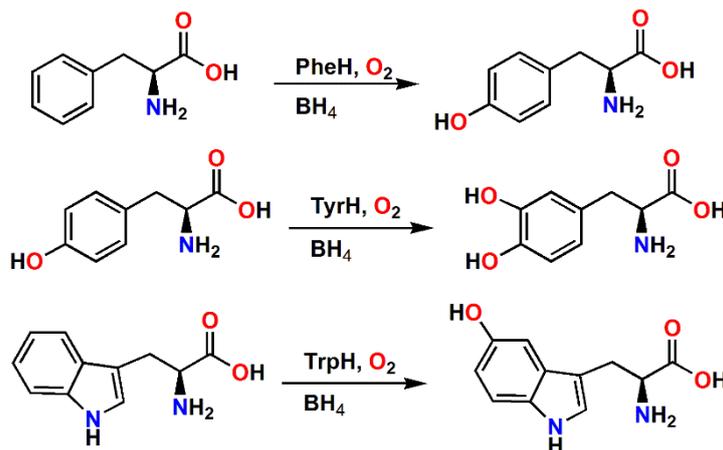


Figure 14: Réactions bilan de la PhH, TyrH et TrpH.

La TyrH est très importante car elle contrôle la biosynthèse de la dopamine, de l'adrénaline et de la noradrénaline. La TrpH est quant à elle à la base de la biosynthèse de la sérotonine et de la mélatonine qui jouent les rôles de neurotransmetteurs et de régulateur du rythme circadien.⁵¹

a) Structure

Les structures des trois enzymes a été résolue par diffraction des rayons X.⁵²⁻⁵⁴ Elles ont permis de déterminer l'environnement du fer au niveau du site actif.

Le fer se trouve dans une poche centrale à 10 Å de la surface de l'enzyme. Il est coordiné par six ligands, dont un motif déjà identifié dans la famille des α -CG, qui est la triade faciale 2-histidine-1-carboxylate (aspartate ou glutamate), et trois molécules d'eau complètent la sphère de coordination du fer. Comme pour les α -cétoglutarates dépendantes, le fer est au degré d'oxydation +II. Dans PheH, l'histidine 290 est positionnée sur l'axe fer-ptérine et est considérée de fait comme un ligand axial ; l'histidine 285 et le glutamate 330 sont des ligands équatoriaux.⁵⁵ Le cofacteur BH_4 est situé dans la deuxième sphère de coordination du métal (Figure 15).

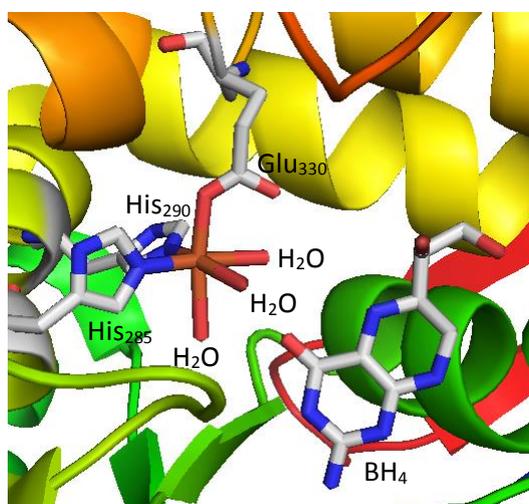


Figure 15: Structure cristalline du site actif de la phénylalanine hydroxylase (PDB : 1J8U).

b) Réactivité

Le mécanisme proposé pour l'activation du dioxygène par les hydroxylases ptériques dépendantes peut être divisé en deux parties (Figure 16).^{56,57} Le ligand glutamate devient bidente après le départ de deux molécules d'eau (**B**). L'interaction avec le substrat conduit également à un déplacement du cofacteur BH_4 , qui permet la formation de l'intermédiaire Fe(II)-peroxoptérine ($Fe(II)-O-O-BH_4$) après coordination de O_2 sur le fer(II) (**C**). Il est ensuite proposé une rupture hétérolytique de la liaison O-O de l'intermédiaire $Fe^{II}-OOBH_4$, qui conduit à la formation de la 4a-hydroxybioptérine (BH_3OH) et d'une espèce Fe(IV)-oxo ($Fe(IV)=O$) qui a été identifié par Mössbauer (**C**).^{58,59} Cet intermédiaire Fe(IV)-oxo haut spin subit une addition électrophile du substrat ce qui est dans le cas du mécanisme proposé Figure 16 de la phénylalanine (**D**). Cette étape est proposée suite à des expériences de marquage isotopique qui ont permis de mettre en avant l'incorporation quasi-quantitative de l' ^{18}O dans l'acide aminé et le cofacteur BH_4 . L'hydroxylation d'un substrat deutéré par la TrpH présente un KIE (effet isotopique cinétique) inférieur à 1 ce qui suggère une étape de substitution électrophile comme étape

limitante s'accompagnant d'un NIH shift compatible avec cette proposition.⁶⁰ La fin du cycle catalytique permet de régénérer le centre actif et le cofacteur ($E \rightarrow F \rightarrow A$).

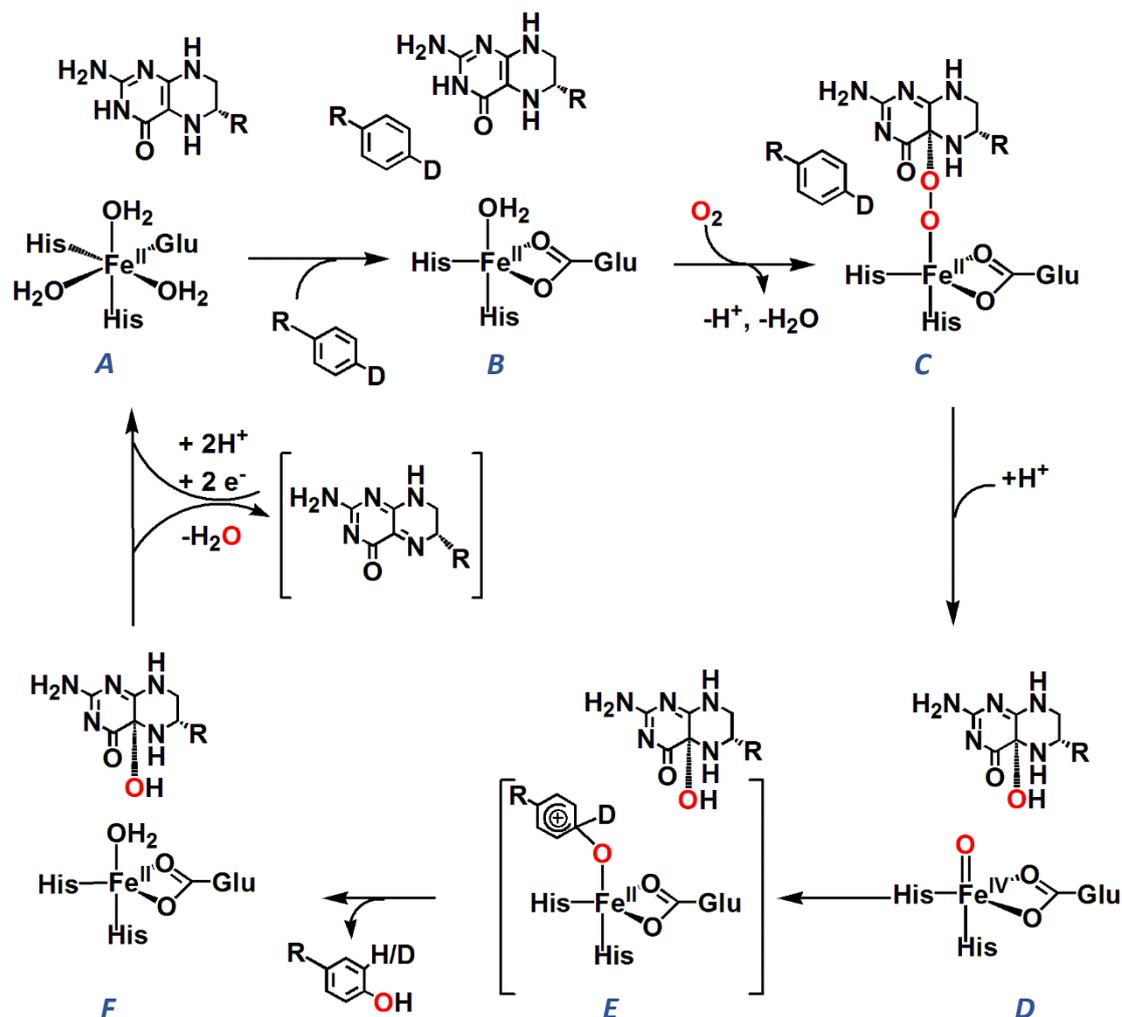
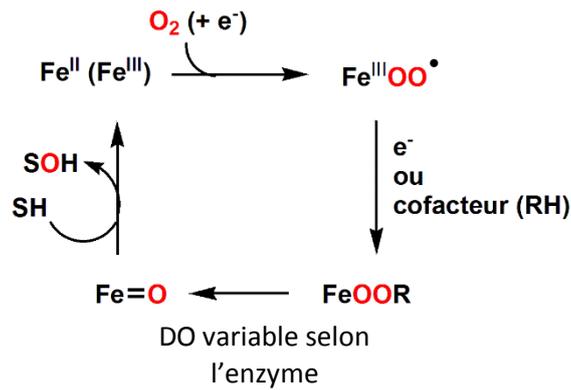


Figure 16: Mécanisme proposé pour l'activation du dioxygène par la phénylalanine hydroxylase (d'après Pavon et al.).⁵⁶

1.4. Conclusions

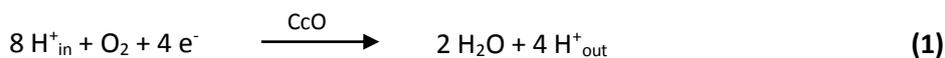
L'étude des structures des Cytochromes P450, des α -cétoglutarates dépendantes, des hydroxylases ptéridine dépendantes et des dioxygénases de Rieske nous a permis de mettre en avant l'importance de l'organisation structurale autour du centre métallique pour le transfert des électrons. La seconde sphère de coordination du centre métallique permet la formation des intermédiaires réactionnels nécessaire pour l'oxydation des substrats, et la structure de la poche catalytique de ces enzymes diminue la formation d'espèces indésirables. Dans tous les cas, l'activation réductrice du dioxygène peut se résumer de la façon suivante :



2. Fixation de systèmes synthétiques sur électrode d'or

Un défi des chimistes est de reproduire au mieux ce que les systèmes naturels réalisent très bien. L'intérêt est alors de disposer de systèmes synthétiques, meilleur marché que les protéines, pour la même utilisation. Dans ces systèmes naturels, il a été montré que la structure du site catalytique ainsi que la seconde sphère de coordination du métal étaient très importantes. D'autre part, l'activation du dioxygène demande un apport d'électrons contrôlé qui provient de cofacteurs.

La cytochrome c oxydase ainsi que les cytochromes P450 sont des métalloenzymes qui catalysent la réduction du dioxygène en eau ou l'oxydation de substrats par le dioxygène respectivement. Dans le cas de la cytochrome C oxydase (Cco), la réaction de réduction de O₂ totale est à quatre électrons tandis que dans le cas du cytochrome P450, la réduction de O₂ est biélectronique pour fournir le substrat oxydé et une molécule d'eau. Ce contrôle de la réduction est nécessaire pour limiter la formation d'espèces réactives du dioxygène (ROS). Les équations bilan pour la Cco et les cytP450 sont décrites ci-dessous :



Les équipes de Collman et Dey ont tenté de reproduire l'apport d'électrons au site catalytique, par greffage de complexes biomimétiques. Des électrodes d'or permettent l'apport des électrons au centre métallique, nécessaires à l'activation réductrice du dioxygène ou à sa réduction complète.

2.1. Modèle de la cytochrome c oxydase (CcO)

L'équipe de Collman a notamment développé des systèmes biomimétiques de la cytochrome c oxydase (CcO) qui catalyse la réduction du dioxygène en eau. Cette réduction à quatre électrons doit se faire sans générer des espèces toxiques telles que les espèces réactives du dioxygène (ROS) (O_2^- , O_2^{2-} , OH^\bullet). Les modèles synthétisés par cette équipe permettent de retrouver le même environnement autour du site actif porphyrinique que dans la CcO (Figure 17).⁶¹

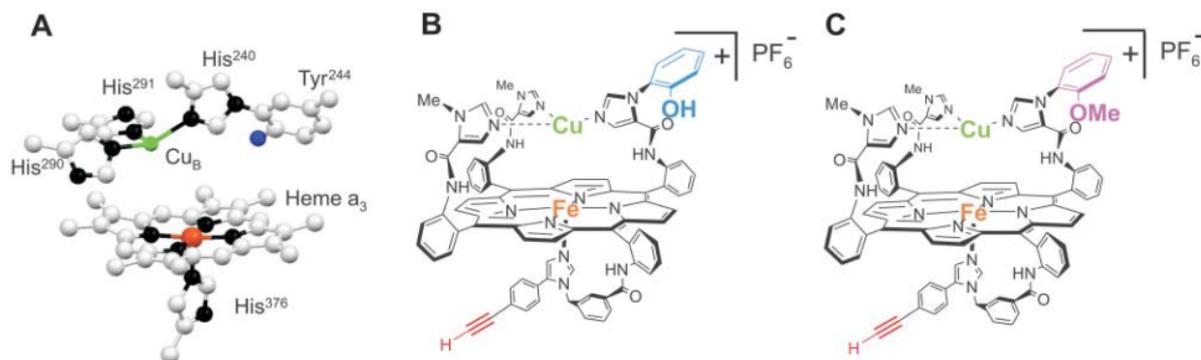


Figure 17: **(A)** Structure du site actif de la CcO provenant du cœur d'un bovin (PDB : 1OCC). **(B)** et **(C)** Modèles structuraux du site actif de la CcO (Collman et al.).⁶¹

Le site actif de la Cco présente une porphyrine de fer, et un cuivre distal (Cu_B), coordiné par trois histidines. Une tyrosine (Tyr₂₄₄) est dans l'environnement proche du cuivre distal. Le rôle du cuivre Cu_B et de la Tyr₂₄₄ est encore débattu ainsi que le mécanisme global. Cependant dans les conditions de « single turnover », il a été montré que chacun effectuait la médiation d'un électron permettant la coordination du dioxygène sur le site actif, en plus des deux électrons fournis par le fer de l'hème_{a3}.⁶¹ Cette rapide réduction intramoléculaire dans l'environnement hydrophobe diminue le temps de vie des espèces de type ROS.

L'équipe de Collman a donc développé des modèles structuraux du site actif de la Cco (Figure 17 **(B)** et **(C)**) possédant deux sites redox, un hème et un cuivre distal coordiné par des imidazoles, avec un phénol à proximité du cuivre remplaçant la Tyr₂₄₄. Il a été montré que le cuivre distal et le phénol sont nécessaires pour la réduction sélective à quatre électrons du dioxygène à pH et potentiel physiologique.⁶²⁻⁶⁵ Dans le cadre des expériences en « single turnover », les complexes modèles effectuant une réduction à quatre électrons comme observé pour l'enzyme native. Cependant, le mélange réactionnel final contient du fer(IV) ainsi que des radicaux de phénol, impliquant la formation de ROS.

Dans le but de maîtriser l'apport des électrons aux complexes modèles, l'équipe de Collman a greffé ces complexes sur des électrodes d'or. Les systèmes sur électrode d'or sont des couches moléculaires auto-assemblés (SAMs). Les complexes sont reliés à la surface d'or par des liaisons

covalentes de type Au-S. Pour cela, les modèles sont fonctionnalisés avec un bras alcyne qui par chimie click réagit avec un azoture préalablement greffé sur la surface d'or (Figure 18).^{66,67}

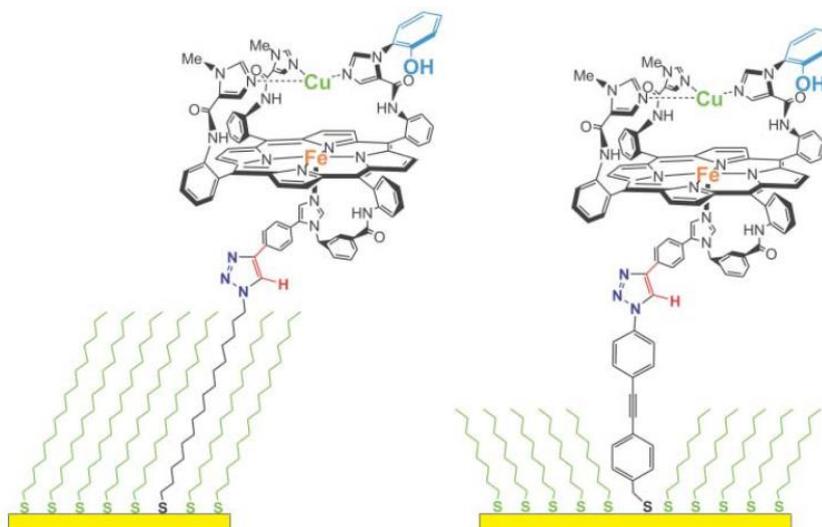


Figure 18: Schéma des modèles synthétiques de Cco, par une chaîne aliphatique (à gauche) et par une chaîne conjuguée (à droite), sur une électrode d'or modifiée (jaune), par un film SAM (vert) (d'après Collman et al.).⁶¹

La vitesse du transfert d'électrons entre le complexe et l'électrode peut être modulée selon la longueur et la conjugaison de la chaîne du film. Dans le cas de la chaîne aliphatique (Figure 18 (gauche)), le transfert d'électrons est lent ($k^{\circ} = 6 \text{ s}^{-1}$), tandis que dans le cas de la chaîne conjuguée (Figure 18 (droite)), le transfert d'électrons est rapide ($k^{\circ} = 1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$).^{61,68} Le potentiel auquel la catalyse démarre est le même dans les systèmes rapide et lent.

La présence du cuivre distal et du phénol redox actif n'est pas nécessaire pour la réduction totale du dioxygène dans le cas de la SAM à transfert d'électrons rapides. Les électrons apportés par le phénol et le cuivre dans le système naturel sont délivrés dans ce cas par l'électrode, compensant l'absence du cuivre et du phénol.

Par comparaison, la SAM à lent transfert électronique, où le cycle catalytique est limité par le transfert d'électrons, présente des résultats proches de ceux observés avec le système biologique. Dans ce cas, l'absence du phénol à proximité du site actif conduit à la formation de ROS conduisant à la dégradation du catalyseur. Le complexe B greffé sur la surface d'or peut réduire le dioxygène sélectivement à quatre électrons lorsque le transfert électronique est l'étape limitante. Avec ce système, il a été possible d'effectuer la réduction du dioxygène en eau à l'aide des quatre électrons avec une sélectivité de 96 %, contre 99 % dans la CcO. La formation des ROS reste dans ces systèmes très limitée, et tous les électrons fournis au système sont utilisés pour la réaction désirée.

Les résultats de ces études montrent clairement que des systèmes synthétiques sont capables de présenter une activité catalytique aussi performante que des métalloenzymes et ce, dans des conditions expérimentales semblables.

2.2. Modèles d'oxygénases

2.2.1. Modèles fonctionnels dinucléaires

Une adaptation de ces systèmes en remplaçant le cuivre par du fer(II) a également été faite par Collman et al.⁶⁹ Le système avec un complexe de fer(II) hémique et un complexe de fer(II) non hémique est capable d'activer le dioxygène en générant un intermédiaire Fe(III)-(μ-peroxo)-Fe(III). Cette espèce évolue par rupture homolytique de la liaison O-O, en un complexe hémique/non-hémique bis Fe(IV)-oxo qui est capable de transférer les atomes d'oxygène à la triphénylphosphine ou de produire de l'eau en présence de protons et d'électrons (Figure 19).⁶⁹

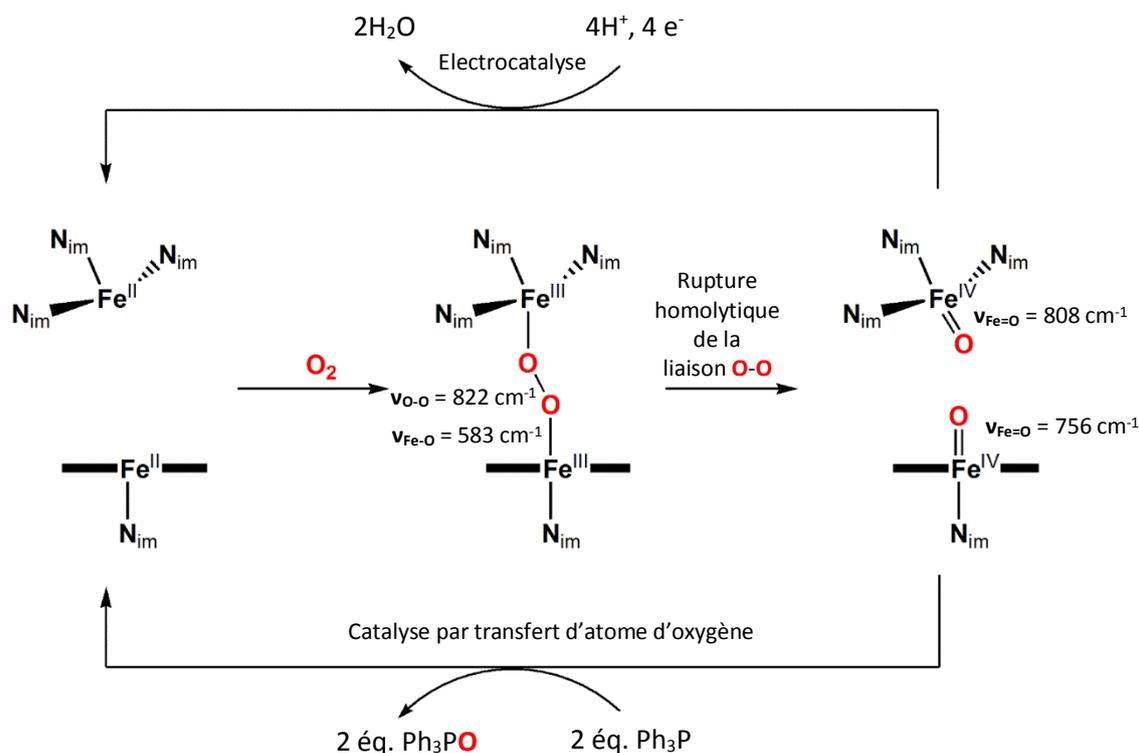


Figure 19: Mécanisme proposé par Collman et al. pour la réaction du dioxygène avec le système bis-fer(II).⁶⁹

En condition de « single turnover », cette espèce bis-fer(IV)=O peut oxyder ainsi deux équivalents de substrat avec une très faible génération de ROS. En l'absence de PPh₃ et en présence d'un flux d'électrons, le même système permet la réduction de O₂ en H₂O. Seulement 3 à 6 % de ROS sont formées selon que le transfert d'électrons est rapide ou lent, respectivement.

2.2.2. Modèles fonctionnels mononucléaires

L'hémoglobine, la myoglobine et les cytochromes c oxydases, possèdent un hème pour la fixation du dioxygène. Le ligand axial est un imidazole qui provient d'une histidine. Le cytochrome P450 possède également un site actif hémique, mais le ligand axial est un thiolate provenant d'une cystéine.

Lors de l'activation du dioxygène, le ligand proximal induit des effets électroniques de type « push » (effets électroniques donneurs) tandis que les acides aminés de la seconde sphère de coordination du côté distal, accepteur de liaisons hydrogènes, induisent des effets électroniques de type « pull ».⁷⁰

Il est important de comprendre la contribution des ligands proximaux ainsi que l'environnement distal pour expliquer les diverses réactivités des protéines. Cependant, un grand problème se pose quant à la synthèse de systèmes hémiques de fer avec en position axiale un thiolate ou un imidazole. Les composés obtenus sont très peu stables en présence de dioxygène, ou dans les solvants aqueux.^{23,71-73} D'autre part, aucun de ces systèmes modèles en présence de dioxygène n'a montré une bonne efficacité pour l'oxydation de petites molécules organiques par O₂. Contrairement aux enzymes pour lesquelles deux électrons sont nécessaires pour activer O₂, une surconsommation d'électrons a été observée avec ces systèmes synthétiques menant vraisemblablement à la réduction de O₂ en H₂O.⁷⁴⁻⁷⁸ Dans le cas des porphyrines, cette réaction nécessite des protons, des électrons et du dioxygène selon le bilan suivant :

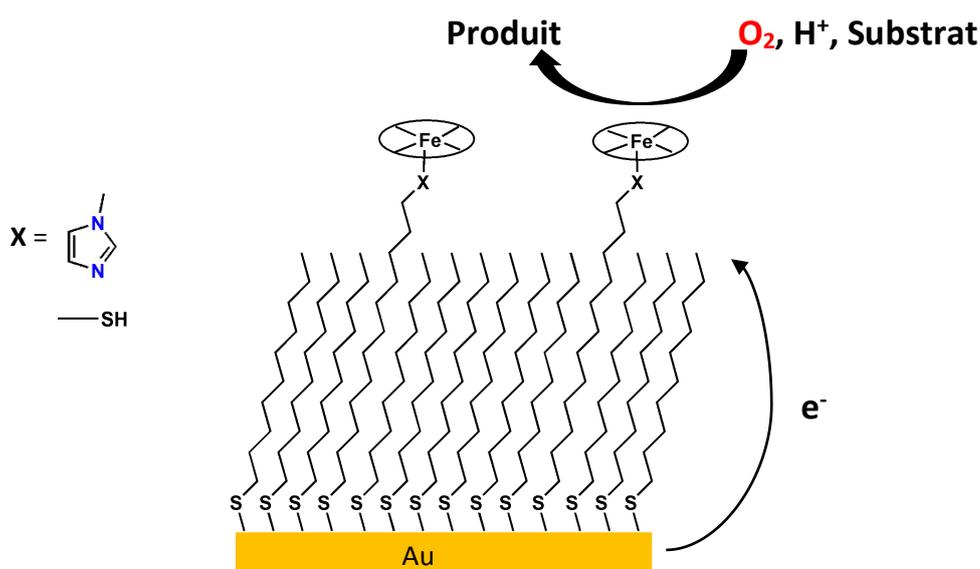
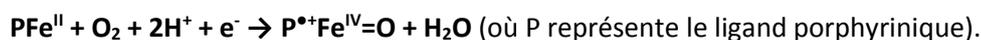


Figure 20: Schéma de principe de l'oxydation de substrat en présence de O₂, H⁺ et des électrons apportés par l'électrode au centre actif.

Dey et al. ont développé des systèmes dont l'étude mécanistique permet de mieux comprendre comment former les intermédiaires réactionnels avec efficacité.

L'objectif est de former ces intermédiaires hautement oxydants à partir du dioxygène afin de ne plus utiliser d'oxydants chimiques. Dans les systèmes proposés par Dey, l'électrode joue le rôle de réductase permettant l'apport des deux électrons nécessaire au site actif pour la réduction du dioxygène (Figure 20).^{79,80}

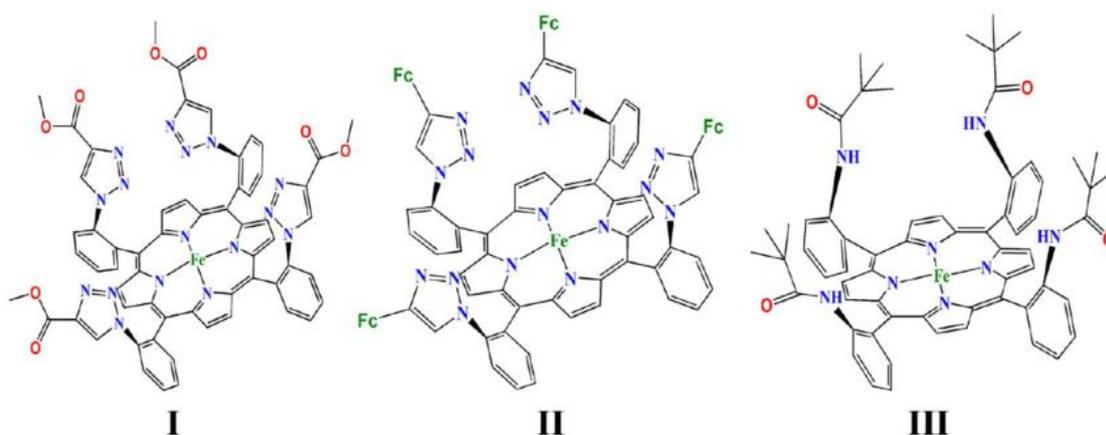


Figure 21: Représentation des complexes hémiques de fer utilisés comme catalyseurs (d'après Dey et al.).⁷⁹

Deux types de systèmes ont été étudiés, le ligand axial et le ligand distal étant variables. Afin de pouvoir étudier l'influence du ligand sur le système modèle porphyrinique, l'équipe de Dey a utilisé trois types de complexes hémiques dont l'environnement distal varie (Figure 21) et deux types de thiols fonctionnalisés en bout de chaîne (imidazole et thiol) ont été greffés sur surface d'or pour étudier l'effet du ligand axial (Figure 22).⁷⁹

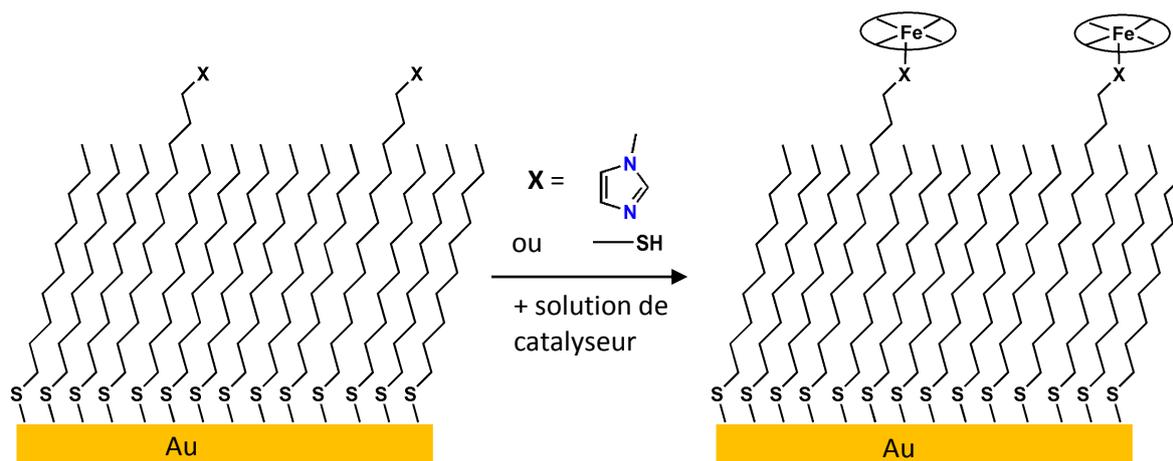


Figure 22: Schéma de principe de construction d'électrodes bio-inspirées (d'après Dey et al.).⁷⁹

La dépendance en pH du potentiel de demi-vague du couple $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ suggère que le thiolate axial augmente le pKa du ligand aqua en position trans de sorte à conserver H_2O pour l'oxydation du site ferrique à des pH aussi hauts que 9. Dans le cas où le ligand axial est un imidazole, le pKa de H_2O varie

de 6 à 8 selon le ligand distal.^{79,81} D'autre part, la production de ROS est plus importante dans le cas où le ligand axial est le thiolate et non l'imidazole (10 % de ROS pour 5 % respectivement), et cela ne dépend pas du ligand distal utilisé.

Les ROS résultent du découplage des espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}^\bullet/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ et mettent en avant un effet « push » plus important dans le cas d'un ligand thiolate en position trans. Pour les complexes I et II (Figure 21) où un groupement triazole est présent dans la poche distale, et dans le cas où le ligand axial est un thiolate, des quantités importantes de ROS sont produites.

Une étude mécanistique de la réduction de O_2 menée par RRDE (électrode tournante disque-anneau) couplée à du Raman de résonance exalté de surface a été effectuée.^{79,80} La RRDE permet de suivre le potentiel appliqué, l'intensité et la détection électrochimique des espèces générées (ROS éventuelles) au niveau de l'anneau. La résonance Raman permet une caractérisation des complexes métalliques générés à la surface de l'électrode. Dans le cas présenté, le ligand axial est un thiolate. Les études ont permis d'établir les cycles catalytiques suivants :

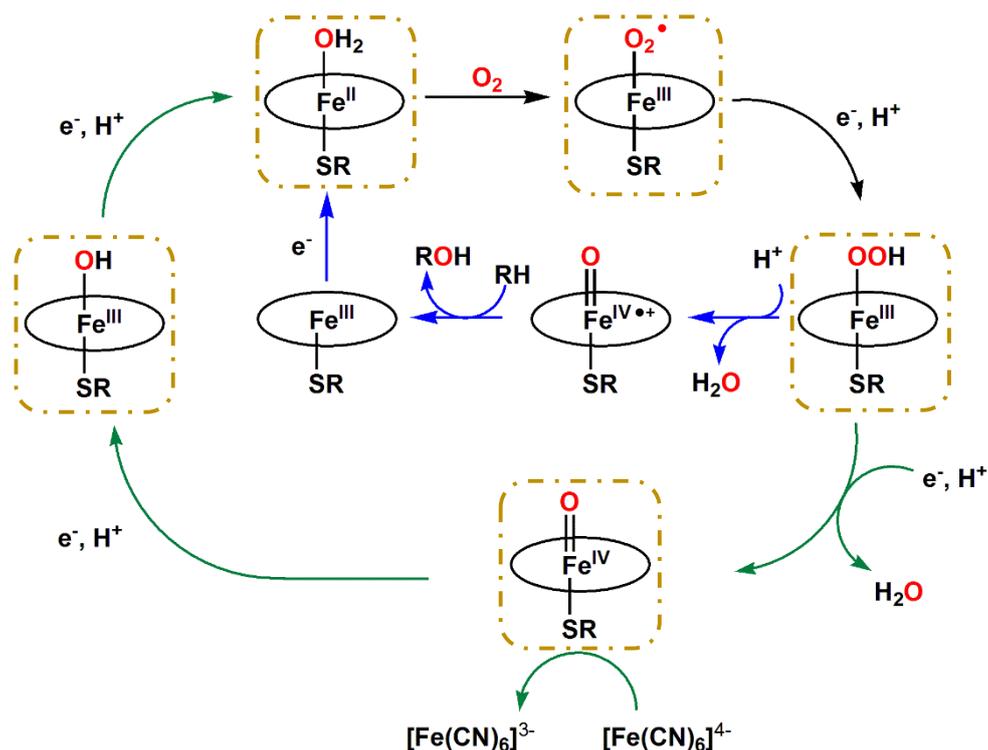


Figure 23: Représentation schématique de la compétition des réactions au niveau de l'électrode bioinspirée.
 → Cycle de type oxydase ; → Cycle de type oxygénase ; - - - Complexes intermédiaires identifiés par résonance Raman.

Il y a une compétition entre la formation d'un intermédiaire de haute valence de type $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ qui peut oxyder des petites molécules organiques (flèches bleues Figure 23) selon un mécanisme analogue aux P450 et la réduction de cette espèce par un transfert d'électrons fournis par l'électrode (flèches vertes Figure 23) conduisant à la réduction du dioxygène par 4 électrons et 4 protons. Le transfert

d'électrons peut être ralenti par un allongement de la chaîne carbonée de la chaîne thiol. Cela permet d'augmenter le temps de vie de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ et $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$, ce qui peut augmenter la probabilité d'un processus catalytique d'oxydation.

Les systèmes synthétiques greffés sur électrode d'or miment la réactivité des monooxygénases ; en reproduisant des intermédiaires réactionnels identifiés dans les systèmes biologiques. Cette activité, qui nécessite un contrôle optimal des transferts d'électrons, est en compétition avec une activité de type oxydase au cours de laquelle O_2 est réduit en H_2O . L'amélioration du contrôle du flux d'électrons devrait permettre d'utiliser O_2 à la place des oxydants chimiques usuels dans des réactions d'oxydation.

3. Les métalloenzymes artificielles

3.1. Concept général

L'étude de systèmes biologiques telle que nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre a permis de montrer l'importance de la première et de la seconde sphère de coordination du métal des métalloenzymes. En comparant la biocatalyse aux catalyseurs synthétiques, il a été mis en avant que la catalyse en phase homogène possède des limites notamment au niveau de la stéréochimie des réactions. D'autre part, des optimisations génétiques sont nécessaires en biocatalyse pour augmenter la gamme de substrats. Les limites de ces deux systèmes ont mené au développement de systèmes qui regroupent les avantages de ces deux méthodes dans un objet appelé métalloenzyme artificielle, le but étant d'avoir une synergie entre les avantages de la catalyse homogène et de la biocatalyse.

Tableau 1: Comparaison des différentes propriétés de la catalyse homogène et de la biocatalyse d'après Ward.⁸²

	Catalyse homogène	Biocatalyse
Nombre de substrats	Grand	Petit
Solvant	Organique	Aqueux
Répertoire réactionnel	Large	Restreint
2nd sphère de coordination	Mal définie	Bien définie
Nombre d'énantiomères	Deux	Un
Nombre de cycles catalytiques	Faible à moyen	Grand
Optimisation	Chimique	Génétique
Recyclage	Problématique	Aisé

Les métalloenzymes artificielles sont des catalyseurs hybrides résultant de l'introduction d'un complexe métallique possédant une activité catalytique dans une macromolécule hôte, telle qu'une protéine, de l'ADN ou un anticorps, qui va procurer une seconde sphère de coordination très bien définie et qui doit induire la sélectivité de la réaction (Figure 24).⁸²

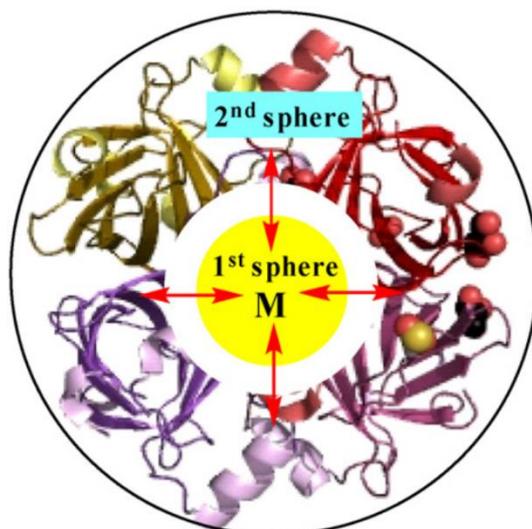


Figure 24: Représentation schématique d'une métalloenzyme artificielle avec le complexe métallique M (jaune) entouré par des acides aminés de la protéine (d'après Ward et al.).⁸²

La première sphère de coordination correspond aux atomes du ligand coordonnés au centre métallique et à des acides aminés, la seconde sphère de coordination est constituée d'acides aminés de la protéine interagissant avec le ligand du complexe. La réactivité de ces systèmes est imposée par le complexe inorganique inséré dans la protéine. La seconde sphère de coordination du catalyseur va directement influencer l'arrivée du substrat et son positionnement par rapport à l'ion métallique dans la poche catalytique.

Plusieurs approches sont possibles pour insérer le complexe inorganique au sein d'une protéine. Soit via un greffage covalent : le complexe métallique est introduit dans la protéine grâce à la formation d'une liaison covalente entre le ligand et un acide aminé ; soit via une liaison de coordination : le complexe peut aussi être ancré dans la protéine grâce à l'établissement d'une liaison de coordination entre le métal et un acide aminé ; enfin, via une reconnaissance supramoléculaire basée sur la reconnaissance d'une molécule pour une protéine. La fonctionnalisation du ligand par cette molécule permet d'insérer le complexe métallique dans la protéine qui est fixé par interactions non covalentes.

D'autres types d'interactions non covalentes entre les acides aminés de la protéine et le complexe telles que des liaisons ioniques, des liaisons hydrogènes, et des interactions hydrophobes telles que le π -stacking entre deux noyaux aromatiques, peuvent être mises en jeu.⁸³ Toutes ces interactions sont résumées Figure 25.

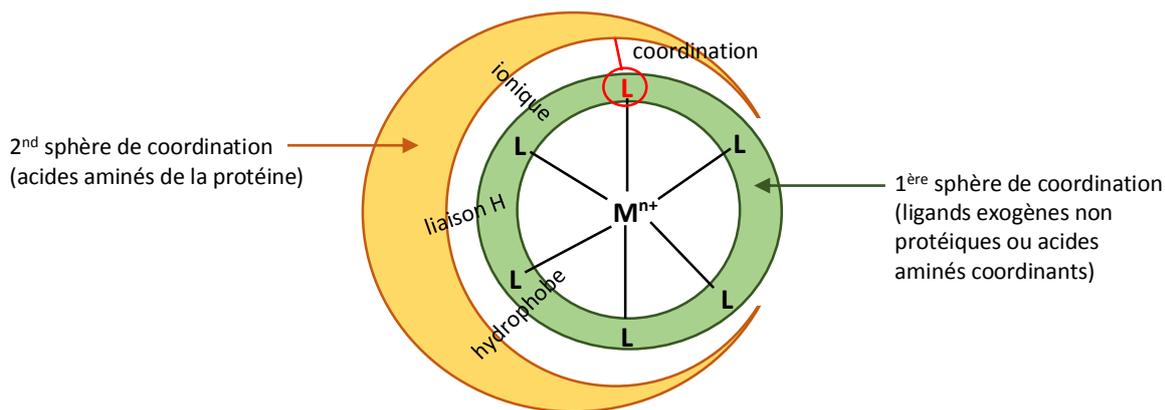


Figure 25: Schéma des interactions possibles entre le complexe métallique et la protéine.

On peut donc envisager une augmentation de la sélectivité des réactions et de leur vitesse de réaction avec un comportement de type Michaelis-Menten pour ces catalyseurs hybrides par rapport au complexe métallique seul.

3.2. Elaboration d'oxygénases artificielles

Depuis les travaux de pionniers comme Kaiser et Whitesides dans les années 70 sur la synthèse de catalyseurs hybrides,^{84,85} le design, la synthèse et les applications des métalloenzymes artificielles ont fait des progrès très importants avec une palette de réactions étudiées variée.^{82,83,86} Les différentes stratégies d'obtention des hybrides peuvent être catégorisées en trois groupes : la stratégie par liaison de coordination, l'insertion par reconnaissance supramoléculaire ou liaison non covalente et l'insertion covalente. Ces trois stratégies vont être illustrées dans la suite pour différentes réactions d'oxydation uniquement.

3.2.1. Stratégie par liaisons de coordination

La stratégie utilisée par Watanabe et al. en 2003 a été basée sur l'échange du cofacteur hémique dans la myoglobine (Mb) par un complexe de type base de Schiff de chrome(III).⁸⁷ Cela nécessite de bien connaître le site actif de la protéine, afin de pouvoir optimiser la poche enzymatique par mutagenèse. Dans la myoglobine native, le cofacteur hémique est lié à la chaîne polypeptidique par la coordination d'un atome d'azote d'un résidu histidine (His93) sur le centre métallique sans aucune autre liaison. Ce résidu est nécessaire pour le maintien du cofacteur au sein de la protéine.

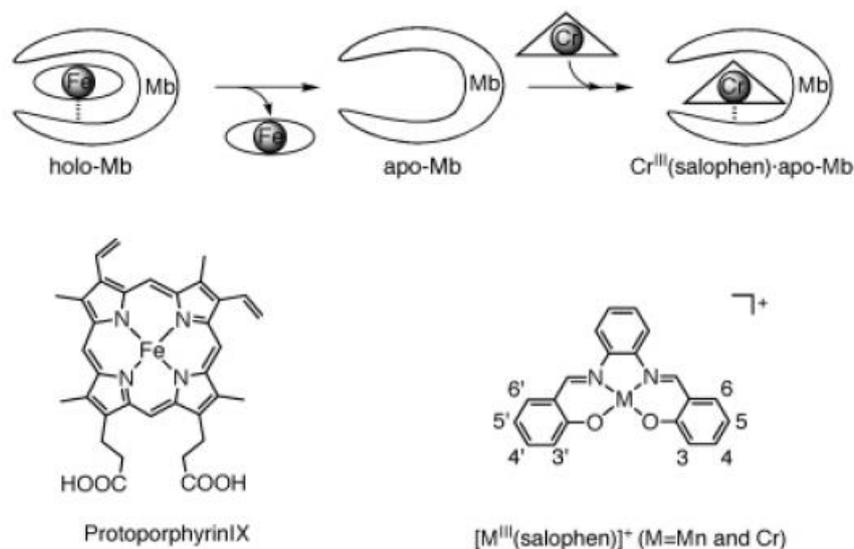


Figure 26: Schéma de principe de la stratégie adoptée par Watanabe et al. pour l'insertion du complexe $[M(\text{salophen})]^+$ (d'après Watanabe et al.).⁸⁷

Les Figure 26 et Figure 27 présentent l'insertion non covalente du complexe $[\text{Cr}^{\text{III}}(\text{salophen})]^+$ dans la cavité de l'apo-Mb, celle-ci ayant été modifiée par mutagenèse. Les modifications apportées à l'apo-Mb ont été effectuées de façon à augmenter l'interaction du complexe avec la poche enzymatique et l'accès du substrat dans la poche. Comme observé avec l'hème dans la protéine native, His93 se coordine au complexe de chrome. Un remplacement de His64 par Asp augmente l'accès du substrat (thioanisole) et de l'oxydant (H_2O_2) au site distal vacant du centre métallique,⁸⁸ et la chaîne Ala71 dans la myoglobine échangée par Gly augmente l'espace distal pour améliorer l'affinité du complexe avec la protéine, et aussi favoriser l'approche du substrat dans la poche enzymatique.

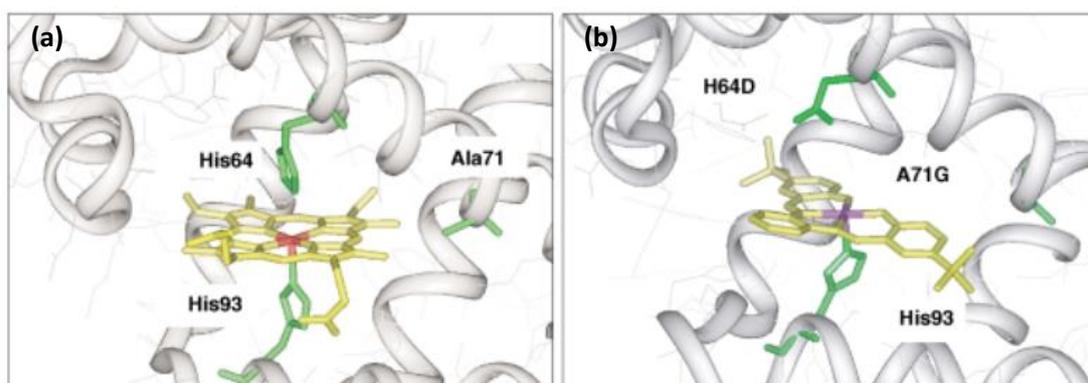


Figure 27: Comparaison de la myoglobine native (a) et de l'hybride Cr.2.apo-Mb (H64D/A71G) (b). L'hème et le complexe $[\text{Cr}^{\text{III}}(\text{salophen})]^+$ sont colorés en jaune, les résidus interagissant avec les cofacteurs et ceux qui sont mutés sont colorés en vert, l'ion Fe^{III} est coloré en rouge (a) et l'ion Cr^{III} (b) en violet. Ces structures résultent de modélisations moléculaires (d'après Watanabe et al.).⁸⁷

L'organisation similaire autour du site actif dans le système natif et dans le système hybride montre l'importance de la coordination de His93 au centre métallique, qui permet de maintenir le complexe dans apo-Mb.

Des tests de catalyse de sulfoxydation ont été effectués avec le complexe Cr.2.apo-Mb (H64D/A71G) en utilisant l'eau oxygénée comme oxydant. Une activité catalytique a été mise en avant ($78 \cdot 10^{-3} \text{ cycles min}^{-1}$) avec un excès énantiomérique moyen de 13 %, ce qui en comparaison avec le même complexe seul présente une amélioration ($13 \cdot 10^{-3} \text{ cycles min}^{-1}$) sans excès énantiomérique (Figure 28).

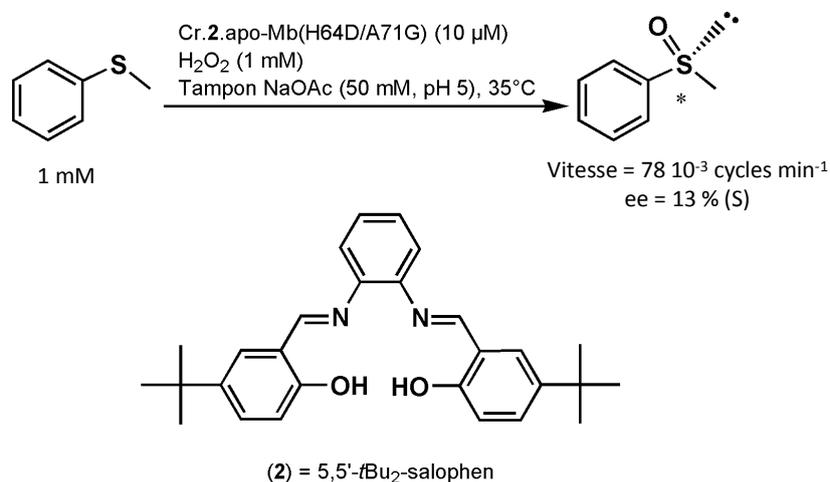


Figure 28: Sulfoxydation du thioanisole catalysée par Cr.2.apo-Mb (H64D/A71G).

3.2.2. Insertion par reconnaissance supramoléculaire et ionique

a) Stratégie du cheval de Troie : Streptavidine/biotine

La première métalloenzyme artificielle est issue de cette stratégie. En 1978, Whitesides et Wilson ont travaillé avec un complexe de rhodium présentant un ligand possédant un bras espaceur avec le motif biotine qui a une très grande affinité pour l'avidine ($K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$).⁸⁵ Le bras biotine sert à fixer le complexe dans la protéine avec une force de liaisons proche de celles des liaisons covalentes (Figure 29).

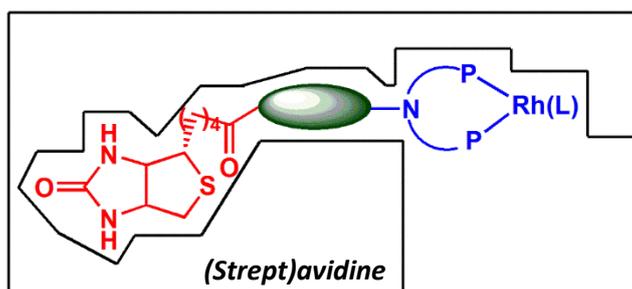


Figure 29: Schéma de principe de la stratégie du « Cheval de Troie » avec l'exemple d'approche biotine/(strept)avidine. La biotine est coloriée en rouge, le bras espaceur est coloriée en vert et la partie catalyseur est coloriée en bleu. (strept)avidine = streptavidine ou avidine.

Un des travaux qui illustre le principe de la stratégie du « cheval de Troie » est le travail de Ward et al. publié en 2005.⁸⁶ Comme dans l'exemple précédent, la protéine hôte est l'avidine ou la streptavidine et les complexes testés ont des ligands amino-sulfonamide biotinylés (Figure 30).

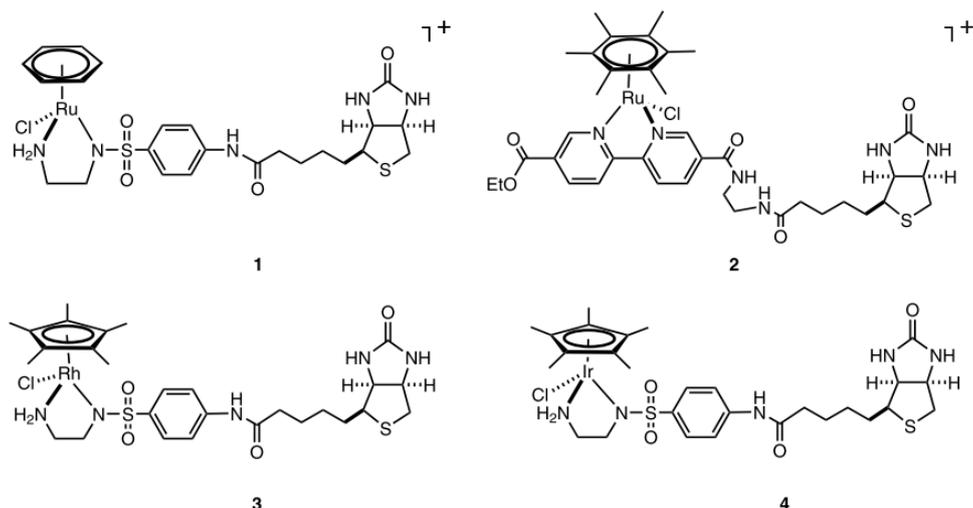


Figure 30: Coenzymes avec ligands biotine testées pour la catalyse d'oxydation d'alcools (d'après Ward et al.).⁸²

Ces systèmes ont été utilisés pour catalyser l'oxydation d'alcools par tBuOOH. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Résultats de catalyse d'oxydation du 1-phényléthanol par les hybrides.

Complexe	Protéine hôte	Rdt (%)
1	Streptavidine	81
2	Streptavidine	69
3 (140 h)	Streptavidine	3
4 (140 h)	Streptavidine	12
1	Avidine	92

Conditions : alcool (62.5 μM), tBuOOH_{aq} (75 μM), complexe (0.25 μM) dissous dans DMF, protéine (0.08 μM) dissoute dans un mélange H₂O/acétone (500 μL / 100 μL)

Une électrophorèse du mélange réactionnel indique que la protéine hôte n'est pas dégradée pendant la catalyse. Les résultats de catalyse d'oxydation de l'alcool en cétone montrent de très bons rendements avec les complexes **1** et **2**, à base de ruthénium.

b) Stratégie du cheval de Troie : reconnaissance anticorps/antigène

Une autre variante de la stratégie du « Cheval de Troie » développée par Mahy et al., est basée sur la très bonne affinité d'un anticorps pour son antigène (Figure 31). L'anticorps 7A3 présente une très

forte affinité pour l'œstradiol avec une valeur de K_d de l'ordre de 10^{-10} M.⁸⁹ Des métalloenzymes artificielles ont été préparées en insérant une porphyrine fonctionnalisée avec 7A3 dans l'œstradiol.

Les métalloenzymes artificielles obtenues présentent une activité peroxydase, et permettent la sulfoxydation du thioanisole par l'oxydant H_2O_2 avec des excès énantiomériques modérés.^{90,91}

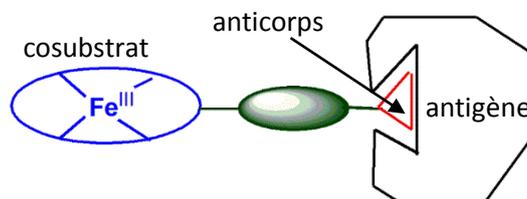


Figure 31 : Schéma de la stratégie "Cheval de Troie" basée sur l'interaction anticorps/antigène.

L'efficacité réactionnelle est également améliorée dans ces systèmes par rapport au complexe seul, ce qui suggère une protection du cofacteur par l'anticorps vis-à-vis des dégradations oxydantes.⁹⁰ L'optimisation de ces systèmes par échange du centre métallique dans la porphyrine et l'utilisation de différents oxydants, a permis d'observer des excès énantiomériques de l'ordre de 10 % pour la sulfoxydation du thioanisole par H_2O_2 . Dans le cas de l'oxydation du styrène, l'activité catalytique de la porphyrine de manganèse a été améliorée de 38 % grâce à l'effet protecteur de la protéine.⁹²

Le désavantage de cette stratégie est que le complexe se trouve en dehors de la protéine et ne présente pas de seconde sphère de coordination bien définie.

c) Stratégie par liaisons ioniques

Un exemple d'oxygénase artificielle par insertion non covalente du complexe est celui publié par Ricoux et al.⁹³⁻⁹⁵ La protéine choisie, est la β -1,4-endoxylyanase (xylanase A, Xyl10A). Cette protéine possède une poche protéique avec une densité de charges positives. Le complexe qui est utilisé pour se fixer non covalamment dans la Xyl10A, est une porphyrine possédant des substituants carboxylates ou sulfonates qui, chargés négativement vont permettre la fixation du complexe dans la poche. Les différents complexes insérés dans la Xyl10A, sont les complexes représentés Figure 32.

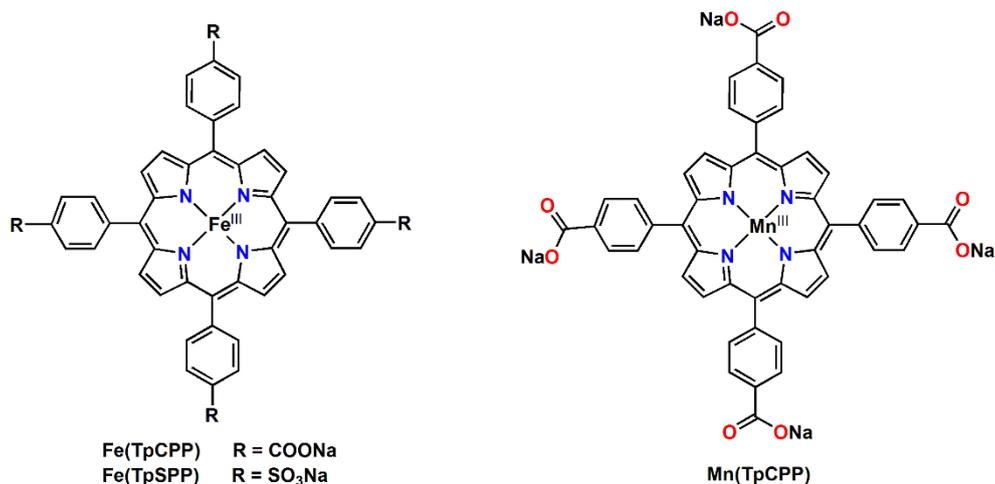


Figure 32 : Structure des porphyrines testées pour le greffage non covalent dans Xyl10A.

Les constantes de dissociation (K_d) de ces systèmes sont de l'ordre de $5 \cdot 10^{-7}$ M. L'affinité est faible par comparaison à celle de l'avidine pour la biotine dans les systèmes enzymatiques où le K_d est de l'ordre de 10^{-15} M.⁸⁵ Des analyses de modélisation moléculaire ont pu montrer que pour les complexes Fe(TpCPP) et Fe(TpSPP), deux solutions de minimum d'énergie sont possibles (Figure 33). Ces deux minima montrent deux orientations différentes de la porphyrine dans la Xyl10A.

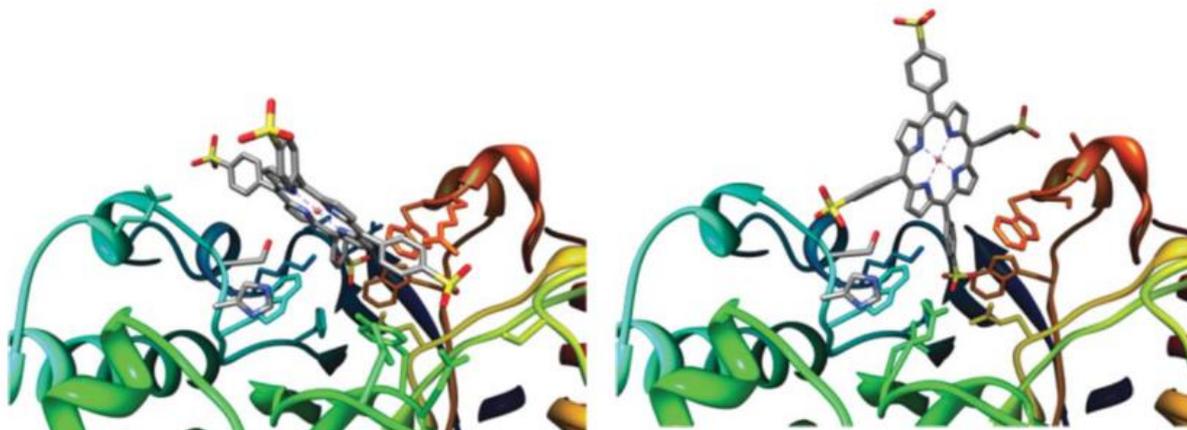


Figure 33: Représentation des minima d'énergie du Fe(TpSCC) dans la Xyl10A (d'après Ricoux et al.).⁹⁴

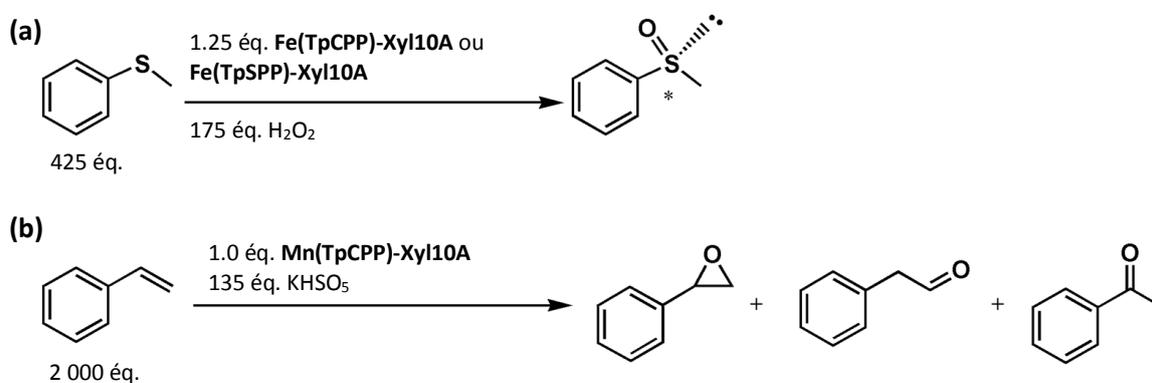


Figure 34: (a) Conditions de sulfoxydation par Fe(TpCPP) et Fe(TpSPP) ; (b) Conditions d'oxydation du styrène par Mn(TpCPP).

Les conditions de catalyse d'oxydation du thioanisole et du styrène sont présentées Figure 34 et le Tableau 3 présente les résultats de ces trois systèmes obtenus.

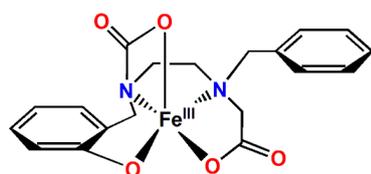
Tableau 3: Résultats des catalyses d'oxydation du thioanisole et du styrène. Les rendements sont calculés par rapport à H_2O_2 pour l'oxydation du thioanisole et par rapport à $KHSO_5$ pour l'oxydation du styrène.

Catalyseur	Rendement (%)	ee (%)
Fe(TpCPP)-Xyl10A (50 mM phosphate pH 3)	24	36
Fe(TpCPP) (50 mM phosphate pH 3)	33	-
Fe(TpSPP)-Xyl10A (50 mM glycine pH 3)	24	24
Fe(TpSPP) (50 mM glycine pH 3)	42	-
	Rendement total (%)	Rendement époxyde (%)
Mn(TpCPP)-Xyl10A (50 mM phosphate pH 7)	26	17
MnCl₂ (50 mM phosphate pH 7)	4.5	3.5
MnCl₂-Xyl10A (50 mM phosphate pH 7)	4.5	3.5

La catalyse d'oxydation du thioanisole par les oxygénases artificielles présente des rendements plus faibles que ceux obtenus pour la porphyrine en solution. Cependant, des excès énantiomériques corrects sont observés. Par comparaison, les rendements de catalyse d'oxydation du styrène sont plus importants avec le système Mn(TpCPP)-Xyl10A avec une sélectivité plus grande pour la formation de l'époxyde. Un excès énantiomérique de 80 % est détecté pour l'oxydation du *p*-méthoxystyrène, avec un rendement en époxyde de 16 %.⁹³

La méthode est avantageuse, car elle ne demande pas de modification par mutagenèse de la protéine.

Un autre exemple de biohybride basé sur des interactions non covalentes a été publié par l'équipe de Ménage. Ils ont utilisé la protéine NikA qui cristallise très bien.^{96,97} Des cristaux incolores de NikA-Fe(EDTA) ont été trempés dans une solution contenant le complexe 1 (Figure 35).



Complexe 1

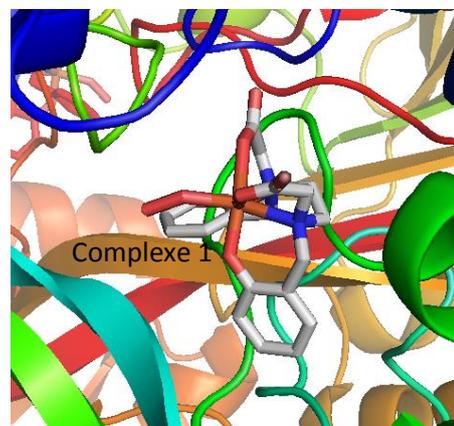


Figure 35: Bilan de la réaction, représentation schématique du complexe 1 utilisé et structure par diffraction des rayons X de l'espèce NikA/1-O₂ (PDB : 3MVY).

La substitution du complexe Fe(EDTA) par le complexe 1 dans le cristal se traduit par une coloration rouge foncé des cristaux. Cette couleur correspond à la bande de transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT) à 470 nm, qui est caractéristique d'un fer(III)-phénolate. La structure du système NikA/1 a été résolue par diffraction des rayons X et met en avant la présence du complexe 1 à la place du complexe Fe(EDTA) initial.

La réduction du complexe dans NikA/1 à l'aide de dithiothréitol (DTT) conduit à la décoloration du cristal. L'exposition à l'air du cristal incolore conduit à la coloration en violet du cristal et à la formation de l'espèce NikA/1-O₂ dont la structure par diffraction des rayons X est présentée Figure 35. L'étude spectroscopique de cet intermédiaire par spectroscopie UV-visible et Raman de résonance permet de l'identifier comme une espèce Fe^{III}-peroxo. C'est le premier intermédiaire réactionnel caractérisé dans une métalloenzyme artificielle. L'évolution dans le temps de cet intermédiaire observé par diffraction des rayons X montre qu'il hydroxyle les noyaux aromatiques de son ligand.

3.2.3. Stratégie par liaison covalente

Cette stratégie est apparue dès la fin des années 1970 avec les travaux de l'équipe de Kaiser. Le but était de stabiliser encore plus le complexe dans la protéine par la formation d'une liaison covalente entre un cofacteur (flavine) et la protéine hôte (papaïne).⁹⁸

D'autres équipes ont continué à travailler avec la papaïne. Cette protéine possède une cystéine accessible dans une grande cavité. Pour effectuer un couplage covalent entre le cofacteur et le thiol de la cystéine de la papaïne, le ligand est généralement fonctionnalisé avec un groupe maléimide. Une réaction de Michael entre le groupe maléimide et le thiol, rend le couplage quantitatif. En 2002, Reetz et al. ont synthétisé trois métalloenzymes artificielles par réactions de couplage entre des complexes à ligands salen fonctionnalisés et la papaïne (Figure 36).⁹⁹

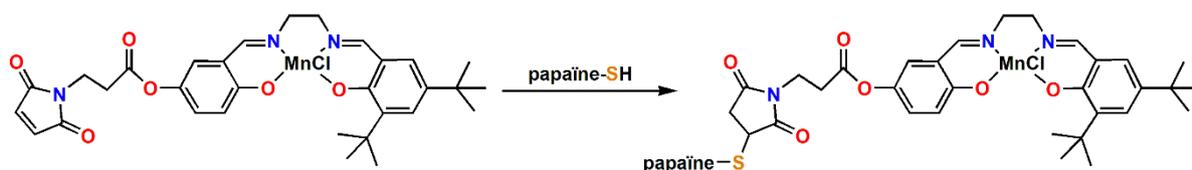


Figure 36: Addition de Michael du thiol de la cystéine 25 de la papaïne sur le groupement maléimide du complexe $[Mn(salen)]$.

Des tests en catalyse d'époxydation ont été effectués avec l'hybride schématisé Figure 36, mais les excès énantiomériques n'excèdent pas 10 %. L'hypothèse avancée pour la faible stéréosélectivité de ce système est la grande flexibilité conformationnelle de cette protéine.¹⁰⁰

Cheruzel et al. ont récemment reporté des métalloenzymes artificielles très originales. Leur système est un mutant du P450 BM3 conjugué à un complexe du type $Ru^{II}(bipy)_3$ utilisé pour mimer une réductase.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

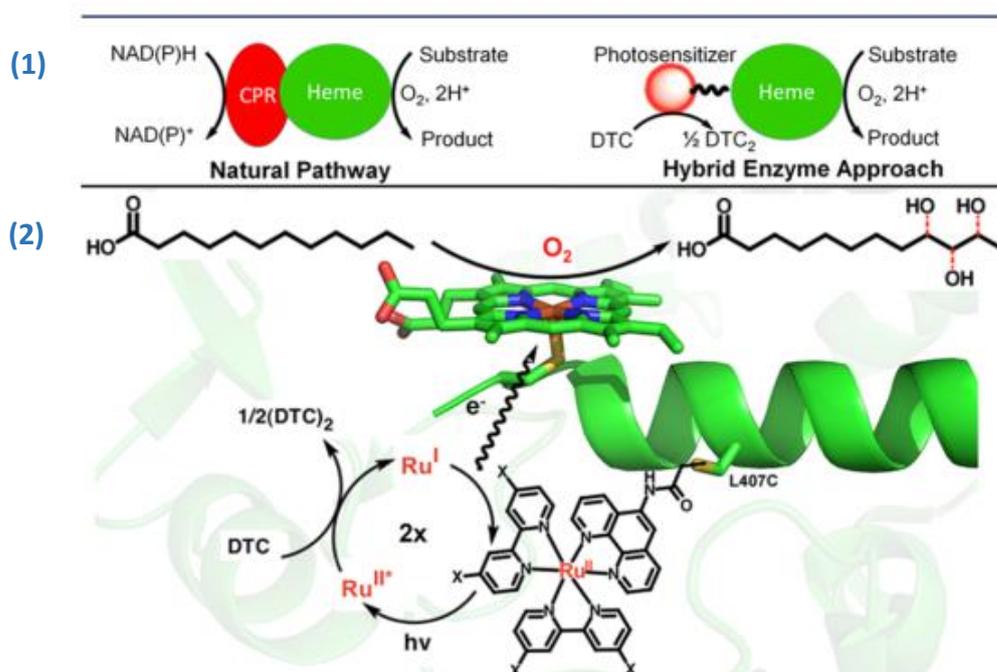
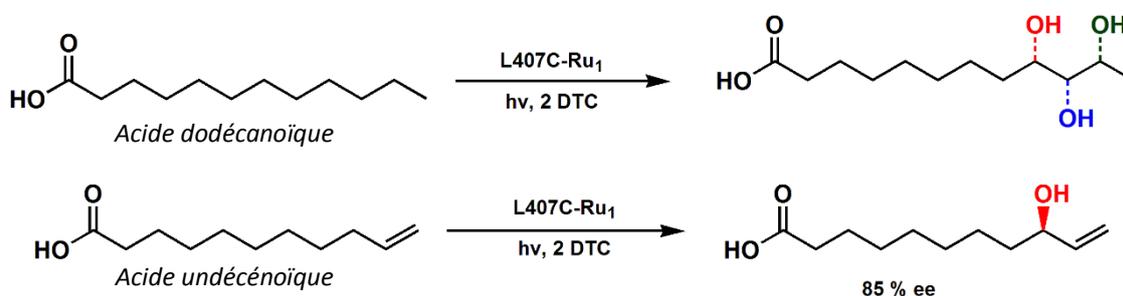


Figure 37: **(1)** Représentation schématique de l'approche avec l'enzyme hybride (à droite) et le chemin réactionnel naturel des CytP450 (à gauche) avec les partenaires redox (CPR) et NADPH. **(2)** Proximité du site actif de porphyrine où le complexe photoactivable de $Ru(II)$ ($X = H$ (a) ou OMe (b)) est greffé covalamment à la cystéine (L407C) du CytP450 BM3 non natif. DTC : diéthylthiocarbamate de sodium (d'après Cheruzel et al.).¹⁰⁴

Ce complexe de ruthénium possède en effet des propriétés photochimiques et est greffé covalamment sur une cystéine du mutant BM3 du cytochrome P450. Sous irradiation et en présence d'un réducteur diéthylthiocarbamate de sodium (DTC), le photosensibilisateur délivre des électrons au site actif du cytochrome P450 BM3 (Figure 37). L'originalité de l'approche est que l'apport des électrons au site actif se fait par l'intermédiaire du complexe de ruthénium et non par la réductase.

De cette façon, l'enzyme hybride peut réaliser l'oxydation de l'acide dodécanoïque suite à l'activation lumineuse du complexe de ruthénium. Trois produits de mono hydroxylation ont été détectés.¹⁰³ Le changement de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide a permis d'obtenir des résultats très impressionnants. Un seul produit de mono hydroxylation a été détecté avec l'acide 10-undécénoïque avec un rendement de 40 % et un excès énantiomérique de 85 %, ¹⁰⁴ ci-après :



3.3. Conclusions

Dans cette partie, nous avons abordé uniquement les métalloenzymes artificielles qui catalysent l'oxydation de petites molécules organiques. La fixation covalente ou non d'un complexe dans une protéine permet l'oxydation régio-, stéréo- et chimiosélective de molécules. Le nombre d'exemples de métalloenzymes artificielles reportés dans la littérature est considérable et nous n'avons ici présenté que certains exemples représentatifs des moyens d'élaborer de tels systèmes.

Il est à noter que de nombreux autres systèmes ont été développés selon les stratégies présentées avec des catalyseurs qui présentent des réactivités variées (hydrogénation, cycloaddition de Diels-Alder, hydrolyse, ...).^{82,83,86}

4. Systèmes bioinspirés non-hémiques pour la catalyse d'oxydation

Dans le but d'activer les liaisons C-H et C=C pour leur oxydation, des complexes non-hémiques ont été synthétisés par différentes équipes. Ces complexes permettent par ajout d'un oxydant chimique de

conduire à la formation d'intermédiaires réactionnels de type $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(O}_2\text{)}$, $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ et $\text{Fe}^{\text{V}}\text{(O)(OH)}$. Différentes classes de complexes existent, et leur réactivité dépend des ligands.

4.1. Utilisation de ligands hexa- et pentadentes

Les ligands penta- et hexadentes présentés Figure 38 sont des ligands de type amine/pyridine. Les complexes de Fe(II) obtenus à partir de ces complexes ont été très étudiés.¹⁰⁵⁻¹¹⁰

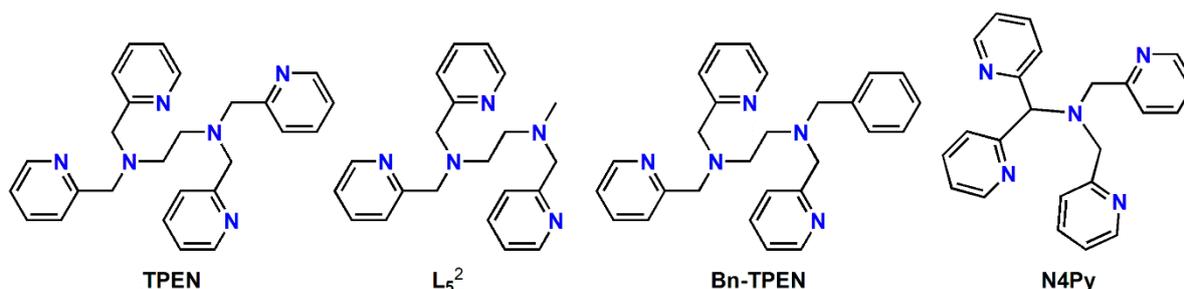


Figure 38: Structures des ligands penta- et hexadentes.

Différents intermédiaires réactionnels ont été générés et identifiés à partir de ces complexes, dont les intermédiaires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\eta^2\text{-O}_2\text{)}$, $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$.¹¹¹⁻¹¹⁵ Ces intermédiaires sont stables dans des conditions bien définies (température, solvant, oxydant).

L'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ est généré par addition d'un excès de peroxyde d'hydrogène et permet l'hydroxylation d'aromatiques de substrats.^{105,109} Cet intermédiaire peut évoluer par action d'une base pour générer $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}$.^{106,112}

Toujours dans le but de mimer les systèmes biologiques, l'activation du dioxygène par ce type de complexes de Fe(II) , en présence d'un réducteur chimique (BPh_4^-) et de proton a été effectuée, ce qui a conduit à la formation d'un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$.⁷⁵

De plus, la réaction de ces précurseurs de Fe(II) avec un oxydant tel que PhIO ou un peracide (mCPBA), permet de former le complexe $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{(O)}$.^{108,112,115}

La Figure 39 résume les différentes voies de formation de ces intermédiaires réactionnels.

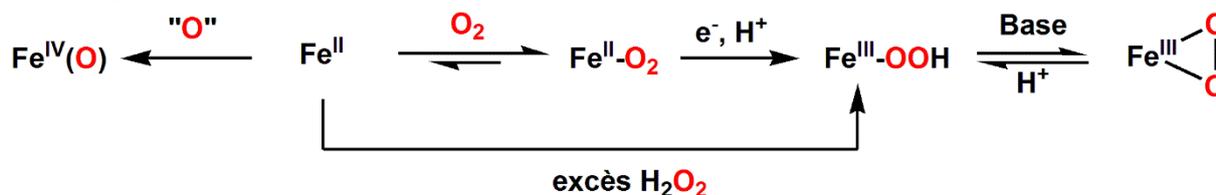


Figure 39: Réactivité des complexes penta- et hexadentes.

Le complexe $[(\text{N4Py})\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$ a été développé par Feringa et al.¹¹⁶ Par addition d'eau oxygénée, l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ est générée et par addition d'un peracide (PAA ou mCPBA) l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ est

général.¹¹⁶ Une différence de réactivité et de sélectivité de ces deux intermédiaires a été mise en évidence. Le Tableau 4 résume les résultats de catalyse d'oxydation du cyclohexane et de l'adamantane (Figure 40).

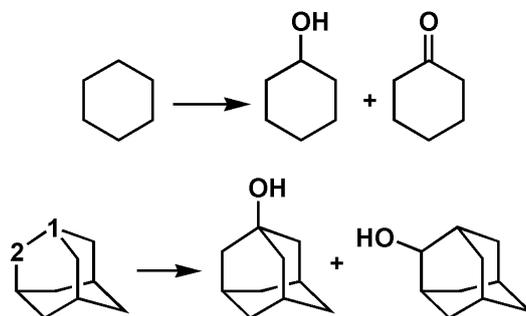


Figure 40: Oxydation du cyclohexane (en haut) et de l'adamantane (en bas).

Tableau 4: Résultats de catalyses d'oxydation du cyclohexane et de l'adamantane dans l'acétonitrile par le complexe $[(N4Py)Fe^{II}](BF_4)_2$ par les oxydants H_2O_2 , mCPBA et PAA (acide peracétique). Le rapport 3°/2° correspond au rapport de carbone tertiaire oxydé / carbone secondaire oxydé.

	Oxydant	TON			k_H/k_D
		alcool	cétone	$[-ol] / [-one]$	
Cyclohexane					
	H_2O_2	18.5	12.9	1.4	1.5
	mCPBA	28	5.0	5.6	4.5
	PAA	6.4	1.4	4.6	4.9
Adamantane		1-ol	2-ol	cétone	3°/2°
	H_2O_2	8.9	4.9	3.1	3.1
	mCPBA	6.4	0.4	0.7	18
	PAA	2.2	0.4	0.3	9

Dans le cas de l'oxydation du cyclohexane, selon le type d'oxydant utilisé, les rendements de réaction calculés par rapport à la quantité d'oxydant sont différents (H_2O_2 : 43 % ; mCPBA : 38 % ; PAA : 9.2 %). De plus, le rapport alcool/cétone ainsi que le KIE (kinetic isotope effect) défini comme le rapport k_H/k_D sont différents. Ces deux rapports renseignent sur le type de mécanisme impliqué dans la réaction d'oxydation du substrat. Un rapport alcool/ cétone de 1.4 ainsi qu'un KIE de 1.5 dans le cas où H_2O_2 est utilisé comme oxydant met en avant l'intervention de radicaux libres de type HO^\bullet . L'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$ évolue vraisemblablement en $Fe^{IV}=O$ par rupture hétérolytique de la liaison O-O conduisant à la formation de HO^\bullet . Par comparaison, dans le cas où l'oxydant est un peracide, les rapports alcool/ cétone sont plus élevés (de l'ordre de 5) pour l'oxydation du cyclohexane, avec des KIE de l'ordre de 5. Ces valeurs indiquent que l'intermédiaire $Fe^{IV}=O$ est plus sélectif car il ne conduit pas majoritairement à la formation de radicaux libres.

De même pour l'oxydation de l'adamantane, la régiosélectivité est augmentée avec les peracides, avec une oxydation du carbone tertiaire importante. Les rapports alcool / cétone sont également de l'ordre de 9 pour l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ alors qu'il est beaucoup plus faible pour l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ ($[-\text{ol}]/[-\text{one}] = 4$).

L'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ est donc plus sélectif que l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ car il n'y a pas génération de radicaux HO^\bullet .

4.2. Utilisation de ligands tétradentes linéaires

Les ligands tétradentes ont été développés de sorte à avoir deux sites labiles au niveau du fer. Les structures des différents ligands sont présentés Figure 41.

L'équipe de Que a réalisé l'oxydation du cyclohexane par H_2O_2 catalysée par le complexe $[(\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$.¹¹⁷ Le rendement en produits formés en présence de 10 éq. de H_2O_2 est de 63% avec un rapport alcool/cétone de 8. Ce ligand simple permet une grande sélectivité en générant principalement du cyclohexanol.

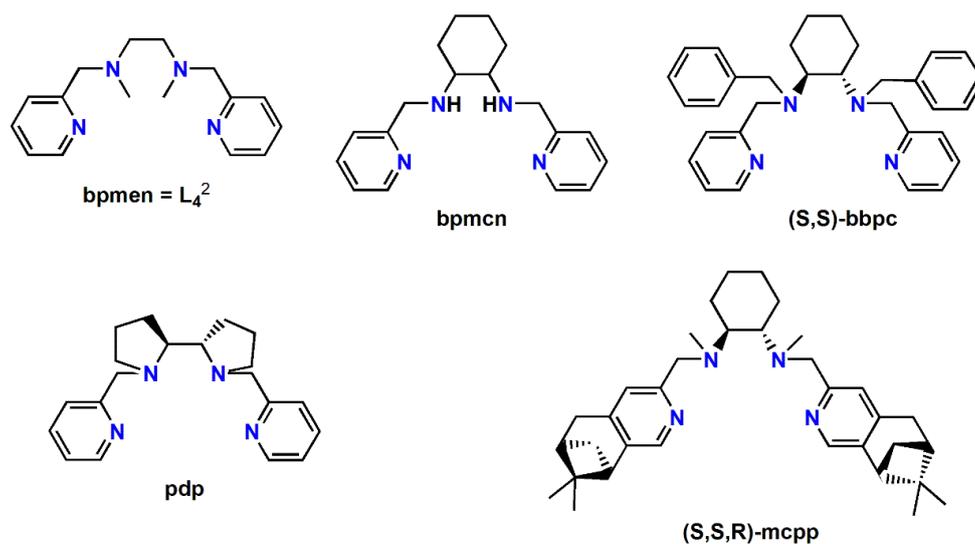


Figure 41: Structures de ligands tétradentes linéaires.

Les rapports cyclohexanol sur cyclohexanone sont supérieurs à 1 pour les complexes à ligands L_4^2 . Cela indique qu'il n'y a pas de processus radicalaire mis en jeu. De plus, avec ce type de complexe, l'intermédiaire Fe^{III} -OOH est très réactif, et évolue rapidement en un intermédiaire $Fe^V(O)(OH)$ (Figure 42).¹¹⁸ Cette évolution nécessite la présence d'un site labile en position cis du groupe peroxy.

De plus, l'oxydation du *cis*-1,2-diméthylcyclohexane (*cis*-DMC) en présence de ce type de complexes à ligands L_4^2 , permet la formation de l'alcool avec une rétention de configuration de 96 %, ce qui suggère que la réaction est réalisée par un oxydant à deux électrons (Fe -oxo de haute valence) plutôt qu'en suivant un mécanisme radicalaire.¹¹⁸

Une étude de l'influence des ligands exogènes a été effectuée par Ménage et al.¹¹⁹ L'oxydation par H_2O_2 de différents substrats a été effectuée avec des catalyseurs $[(L_4^2)Fe^II(X)(Y)]$ (où X et Y sont Cl^- ou CH_3CN). Lorsque $X = Y = Cl^-$, qui est un ligand peu labile, une oxydation du ligand est observée, suggérant la formation d'espèces radicalaires telle que HO^\bullet . Lorsque $X = Y = CH_3CN$, le ligand n'est pas oxydé, suggérant que les espèces radicalaires ne sont pas formées. De plus, ce complexe est beaucoup plus actif en catalyse d'oxydation du cyclohexane avec un rendement global de 30 % et un rapport

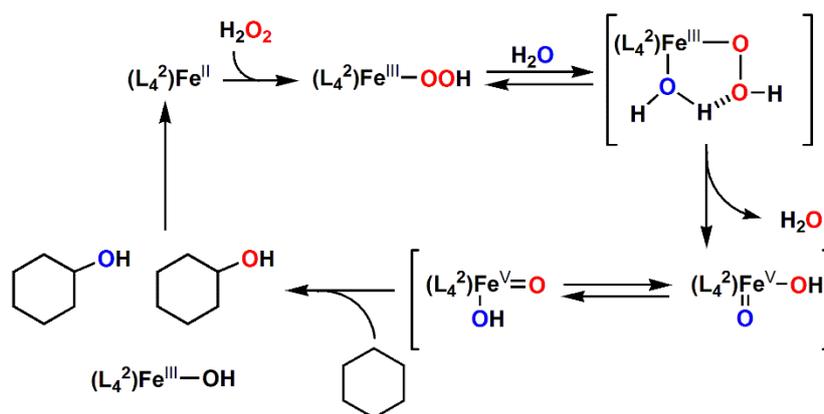


Figure 42: Mécanisme d'oxydation du cyclohexane par les complexes à ligand de type L_4^2 .

alcool/cétone de 9. La catalyse d'oxydation du cyclooctène en époxyde et diol est possible dans ce cas, alors qu'avec $X = Y = Cl^-$ aucun produit d'oxydation n'est observé. L'oxydation du *cis*-DMC donne l'alcool *cis* avec 74 % de rétention de configuration.

Le développement de ligands encombrés au niveau du pont diaminoéthane a par la suite été mené. Les catalyseurs de l'équipe de Goldsmith à base du ligand bbpc atteignent des rendements corrects de 32 % par rapport à H_2O_2 lors de l'oxydation du *cis*-DMC.¹²⁰ Ces ligands permettent des réactions d'oxydation stéréosélectives. Cette sélectivité a également été observée avec le ligand pdp de l'équipe de White,^{121,122} et avec le ligand similaire (S,S,R)-mcpp (trans) de l'équipe de Costas.¹²³

Comme pour les catalyseurs à ligands penta ou hexadentes, la réactivité des complexes de fer(II) à ligands tétradentes avec H_2O_2 semble unifiée ; l'espèce active étant un complexe $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})$ lorsque deux sites de coordination sont labiles pour le précurseur.

4.3. Utilisation de ligands macrocycliques

Des ligands macrocycliques ont été développés dans le but d'améliorer la stabilité et l'efficacité des catalyseurs (Figure 43).

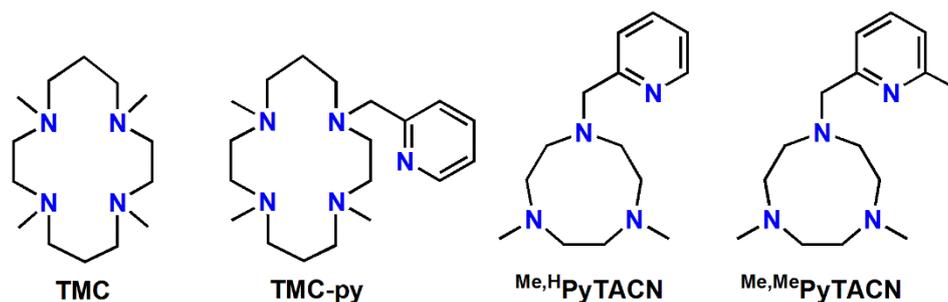


Figure 43: Structures de ligands macrocycliques.

A partir du complexe $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$, Nam et al. ont généré un intermédiaire vert pâle (par activation du dioxygène) qui correspond, d'après des analyses ESI-MS, à l'intermédiaire $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})(\text{OTf})]^+$.¹²⁴ La formation de cet intermédiaire dépend du solvant, et marque les premiers pas vers la génération d'espèces hautement oxydantes sans l'addition d'oxydants chimiques. De plus, cet intermédiaire oxyde PPh_3 sous atmosphère de O_2 , chose qui n'a pu être observé avec N4Py et BPMEN.

Que et Münck ont étudié la formation du complexe $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})(\text{OTf})]^{2+}$ à partir de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ ($S = 5/2$) très instable. Le rôle des protons dans le milieu réactionnel est important car il favoriserait la rupture de la liaison O-O conduisant à la formation d'un complexe intermédiaire de type $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})$ qui évolue en l'espèce stable réduite $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ (Figure 44).¹²⁵

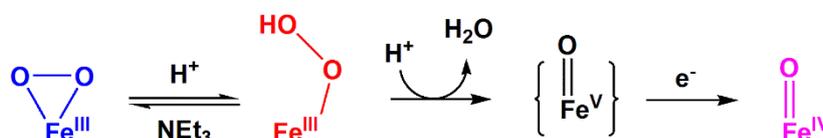


Figure 44: Conversion du $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})]^{2+}$ en un intermédiaire hypothétique $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]^{3+}$, qui se réduit en $[(\text{TMC})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$.

Au laboratoire, en collaboration avec l'équipe de Que, l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ a été généré à partir du complexe $[(\text{TMC-py})\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$.¹²⁶ La réaction entre ce complexe et le dioxygène a permis la formation de cette espèce oxydante en présence de protons et d'un réducteur chimique selon un mécanisme compatible avec les résultats de Martinho.⁷⁵

Costas a développé au sein de son équipe d'autres ligands macrocycliques à partir du triazacyclononane (TACN). L'efficacité des complexes a été comparée aux données obtenues avec le complexe $[(\text{bpmen})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$. Le complexe synthétisé à partir du ligand $^{\text{Me,H}}\text{PyTACN}$ est efficace pour l'oxydation du cyclohexane en présence de 10 éq. de H_2O_2 , avec un rendement de 65 %, ce qui est similaire à celui obtenu avec le complexe $[(\text{bpmen})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$.¹²⁷ Le rapport alcool/cétone est de 12, ce qui améliore la spécificité de la réaction. L'oxydation du *cis*-DMC conduit majoritairement à l'alcool tertiaire, avec un taux de rétention de configuration de 93 %. La modification de l'encombrement stérique du ligand par ajout d'un groupement méthyle sur la pyridine permet d'augmenter le rendement jusqu'à 76 % avec le complexe $[(^{\text{Me,Me}}\text{PyTACN})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$ avec un rapport alcool/cétone de 10.2.¹²⁸ La sélectivité envers les carbones secondaires est améliorée avec ces ligands par rapport aux résultats obtenus avec les complexes basés sur TACN à ligands pdp et mcpp.¹²⁹

Pour ces complexes à ligands macrocycliques, un mécanisme de formation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})$ de haute valence a été proposé par Prat.¹³⁰ La formation de l'intermédiaire $[(^{\text{Me,Me}}\text{PyTACN})\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})](\text{OTf})^+$ (30) par rupture hétérolytique de la liaison O-O du complexe $[(\text{LFe}^{\text{III}}(\text{OOH})(\text{OH}_2))(\text{OTf})]^+$ ($3\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$) assistée par une molécule d'eau (Figure 45) est analogue au mécanisme présenté Figure 42.

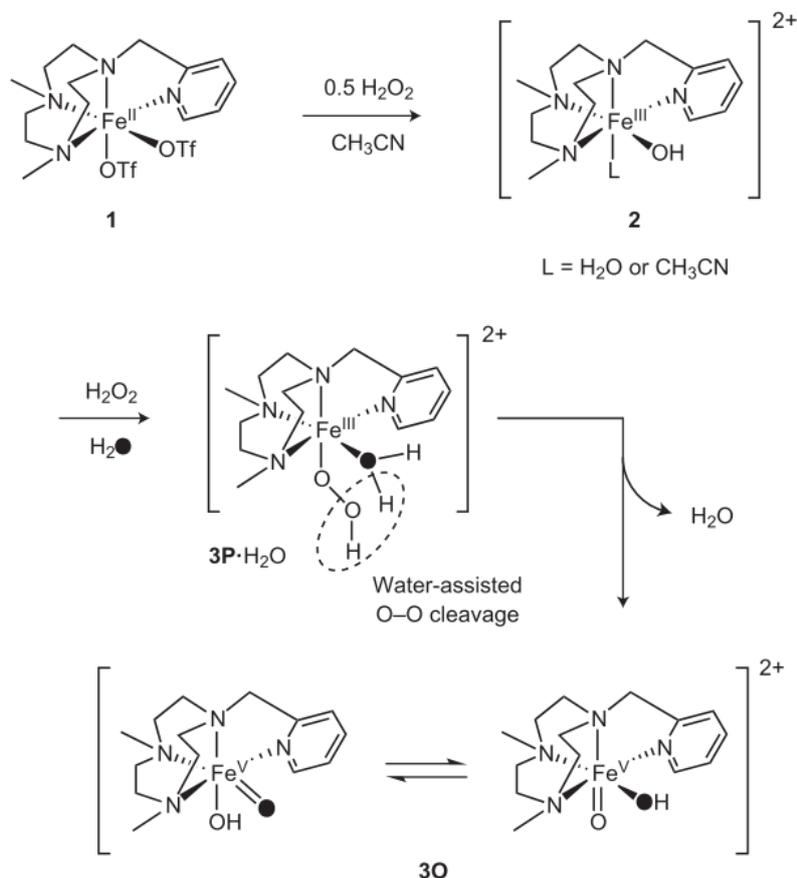


Figure 45: Mécanisme proposé pour la formation du complexe de haute valence $[(^{\text{Me,Me}}\text{PyTACN})\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})(\text{OH})](\text{OTf})^+$ (d'après Prat et al.).¹²⁶

4.4. Utilisation de ligands tripodes

Des ligands de type “pince” ont également été développés (Figure 46).

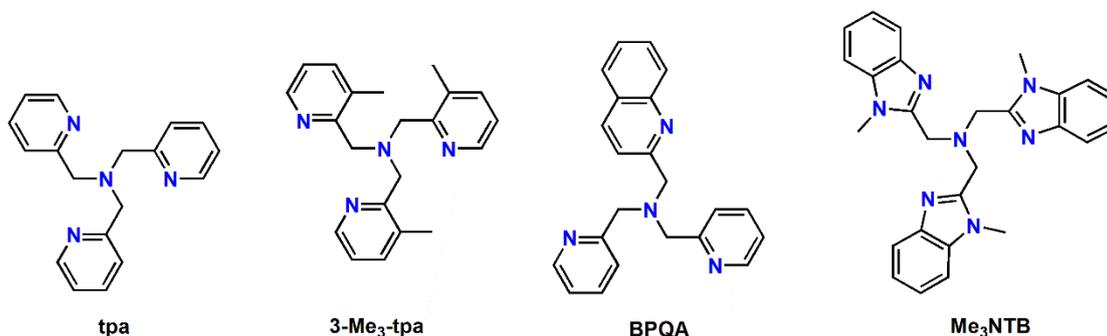


Figure 46: Structures des ligands tripodes.

Le plus simple ligand tripode est le ligand tpa que l'équipe de Que étudie depuis de nombreuses années. La catalyse d'oxydation du cyclohexane par ajout de 100 éq. de H₂O₂ sur le complexe [(tpa)Fe^{II}(ACN)₂]²⁺ permet l'obtention de 37 % de rendement en produits formés, avec un rapport alcool/cétone de 4.3.¹³¹ Encore une fois, l'intervention d'une espèce Fe^V(O)(OH) a été démontrée.¹³²

L'oxydation du *cis*-DMCH par ce complexe conduit à une très importante rétention de configuration supérieure à 99 %.¹¹⁸ La fonctionnalisation des ligands en plaçant des groupements méthyle et quinone sur les pyridines conduit à une augmentation du rendement global de la réaction d'oxydation du cyclohexane, avec un rapport alcool/cétone de 14 dans le cas du complexe au ligand 3-Me₃-tpa, et la stéréospécificité de la réaction est conservée.¹¹⁷

L'équipe de Mandon a mis en évidence la catalyse d'oxydation du cyclohexane par activation du dioxygène.¹³³ L'effet de la position des substituants chloro sur les pyridines a été étudié sur le ligand tpa. Les conditions de catalyses sont les suivantes : cyclohexane : AcOH : complexe ratio 1100 : 300 : 1, où les complexes testés sont [(Cl_n-tpa)FeCl₂] (0 < n < 3) et en présence de O₂ et d'un amalgame de zinc. Pour tous les complexes étudiés, les TONs sont compris entre 2.1 et 0.4 [(Cl₀-tpa)FeCl₂] et [(Cl₃-tpa)FeCl₂] respectivement. Quand n augmente, le rendement et les rapports sont compris entre 2.0 et 3.2. Une sélectivité plus importante a toutefois été observée dans le cadre de l'oxydation de l'adamantane, avec un rapport de 5.8 en faveur de l'oxydation du carbone tertiaire avec un TON de 2.5.

Nam et al. ont synthétisé un complexe avec le ligand Me₃NTB qui par addition de mCPBA conduit à la formation du complexe [(Me₃NTB)Fe^{IV}(O)(OTf)]⁺ bas spin.¹³⁴ Cet intermédiaire est intéressant car malgré son état bas spin, il s'est montré plus réactif que les cytP450.¹³⁴ L'apport de calculs DFT permet

d'expliquer que cette grande réactivité est due à la présence d'un état très réactif $S = 2$ de basse énergie.

4.5. Conclusion

Depuis plusieurs décennies, un gros travail a été effectué sur la synthèse de ligands dans le but de stabiliser les intermédiaires réactionnels identifiés dans les systèmes biologiques. A partir de ces systèmes biomimétiques, les intermédiaires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\eta^2\text{-O}_2\text{)}$, $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ et $\text{Fe}^{\text{V}}\text{(O)(OH)}$ ont été générés et identifiés, parfois même isolés. Une bonne compréhension des systèmes permet de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans les réactions d'oxydation de différents substrats.

L'addition d'eau oxygénée ou d'un unique atome d'oxygène sur les complexes à ligand de type L_5 et L_6 conduit à la formation des complexes $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{(OOH)}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{(O}_2\text{)}$. Ces intermédiaires présentent une réactivité et une sélectivité différente vis-à-vis de substrats. L'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{(OOH)}$ est peu sélectif car il est instable et sa dégradation conduit à la formation de radicaux, tandis que l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ présente une meilleure sélectivité. Les rendements des réactions d'oxydation avec ces catalyseurs sont moyens.

La réactivité est différente dans le cas des complexes à ligands de type L_4 macrocycliques, linéaires ou ramifiés. En effet, deux intermédiaires ont été identifiés comme espèces oxydantes, $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ et l'intermédiaire de haute valence $\text{Fe}^{\text{V}}\text{(O)(OH)}$, ce dernier étant de loin le plus réactif. La sélectivité des réactions est plus importante et les rendements sont plus élevés par comparaison avec les complexes à ligands de type L_5 et L_6 . Ces catalyseurs sont plus efficaces.

Les complexes présentés sont efficaces pour la catalyse d'hydroxylation d'aromatiques, l'époxydation d'alcènes ainsi que l'oxydation d'alcanes. Dans le cadre de cette dernière réaction, les rendements sont faibles.

Le but de cette thèse est de travailler avec des complexes biomimétiques et d'améliorer les ligands des complexes de type L_4 , L_5 et L_6 utilisés au laboratoire afin d'augmenter les rendements ainsi que la sélectivité des réactions. Un premier projet concerne le renforcement de positions fragiles identifiées sur les ligands, leur étude en chimie de coordination et en réactivité. Un autre projet concerne la formation de SAMs avec des complexes de type L_5 fonctionnalisés avec un bras thioctique. Ce nouveau point devrait permettre de mieux contrôler l'apport d'électrons au centre métallique et ainsi d'envisager l'activation réductrice du dioxygène avec ces systèmes. Pour terminer, une fonctionnalisation par un bras maléimide d'un complexe à ligand de type L_5 doit permettre le greffage covalent du complexe dans une protéine. Cette méthode devrait augmenter la sélectivité des réactions d'oxydation.

Références

- (1) *L'actualité Chimique mai-juin 2002.*
- (2) Behr, A.; Neubert, P. *Applied homogenous catalysis*, 2012.
- (3) R.A. Sheldon, I. A., U. Hanefeld *Green Chemistry and Catalysis*, 2009.
- (4) Bäckvall, J.-E. *Moder Oxidation Methods*, 2011.
- (5) Doble, M. V.; Ward, A. C. C.; Deuss, P. J.; Jarvis, A. G.; Kamer, P. C. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5657.
- (6) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 2253.
- (7) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 3947.
- (8) Momenteau, M.; Reed, C. A. *Chemical Reviews* **1994**, *94*, 659.
- (9) Sevrioukova, I. F.; Li, H.; Zhang, H.; Peterson, J. A.; Poulos, T. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 1863.
- (10) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, *287*, 1615.
- (11) Raag, R.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7586.
- (12) Groves, J. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 3569.
- (13) Nam, W. *Accounts of Chemical Research* **2007**, *40*, 522.
- (14) Sligar, S. G. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5399.
- (15) Egawa, T.; Ogura, T.; Makino, R.; Ishimura, Y.; Kitagawa, T. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 10246.
- (16) Macdonald, I. D. G.; Sligar, S. G.; Christian, J. F.; Unno, M.; Champion, P. M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 376.
- (17) Mak, P. J.; Denisov, I. G.; Victoria, D.; Makris, T. M.; Deng, T.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6382.
- (18) Davydov, R.; Macdonald, I. D. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Hoffman, B. M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 10654.
- (19) Denisov, I. G.; Mak, P. J.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 13172.
- (20) Rittle, J.; Green, M. T. *Science* **2010**, *330*, 933.
- (21) Groves, J. T. *Journal of Chemical Education* **1985**, *62*, 928.
- (22) Newcomb, M.; Toy, P. H. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 449.
- (23) Mansuy, D. *Comptes Rendus Chimie* **2007**, *10*, 392.
- (24) Lee, K.; Friemann, R.; Parales, J. V.; Gibson, D. T.; Ramaswamy, S. *Acta Crystallographica Section F* **2005**, *61*, 669.
- (25) Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *Structure* **1998**, *6*, 571.
- (26) Wolfe, M. D.; Parales, J. V.; Gibson, D. T.; Lipscomb, J. D. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 1945.
- (27) Ferraro, D. J.; Gakhar, L.; Ramaswamy, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *338*, 175.
- (28) Karlsson, A.; Parales, J. V.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *Science* **2003**, *299*, 1039.
- (29) Neibergall, M. B.; Stubna, A.; Mekmouche, Y.; Münck, E.; Lipscomb, J. D. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8004.
- (30) Bassan, A.; Blomberg, M. A.; Siegbahn, P. M. *J Biol Inorg Chem* **2004**, *9*, 439.
- (31) Wolfe, M. D.; Lipscomb, J. D. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 829.
- (32) Feng, Y.; Ke, C.-y.; Xue, G.; Que, L. *Chemical Communications* **2008**, 52.
- (33) Wackett, L. P.; Kwart, L. D.; Gibson, D. T. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1360.
- (34) Que Jr, L. *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 182.
- (35) Hegg, E. L.; Jr, L. Q. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *250*, 625.

- (36) Costas, M.; Mehn, M. P.; Jensen, M. P.; Que, L. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 939.
- (37) Bruijninx, P. C. A.; van Koten, G.; Klein Gebbink, R. J. M. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2716.
- (38) Cosper, N. J.; Stålhandske, C. M. V.; Saari, R. E.; Hausinger, R. P.; Scott, R. A. *J Biol Inorg Chem* **1999**, *4*, 122.
- (39) Lloyd, M. D.; Lee, H.-J.; Harlos, K.; Zhang, Z.-H.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Charnock, J. M.; Garner, C. D.; Hara, T.; Terwisscha van Scheltinga, A. C.; Valegård, K.; Viklund, J. A. C.; Hajdu, J.; Andersson, I.; Danielsson, Å.; Bhikhabhai, R. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *287*, 943.
- (40) Pavel, E. G.; Kitajima, N.; Solomon, E. I. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 3949.
- (41) Ho, R. Y. N.; Mehn, M. P.; Hegg, E. L.; Liu, A.; Ryle, M. J.; Hausinger, R. P.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 5022.
- (42) Valegård, K.; van Scheltinga, A. C. T.; Lloyd, M. D.; Hara, T.; Ramaswamy, S.; Perrakis, A.; Thompson, A.; Lee, H.-J.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Hajdu, J.; Andersson, I. *Nature* **1998**, *394*, 805.
- (43) Zhihong Zhang, J. R., David K. Stammers, Jack E. Baldwin, Karl Harlos & Christopher J. Schofield *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 127.
- (44) Wilmouth, R. C.; Turnbull, J. J.; Welford, R. W. D.; Clifton, I. J.; Prescott, A. G.; Schofield, C. J. *Structure* **2002**, *10*, 93.
- (45) Clifton, I. J.; Doan, L. X.; Sleeman, M. C.; Topf, M.; Suzuki, H.; Wilmouth, R. C.; Schofield, C. J. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 20843.
- (46) Riggs-Gelasco, P. J.; Price, J. C.; Guyer, R. B.; Brehm, J. H.; Barr, E. W.; Bollinger, J. M.; Krebs, C. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8108.
- (47) Price, J. C.; Barr, E. W.; Glass, T. E.; Krebs, C.; Bollinger, J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13008.
- (48) Proshlyakov, D. A.; Henshaw, T. F.; Monterosso, G. R.; Ryle, M. J.; Hausinger, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1022.
- (49) Bollinger, J. M.; Price, J. C.; Hoffart, L. M.; Barr, E. W.; Krebs, C. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, *2005*, 4245.
- (50) Solomon, E. I.; Brunold, T. C.; Davis, M. I.; Kemsley, J. N.; Lee, S.-K.; Lehnert, N.; Neese, F.; Skulan, A. J.; Yang, Y.-S.; Zhou, J. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 235.
- (51) Kappock, T. J.; Caradonna, J. P. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2659.
- (52) Fusetti, F.; Erlandsen, H.; Flatmark, T.; Stevens, R. C. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 16962.
- (53) Goodwill, K. E.; Sabatier, C.; Stevens, R. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13437.
- (54) Wang, L.; Erlandsen, H.; Haavik, J.; Knappskog, P. M.; Stevens, R. C. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12569.
- (55) Andreas Andersen, O.; Flatmark, T.; Hough, E. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *320*, 1095.
- (56) Pavon, J. A.; Fitzpatrick, P. F. *Biochemistry* **2006**, *45*, 11030.
- (57) Roberts, K. M.; Pavon, J. A.; Fitzpatrick, P. F. *Biochemistry* **2013**, *52*, 1062.
- (58) Panay, A. J.; Lee, M.; Krebs, C.; Bollinger, J. M.; Fitzpatrick, P. F. *Biochemistry* **2011**, *50*, 1928.
- (59) Eser, B. E.; Barr, E. W.; Frantom, P. A.; Saleh, L.; Bollinger, J. M.; Krebs, C.; Fitzpatrick, P. F. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 11334.
- (60) Moran, G. R.; Derecskei-Kovacs, A.; Hillas, P. J.; Fitzpatrick, P. F. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 4535.
- (61) Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Decréau, R. A.; Yang, Y.; Yan, Y.-L.; Ebina, W.; Eberspacher, T. A.; Chidsey, C. E. D. *Science* **2007**, *315*, 1565.
- (62) Collman, J. P.; Herrmann, P. C.; Boitrel, B.; Zhang, X.; Eberspacher, T. A.; Fu, L.; Wang, J.; Rousseau, D. L.; Williams, E. R. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 9783.
- (63) Collman, J. P.; Fu, L.; Herrmann, P. C.; Zhang, X. *Science* **1997**, *275*, 949.

- (64) Collman, J. P.; Rapta, M.; Bröring, M.; Raptova, L.; Schwenninger, R.; Boitrel, B.; Fu, L.; L'Her, M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1387.
- (65) Collman, J. P.; Sunderland, C. J.; Boulatov, R. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41*, 2282.
- (66) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596.
- (67) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057.
- (68) Devaraj, N. K.; Decreau, R. A.; Ebina, W.; Collman, J. P.; Chidsey, C. E. D. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 15955.
- (69) Collman, J. P.; Dey, A.; Yang, Y.; Ghosh, S.; Decréau, R. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 10528.
- (70) Dawson, J. H.; Sono, M. *Chemical Reviews* **1987**, *87*, 1255.
- (71) Ueyama, N.; Nishikawa, N.; Yamada, Y.; Okamura, T.-a.; Nakamura, A. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 12826.
- (72) Ueno, T.; Nishikawa, N.; Moriyama, S.; Adachi, S.; Lee, K.; Okamura, T.-a.; Ueyama, N.; Nakamura, A. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1199.
- (73) Higuchi, T.; Uzu, S.; Hirobe, M. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 7051.
- (74) Lee, Y.-M.; Hong, S.; Morimoto, Y.; Shin, W.; Fukuzumi, S.; Nam, W. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 10668.
- (75) Martinho, M.; Blain, G.; Banse, F. *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 1630.
- (76) Mukherjee, A.; Cranswick, M. A.; Chakrabarti, M.; Paine, T. K.; Fujisawa, K.; Münck, E.; Que, L. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 3618.
- (77) Lee, D.; Pierce, B.; Krebs, C.; Hendrich, M. P.; Huynh, B. H.; Lippard, S. J. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 3993.
- (78) Shook, R. L.; Gunderson, W. A.; Greaves, J.; Ziller, J. W.; Hendrich, M. P.; Borovik, A. S. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8888.
- (79) Sengupta, K.; Chatterjee, S.; Samanta, S.; Bandyopadhyay, S.; Dey, A. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 2000.
- (80) Sengupta, K.; Chatterjee, S.; Samanta, S.; Dey, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 8431.
- (81) Pramanik, D.; Dey, S. G. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 81.
- (82) Steinreiber, J.; Ward, T. R. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 751.
- (83) Davies, C. L.; Dux, E. L.; Duhme-Klair, A.-K. *Dalton Transactions* **2009**, 10141.
- (84) Yamamura, K.; Kaiser, E. T. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1976**, 830.
- (85) Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 306.
- (86) Thomas, C. M.; Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, *690*, 4488.
- (87) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 1005.
- (88) Kato, S.; Yang, H.-J.; Ueno, T.; Ozaki, S.-i.; Phillips, G. N.; Fukuzumi, S.; Watanabe, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 8506.
- (89) de Lauzon, S.; Rajkowski, K. M.; Cittanova, N. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1994**, *48*, 225.
- (90) Raffy, Q.; Ricoux, R.; Mahy, J.-P. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 1865.
- (91) Raffy, Q.; Ricoux, R.; Sansiaume, E.; Pethe, S.; Mahy, J.-P. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2010**, *317*, 19.
- (92) Sansiaume, E.; Ricoux, R.; Gori, D.; Mahy, J.-P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1593.
- (93) Allard, M.; Dupont, C.; Muñoz Robles, V.; Doucet, N.; Lledós, A.; Maréchal, J.-D.; Urvoas, A.; Mahy, J.-P.; Ricoux, R. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 240.
- (94) Ricoux, R.; Allard, M.; Dubuc, R.; Dupont, C.; Marechal, J.-D.; Mahy, J.-P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 3208.

- (95) Ricoux, R.; Dubuc, R.; Dupont, C.; Marechal, J.-D.; Martin, A.; Sellier, M.; Mahy, J.-P. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 899.
- (96) Cherrier, M. V.; Cavazza, C.; Bochot, C.; Lemaire, D.; Fontecilla-Camps, J. C. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9937.
- (97) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat Chem* **2010**, *2*, 1069.
- (98) Levine, H. L.; Nakagawa, Y.; Kaiser, E. T. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**, *76*, 64.
- (99) Reetz, M. T.; Rentzsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M. *Chimia* **2002**, *56*, 721.
- (100) Deuss, P. J.; den Heeten, R.; Laan, W.; Kamer, P. C. J. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 4680.
- (101) Tran, N.-H.; Huynh, N.; Bui, T.; Nguyen, Y.; Huynh, P.; Cooper, M. E.; Cheruzel, L. E. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 11936.
- (102) Tran, N.-H.; Huynh, N.; Chavez, G.; Nguyen, A.; Dwaraknath, S.; Nguyen, T.-A.; Nguyen, M.; Cheruzel, L. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *115*, 50.
- (103) Tran, N.-H.; Nguyen, D.; Dwaraknath, S.; Mahadevan, S.; Chavez, G.; Nguyen, A.; Dao, T.; Mullen, S.; Nguyen, T.-A.; Cheruzel, L. E. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14484.
- (104) Kato, M.; Nguyen, D.; Gonzalez, M.; Cortez, A.; Mullen, S. E.; Cheruzel, L. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5687.
- (105) Thibon, A.; Jollet, V.; Ribal, C.; Sénéchal-David, K.; Billon, L.; Sorokin, A. B.; Banse, F. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 2715.
- (106) Simaan, A. J.; Banse, F.; Girerd, J.-J.; Wieghardt, K.; Bill, E. *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 6538.
- (107) Raffard, N.; Bolland, V.; Simaan, J.; Létard, S.; Nierlich, M.; Miki, K.; Banse, F.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Girerd, J.-J. *Comptes Rendus Chimie* **2002**, *5*, 99.
- (108) Martinho, M.; Banse, F.; Bartoli, J.-F.; Mattioli, T. A.; Battioni, P.; Horner, O.; Bourcier, S.; Girerd, J.-J. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 9592.
- (109) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 3182.
- (110) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.
- (111) Girerd, J. J.; Banse, F.; Simaan, A. J. *Structure and bonding*; Vol. 97.
- (112) Thibon, A.; Bartoli, J.-F.; Bourcier, S.; Banse, F. *Dalton Transactions* **2009**, 9587.
- (113) Roelfes, G.; Lubben, M.; Chen, K.; Ho, R. Y. N.; Meetsma, A.; Genseberger, S.; Hermant, R. M.; Hage, R.; Mandal, S. K.; Young, V. G.; Zang, Y.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Que, L.; Feringa, B. L. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1929.
- (114) Hazell, A.; McKenzie, C. J.; Nielsen, L. P.; Schindler, S.; Weitzer, M. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2002**, 310.
- (115) Klinker, E. J.; Kaizer, J.; Brennessel, W. W.; Woodrum, N. L.; Cramer, C. J.; Que, L. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 3690.
- (116) van den Berg, T. A.; de Boer, J. W.; Browne, W. R.; Roelfes, G.; Feringa, B. L. *Chemical Communications* **2004**, 2550.
- (117) Chen, K.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6327.
- (118) Chen, K.; Costas, M.; Que, J. L. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2002**, 672.
- (119) Mekmouche, Y.; Ménage, S.; Pécaut, J.; Lebrun, C.; Reilly, L.; Schuenemann, V.; Trautwein, A.; Fontecave, M. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2004**, *2004*, 3163.
- (120) He, Y.; Gordon, J. D.; Goldsmith, C. R. *Inorganic Chemistry* **2011**, *50*, 12651.
- (121) Chen, M. S.; White, M. C. *Science* **2007**, *318*, 783.
- (122) Chen, M. S.; White, M. C. *Science* **2010**, *327*, 566.

- (123) Gómez, L.; Garcia-Bosch, I.; Company, A.; Benet-Buchholz, J.; Polo, A.; Sala, X.; Ribas, X.; Costas, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 5720.
- (124) Kim, S. O.; Sastri, C. V.; Seo, M. S.; Kim, J.; Nam, W. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4178.
- (125) Li, F.; Meier, K. K.; Cranswick, M. A.; Chakrabarti, M.; Van Heuvelen, K. M.; Münck, E.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 7256.
- (126) Thibon, A.; England, J.; Martinho, M.; Young, V. G.; Frisch, J. R.; Guillot, R.; Girerd, J.-J.; Münck, E.; Que, L.; Banse, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 7064.
- (127) Company, A.; Gómez, L.; Güell, M.; Ribas, X.; Luis, J. M.; Que, L.; Costas, M. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 15766.
- (128) Company, A.; Gómez, L.; Fontrodona, X.; Ribas, X.; Costas, M. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 5727.
- (129) Prat, I.; Gómez, L.; Canta, M.; Ribas, X.; Costas, M. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 1908.
- (130) Prat, I.; Mathieson, J. S.; Güell, M.; Ribas, X.; Luis, J. M.; Cronin, L.; Costas, M. *Nat Chem* **2011**, *3*, 788.
- (131) Kim, C.; Chen, K.; Kim, J.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 5964.
- (132) Oloo, W. N.; Fielding, A. J.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 6438.
- (133) Jaafar, H.; Vileno, B.; Thibon, A.; Mandon, D. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 92.
- (134) Seo, M. S.; Kim, N. H.; Cho, K.-B.; So, J. E.; Park, S. K.; Clemancey, M.; Garcia-Serres, R.; Latour, J.-M.; Shaik, S.; Nam, W. *Chemical Science* **2011**, *2*, 1039.

Chapitre 2 : Nouveaux complexes renforcés

Dans des conditions oxydantes, Marlène Martinho a montré que l'espèce $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ se dégradait par coupure oxydante selon une réaction bimoléculaire (Figure 1).¹ Cette dégradation serait initiée par l'arrachement d'un H^\bullet en α du groupement pyridyle pendent.

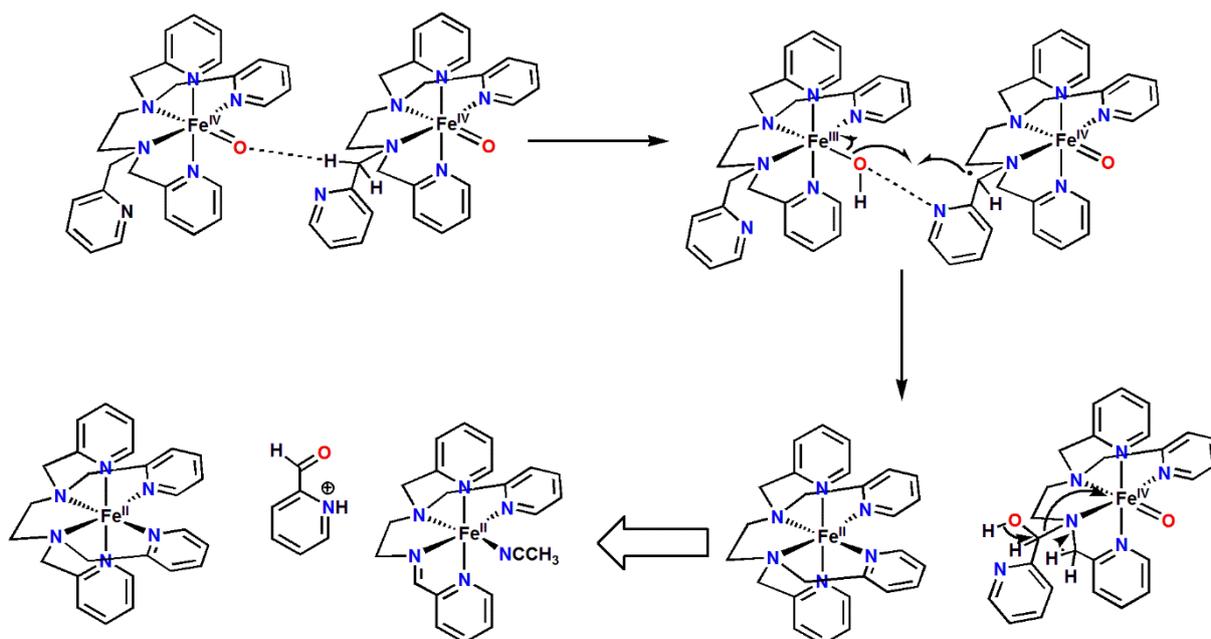


Figure 1: Mécanisme proposé pour la dégradation de $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ en absence de substrat.

Ainsi, d'autres ligands ont été synthétisés en insérant notamment des groupements éthyles sur les pyridines ($\text{L}_6^{24\text{E}}$) (Figure 2) dans le but d'empêcher les interactions entre complexes, grâce à un encombrement stérique, afin d'empêcher la réaction de dégradation intermoléculaire.

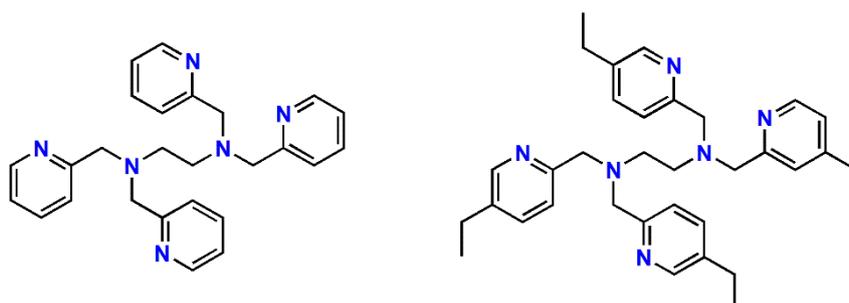


Figure 2: Ligands TPEN (à gauche) et $\text{L}_6^{24\text{E}}$ (à droite).

Cependant, il a été montré par Aurore Thibon que le ligand $\text{L}_6^{24\text{E}}$ se dégradait également même si les groupements éthyles apportent un peu plus de stabilité à l'intermédiaire $[(\text{L}_6^{24\text{E}})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ par rapport au $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$.^{2,3}

L'addition de groupements éthyle sur les pyridines gêne vraisemblablement l'approche entre les différents intermédiaires $[(L_6^{24E})Fe^{IV}(O)]^{2+}$, ce qui a pour effet de ralentir la réaction de dégradation bimoléculaire du complexe, mais elle ne la supprime pas.⁴ Dans cette optique de renforcer les ligands, l'équipe a donc synthétisé des ligands avec des groupements méthyle en α des pyridines (Figure 3 et Figure 4).⁵

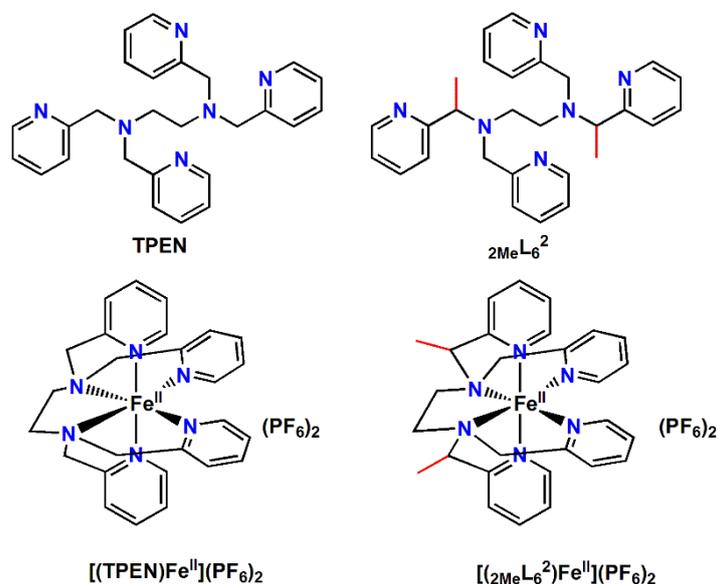


Figure 3: Schéma des différents ligands de type L_6^2 et des complexes correspondants.

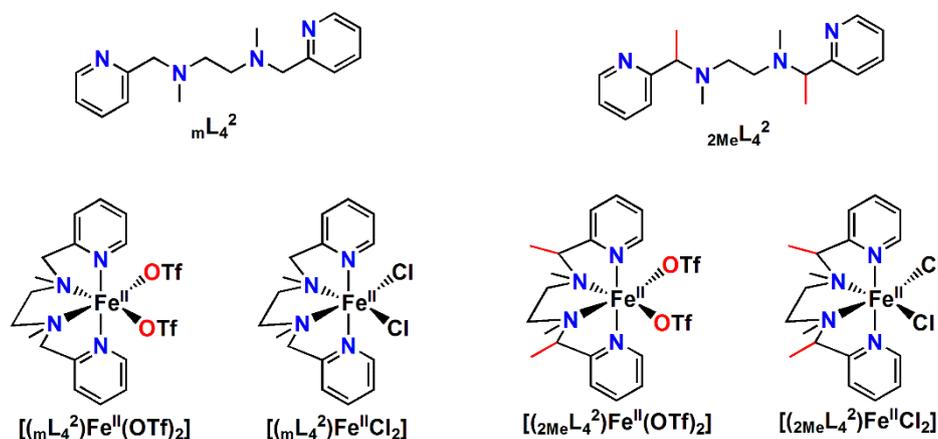


Figure 4: Schéma des différents ligands de type L_4^2 et des complexes correspondants.

Un autre point intéressant est que ces nouveaux ligands renforcés pourraient apporter une certaine stéréosélectivité pour les réactions d'oxydation de substrat. En effet, si les différents énantiomères des complexes peuvent être séparés par des contre-ions énantiomériquement purs, il devrait être possible de réaliser des réactions de catalyse conduisant à la formation d'un énantiomère majoritaire.

J'ai synthétisé les complexes présentés ci-dessus à l'exception du complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$. Les synthèses des ligands et des complexes sont détaillées dans la partie expérimentale.

1. Caractérisation

1.1. A l'état solide

Deux des nouveaux complexes, $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$, ont été obtenus sous la forme de monocristaux jaunes et rouges respectivement, de qualité suffisante pour la résolution de structure par diffraction des rayons X.

1.1.1. Complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$

Des cristaux jaunes du composé $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ ont été obtenus. La structure du complexe obtenue par diffraction des rayons X est présentée Figure 5 (b).

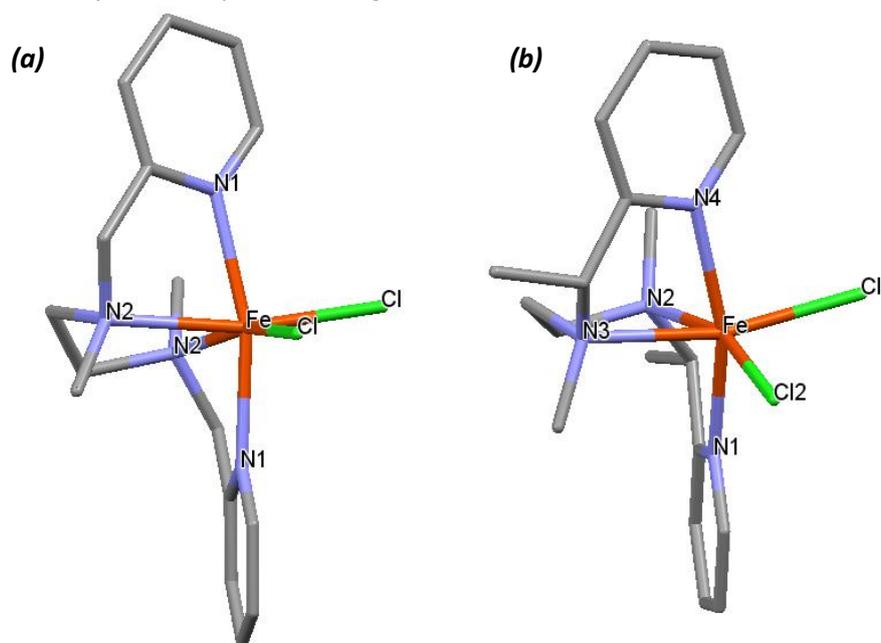


Figure 5: Structure des complexes moléculaires $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (a) et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (b).

Le métal est dans un environnement pseudo-octaédrique. Le ligand tétradente occupe deux positions axiales et équatoriales dans un mode de coordination cis α comme pour le complexe parent $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$. Les deux chlorures occupent les deux positions équatoriales restantes.

La distance moyenne des liaisons Fe-N est de 2.242 Å dans le nouveau complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et de 2.236 Å dans $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$. Ces distances moyennes sont caractéristiques d'un état haut spin ($S = 2$) du fer(II). Ces distances sont plus longues que celles observées pour les complexes de fer bas spin ($S = 0$) qui possèdent des distances Fe-1° voisin de l'ordre de 1.9 Å.^{6,7}

Le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ est centro-symétrique, et présente dans une géométrie distordue pseudo-octaédrique, avec l'angle entre les atomes d'azote en position axiale et les chlorures proche de 90° , tandis que l'angle N1-Fe-N2 est de 75° .

Par comparaison, le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ présente une géométrie moins distordue que le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$, les valeurs des angles restent très proches de 90° . Les distances des liaisons Fe-N_{py} sont plus courtes dans les deux complexes que les liaisons Fe-N_{am}. Ce raccourcissement des liaisons Fe-N_{py} peut être dû au caractère π accepteur des pyridines qui renforce la liaison.⁴

Tableau 1: Principaux angles ($^\circ$) et distances en (\AA) dans les $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$.

$[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$		$[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$	
Fe-N1 (py)	2.195	Fe-N1 (py)	2.182(2)
Fe-N2 (am)	2.278	Fe-N2 (am)	2.315(2)
Fe-Cl	2.434	Fe-N3 (am)	2.288(2)
N1-Fe-N2	74.86	Fe-N4 (py)	2.186(2)
N1-Fe-Cl	92.99	Fe-Cl1 (py)	2.3967(7)
N2-Fe-Cl	163.77	Fe-Cl2(py)	2.4637(7)
N1-Fe-N1	164.39	N1-Fe-N3	93.96
Cl-Fe-Cl	100.89	N2-Fe-N4	91.81
		N1-Fe-Cl1	95.62
		N1-Fe-Cl2	94.04
		N4-Fe-Cl1	94.22
		N4-Fe-Cl2	98.29
		N1-Fe-N4	163.04
		N3-Fe-Cl1	166.36
		N2-Fe-Cl2	163.00
		Cl1-Fe-Cl2	97.74

La présence des deux groupements méthyle en α des pyridines semble minimiser la distorsion de l'octaèdre métal-ligand. Ce résultat est inattendu à première vue. Cependant, les structures sont similaires, ce qui implique qu'une réactivité semblable peut-être attendue.

1.1.2. Complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$

Des cristaux rouges foncés du composé $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ ont été obtenus par diffusion lente de *tert*butyl-méthyl-éther dans une solution du complexe dissous dans l'acétonitrile (Figure 6).

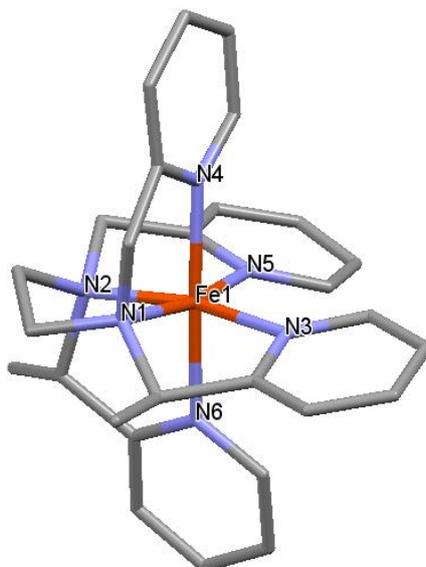


Figure 6: Structure du complexe moléculaire $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$.

Le métal est dans un environnement pseudo-octaédrique. Le ligand hexadente occupe les six sites de coordination. La structure du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ peut être comparée à celle des complexes $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$ et $[(L_6^24E)Fe^{II}](PF_6)_2$ car l'enroulement du ligand autour du métal est identique pour les trois complexes.⁸ Les positions équatoriales sont occupées par deux fonctions amines (N_1 et N_2) et deux pyridines (N_3 et N_4). Les positions apicales sont quant à elles occupées par deux pyridines (N_5 et N_6). Les deux pyridines issues de la même fonction amine se disposent en configuration fac par rapport à cette dernière. Le complexe peut cristalliser sous différents isomères géométriques, hormis les isomères optiques envisageables, comme représentés Figure 7.

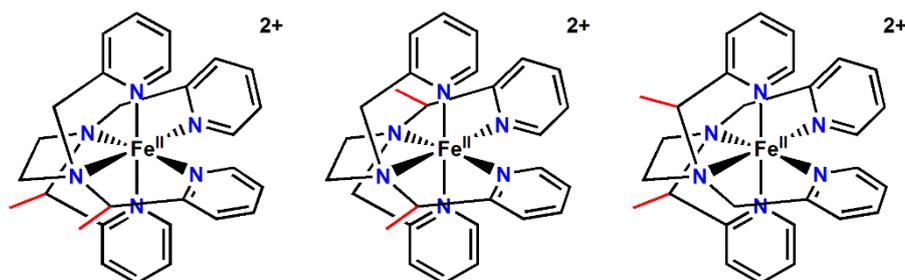


Figure 7: Isomères géométriques possibles du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$.

Le Tableau 2 présente quelques données structurales pour ces complexes. Les distances moyennes observées sont caractéristiques d'un état bas spin ($S = 0$) du fer(II) avec un $d_{moyen} = 1,995$ Å pour le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$,⁴ un $d_{moyen} = 1,981$ Å pour le complexe $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$ et un $d_{moyen} = 1,987$ Å pour le complexe $[(L_6^24E)Fe^{II}](PF_6)_2$.⁴ Ces distances sont plus courtes que celles observées pour les complexes haut spin ($S = 2$) qui possèdent des distances de l'ordre de 2,2 Å.

Tableau 2 : Principaux angles (°) et distances en (Å) dans les complexes $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$, $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$ et $[(L_6^{24E})Fe^{II}](PF_6)_2$.⁴

	$[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$	$[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$	$[(L_6^{24E})Fe^{II}](PF_6)_2$
Fe₁-N₁ (am)	1.999	1.993	2.002
Fe₁-N₂ (am)	2.002	1.991	1.998
Fe₁-N₃ (py)	1.984	1.971	1.987
Fe₁-N₄ (py)	1.991	1.977	1.966
Fe₁-N₅ (py)	1.999	1.981	1.983
Fe₁-N₆ (py)	1.994	1.975	1.989
N₂-Fe₁-N₁	87.271	87.216	87.801
N₁-Fe₁-N₃	83.212	81.185	81.290
N₂-Fe₁-N₄	80.315	81.672	81.717
N₃-Fe₁-N₄	109.867	110.232	109.637
N₅-Fe₁-N₃	92.107	90.976	93.280
N₂-Fe₁-N₆	101.640	96.861	97.336

La géométrie octaédrique de ces trois complexes est légèrement distordue. Les valeurs des angles restent globalement proches de 90° excepté en ce qui concerne l'angle N₃-Fe₁-N₄ qui est un peu plus ouvert. Les distances Fe-N_{py} sont plus courtes que les liaisons Fe-N_{am}. Ce raccourcissement des liaisons Fe-N_{py} peut être dû au caractère π accepteur des pyridines qui renforce la liaison comme précédemment.

1.1.3. Conclusion

Les complexes $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ ont des structures proches de leurs complexes parents. Cependant, le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ est moins distordu que $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$. Les structures étant proches, la réactivité des nouveaux complexes devrait être similaire à celle des complexes parents.

1.2. Caractérisation en solution

Pour déterminer la structure du complexe en solution et ses propriétés électroniques, les techniques de spectrométrie de masse par ionisation électrospray, de spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible et de voltamétrie cyclique ont été utilisées.

1.2.1. Spectrométrie de masse (ESI)

La première caractérisation en solution effectuée est la spectrométrie de masse électrospray en mode positif. Cette technique renseigne sur la formulation globale du complexe, et par déduction indique la première sphère de coordination du fer en solution. Les complexes sont analysés en solution dans l'acétonitrile à des concentrations de l'ordre de 10^{-4} M.

Le spectre de masse du complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ présente peu de pics, ce qui montre que l'espèce isolée est pure (Figure 9). Les pics les plus intenses ont notamment été identifiés et attribués aux espèces suivantes : $[(2MeL_4^2)Fe^{II}]^{2+}$ $m/z = 177.0744$, $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OCH_2CH_3)]^+$ $m/z = 399.1473$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)]^+$ $m/z = 503.1030$. Les spectres expérimental et simulé de l'espèce $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)]^+$ sont représentés Figure 8. L'espèce à 399.1473 uma est formée au sein de l'appareil. Ce genre d'espèce est classiquement observé avec d'autres complexes de ce type au laboratoire.

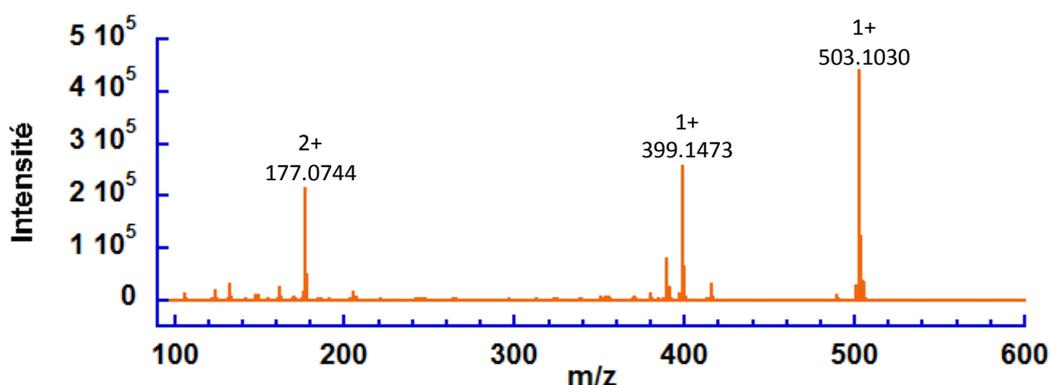


Figure 9: Spectre de masse (ESI, mode positif) du complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ dissous dans l'acétonitrile ($[Fe] \approx 10^{-4}$ M).

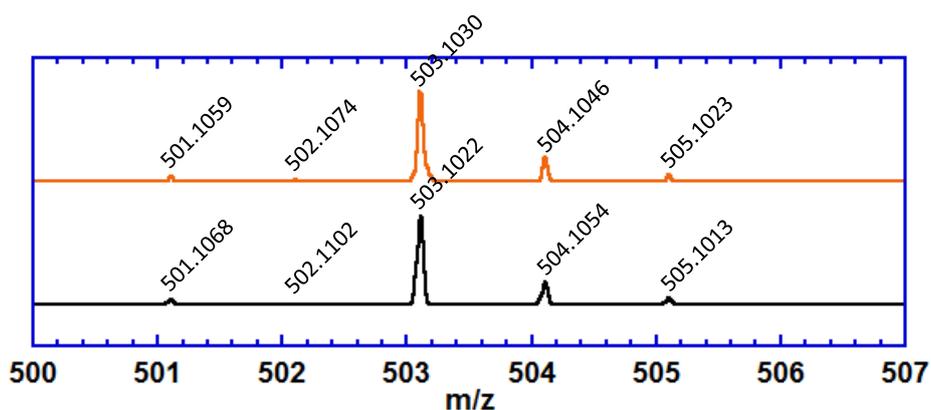


Figure 8: Spectre de masse (ESI, mode positif) du complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)]^+$ expérimental (orange) et simulé (noir) [$C_{19}H_{26}F_3FeN_4O_3S$, m/z mesuré = 503.1030, m/z théorique = 503.1022, erreur [ppm] = -1.6].

De même, les complexes $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ ont été caractérisés par spectrométrie de masse ESI. Le Tableau 3 résume les résultats obtenus pour les trois complexes.

Tableau 3: Masses des complexes en solution dans l'acétonitrile, par ESI MS (mode positif).

$[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$	$[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	$[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$
$[LFe^{II}Cl]^+$ m/z mesuré = 389.1195 m/z calculé = 389.1190 err[ppm] = -1.2	$[LFe^{II}(OTf)]^+$ m/z mesuré = 503.1030 m/z calculé = 503.1022 err[ppm] = -1.6	$[LFe^{II}]^{2+}$ m/z mesuré = 254.1047 m/z calculé = 254.1013 err[ppm] = -13.0
$[LFe^{III}Cl_2]^+$ m/z mesuré = 424.0880 m/z calculé = 424.0879 err[ppm] = -0.2	$[LFe^{III}]^{2+}$ m/z = 177.0744 m/z calculé = 177.0748 err[ppm] = 2.1	$[LFe^{II}Cl]^+$ m/z mesuré = 543.1772 m/z calculé = 543.1721 err[ppm] = -9.3

Ces spectres sont compatibles avec la structure des complexes observés à l'état solide pour $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$; et avec la structure souhaitée pour $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$.

1.2.2. Spectrophotométrie UV-visible

a) Complexes à ligands de type L_4^2

Les complexes ont été analysés par spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible dans l'acétonitrile. Les spectres sont enregistrés à température ambiante et sont présentés Figure 10.

Les spectres présentent une bande intense dans l'UV (230 - 260 nm, $\epsilon > 10\ 000\ cm^{-1}M^{-1}$) correspondant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des pyridines des ligands (non présentées). Les bandes moins intenses dans le visible qui donne la couleur de la solution (autour de 400 nm) correspondent aux transferts de charge des orbitales t_{2g} du Fe^{II} vers les π^* des pyridines du ligand (**MLCT** : Metal to Ligand Charge Transfer) (Figure 10).

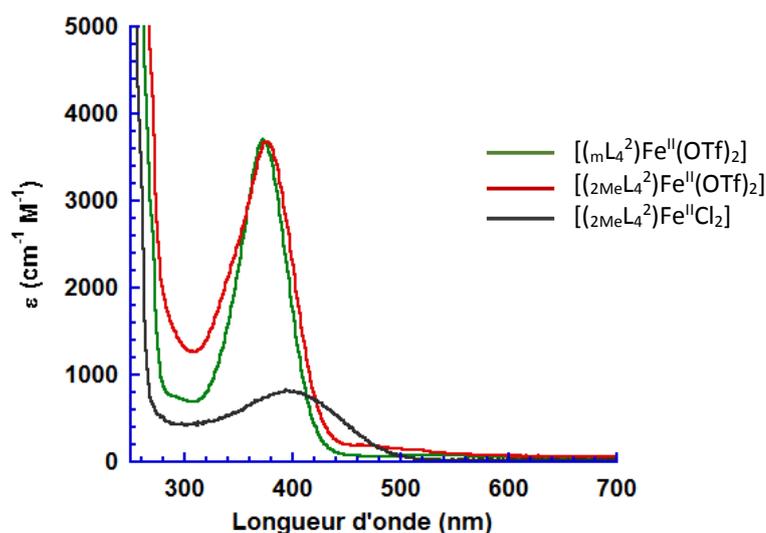


Figure 10 : Spectres d'absorption électronique UV-visible des complexes à ligands de type L_4^2 enregistrés dans l'acétonitrile, à température ambiante.

De par son intensité et sa position, cette bande renseigne sur l'état de spin du Fe^{II} et sur la nature de la première sphère de coordination.⁷ Ainsi, un complexe haut spin ($S = 2$) a un coefficient d'extinction molaire ϵ de l'ordre de $1\ 000\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ à $2\ 000\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; alors que les complexes Fe^{II} bas spin ($S = 0$) avec les mêmes ligands amine/pyridine ont des coefficients d'extinction molaire de $8\ 000 - 10\ 000\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Le fer(II) au sein du complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ est dans un état haut spin ; le coefficient d'extinction molaire de la transition **MLCT** est de $770\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ à la longueur d'onde de $415\ \text{nm}$.⁹

Le complexe $[(_{2Me}L_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (courbe grise Figure 10) présente une bande d'absorption à $393\ \text{nm}$ avec $\epsilon = 830\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Par comparaison avec le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$, on peut en déduire que l'ion Fe(II) dans le complexe $[(_{2Me}L_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ est dans un état haut spin.

Les complexes $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (a) et $[(_{2Me}L_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (b) (courbes verte et rouge Figure 10) dissous dans l'acétonitrile présentent un maximum d'absorbance à $372\ \text{nm}$ et $376\ \text{nm}$ pour (a) et (b) respectivement avec un coefficient d'extinction molaire de la transition **MLCT** de $3\ 700\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. La valeur du coefficient d'extinction molaire est intermédiaire entre les valeurs habituelles pour des complexes haut spin et des complexes bas spin. Il existe probablement un équilibre entre deux complexes haut et bas spin. De plus, par comparaison avec les complexes $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ et $[(_{2Me}L_4^2)Fe^{II}Cl_2]$, l'énergie de la transition augmente de $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$. Les chlorures et les triflates sont des ligands σ et π donateurs, tandis que l'acétonitrile est σ donneur et π accepteur. L'échange chimique des ligands triflates par l'acétonitrile mène à une stabilisation des orbitales t_{2g} ce qui provoque, *in fine*, un basculement de l'état de spin du fer(II) de $S = 2$ à $S = 0$ (Figure 11). La transition des orbitales t_{2g} vers les orbitales π^* du ligand est alors observée à plus haute énergie.

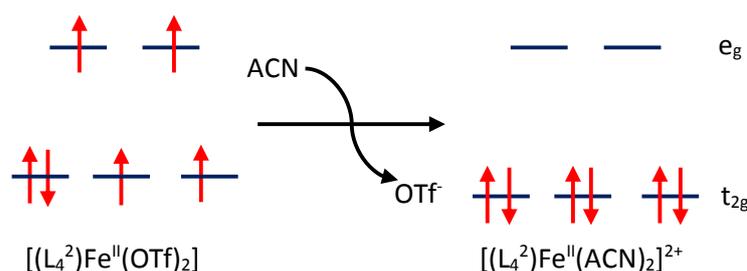


Figure 11: Schéma de la transition de spin du fer(II) suite à un échange de ligand exogène (OTf)⁻ par ACN.

D'après White et al., il existe un échange chimique entre les ions triflates et l'acétonitrile à température ambiante pour des complexes analogues.^{10,11} Cela explique donc la valeur intermédiaire du coefficient d'extinction molaire. Deux complexes coexistent en solution : $[(L_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(L_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$.

Cet équilibre chimique entre $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]^+$ et $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$ a été mis en évidence par voltamétrie cyclique et sera présenté dans la suite de ce chapitre.

Le Tableau 4 résume la longueur d'onde des maxima d'absorption, coefficients d'extinction molaire et état de spin du fer(II) dans les différents complexes.

Tableau 4: Comparaison des positions et du coefficient d'extinction molaire de la transition MLCT des complexes $[(m\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$, $[(m\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$, $[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$ et $[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ dans l'acétonitrile

	$[(m\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	$[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	$[(m\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$	$[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$
λ_{max} (nm)	415	393	372	375
ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	770	830	3 700	3 690
Espèces en solution probables	$[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	$[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	$[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]^+$ $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$	$[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$ $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{ACN})_2]^{2+}$
Etat de spin	Haut spin	Haut spin	Bas spin + haut spin	Bas spin + haut spin

b) Complexe $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$

Le complexe $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ a été dissous dans l'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH), les spectres d'absorption sont présentés Figure 12.

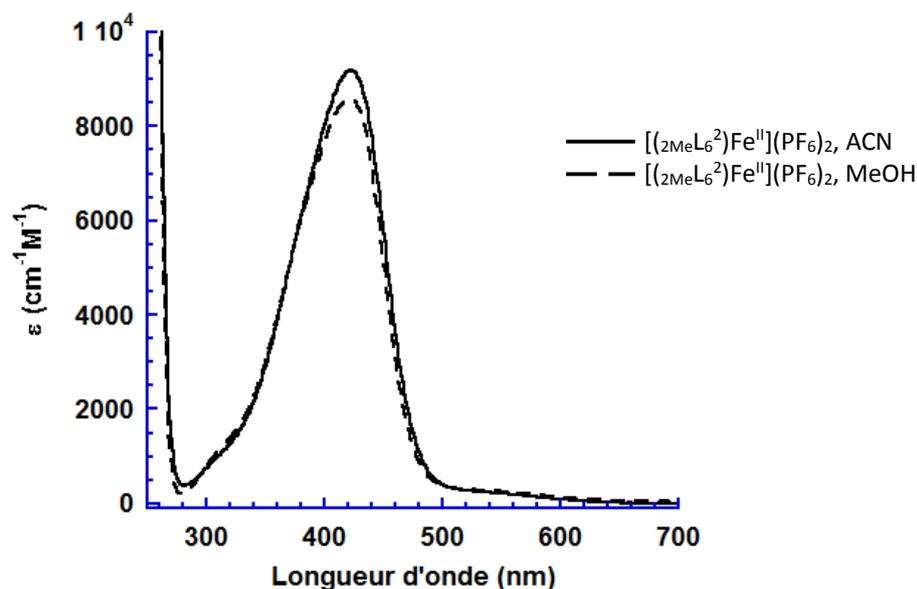


Figure 12: Spectres d'absorption électronique UV-visible du complexe $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ enregistrés dans ACN et MeOH à température ambiante.

Le complexe $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ présente dans le méthanol et l'acétonitrile deux bandes d'absorption d'intensité et de coefficient d'extinction molaire comparable (Figure 12 et Tableau 5). La première, non présentée ici, à 254 nm, est attribuée aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des pyridines. La seconde, vers 420 nm, est attribuée aux bandes de transfert de charge de type MLCT. Cette dernière présente des coefficients d'absorption molaire similaires dans le méthanol et l'acétonitrile ($8\,600\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ et $9\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

200 cm⁻¹M⁻¹ respectivement) (Tableau 5). Le fer(II) dans le complexe est majoritairement dans un état bas spin. Les spectres étant similaires dans les deux solvants, le complexe conserve en solution la structure observée à l'état solide.

De petites différences entre les coefficients d'extinction molaire sont observées selon le solvant et pour chaque complexe. Cela suggère un équilibre de spin intrinsèque pour chaque complexe avec des ligands tétradentes ou hexadentes, ce qui sera détaillé dans la suite.

Tableau 5: Comparaison des transitions MLCT des complexes [(TPEN)Fe^{II}](PF₆)₂, [(L₆²4E)Fe^{II}](PF₆)₂ et [(₂MeL₆²)Fe^{II}](PF₆)₂ dans le méthanol et l'acétonitrile, à température ambiante.

Solvant	[(TPEN)Fe ^{II}](PF ₆) ₂ ³		[(L ₆ ² 4E)Fe ^{II}](PF ₆) ₂ ³		[(₂ MeL ₆ ²)Fe ^{II}](PF ₆) ₂	
	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN
λ _{max} (nm)	417	417	419	419	421	421
ε (cm ⁻¹ M ⁻¹)	10 500	10 500	8 500	8 000	8 600	9 200
Etat de spin	Bas spin	Bas spin	Bas spin	Bas spin	Bas spin	Bas spin

1.2.3. Voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile

Les complexes ont été étudiés par voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile. L'électrolyte support utilisé est l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (TBAPF₆) à 0.1 M, ce qui rend le milieu plus dissociant que lors des études par spectroscopie UV-visible. Les mesures ont été effectuées sous flux d'argon et à température ambiante (20°C). Le montage utilisé pour enregistrer les spectres est constitué de trois électrodes : une électrode de travail de carbone vitreux, une électrode de référence au calomel saturé, et une contre électrode de platine. La vitesse de balayage est de 0.1 V/s, et les valeurs de potentiels sont données par rapport à l'électrode de référence au calomel saturé (ECS).

La valeur du potentiel d'oxydation du fer(II) en fer(III) est directement liée à la première sphère de coordination du complexe.^{12,13}

Pour les complexes [(₂MeL₄²)Fe^{II}Cl₂], [(₂MeL₄²)Fe^{II}(OTf)₂] et [(₂MeL₆²)Fe^{II}](PF₆)₂ les voltamogrammes sont présentés Figure 13 et Figure 14 et ont été comparés avec les complexes parents [(_mL₄²)Fe^{II}(OTf)₂] et [(TPEN)Fe^{II}](PF₆)₂.

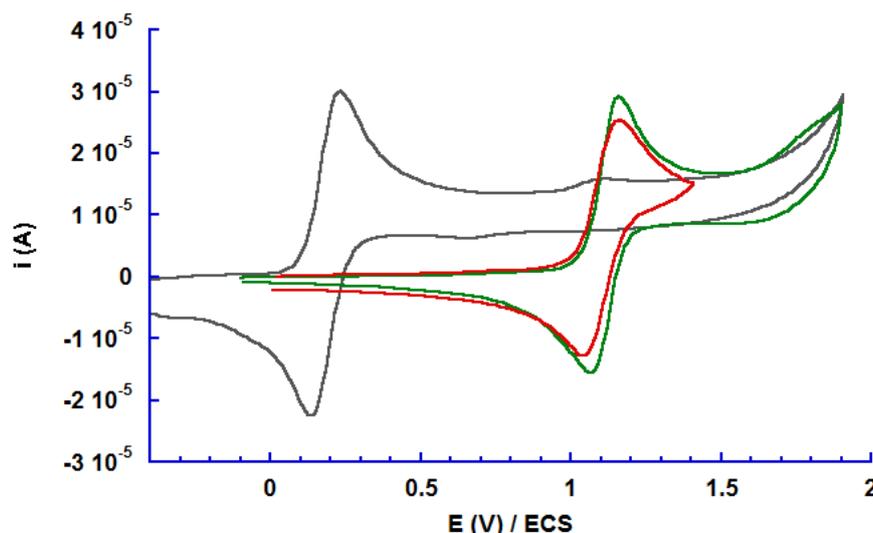


Figure 13: Voltammogrammes des complexes $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (gris) (2.0 mM), $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (vert) (2.0 mM) et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (rouge) (2.0 mM) dans ACN TBAPF₆ 0.1 M.

Pour le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$, une vague réversible à 0.18 V/ECS est observée, elle est quasiment identique à celle obtenue pour le complexe similaire $[(mL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$.⁹ Par conséquent, le fer(II) dans le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ est coordonné par deux chlorures en solution. La petite vague non réversible de très faible intensité à 1.1 V peut être attribuée à l'espèce $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$.

Les voltammogrammes des complexes $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ sont très similaires avec un potentiel de demi-vague de 1.1 V/ECS. La signature redox à 1.1 V correspond aux couples $[(mL_4^2)Fe^{III/II}(ACN)_2]^{3+/2+}$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{III/II}(ACN)_2]^{3+/2+}$. Cette attribution est en accord avec les résultats observés pour des complexes similaires par Nathalie Ségaud.¹²

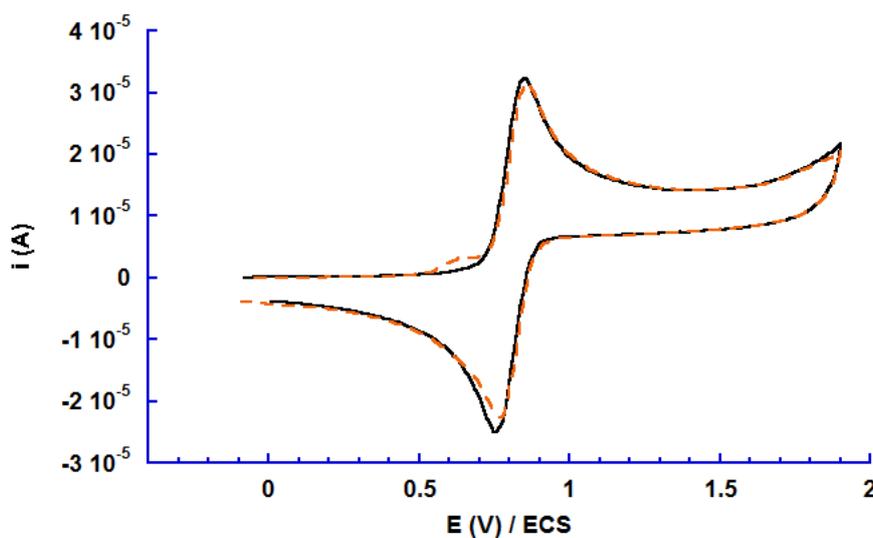


Figure 14: Voltammogrammes des complexes $[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$ (pointillés oranges) (2.0 mM) et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$ (noir) (2.0 mM) dans ACN TBAPF₆ 0.1 M.

Les résultats obtenus par cette étude ne sont pas incompatibles avec ceux obtenus par spectrophotométrie UV-visible. En effet, les études par voltamétrie cyclique nécessitent un électrolyte support qui favorise la formation d'espèces dichargées. Les structures des complexes en solution sont proposées Tableau 6.

Les complexes $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ et $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ ont exactement la même signature électrochimique, avec des potentiels de demi-vague de 0.80 V (Figure 14). Dans ces conditions, le ligand hexadente reste lié au métal.

Le Tableau 6 résume les différentes données des complexes ainsi que leur structure en solution déduite par spectroscopie UV-visible et par voltamétrie cyclique.

Tableau 6 : Valeurs des potentiels $E_{1/2}$ pour les couples $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, écart ΔE , et structure des complexes en solution dans l'acétonitrile (UV-visible) et l'acétonitrile TBAPF₆ 0.1 M (voltamétrie cyclique).

Complexe	$E_{1/2}$ (V) / ECS	ΔE (mV)	Structure en solution dans ACN/TBAPF ₆	Structure en solution dans ACN
$[(\text{mL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	0.19	64	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{FeCl}_2]$	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{FeCl}_2]$
$[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$	0.18	102	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{FeCl}_2]$	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{FeCl}_2]$
$[(\text{mL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$	1.12	97	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{ACN})_2]^{2+}$	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{ACN})_2]^{2+}$ $[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{OTf})_2]$
$[(2\text{MeL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$	1.10	116	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{ACN})_2]^{2+}$	$[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{ACN})_2]^{2+}$ $[\text{N}_2\text{Py}_2\text{Fe}(\text{OTf})_2]$
$[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$	0.81	76	$[\text{N}_2\text{Py}_4\text{Fe}]^{2+}$	$[\text{N}_2\text{Py}_4\text{Fe}]^{2+}$
$[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$	0.80	98	$[\text{N}_2\text{Py}_4\text{Fe}]^{2+}$	$[\text{N}_2\text{Py}_4\text{Fe}]^{2+}$

2. Etude spectrophotométrique à température variable

Des équipes ont étudié l'évolution de l'état de spin du fer(II) dans ce type de complexe en fonction de la température.^{10,11,14-16} Les complexes parents $[(\text{mL}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$ et $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ sont connus pour présenter en solution dans l'acétonitrile, une transition de spin autour de la température ambiante.^{10,15,16} Le suivi de l'état de spin du fer(II) en fonction de la température a été effectué par des études de spectroscopie RMN ¹H en utilisant la méthode d'Evans.^{11,14-16} A partir des proportions en complexes haut et bas spin, les auteurs ont pu remonter à l'enthalpie et l'entropie de cette transition de spin. Cependant, nous avons vu précédemment que certains complexes subissaient un échange de ligands exogènes qui induisait une modification de l'état de spin du complexe. L'état de spin du centre métallique et la labilité des ligands sont des paramètres importants pour la réactivité chimique.

Nous avons donc souhaité étudier l'évolution de l'état de spin du fer(II) des nouveaux complexes en fonction de la température pour tenter de faire une discrimination entre la transition de spin

intrinsèque et l'échange chimique qui peut être à l'origine de l'équilibre de spin. Pour cela, nous avons effectué le suivi par spectroscopie d'absorption électronique en fonction de la température en regardant l'évolution du coefficient d'extinction molaire (ϵ) pour la transition **MLCT** comme Toftlund et al. l'ont fait pour le complexe $[\text{Fe}(\text{pybenH})_3]^{2+}$.¹⁵

2.1. Evolution de la transition MLCT en fonction de la température pour les complexes à ligands de type L_6^2

Le coefficient d'extinction molaire du complexe $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$ évolue de $7\,400$ à $10\,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ($\Delta\epsilon_1 \approx 2940\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 313 et 233 K . Le coefficient d'extinction molaire du complexe $[(2_{\text{Me}}L_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$ évolue de 5700 à $8\,200\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ($\Delta\epsilon_2 \approx 2480\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 318 et 233 K (Figure 15).

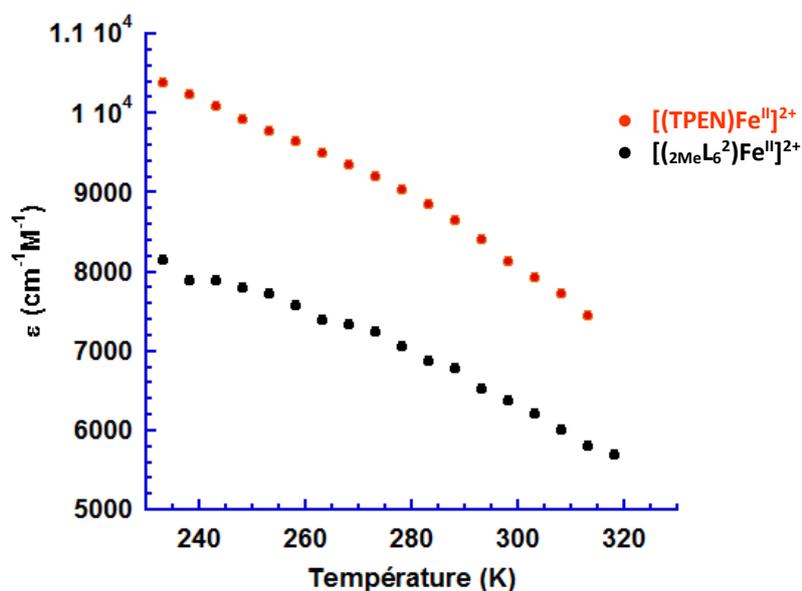


Figure 15: Evolution du coefficient d'extinction molaire de la transition MLCT des complexes à ligands de type L_6^2 en fonction de la température, dans l'acétonitrile distillé.

Par spectrophotométrie UV-vis et voltamétrie cyclique, il a été précédemment montré que les deux ligands TPEN et $2_{\text{Me}}L_6^2$ occupent les six positions de la première sphère de coordination du fer(II). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que la variation du coefficient d'extinction molaire sur la gamme de température étudiée est due uniquement à une conversion de spin intrinsèque du centre métallique.

A température ambiante, il y a un mélange de complexes dans un état haut spin et bas spin. Sur la gamme de température étudiée, la conversion de spin n'est pas totale.

Sur la même gamme de température, l'état de spin du fer(II) dans le complexe $[(2_{Me}L_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ a été suivi qualitativement par spectroscopie RMN 1H , comme cela a été fait par Toftlund pour le complexe $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$.¹⁷ Il est possible d'observer que le complexe est paramagnétique à 300 K avec des résonances larges et déplacées vers les bas champs, alors qu'à 250 K il est diamagnétique (Figure 16). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par spectroscopie UV-visible.

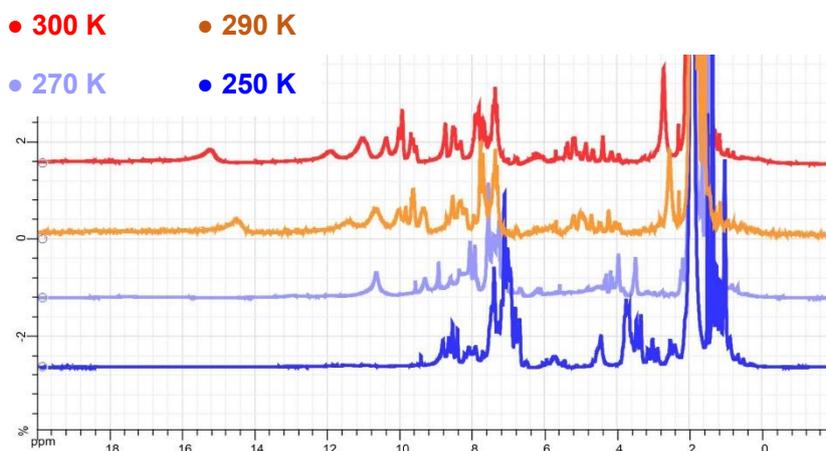


Figure 16: Spectres RMN 1H à 400 MHz du complexe $[(2_{Me}L_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ dans l'acétonitrile à différentes températures.

2.2. Evolution de la transition MLCT en fonction de la température pour les complexes à ligands de type L_4^2

Les courbes Figure 17 présentent l'évolution du coefficient d'extinction molaire en fonction de la température pour les différents complexes avec des ligands tétradentes.

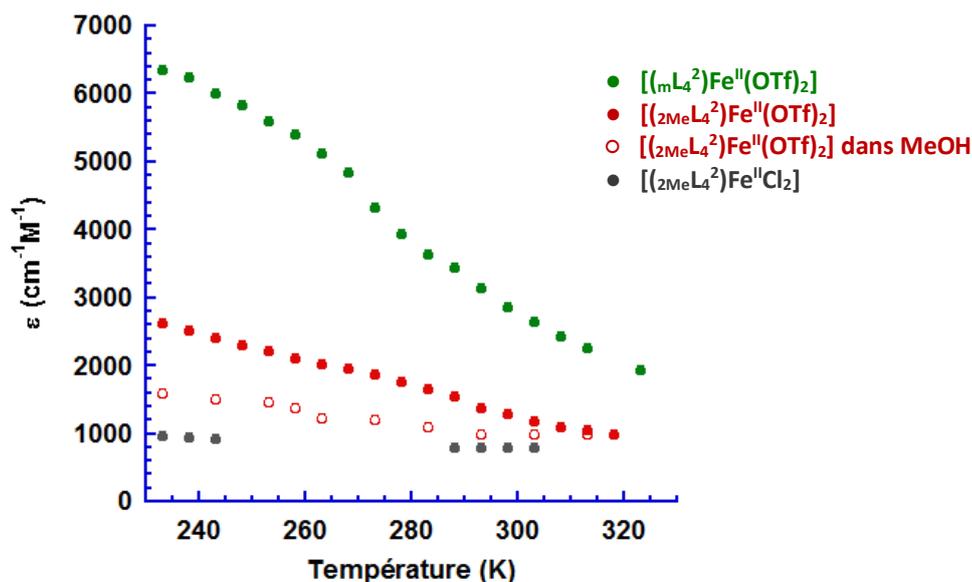


Figure 17: Evolution du coefficient d'extinction molaire de la transition MLCT des complexes à ligands de type L_4^2 en fonction de la température, dans l'acétonitrile distillé et le méthanol distillé pour le complexe $[(2_{Me}L_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$.

Dans le cas du complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (points gris Figure 17), le coefficient d'extinction molaire est quasiment constant entre 303 et 233 K ($\Delta\epsilon_3 \approx 190 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Le complexe est, sur la gamme de température étudiée, dans un état haut spin, et il n'y a pas d'équilibre chimique avec un complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$ qui se traduirait par un changement important du coefficient d'extinction molaire.

Le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ dissous dans le méthanol (cercles rouges Figure 17) présente également une faible variation du coefficient d'extinction molaire ($\Delta\epsilon_4 \approx 580 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 313 et 233 K. Le méthanol n'étant pas un solvant très coordinant, on peut supposer que cette évolution traduit une conversion de spin intrinsèque très incomplète et non pas un échange chimique.

Ce même complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ dissous dans l'acétonitrile (points rouges Figure 17) présente une variation du coefficient d'extinction molaire plus prononcée ($\Delta\epsilon_5 \approx 1660 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 318 et 233 K. Cela s'explique par un équilibre chimique : le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$ possédant un champ de ligand plus fort que le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]^{2+}$, il basculera plus aisément vers un état diamagnétique, comme il a été observé par voltamétrie cyclique.

Pour le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (points verts Figure 17), entre 323 et 233 K, le coefficient d'extinction molaire évolue de 1960 à 6350 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ($\Delta\epsilon_6 \approx 4390 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Cela correspond à la plus forte évolution du coefficient d'extinction molaire. Comme observé pour le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ dissous dans l'acétonitrile, la variation observée est due à un équilibre chimique entre $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(mL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$, et à une conversion de l'état de spin du fer(II) plus prononcée. La température critique est définie pour un mélange équimolaire en complexe haut spin et bas spin, se traduisant par un point d'inflexion sur la courbe, dans notre cas, $T_c = 277 \text{ K}$. Cette valeur est en accord avec celles obtenues par England¹⁰ et Bryliakov.¹⁶ La température critique enregistrée par ces deux équipes est respectivement de 264 K et de 284 K dans l'acétonitrile deutéré par des études de spectroscopie RMN ^1H en utilisant la méthode d'Evans.

D'après les courbes observées, avec le ligand protégé $2MeL_4^2$, la transition de spin est moins favorisée vers l'état bas spin. Cet effet n'a pas été observé avec les ligands TPEN et $2MeL_6^2$.

2.3. Rationalisation des observations

Les évolutions du coefficient d'extinction molaire en fonction de la température sont dues à un équilibre chimique (EC) et une conversion de spin (CS) (Figure 18). La valeur du coefficient d'extinction molaire pour une température donnée est liée à la proportion de complexes haut et bas spin en solution. En faisant l'hypothèse que l'équilibre de spin pour les complexes $[LFe^{II}(OTf)_2]$ est négligeable et que la substitution des ligands exogènes OTf par ACN ne se produit qu'entre complexes de même multiplicité de spin ($S = 2$), les réactions conduisant aux variations de ϵ peuvent s'écrire :

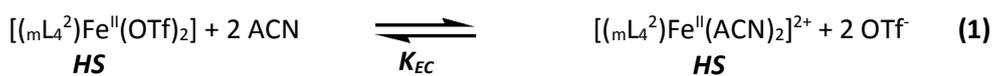


Figure 18: Schéma de l'équilibre chimique (1) et de la conversion de spin (2) en solution dans l'acétonitrile. Pour l'équilibre (1), le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$ est dans un état haut spin.

Il est possible d'exprimer les constantes de ces deux équilibres de la façon suivante :

$$K_{EC} = \frac{[Fe(OTf)_2]_{HS} [ACN]^2}{[Fe(ACN)_2]_{HS} [OTf]^{-2}} \quad K_{CS} = \frac{[Fe(ACN)_2]_{HS}}{[Fe(ACN)_2]_{BS}} \quad \text{(3)}$$

La constante de réaction globale K_{Obs} traduisant l'équilibre chimique et la conversion de spin peut être définie de la façon suivante :

$$K_{Obs} = ([Fe(OTf)]_{HS} + [Fe(ACN)]_{HS}) / [Fe(ACN)]_{BS} = C_{HS} / C_{BS} \quad \text{(4)}$$

$$K_{Obs} = K_{CS} (1 + K_{EC} [OTf]^{-2} / [ACN]^2) \quad \text{(5)}$$

$$K_{Obs} = K_{CS} + K_{EC}' K_{CS} \quad \text{où} \quad K_{EC}' = K_{EC} [OTf]^{-2} / [ACN]^2 \quad \text{(6)}$$

En faisant l'hypothèse que les complexes de type $[(L_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (haut spin) et $[(L_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$ (haut spin) possèdent le même ϵ et en utilisant pour les complexes à ligands de type L_4^2 des coefficients d'extinction molaire limites (HS : $770 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$; BS : $8\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) le coefficient d'extinction molaire observé permet de remonter à la répartition entre les complexes haut spin et bas spin grâce à l'expression :

$$\epsilon_{Obs} = C_{HS} \epsilon_{HS} + C_{BS} \epsilon_{BS} \quad \text{(7)}$$

Cette expression est aussi utilisée pour les complexes à ligands de type L_6^2 en utilisant les coefficients d'extinction molaire limites (HS : $1\,600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$; BS : $12\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).

En notant la fraction molaire en espèce haut spin α , et la fraction molaire en espèce bas spin ($1-\alpha$), on peut réécrire une expression simplifiée :

$$\epsilon_{Obs} = \alpha \epsilon_{HS} C_{tot} + (1 - \alpha) \epsilon_{BS} C_{tot} \quad (8)$$

Ainsi, K_{Obs} peut s'écrire à partir des fractions molaires en espèces haut et bas spin :

$$K_{Obs} = \alpha / (1-\alpha) \quad (9)$$

Cette constante de réaction est liée à l'enthalpie libre de réaction $\Delta_r G^\circ_{Obs}$:

$$\Delta_r G^\circ_{Obs} = - RT \ln (K_{Obs}) = \Delta_r H^\circ_{Obs} - T \Delta_r S^\circ_{Obs} \quad (10)$$

Ainsi il est possible d'exprimer $\ln(K_{Obs})$ en fonction de l'entropie et de l'enthalpie de réaction:

$$\ln(K_{Obs}) = \Delta_r S^\circ_{Obs} / R - \Delta_r H^\circ_{Obs} / (RT) \quad (11)$$

Pour chaque température, la valeur de ϵ observée conduit à déterminer α , donc K_{Obs} . Comme observé Figure 19, $\ln K_{Obs}$ est linéaire en fonction de $1000/T$. La pente (B) et l'ordonnée à l'origine (A) de la droite $\ln K_{Obs} = A + B \times 1000/T$ permettent d'extraire l'entropie et l'enthalpie de la réaction.

$$\Delta_r H^\circ_{Obs} = - 1\,000 \times R \times B \quad (12)$$

$$\Delta_r S^\circ_{Obs} = A \times R \quad (13)$$

Pour les complexes qui subissent uniquement une conversion de spin sur la gamme de température étudiée, les enthalpies et entropies de la conversion de spin correspondent aux grandeurs respectives observées.

Pour les complexes qui subissent à la fois un équilibre chimique et une conversion de spin, K_{Obs} est liée à K_{EC}' et K_{CS} par la relation (14) :

$$\ln(K_{Obs}) = \ln(K_{CS} (1 + \ln(K_{EC}')) = \ln K_{CS} + \ln (1 + K_{EC}') \quad (14)$$

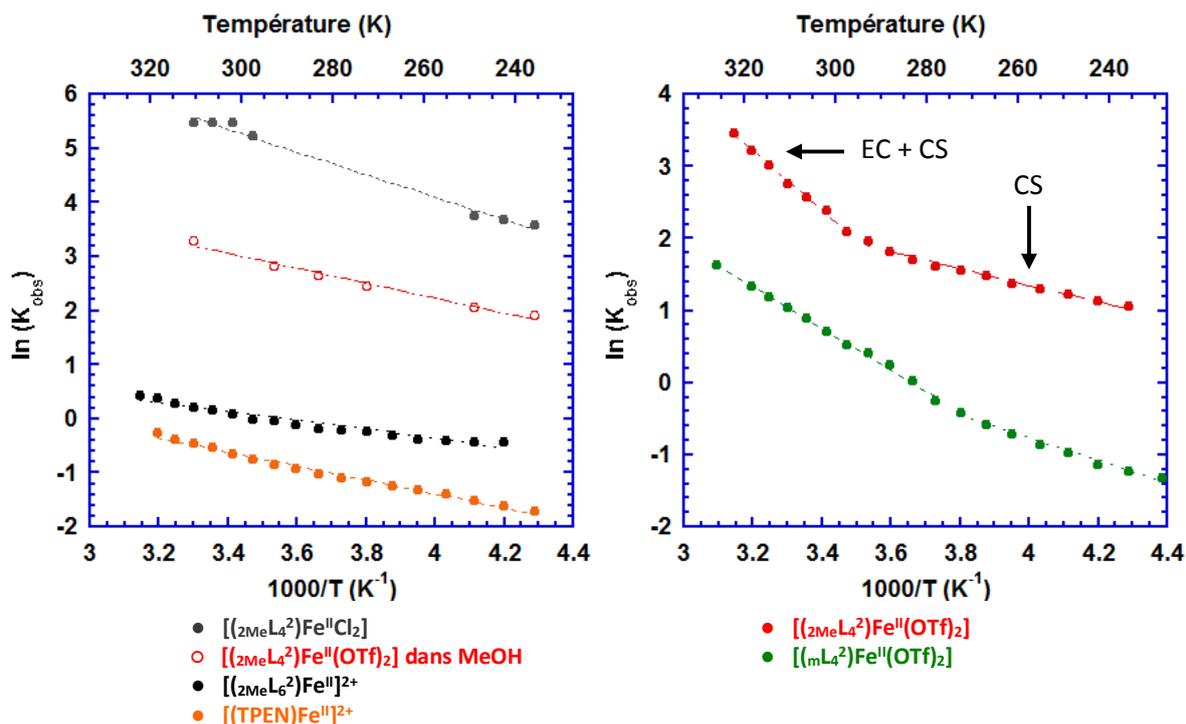


Figure 19: Evolution de $\ln(K_{\text{Obs}})$ en fonction $1000/T$ (K^{-1}) pour les complexes étudiés dans l'acétonitrile ; les données expérimentales sont représentées par des points/cercles et les fits sont représentés par des traits pointillés. La température est donnée à titre indicatif.

L'évolution de $\ln(K_{\text{Obs}})$ en fonction de $1000/T$ a été tracée pour les 5 complexes (Figure 19). Les courbes obtenues sont linéaires sur la gamme de température pour tous les complexes sauf pour $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ dans l'acétonitrile. Pour ces deux complexes, les linéarisations ont été effectuées sur deux gammes de température différentes. En faisant l'hypothèse que l'échange chimique est négligeable sur le régime basse température, les paramètres K_{CS} , $\Delta_r H^\circ_{\text{CS}}$ et $\Delta_r S^\circ_{\text{CS}}$ peuvent être déterminés ($K_{\text{Obs}} = K_{\text{EC}}$). La valeur de K_{CS} ainsi obtenue permet de déterminer K_{EC} pour le segment de droite observé à hautes température et les paramètres K_{EC} , $\Delta_r H^\circ_{\text{EC}}$ et $\Delta_r S^\circ_{\text{EC}}$ associés.

Les grandeurs thermodynamiques déterminées à partir des données expérimentales sont présentées Tableau 7.

Tableau 7: Grandeurs thermodynamiques des équilibres chimiques et de spin des complexes, où HT : hautes températures et BT : basses températures.

Entrée	Complexe	$\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\circ_{\text{obs}}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta H^\circ_{\text{CS}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\circ_{\text{CS}}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta H^\circ_{\text{EC}'}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\circ_{\text{EC}'}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
1	$[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	24 (HT) 13 (BT)	88 (HT) 46 (BT)	13	46	11	42
2	$[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	34 (HT) 12 (BS)	135 (HT) 49 (BT)	12	49	22	86
3	$[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ (MeOH)	11	64	11	64		
4	$[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$	17	104	17	104		
5	$[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$	11	31	11	31		
6	$[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$	7.1	25	7.1	25		

Les valeurs positives des ΔH°_{CS} (BS \rightarrow HS) correspondent à l'allongement de la liaison Fe-L par peuplement de deux électrons des orbitales antiliantes eg^* .^{15,18}

Les valeurs positives des ΔS°_{CS} (BS \rightarrow HS) correspondent à l'augmentation de la vibration des liaisons Fe-L et de la multiplicité de spin.^{15,18} Le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$ (entrée 4) est celui pour lequel le ΔS°_{CS} et ΔH°_{CS} sont les plus élevés ($104 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ et $17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'augmentation de la vibration des liaisons Fe-L dans ce complexe traduit a priori une variation importante de la longueur de ces liaisons, ce qui pourrait expliquer la valeur du ΔH°_{CS} . D'autre part, le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$ (entrée 6) a les grandeurs thermodynamiques de la conversion de spin les plus faibles. Ces données traduisent probablement une faible variation de la vibration des liaisons Fe-L entre les états bas spin et haut spin, avec des longueurs de liaison peu différentes entre les deux états de spin. Il a été observé que ce complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$ est moins réactif que le complexe $[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$ (cf. chapitre 3). Ce complexe est vraisemblablement moins labile que le complexe $[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$, ce qui pourrait s'expliquer par les grandeurs thermodynamiques faibles pour la conversion de spin et des liaisons Fe-L semblables entre les deux états.

Pour tous les complexes à ligands mL_4^2 et $2MeL_4^2$ les valeurs sont très semblables que l'étude ait été effectuée dans l'acétonitrile ou dans le méthanol. De petites différences des paramètres thermodynamiques selon le solvant d'étude ont déjà été mises en évidence par Toftlund.¹⁵

Par rapport aux complexes parents $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$, la présence des deux groupements méthyle en α des pyridines ne semble pas influencer sur l'état de spin du complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$. Cependant, dans le cas du second nouveau complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$, l'effet de ces groupements est important, et semble augmenter la stabilité du complexe dans un état majoritairement bas spin.

3. Conclusion

Les nouveaux complexes ont été caractérisés. A l'état solide, Les géométries des complexes avec les ligands protégés sont un peu moins distordues que celles des complexes parents. En solution, des équilibres chimiques ont lieu à température ambiante, avec les complexes à ligands de type L_4^2 . L'étude en température appuie le fait que le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)$ est plus inerte que le complexe $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$. Cette différence va influencer la réactivité de celui-ci comme il sera présenté dans le chapitre suivant.

Références

- (1) Martinho, M.; Banse, F.; Bartoli, J.-F.; Mattioli, T. A.; Battioni, P.; Horner, O.; Bourcier, S.; Girerd, J.-J. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 9592.
- (2) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 3182.
- (3) Thibon, A.; Bartoli, J.-F.; Bourcier, S.; Banse, F. *Dalton Transactions* **2009**, 9587.
- (4) Thibon, A., Université Paris Sud, 2006.
- (5) Jollet, V., Université Paris Sud, 2011.
- (6) Simaan, J.; Poussereau, S.; Blondin, G.; Girerd, J.-J.; Defaye, D.; Philouze, C.; Guilhem, J.; Tchertanov, L. *Inorganica Chimica Acta* **2000**, *299*, 221.
- (7) Mialane, P.; Nivorjine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1085.
- (8) Martinho, M., Université Paris Sud, 2006.
- (9) Raffard-Pons Y Moll, N., Université Paris Sud, 2002.
- (10) England, J.; Gondhia, R.; Bigorra-Lopez, L.; Petersen, A. R.; White, A. J. P.; Britovsek, G. J. P. *Dalton Transactions* **2009**, 5319.
- (11) Britovsek, G. J. P.; England, J.; White, A. J. P. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 8125.
- (12) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.
- (13) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Muñoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 7285.
- (14) Toftlund, H. Y.-A., *S. Acta Chem. Scand.* **1981**, *35*, 575.
- (15) Toftlund, H. *Coordination Chemistry Reviews* **1989**, *94*, 67.
- (16) Bryliakov, Konstantin P.; Duban, Eduard A.; Talsi, Evgenii P. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, *2005*, 72.
- (17) Bernal, I.; Jensen, I. M.; Jensen, K. B.; McKenzie, C. J.; Toftlund, H.; Tuchagues, J.-P. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995**, 3667.
- (18) Turner, J. W.; Schultz, F. A. *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 5296.

Chapitre 3 : Réactivité des nouveaux complexes renforcés

De nombreuses métalloenzymes à fer réagissent avec le dioxygène de l'air pour catalyser l'insertion d'un atome d'oxygène dans un substrat organique. Les cycles catalytiques présentés au chapitre 2 pour les monooxygénases montrent la formation de différentes espèces intermédiaires très réactives et instables tels que le Fe^{III} -superoxo, Fe^{III} -peroxo, Fe^{III} -hydroperoxo et Fe^{V} -oxo.

A partir de systèmes biomimétiques non hémiques de fer(II), il est possible de reproduire certains intermédiaires clé des monooxygénases. La formation et les caractéristiques de ces espèces ont été reportées par diverses équipes.¹⁻³

Dans ce chapitre, la réactivité du nouveau complexe $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ est présentée, ainsi que des résultats préliminaires en catalyse d'oxydation, et une nouvelle réactivité mise en évidence pour l'oxydation de la cyclohexanone.

1. Réactivité vis-à-vis de l'eau oxygénée et de l'iodosylbenzène

Il a été montré que certains complexes biomimétiques de fer(II) sont capables d'activer le dioxygène de l'air en solution en présence d'un réducteur chimique et de protons.^{4,5} Cependant, il est plus facile de générer, à partir du fer(II), des intermédiaires $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})$ par ajout de H_2O_2 et $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ par ajout d'un donneur d'un unique atome d'oxygène (PhIO ou mCPBA) comme montré Figure 1. Les intermédiaires formés peuvent oxyder des substrats organiques. Une première étude a donc été effectuée sur les complexes synthétisés pour connaître leur réactivité vis-à-vis de deux oxydants : H_2O_2 et PhIO.

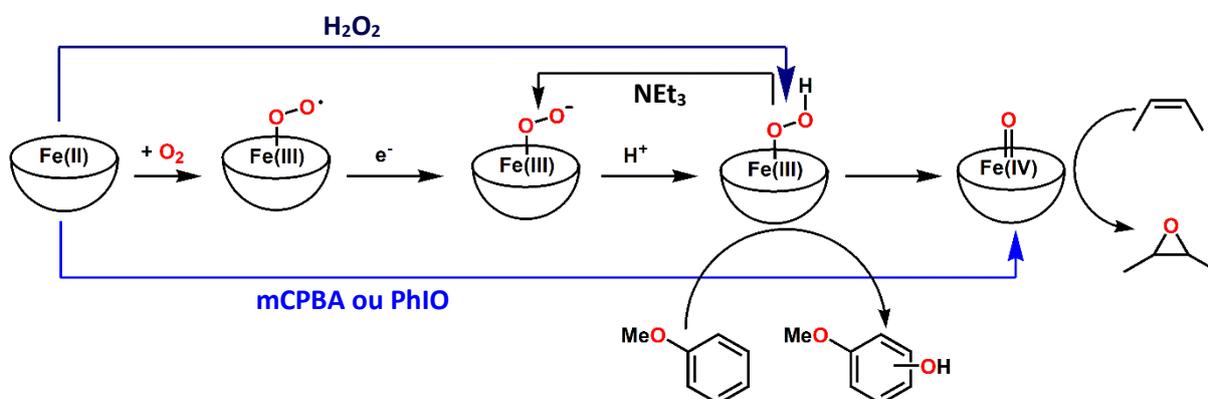


Figure 1: Formation des espèces oxydantes du fer en présence de divers oxydants et exemples de réactivité observés au laboratoire.

Le complexe caractérisé précédemment $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ a été utilisé pour générer un intermédiaire $Fe^{III}-OOH$ à l'aide d'eau oxygénée. L'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OO)]^+$ a été formé par addition de base sur $[(2MeL_6^2)Fe^{II}(OOH)]^{2+}$ et le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ a également été utilisé pour suivre la formation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$ par addition de PhIO.

1.1. Caractérisation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$

1.1.1. Etude par spectroscopie d'absorption électronique UV-visible

L'addition d'un excès d'eau oxygénée sur le complexe de $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ dans le méthanol conduit à l'apparition d'une bande d'absorption large et peu intense à 570 nm (Figure 2 gauche). Lorsque de l'acide perchlorique est ajouté au préalable, une bande bien définie et plus intense croît à 530 nm (Figure 2 droite).

Cette signature est bien connue et est attribuée à des complexes $Fe^{III}-OOH$ bas spin. Les maxima de ces bandes varient de 515 nm à 592 nm selon le ligand du complexe de départ.⁶ Elles sont attribuées à des transferts de charge **LMCT** de l'hydroperoxo vers le $Fe(III)$. Le coefficient d'absorption molaire de l'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$ formé n'a pas été déterminé, mais il est généralement de l'ordre de $1\ 000\ cm^{-1}M^{-1}$ pour ce type d'intermédiaire.⁷

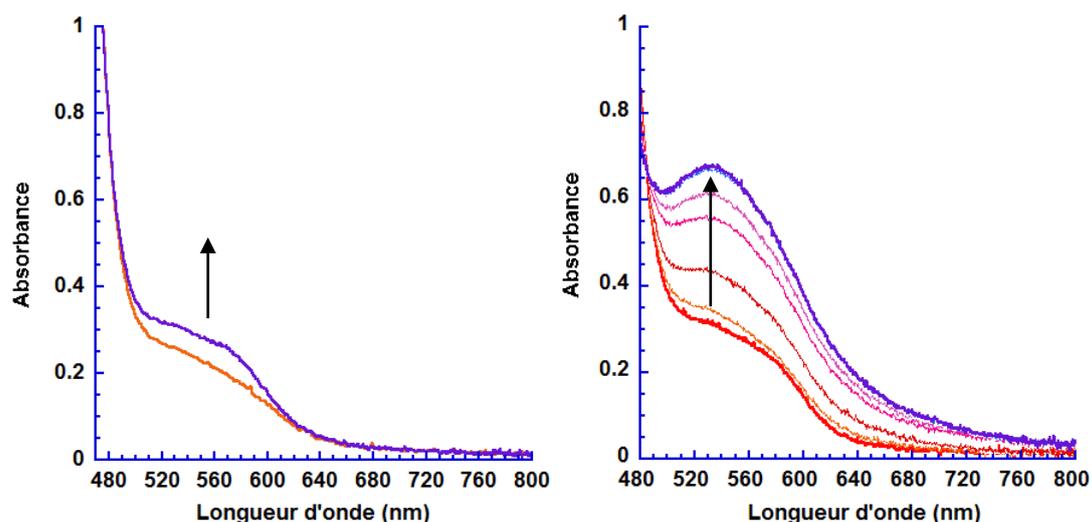


Figure 2: Suivi par absorption UV-visible de la formation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ par addition de 100 éq. de H_2O_2 (spectres de gauche) et par addition de 1.2 éq. de $HClO_4$ + 100 éq. de H_2O_2 (spectres de droite), à une solution de $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ dans le méthanol à $-50^\circ C$ ($[Fe]=1\ mM$).

En absence d'acide perchlorique, il est difficile de générer l'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$, et à $-50^\circ C$ cet intermédiaire est très instable. Par comparaison, dès qu'un équivalent d'acide perchlorique est ajouté au mélange réactionnel, il est possible de générer cet intermédiaire qui est stable plus de 6h (à $-50^\circ C$ et à $0^\circ C$).

Le complexe $[(2_{Me}L_6^2)Fe^{II}]^{2+}$ est connu au laboratoire pour être un complexe bas spin à basse température, cet état de spin se traduit par une inertie du complexe, et il est difficile de générer l'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$. L'addition de 1.2 éq. d'acide perchlorique aide à décoordonner une pyridine du métal (Figure 3).⁸ Cela s'accompagne d'un changement de l'état bas spin vers un état haut spin, qui accroît la réactivité du complexe.

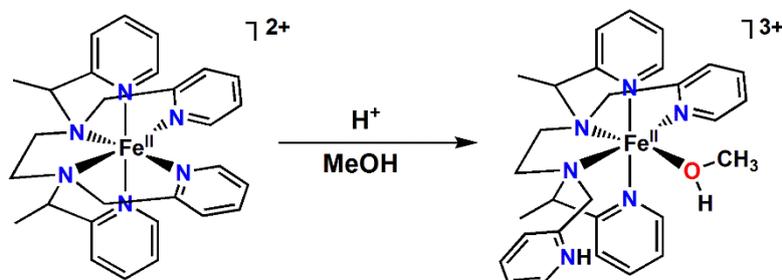


Figure 3: Schéma de l'effet de l'acide perchlorique sur le complexe $[(2_{Me}L_6^2)Fe^{II}]^{2+}$.

Tableau 1 : Taux de conversion de l'intermédiaire $Fe^{III}(OOH)$ dans le méthanol en fonction de ses conditions de formation. Le taux de conversion est calculé à partir de l'absorbance maximale de la transition MLCT de l'intermédiaire, avec un coefficient d'extinction de l'ordre de $1\ 000\ cm^{-1}M^{-1}$.⁷

	Condition de formation de l'intermédiaire $Fe^{III}OOH$	Taux de conversion
100 éq. H_2O_2	-50°C	Non estimable
100 éq. H_2O_2 + 1.2 éq. $HClO_4$	-50°C	71 % (+/- 5)
100 éq. H_2O_2 + 1.2 éq. $HClO_4$	0°C	64 % (+/- 5)

1.1.2. Spectroscopie RPE

Cet intermédiaire a également été caractérisé par spectroscopie RPE. L'échantillon a été prélevé au maximum d'intensité de la bande à 530 nm. Le complexe de $Fe(II)$ de départ est silencieux en RPE, donc c'est une technique de choix pour suivre la formation du $Fe(III)-OOH$ qui est détectable par spectroscopie RPE. Le spectre obtenu est présenté Figure 4.

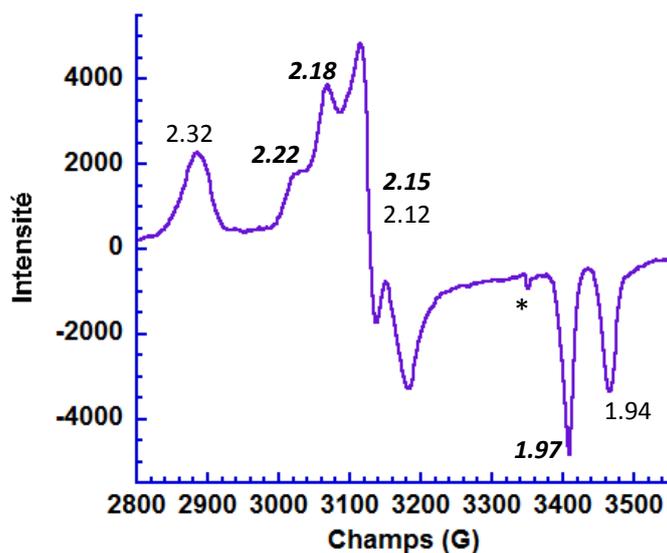


Figure 4: Spectre RPE en bande X de $[(2MeL_6)_2Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ dans le méthanol, enregistré à 100 K. Le signal de la cavité est représenté par un astérisque.

Le spectre est centré autour de $g = 2$, ce qui est caractéristique d'espèces Fe(III) monomériques bas spin ($S=1/2$). Les spectres des complexes Fe^{III}-OOH ($S=1/2$) sont assez proches de ceux d'espèces axiales.² Les signaux à (2,22 ; 2,15 ; 1,97) et (2,18 ; 2,12 ; 1,97) peuvent être attribués à de tels intermédiaires.⁹ La présence de plusieurs signaux s'explique par l'existence de rotamères, isomères géométriques dont la structure schématique est présentée pour quelques exemples Figure 5.

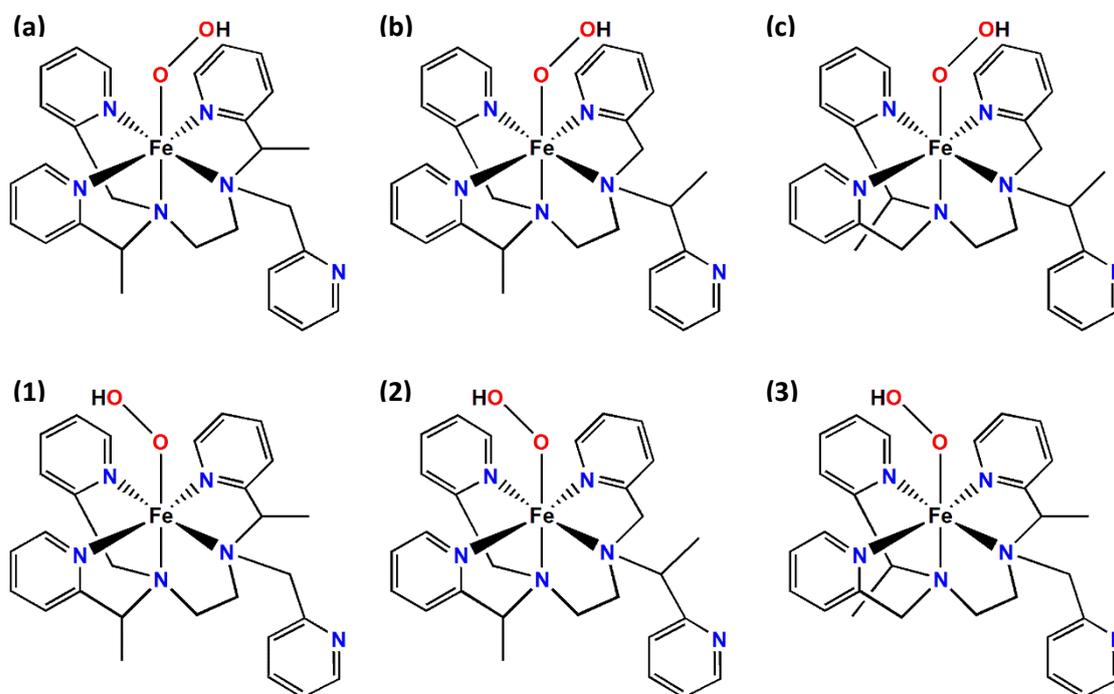


Figure 5 : Représentation schématique d'isomères de rotations (a)/(1), (b)/(2) et (c)/(3), et d'isomères géométriques (a),(1)/(b),(2)/(c),(3). **Schémas du haut** : la projection de la liaison O-O dans le plan équatorial est bissectrice de l'angle $N_{py}-Fe-N_{am}$; **Schémas du bas** : la projection de la liaison O-O dans le plan équatorial est bissectrice de l'angle $N_{py}-Fe-N_{py}$.

De plus, le ligand possède deux carbones asymétriques, ce qui suggère qu'il y a également d'autres isomères.⁹ Une attribution plus précise est impossible à ce stade. Le signal plus rhombique à (2,32 ; 2,12 ; 1,94) et très anisotrope peut être attribué à l'espèce $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OMe)]^{2+}$ par comparaison avec la littérature.^{9,10}

1.2. Caractérisation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$

1.2.1. Action d'une base sur $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$

Afin de déprotoner l'espèce $Fe^{III}(OOH)$ pour former l'intermédiaire $Fe^{III}(OO)$, une base est utilisée. Jalila Simaan a étudié la formation du complexe $[(TPEN)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ ($S = 5/2$), pour laquelle 5 équivalents de triéthylamine ont permis de déprotoner l'intermédiaire $Fe^{III}OOH$ à température ambiante.¹¹

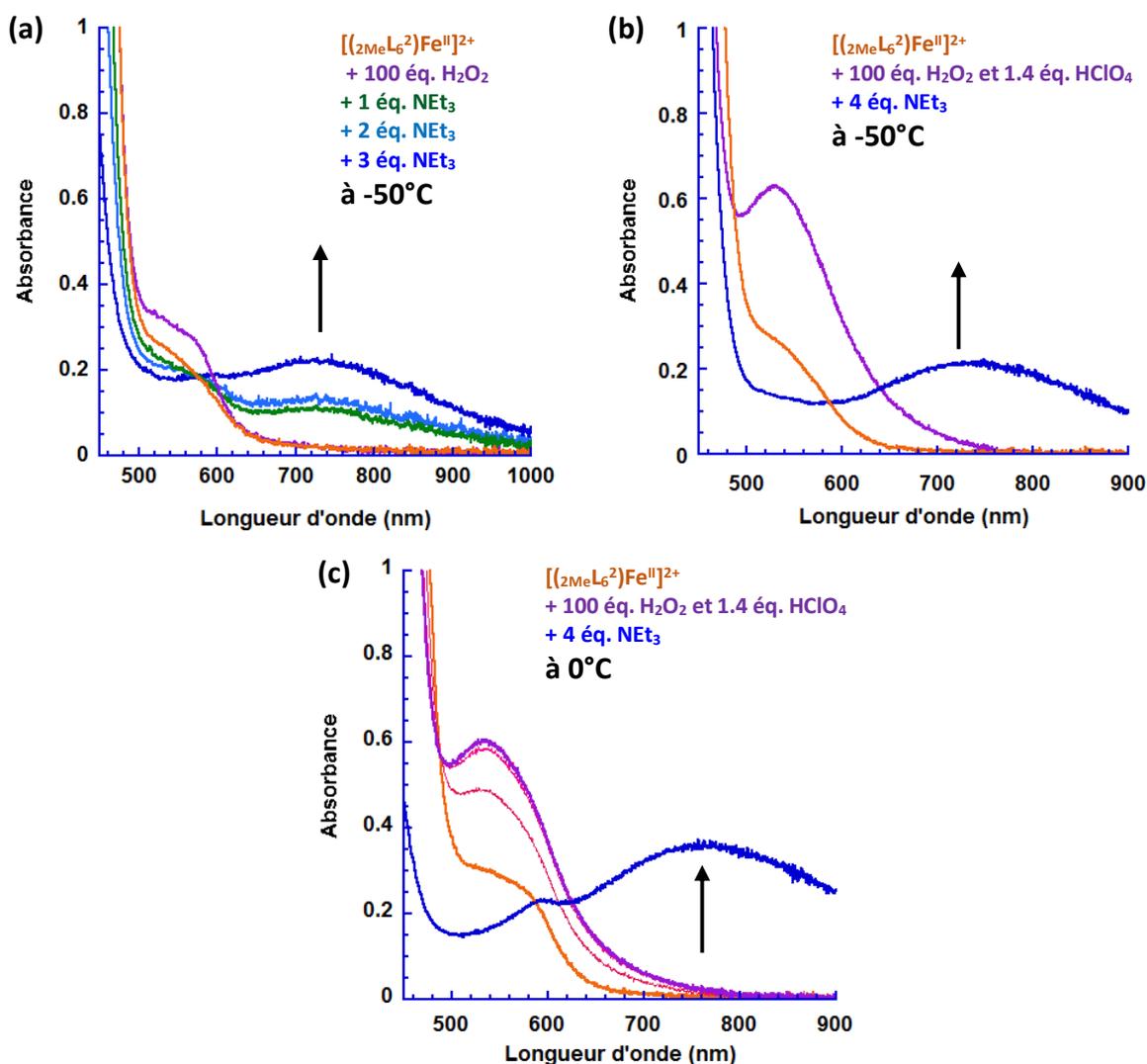


Figure 6: Evolution suivie par UV-visible du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}]^{2+}$ en présence de H_2O_2 , $HClO_4$ et NEt_3 à $-50^\circ C$ et $0^\circ C$ dans le méthanol ($[Fe] = 1.0\text{ mM}$).

Des ajouts de triéthylamine sur l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ ont été réalisés à 0 et $-50^\circ C$ (Figure 6).

A $-50^\circ C$ et quand l'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$ a été formé par addition de H_2O_2 en absence d'acide perchlorique, l'addition de 3 équivalents de triéthylamine sur la solution contenant l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ ($\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$) dans le méthanol conduit à une coloration verte de la solution (Figure 6 (a)). La nouvelle espèce caractérisée par un maximum d'absorption à 730 nm est stable pendant plusieurs minutes. Cette espèce semble être, d'après l'étude UV-visible et des résultats de la littérature, l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ haut spin ($S = 5/2$).^{7,10,12-14} Le coefficient d'absorption molaire pour ce type d'intermédiaire est d'environ $500 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$.¹¹ Le taux de conversion est donc d'environ 40-50 %.

A $-50^\circ C$ et quand l'intermédiaire $Fe^{III}-OOH$ a été formé par addition de H_2O_2 en présence de $HClO_4$, l'addition de 4 équivalents de triéthylamine sur la solution contenant l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ dans le méthanol conduit à une coloration verte de la solution ($\lambda_{max} = 730 \text{ nm}$) (Figure 6 (b)). Le taux de conversion est également d'environ 40-50 %.

A $0^\circ C$, dans les mêmes conditions que précédemment, le taux de conversion vers l'intermédiaire $Fe^{III}-(\eta^2-O_2)$ ($\lambda_{max} = 760 \text{ nm}$) est de l'ordre de 70 % (Figure 6 (c)). Malheureusement, à cette température, l'espèce est très instable et se dégrade très rapidement avec un fort effet catalase.

1.2.2. Spectroscopie RPE de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$

L'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(O_2)]^+$ a été étudié par spectroscopie RPE. Un échantillon a été prélevé au maximum d'intensité de la bande à 730 nm. Le spectre obtenu est présenté Figure 7.

Différentes résonnances sont observées.

Les résonances à bas champs sont caractéristiques de deux espèces Fe(III) haut spin. Une de ces espèces est caractérisée par la résonance à $g = 4,3$ et l'autre par des résonances à $g = 8,22$ et $g = 5,55$.

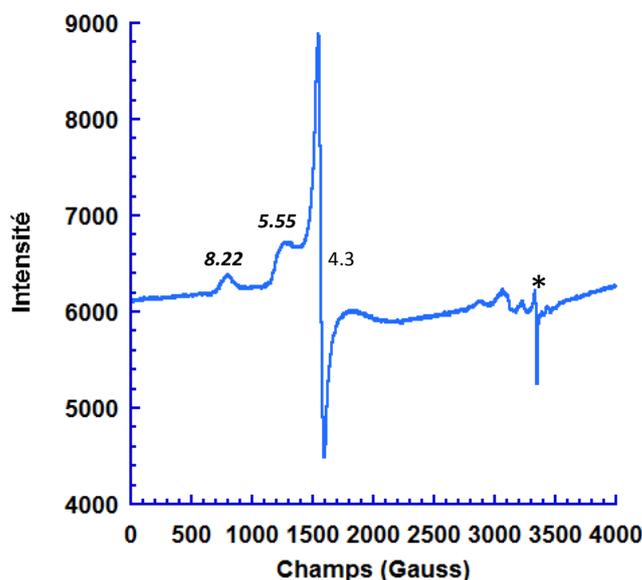


Figure 7: Spectre RPE en bande X de la solution verte obtenue après addition de 3 équivalents de NEt_3 sur $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ dans le méthanol, spectre enregistré à 10 K. Le signal repéré par un astérisque correspond à la cavité.

Par analogie avec la littérature, il est possible d'attribuer ces signaux. Les signaux à $g = 8,22$ et $g = 5,55$ sont caractéristiques du Fe(III)-peroxo ($S = 5/2$) où le ligand peroxo se trouve en mode de coordination η^2 .⁷ Le signal à $g = 4,3$ est généralement attribué à une espèce Fe(III) rhombique haut spin, qui provient de la décomposition du $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$.

A plus haut champ, autour de $g = 2$, des résonances de faible intensité correspondent à l'intermédiaire bas spin $Fe^{III}-OOH$ précurseur de l'intermédiaire $Fe^{III}(\eta^2-O_2)$.

1.2.3. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI-MS) a aussi permis l'observation de cet intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ (Tableau 2 et Figure 8).

Tableau 2: Masses de l'espèces $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ détectée par ESI MS (mode positif) à température ambiante.

	m/z expérimental	m/z théorique	err (ppm)
$[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$	540.1913	540.1931	3.3

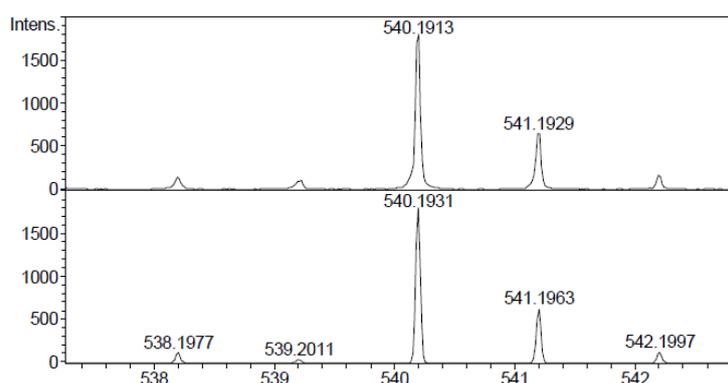


Figure 8: Spectre de masse (ESI, mode positif) de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ dans le méthanol ; spectre expérimental en haut et spectre simulé en bas.

1.3. Formation et stabilité du complexe de $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$

L'intermédiaire Fe^{IV} -oxo a été formé à partir d'une solution de $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ dissout dans l'acétonitrile distillé et ajout de 1,2 équivalents de PhIO dissout dans le méthanol. La réaction a été menée à température ambiante. L'évolution de l'absorbance du mélange réactionnel en fonction du temps est présentée Figure 9 et Figure 10.

Après ajout de PhIO comme donneur d'atome d'oxygène, la couleur de la solution passe du jaune au rose pâle. Une bande peu intense apparaît alors à 750 nm (Figure 9). Le coefficient d'extinction molaire pour $[(TPEN)Fe^{IV}O]^{2+}$ a été déterminé, et est de l'ordre de $400 M^{-1}.cm^{-1}$.⁸ En considérant que le coefficient d'extinction molaire de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}O]^{2+}$ est du même ordre de grandeur que celui de $[(TPEN)Fe^{IV}O]^{2+}$, il est possible de déterminer la quantité formée pour cette espèce. La conversion de $Fe(II)$ en $Fe(IV)$ après ajout de PhIO est alors d'environ 60 %.

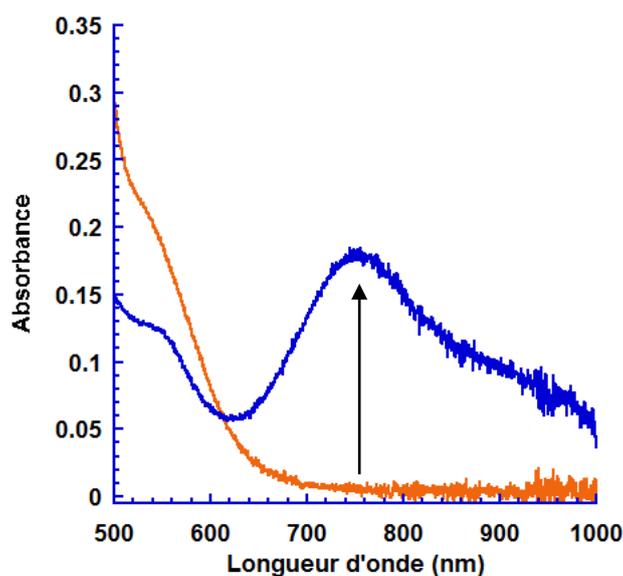


Figure 9: Suivi de la formation par absorption UV-visible de l'intermédiaire réactionnel $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]$ après ajout de 1,2 éq. de PhIO à une solution de $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ dans l'acétonitrile, à température ambiante ($[Fe]= 1 mM$).

Marlène Martinho et Aurore Thibon ont montré que les espèces $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ et $[(\text{L}_6^{24\text{E}})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ se dégradent suivant un mécanisme bimoléculaire qui conduit à la formation d'un complexe de Fer(II) qui absorbe à 556 nm.¹⁵⁻¹⁷

L'évolution de l'intermédiaire $[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$ au cours du temps est présenté Figure 10. Au cours de la disparition de la bande à 750 nm, une bande à 547 nm croît et reste stable dans le temps. Cette bande de forte intensité ($\epsilon \approx 6\,800\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$) est caractéristique d'un produit issu de la coupure oxydante du ligand (Figure 10, **(2)**).^{15,18} Le taux de conversion au bout de 15 jours, estimé en complexe dégradé est de 5 %.

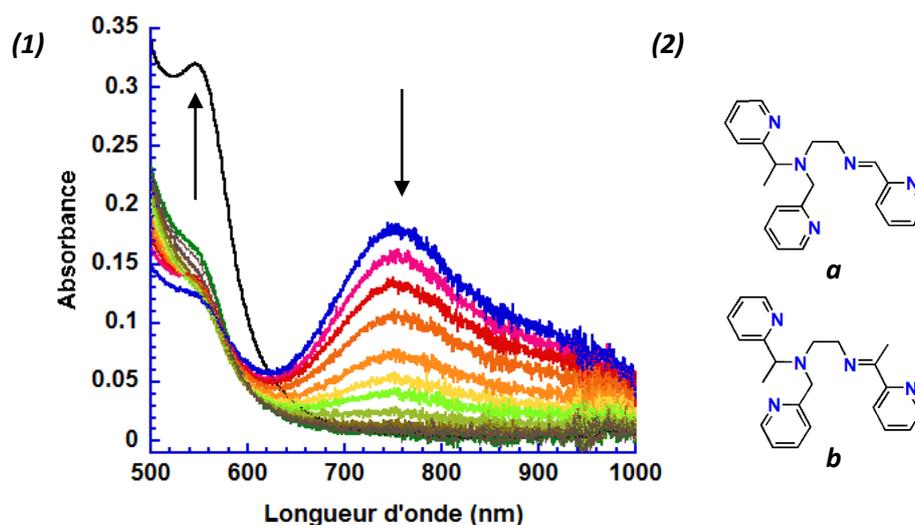


Figure 10: **(1)** Suivi par absorption UV-visible de la dégradation de $[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$ après ajout de 1,2 éq. de PhIO à une solution de $[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ dans l'acétonitrile, à température ambiante. En noir, spectre d'absorption après 15 jours. ($[\text{Fe}] = 1\text{mM}$). **(2)** Structure possible des ligands des complexes de Fer(II) formés par coupures oxydantes du ligand $_{2\text{Me}}\text{L}_6^2$.

Dans le cas du ligand TPEN, la formation de ce complexe analogue se produit très rapidement (2 h), et en quantité beaucoup plus importante (20 % de conversion).¹⁵

La spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI-MS) a également permis l'observation de l'intermédiaire $[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$ (Figure 11) et de mettre en évidence la présence de différentes espèces qui sont présentées dans le Tableau 3. Des pics correspondant aux complexes de Fer(II) avec les ligands dégradés indiqués Figure 10 sont bien observés aussi.

Tableau 3: Masses des espèces détectées en solution dans l'acétonitrile suite à la formation de $[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$, par ESI MS (mode positif).

	m/z expérimental	m/z théorique
$[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^{2+}$	262.0996	262.0988
$[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^+(\text{PF}_6)$	669.1608	669.1623
$[(_{2\text{Me}}\text{L}_6^2)\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$	254.1019	254.1013
$[(\text{L}_a)\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$	200.5647	200.5651
$[(\text{L}_b)\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$	207.5727	207.5729

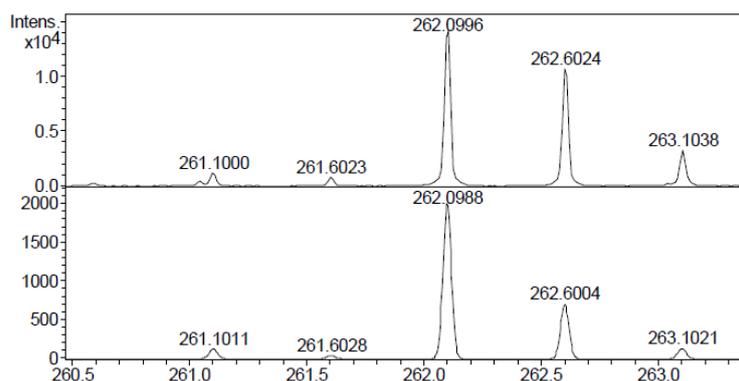


Figure 11 : Spectre de masse (ESI, mode positif) de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$ dans l'acétonitrile ; spectre expérimental en haut et spectre simulé en bas.

Bien que l'espèce Fe(IV)-oxo soit formée, il reste effectivement du complexe de départ. Ceci est cohérent avec le suivi UV-visible qui a permis d'estimer une conversion de Fe(II) en Fe(IV)-oxo de 60%.

La cinétique de dégradation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$ est présentée Figure 12. Elle suit une cinétique de dégradation du premier ordre. Le temps de demi-vie de l'intermédiaire est de 20 min. C'est un temps de demi-vie qui est faible comparé à d'autres intermédiaires dans des conditions analogues.¹⁷ Il est important de noter que malgré un temps de demi-vie de l'intermédiaire plus faible, la cinétique de dégradation est d'ordre un. Dans le cas du $[(TPEN)Fe^{IV}=O]^{2+}$ et $[(L_6^24E)Fe^{IV}=O]^{2+}$ les cinétiques de dégradation sont plus complexes puisqu'elles traduisent l'instabilité intrinsèque de l'intermédiaire (ordre 1) ainsi que sa dégradation par coupure oxydante (ordre 2). Cette différence est en faveur d'une robustesse plus importante du ligand $2MeL_6^2$ vis-à-vis des coupures oxydantes, mais une instabilité plus grande de l'intermédiaire.

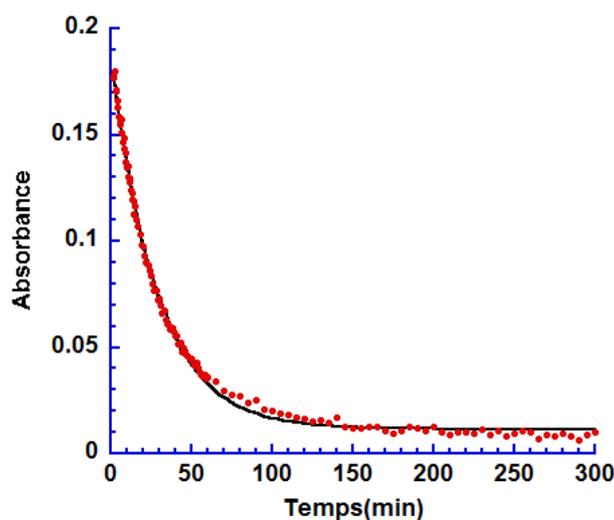


Figure 12: Evolution de l'absorbance à 751 nm, en fonction du temps, après ajout de 1,2 éq. de PhIO. Données expérimentales sont en rouge et le fit en noir. $A=A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$ avec $k = 0,035 \text{ min}^{-1}$ et $R = 0,99898$.

1.4. Conclusions

Le ligand protégé conduit à diminuer la réactivité du précurseur de fer(II) pour former l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$, et l'addition d'acide permet de générer cet intermédiaire avec une bonne conversion. Cette plus faible réactivité est probablement liée au caractère diamagnétique plus marqué de ce complexe, par rapport à l'analogue avec TPEN.

Le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ a montré une plus grande robustesse vis-à-vis de la coupure oxydante du ligand. Ce résultat est en accord avec la cinétique de dégradation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$ qui suit une loi d'ordre 1 par rapport au fer. Par ailleurs, son instabilité est un peu plus importante que celle des complexes analogues et pourrait traduire une réactivité plus grande pour l'oxydation de petites molécules.

2. Catalyse d'oxydation de substrats organiques par l'eau oxygénée : réactivité préliminaire

Les complexes synthétisés et caractérisés ont montré une réactivité vis-à-vis de l'eau oxygénée. L'intermédiaire Fe^{III} -hydroperoxo a été caractérisé précédemment. La présence des méthyles en position α des pyridines influe sur la réactivité car il est plus difficile de générer et d'accumuler l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}OOH]^{2+}$ que $[(TPEN)Fe^{III}OOH]^{2+}$.

Les complexes $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$, $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$, $[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ ont été utilisés comme catalyseurs de réactions d'oxydation. Les substrats organiques choisis sont ceux utilisés classiquement pour comprendre la réactivité des complexes : le cyclohexane, le cyclooctène et l'anisole.

2.1. Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales utilisées sont celles mises au point par Nathalie Ségaud.¹⁹ Nous nous plaçons dans des conditions catalytiques avec l'intermédiaire Fe^{III} -hydroperoxo.

Les conditions de réaction utilisées sont les suivantes :

- Solvant : Acétonitrile commercial
- Catalyseur : [complexe] = 1 mM dans 1 mL d'acétonitrile
- Oxydant chimique : 20 équivalents d'eau oxygénée vs Fe

- Substrat : 3 000 équivalents d'anisole, ou 800 équivalents de cyclohexane ou de cyclooctène vs Fe

- Ajout de l'eau oxygénée au pousse seringue pendant 1h30

- Durée de la réaction : 2h sous forte agitation

- Conditions aérobies

L'ordre d'ajout des réactifs est le suivant : complexe/acétonitrile/substrat/H₂O₂. Le mode opératoire et les conditions de détection et de quantification des produits par chromatographie en phase gazeuse sont donnés dans la partie expérimentale.

2.2. Résultats

Le cyclooctène peut être oxydé en époxycyclooctane et en cyclooctane-1,2-diol. Dans le cas de l'oxydation du cyclohexane, les produits d'oxydation sont le cyclohexanol et la cyclohexanone. Dans les conditions expérimentales ([substrat]/[H₂O₂] grand), les produits d'oxydation de l'anisole sont les produits d'hydroxylation du noyau aromatique et le phénol. Les différents produits attendus sont présentés Figure 13.

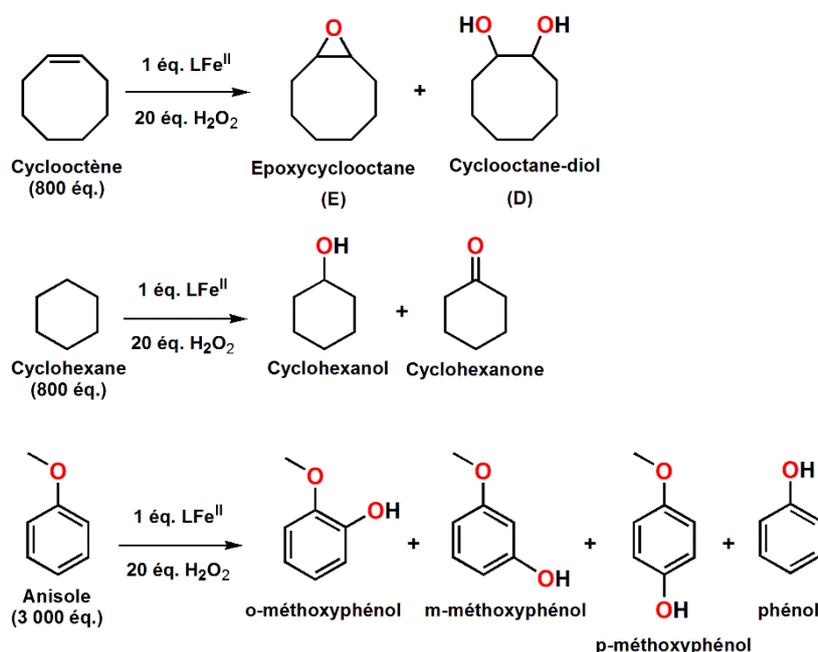


Figure 13: Produits d'oxydation du cyclooctène (époxycyclooctane et cyclooctanediol), du cyclohexane (cyclohexanol et cyclohexanone), et de l'anisole (ortho, méta, et para-méthoxyphénol), et susceptibles d'être obtenus.

Le TON est défini comme le nombre de moles de produit obtenues par mole de catalyseur, et les rendements sont donnés en pourcentage par rapport à la quantité d'eau oxygénée.

Il faut noter que les blancs réalisés dans les mêmes conditions et sans catalyseur ne montrent aucune trace de produit, quel que soit le substrat.

2.2.1. Catalyse d'oxydation du cyclooctène

Les résultats sont présentés Tableau 4. Les rendements en produits d'oxydation pour les complexes à ligands de type L_4^2 sont de l'ordre de 70 à 90 %. Ces complexes sont efficaces avec une sélectivité plus ou moins importante. Les rendements pour les complexes à ligands de type L_6^2 sont de l'ordre de 20 %, ce qui montre une efficacité moindre pour ce type de complexes. Cependant, ils présentent une bonne sélectivité pour la formation de l'époxyde.

Tableau 4 : Rendements (en pourcentage par rapport à H_2O_2) des produits d'oxydation du cyclooctène et valeur des TON, $[E]/[D]$ correspond au rapport époxycyclooctane sur cyclooctanediol, et %E + %D correspond au rendement total de la réaction.

Catalyseur	Epoxycyclooctane		Cyclooctanediol		[E]/[D]	%E + %D
	Rendement	TON	Rendement	TON		
$[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	90 %	18	1 %	0.20	90	91 %
$[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	69 %	14	8 %	1.5	8.6	77 %
$[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$	17 %	2.8	1 %	0.11	17	18 %
$[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$	19 %	3.7	2 %	0.38	9.5	21 %

D'après les travaux de Que et al., la formation d'époxyde et de diol est due à un intermédiaire de type $Fe^V(O)(OH)$.^{20,21} La formation plus importante de diol avec le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ indique toutefois une différence de propriétés entre les deux intermédiaires. L'élucidation de ce mécanisme nécessiterait des études plus poussées, avec de l'oxydant et/ou de l'eau marqués à ^{18}O , et en faisant varier la nature de l'oléfine.

2.2.2. Résultats de la catalyse d'oxydation du cyclohexane

Les résultats obtenus pour l'oxydation du cyclohexane par H_2O_2 sont présentés Tableau 5. Des rendements moyens à excellents ont obtenus avec les complexes à ligands de type L_4^2 . Avec les complexes à ligands de type L_6^2 , les rendements sont un peu plus faibles.

Tableau 5: Rendements (en pourcentage par rapport à H₂O₂) des produits d'oxydation du cyclohexane et valeur des TON, [-ol]/[-one] correspond au rapport cyclohexanol sur cyclohexanone, et %-ol + %-one correspond au rendement total de la réaction

Catalyseur	Cyclohexanol		Cyclohexanone		[-ol]/[-one]	% -ol + % -one ^b
	Rendement	TON	Rendement	TON ^a		
[(_m L ₄ ²)Fe ^{II} (OTf) ₂]	70 %	14	24 %	2.41	2.9	94 %
[(_{2Me} L ₄ ²)Fe ^{II} (OTf) ₂]	40 %	8	6%	0.59	6.7	46 %
[(TPEN)Fe ^{II}](PF ₆) ₂	12 %	2	17 %	1.7	0.70	29 %
[(_{2Me} L ₆ ²)Fe ^{II}](PF ₆) ₂	13 %	3	10 %	1.02	1.3	23 %

^a Le TON est calculé en considérant que deux moles d'oxydant sont nécessaires pour oxyder une mole de substrat.

^b Le rendement global %-ol + %-one est calculé en supposant que deux fois plus d'oxydant est nécessaire à la formation d'une molécule de cétone.²²

Un point important est la comparaison des rapports [-ol]/[-one] qui pour les complexes à ligands L₄² sont supérieurs à 1, alors qu'ils sont de l'ordre de 1 avec les complexes à ligands L₆². Ceci indique que l'oxydation d'un alcane est réalisée suivant des mécanismes différents selon le catalyseur.

Le rapport [-ol]/[-one] >> 1 pour les complexes à ligand L₄² indique qu'il n'y a pas de processus radicalaire mis en jeu. De plus, avec ce type de complexe, l'intermédiaire Fe^{III}-OOH est très réactif, et évolue rapidement en un intermédiaire Fe^V(O)(OH) (Figure 14).²¹

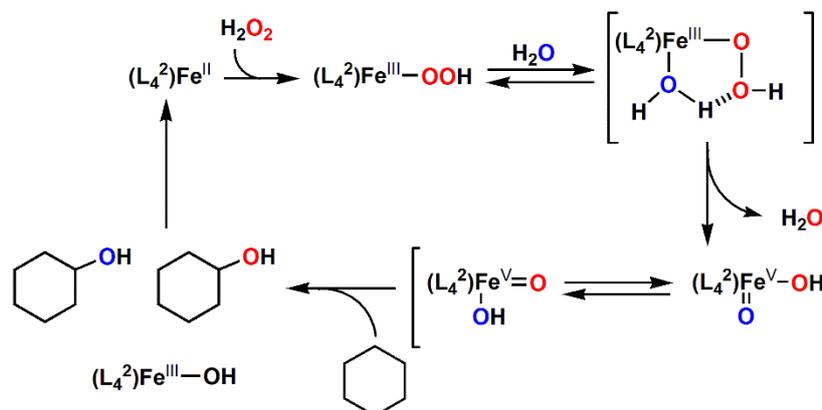


Figure 14: Mécanisme d'oxydation du cyclohexane par les complexes à ligand de type L₄².²¹

Cet intermédiaire serait responsable de l'insertion d'un atome d'oxygène dans une liaison C-H du substrat, selon un processus de type « rebound mechanism ». La sélectivité [-ol]/[-one] est différente pour les deux catalyseurs suggérant à nouveau que les intermédiaires Fe^V(O) ont des propriétés qui dépendent du ligand.

Dans le cas des complexes à ligands de type L_6^2 , le rapport [-ol]/[-one] est proche de 1. La sélectivité très faible a déjà été observée pour des complexes parents.²³⁻²⁵ Ce faible rapport indique qu'il y a des processus radicalaire mis en jeu. L'intermédiaire $Fe^{III}OOH$ évolue vraisemblablement par coupure homolytique pour donner $Fe^{IV}(O) + HO^\bullet$. Le radical hydroxyle est plus réactif que l'intermédiaire $Fe^{IV}=O$, ce qui implique la formation du radical libre cyclohexyle qui va donner un mélange 1/1 d'alcool et cétone selon un processus d'auto-oxydation.²⁶ Ce mécanisme est présenté Figure 15.

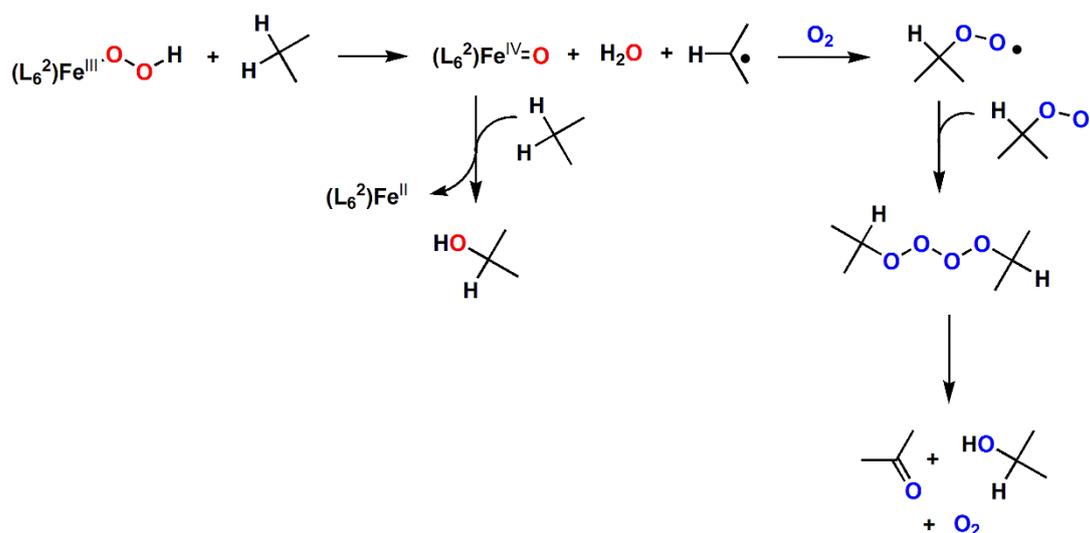


Figure 15: Mécanisme d'auto oxydation proposé pour l'oxydation d'alcane initié par les intermédiaires de type $[(L_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$.

La présence de dioxygène conduit à la propagation des radicaux. En effectuant la catalyse sous atmosphère inerte, ce phénomène ne devrait pas être observé, et les rendements devraient diminuer contrairement aux catalyses avec les complexes L_4^2 qui ne dépendent vraisemblablement pas du dioxygène.

2.2.3. Résultats de la catalyse d'oxydation de l'anisole

Les résultats sont présentés Tableau 6. L'hydroxylation de l'anisole mène globalement à un produit majoritaire : l'ortho-méthoxyphénol. Cependant, du para-méthoxyphénol est également détecté.

Tableau 6 : Rendements (en pourcentage par rapport à H_2O_2) des produits d'oxydation à l'anisole et valeur des TON, $[o-PhOH]/[p-PhOH]$ correspond au rapport o-méthoxyphénol sur p-méthoxyphénol, et %o-PhOH + %p-PhOH correspond au rendement total de la réaction.

Catalyseur	o-méthoxyphénol		p-méthoxyphénol		[o-PhOH] / [p-PhOH]	%o-PhOH + %p-PhOH
	Rendement	TON	Rendement	TON		
$[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	19 %	3.9	7 %	1.4	2.7	26 %
$[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$	33 %	6.5	10 %	2.0	3.3	43 %
$[(TPEN)Fe^{II}](PF_6)_2$	7.8 %	1.6	1.1 %	0.22	7.1	9 %
$[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$	25 %	5.0	4 %	0.81	6.25	29 %

Afin de déterminer le type de mécanisme mis en jeu lors de l'hydroxylation d'aromatique (concerté ou non), il est d'usage de comparer les constantes de vitesse des réactions entre des substrats aromatiques (k_H) et leurs homologues deutérés (k_D). Le KIE (Kinetic isotope effects) est défini comme étant le rapport k_H/k_D .

Lorsque dans le mécanisme il y a une rupture de la liaison C-H (abstraction ou insertion directe d'un atome d'hydrogène) alors $KIE > 1$. En revanche, lorsqu'il s'agit d'une substitution électrophile du cycle aromatique, classiquement un rapport KIE inverse de faible valeur ($KIE < 1$) est obtenu.²⁷

Dans le cas des complexes à ligands de type L_4^2 , Rybak-Akimova et al. ont montré que l'espèce active l'intermédiaire $Fe^V(O)$ qui se forme par rupture hétérolytique de la liaison O-O du $Fe^{III}-OOH$.²⁸⁻³⁰ Ils ont mis en évidence un KIE de 0.8 pour l'hydroxylation du benzène, donc un mécanisme de type substitution électrophile du cycle aromatique. Dans le cas de l'attaque électrophile du noyau aromatique du benzène ou de l'anisole, il y a un changement de l'état d'hybridation $sp^2 \rightarrow sp^3$ du carbone site de l'attaque, qui conduit à ce rapport inverse.³⁰

Nous n'avons pas refait de suivi isotopique avec nos complexes et l'anisole. Cependant nous pouvons supposer avoir le même type de mécanisme. En effet le rapport [o-PhOH] / [p-PhOH] est de 3 ce qui met en évidence la sélectivité de la réaction, ce qui ne pourrait pas être observé avec une réaction faisant intervenir des radicaux libres HO^\bullet . Nous pouvons donc proposer le mécanisme suivant Figure 16.

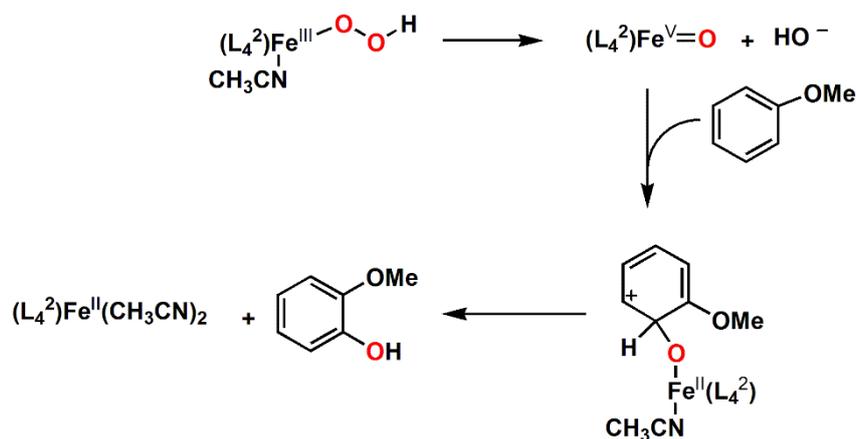


Figure 16: Mécanisme proposé pour l'hydroxylation du noyau aromatique par les complexes à ligands de type L_4^2 .

Avec des complexes à ligands de type L_5^2 , il a été démontré par A. Thibon grâce à des études cinétiques isotopiques ($KIE > 1$) que l'intermédiaire réactionnel $Fe^{III}-OOH$ évoluait en une paire oxydante [$Fe^IV(O) + HO^\bullet$] qui est responsable de l'oxydation du substrat.²⁹ Nous pouvons supposer qu'avec les complexes de type L_6^2 nous avons le même type de mécanisme. Là encore, l'implication du

métal dans ce mécanisme est évidente car une telle sélectivité (6-7) ne pourrait être observée avec les radicaux HO• libres.

Les rendements obtenus lorsque H₂O₂ est introduit au pousse-seringue sont plus faibles que ceux obtenus par Aurore Thibon avec le complexe [(TPEN)Fe^{II}](PF₆)₂ où H₂O₂ est introduit d'un coup.^{10,31}

Les résultats préliminaires de catalyse d'oxydation de différents substrats ont permis de confirmer les différents mécanismes mis en jeu selon le type de ligand du catalyseur par rapport à des systèmes analogues connus. Dans le cas de l'oxydation du cyclooctène et du cyclohexane, les complexes à ligand de type L₄² présentent des rendements et une sélectivité importants. Au contraire, dans le cas de l'hydroxylation du noyau aromatique de l'anisole, les complexes à ligand de type L₆² sont moyennement efficaces dans les conditions testées, mais présentent une grande sélectivité.

Les nouveaux complexes à ligands protégés ont présenté des meilleurs résultats dans le cas de l'oxydation du cyclohexane avec des sélectivités plus importantes, et dans le cas de l'hydroxylation du noyau aromatique de l'anisole, les rendements sont plus élevés pour ces complexes protégés.

2.3. Une nouvelle réactivité, pour l'intermédiaire [(₂MeL₆²)Fe^{III}-(η²-O₂)]⁺

La réaction de Baeyer-Villiger est une réaction centenaire qui permet l'oxydation d'une cétone en ester ou lactone à partir d'un peracide utilisé comme oxydant en quantités stœchiométriques.³² Cette réaction est d'un intérêt majeur en chimie organique avec des applications dans la synthèse d'antibiotiques et de stéroïdes, la synthèse de phéromones dans l'agrochimie ou encore la synthèse de monomères pour les polymères tel que le nylon.³³

Le mécanisme de la réaction a été étudié par Criegee et consiste en une attaque nucléophile du peracide sur le carbonyle avec la protonation concomitante de l'oxygène du carbonyle, suivie d'une étape de migration conduisant à la formation d'un carboxylate. La dernière étape, limitante, correspond au départ du groupe partant (Figure 17).³⁴

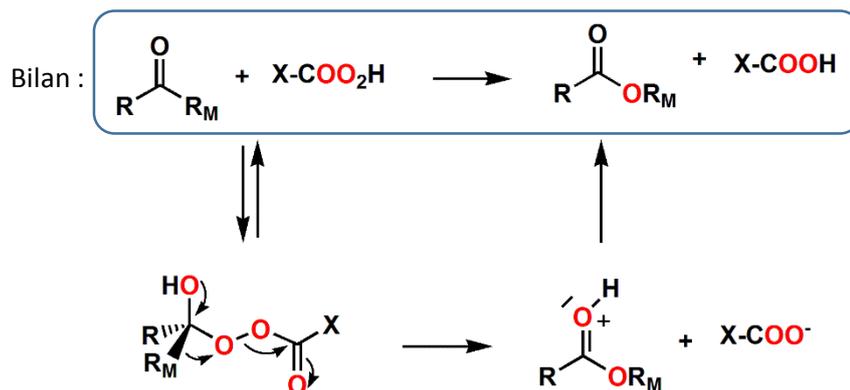


Figure 17: Mécanisme de l'oxydation de Baeyer-Villiger d'une cétone par un peracide.

Cependant, l'utilisation d'un équivalent de peracide organique comme oxydant conduit invariablement à la formation d'un équivalent d'acide carboxylique par unité de produit désiré. C'est pour cela que différentes équipes ont développé des catalyseurs métalliques.³⁵⁻⁴¹ Dans le travail effectué par Strukul et al., du peroxyde d'hydrogène est utilisé comme oxydant et un complexe cationique de platine(II) comme catalyseur.⁴⁰ Le complexe de Pt(II) sert d'acide de Lewis et n'intervient pas dans l'activation de H₂O₂.

L'intermédiaire $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{III}}(\eta^2\text{-O}_2)]^+$ possède a priori un caractère nucléophile et a été testé dans le cadre de l'oxydation de Baeyer-Villiger (Figure 18). La cinétique de dégradation de cet intermédiaire est très lente à -50°C. Ainsi, de la cyclohexanone a été ajoutée sur cet intermédiaire dans le but d'oxyder la cétone en lactone.

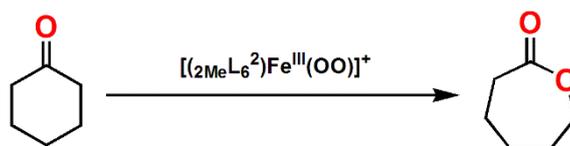


Figure 18: Schéma bilan de la réaction de Baeyer-Villiger envisagée avec l'intermédiaire $[(2\text{MeL}_6^2)\text{Fe}^{\text{III}}(\eta^2\text{-O}_2)]^+$.

2.3.1. Etude de la réaction de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ avec la cyclohexanone

Expérimentalement, cette nouvelle réactivité a été étudiée par spectroscopie UV-visible. Dans un premier temps, l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ est formé par addition d'eau oxygénée et de triéthylamine. Lorsque le maximum d'absorbance est atteint à 731 nm, 100 équivalents de cyclohexanone sont ajoutés.

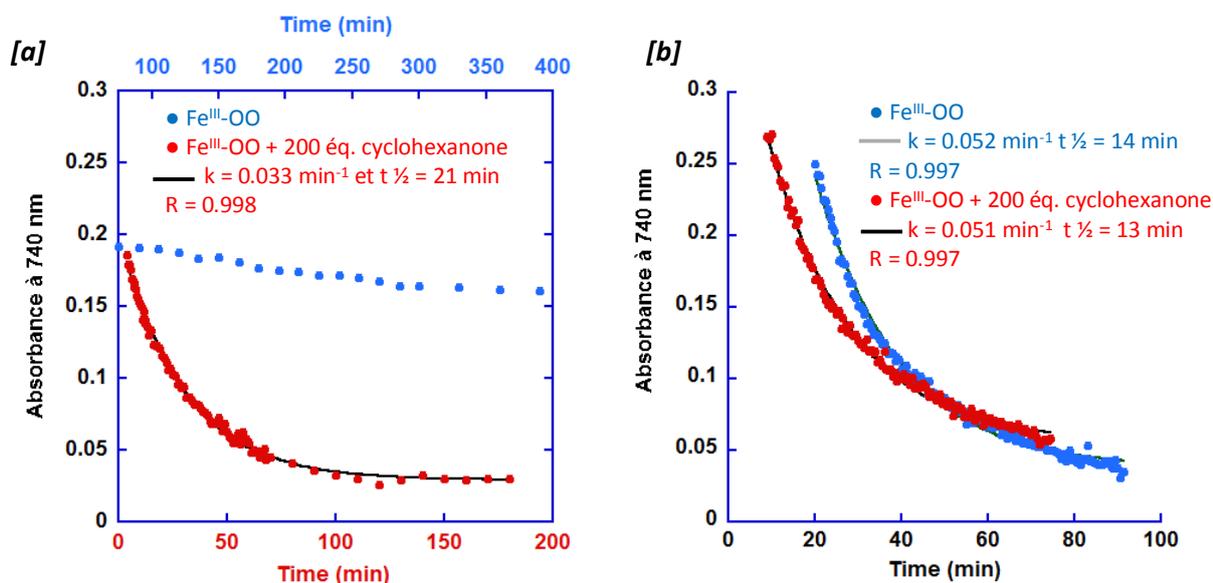


Figure 19: Cinétiques de dégradation de l'intermédiaire Fe(III)-peroxo dans le méthanol à -50°C [a] et à 0°C [b] sans (points bleus) et avec addition de 200 éq. de cyclohexanone (points rouge), $[Fe] = 1.0 \text{ mM}$.

La dégradation de l'intermédiaire a été étudiée en absence et en présence de cyclohexanone à -50°C et à 0°C. Les quatre cinétiques enregistrées sont présentées Figure 19 [a] et [b].

A -50°C, l'intermédiaire Fe^{III}-peroxo est relativement stable et lorsque 100 équivalents de cyclohexanone sont ajoutés, sa cinétique de dégradation est considérablement accélérée, ce qui montre que l'intermédiaire réagit avec le substrat. Cette cinétique de dégradation suit un ordre pseudo ordre 1 par rapport au fer, avec un temps de demi-vie de 21 min.

A 0°C, les cinétiques de dégradation de l'intermédiaire avec et sans cyclohexanone sont similaires et suivent une loi de dégradation de pseudo ordre 1 par rapport au fer, avec des temps de demi-vie de l'intermédiaire de 14 minutes. L'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ est beaucoup plus instable, et un effet catalase important est observé (qui se traduit par la formation de bulles). L'intermédiaire Fe^{III}(η^2-O_2) se dégrade avant même de pouvoir réagir avec la cyclohexanone à cette température.

Afin de savoir si l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ est un intermédiaire spécifique de ce type de réaction, la même étude a été menée avec l'intermédiaire Fe^{III}-OOH. Les cinétiques de dégradation de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ ont été enregistrées à 0°C, en absence et en présence de cyclohexanone (Figure 20).

A -50 °C, l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ est très stable. Jusqu'à 400 éq. de cyclohexanone ont été ajoutés au mélange réactionnel, mais la bande d'absorption caractéristique de l'intermédiaire n'a pas diminué. Cet intermédiaire ne réagit pas avec la cyclohexanone à -50°C.

A 0°C, une différence est observée pour la cinétique de dégradation de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ en présence de cyclohexanone. Elle suit une loi de vitesse de pseudo ordre 1 par rapport au fer, avec un temps de demi-vie de 23 min.

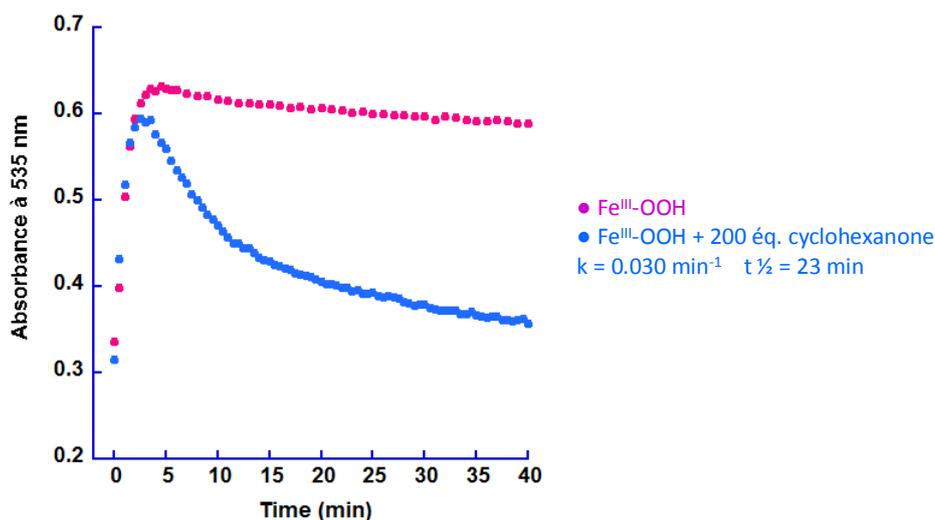


Figure 20: Cinétiques de dégradation de l'intermédiaire $[(2\text{MeL}_6)^2\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})]^{2+}$ dans le méthanol à 0°C sans (points rose) et avec addition de 200 éq. de cyclohexanone (points bleus), $[\text{Fe}] = 1.0 \text{ mM}$.

Pour que cette réaction ait lieu, il faut vraisemblablement une activation thermique de la liaison O-O de l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$; au contraire l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\eta^2\text{-O}_2\text{)}$ est stable à -50 °C mais réagit avec la cyclohexanone dès son ajout.

2.3.2. Détection des produits d'oxydation de la cyclohexanone

Les bruts réactionnels des expériences de suivi par spectroscopie UV-visible présentées précédemment ont été analysés par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS). Plusieurs pics ont été détectés et attribués à de la cyclohexanone, de la caprolactone et une forme ouverte oxydée de la lactone. Cette forme ouverte correspond à un produit de transestérification de la caprolactone avec le méthanol qui est utilisé comme solvant (Figure 21).

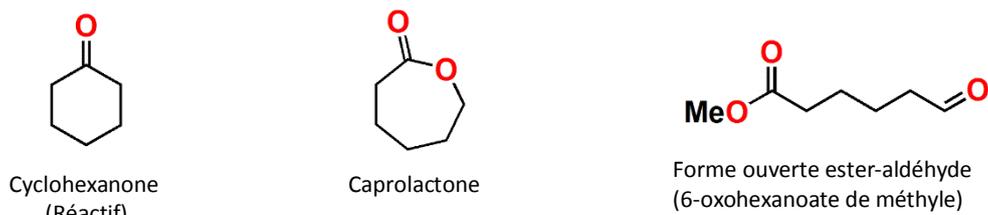


Figure 21: Molécules détectées et identifiées par GC/MS.

La caprolactone est difficile à détecter et à quantifier en GC/MS, c'est pour cela que nous avons travaillé en HPLC à phase inverse pour essayer de quantifier les différents produits de la réaction qui sont polaires. Ces études n'ont pas abouti pour le moment. En effet, faute de temps, les tests catalytiques ont été effectués à température ambiante dans les conditions suivantes :

- Solvant : Méthanol
- Température ambiante
- Conditions aérobies
- [Fer] = 1 mM
- Acide perchlorique : 1.2 éq. vs fer
- Eau oxygénée : 20 éq. vs fer
- Cyclohexanone : 800 éq. vs fer pour être en large excès et diminuer la quantité de produits de suroxydation

Dans ces conditions, c'est l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ qui est formé et non $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\eta^2\text{-O}_2\text{)}$.

Les solutions ont directement été analysées par HPLC (éluant : eau/acétonitrile). Les chromatogrammes présentent de nombreux pics, qui pour la plupart n'ont pu être identifiés même par HPLC/MS. D'autre part, la cyclohexanone est considérablement consommée, alors qu'il y avait 800 équivalents initialement et uniquement de 20 éq. de H_2O_2 . Le rendement supérieur à 100 % par rapport à H_2O_2 indique une réaction radicalaire incontrôlée.

Ce phénomène est également observé sous atmosphère inerte. Le $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ évolue pour donner vraisemblablement des radicaux HO^\bullet et est probablement aussi responsable de la formation de O_2 par effet catalase, ce qui conduit aux réactions incontrôlées observées.

Il serait intéressant de faire des tests de catalyse avec l'intermédiaire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\eta^2\text{-O}_2\text{)}$, mais cela nécessite de travailler à $-50\text{ }^\circ\text{C}$ pour le générer. Cela serait beaucoup plus délicat, car l'intermédiaire met du temps à se former (4 heures). Cependant, les résultats seraient sans doute plus faciles à analyser.

3. Conclusion

La réactivité du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ en présence de H_2O_2 ou PhIO a été étudiée. Nous avons pu suivre la formation et la dégradation des intermédiaires $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$, $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ et $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$. Le nouveau ligand diminue la réactivité du complexe vis-à-vis de H_2O_2 . L'addition d'acide permet de générer l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ avec une bonne conversion. Le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}=O]^{2+}$ a montré une plus grande robustesse vis-à-vis de la coupure oxydante du ligand.

Les premiers résultats en catalyse d'oxydation ont permis de mettre en avant les différents types de mécanismes mis en jeu pour les complexes à ligands de type L_4^2 et L_6^2 . Les nouveaux complexes ont présenté une réactivité similaire à celle des complexes parents. Les complexes à ligands L_4^2 présentent des rendements et une sélectivité importants pour la catalyse d'oxydation du cyclooctène et du cyclohexane. Les complexes à ligands L_6^2 sont moyennement efficaces pour l'oxydation de l'anisole, mais la régio- et la chimiosélectivité sont importantes. Les nouveaux complexes à ligands protégés présentent de meilleurs résultats dans le cas de l'oxydation du cyclohexane et de l'anisole, avec des sélectivités plus importantes.

La réactivité de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ vis-à-vis de la cyclohexanone a pu être mise en évidence par le suivi cinétique par spectroscopie UV-visible. Les tests en catalyse d'oxydation à température ambiante à partir de l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ n'ont pas été concluants. Il serait très intéressant de refaire ces tests à plus basse température afin d'étudier la capacité de l'intermédiaire $Fe^{III}(\eta^2-O_2)$ à catalyser la réaction de Bayer-Villiger.

Références

- (1) Costas, M.; Mehn, M. P.; Jensen, M. P.; Que, L. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 939.
- (2) Girerd, J. J.; Banse, F.; Simaan, A. J. *Structure and bonding*; Vol. 97.
- (3) Bruijninx, P. C. A.; van Koten, G.; Klein Gebbink, R. J. M. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2716.
- (4) Martinho, M.; Blain, G.; Banse, F. *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 1630.
- (5) Thibon, A.; England, J.; Martinho, M.; Young, V. G.; Frisch, J. R.; Guillot, R.; Girerd, J.-J.; Münck, E.; Que, L.; Banse, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 7064.
- (6) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.
- (7) Simaan, A. J.; Döpner, S.; Banse, F.; Bourcier, S.; Bouchoux, G.; Boussac, A.; Hildebrandt, P.; Girerd, J.-J. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, *2000*, 1627.
- (8) Segaud, N.; Anxolabehere-Mallart, E.; Senechal-David, K.; Acosta-Rueda, L.; Robert, M.; Banse, F. *Chemical Science* **2015**, *6*, 639.
- (9) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 3182.
- (10) Thibon, A., Université Paris Sud, 2006.
- (11) Simaan, A. J., Université Paris Sud, 2000.
- (12) Mialane, P.; Nivorokine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1085.
- (13) B. Jensen, K.; J. McKenzie, C.; Preuss Nielsen, L.; Zacho Pedersen, J.; Molina Svendsen, H. *Chemical Communications* **1999**, 1313.
- (14) Hazell, A.; McKenzie, C. J.; Nielsen, L. P.; Schindler, S.; Weitzer, M. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2002**, 310.
- (15) Martinho, M.; Banse, F.; Bartoli, J.-F.; Mattioli, T. A.; Battioni, P.; Horner, O.; Bourcier, S.; Girerd, J.-J. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 9592.
- (16) Thibon, A.; Bartoli, J.-F.; Guillot, R.; Sainton, J.; Martinho, M.; Mansuy, D.; Banse, F. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2008**, *287*, 115.
- (17) Thibon, A.; Bartoli, J.-F.; Bourcier, S.; Banse, F. *Dalton Transactions* **2009**, 9587.
- (18) Patra, A. K.; Olmstead, M. M.; Mascharak, P. K. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41*, 5403.
- (19) Ségaud, N., Université Paris Sud, 2013.
- (20) Feng, Y.; Ke, C.-y.; Xue, G.; Que, L. *Chemical Communications* **2008**, 52.
- (21) Oloo, W. N.; Fielding, A. J.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 6438.
- (22) Kaizer, J.; Klinker, E. J.; Oh, N. Y.; Rohde, J.-U.; Song, W. J.; Stubna, A.; Kim, J.; Münck, E.; Nam, W.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 472.
- (23) Talsi, E. P.; Bryliakov, K. P. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 1418.
- (24) Ribal, C., Université Paris Sud, 2008.
- (25) Roelfes, G.; Lubben, M.; Hage, R.; Que, J. L.; Feringa, B. L. *Chemistry – A European Journal* **2000**, *6*, 2152.
- (26) MacFaul, P. A.; Ingold, K. U.; Wayner, D. D. M.; Que, L. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10594.
- (27) Mitchell, K. H.; Rogge, C. E.; Gierahn, T.; Fox, B. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 3784.
- (28) Faponle, A. S.; Quesne, M. G.; Sastri, C. V.; Banse, F.; de Visser, S. P. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 1221.
- (29) Kudrik, E. V.; Sorokin, A. B. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 7123.
- (30) Makhlynets, O. V.; Rybak-Akimova, E. V. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 13995.

- (31) Thibon, A.; Jollet, V.; Ribal, C.; Sénéchal-David, K.; Billon, L.; Sorokin, A. B.; Banse, F. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 2715.
- (32) Baeyer, A.; Villiger, V. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1899**, *32*, 3625.
- (33) Belaroui, L. S.; Sorokin, A. B.; Figueras, F.; Bengueddach, A.; Millet, J.-M. M. *Comptes Rendus Chimie* **2010**, *13*, 466.
- (34) Criegee, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1948**, *560*, 127.
- (35) Jacobson, S. E.; Tang, R.; Mares, F. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1978**, 888.
- (36) Jacobson, S. E.; Tang, R.; Mares, F. *Inorganic Chemistry* **1978**, *17*, 3055.
- (37) Vaska, L. *Science* **1963**, *140*, 809.
- (38) Furia, F. D.; Modena, G. *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1853.
- (39) Camestrini, S.; Di Furia, F. *Journal of Molecular Catalysis* **1993**, *79*, 13.
- (40) Del Todesco Frisone, M.; Giovanetti, R.; Pinna, F.; Strukul, G. In *Studies in Surface Science and Catalysis*; Simándi, L. I., Ed.; Elsevier: 1991; Vol. Volume 66, p 405.
- (41) Strukul, G. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 1198.

Chapitre 4 : Complexes greffés sur électrodes d'or

La catalyse d'oxydation de molécules organiques par activation du dioxygène en présence d'électrons et de protons est envisageable par greffage des complexes biomimétiques sur des électrodes d'or. L'électrode joue le rôle du cosubstrat présent dans les systèmes biologiques, en fournissant les électrons nécessaires à la fixation du dioxygène sur le centre métallique.

1. Choix du système électrochimique, et fonctionnalisation des complexes

Afin de greffer le complexe de type $[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$ sur des électrodes d'or et d'étudier la chimie du complexe immobilisé, il a fallu dans un premier temps fonctionnaliser le ligand avec une fonction thioctique qui sert de point d'accroche sur les surfaces d'or (Figure 1).

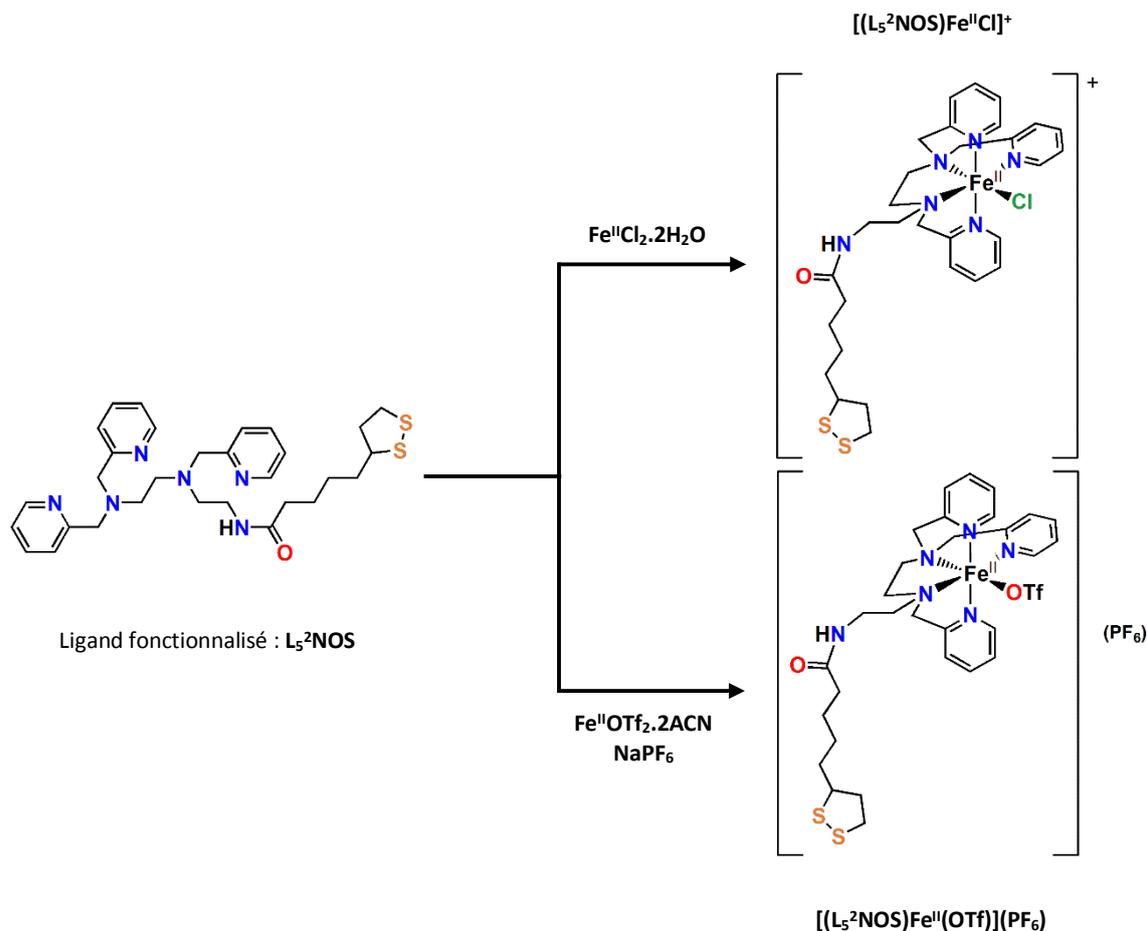


Figure 1: Nouveaux complexes fonctionnalisés avec un bras thioctique pour greffage sur électrodes d'or.

Une première partie de synthèse organique a été nécessaire pour la fonctionnalisation du ligand. Cette partie a été mise au point par le Dr. Sihem Groni du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de l'Université Paris Diderot. Le nouveau ligand L_5^2NOS est issu d'un couplage peptidique de

l'aminoéthyltrispicen (trispicen amine) avec l'acide dithioctique (la synthèse est effectuée sous activation par microondes, avec un rendement de 83 %). Les détails de la synthèse ainsi que la caractérisation du ligand sont présentés dans la partie expérimentale.

Les complexes ont été synthétisés selon deux voies de synthèse en fonction de l'espèce finale attendue : Fe-Cl ou Fe-OTf (Figure 1). Le choix du chlorure ou du triflate comme sixième ligand du fer doit permettre d'observer une différence de réactivité entre les complexes avec un ligand plus ou moins labile.

Pendant sa thèse, Nathalie Ségaud a isolé les deux complexes sous les formes suivantes : $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)](PF_6)_2$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl](PF_6)$. L'obtention des poudres a été très difficile à cause de la fonction thioctique présente sur le ligand. En effet, il a été observé la formation d'une huile très peu soluble qui semble être due à la polymérisation de la partie thioctique du ligand. D'autre part, la longue chaîne carbonée contribue à une très grande solubilité du complexe dans de nombreux solvants, rendant sa précipitation difficile. Ainsi, les différentes caractérisations en solution indiquaient la présence d'impuretés.

J'ai dû synthétiser à nouveau ces deux complexes, en privilégiant plutôt l'obtention de la forme $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ au lieu du $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)](PF_6)_2$ afin de diminuer le potentiel d'oxydation du Fer(II) pour le travail sur les surfaces auto-assemblées (SAMs). En effet, appliquer des potentiels trop élevés peut conduire à la désorption des SAMs.^{1,2}

Le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ a été isolé et caractérisé après un mois d'essais de précipitation dans différents solvants ou mélanges de solvants.

La préparation du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl](PF_6)$ a été quant à elle beaucoup plus difficile que prévu. D'une part, il a été difficile d'isoler une poudre. Celles isolées ont été analysées par électrochimie ; ce qui a permis de mettre en évidence la présence d'impuretés. Néanmoins, un suivi de la complexation par voltamétrie cyclique a montré que la solution contenant un mélange équimolaire de $Fe^{II}Cl_2$ et de ligand conduit à la formation du complexe souhaité. Ainsi, pour greffer le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl](PF_6)$ sur des électrodes d'or, il a été jugé préférable de travailler avec le complexe en solution. Les détails de la synthèse se trouvent dans la partie expérimentale.

Dans la suite de ce chapitre, les complexes dont les études sont présentées, sont ceux que j'ai synthétisés, $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ isolé sous forme de poudre puis redissous et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ formé *in situ*.

1.1. Caractérisation en solution

Pour déterminer la structure du complexe en solution et ses propriétés électroniques, les techniques de spectrométrie de masse par ionisation électrospray, de spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible et de voltamétrie cyclique ont été utilisées.

1.1.1. Spectrométrie de masse (ESI)

Le spectre de masse du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ présente peu de pics, ce qui montre que l'espèce isolée est de pureté satisfaisante (Figure 2). Les pics les plus intenses ont notamment été identifiés et attribués aux espèces suivantes : $[(L_5^2NOS)Fe^{II}]^{2+}$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$, $m/z = 310.1035$ uma et $m/z = 769.1573$ uma respectivement. Le pic petit à $m/z = 655.1748$ uma est attribué au complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ formé dans le spectromètre où il y a des traces d'ions chlorures.

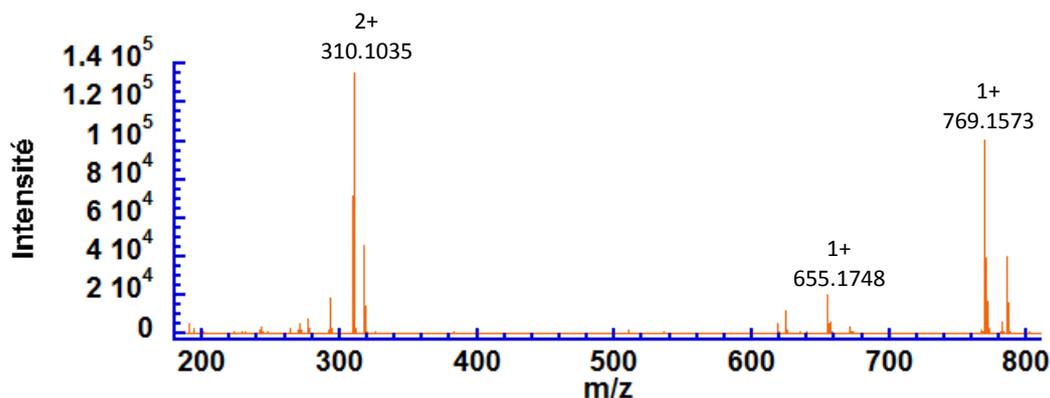


Figure 2: Spectre de masse (ESI, mode positif) de la poudre obtenue pour la synthèse du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ dans l'acétonitrile.

Le spectre de masse du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ non isolé présente de nombreux pics, indiquant la présence de nombreuses espèces (Figure 3). Ceci est vraisemblablement dû au fait que le complexe n'a pas été isolé. En effet, les pics à $m/z = 310.1035$, $m/z = 655.1765$, $m/z = 619.1984$ sont caractéristiques des complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}]^{2+}$, $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]-HCl$ respectivement, ce qui confirme que le complexe souhaité a été obtenu.

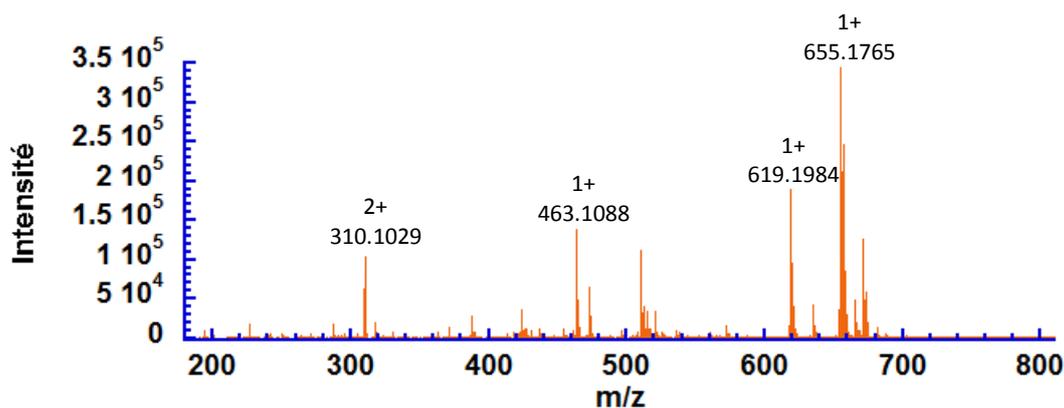


Figure 3: Spectre de masse (ESI, mode positif) de la solution contenant le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ dans l'acétonitrile.

1.1.2. Spectrophotométrie UV-visible

Les complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ et de $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ ont également été analysés par spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible dans l'acétonitrile (Figure 4 et Figure 5).

Les spectres présentent une bande intense dans l'UV (253 nm, $\epsilon \approx 10\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$) correspondant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des pyridines du ligand. La bande moins intense dans le visible à 380 nm correspond aux transferts de charge de type **MLCT**.

De par son intensité et sa position, cette bande renseigne sur l'état de spin du Fe^{II} et sur la nature de la première sphère de coordination.³ Ainsi, comme vu dans le chapitre précédent, un complexe Fe^{II}

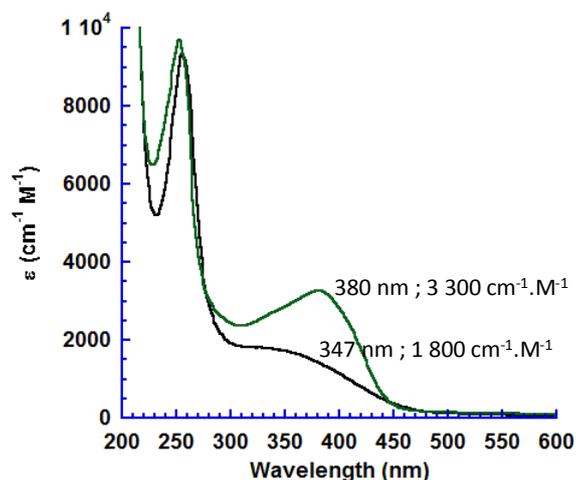


Figure 4: Spectres d'absorption électronique UV-visible des complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ dans l'acétonitrile (vert), dans le méthanol (noir).

haut spin ($S = 2$) a un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de $1\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ à $2\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$; alors qu'un complexe Fe^{II} bas spin ($S = 0$) avec les mêmes ligands amine/pyridine a un coefficient d'extinction molaire de $8\,000 - 10\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

Une variation de λ_{\max} et du coefficient d'extinction molaire implique un changement de structure du complexe ainsi que l'état de spin du métal.³

Le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ a été étudié dans l'acétonitrile et le méthanol (Figure 4).

La transition **MLCT** est à 380 nm ($3\,300\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) dans l'acétonitrile et à 347 nm ($1\,800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) dans le méthanol. Ce genre de comportement s'attribue à un changement de l'état de spin du fer(II) dans le complexe.³ Cela montre que dans le méthanol, le triflate est majoritairement lié au fer, ce qui donne une majorité de complexe haut spin en solution, et ainsi un faible coefficient d'extinction molaire de la transition **MLCT**. Dans l'acétonitrile, la transition **MLCT** est plus intense, ce qui suggère qu'une partie du fer(II) est dans un état bas spin. Cela indique qu'il existe un échange entre le triflate et le ligand acétonitrile qui est à champ fort. D'autre part, cette transition dans l'acétonitrile présente un épaulement vers 340 nm, ce qui correspond à la position de la transition **MLCT** lorsque le triflate est lié au fer(II), par comparaison avec le spectre de ce complexe dans le méthanol.

Dans l'acétonitrile, il y a donc un mélange de complexe de fer(II) haut spin et bas spin, donc un mélange de complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)]^{2+}$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ en solution.

Il est possible de déduire la proportion approchée en complexe de fer(II) haut spin et bas spin à partir des coefficients d'extinction molaire de référence pour une espèce fer(II) haut spin ($\epsilon_{HS} = 1\,800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) et une espèce de fer(II) bas spin ($\epsilon_{BS} = 8\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).^{3,4}

Dans ces conditions, le coefficient d'extinction molaire moyen ϵ peut s'écrire sous la forme :

$$C_{HS} \times \epsilon_{HS} + C_{BS} \times \epsilon_{BS} = \epsilon = 3\,300\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$$

En notant la fraction molaire en espèce haut spin x , et la fraction molaire en espèce bas spin $(1-x)$, l'équation suivante est obtenue :

$$x \times \epsilon_{HS} + (1 - x) \times \epsilon_{BS} = \epsilon = 3\,300\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$$

Ce qui permet de déduire la proportion en espèce fer(II) haut spin $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ de :

$$x = (\epsilon - \epsilon_{BS}) / (\epsilon_{HS} - \epsilon_{BS}) = 76\%$$

Ainsi, pour le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ en solution dans l'acétonitrile, il y a une grande majorité de complexe sous forme haut spin, avec le triflate lié au fer(II).

Il est à noter que ce calcul n'est pas totalement rigoureux dans la mesure où les ϵ dans les différents complexes ne sont pas connus. Il indique cependant une bonne approximation de la répartition entre ces deux espèces.

Le complexe non isolé $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ dans l'acétonitrile présente aussi une transition **MLCT** à 372 nm ($1\,600\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$) (Figure 5). Le fer(II) dans ce complexe est dans un état haut spin ($S = 2$), le chlorure reste lié au fer dans l'acétonitrile. Le produit majoritaire est le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$, ce qui est en accord avec le résultat de l'analyse par ESI-MS.

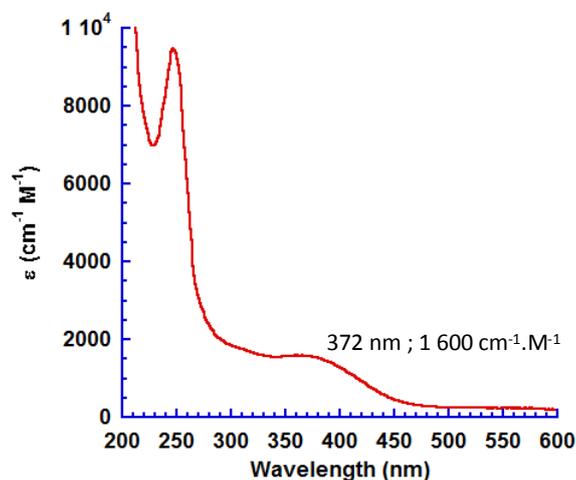


Figure 5: Spectres d'absorption électronique UV-visible du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ dissous dans l'acétonitrile.

Les complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ sont donc stables en solution. Avec simplement un échange de ligand exogène pour $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$.

1.1.3. Voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile

Les complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ ont également été analysés par voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile distillé avec du $TBAPF_6$ (0.1 M) comme électrolyte support (électrode de référence au calomel saturé (+ 0.24 V/ENH), électrode de travail en carbone vitreux, et contre électrode de platine).

Cette étude électrochimique doit permettre de déterminer sous quelle forme sont présents les complexes en solution afin de confirmer les résultats obtenus par spectroscopie UV-visible, qui indiquent que le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ est entièrement sous la forme Fe-Cl, alors que le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ est sous forme d'un mélange de $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)]^{2+}$, avec toutefois une majorité du premier complexe.

a) $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$

Le voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ dissous dans l'acétonitrile est présenté Figure 6. Il présente trois vagues dont deux qui sont réversibles. Par comparaison avec des systèmes analogues connus, les vagues peuvent être attribuées.⁴

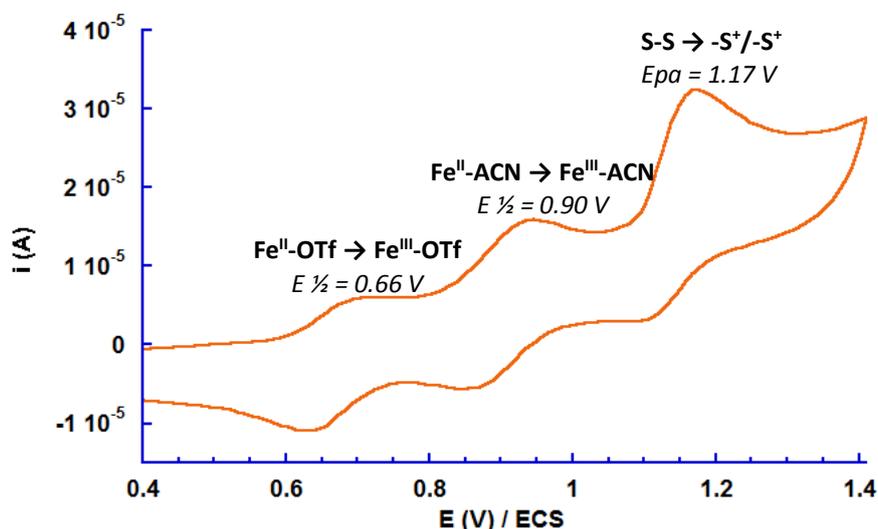


Figure 6: Voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ à 1.0 mM, dans l'acétonitrile, TBAPF₆ 0.1 M, 0.1 V/s.

La première vague réversible avec un potentiel de demi-vague de 0.66 V/ECS correspond au couple $[LFe^{III}(OTf)]^{2+}/[LFe^{II}(OTf)]^+$. La seconde vague également réversible avec un potentiel de demi-vague de 0.90 V/ECS correspond au couple $[LFe^{III}(ACN)]^{3+}/[LFe^{II}(ACN)]^{2+}$. L'intensité des pics anodiques de $Fe^{III}(OTf)/Fe^{II}(OTf)$ et $Fe^{III}(ACN)/Fe^{II}(ACN)$ permet d'estimer un rapport de 0.6 entre les deux complexes, ce qui est différent de ce qui a été observé par spectroscopie UV-visible dans la partie précédente. D'une part, la quantification effectuée par UV-vis se fait à partir de coefficients d'extinction molaires de complexes analogues, les valeurs exactes pour les complexes étudiés ne sont pas connues. D'autre part, pour l'étude par voltamétrie cyclique, le complexe est dissous dans une solution électrolytique, et la présence du sel de fond augmente la force ionique, favorisant la stabilisation des espèces fortement chargées, d'où une plus grande proportion de complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)]^{2+}$.

La troisième vague est quant à elle attribuée à l'oxydation de la partie thioctique du ligand.¹ L'intensité de cette vague est plus importante qu'un transfert à un électron. Une étude a montré que cette vague correspond à un processus multi-électronique.^{5,6}

b) $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$

Le voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ dans l'acétonitrile TBAPF₆ 0.1 M est présenté Figure 7. Il a été comparé avec le voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl](PF_6)$ isolé par Nathalie Ségaud. Le complexe isolé présente deux vagues, dont une réversible.

La vague à $E_{1/2} = 0.60$ V/ECS est attribuée au couple $[(L_5^2NOS)Fe^{III}Cl]^{2+}/[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$. Comme pour le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$, la vague non réversible à 1.12 V/ECS correspond à l'oxydation du groupement thioctique.

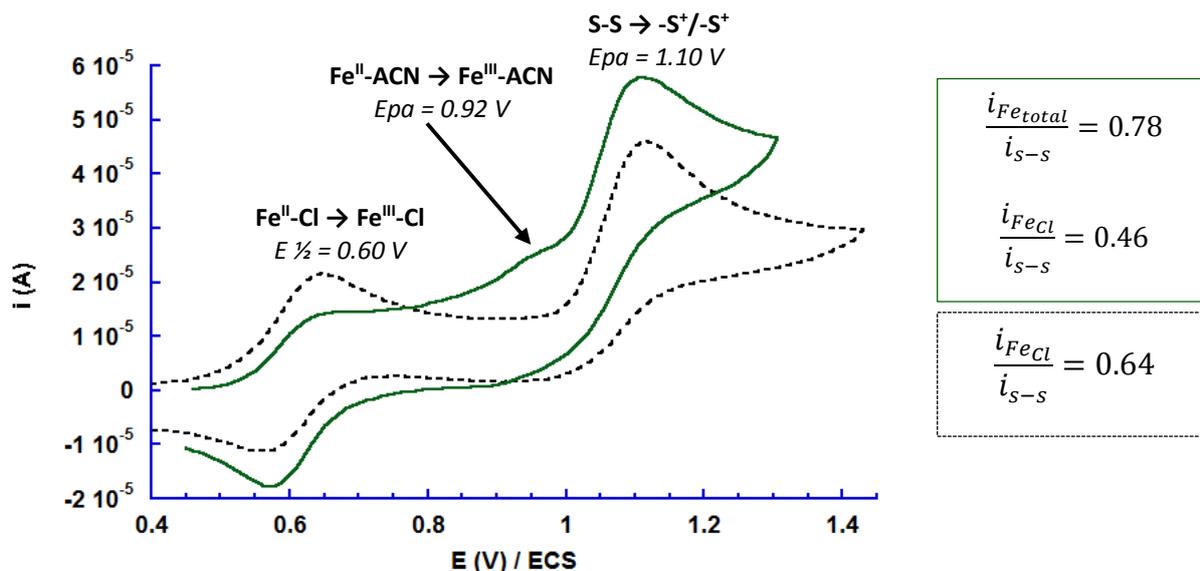


Figure 7: Voltamogrammes des complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl](PF_6)$ (isolé par Nathalie Ségaud) (pointillés noirs) et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ (vert), dans l'acétonitrile, TBAPF₆ 0.1 M, 0.1 V/s, $[Fe] = 1.0$ mM.

Le voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ non isolé, présente les deux vagues identifiées pour le complexe isolé de Nathalie Ségaud. De plus, les rapports d'intensité des vagues en oxydation des systèmes $[LFe^{II}Cl]^+$ et $[LFe^{II}(ACN)]^{2+}$ par rapport à l'oxydation du thioctique S-S sont du même ordre de grandeur dans les deux échantillons. Cependant, une vague non réversible est observée à 0.96 V/ECS. Il est possible de l'attribuer à l'oxydation de $[LFe^{II}(ACN)]^{2+}$ par comparaison avec le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$. Ce complexe non détecté par spectroscopie UV-visible peut s'expliquer par la préparation de la solution de complexe, où 1 éq. de triflate d'argent dissous dans l'acétonitrile est ajouté pour éliminer un équivalent d'ions chlorures (cf. partie expérimentale). Lorsque la stœchiométrie n'est pas parfaitement contrôlée, ($n_{AgOTf} / n_{FeCl_2} \geq 1$), la quantité de ligands exogènes Cl⁻ est en sous-stœchiométrie ($n_{Cl^-} / n_{Fe} \leq 1$) et donc une faible proportion de complexe se trouve sous la forme $Fe^{II}(ACN)$. Enfin, la voltamétrie cyclique permet de distinguer toutes les espèces électroactives alors que la spectroscopie UV-visible ne donne qu'une image globale du mélange d'espèces.

Le Tableau 1 rappelle les différents potentiels de pic des deux voltamogrammes représentés Figure 6 et Figure 7.

Tableau 1: Comparaison des potentiels anodiques et cathodiques en fonction du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(X)]^{n+}$ en solution dans l'acétonitrile TBAPF₆ 0.1 M, 0.1 V/s (X = OTf, ACN, Cl).

	Acétonitrile TBAPF ₆ 0.1 M		
$[(L_5^2NOS)Fe(OTf)]^{2+/+}$	$E_{pa} = 0.70$ V	$E_{pc} = 0.63$ V	$E_{1/2} = 0.66$ V
$[(L_5^2NOS)Fe(ACN)]^{3+/2+}$	$E_{pa} = 0.94$ V	$E_{pc} = 0.86$ V	$E_{1/2} = 0.90$ V
S-S \rightarrow -S ⁺ /-S ⁺	$E_{pa} = 1.17$ V		
$[(L_5^2NOS)FeCl]^{2+/+}$	$E_{pa} = 0.64$ V	$E_{pc} = 0.56$ V	$E_{1/2} = 0.60$ V
$[(L_5^2NOS)Fe(ACN)]^{3+/2+}$	$E_{pa} = 0.96$ V		
S-S \rightarrow -S ⁺ /-S ⁺	$E_{pa} = 1.10$ V		

Les deux complexes fonctionnalisés $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ ont été caractérisés. Les études en solution par spectrométrie de masse, spectroscopie UV-visible et voltamétrie cyclique ont montré que les complexes sont stables en solution, de pureté satisfaisante, et que le système Fe-X (X= OTf, Cl⁻) est en équilibre avec Fe-ACN.

1.2. Echange de ligand exogène en solution dans l'acétone à partir du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$

Afin de préparer l'étude des complexes immobilisés sur surface, leur comportement vis-à-vis de l'échange du ligand exogène en solution a été préalablement examiné. Cette étude a été menée dans l'acétone de sorte à minimiser les échanges de ligands observés dans l'acétonitrile. L'étude est menée uniquement sur le complexe isolé $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$, ce qui facilitera le travail sur les SAMs.

1.2.1. Etude préliminaire sur le complexe $[(L_5^2)Fe^{II}Cl](PF_6)$ dans l'acétone

Dans un premier temps, afin de savoir si l'acétone peut se coordonner au fer, nous avons travaillé sur le complexe modèle $[(L_5^2)Fe^{II}Cl](PF_6)$. Une solution de ce complexe à 1.0 mM dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M est préparée.

Initialement, une vague réversible est présente (courbe orange, Figure 8) avec un potentiel de demi-vague de 0.63 V. Cette valeur est caractéristique du système $[LFe^{III/II}Cl]^{2+/+}$.

L'ajout de triflate d'argent (0.5 éq.) conduit à la formation de AgCl_(s), à une diminution de l'intensité de la vague centrée à 0.63 V, et une nouvelle vague à 0.90 V apparaît (courbe en pointillés verts, Figure 8). Cette vague peut être attribuée à l'oxydation de l'espèce $[LFe^{II}(Acétone)]^{2+}$. Une vague

à 1.6 V non réversible est également présente. Son intensité est proche de celle de la vague $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{Acétone})]^{2+}$.

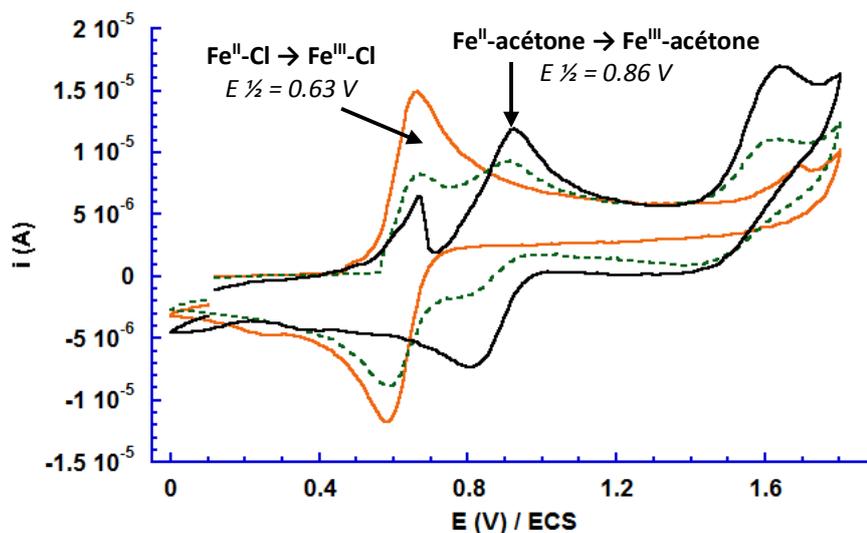


Figure 8: Voltammogrammes du complexe $[(mL_5^2)Fe^{\text{II}}Cl](PF_6)$ dans l'acétone (orange), après ajout de 0.5 éq. (pointillés verts) et 1.0 éq. (noir) de $AgOTf$ dissous dans l'acétone, $[Fe] = 1.0 \text{ mM}$.

L'ajout au total de 1.0 éq. de triflate d'argent conduit à la disparition de la vague à 0.63 V, à la formation d'un pic à ce même potentiel qui est caractéristique de $AgCl_{(s)}$ adsorbé sur l'électrode et également à l'apparition d'une vague réversible à $E_{1/2} = 0.86 \text{ V/ECS}$. La vague à 0.86 V est attribuée au système réversible $[(mL_5^2)Fe^{\text{III/II}}(\text{Acétone})]^{3+/2+}$. La vague à 1.6 V a doublé en intensité, ce qui signifie que l'espèce oxydée est directement liée à l'ajout de $AgOTf$ dans la solution. Elle correspond probablement à l'oxydation du complexe de Fe(III) généré à l'électrode en complexe de Fe(IV).

1.2.2. Etude de l'addition d'acétonitrile sur le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{\text{II}}(OTf)](PF_6)$

Initialement, une solution de complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{\text{II}}(OTf)](PF_6)$ à 1.0 mM dans l'acétone $TBAPF_6$ 0.1 M est préparée. Comme vu dans la 1.2.1. dans l'acétone, il est possible d'observer le système réversible $[(mL_5^2)Fe^{\text{III/II}}(\text{Acétone})]^{3+/2+}$. Le voltammogramme rouge Figure 9 présente deux vagues réversibles à 0.66 et 0.90 V/ECS et une vague non réversible à 1.17 V qui a été attribuée dans la partie 1 à l'oxydation du groupement thioctique. La vague à 0.66 V/ECS est attribuée à $[(L_5^2NOS)Fe^{\text{III/II}}(OTf)]^{2+/+}$ par comparaison avec l'étude de ce complexe dans l'acétonitrile. La vague à 0.90 V est quant à elle attribuée au système $[(L_5^2NOS)Fe^{\text{III/II}}(\text{Acétone})]^{3+/2+}$ par comparaison avec l'étude du 1.2.1. (Figure 8).

De l'acétonitrile a été ajouté dans un premier temps pour voir s'il est possible de déplacer le triflate lié au fer (Figure 9).

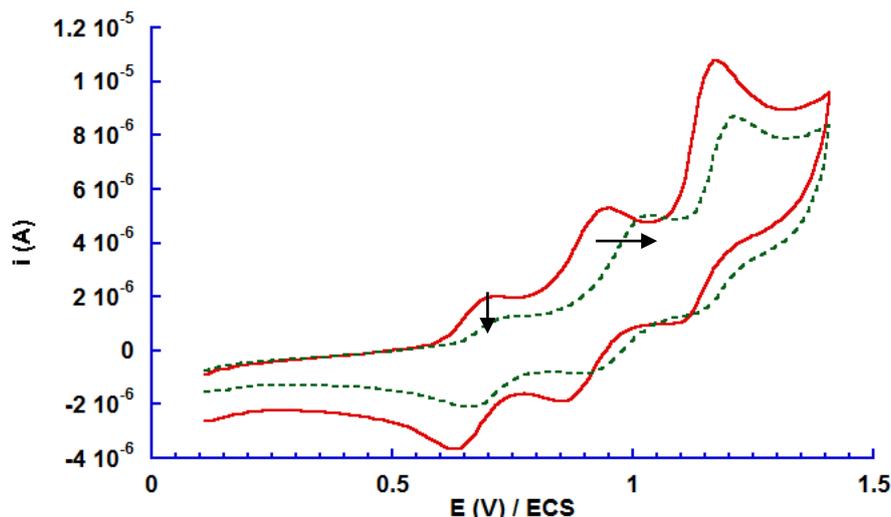


Figure 9: Voltamétrie cyclique du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ 1.0 mM dans 2 mL d'acétone TBAPF₆ 0.1 M (rouge), et après ajout de 1 mL d'acétonitrile (pointillés verts).

L'ajout d'acétonitrile provoque quelques modifications. Les voltammogrammes de la solution initiale et après ajout d'acétonitrile (1 mL dans 2 mL d'acétone) sont présentés Figure 9 pour les courbes rouge et verte respectivement.

Tableau 2: Comparaison des potentiels anodiques et cathodiques en fonction du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(X)]^{n+}$ en solution dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M (partie rouge du tableau), dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M + ACN (partie verte du tableau) 0.1 V/s ($X = OTf, ACN, \text{acétonitrile}$).

Acétone TBAPF ₆ 0.1 M (2 mL)			
$[(L_5^2NOS)Fe(OTf)]^{2+/+}$	$E_{pa} = 0.69$ V	$E_{pc} = 0.63$ V	$E_{1/2} = 0.66$ V
$[(L_5^2NOS)Fe(\text{Acétone})]^{3+/2+}$	$E_{pa} = 0.94$ V	$E_{pc} = 0.86$ V	$E_{1/2} = 0.90$ V
S-S \rightarrow -S ⁺ /-S ⁺	$E_{pa} = 1.17$ V		
Acétone TBAPF ₆ 0.1 M (2 mL) + Acétonitrile (1 mL)			
$[(L_5^2NOS)Fe(OTf)]^{2+/+}$	$E_{pa} = 0.73$ V	$E_{pc} = 0.67$ V	$E_{1/2} = 0.70$ V
$[(L_5^2NOS)Fe(ACN)]^{3+/2+}$	$E_{pa} = 1.03$ V	$E_{pc} = 0.92$ V	$E_{1/2} = 0.97$ V
S-S \rightarrow -S ⁺ /-S ⁺	$E_{pa} = 1.21$ V		

Des changements sont observés. L'intensité de l'intégralité du voltammogramme diminue correspondant à la dilution de la solution. De plus, un déplacement des vagues d'oxydation vers les hauts potentiels est observé. Pour les vagues du système LFe(OTf) et du thioctique, cette variation est de 40 mV, et peut être due au changement de la conductivité de la solution. Cependant, pour la vague attribuée au système $[LFe^{II}(\text{Acétone})]^{2+}$ le déplacement est de 90 mV suggérant qu'une autre espèce est sondée. En effet, l'acétone est un moins bon ligand que l'acétonitrile et dans les conditions de l'expérience où il y a un tiers d'acétonitrile, il est possible d'observer le changement de ligand exogène. L'augmentation des rapports de l'intensité relative de la vague anodique suite à l'ajout d'acétonitrile

appuie cette hypothèse : 2 mL acétone : $i_{\text{Fe-Acétone}} / i_{\text{Fe-OTf}} = 2.5$; 2 mL acétone + 1 mL acétonitrile : $i_{\text{Fe-ACN}} / i_{\text{Fe-OTf}} = 3.3$. L'acétonitrile est un meilleur ligand du fer que l'acétone, ce qui explique un rapport plus important suite à l'ajout d'acétonitrile. Pour terminer, la vague cathodique de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OTf})$ est plus intense que celle de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ACN})$. L'ajout d'acétonitrile conduit bien à un déplacement des ligands OTf et acétone par l'acétonitrile. Cependant, la vague de réduction de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OTf})$ étant plus intense que celle de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ACN})$, cela indique qu'il existe un équilibre chimique entre $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ACN})$ et $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OTf})$, ce qui peut être résumé par le schéma présenté Figure 10.

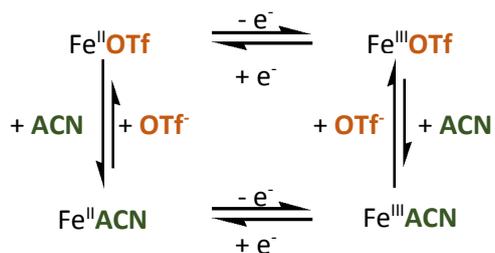


Figure 10: Schéma des équilibres chimiques entre les complexes en solution.

1.2.3. Effet d'ions chlorures

L'addition d'ions chlorures sur le complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})](\text{PF}_6)$ a été effectuée dans l'acétone, TBAPF₆ 0.1 M et le suivi est présenté Figure 11.

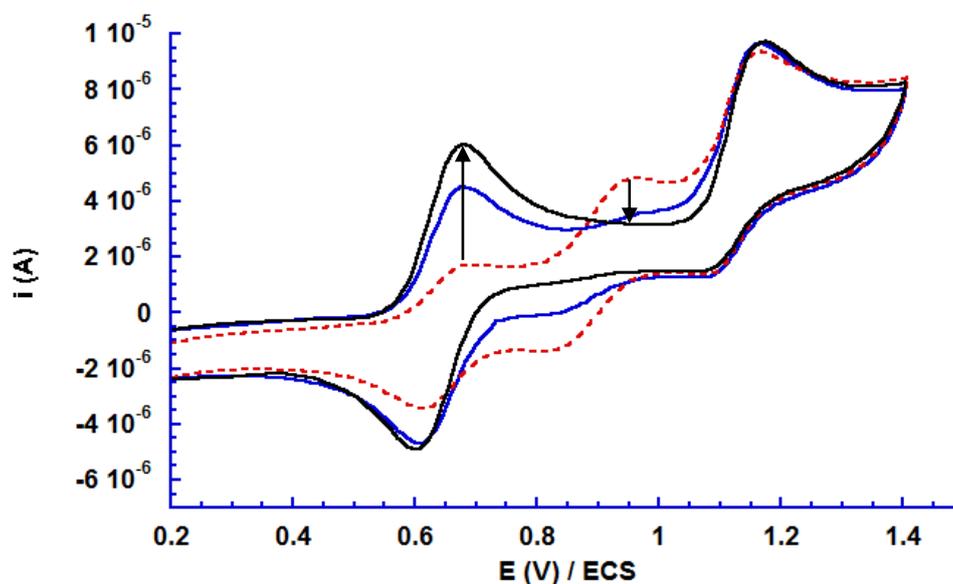
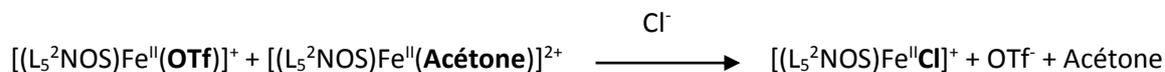


Figure 11: Voltammogrammes du complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})](\text{PF}_6)$ dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M (pointillés rouges), après ajout de 0.5 éq. de TBACl dissous dans l'acétone (bleu) et après ajout de 1 éq. de TBACl (noir) ; 0.1 V/s, $[\text{Fe}] = 1.0 \text{ mM}$.

Comme précédemment, le système est initialement en équilibre entre $[\text{LFe}(\text{OTf})]^+$ et $[\text{LFe}(\text{Acétone})]^{2+}$. Après ajout de 0.5 éq. de chlorures, l'intensité de la vague anodique à 0.95 V diminue considérablement alors qu'une vague réversible de potentiel de demi-vague de 0.63 V gagne en

intensité. Cette valeur correspond au couple $[\text{LFe}^{\text{III}}\text{Cl}]^{2+}/[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$. L'ajout total de 1 éq. de TBACl, conduit à la disparition de la vague à 0.95 V du système $[\text{LFe}^{\text{III}}(\text{Acétone})]^{2+}$, et à une augmentation du pic anodique de la vague à 0.67 V qui correspond à l'oxydation de $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$. L'équation bilan de cette étape peut être écrite de la façon suivante :



Du triflate d'argent dissous dans l'acétonitrile a ensuite été ajouté.

A partir du complexe $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$, l'ajout progressif de AgOTf dans l'acétonitrile conduit à la formation d'une espèce qui s'oxyde à 0.94 V (Figure 12). En solution, il y a alors deux systèmes redox, $[\text{LFe}^{\text{III}}\text{Cl}]^{2+}/[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ et $[\text{LFe}^{\text{III}}(\text{Acétone})]^{3+}/[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{Acétone})]^{2+}$. L'ajout de 1 éq. de AgOTf, conduit à la disparition du système réversible $[\text{LFe}^{\text{III}}\text{Cl}]^{2+}/[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ et l'intensité de cette vague est retrouvée dans la vague quasiment réversible de potentiel de demi-vague de 0.88 V du système $[\text{LFe}^{\text{III}}(\text{Acétone})]^{3+}/[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{Acétone})]^{2+}$. L'équation bilan de cette seconde étape peut être écrite de la façon suivante :

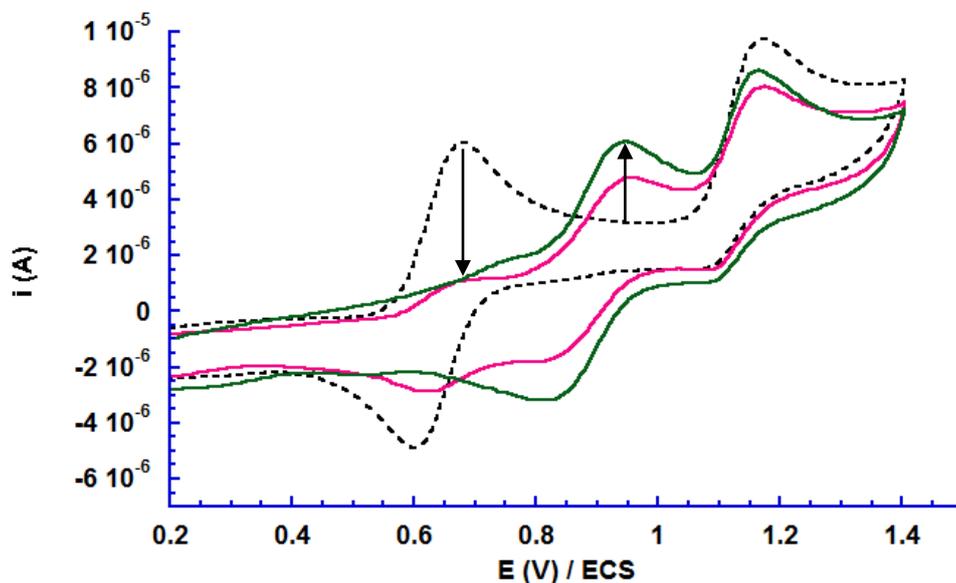
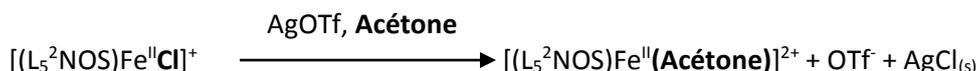


Figure 12: Voltammogrammes du complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})](\text{PF}_6)$ dans l'acétone TBAPF_6 0.1 M après ajout de 1 éq. de TBACl (pointillés noirs), après ajout de quantités croissantes de AgOTf dissous dans l'acétonitrile (rose puis vert) ; 0.1 V/s, $[\text{Fe}] = 1.0 \text{ mM}$.

1.3. Conclusion

Pour les systèmes $[(L_5^2NOS)Fe^{III/II}(X)]^{2+/+}$, où X est un triflate ou un chlorure, les potentiels de demi-vagues sont très proches (0.7 et 0.6 V/ECS) et ne dépendent pas du solvant, des échanges de ligands avec le solvant conduisent à la formation des systèmes $[(L_5^2NOS)Fe^{III/II}(Y)]^{3+/2+}$, où Y est de l'acétone ou de l'acétonitrile, les potentiels de demi-vagues sont également très proches (0.9 et 1.0 V/ECS). Ces valeurs de demi-vagues dépendent essentiellement de la charge globale du système. De manière intéressante, l'acétonitrile déplace difficilement un ligand triflate sur le fer(II) (Figure 6). Cela signifie que l'acétonitrile est un moins bon ligand du fer(II) que OTf^- dans ce complexe. Au contraire, lorsque le ligand chlorure est arraché du fer(II), l'acétonitrile, présent en grand excès par rapport aux triflates se fixe sur le centre métallique mettant en évidence la préférence cinétique pour cette réaction.

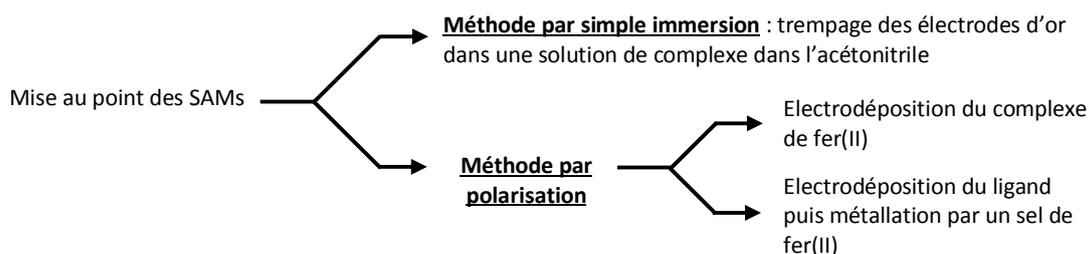
2. Mise au point et étude des monocouches de complexes autoassemblées sur or (SAMs)

Les deux complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}Cl]^+$ ont été caractérisés et l'échange des ligands exogènes a également été étudié. Le greffage de ces complexes sur des électrodes d'or est présenté dans cette partie. Sauf précisions particulières, les surfaces sont sondées à $10 V.s^{-1}$ dans l'acétone $TBAPF_6$ (0.1 M) comme sel de fond.

2.1. Mise au point des SAMs

La mise au point des SAMs demande dans un premier temps la préparation des électrodes d'or. En effet, il faut polir la surface avec des suspensions d'alumine de différentes tailles dans l'eau, puis effectuer une restructuration des électrodes dans de l'acide sulfurique afin d'éliminer toute trace d'oxydes.⁷⁻¹⁰ Cette étape de prétraitement des électrodes est essentielle pour diminuer la rugosité des surfaces et permettre ainsi une bonne reproductibilité des SAMs formées.

Deux méthodes ont été utilisées pour le greffage des complexes sur les électrodes. Les détails sont précisés en partie expérimentale.



Tous les voltamogrammes qui sont présentés dans cette partie ont été enregistrés avec le montage suivant : électrode au calomel saturé (référence), électrode de platine (contre électrode) et électrode d'or (travail), à une vitesse de balayage de 10 V/s (sauf indication contraire), et l'électrolyte support est composé de TBAPF₆ 0.1 M dans l'acétonitrile distillé ou l'acétone ultra pur. La gamme de potentiels balayée s'étend de -0.4 à 1.0 V/ ECS pour éviter de désorber le complexe de la surface.^{1,2}

A partir des voltamogrammes obtenus, il est possible de connaître la concentration surfacique qui correspond au nombre de molécules adsorbées par unité de surface.¹¹ Les formules sont les suivantes :

$$\Gamma_{\text{exp}} = Q / (nFA) \text{ avec } Q = A_{\text{pic}} / \nu$$

Γ_{exp} : concentration surfacique (mol.cm⁻²) ; Q : quantité de charge (C) ; n : nombre d'électrons transférés ; F : constante de Faraday (96485 C .mol⁻¹) ; A : surface de l'électrode (cm²) ; A_{pic} : aire du pic ; ν : vitesse de balayage (V.s⁻¹).

2.1.1.Méthode par simple immersion : Formation de la SAM avec le complexe

[(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)](PF₆)

La méthode par simple immersion est la méthode la plus simple. Les électrodes prétraitées sont plongées dans une solution de complexe de fer à une concentration de 1 mM dans l'acétonitrile distillé sous argon pendant au moins une nuit.

La charge capacitive de l'électrode nue diminue après trempage de l'électrode dans la solution de complexe. Cela indique que l'on recouvre l'électrode, le complexe est donc fixé sur la surface (Figure 13). Le complexe est également observé sur la surface car c'est une espèce électroactive.

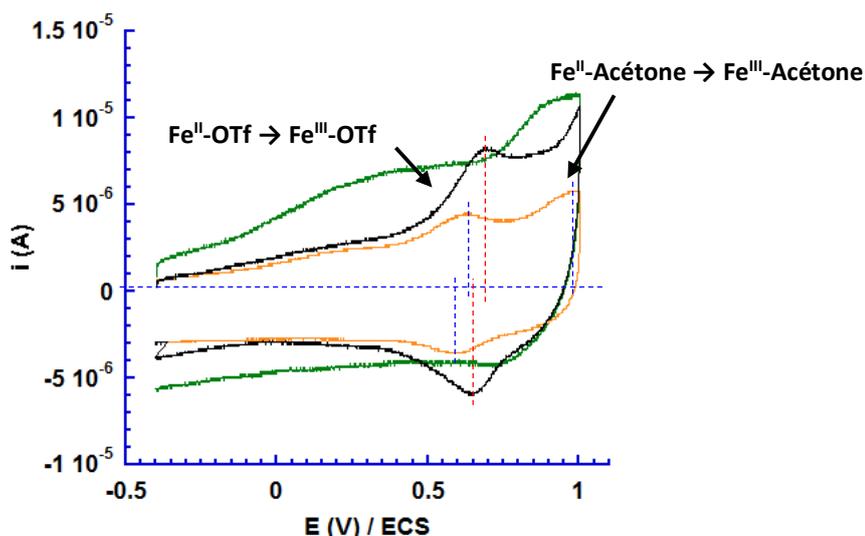


Figure 13: Voltamogrammes de l'électrode nue (vert) et du complexe [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)]⁺ sur une électrode d'or après une nuit (orange) et 10 jours (noir) dans une solution de complexe [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)](PF₆) à 1 mM dans l'acétonitrile, sondée dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M, diamètre de l'électrode : 1.6 mm.

Les SAMs formées par immersion ont été analysées par voltamétrie cyclique. Trois voltamogrammes sont présentés Figure 13, et montrent l'électrode nue ainsi que l'évolution des électrodes fonctionnalisées à 10 jours d'intervalle.

Au bout d'une nuit il est possible de sonder le complexe sur la surface. Il y a deux systèmes présents sur l'électrode, qui d'après la valeur des potentiels correspondent à des complexes $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ à $E_{1/2} = 0.60$ V et $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(Acétone)]^{2+}$ à 0.96 V. La densité surfacique est de l'ordre de $7.2 \cdot 10^{-12}$ mol cm^{-2} pour l'espèce s'oxydant à 0.60 V/ECS.

Après 10 jours de trempage de l'électrode d'or dans la solution de complexe dans l'acétonitrile, la densité surfacique augmente jusqu'à $1.62 \cdot 10^{-11}$ mol cm^{-2} pour SAM- $[LFe^{II}(OTf)]^+$. Cela montre que la méthode par immersion (voie passive) est toujours relativement lente.

Une augmentation de l'intensité est observée à haut potentiel ce qui pourrait refléter la présence d'un complexe $[LFe^{II}(acétone)]^{2+}$ à la surface de l'électrode. Pour prévenir tout risque de désorption, ces électrodes n'ont pas été sondées à plus haut potentiel.

2.1.2. Méthode par polarisation

Cette méthode permet en 40 minutes d'obtenir des densités surfaciques comparables aux SAMs obtenues par méthode de simple trempage.

a) Electrodeposition du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$

L'électrodeposition du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ a été effectuée durant 40 min à -0.4 V/ECS dans l'acétonitrile. Les voltamogrammes enregistrés dans l'acétone et dans l'acétonitrile sont présentés Figure 14.

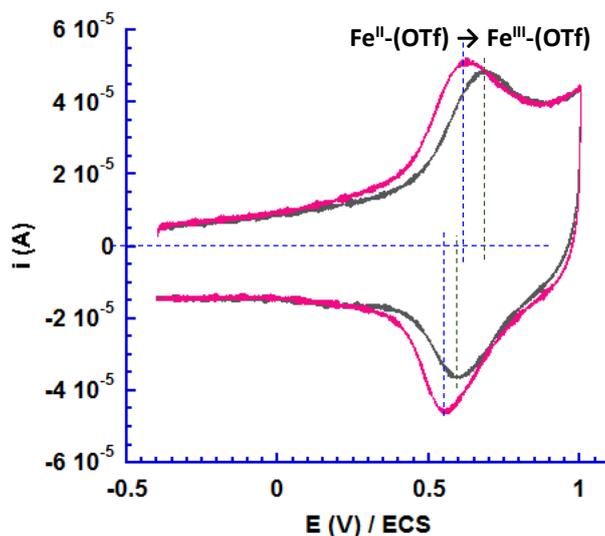


Figure 14: Voltamogrammes du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ sur une électrode d'or de diamètre 3.0 mm, dans l'acétone TBAPF₆ 0.1 M (gris), et dans l'acétonitrile TBAPF₆ 0.1 M (rose).

La densité surfacique est de l'ordre de $2.1 \cdot 10^{-11}$ et $2.8 \cdot 10^{-11}$ mol cm^{-2} dans l'acétone et l'acétonitrile respectivement. Les potentiels de demi-vagues sont de 0.59 et 0.63 V/ECS dans l'acétonitrile et l'acétone respectivement, et sont compatibles avec un complexe $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$. Les différences de densité surfacique ainsi que les valeurs de potentiels suggèrent une organisation différente de la SAM en fonction du solvant d'analyse.

b) Electrodeposition du complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$

L'électrodeposition du complexe non isolé $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ a été effectuée durant 40 min à -0.4 V/ECS dans l'acétonitrile. La SAM est sondée ensuite dans une solution d'acétone fraîchement préparée (Figure 15).

Sur le voltamogramme, il est important de noter qu'il y a un premier pic anodique à 0.73 V/ECS, et une augmentation de l'intensité vers 1 V qui suggère que l'acétone se lie au métal. La vague retour à 0.65 V est de la même intensité que la vague aller à 0.73 V, le système SAM- $[\text{LFe}^{\text{III}}/\text{II}]\text{Cl}]^{2+/-}$ est réversible. La densité surfacique est de $1.3 \cdot 10^{-11}$ mol cm^{-2} .

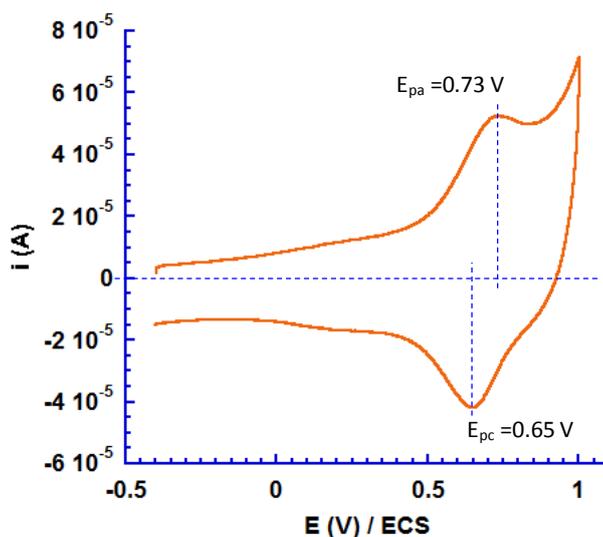


Figure 15: Voltamogramme du complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ sur une électrode d'or de diamètre 3.0 mm, acétone TBAPF₆ 0.1 M.

c) Electrodeposition de SAMs mixtes

Cette méthode se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'électrodeposition du ligand sur l'électrode d'or (Figure 16). Ensuite l'électrode est plongée 2 minutes dans une solution de 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) ; ces deux étapes se traduisent par une diminution de la densité du courant surfacique (Figure 17 gauche). Le MCH permet de diminuer la charge capacitive du système en couvrant le reste de la surface d'or. Il est généralement admis qu'il permet également une meilleure organisation de la surface pour la métallation.

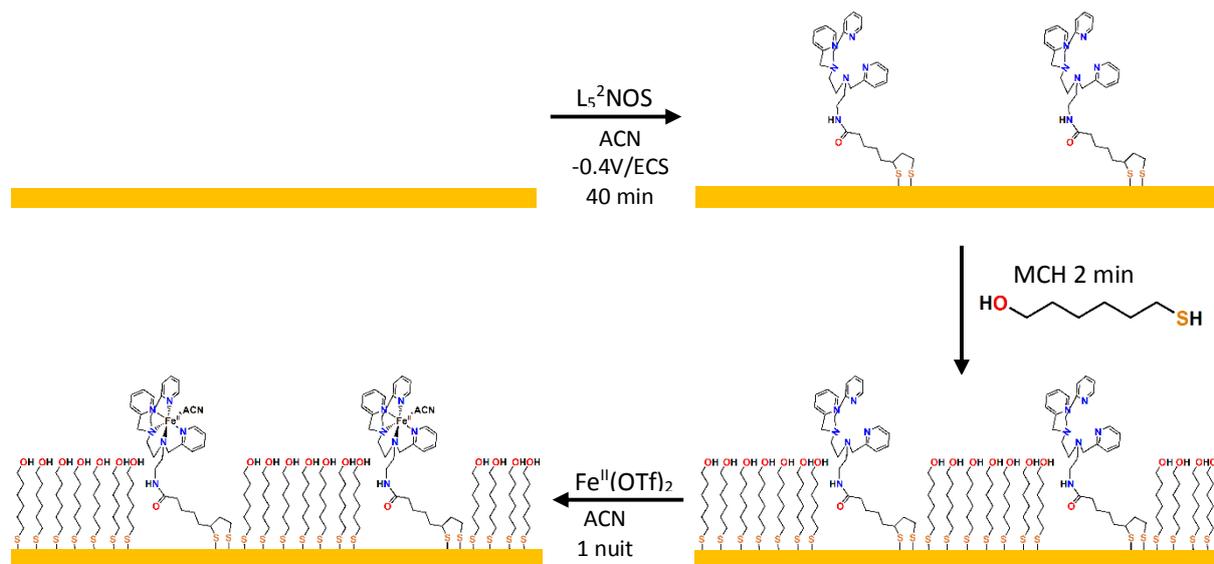


Figure 16: Etapes d'obtention d'une SAM mixte par voie électroactive (3 étapes).

Le ligand n'étant pas électroactif, le voltamogramme ne présente aucun système rédox. Après une nuit dans une solution de triflate de fer, la SAM est directement analysée.

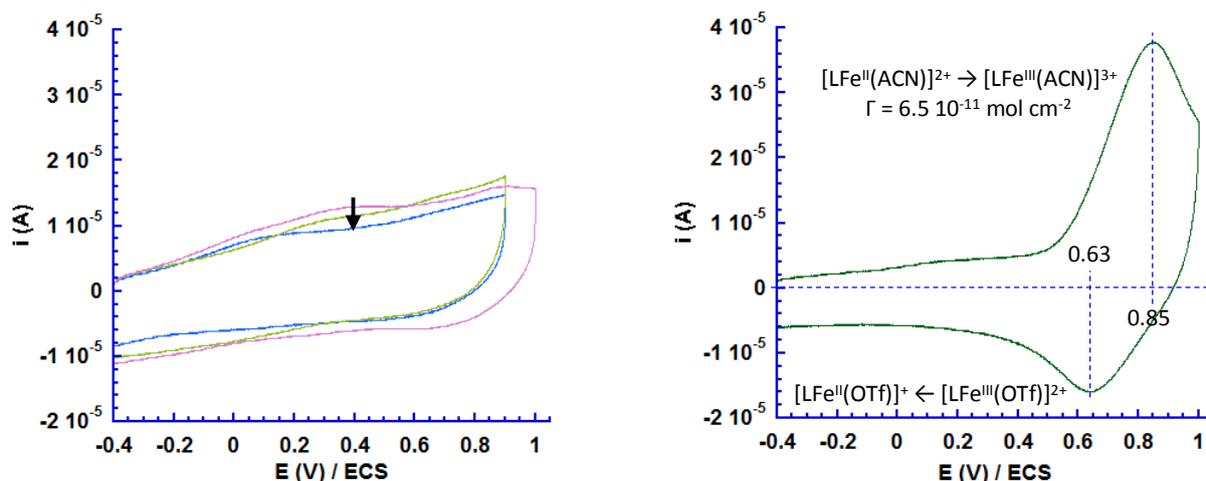
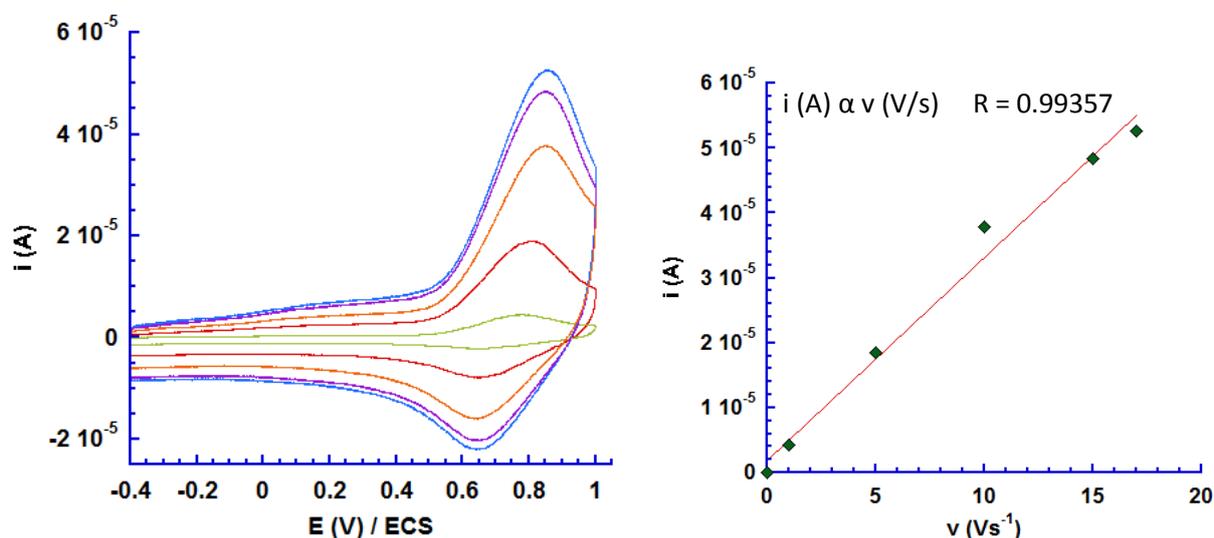


Figure 17: Voltamogrammes enregistrés dans l'acétonitrile TBAPF₆ 0.1 M. **A gauche** : électrode nue (rose), ligand L_5^2NOS électrodéposé (vert clair) et après 2 min dans MCH (bleu clair). **A droite** : SAM après complexation une nuit dans $Fe^{II}(OTf)_2$ dans ACN (vert).

Le voltamogramme correspondant présente un pic anodique à 0.85 V/ECS et un pic cathodique à 0.63 V (Figure 17 droite). L'écart de potentiel ΔE est de 0.22 V, les deux vagues ne correspondent pas à un système réversible.

Par comparaison avec les systèmes en solution, il est possible d'attribuer les vagues à deux systèmes différents qui mettent en avant un équilibre chimique comme évoqué au point 1.2.2 de ce chapitre. La vague à 0.85 V/ECS correspond à l'oxydation du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)]^{2+}$ en $[(L_5^2NOS)Fe^{III}(ACN)]^{3+}$, qui par réaction chimique conduit à un échange de ligand, conduisant à la formation $[(L_5^2NOS)Fe^{III}(OTf)]^{2+}$. Nous pouvons en déduire que le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(ACN)]^{2+}$ a été électrodéposé sur la SAM.

D'autre part, l'intensité du pic est proportionnelle à la vitesse de balayage, ce qui confirme que le complexe est bien greffé sur la surface de l'électrode et ne diffuse pas de la solution vers l'électrode.



Pour un système donné, les potentiels de pic en solution et sur la SAM sont du même ordre de grandeur. Un complexe de fer(II) monocationique s'oxyde entre 0.6 et 0.7 V/ECS, tandis qu'un complexe de fer(II) bicationique s'oxyde entre 0.9 et 1.2 V/ECS.

2.1.3. Analyses de surface

Il n'est pas possible d'utiliser les techniques de caractérisation de surface directement sur nos électrodes d'or. Ces techniques requièrent des échantillons de petite taille et plans. Pour cela, nous avons utilisé des surfaces d'or déposées sur du verre liées par du titane, appelées « wafers ». Pour savoir si le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^{+}$ est greffé sous forme de monocouche et présent de manière homogène sur la surface d'or, une étude par microscopie à force atomique (AFM) a été effectuée. Afin

de déterminer la composition de cette couche, une étude par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) a été réalisée.

Les surfaces ont été décapées à l'acide sulfurique à 98 %, rincées plusieurs fois à l'eau distillée, plongées successivement pendant 8 minutes dans un bain à ultra-sons dans l'eau, l'acétone puis l'éthanol. Enfin, elles ont été traitées à l'ozone pendant 10 minutes.

Avant tout greffage de complexe, la surface du wafer est vérifiée par AFM. Plusieurs SAMs sur wafers d'or ont été réalisées par voie simple immersion avec une durée de trempage de 27 jours dans la solution de complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ dans l'acétonitrile.

a) Microscopie à force atomique (AFM)

Les surfaces d'or sont plutôt homogènes (Figure 19). La surface d'or nue a une rugosité moyenne de 1-2 nm (Figure 19, gauche). Dans le cas où le complexe est greffé, la surface est homogène, à part à certains endroits où des dépôts de grande taille sont présents.

Par rinçage à l'acétone, ces dépôts sont éliminés. Sur la ligne (a), la rugosité moyenne est de 3 nm (Figure 19, droite). Cette valeur est un peu plus grande qu'avant greffage ce qui est en accord avec un greffage homogène du complexe sur la surface (taille du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ de l'ordre de 1.5 nm).

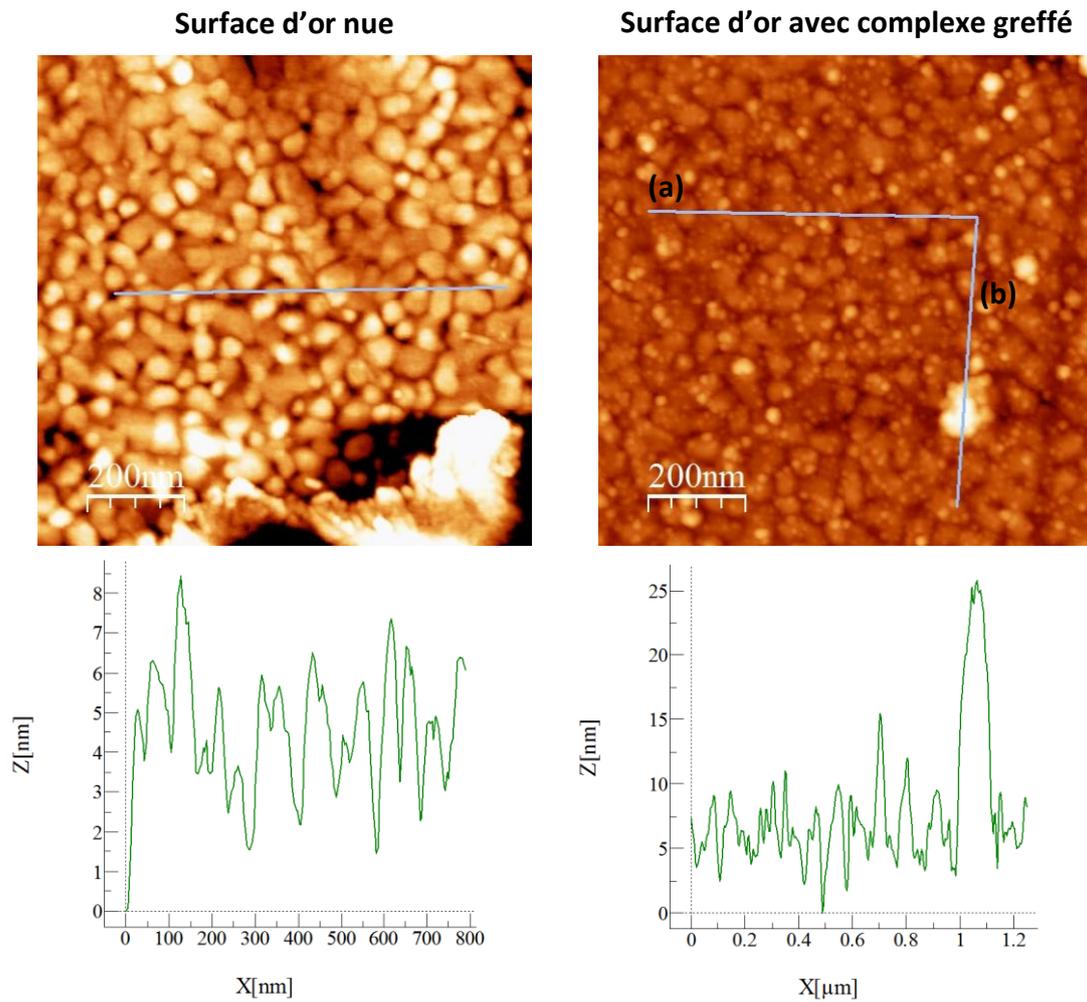


Figure 19 : Images AFM de la surface nue (haut gauche) de rugosité moyenne 1-2 nm (bas gauche). Images AFM de surface avec le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ greffé (haut droite) de rugosité moyenne 3 nm (bas droit).

Le complexe semble donc greffé sur la surface d'or sous forme de monocouche. Cependant, une preuve irréfutable de l'agencement des complexes sous forme de monocouche nécessiterait l'utilisation d'une surface initiale parfaitement plane.

b) Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

Les analyses XPS indiquent la nature des éléments présents à la surface et peuvent en principe permettre de déterminer la stœchiométrie d'un complexe.

La caractérisation XPS du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ sur poudre, ainsi que sur la SAM ont été effectuées (Figure 20). Notre analyse est uniquement qualitative. En effet, il n'a pas été possible de réaliser une analyse quantitative puisque les éléments caractéristiques du complexe sont présents en quantité très faible et sont parfois en limite de détection (le fer notamment).

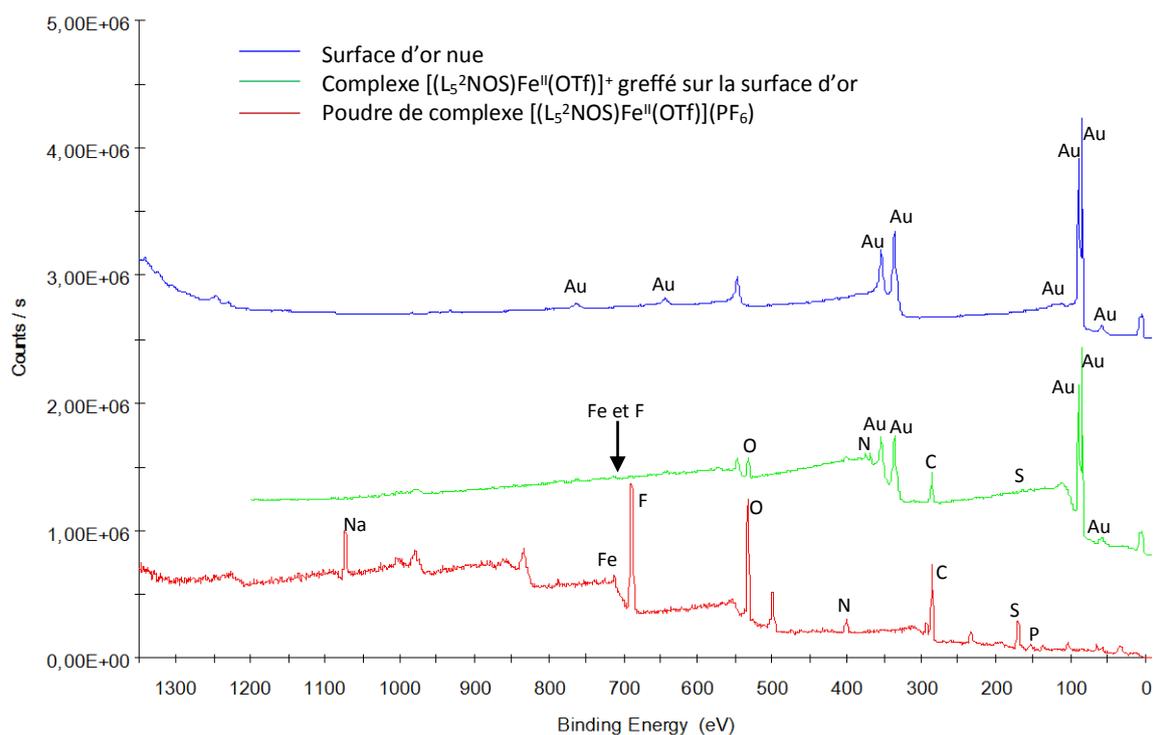


Figure 20 : Spectres XPS d'une surface d'or nue (bleu), d'une SAM $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ obtenue par voie simple immersion (vert) et du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](PF_6)$ en poudre (rouge).

Le spectre de la surface d'or présente plusieurs pics caractéristiques de l'or (spectre bleu, Figure 20).

Le complexe sous forme de poudre ou greffé sur la surface d'or présente des spectres avec certains pics similaires. Pour le complexe en poudre (spectre rouge, Figure 20), sont présents les pics caractéristiques du Fe, F, O, N, C, S et P qui correspondent aux différents types d'atomes constituant le complexe. Du sodium provenant du $NaPF_6$ utilisé pour faire précipiter le complexe, est également observé.

La SAM présente un spectre comportant des pics comparables à ceux du complexe en poudre et à ceux détectés sur la surface d'or nue, dont les pics du Fe, F, O, N, Au, S et C.

L'accumulation de spectres centrés sur les différentes énergies caractéristiques des éléments pour la poudre et pour la SAM a permis de déterminer la nature des liaisons chimiques dans lesquelles sont engagées ces éléments (Figure 21, Figure 22 et Figure 23).

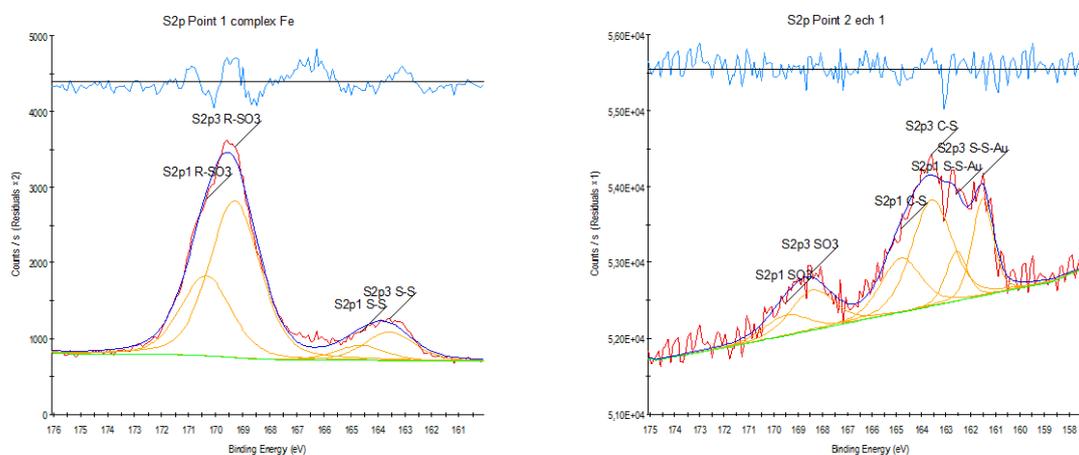


Figure 21 : Spectres centrés sur la transition 2p S du complexe en poudre (à gauche) et de la SAM (à droite) par XPS.

Le spectre de la transition 2p du soufre dans le complexe présente deux bandes qui ont pu être attribuées aux liaisons de type C-S et S-S du ligand, ainsi qu'à une liaison de type SO_3 . Cette dernière correspond à la liaison S-O dans le triflate (CF_3SO_3^-). L'intensité de ce pic est beaucoup plus importante que le pic des liaisons S-C et S-S du ligand. Il y a probablement un excès de triflate dans la poudre sous la forme de NaOTf.

En ce qui concerne le spectre de la transition 2p du soufre sur la SAM, trois bandes sont présentes, avec des rapports différents de ceux observés précédemment sur le complexe en poudre. Les transitions ont été attribuées aux liaisons SO_3 , C-S et S-Au avec, pour cette dernière liaison, une énergie de transition plus basse se traduisant par l'apparition d'un épaulement sur le spectre de la SAM. Ce pic confirme que le complexe est greffé sur la surface d'or. D'autre part, le rapport des intensités des bandes SO_3 et S-C est inverse par rapport à la poudre. Cela indique que la quantité en triflate est beaucoup plus faible sur la SAM que dans la poudre. Cela est cohérent avec le mode d'obtention des SAMs. Le triflate détecté correspond uniquement à celui lié au métal dans le cas de la SAM.

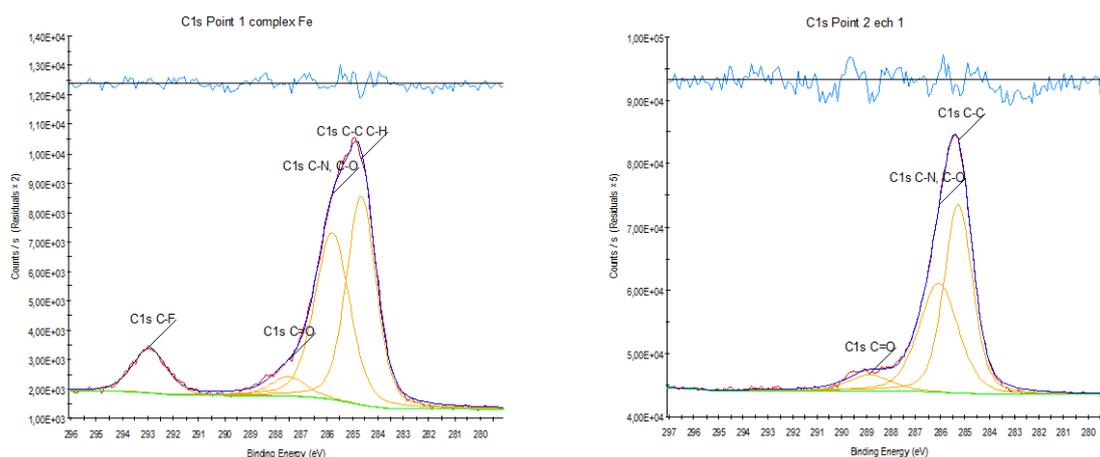


Figure 22: Spectres centrés sur la transition 1s C du complexe en poudre (à gauche) et de la SAM (à droite) par XPS.

Les pics correspondant au carbone sont assez similaires pour les deux échantillons et mettent en avant la présence de plusieurs types de liaisons impliquant le carbone telles que : C-C, C-H, C=O et C-N. Dans le cas de la poudre, des liaisons de type C-F ont été identifiées et attribuées aux liaisons C-F dans le triflate. Cependant, dans le cas de la SAM, le pic de la liaison C-F n'est pas observé. Pour le pic du soufre, des liaisons de type SO_3 ont été identifiés, avec une quantité beaucoup plus faible que pour l'analyse sur poudre (Figure 21 droite). De plus, l'absence de liaison C-F sur la SAM, peut être due à la dégradation du fluor sous le faisceau. Comme la quantité en triflate est très faible sur la SAM, le fluor disparaît, mais le pic SO_3 est cohérent avec les triflates présents sur la SAM après greffage.

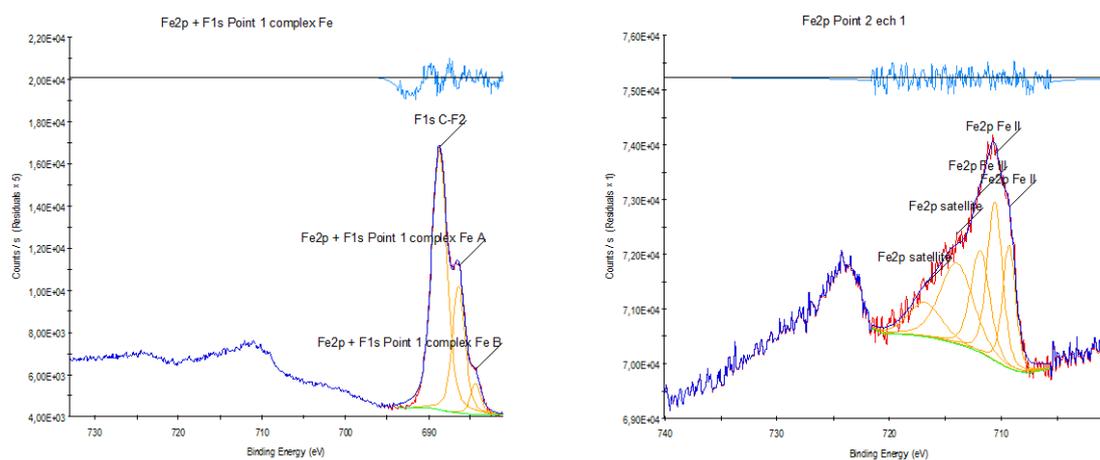


Figure 23: Spectres centrés sur les transitions 2p Fe et 1s F du complexe en poudre (à gauche) et de la SAM (à droite) par XPS.

Les spectres du fer et du fluor se superposent. Ils sont assez différents pour le complexe en poudre et pour la SAM. Dans le cas du complexe en poudre, le sixième ligand du fer est un ion triflate (CF_3SO_3^-) et le contre ion est un PF_6^- . Cela explique pourquoi, dans le cas du complexe en poudre, il n'est pas possible d'interpréter le spectre du fer qui est modifié par la présence du pic du fluor.

Cependant, dans le cas de la SAM, très peu de fluor a été détecté car il se dégrade progressivement sous le faisceau. Il a été possible d'interpréter dans une première mesure le pic du fer. Les pics principaux à 709.3 et 710.4 eV sont plutôt caractéristiques d'un Fe^{II}. Le pic à 711.9 eV est attribué à un Fe^{III}.^{12,13}

L'analyse par XPS montre que le complexe [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)]⁺ est bien greffé sur la surface et que tous les éléments caractéristiques sont présents. L'absence de signaux caractéristiques du chlore pour le complexe en poudre et surtout pour le complexe greffé sur la surface confirme que l'espèce sondée par électrochimie à E_{1/2} = 0.60 V/ECS est bien caractéristique d'une espèce [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)]⁺ et non [(L₅²NOS)Fe^{II}Cl]⁺.

2.1.4. Conclusion

Il est possible de préparer des SAMs de différentes manières. Le greffage des complexes peut se faire soit directement à partir du complexe synthétisé, soit en plusieurs étapes avec le greffage du ligand suivi de la complexation du sel de fer(II). Les signaux enregistrés sont similaires à ceux observés en solution. L'évolution de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage étant linéaire, les systèmes sondés ne diffusent pas, les complexes sont bien greffés sur la surface d'or. Des équilibres chimiques entre ligands exogènes et solvant ont été observés par voltamétrie cyclique. La caractérisation des surfaces par AFM et XPS a permis de mettre en évidence la présence d'une monocouche de complexes greffés sur la surface d'or.

2.2. Etude de l'échange de ligand exogène sur la SAM

Toutes les SAMs ont été préparées à partir d'une solution de complexe [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)](PF₆) dans l'acétonitrile. Elles comportent donc ce complexe à la surface au début de chaque étude présentée dans la suite. Sauf précisions particulières, le sel de fond est TBAPF₆ 0.1 M dans l'acétone. La vitesse de balayage est de 10 V.s⁻¹.

2.2.1. Comportement du complexe [(L₅²NOS)Fe^{II}(OTf)]⁺ greffé par voie de simple immersion dans des solutions de TBAOTf et TBACl

La SAM comporte initialement le complexe [LFe^{II}(OTf)]⁺ avec un potentiel de demi-vague de 0.67 V. L'électrode a ensuite été rincée à l'acétonitrile puis plongée 30 min dans une solution de TBAOTf (0.1 M) dissous dans l'acétonitrile. Le voltamogramme rouge correspondant à la SAM initiale (Figure 24) a été enregistré dans une solution d'acétone TBAPF₆ (0.1 M).

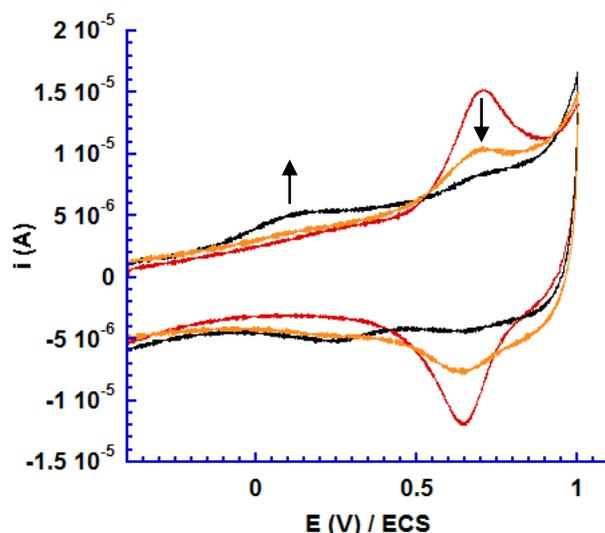


Figure 24: Voltammogrammes de SAM-[LFe(OTf)] sondée dans l'acétone (rouge), puis plongée dans une solution de TBAOTf (0.1 M) pendant 30 min (noir), et après 1h15 d'immersion dans une solution de TBACl (0.1 M) (orange).

Après immersion pendant 30 minutes dans une solution de TBAOTf, la SAM sondée présente une vague large réversible vers 0.2 V qui correspond au complexe $[LFe^{II}(OTf)_2]$, la vague à 0.7 V est beaucoup plus faible en intensité, ce qui laisse penser qu'en présence d'une grande quantité de triflate, le système $[LFe^{II}(OTf)]^+$ évolue vers un mélange de complexes de structure voisine de celle du complexe $[LFe^{II}(OTf)_2]$.

Lorsque cette électrode est plongée pendant 1h30 dans une solution de TBACl (0.1 M) dans l'acétonitrile et sondée dans l'acétone, la vague à 0.2 V disparaît, et une vague réversible à 0.66 V apparaît. On obtient donc un complexe qui présente une valeur de potentiel en accord avec celle du complexe $[LFe^{II}Cl]^+$ étudié en solution dans la partie précédente. Cette valeur est aussi compatible avec celle du complexe $[LFe^{II}(OTf)]^+$ mais il est improbable que ce dernier ne se reforme de cette manière. En effet, la SAM a été plongée dans une solution contenant un excès de Cl^- , et les complexes $[LFe^{II}Cl]^+$ sont beaucoup plus stables que les complexes $[LFe^{II}(OTf)]^+$.

2.2.2. Substitution du ligand exogène triflate par un ion chlorure

Initialement la SAM comporte le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ avec un potentiel de demi vague de 0.72 V / ECS, avec une densité surfacique Γ de $5.9 \cdot 10^{-11}$ mol cm^{-2} . Le système $LFe^{III}(OTf)/LFe^{II}(OTf)$ est réversible (Figure 25).

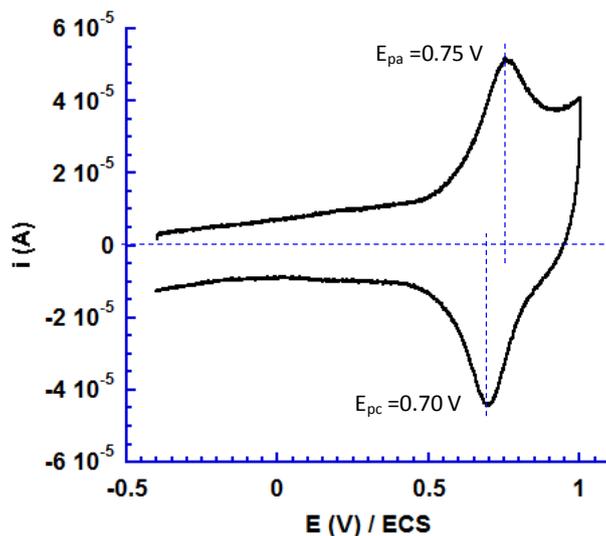


Figure 25: Voltamogramme d'une SAM $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ obtenue par simple immersion pendant 27 jours dans la solution de complexe correspondante.

Cette électrode est alors rincée à l'acétone, puis plongée dans une solution de TBACl 0.1 M pendant 15, 30 puis 75 min (Figure 26 gauche).

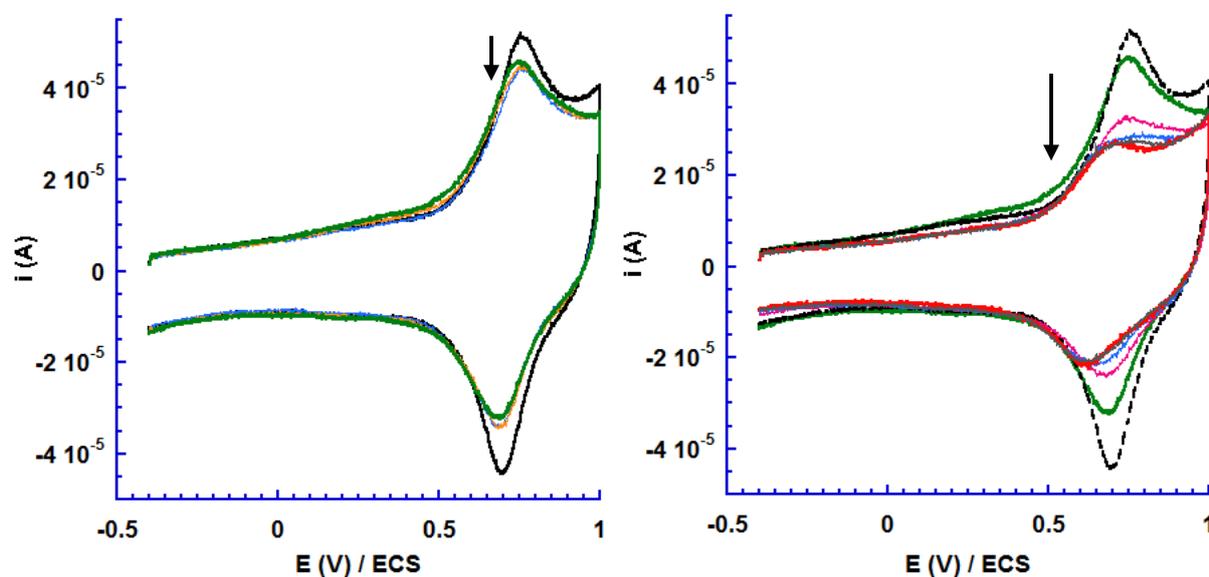
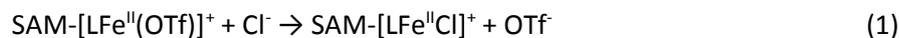


Figure 26: **A gauche** : Evolution de la SAM $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ suite au trempage dans une solution de TBACl 0.1 M. **A droite** : En pointillés noirs : SAM- $[LFe^{II}(OTf)]^+$; en vert : SAM- $[LFe^{II}Cl]^+$; puis évolution des voltamogrammes par ajouts croissants de $AgPF_6$ dissous dans l'acétone (rose : 0.5 μ L ; bleu : 1.0 μ L ; gris : 1.5 μ L ; rouge : 2 μ L).

Les potentiels de pic ne sont pas modifiés après ajout de Cl^- . Toutefois, une faible diminution de l'intensité est observée. Le chlorure est un très bon ligand par rapport au triflate, ainsi après trempage 15 min dans TBACl, on peut supposer un échange du ligand exogène OTf^- par Cl^- .



La confirmation de cette hypothèse est apportée par l'ajout de AgPF_6 dissous dans l'acétone. Jusqu'à 2 μL d'une solution à 6 mM de AgPF_6 ($1.2 \cdot 10^{-8}$ mol) sont ajoutés à un volume de 5 mL d'électrolyte support dans la cellule électrochimique, soit un large excès de AgPF_6 par rapport à la quantité de complexe présente sur la surface qui est de $4 \cdot 10^{-12}$ mol.

L'ajout de AgPF_6 conduit à la diminution progressive de la vague réversible à 0.72 V/ECS, ce qui indique que le chlorure n'est plus lié au fer(II). La diminution de cette vague ne s'accompagne pas de l'apparition d'une vague entre -0.4 et 1 V/ECS. Il est possible que l'acétone coordine le fer, ce qui conduirait à la formation d'un complexe dichargé qui posséderait un haut potentiel anodique. La vague à 0.72 V se déplace à 0.66 V et ne disparaît pas totalement, cela indique que l'équilibre n'est pas totalement déplacé vers la formation de $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{Acétone})]^{2+}$ suite à l'ajout d'argent.

L'équation bilan associée à cette étape est la suivante :



Afin de déterminer si le traitement par AgPF_6 est délétère pour les espèces fixées sur l'électrode, cette électrode a été ensuite trempée à nouveau dans une solution de TBACl 0.1 M (Figure 27).

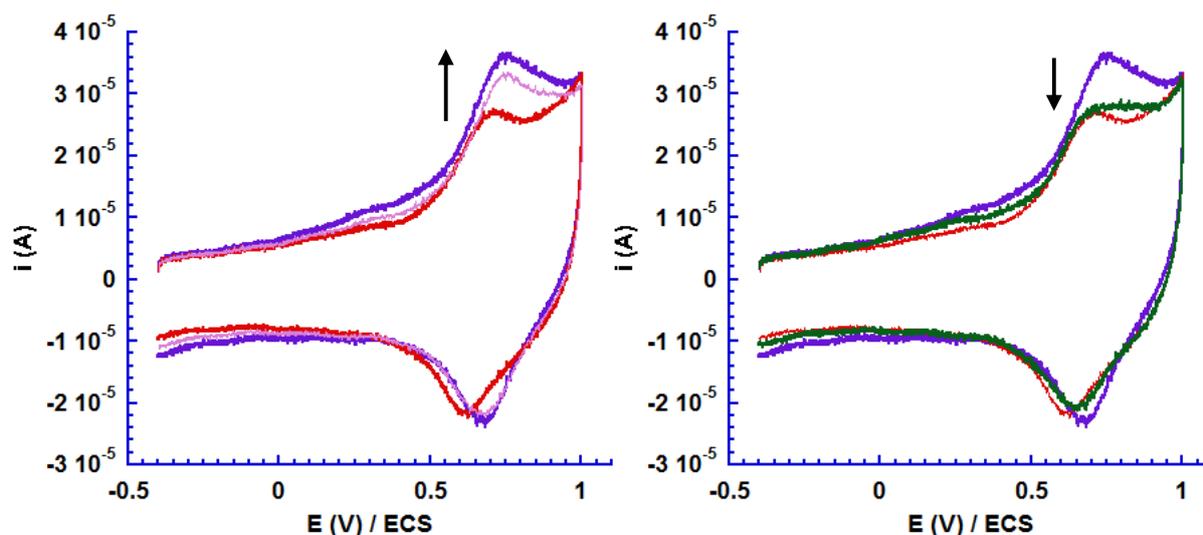
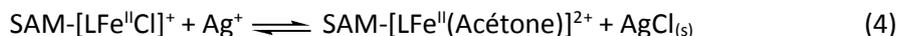
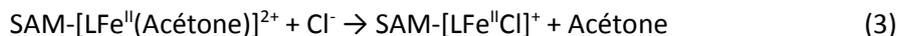


Figure 27: **A gauche** : Evolution de la SAM après trempage dans TBACl 0.1 M 30 min (rose) et 60 min (violet).
A droite : Evolution de la SAM après ajout de 2 μL de AgPF_6 sur la SAM en LFeCl (vert).

Une augmentation de l'intensité à 0.75 V/ECS est alors observée (Figure 27 gauche). 2 μL de la solution de AgPF_6 sont à nouveau ajoutés, conduisant également à la diminution de l'intensité de la

vague à 0.75 V (Figure 27 droite). Ces observations peuvent se résumer à l'aide des équations 3 et 4 ci-dessous.



Il est intéressant d'observer qu'il est possible de faire des échanges de ligands sur les complexes fixés sur électrode et de façon reproductible.

2.2.3. Effet de l'addition d'ions chlorures sur une SAM $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$ dans l'acétonitrile

Une SAM sondée dans l'acétonitrile et dans l'acétone ne présente pas la même allure. La Figure 28 (gauche) présente le voltamogramme d'une SAM $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$ sondée dans l'acétonitrile. L'intensité augmente considérablement vers 1 V et en réduction, un pic à 0.63 V/ECS est observé. Ce pic cathodique est positionné au potentiel de réduction du couple $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{III/II}}(\text{OTf})]^{2+}/+$. La forte intensité observée à haut potentiel pourrait être attribuée au complexe $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{ACN})]^{2+}$ qui se réarrange lorsqu'il est oxydé en $[\text{LFe}^{\text{III}}(\text{OTf})]^+$ qui est sondé au retour.

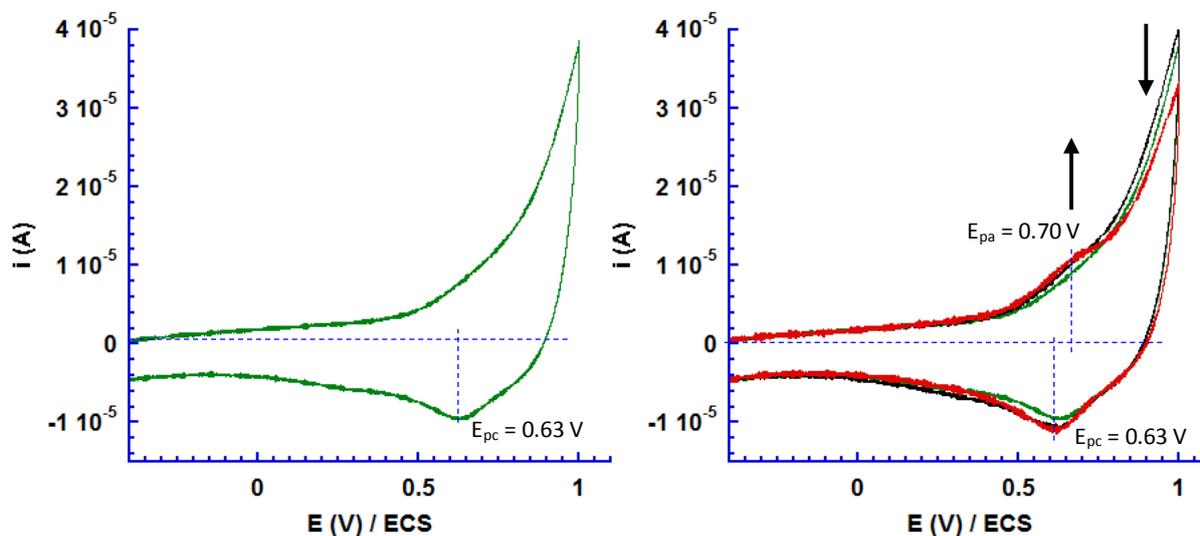


Figure 28: **A gauche et à droite**: voltamogramme d'une SAM $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$ (vert) ; **A droite** : Voltamogrammes de la SAM après 15 min (noir) et 60 min (rouge) dans TBACl dissous dans ACN. SAM sondée dans ACN TBAPF₆ 0.1M.

La SAM est plongée pendant 15 à 60 min dans une solution de TBACl dissous dans l'acétonitrile. L'électrode est ensuite rincée puis sondée dans l'acétonitrile (Figure 28 droite). L'intensité à 1 V diminue un peu, et surtout, un pic anodique croît à 0.70 V/ECS. Par comparaison avec la SAM $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ étudiée au point 2.1.2b), le système qui s'oxyde à 0.70 V correspond à $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$. Cependant, l'intensité à 1 V reste assez intense, il y a deux espèces sondées sur la SAM, $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ et $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ACN})]^{2+}$.

L'addition de AgPF_6 dissous dans l'acétonitrile conduit à la formation d'un pic anodique à 0.97 V masquant la vague à 0.70 V (Figure 29 gauche).

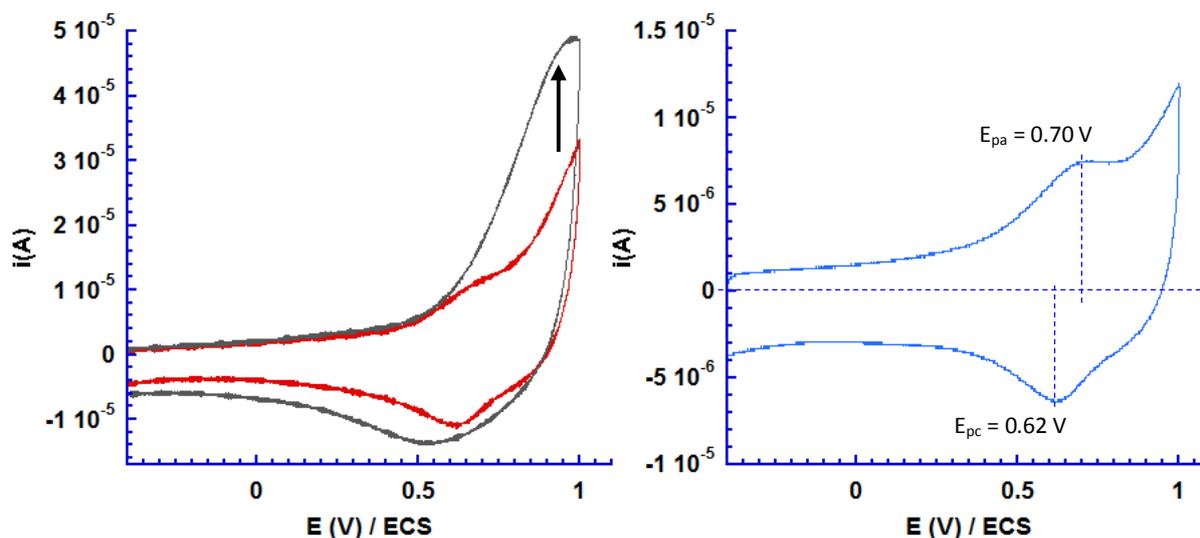


Figure 29: **A gauche** : voltammogrammes de la SAM après 60 min dans TBACI dissous dans ACN (rouge), et après ajout de AgPF_6 dissous dans ACN ; **A droite** : voltammogramme de la SAM après 36 h dans TBACI dissous dans ACN. Les voltammogrammes sont enregistrés dans ACN TBAPF_6 0.1 M, 10 V/s.

Cette forte intensité ne peut pas correspondre uniquement au complexe greffé sur la surface. En effet, le chlorure lié au fer est remplacé par une molécule de solvant (ACN), ce qui conduit à une augmentation du potentiel d'oxydation du fer(II). Mais cette vague est trop intense pour qu'on sonde uniquement le complexe. De plus, la vague ne correspond pas à un système réversible. Un pic cathodique large et intense est également observé vers 0.52 V. L'observation de ces signaux de forte intensité dans l'acétonitrile a été faite plusieurs fois. Nous ne sommes pas encore en mesure de l'expliquer.

Cette même électrode est ensuite plongée pendant 36 h dans la solution de TBACI dans l'acétonitrile (Figure 29 droite). La SAM sondée dans l'acétonitrile présente un signal caractéristique d'une SAM comportant $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ avec un signal réversible dont le potentiel de demi vague est de 0.66 V/ECS. Une perte de la forte intensité à haut potentiel est observée. L'intensité du pic anodique à 0.70 V est proche de celle de la SAM après avoir trempé l'électrode 60 min dans TBACI (Figure 29-gauche, courbe rouge).

2.2.4. Conclusion

De façon très semblable aux observations faites en solution, il est possible d'échanger les ligands exogènes de type OTf, Cl⁻, acétone et acétonitrile sur les complexes greffés sur électrodes d'or. De plus, les complexes $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ à la surface montrent une grande stabilité alors que les complexes $[(\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf}))]^+$ sont plus labiles.

2.3. Premiers tests de réactivité de la SAM vis-à-vis du dioxygène dans l'acétonitrile

Précédemment au laboratoire, Nathalie Ségaud a étudié par voltamétrie cyclique en conditions sèches, l'interaction du dioxygène avec le complexe $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}]^{2+}$.^{14,15} Lors de cette étude, l'électrode de travail était une électrode de carbone. Des ajouts successifs d'une solution concentrée de complexe $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{II}}](\text{PF}_6)_2$ dans l'acétonitrile dans une solution d'électrolyte saturée en dioxygène conduisait à la formation de l'adduit $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, se traduisant sur les voltamogrammes par l'apparition d'une pré vague non réversible à -0.76 V/ECS, avant la vague correspondant à la réduction de O_2 en superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$.¹⁶

Nous avons effectué la même expérience avec une électrode d'or nue puis avec une SAM. Les voltamogrammes ont été enregistrés sur deux fenêtres différentes -0.4 → -1.2 → 1.0 V et -0.4 → -1.1 → 1.0 V (Figure 30). Plus le balayage est effectué vers les bas potentiels, plus l'intensité en réduction augmente vers -1 V et plus la vague retour en oxydation à -0.44 V est intense. Ceci traduit le fait que plus la proportion de O_2 réduit en $\text{O}_2^{\bullet-}$ augmente, plus la quantité de $\text{O}_2^{\bullet-}$ sondée en oxydation au retour augmente.

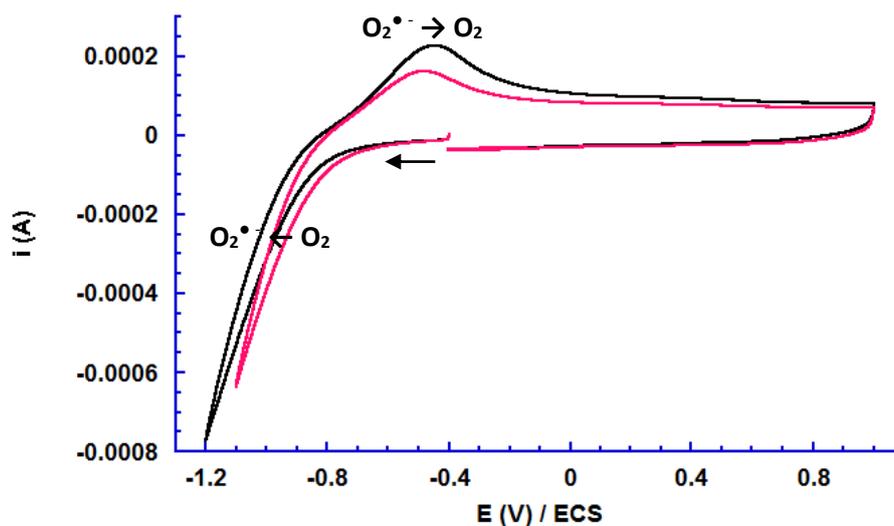


Figure 30: Voltamogrammes de la solution saturée en dioxygène, enregistrés en réduction à 10 Vs^{-1} , avec une électrode d'or nue.

La même expérience a été effectuée avec une SAM obtenue par électrodéposition sur une électrode de gros diamètre. Plus le balayage est effectué vers les bas potentiels en réduction, plus il est possible d'observer l'oxydation du superoxyde en dioxygène au retour comme observé avec l'électrode d'or nue (Figure 31).

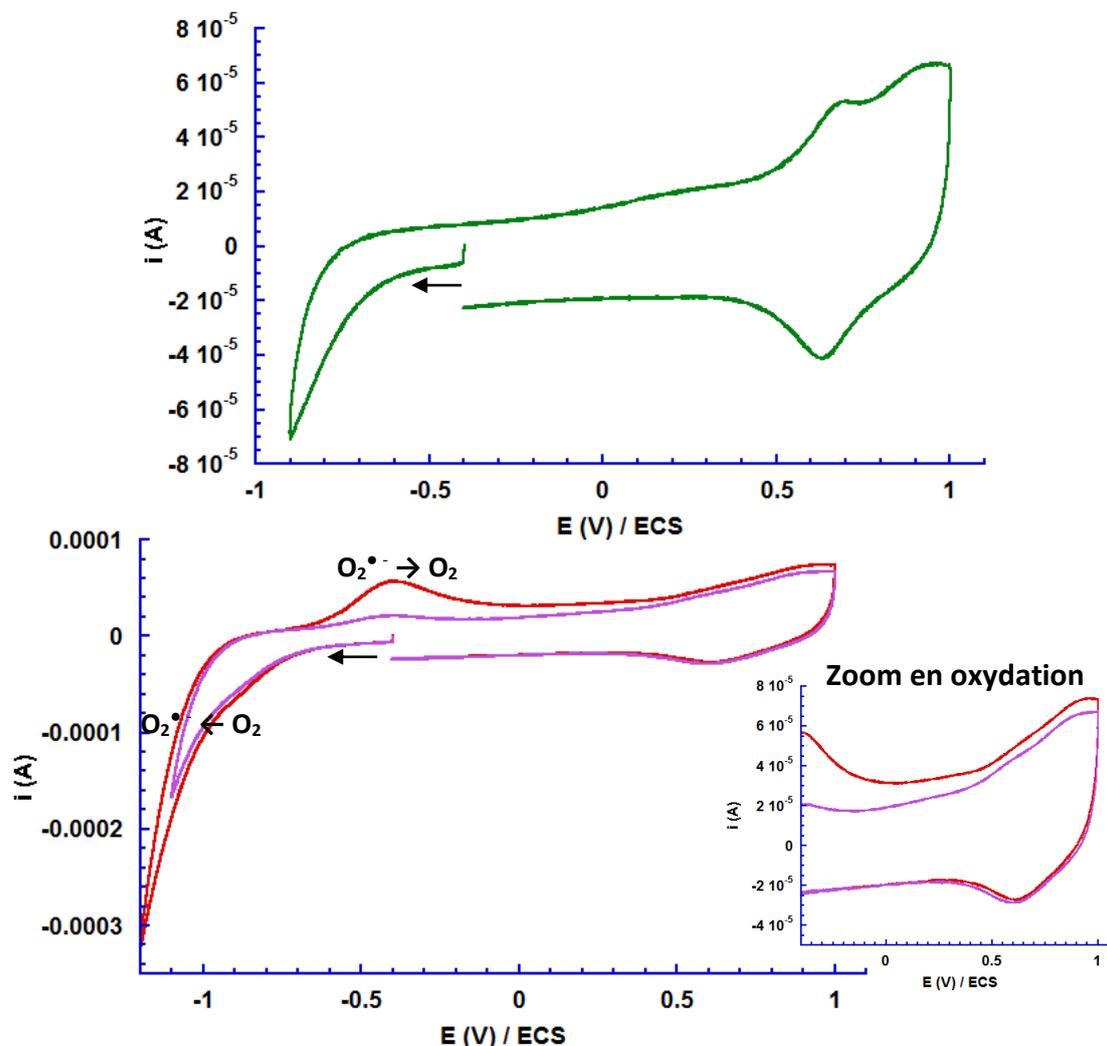


Figure 31 : Voltammogrammes de la solution saturée en dioxygène sondée par une électrode d'or avec le complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)]^+$ greffé. La gamme de potentiel est variable : $-0.4 \rightarrow -0.9 \rightarrow 1.0$ V en vert ; $-0.4 \rightarrow -1.1 \rightarrow 1.0$ V en violet et $-0.4 \rightarrow -1.2 \rightarrow 1.0$ V en rouge.

Un balayage jusqu'à -0.9 V (courbe verte, Figure 31), ne permet pas l'observation d'une vague en oxydation vers -0.4 V, mais le signal caractéristique du complexe greffé sur l'électrode est observé avec une vague réversible au potentiel $E_{1/2}$ de 0.65 V. A ce potentiel, l'espèce sondée est $[LFe^{II}(OTf)]^+$. Une autre vague non réversible est présente également en oxydation à 0.95 V, correspondant probablement à l'espèce $[LFe^{II}(ACN)]^{2+}$.

Par contre, un balayage jusqu'à -1.1 et -1.2 V (courbes rose et rouge, Figure 31), se traduit par l'apparition d'un pic en réduction à -1.1 et -1.2 V intense, et d'une vague en oxydation à -0.41 V, dont l'intensité semble liée au potentiel de réduction. Après balayage jusqu'à -1.2 V, l'intensité de cette

vague est considérablement plus importante que pour celui jusqu'à -1.1 V. En comparaison avec la Figure 30, le pic à -1.1 V correspond à la réduction du dioxygène en superoxyde et la vague en oxydation à -0.41 V à l'oxydation du superoxyde en dioxygène. Le dioxygène semble diffuser jusqu'à la surface de l'électrode même quand le complexe est greffé. De plus, un petit épaulement est présent dans le pied du pic à -0.85 V. Cet épaulement n'était pas observé avec l'électrode nue. Par analogie avec les travaux de Nathalie Ségaud, il pourrait s'agir de la vague de réduction de l'adduit $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ greffé à la surface de l'électrode.

D'autre part, en oxydation, une vague large pour laquelle il semble y avoir deux maxima à 0.66 et 0.97 V est observée (zoom en oxydation Figure 31). Le complexe est toujours présent mais son signal a été modifié. Il semble toutefois être majoritairement sous la forme $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{ACN})]^{2+}$. Ces observations indiquent que le complexe de fer voit sa structure modifiée lorsque l'électrode est sondée suffisamment bas en réduction afin que le dioxygène soit réduit.

Ces résultats méritent d'être confirmés lors d'études plus complètes.

3. Conclusions

Les complexes greffés sur électrode d'or présentent la même première sphère de coordination du fer(II) qu'en solution. L'échange de ligand exogène avec le solvant (acétone et acétonitrile) est effectif également sur les systèmes greffés. La caractérisation des SAMs par voltamétrie cyclique, AFM et XPS a mis en avant que le complexe est greffé de façon homogène sur la surface avec conservation de sa structure. Les échanges de ligands exogènes triflate et chlorure ont montré une différence de stabilité du complexe $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$ et $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$. D'autre part, le complexe semble capable de réagir avec le dioxygène dissous tout en restant greffé sur l'électrode d'or et sans détériorer celle-ci. Ces résultats nécessitent de plus amples investigations dans le but de développer des systèmes électrocatalytiques.

Références

- (1) Sahli, R.; Fave, C.; Raouafi, N.; Boujlel, K.; Schöllhorn, B.; Limoges, B. *Langmuir* **2013**, *29*, 5360.
- (2) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103.
- (3) Mialane, P.; Nivorojkine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1085.
- (4) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Muñoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 7285.
- (5) Antonello, S.; Benassi, R.; Gavioli, G.; Taddei, F.; Maran, F. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 7529.
- (6) Grogger, C.; Fattakhov, S. G.; Jouikov, V. V.; Shulaeva, M. M.; Reznik, V. S. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 3185.
- (7) Carvalhal, R. F.; Sanches Freire, R.; Kubota, L. T. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1251.
- (8) Fischer, L. M. T., M.; Heiskanen, A. R.; Masuda, N.; Castillo, J.; Bentien, A.; Emneus, J.; Jakobsen, M. H.; Boisen, A. *Microelectronic Engineering* **2009**, *86*, 1282.
- (9) Tkac, J.; Davis, J. J. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2008**, *621*, 117.
- (10) Hoogvliet, J. C.; Dijkma, M.; Kamp, B.; van Bennekom, W. P. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 2016.
- (11) Chidsey, C. E. D.; Bertozzi, C. R.; Putvinski, T. M.; Mujsce, A. M. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 4301.
- (12) Kim, Y. J.; Park, C. R. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41*, 6211.
- (13) Yan, Z.; Zhuxia, Z.; Tianbao, L.; Xuguang, L.; Bingshe, X. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *70*, 1060.
- (14) Ségaud, N., Université Paris Sud, 2013.
- (15) Segaud, N.; Anxolabehere-Mallart, E.; Senechal-David, K.; Acosta-Rueda, L.; Robert, M.; Banse, F. *Chemical Science* **2015**, *6*, 639.
- (16) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.

Chapitre 5 : Nouvelle métalloenzyme artificielle obtenue par couplage covalent entre un complexe de fer fonctionnalisé et la β -lactoglobuline bovine

Cette partie s'inscrit également dans le projet ANR Cathyméthoxy. Afin d'avoir une meilleure sélectivité lors des réactions d'oxydation avec nos catalyseurs, une stratégie possible est d'introduire le catalyseur dans une protéine afin d'avoir un environnement spécifique autour de celui-ci, ce qui devrait conduire à une approche préférentielle du substrat.

Dans le projet ANR Cathyméthoxy, la protéine choisie pour effectuer un couplage covalent entre une unique cystéine et un complexe fonctionnalisé, est la xylanase A qui ne possède pas de cystéine. En mutant un acide aminé dans la protéine, il a été possible d'obtenir plusieurs protéines mutantes avec une seule cystéine (5 et 7 mg de mutants, S212C et K48C respectivement). Les quantités obtenues étant très faibles, et connaissant peu le domaine de synthèse de métalloenzymes artificielles, nous avons décidé de travailler dans un premier temps sur une protéine beaucoup plus accessible comme la β -lactoglobuline. Cette protéine est commerciale ce qui nous a permis de mettre au point les méthodes de couplage, caractérisation et quantification. De plus, cette protéine est intéressante car elle comprend les caractéristiques suivantes :

- Robuste,
- Structure définie par diffraction des rayons X (Figure 1),¹⁻⁶
- Une seule cystéine libre (Cys121).

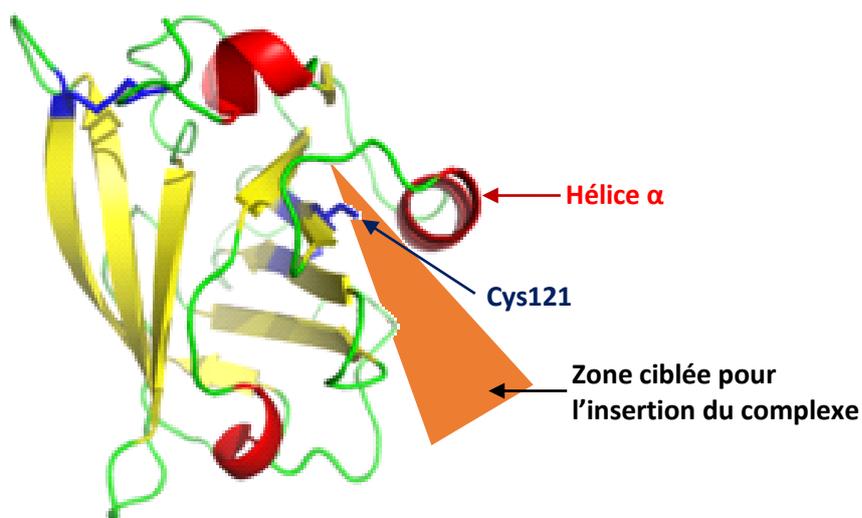


Figure 1: Structure résolue par diffraction des rayons X de la β -lactoglobuline bovine (variant A). En bleu, les cystéines. (PDB : 1BSQ)

La β -lactoglobuline bovine est composée de 162 acides aminés (18 kDa), présente deux variants (A et B) qui diffèrent par deux acides aminés (variant A : Asp64 et Val118 ; variant B : Gly64 et Ala118).

Ces deux variants possèdent 5 cystéines, 4 étant engagées dans des ponts disulfures et une cystéine étant libre, la cystéine 121 (Figure 1).³

Le site que nous avons ciblé est constitué d'une cystéine libre (la cystéine 121) qui est proche d'une hélice α qui va induire une certaine gêne stérique sur le complexe que nous souhaitons greffer covalement (Figure 1).

L'idée est de greffer un complexe de fer(II) dont nous connaissons parfaitement la structure et la réactivité. Dans le laboratoire, nous synthétisons des complexes de fer(II) à ligand amine/pyridine qui permettent l'oxydation de petites molécules organiques comme présentés au chapitre 3. Pour cela, un nouveau complexe a été synthétisé avec un ligand fonctionnalisé. Le choix de la fonction ajoutée au ligand classique est un groupement maléimide afin d'effectuer une réaction de couplage de Michael (sans sous-produit et efficace) entre le complexe et la cystéine 121 de la β -lactoglobuline.⁸

Dans la suite de ce chapitre, une première partie est consacrée à la synthèse du nouveau ligand maléimide et à la synthèse du nouveau complexe fonctionnalisé ; une seconde partie est consacrée à la synthèse de la nouvelle métalloenzyme artificielle ; la troisième partie est centrée sur la réactivité de celle-ci.

1. Synthèse et caractérisation du complexe fonctionnalisé $[(L_5^{2_{\text{maléimide}}})Fe^{II}Cl](PF_6)$

1.1. Synthèse du complexe

Afin de greffer covalement le complexe dans la β -lactoglobuline, il a fallu fonctionnaliser le ligand amine-pyridine par une fonction maléimide (Figure 2). La synthèse de ce ligand est décrite dans la partie expérimentale.

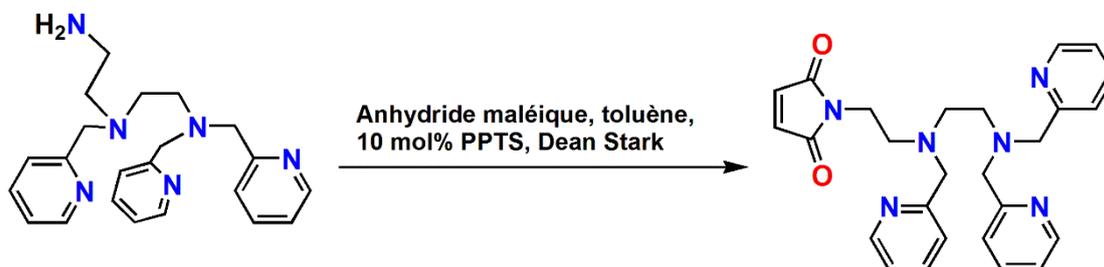


Figure 2: Schéma de synthèse du ligand $L_5^{2_{\text{maléimide}}}$ fonctionnalisé à partir du trispicen amine.

Ce nouveau ligand a été synthétisé en cinq étapes, et purifié, avec un rendement global de 70 %.

La synthèse du complexe a été effectuée sous rampe à vide, à partir de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Figure 3) d'après le protocole décrit en partie expérimentale. Le complexe a été obtenu avec un rendement de 60 %.

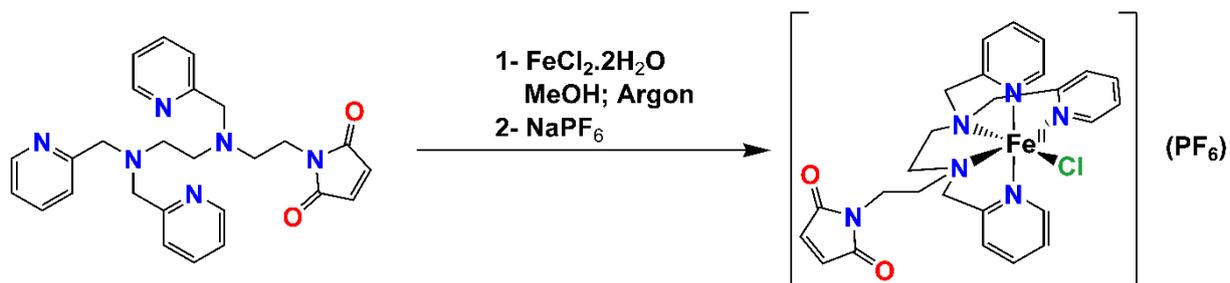


Figure 3: Schéma de synthèse du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$.

Les caractérisations structurale, spectroscopique et électronique de ce nouveau complexe sont présentées dans les paragraphes suivants.

1.2. Caractérisation du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$

1.2.1. A l'état solide

Des monocristaux jaunes du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$ ont été obtenus après évaporation lente sous argon dans un mélange éthanol/acétonitrile. La structure du complexe est présentée Figure 4.

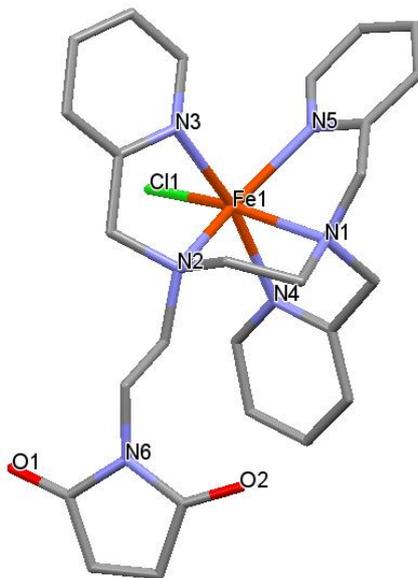


Figure 4: Structure du complexe moléculaire $[(L_5^2_{\text{maléimide}})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ représentée sans les atomes d'hydrogène à 100 K.

Le métal est dans un environnement pseudo-octaédrique. Le ligand pentadente occupe cinq des six positions de coordination du fer et la sixième position est occupée par un ion chlorure. Les positions équatoriales sont occupées par des fonctions amines (N1 et N2) ainsi qu'une pyridine (N5) et l'ion

chlorure (Cl1). Les positions apicales sont quant à elles occupées par deux autres pyridines (N3 et N4). Le Tableau 1 présente quelques données structurales pour ce complexe ainsi que pour le complexe parent $[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$.⁹

Tableau 1: Principaux angles (°) et distances (Å) dans les complexes $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ et $[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$.⁹

	$[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$	$[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$
Fe-N₁ (am)	2.259 (8)	2.274 (3)
Fe-N₂ (am)	2.255 (7)	2.248 (3)
Fe-N₃ (py)	2.218 (8)	2.271 (3)
Fe-N₄ (py)	2.222 (7)	2.200 (3)
Fe-N₅ (py)	2.162 (8)	2.171 (3)
Fe-Cl	2.318 (3)	2.332 (1)
N₁-Fe-N₂	78.9 (3)	78.36 (11)
N₂-Fe-N₃	74.1 (3)	74.32 (10)
N₃-Fe-N₁	104.8 (3)	97.77 (10)
N₄-Fe-N₁	75.5 (3)	75.67 (10)
N₁-Fe-Cl	166.1 (2)	170.18 (8)
N₂-Fe-Cl	106.6 (2)	104.51 (8)
N₃-Fe-Cl	89.1 (2)	92.01 (8)

La liaison Fe-Cl (2.318(3) Å) est plus longue que les liaisons Fe-N qui sont de l'ordre de 2.2 Å. Ces distances sont caractéristiques d'un complexe Fe(II) haut-spin ($S = 2$).¹⁰ A l'état solide, à 100 K, le complexe est donc haut spin.

La superposition des structures des complexes $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$ et $[(L_5^2)Fe^{II}Cl](BPh_4)$ est représentée Figure 5. Une grande similitude entre les deux structures est observée. Les liaisons Fe-N_{am} et Fe-N_{py} se superposent sur les deux structures. Les pyridines ne sont pas exactement dans le même plan mais les différences ne sont pas très importantes. Ces différences peuvent s'expliquer par la différence de température d'acquisition des complexes $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$ et $[(L_5^2)Fe^{II}Cl](BPh_4)$, ainsi que la nature différente du contre ion.

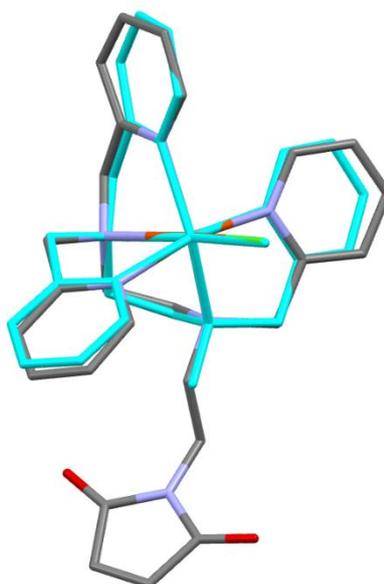


Figure 5: En bleu : $[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$ à 294 K ; En gris : $[(L_5^2_{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$ à 100 K.

1.2.2. En solution

Pour déterminer la structure du complexe en solution et ses propriétés électroniques, les techniques de spectrométrie de masse par ionisation électrospray, de spectrophotométrie d'absorption électronique UV-visible et de voltamétrie cyclique ont été utilisées.

a) Spectrométrie de masse (ESI)

Le complexe est analysé dans l'acétonitrile.

Différentes espèces sont caractérisées par les pics observés sur le spectre, présentant la même formulation de base : $[(L_5^2_{maléimide})Fe]$.

Le pic à $m/z = 547.1302$ est caractéristique du complexe $[(L_5^2_{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$. Il y a également sur le spectre un pic à $m/z = 256.0812$, correspondant à une espèce $[(L_5^2_{maléimide})Fe^{II}]^{2+}$ (Figure 6).

Le complexe isolé est stable en solution et conserve la même structure qu'à l'état solide.

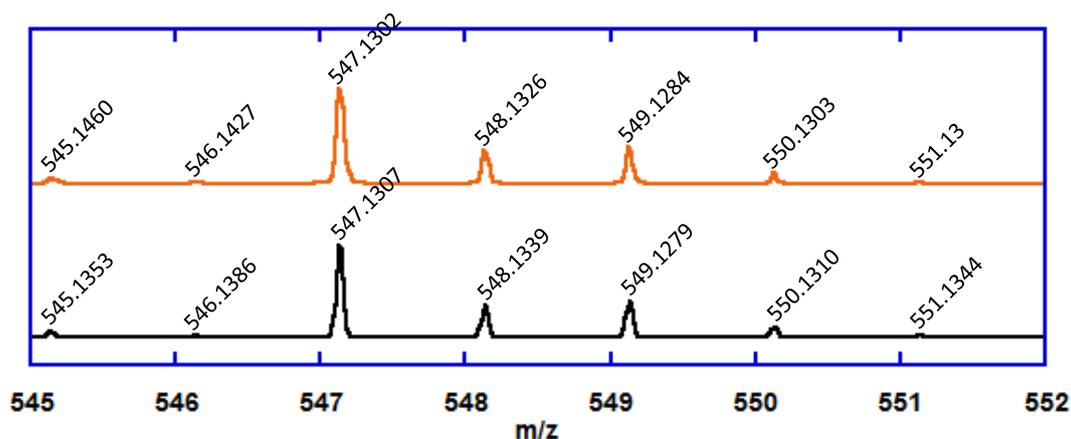


Figure 6: Spectre de masse (ESI, mode positif) du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ expérimental (orange) et simulé (noir) [Formula : $C_{26}H_{28}ClFeN_6O_2$, m/z mesuré = 547.1302, m/z théorique = 547.1307, err [ppm] = 0.8].

b) Spectrophotométrie UV-visible

Le complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ a également été analysé par spectrophotométrie UV-visible dans le méthanol et l'acétonitrile (Figure 7).

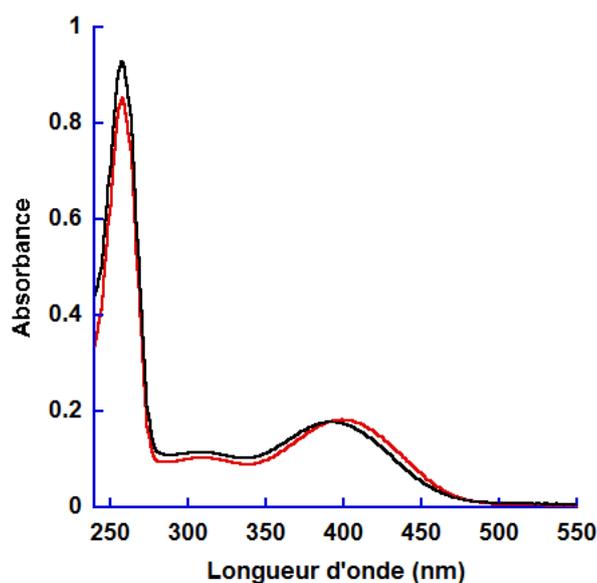


Figure 7: Spectres d'absorption UV-visible du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ dans l'acétonitrile (rouge) et dans le méthanol (noir) (0.1 mM).

Les deux spectres présentent une bande intense dans l'UV (257 nm, $\epsilon \approx 10\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) correspondant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des pyridines du ligand. La bande moins intense dans le visible autour de 400 nm correspond aux transferts de charge **MLCT**. De par son intensité et sa position, cette bande renseigne sur l'état de spin du Fe^{II} et sur la nature de la première sphère de coordination comme vu dans les chapitres précédents.⁹

Le Tableau 2 permet de comparer selon le solvant et le type de complexe la valeur des coefficients d'extinction molaire et la position de la transition **MLCT**.

Tableau 2: Comparaison des positions et du coefficient d'extinction molaire des complexes $[(L_5^2)Fe^{II}Cl]^+$, $[(L_5^2Bz)Fe^{II}Cl]^+$ ¹¹ et $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$ dans MeOH et ACN.

	Solvant	$\lambda(\text{nm})$	$\epsilon (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$
$[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$	Acétonitrile	399	1970
$[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$	Méthanol	393	1950
$[(mL_5^2)Fe^{II}Cl]^+$	Méthanol	385	1750
$[(L_5^2Bz)Fe^{II}Cl]^+$	Acétonitrile	401	2030
$[(L_5^2Bz)Fe^{II}Cl]^+$	Méthanol	394	2180

Dans un premier temps, il est possible de noter que pour le complexe $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$, les transitions **MLCT** sont de même énergie avec des coefficients d'extinction molaire très proches dans les deux solvants. L'ion chlorure reste bien coordonné au fer(II) dans le méthanol et l'acétonitrile. Le complexe $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$ a les mêmes caractéristiques que les complexes $[(mL_5^2)Fe^{II}Cl]^+$ et $[(L_5^2Bz)Fe^{II}Cl]^+$ ce qui confirme que le chlore reste lié au fer(II) en solution (le schéma des complexes comparés est représenté Figure 8).

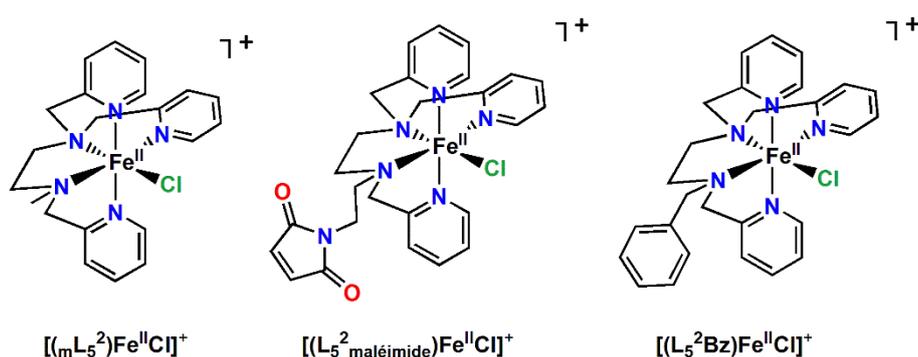


Figure 8: Schéma des complexes de fer(II) comparés par spectroscopie d'absorption électronique UV-visible.

Les coefficients d'extinction molaire étant de l'ordre de $2\ 000\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pour le complexe $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$, le fer(II) en solution est dans un état haut spin ($S = 2$).

Il est à noter cependant une valeur de la longueur d'onde de la bande **MLCT** plus grande dans les complexes $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl]^+$ et $[(L_5^2Bz)Fe^{II}Cl]^+$ avec une différence d'énergie de l'ordre de $600\ \text{cm}^{-1}$. Cela peut se justifier par la fonction maléimide et la fonction benzyle qui enrichissent les amines en électrons, ce qui se traduirait par une diminution de l'énergie de la bande de transfert de charge de la bande **MLCT**.

c) Voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile

Le complexe maléimide a également été étudié par voltamétrie cyclique dans l'acétonitrile distillé.

Le voltamogramme du complexe (Figure 9) présente une allure différente des complexes habituellement analysés. Pour attribuer les différents signaux rédox, il faut procéder par étapes.

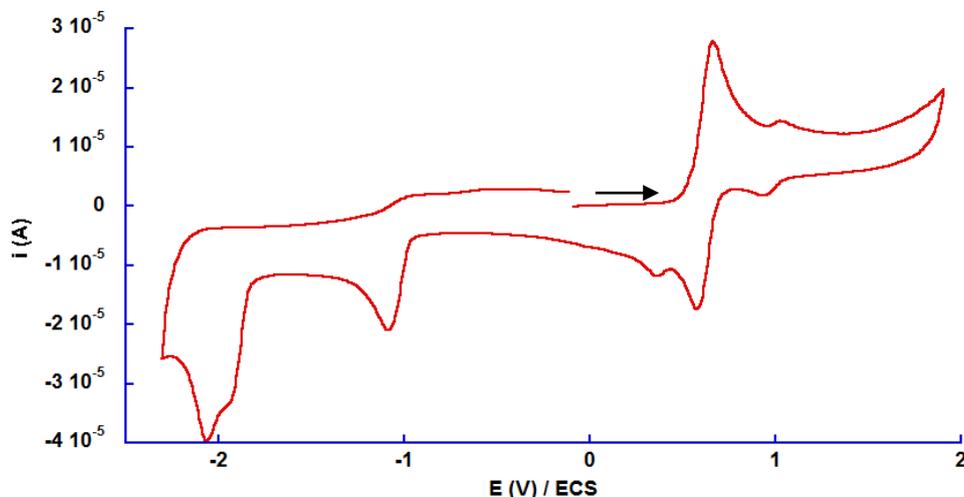


Figure 9: Voltamogramme cyclique du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ dans ACN distillé, température ambiante, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $[Fe] = 2 \text{ mM} + TBAPF_6 (0.1 \text{ M})$.

Dans un premier temps, il est possible de comparer les voltamogrammes du ligand et du complexe (respectivement en noir et rouge sur la Figure 10). Lorsque le ligand est coordonné au fer il y a des changements au niveau des vagues en oxydation. Les vagues (1) et (2) caractéristiques du ligand disparaissent et conduisent à la formation des vagues (a) et (b) en oxydation. Sur le voltamogramme du ligand, les vagues (1) et (2) correspondent à l'oxydation des amines et des pyridines. Lorsque le ligand est coordonné au fer(II), ces vagues sont déplacées vers des plus hauts potentiels et ne sont plus observées sur la gamme de potentiel étudiée. Les signaux (a, b, c) alors observés sur le voltamogramme du complexe correspondent aux différents couples Fe^{III}/Fe^{II} présents en solution.

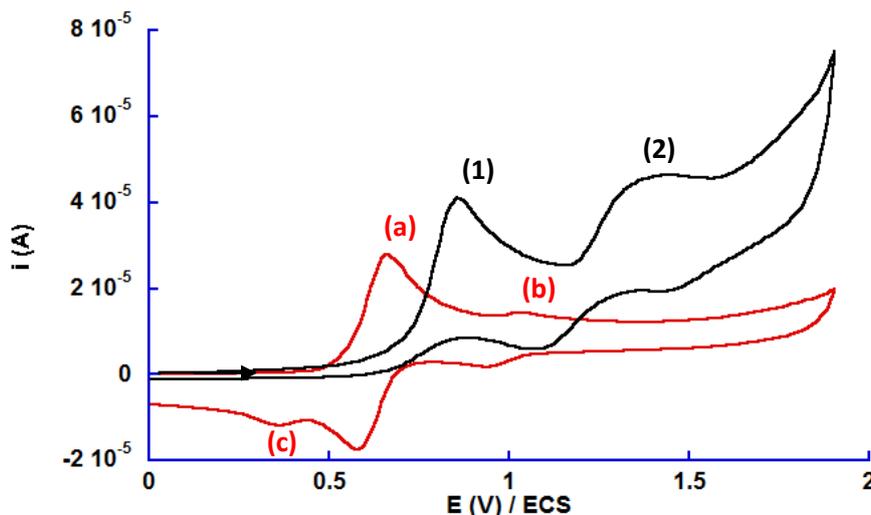


Figure 10: Voltamogrammes du ligand $L_5^2_{\text{maléimide}}$ (noir) et du complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ (rouge) dans ACN distillé, température ambiante, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $[Fe] = 2 \text{ mM} + TBAPF_6 (0.1 \text{ M})$.

La valeur des potentiels de demi-vagues renseigne sur le type de ligand exogène lié au fer. La présence de ces deux vagues indique qu'en solution le complexe $[(L_5^2_{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ est en équilibre

avec le complexe $[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe^{II}(ACN)]^+$ (respectivement (a) et (b) sur la Figure 10). Les différentes vagues réversibles en oxydation correspondent à une espèce Fe-Cl et Fe-ACN (Tableau 3). La vague (c) qui apparaît en retour, de par son potentiel correspond vraisemblablement à une espèce Fe-OH.^{12,13}

Tableau 3: Valeurs des potentiels $E_{1/2}$ pour les couples Fe^{III}/Fe^{II} , écart ΔE et structures en solution.

Vague	$E_{1/2}$ (V/ECS)	ΔE (mV)	Espèce
(a)	0.62	82	$[(L_5^{2\text{ maléimide}})FeCl]^+$
(b)	1.0	90	$[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe(ACN)]^{2+}$
(c)	0.33	-	$[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe(OH)]^+$

En réduction, la vague (e) à -2.07 V/ECS correspond à la réduction des pyridines du ligand complexé. Cependant, une autre vague (d) (Figure 11) est observée à -1.17 V/ECS. Par comparaison avec l'anhydride maléique et le N-éthylmaléimide, cette dernière a été attribuée à la réduction de la partie maléimide du ligand (Figure 11 et Tableau 4).

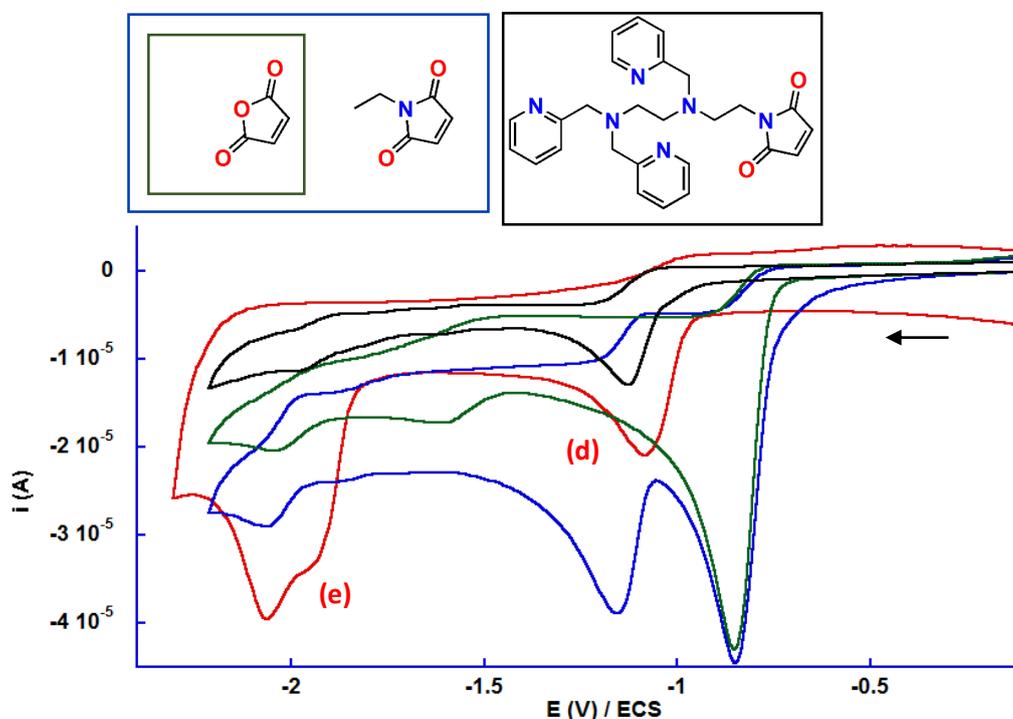


Figure 11: Analyse en réduction du ligand maléimide (noir), du complexe maléimide (rouge), de l'anhydride maléique (vert) et du N-éthylmaléimide + anhydride maléique (bleu) par voltamétrie cyclique (100 mV/s, TBAPF₆ 0.1 M, ACN).

Tableau 4: Attribution des vagues en réduction.

Vague	E_{pc} (V/ECS)	Espèce
(d)	-1.17	Groupe maléimide
(e)	-2.07	Réduction du ligand
	-0.80	Anhydride maléique
	-1.20	N-éthylmaléimide

Le nouveau complexe $[(L_5^{2_{\text{maléimide}}})Fe^{II}Cl](PF_6)$ a été caractérisé à l'état solide et en solution. En solution, la sixième position de coordination du Fer est occupée par un ion chlorure, ou l'acétonitrile, selon un équilibre chimique en faveur du premier.

Les caractérisations sont cohérentes les unes avec les autres. La structure du complexe observée à l'état solide est conservée en solution. Toutefois, nous notons une certaine labilité du ligand exogène chlorure en voltamétrie cyclique, ce qui est favorable pour la réactivité ultérieure du complexe.

1.3. Test de couplage entre le ligand maléimide et l'heptanethiol

Avant de tenter de coupler le complexe $[(L_5^{2_{\text{maléimide}}})Fe^{II}Cl]^+$ dans la β -lactoglobuline et afin de vérifier si la fonction maléimide est bien réactive, le couplage avec un thiol a été effectué. Pour cela, nous avons choisi l'heptanethiol (Figure 12).

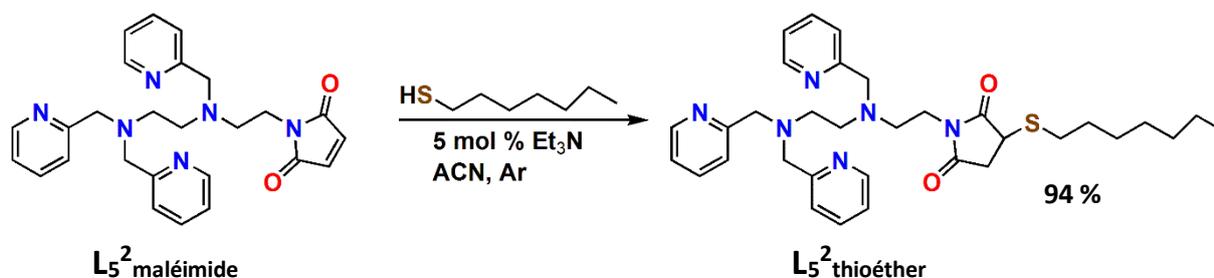


Figure 12: Schéma réactionnel du couplage entre le ligand maléimide et l'heptanethiol.

Cette réaction est une addition de type Michael, correspondant à une réaction sans sous-produits.⁷ Dans un premier temps, le test a été effectué sur le ligand afin de pouvoir étudier le produit du couplage $L_5^{2_{\text{thioéther}}}$ par RMN 1H . La solution obtenue a été caractérisée par spectrométrie de masse ESI (Figure 13).

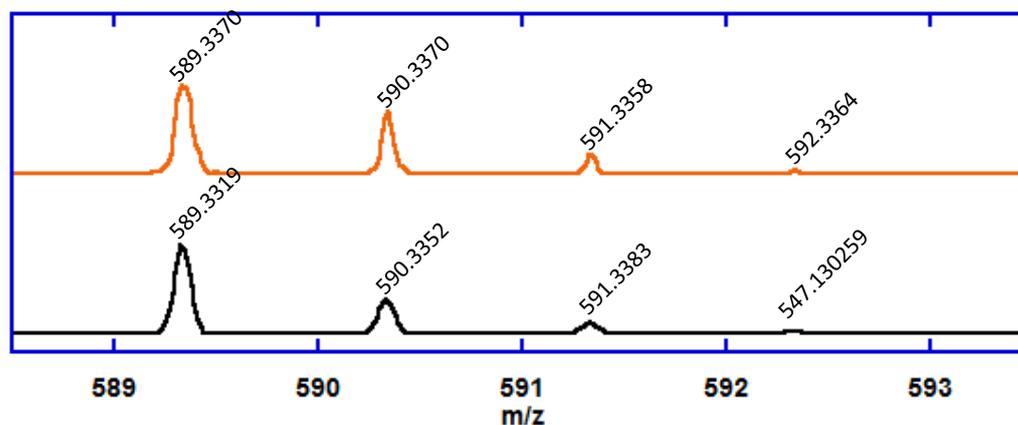


Figure 13: Spectre de masse (ESI, mode positif) de l'espèce $L_5^{2_{\text{thioéther}}}$ expérimental (orange) et simulé (noir) issu du couplage entre le ligand produit $L_5^{2_{\text{maléimide}}}$ et de l'heptanethiol [Formula : $C_{33}H_{45}FeN_6O_2S$, m/z mesuré = 589.3370, m/z théorique = 589.3319, err [ppm] = -5.1].

Le spectre global présente deux massifs intenses. L'un correspond à l'espèce $[L_5^{2\text{thioéther}} + H]^+$ à $m/z = 589.33$ et l'autre à l'espèce $[L_5^{2\text{thioéther}}Na]^+$ à $m/z = 611.31$.

Le spectre RMN du thioéther (Figure 14) présente des similitudes avec celui du ligand maléimide mais de nouveaux signaux sont également présents.

Sur le spectre du thioéther, il est possible de noter la disparition du singulet à 6.6 ppm, qui est caractéristique des deux protons maléimiques et l'apparition de signaux caractéristiques de protons diastéréotopiques confirmant l'addition du thiol sur la fonction maléimide.

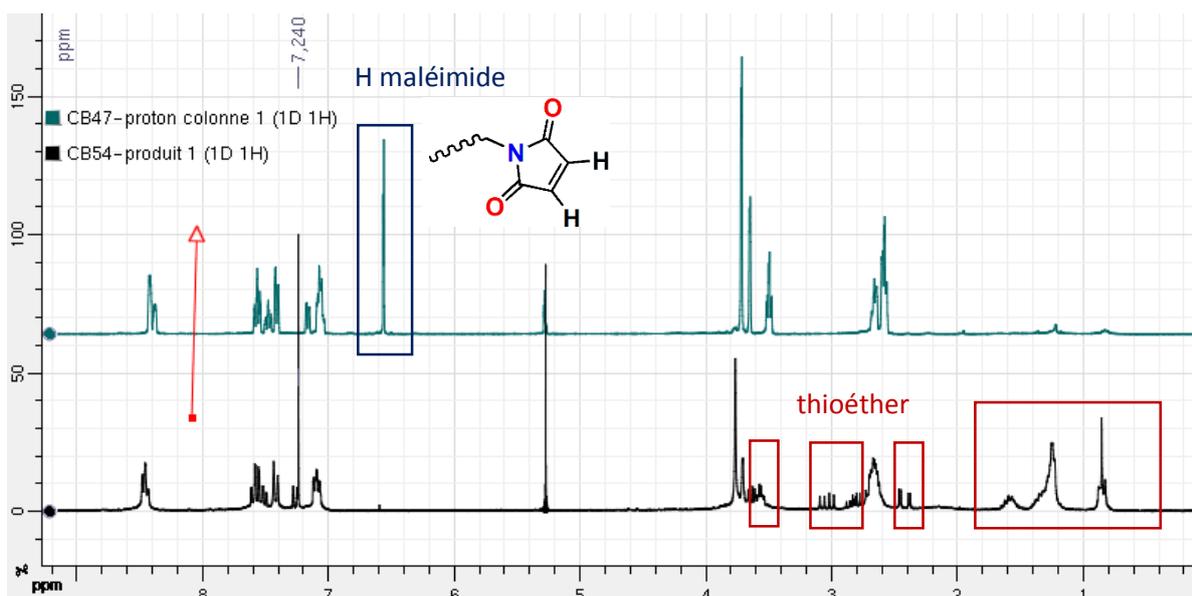


Figure 14: Comparaison des spectres RMN 1H du ligand maléimide produit $L_5^{2\text{maléimide}}$ (en vert) et du produit $L_5^{2\text{thioéther}}$ (en noir), $CDCl_3$, 250 MHz.

Une réaction analogue a été effectuée pour le couplage entre le complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ et l'heptanethiol (Figure 15). Cette réaction a été effectuée dans du tampon phosphate pH 7.4 10 mM afin d'optimiser les conditions de synthèse pour les protéines comme la β -lactoglobuline.

L'espèce finale n'a pas été isolée. Pour vérifier si le couplage a eu lieu, une analyse par spectrométrie de masse ESI a été effectuée (Figure 16) après évaporation de l'eau, puis redissolution dans de l'acétonitrile, du brut réactionnel.

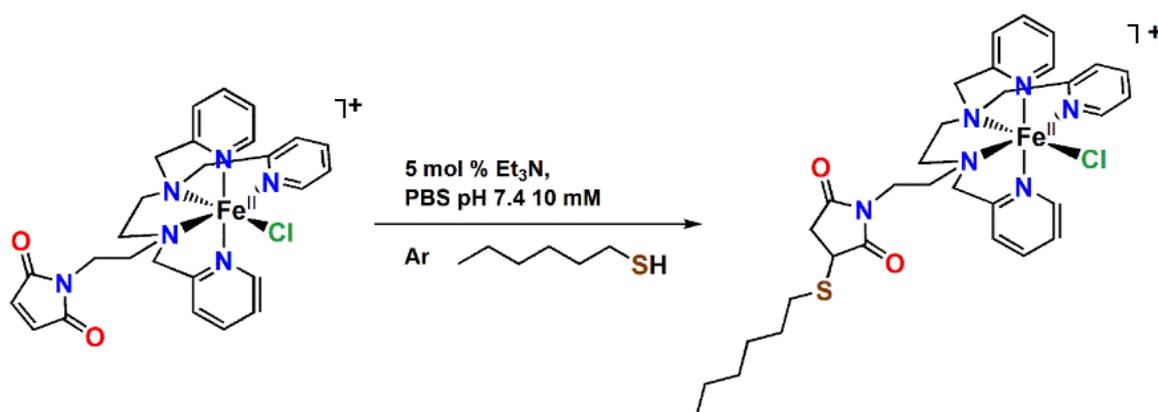


Figure 15: Schéma réactionnel du couplage entre le complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ et l'heptanethiol pour conduire au complexe $[(L_5^{2\text{thioéther}})Fe^{II}Cl]^+$.

De nombreux pics sont présents sur le spectre de masse global. L'espèce $[(L_5^{2\text{thioéther}})Fe^{II}Cl]^+$ est caractérisée par un pic à $m/z = 679.2279$. Il semble également rester du complexe maléimide qui n'a pas réagi et une autre espèce $[(L_5^{2\text{thioéther}})Fe^{II}(OH)]^+$ est observée à $m/z = 661.26$ (Figure 16).

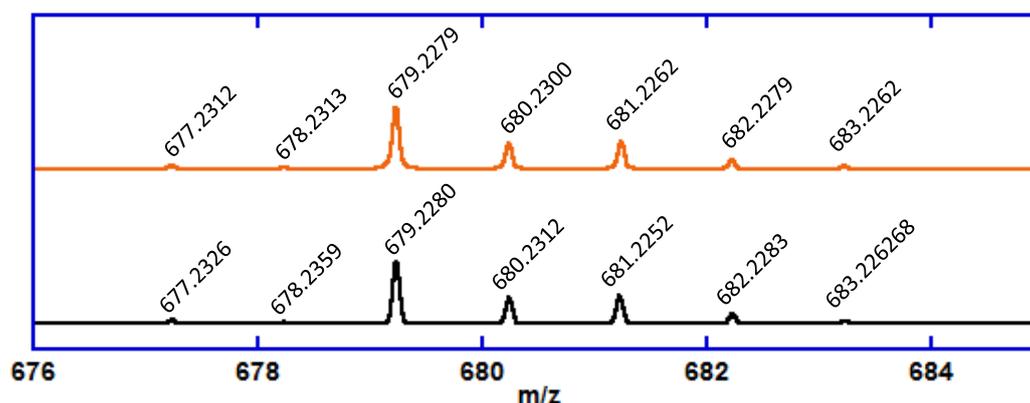


Figure 16: Spectre de masse (ESI, mode positif) du complexe $[(L_5^{2\text{thioéther}})Fe^{II}Cl]^+$ expérimental (orange) et simulé (noir) [Formula : $C_{33}H_{44}ClFeN_6O_2S$, m/z mesuré = 679.2279, m/z théorique = 679.2280, err [ppm] = 0.0].

Ainsi, la réaction de couplage entre la fonction maléimide du complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ et un thiol peut être effectuée en solution aqueuse. Ces conditions peuvent donc être utilisées pour le couplage du complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ avec la cystéine libre 121 de la β -lactoglobuline.

2. Synthèse, caractérisation, quantification et réactivité de BLG-L₅²Fe^{II}

2.1. Synthèse du biohybride et purification

La β -lactoglobuline bovine provient de chez Sigma Aldrich (L7880 (variant A) et L8005 (variant B)). Elle est vendue lyophilisée, ainsi, pour préparer la protéine en vue du couplage, elle est mise en solution à 1.1 mg/mL dans un vial, dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7.4, pendant 2 h et sous léger flux d'argon. En parallèle, une solution de complexe à 2.0 mM est préparée dans l'acétonitrile, sous argon. Ensuite, 200 μ L de la solution de complexe $[(L_5^{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ est ajoutée à 1.8 mL de solution de BLG (4 éq. complexe/1 éq. BLG). Après homogénéisation de la solution, la solution est placée 4 jours à 4°C avec une agitation au vortex chaque jour.

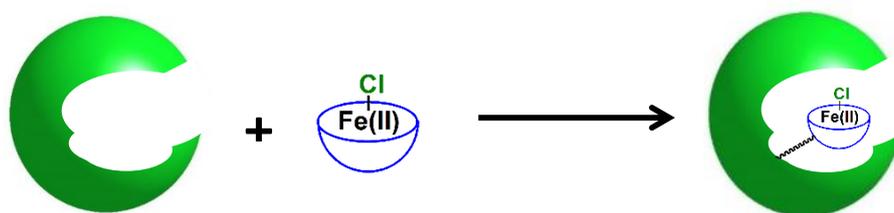


Figure 17: Schéma de couplage du complexe maléimide avec la BLG.

La solution de BLG-L₅²Fe^{II} obtenue après 4 jours doit être traitée. Afin de retirer l'excès de complexe, et de préparer l'échantillon pour une analyse par spectrométrie de masse, la solution est purifiée sur une colonne X5 Zeba spin de 5 mL (< 1 000 Da), avec pour tampon d'imprégnation le tampon bicarbonate d'ammonium (NBIC) 10 mM, pH 8. Suivant les études à effectuer, il est nécessaire de réaliser des changements de tampon. Le Tableau 5 résume la compatibilité des solutions tampons en fonction des études menées.

Tableau 5: Rappels de tampons adaptés aux différentes caractérisations, quantifications et réactivité du biohybride.

	NBIC 10 mM pH 8	HEPES 50 mM pH 8	PBS 10 mM pH 7.4	HEPES 10 mM pH 7.4
MALDI	Oui	Oui	Non	Oui
Orbitrap	Oui	Non	Non	Non
Cristallographie	Non	Non	Non	Oui
UV-vis	Oui	Oui	Oui	Oui
ICP	Oui	Non	Non	Non
Titration du Fe(II)	Oui	Oui	Oui	Non
Réactivité	Non	Oui	Non	Non

2.2. Caractérisation spectroscopique du biohybride

Les solutions de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ ne peuvent pas être analysées par ESI-MS, il est nécessaire de réaliser de la spectrométrie de masse adaptée aux protéines (MALDI-TOF et Orbitrap).

2.2.1. Spectrométrie MALDI-TOF

La résolution de la spectrométrie de masse MALDI est de +/- 5 Da.

Les spectres de masse de la β -lactoglobuline et du biohybride présentent un seul massif. Cela renseigne sur l'absence de coupure oxydante de la protéine lors du couplage ou lors du stockage ((a), Figure 18).

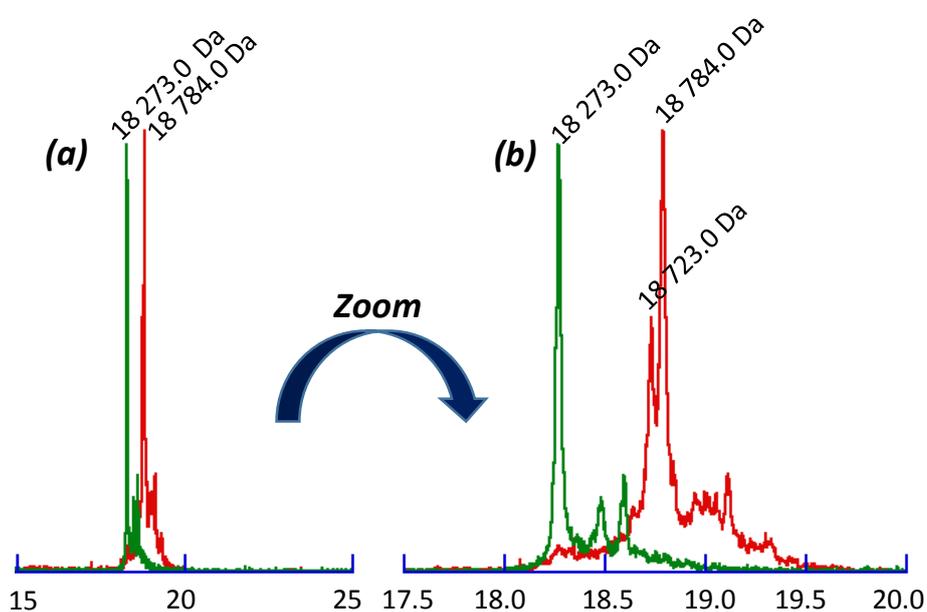


Figure 18 : Spectres de masse MALDI-Tof de la BLG-B (vert) et de la solution de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ (rouge) ; (a) de 15-25 kDa, (b) zoom de 17.5-20.0 kDa.

Le zoom des spectres de masse ((b), Figure 18) permet d'observer que sur le spectre du biohybride, il n'y a plus de β -lactoglobuline (BLG). La BLG est totalement couplée au complexe. Sur le spectre de l'hybride, il y a également un pic assez intense à 18 723 Da, qui peut être attribué à la BLG couplée au ligand L_5^2 maléimide (Tableau 6).

Tableau 6: Comparaison des masses théoriques et mesurées par MALDI-TOF de la BLG (B) et du biohybride (+/- 5 Da).

	Masse théorique (Da)	Masse expérimentale (Da)
BLG-B	18 276	18 273
$[(L_5^2 \text{ maléimide})Fe^{II}]^+$	511	-
BLG- L_5^2Fe	18 784	18 784
BLG- L_5^2	18 729	18 723

Le pic correspondant à l'espèce BLG-L₅²Fe à 18 784 Da permet de confirmer le couplage covalent entre la protéine et le complexe.

Cependant, l'espèce BLG-L₅²FeCl n'est pas observée. Cela peut s'expliquer par le mode d'ionisation utilisé par cette technique d'analyse qui est assez énergétique et entrainerait la décoordination du chlorure.

2.2.2. Spectrométrie Orbitrap

L'orbitrap permet d'obtenir des spectres avec une bien meilleure précision sur la position des pics par rapport à la spectrométrie MALDI-TOF : (+/- 0.2) Da pour l'orbitrap et (+/- 5) Da pour le MADI-TOF. C'est pour cela qu'il a été intéressant d'étudier la β -lactoglobuline et le biohybride par cette technique d'analyse (Tableau 7).

Les solutions de β -lactoglobuline et de biohybride sont dessalées par Zip tip. Ce dernier comporte une structure colloïdale permettant de stocker la protéine le temps du dessalage. Le lavage est effectué une dizaine de fois avec de l'eau acide, puis pour récupérer la protéine, une élution à 70% d'acétonitrile est effectuée. L'échantillon préparé est alors injecté par nanospray.

Tableau 7: Comparaison des masses théorique et expérimentale de la β -lactoglobuline et du biohybride par orbitrap.

	Masse théorique (Da)	Masse expérimentale (Da)
BLG-B	18 276	18 265.65
[(L ₅ ² maléimide)Fe ^{II}] ⁺	511.16	-
BLG-L ₅ ² Fe	18 776.81	18 776.72
BLG-L ₅ ² H ₂	18 722.9	18 722.66

Le spectre de la β -lactoglobuline présente très peu de pics. Le plus intense est à 18 265.65 Da, qui est attribué à la β -lactoglobuline.

Le spectre de la solution de biohybride présente plusieurs pics qui ne sont pas facilement attribuables. Le traitement qui est effectué conduit probablement à des espèces supplémentaires.

Principalement, il n'y a pas de pic à 18 265.65 Da, ce qui montre que l'intégralité de la β -lactoglobuline a été couplée avec le complexe. De plus, le pic le plus intense à 18 776.72 Da correspond au biohybride BLG-L₅²Fe^{II}. Il est également possible d'attribuer le pic à 18 722.9 Da. Il correspond au biohybride sans le fer BLG-L₅²H₂. Le traitement à l'eau acide effectué pour préparer l'échantillon à l'injection entraîne la décoordination du fer suite à la protonation de deux des trois pyridines.

L'espèce $BLG-L_5^2FeCl$ n'est pas observée. Cependant, les mêmes analyses ont été effectuées avec l'autre variant de la β -lactoglobuline, le variant A, et dans ce cas, par orbitrap, l'espèce $BLG_A-L_5^2FeCl$ est détectée.

2.2.3. Tests de cristallisation de la $BLG-L_5^2Fe^{II}$

Les tests de cristallisation de la BLG et de la métalloenzyme artificielle $BLG-L_5^2Fe^{II}$ ont été effectués avec la collaboration de Herman van Tilbeurgh et Ines Gally de l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire de l'Université Paris Sud.

La cristallogenèse des protéines est beaucoup plus complexe que la cristallisation de petites molécules. Les conditions de cristallisation dépendent du sel de cristallisation, du pH, des concentrations en sel de cristallisation et en protéine. Des solutions cristallisantes en kit ont été utilisées, avec différents sels de cristallisation et à plusieurs pH. Les conditions optimales trouvées, des gradients de concentration et de pH ont été effectués, et la méthode de cristallogenèse par diffusion en phase vapeur a été utilisée. Deux méthodes d'introduction de la solution de $BLG-L_5^2Fe^{II}$ ont été testées. La première est l'injection d'une solution de biohybride caractérisée par MALDI dans une goutte de solution cristallisante. La seconde est la formation du biohybride in situ dans la goutte de solution cristallisante par injection d'un mélange équimolaire de BLG et de complexe.

Par ces deux méthodes, différents types de cristaux ont été obtenus et les images enregistrés à l'aide d'un microscope sont présentées Figure 19.

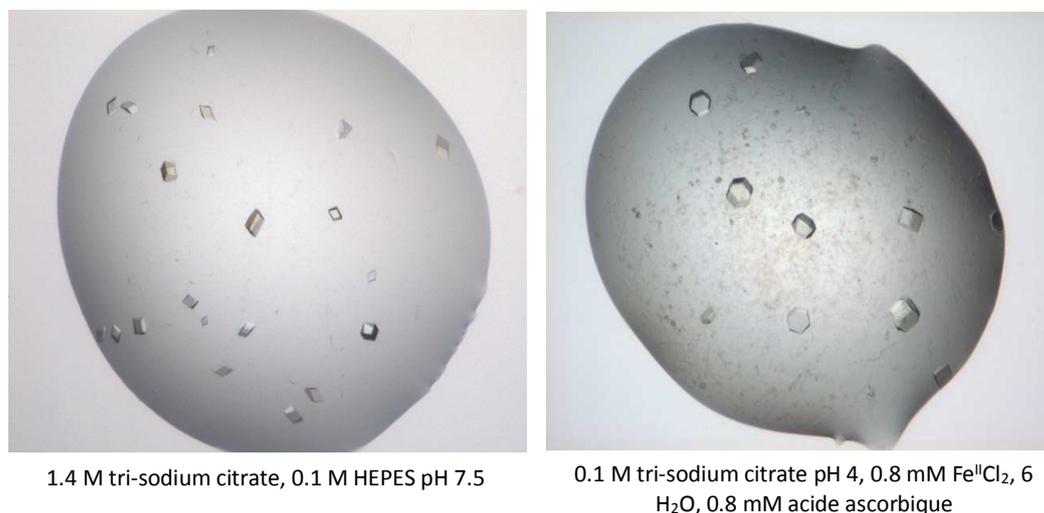


Figure 19 : Images de gouttes de solution cristallisante comportant des monocristaux de $BLG-L_5^2Fe^{II}$ et BLG.

Les cristaux ont été analysés sur synchrotron. Ils diffractent les rayons X, mais il n'est pas possible de résoudre les structures par remplacement moléculaire à partir des structures de BLG disponibles sur la PDB car les cristaux sont maclés.

2.2.4. Greffage unique et sélectif sur la cystéine 121 de la β -lactoglobuline

A ce stade, il est important de savoir si le complexe est bien greffé sur la cystéine 121. Une première étude par protéomique a été effectuée par Jean-Pierre Le Caer (laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN (Gif sur Yvette)). Les conditions sont en partie expérimentale.

Les résultats obtenus étaient difficilement interprétables et n'ont pas permis de mettre en évidence le site de greffage du complexe.

Une autre méthode a donc été mise en œuvre.

Yen et ses collaborateurs ont mis en avant que le couplage entre la β -lactoglobuline et le (+)-Biotinyl-3-maleimidopropionamidyl-3,6-dioxaoctanediamine (appelé dans la suite PEO-maléimide) (Figure 20) se fait covalamment et sélectivement sur la cystéine 121.¹⁴

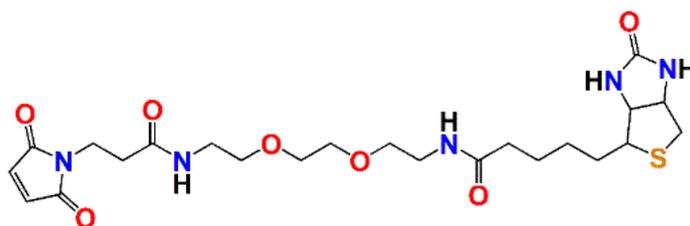
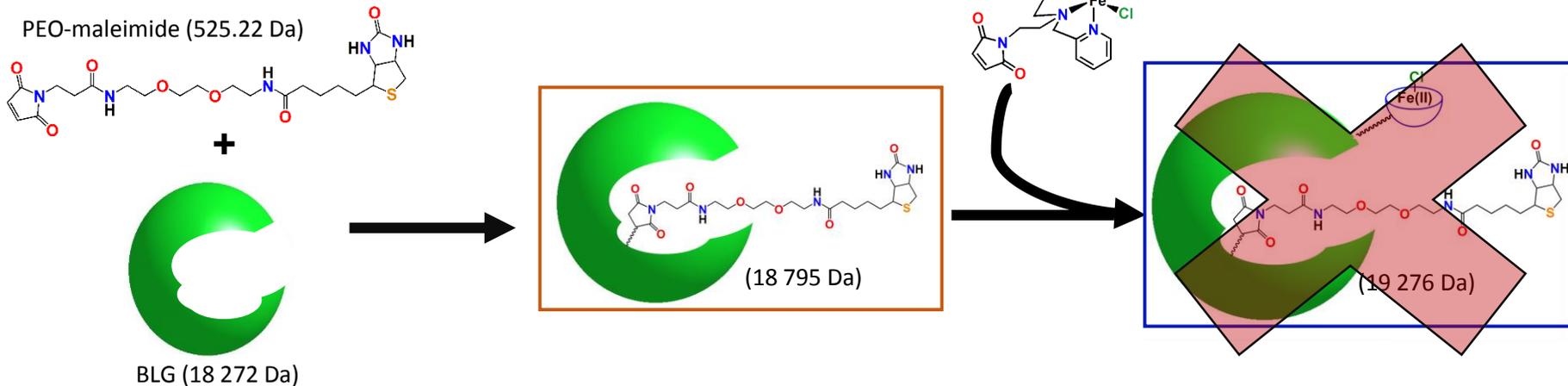


Figure 20: Schéma du PEO-maléimide.

Nous avons donc décidé de reproduire la même expérience entre la β -lactoglobuline et le PEO-maléimide puis d'ajouter le complexe $[(L_5^{\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ (Figure 21, voie A), le temps de réaction est de deux jours. Parallèlement, l'expérience inverse a été effectuée en ajoutant du PEO-maléimide sur $BLG-L_5^2Fe^{II}$ (Figure 21, voie B). Les échantillons obtenus ont été caractérisés par MALDI-TOF.

• Voie A



• Voie B

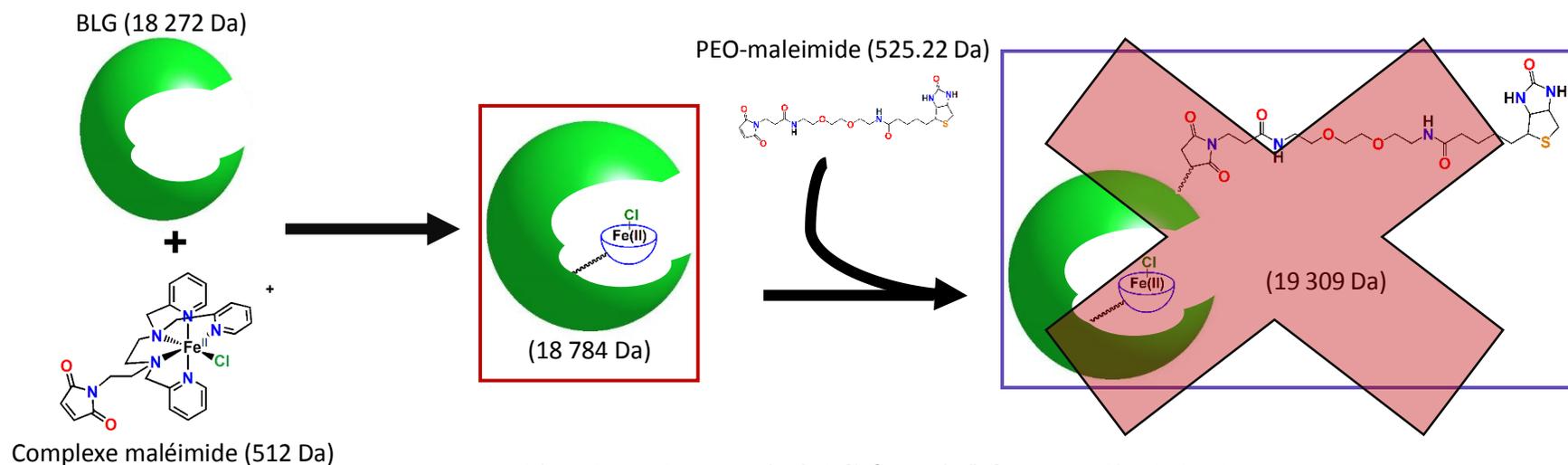


Figure 21: Schémas des couplages compétitifs de $[[L_5^2\text{maléimide}]Fe(II)Cl]^+$ et PEO-maléimide dans la BLG.

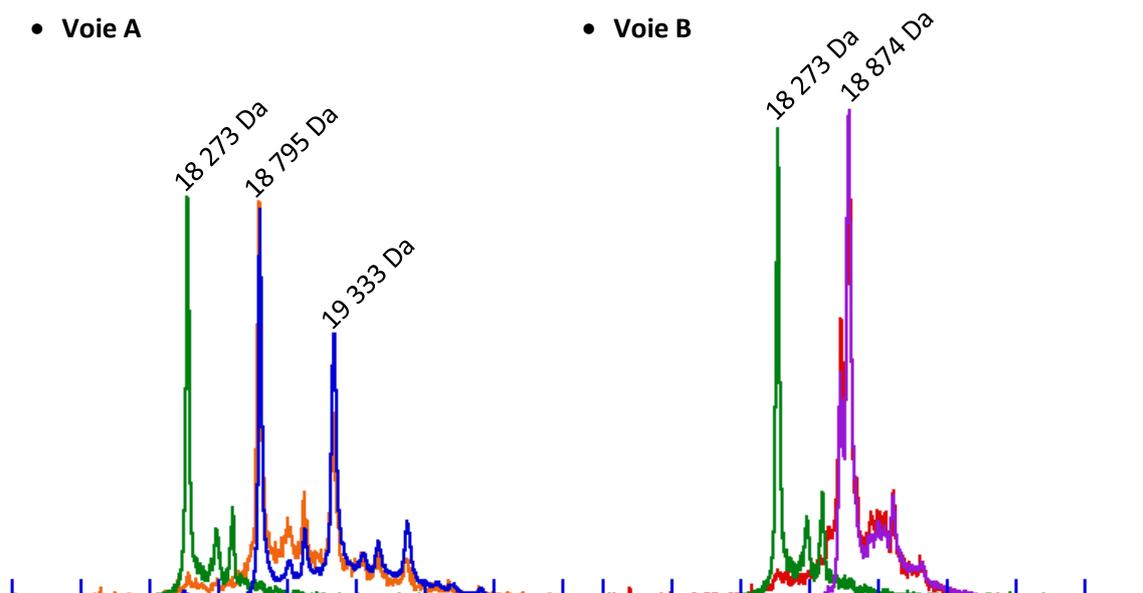


Figure 22: Spectres de masse intermédiaires et finaux des deux voies de vérification de couplage.

Pour la voie A, le spectre vert correspond à la β -lactoglobuline (variant B), le spectre orange correspond à l'espèce BLG-PEO (Figure 22), et le spectre bleu correspond à la solution contenant BLG-PEO à laquelle a été ajouté du complexe. Les spectres orange et bleu sont superposables, ce qui montre que lorsque la cystéine 121 est couplée avec le PEO-maléimide biotine, il n'est pas possible de faire un second couplage avec le complexe $[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$.

Pour la voie B, le spectre vert correspond à la β -lactoglobuline (variant B), le spectre rouge correspond au biohybride (BLG- L_5^2Fe), et le spectre violet correspond à la solution contenant le biohybride à laquelle a été ajouté du PEO-maléimide. Les spectres rouge et violet sont également exactement les mêmes, ce qui prouve que lorsque le complexe est couplé covalamment à la β -lactoglobuline, il n'est pas possible de coupler le PEO-maléimide. Par déduction, cela implique que le complexe $[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ est couplé sélectivement sur la cystéine 121 de la BLG.

Ainsi, les spectres de masse finaux montrent qu'un second couplage, pour les deux voies étudiées, n'est pas possible et ainsi, d'après les travaux de Yen,¹⁴ cela prouve que le couplage du complexe $[(L_5^{2\text{ maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ est unique et sélectif sur la cystéine 121 de la BLG.

2.2.5. Spectroscopie par absorption électronique UV-visible

Une technique d'analyse utilisée en routine au laboratoire est la spectroscopie d'absorption électronique UV-visible. La solution de biohybride a été également analysée par cette technique afin de pouvoir déterminer si le ligand chloro initialement lié au fer(II) est conservé dans l'hybride.

L'analyse par spectroscopie UV-visible en fonction du temps d'une solution contenant la β -lactoglobuline, un équivalent de complexe de fer(II) a été faite pendant 5 jours (Figure 23). La caractérisation par MALDI-OTF du mélange au bout de 5 jours confirme la formation quasiment quantitative de la métalloenzyme artificielle BLG- L_5^2Fe . Les spectres obtenus ont été comparés à des échantillons de référence comme indiqué dans le Tableau 8.

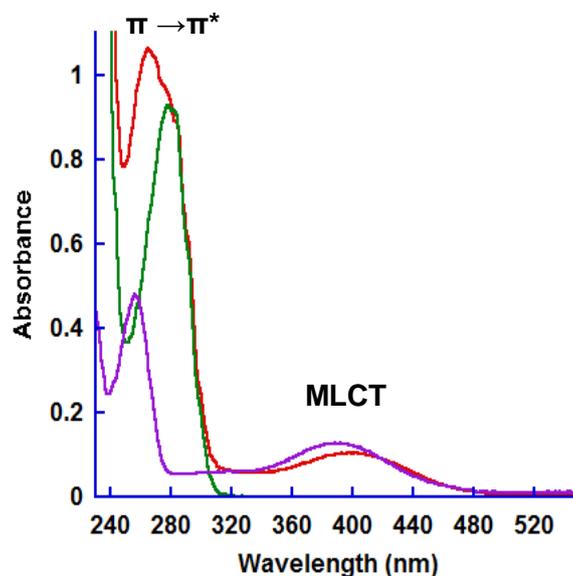


Figure 23: Spectres UV-visible de la BLG-B (50 μ M) en vert, du complexe (50 μ M) en violet, solution de biohybride après 5 jours de couplage en rouge, dans du tampon PBS 10 mM pH 7.4 + 20 % ACN.

Tableau 8: Concentration des différents échantillons analysés par spectroscopie UV-visible.

	Concentration dans l'échantillon analysé	Solvant
BLG-B	$5 \cdot 10^{-5}$ M	PBS 10 mM pH 7.4
$[(L_5^2 \text{ maléimide})Fe^{II}Cl](PF_6)$	$5 \cdot 10^{-5}$ M	PBS 10 mM pH 7.4 + 20% ACN
BLG-B	$5 \cdot 10^{-5}$ M	PBS 10 mM pH 7.4 + 20% ACN
$[(L_5^2 \text{ maléimide})Fe^{II}Cl](PF_6)$	$5 \cdot 10^{-5}$ M	
BLG- $L_5^2Fe^{II}$	$\approx 5 \cdot 10^{-5}$ M	PBS 10 mM pH 7.4 + 20% ACN

Le spectre du biohybride présente trois bandes d'absorption. Deux sont dans la gamme d'énergie de l'UV et une autre transition se situe vers 400 nm.

Par comparaison avec les réactifs (BLG et complexe), ces trois bandes peuvent être attribuées. La bande centrée à 280 nm sur le spectre de la BLG correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des tryptophanes et des tyrosines. En ce qui concerne le spectre du complexe, il présente une première bande centrée à 250 nm qui correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand.

La seconde bande à 396 nm correspond au transfert de charge de type **MLCT**. Le chlore reste lié au fer dans cette solution de tampon PBS avec 20 % d'acétonitrile.

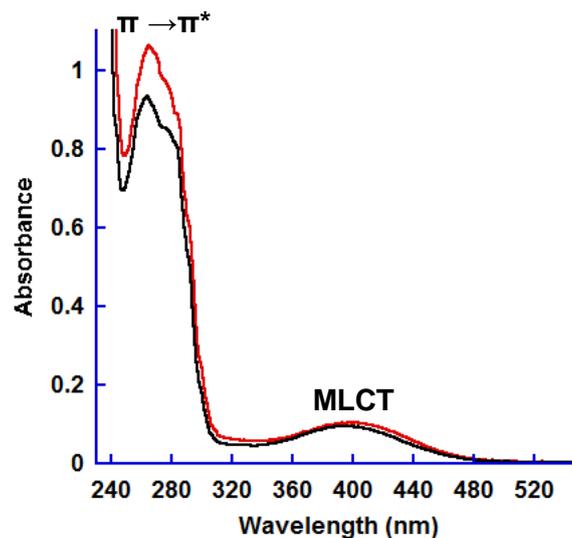


Figure 24: Spectre UV-visible du biohybride après 5 jours (en rouge) et de la solution contenant BLG-B (50 μ M) + complexe (50 μ M) ($t = 0$) (en noir), dans le tampon PBS 10 mM pH 7.4 + 20 % ACN.

Le spectre UV-vis du mélange 1 éq. de BLG-B et 1 éq. de complexe (courbe noire Figure 24) correspond à la solution à l'instant initial du couplage. Il présente une double bande entre 250 et 300 nm qui correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand et de la protéine. Ces bandes sont modifiées sur le spectre de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ (en rouge sur la Figure 24). L'intensité des transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ évoluant au cours du temps, suggère une modification de l'environnement du complexe. La bande à 400 nm est conservée et est de même intensité (Figure 24). Par comparaison avec le spectre du mélange en proportions stœchiométrique de protéine et de complexe de la Figure 24, l'intensité de la **MLCT** dans du BLG- $L_5^2Fe^{II}$ permet de penser que le chlorure est toujours lié au fer, en considérant que le coefficient d'extinction molaire est identique dans le complexe en solution et dans l'hybride. Par ailleurs, les spectres de la solution de biohybride et du mélange BLG/complexe (1:1) étant identiques, dans le BLG- $L_5^2Fe^{II}$, le complexe possède la même structure. Ces spectres UV-visible sont réutilisés dans la partie 2.3.3 pour la quantification de la solution par déconvolution des spectres.

Les différentes caractérisations de la solution par spectrométrie de masse MALDI-TOF et Orbitrap de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ obtenue montrent que le complexe est couplé covalamment à la protéine. Les tests de cristallisation de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ n'ont pas permis d'obtenir une structure. La réaction avec du PEO-maléimide a permis de montrer que le couplage entre le complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl]^+$ et la cystéine 121 est sélectif et unique. Pour finir, le suivi par spectroscopie UV-visible montre également que la structure du complexe greffé est identique à celle du complexe de départ.

2.3. Quantification du biohybride

Il est important de connaître la concentration en métalloenzyme artificielle des solutions de biohybride obtenues et plus précisément la concentration en complexe greffé au sein de la protéine, pour faire des tests de catalyse. Pour cela, plusieurs méthodes ont été mises en œuvre afin de déterminer soit la concentration en protéine dans l'échantillon (tests de Bradford et au Rose de Bengale), soit la concentration en fer(II) dans l'échantillon (déconvolution de spectres UV-visible, ICP et titration par spectroscopie UV-visible).

2.3.1. Test de Bradford

Le test de Bradford est basé sur l'interaction du bleu de Coomassie (Figure 25) avec des résidus d'acides aminés hydrophobes et basiques (arginine, lysine et histidine).^{15,16}

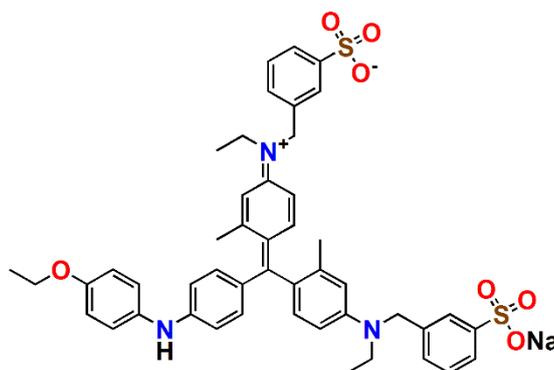


Figure 25: Bleu de Coomassie G-250.

Il faut dans un premier temps établir une gamme étalon, en β -lactoglobuline de faibles concentrations (0 à 10 $\mu\text{g/mL}$ - 0 à $5.5 \cdot 10^{-7}$ M) dans le tampon NBIC 10 mM pH 8. A ces solutions est ajoutée une solution saturée de bleu de Coomassie G-250. Les spectres UV-visible sont alors enregistrés (partie expérimentale).

La solution de biohybride est diluée de telle sorte à pouvoir effectuer deux mesures au sein de la gamme étalon. Ainsi, il a été possible de remonter à une concentration de la solution initiale de biohybride de 10 μM .

2.3.2. Dosage au Rose de Bengale

Un autre test protéique possible, est celui utilisé par Frédéric Oddon lors de sa thèse dans le laboratoire de Stéphane Ménage.¹⁷ La détermination de la concentration en protéine s'effectue par un dosage au Rose de Bengale (4, 5, 6, 7-tetrachloro-2',4',5',7'-tétraiodofluorescéine) (Figure 26) en prenant la β -lactoglobuline comme standard (partie expérimentale). Ce dosage est basé sur l'interaction entre le Rose de Bengale et les groupements $-\text{NH}_3^+$ de la BLG à pH acide.¹⁸

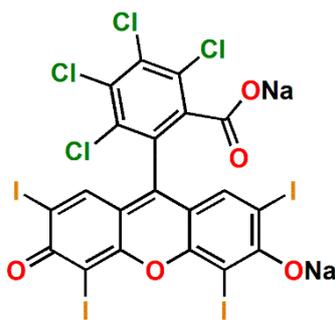


Figure 26: Schéma du Rose de Bengale.

Il faut également établir, dans un premier temps, une gamme étalon basée sur la BLG (0 à 2 mg/mL – 0 à $1.1 \cdot 10^{-4}$ M). Par cette méthode, la concentration en $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ est de l'ordre de 80 μM .

Il est à noter que les deux dosages basés sur des interactions protéine/sonde colorée, pour une même solution, donnent des concentrations en protéine déterminées avec un facteur 8 d'écart. D'autre part, le principe de ces dosages protéiques est basé sur des interactions entre certains acides aminés et le colorant. Ainsi, dans le cas du biohybride, il est possible que le greffage du complexe dans la protéine altère certaines interactions qui ont lieu avec la β -lactoglobuline pure.

2.3.3. Déconvolution

Il est possible d'utiliser la spectroscopie d'absorption électronique UV-visible pour déterminer une concentration en fer(II) de la solution de biohybride.

Dans la partie précédente, nous avons pu observer que la transition de type **MLCT** à 400 nm, est caractéristique du système Fe-Cl de par sa position et son intensité. Une déconvolution du spectre du biohybride à partir de ceux des systèmes initiaux devrait permettre de remonter à une concentration en fer(II) dans la solution de biohybride.

La méthode pour simuler le spectre du biohybride est la suivante ; étudier les spectres de la β -lactoglobuline et du complexe dans PBS + 20 % ACN (Figure 27), trouver les différentes transitions contribuant au spectre final. A partir de là, connaissant la concentration en chaque espèce mise en solution, il est possible de remonter à un coefficient d'extinction molaire pour les transitions **MLCT** et $\pi \rightarrow \pi^*$.

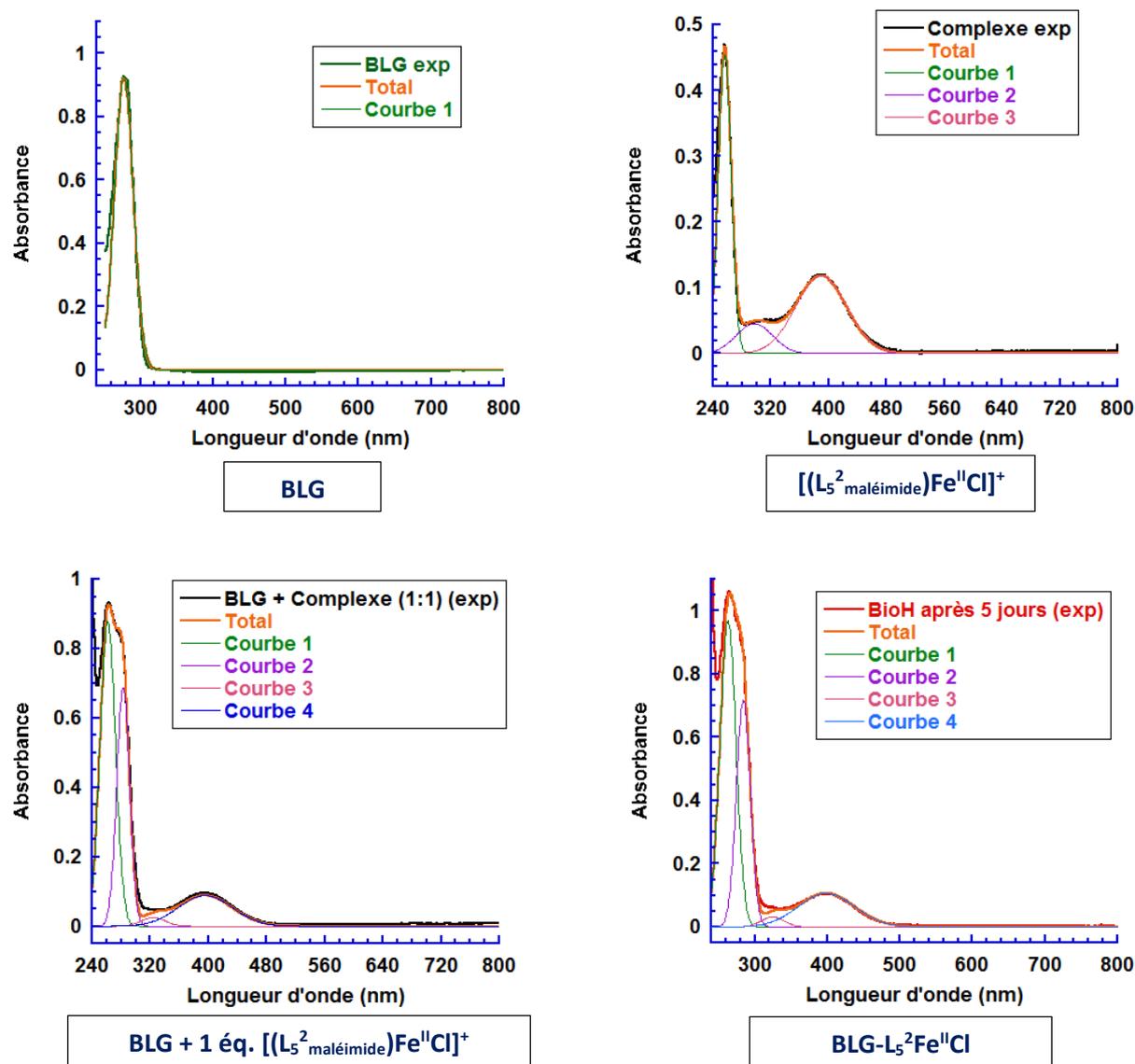


Figure 27: Spectres UV-vis de la BLG, du complexe [(L₅² maléimide)Fe^{II}Cl]⁺, du mélange 1 équ. BLG (5 10⁻⁵ M) + 1 équ. de complexe (5 10⁻⁵ M) et du biohybride après 5 jours de couplage, avec les déconvolutions.

Le spectre de la β -lactoglobuline dans le tampon PBS 10 mM pH 7.4 est composé d'une seule transition à 279 nm ($\epsilon_{\pi\pi^*} = 18\,500\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Le spectre du complexe [(L₅² maléimide)Fe^{II}Cl]⁺ dans le tampon PBS 10 mM pH 7.4 + 20 % ACN, est composé de trois transitions à 254 nm ($\epsilon_{\pi\pi^*} = 9\,320\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), 297 nm et 390 nm ($\epsilon_{\text{MLCT}} = 2\,340\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

Par comparaison, le spectre qui correspond à 1 équ. de β -lactoglobuline + 1 équ. de complexe [(L₅² maléimide)Fe^{II}Cl]⁺ dans le tampon PBS 10 mM pH 7.4 + 20 % ACN, est légèrement modifié. Il y a 4

transitions. Celles à 262 nm ($\epsilon_{\pi\pi^*} = 19\,220\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), 322 nm et 394 nm ($\epsilon_{\text{MLCT}} = 1\,900\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), proviennent du complexe, et une à 284 nm ($\epsilon_{\pi\pi^*} = 14\,220\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), correspond aux transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ de la β -lactoglobuline.

Le spectre du biohybride BLG- $\text{L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ et celui simulé à partir des 4 transitions de la β -lactoglobuline et du complexe maléimide se superposent. Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour le calcul de la concentration en fer(II) dans le biohybride est celui qui a été déterminé pour la solution contenant la BLG et le complexe ($1\,900\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). L'absorbance à 394 nm étant de 0.1057, la concentration estimée en BLG- $\text{L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ est de 56 μM .

La concentration en fer déterminée par cette méthode est différente de celle initialement introduite ($5.6 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ pour $5.0 \cdot 10^{-5}\text{ M}$). L'erreur est de 10 %, ce qui est assez satisfaisant. Cette différence peut être due à une modification du coefficient d'extinction molaire des MLCT dans la BLG par rapport au complexe dans le tampon, et à des modifications mineures du complexe (changement de ligand exogène, oxydation du Fer(II) en Fer(III)). D'autre part, la bande à 390 nm varie d'un biohybride à l'autre, et n'est pas toujours aussi bien définie. Par conséquent, d'autres méthodes ont été testées pour tenter d'améliorer la fiabilité des résultats.

2.3.4. Spectrométrie d'absorption atomique

Une autre possibilité est de doser directement le fer présent en solution par spectrométrie d'absorption atomique (ICP).

Cette technique d'analyse nécessite l'établissement d'une courbe d'étalonnage de solutions composées de la BLG, du complexe $[(\text{mL}_5^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$, et du tampon NBIC 10 mM pH 8 (Figure 28).

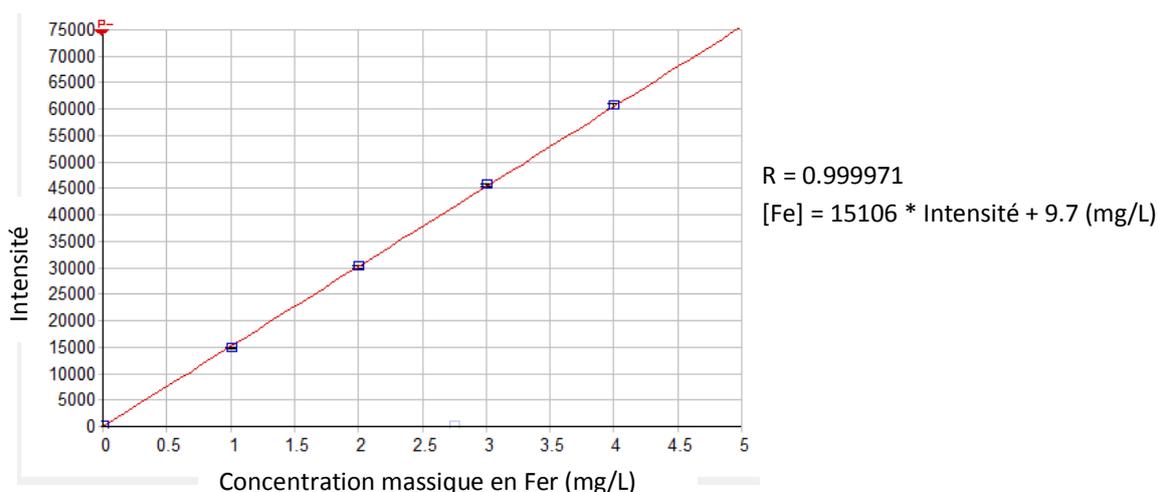


Figure 28: Courbe d'étalonnage établie pour différentes concentrations d'un mélange de complexe $[(\text{mL}_5^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$ / BLG.

La courbe d'étalonnage obtenue a permis de déterminer une concentration en fer dans une solution de BLG-L₅²Fe^{II} (différente de celle analysé au point 2.3.3.) de 3.7 mg/L, soit 67 µM.

Néanmoins, cette technique demande une grande quantité en protéine que ce soit pour l'établissement de la courbe d'étalonnage ou pour la solution de biohybride à doser (prévoir 100 mg de BLG), ce qui n'est pas envisageable comme technique de routine pour déterminer la concentration en fer de la solution. De plus, cette technique n'est pas spécifique du Fe(II) coordiné dans la protéine, car lors de la mesure tout le fer présent dans la solution est dosé (Fe(II), Fe(III), ...).

Pour cela, une nouvelle méthode de dosage du fer(II) dans la solution de biohybride a été mise au point.

2.3.5. Titration du fer(II) par les ions cyanure

Les méthodes de dosage de protéine que nous avons précédemment utilisées sont peu fiables car elles ne sont pas spécifiques de la β-lactoglobuline. L'ICP est une technique assez lourde et coûteuse en BLG-L₅²Fe^{II}, ainsi nous avons mis au point une dernière méthode simple et accessible et beaucoup plus économe en BLG-L₅²Fe^{II}.

Elle est basée sur des principes de chimie inorganique et de modification de l'intensité de la MLCT en fonction de l'état de spin du complexe résumé dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Propriétés physiques des complexes haut spin et bas spin de fer(II).

Complexe de fer(II)	Champ de force du ligand	Qualité du recouvrement M-L	Longueur des liaisons	Intensité de la bande MLCT
Haut spin	faible	faible	≈ 2.2 Å	1 000-2 000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Bas spin	fort	fort	≈ 2 Å	8 000-10 000 M ⁻¹ cm ⁻¹

Dans le biohybride, l'ion chlorure est coordiné au fer(II), le complexe est haut spin (**S = 2**). Si l'ion chlorure est substitué par un ligand à champs fort, le fer(II) doit passer à un état bas spin (**S = 0**) et cela devrait se traduire par une augmentation de l'intensité de la bande de transfert de charges **MLCT**, ce qui devrait permettre une plus grande précision pour la détermination de la concentration en fer(II) dans la solution de BLG-L₅²Fe^{II}.

Pour cela, plusieurs ligands à champs forts ont été testés : $\text{CO}_{(g)}$ **(a)**, imidazole **(b)**, N-méthylimidazole **(c)**, ion cyanure **(d)** (Figure 29). Les tests ont été effectués sur le complexe $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl})]^+$. A l'exception de l'ion cyanure, l'ajout de ces ligands dans la solution n'a conduit qu'à de faibles variations sur le spectre UV-visible du complexe.



Figure 29: Schéma des différents ligands à champs fort testés.

Le seul résultat intéressant a été observé avec les ions cyanures. Pour travailler avec les sels de cyanure, différentes précautions ont dû être prises ; en effet, le pH de la solution tampon est de 8 et le pKa du couple HCN/CN^- est 9.2. Ainsi, à pH 8, il y a un risque de former de l'acide cyanidrique. Les tests ont été effectués sous sorbonne, et toute la verrerie a été lavée avec une solution d'eau de javel.

A ma connaissance, dans la littérature, un seul complexe de type $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN}))](\text{PF}_6)$ a été rapporté.¹⁹ Ce complexe a été obtenu par cristallisation dans un mélange acétone/méthanol. Ainsi, j'ai tenté d'obtenir ce complexe de façon à connaître le coefficient d'extinction molaire de l'espèce Fe-CN dans différents tampons. Cependant, tous les essais pour isoler le complexe $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN}))](\text{PF}_6)$ ont été vains. A chaque évaporation des solvants un changement de la couleur de la poudre du marron-rouge au bleu-vert est observé. Ceci est vraisemblablement dû à des dimères pontés par des cyanures qui se forment.

Face à ces échecs, une autre méthode a été développée, celle de partir du complexe Fe-Cl et d'étudier directement en solution l'effet d'ions CN^- sur le complexe (Figure 30). Pour cela, le complexe modèle $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl})](\text{PF}_6)$ a été utilisé car il ne présente pas de fonction maléimide susceptible de réagir avec les cyanures en raison de sa très grande réactivité vis-à-vis des nucléophiles.

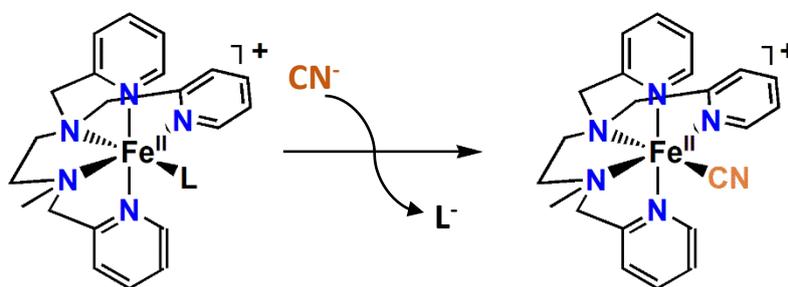


Figure 30: Schéma bilan de l'ajout d'ions cyanure sur le complexe $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L})]^+$ (où $L = \text{Cl}^-$ ou HO^-) conduisant à la formation du complexe $[(L_5^{\text{maléimide}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN})]^+$.

Le suivi de l'ajout de petites fractions de CN^- a été effectué par voltamétrie cyclique (Figure 31) et par spectroscopie UV-visible (Figure 32).

L'espèce $[(mL_5^2)Fe^{II}Cl]^+$ est caractérisée par un $E_{1/2} = 0.10$ V/ECS, $\Delta E = 151$ mV, dans le tampon NBIC 10 mM pH 8. D'après Herrero et al., l'ion chlorure est probablement substitué par HO^- dans le tampon.¹³ L'ajout de CN^- par fraction de 0.25 éq. conduit à la diminution puis à la disparition de la vague à $E_{1/2} = 0.1$ V. D'autre part, une nouvelle vague apparaît à $E_{1/2} = 0.51$ V/ECS, $\Delta E = 120$ mV, dès l'ajout de 0.25 éq. de CN^- .

Lorsque 1.05 éq. de CN^- a été ajouté, cette vague n'évolue plus et correspond à la disparition de la vague correspondant à $Fe-OH$. Il y a un déplacement d'équilibre en faveur de l'espèce $Fe-CN$.

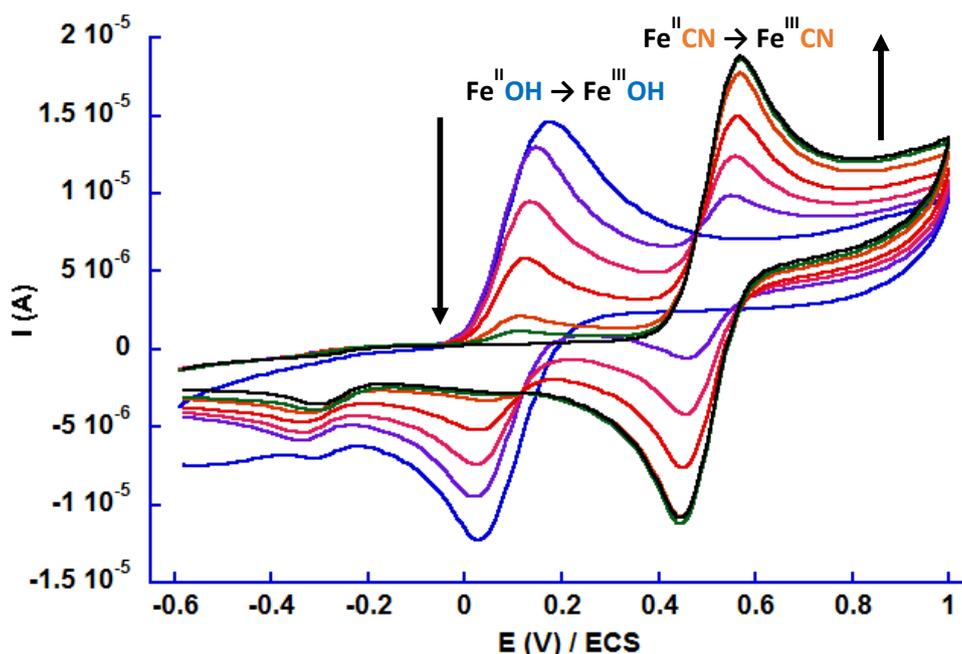


Figure 31: Suivi par voltamétrie cyclique de l'ajout d'ions cyanure sur le complexe $[(mL_5^2(OH))]^+$ (en bleu) conduisant à la formation du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$ (en vert) dans le tampon NBIC 10 mM pH 8, 100 mV/s. Absence de CN^- en bleu, 0.25 éq CN^- en violet, 0.50 éq. CN^- en rose, 0.75 éq. CN^- en rouge, 1.0 éq. CN^- en orange, 1.05 éq. CN^- en vert, 1.1 éq. CN^- en noir.

L'étude de l'évolution de l'aire de la vague $Fe^{II}X \rightarrow Fe^{III}X$ permet d'observer que la réaction de formation de l'espèce $Fe-CN$ est bien totale suite à l'ajout de CN^- (Figure 32).

Lorsque 0.55 équivalent de CN^- a été ajouté, les deux courbes se croisent. Cela prouve qu'il y a bien apparition concomitante d'une unique autre espèce, le complexe $[(mL_5^2)Fe^{III}CN]^+$.

D'autre part, il est important de noter que les espèces $[(mL_5^2)Fe^{II}OH]^+$ et $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$ ont une même charge globale qui est de +1. Dans le cas du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}OH]^+$, le fer(II) est haut spin ($S = 2$), et le potentiel anodique est 0.17 V/ECS ; cette valeur est inférieure à celle du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$, qui possède un fer(II) bas spin ($S = 0$), avec un potentiel anodique de 0.57 V/ECS. La différence de potentiel pour ces deux espèces peut se justifier par l'état de spin du fer(II) qui est différent dans les deux complexes.

Ainsi, lorsque le complexe est haut spin ($S = 2$), il est moins stable qu'un complexe bas spin ($S = 0$), ce qui se traduit par un potentiel d'oxydation plus faible. Cette stabilité du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$, se traduit aussi par une absence de réactivité vis-à-vis de l'eau oxygénée.

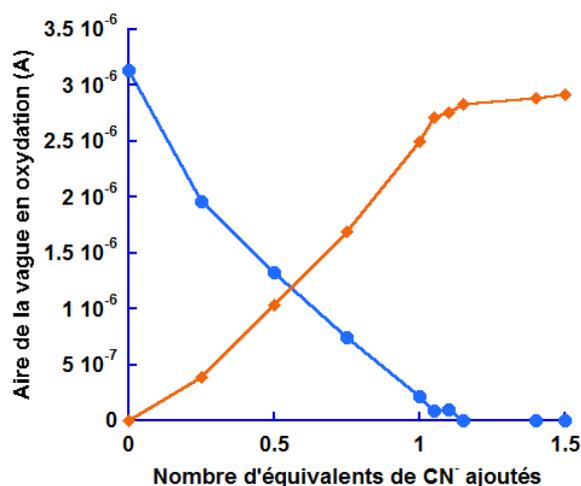


Figure 32: Evolution des aires des vagues d'oxydation des complexes $[(L_5^2)Fe^{II}(OH)]^+$ (bleu) et $[(L_5^2)Fe^{II}(CN)]^+$ (orange) suite à l'ajout de CN^- .

En parallèle, l'évolution a été suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible (Figure 33). Comme attendu, l'ajout d'ions cyanure conduit à une augmentation de l'intensité de la bande **MLCT**. Ce résultat est en accord avec les travaux de Ortega-Villar publiés en 2007,¹⁹ le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN](PF_6)$ dissout dans l'acétonitrile présente une bande de transfert de charge **MLCT** à 443 nm alors que le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}Cl](PF_6)$ dissout également dans l'acétonitrile présente une bande de transfert de charge **MLCT** à 400 nm. Dans le tampon NBIC 10 mM, pH 8, le complexe est sous la forme $[(mL_5^2)Fe^{II}(OH)]^+$, la bande de transfert de charge **MLCT** est déplacée vers les hautes énergies à 370 nm.

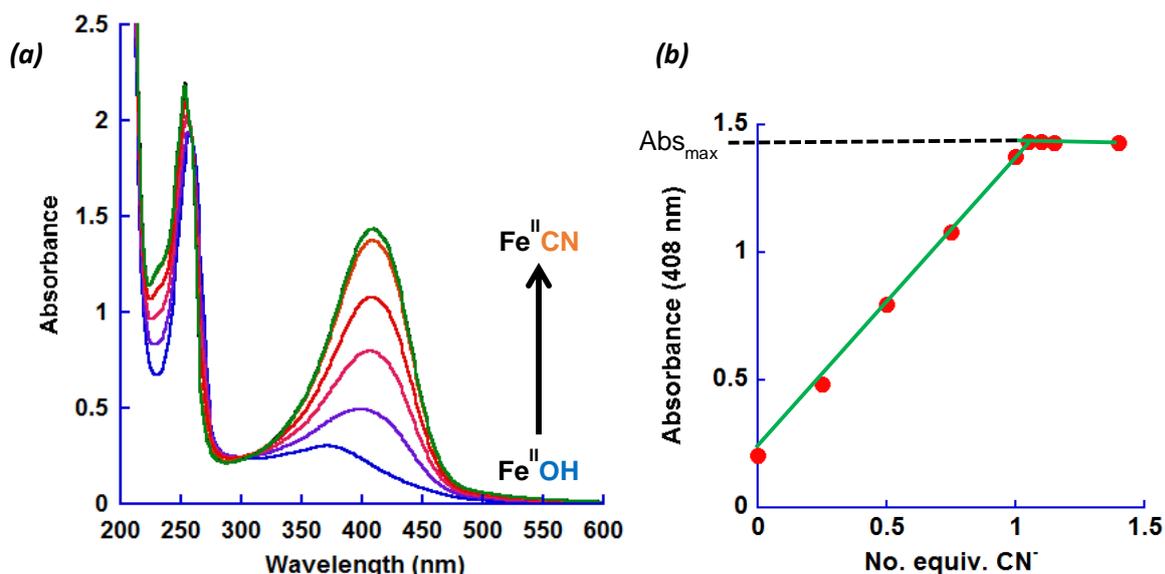


Figure 33: (a) Suivi par spectroscopie d'absorption électronique UV-visible de l'ajout de CN^- sur le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}(OH)]^+$; (b) Evolution de l'absorbance à 408 nm pendant l'ajout de CN^- sur le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}(OH)]^+$ (NBIC 10 mM pH8). Absence de CN^- en bleu, 0.25 éq CN^- en violet, 0.50 éq. CN^- en rose, 0.75 éq. CN^- en rouge, 1.0 éq. CN^- en orange, 1.05 éq. CN^- en vert.

Sur la Figure 33 (b), la lecture au maximum d'absorbance permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$ dans le tampon NBIC 10 mM pH 8 car la concentration en fer(II) initiale est connue. Cette étude a été effectuée dans différents solvants et tampons (Tableau 10) et les résultats sont similaires.

Tableau 10: Coefficient d'extinction molaire de l'espèce $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$ dans différents solvants et tampons.

$[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)
Acétonitrile	12 295
NBIC 10 mM pH 8	7 200
PBS 0.1 mM pH 7.4	6 300
HEPES 50 mM pH 8	7 090

Si nous faisons l'approximation que le coefficient d'extinction molaire du complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}CN]^+$ est le même en solution et dans le biohybride pour un tampon donné, la reproduction de la même expérience avec le biohybride va nous permettre de connaître sa concentration en fer(II).

L'addition de CN^- sur la BLG en solution dans le même tampon ne conduit à aucune modification sur le spectre UV-visible.

A une solution diluée de $BLG-L_5^2Fe^{II}$ dans du tampon NBIC 10 mM pH 8, des quantités croissantes de cyanure sont ajoutées (Figure 34).

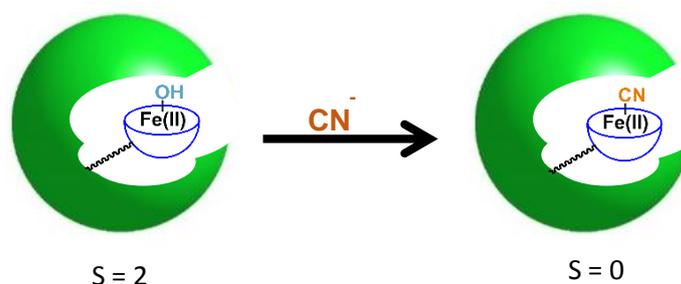


Figure 34: Schéma de la réaction du biohybride avec l'ion cyanure.

Comme observé pour le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}L]^+$, l'ajout de CN^- conduit à l'augmentation de l'intensité de la bande de transfert de charge de type **MLCT** à 412 nm (Figure 35). Cependant, l'allure de la courbe d'évolution de l'absorbance en fonction de l'ajout de CN^- est différente de celle observée dans le cas du complexe seul en solution puisqu'elle présente une allure caractéristique d'une courbe de saturation. Cela montre dans un premier temps, que la réactivité du fer(II) dans le biohybride est différente du complexe en solution, et dans un second temps, que la réaction est équilibrée. Précédemment pour le complexe en solution dans le même tampon, la réaction était quantitative (Figure 33 (b)).

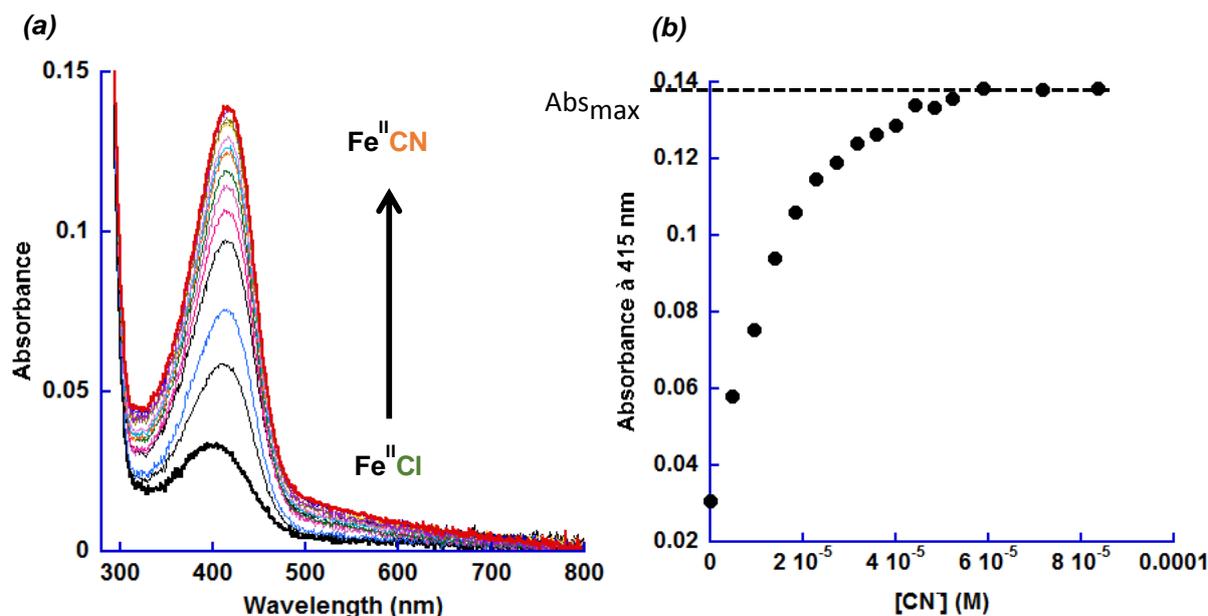


Figure 35: (a) Suivi par absorption UV-visible de l'ajout de CN^- sur le biohybride ; (b) Evolution de l'absorbance à 412 nm (HEPES 50 mM pH 8).

Ainsi, le dosage est terminé lorsque l'ajout de CN^- ne conduit plus à l'augmentation de la bande **MLCT**. La lecture du maximum d'absorbance permet de déterminer la concentration de la solution en fer(II) par application de la loi de Beer-Lambert, en utilisant les valeurs du Tableau 10. Pour cette solution, la concentration en fer(II) est de $2.4 \cdot 10^{-5}$ M. Cette expérience a été reproduite dans les tampons PBS 0.1 mM pH 7.4 et NBIC 10 mM pH 8, et les mêmes allures ont été observées. Les concentrations déterminées sont identiques (partie expérimentale).

La concentration en fer(II) de chaque solution de biohybride a été déterminée par cette nouvelle méthode de titration. D'autre part, par le biais de cette expérience, nous savons que le fer(II) dans le biohybride est accessible car il y a une variation de la **MLCT** lors de l'ajout d'ions cyanure. Par ailleurs, la substitution du ligand exogène initial (Cl^- ou OH^-) par CN^- est équilibrée, ce qui montre que le complexe est bien localisé dans la protéine. De plus, cette méthode de dosage du fer(II) semble plus précise que les méthodes de dosages protéiques car les systèmes sonde colorée/protéine sont peu stables, et sont également sensibles à la présence d'ions métalliques en solution.

3. Réactivité du biohybride

La nouvelle métalloenzyme artificielle BLG-L₅²Fe^{II} a été caractérisée et la concentration en catalyseur (fer(II)) a été déterminée. Une première étude sur la génération d'intermédiaires réactionnels a été effectuée ainsi que des tests en catalyse d'oxydation.

3.1. Génération d'intermédiaires réactionnels

Pour comprendre la réactivité de BLG-L₅²Fe^{II} en catalyse d'oxydation par H₂O₂, la réaction du biohybride avec cet oxydant a été étudiée de manière à identifier d'éventuels intermédiaires réactionnels.

Une solution de BLG-L₅²Fe^{II} a été préparée à une concentration de 400 μM (≈ 10 mg/mL) soit environ 10 fois plus concentré que pour la catalyse (cf. paragraphe suivant). Les conditions de réaction sont les suivantes : 1 éq. de BLG-L₅²Fe^{II} (HEPES 50 mM pH8) + 100 éq. de H₂O₂ dans l'acétonitrile, ajouté en une seule fois. Ces conditions sont a priori favorables pour accumuler des espèces instables.

L'addition de 100 éq. de H₂O₂ sur la solution de biohybride conduit à la disparition de la MLCT à 400 nm, et à l'apparition d'une bande large centrée vers 660 nm (spectre rouge, Figure 36 (a)). Cette espèce se dégrade ensuite pour conduire à une espèce qui absorbe vers 500 nm (Figure 36 (b)), et qui évolue ensuite lentement. L'absence de point isobestique reflète l'instabilité du chromophore absorbant à 660 nm pour lequel le maximum d'absorbance est atteint au bout de 3 minutes.

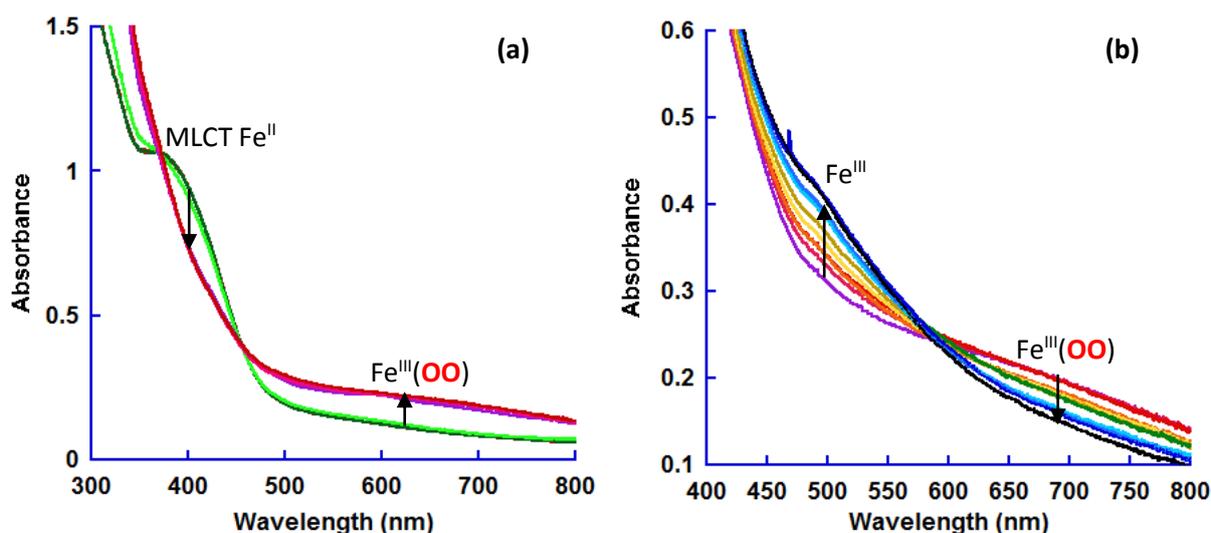


Figure 36: Suivi par absorption électronique UV-visible de l'ajout de 100 éq. de H₂O₂ sur le BLG-L₅²Fe^{II} (courbe verte (a)) dans le tampon HEPES 50 mM pH8 (20 % ACN) à température ambiante.

Les cinétiques d'évolution de ces deux espèces intermédiaires sont présentées Figure 37.

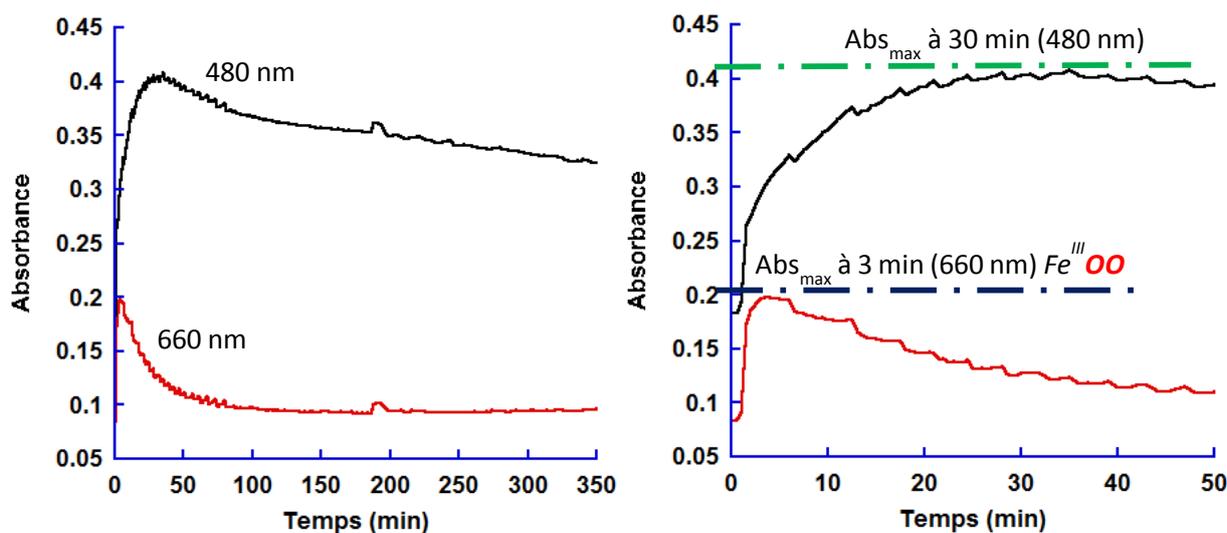


Figure 37: Cinétique de dégradation des intermédiaires réactionnels suite à l'ajout de 100 éq. de H_2O_2 sur BLG- $L_5^2Fe^{II}$.

Après 12 heures, 0.5 éq. de dithionite de sodium a été ajouté sur la solution dont l'évolution a été suivie par spectroscopie UV-visible. Le fer(III) réduit en fer(II) dans la métalloenzyme artificielle a ensuite été dosé par spectroscopie UV-visible par ajout de CN^- (Figure 38). La transition MLCT caractéristique du complexe $LFe^{II}CN$ est observée à 412 nm avec une intensité correspondant à 35 % du complexe initial BLG- $L_5^2Fe^{II}$, mettant en avant une dégradation vraisemblable de la métalloenzyme artificielle.

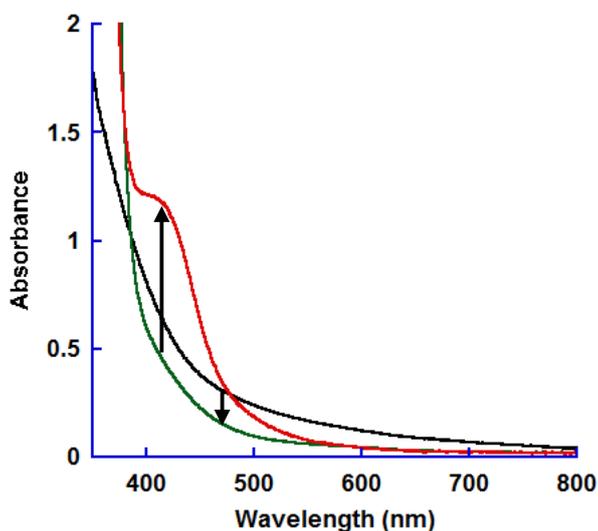


Figure 38 : Spectres UV-visible de la solution 12 h après la réaction de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ et H_2O_2 (noir), après addition de 0.5 éq. de $Na_2S_2O_4$ par rapport à la quantité initiale de biohybride (vert) et après titration du $Fe(II)$ présent par ajout de CN^- (rouge).

Un échantillon de la solution a été prélevé au bout de 2 minutes de réaction de BLG- $L_5^2Fe^{II}$ et H_2O_2 pour tenter d'identifier l'espèce très instable absorbant à 660 nm. Cet échantillon a été analysé par

RPE à 10 K. Le spectre RPE présente une résonance à $g = 4.3$ caractéristique d'un Fe(III) rhombique haut spin ($S = 5/2$), et des signaux autour de $g = 2$ (Figure 39).

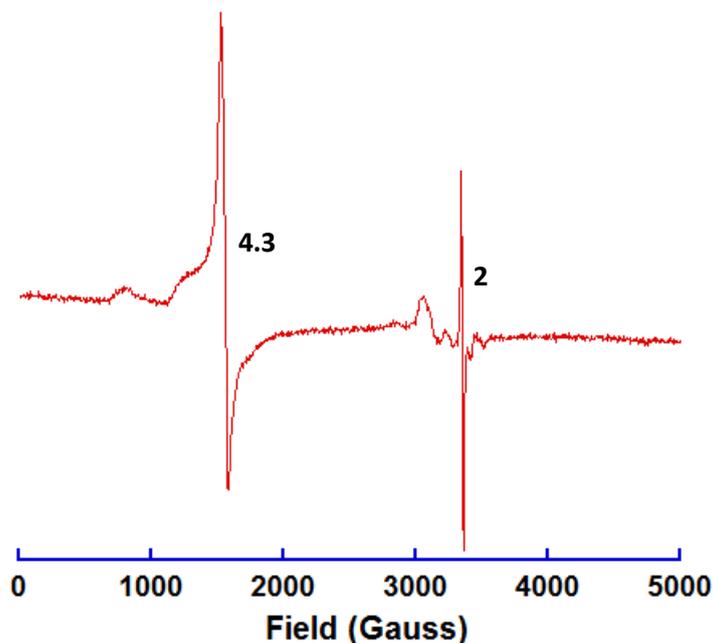


Figure 39 : Spectre RPE du chromophore absorbant à 660 nm (10 K).

Un zoom sur la zone de $g = 2$ révèle la présence d'une fine résonance à $g = 2.001$, qui est caractéristique d'un radical organique, et des signaux à g_1 2.19 ; g_2 2.15 et g_3 1.97, qui correspondent à un complexe bas spin ($S = 1/2$). Lorsque le tube est dégelé 5, 10, 20, 30, 40 et 60 minutes à température ambiante, les résonances autour de $g = 2$ disparaissent progressivement, tandis que la résonance à $g = 4.3$ persiste. D'autre part, le complexe bas spin aux résonances g_1 2.19 ; g_2 2.15 et g_3 1.97, présente la durée de vie la plus courte (Figure 40).

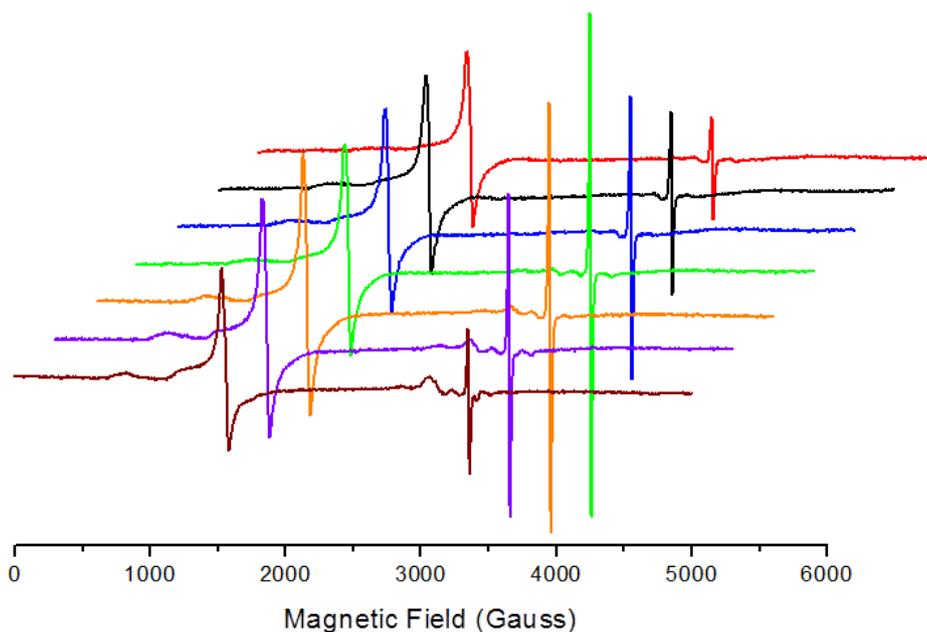


Figure 40: Evolution temporelle par RPE de la solution de BLG-L₃₂Fe^{II} avec H₂O₂. Le temps de réaction augmente du spectre marron en bas, au spectre rouge en haut.

Les expériences de contrôle sur une solution de 1 éq. de protéine BLG et 100 éq. de H₂O₂ n'ont présenté aucun signal par RPE, la présence du complexe de fer dans la protéine est nécessaire pour l'activation de H₂O₂ et l'observation de ces signaux.

Les résonances associées au complexe de Fe^{III} bas spin sont caractéristiques d'un intermédiaire réactionnel non hémique Fe^{III}(OOH).^{12,20} Ces complexes sont aussi caractérisés par une bande de transfert de charge à 530 nm,²¹ qui n'est pas observé lors des premières minutes de la réaction (Figure 36). Au contraire, l'espèce prélevée à t = 2 minutes est caractérisée par une bande d'absorption à 660 nm, qui rappelle les complexes Fe^{III}(η²-O₂) haut spin. Ces intermédiaires sont générés classiquement par déprotonation du complexe Fe^{III}(OOH) suivant un équilibre acido-basique dépendant du pKa de la base utilisée et de la température.²² Il a été montré que plus le pKa de la base est élevé, moins il est nécessaire d'ajouter de base. De plus, la forme protonée Fe^{III}(OOH) est prédominante à basse température.²²

Prenant en compte à présent que l'étude par spectroscopie UV-visible est effectuée à température ambiante, que l'expérience de RPE est menée à 10 K et le fait que l'instabilité du chromophore à 660 nm est associée à la disparition rapide des résonances à g₁ 2.19, g₂ 2.15 et g₃ 1.97, nous pouvons proposer que l'intermédiaire haut spin Fe^{III}(η²-O₂) est formé au sein de la BLG-L₅²Fe^{III} après réaction avec H₂O₂.

Cette proposition est résumée Figure 41.

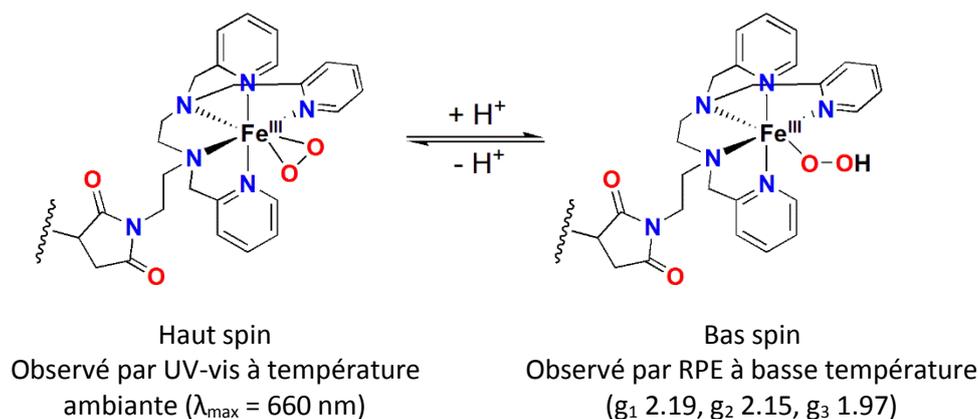


Figure 41 : Equilibre chimique entre les intermédiaires BLG- L₅²Fe^{III}(η²-O₂) et BLG-L₅²Fe^{III}(OOH). La dépendance en température de cet équilibre et les caractéristiques spectroscopiques sont également indiquées.

Cette hypothèse est renforcée par l'étude de la réaction du complexe [(L₅²)Fe^{II}Cl]⁺ avec un excès de H₂O₂ qui conduit à la formation d'un intermédiaire caractérisé par une bande d'absorbance à 710 nm à température ambiante, et dont le spectre RPE à 10 K présente des résonances à g₁ 2.21 ; g₂ 2.16

et g_3 1.97 (Figure 42). Cela peut être attribué sans ambiguïté au complexe haut spin $[(L_5^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ et au complexe bas spin $[(L_5^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$, respectivement.^{20,23}

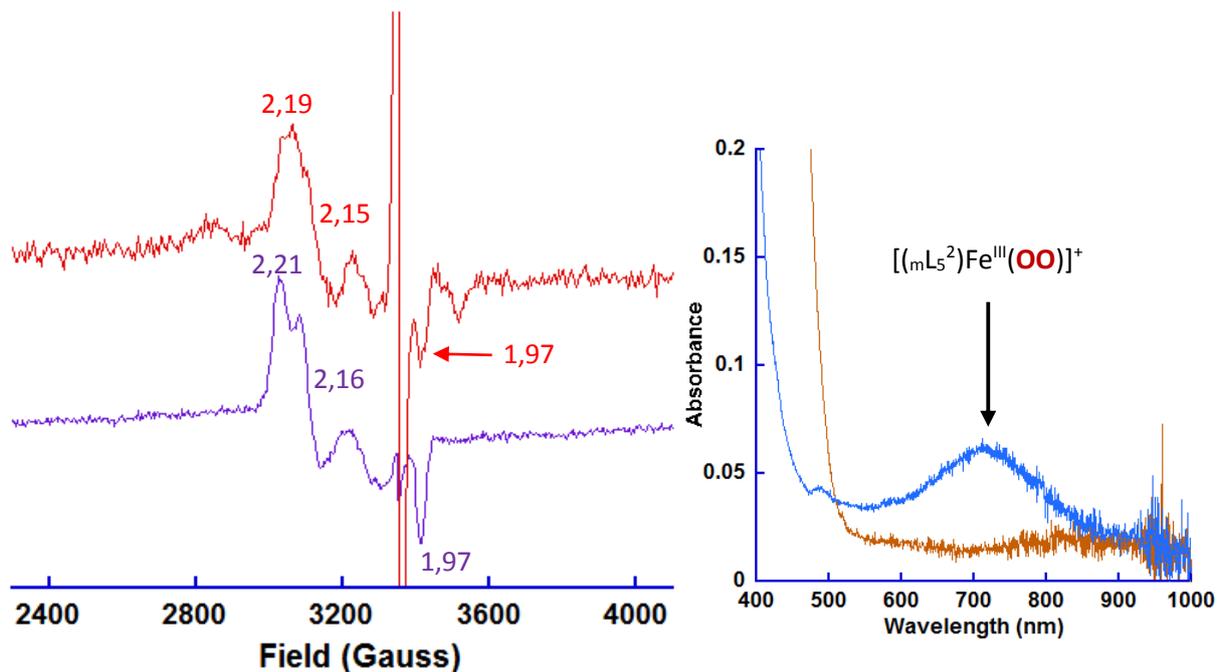


Figure 42: **A gauche** : spectres RPE des intermédiaires réactionnels BLG- $L_5^2Fe^{III}(OOH)$ (HEPES 50 mM pH8) (rouge) et $[(mL_5^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$ (PBS 0.1 M pH 7.4) (violet) enregistrés à 10 K. **A droite** : Spectres UV-visible $[(mL_5^2)Fe^{III}Cl]^+$ avant (orange) et après ajout de 30 éq. de H_2O_2 (bleu) (PBS 0.1 M pH 7.4).

La réaction entre la métalloenzyme artificielle et H_2O_2 permet de générer un intermédiaire BLG- $L_5^2Fe(\eta^2-O_2)$ haut spin. A ma connaissance, c'est seulement la seconde fois qu'un intermédiaire réactionnel est identifié dans une métalloenzyme artificielle.²⁴

3.2. Catalyse d'oxydation du thioanisole

Pour vérifier dans un premier temps que le complexe est toujours actif dans le biohybride, des tests de catalyse de sulfoxydation ont été réalisés. Tous les tests de catalyse ont été effectués sous air et à température ambiante, sauf cas mentionnés.

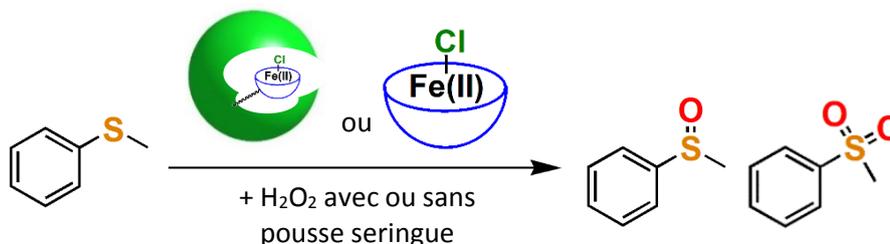


Figure 43: Schéma bilan des tests de catalyse de sulfoxydation par le complexe $[(mL_5^2)Fe^{II}Cl](PF_6)$ et le biohybride.

Les proportions en catalyseur, thioanisole et eau oxygénée sont de 1 : 1 000 : 60 équivalents. L'influence du pH a été testée en effectuant des catalyses à 3 pH différents : 5.5, 6.8 et 8.0. L'ajout de l'oxydant a été effectué sans ou avec pousse seringue (45 min). Dans tous les cas, un seul produit est observé, le phénylméthylsulfoxyde. Les conditions et résultats sont présentés Tableau 11 et Figure 44 respectivement.

Tableau 11 : Conditions de catalyse pour 1 000 éq. de thioanisole par rapport au catalyseur.

Entrée	Catalyseur	Pousse seringue	H ₂ O ₂	Tampon
1	BLG-L ₅ ² Fe ^{II}	Non	60 éq.	HEPES 50 mM pH 8
2	BLG-L ₅ ² Fe ^{II}	Non	60 éq.	HEPES 50 mM pH 6.8
3	BLG-L ₅ ² Fe ^{II}	Non	60 éq.	MES 50 mM pH 5.5
4	[(mL ₅ ²)Fe ^{II} Cl](PF ₆)	Oui (45 min)	100 éq.	HEPES 50 mM pH 8
5	BLG-L ₅ ² Fe ^{II}	Oui (45 min)	100 éq.	HEPES 50 mM pH 8

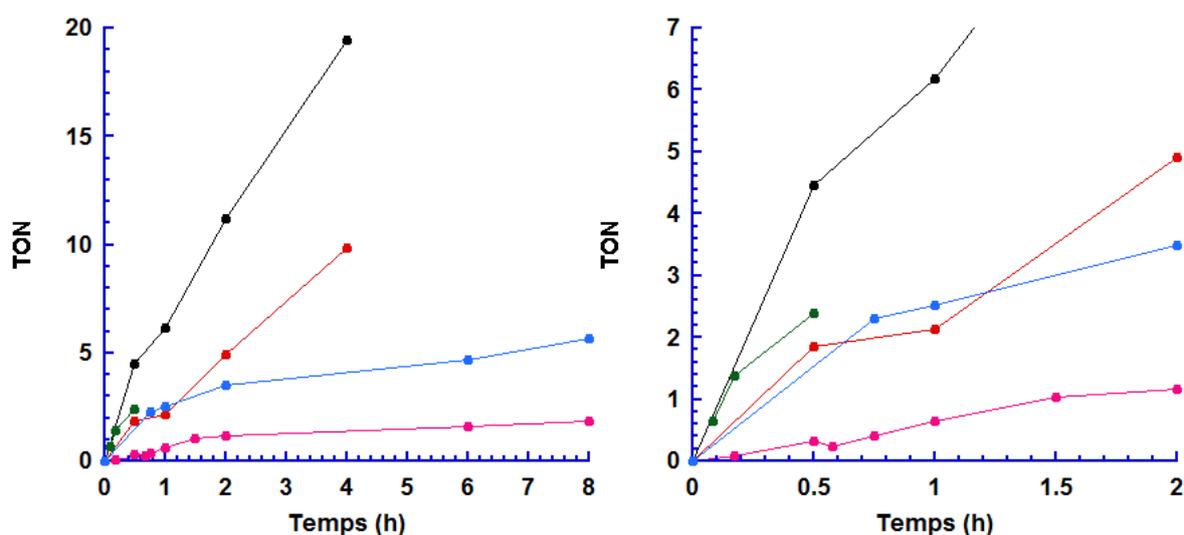


Figure 44 : Evolution du TON en fonction du temps (heures). Courbe noire: BioH, pH 8, sans pousse seringue (PS) ; courbe rouge : BioH, pH 5.5, sans PS ; courbe verte : BioH, pH 6.8 sans PS ; courbe bleue : complexe, pH 8, avec PS ; courbe rose : BioH, pH 8, avec PS. Le zoom entre 0 et 2 h est présenté à droite.

Dans un premier temps, il est possible de remarquer que l'addition au pousse seringue diminue le nombre de TON. Pour avoir des TONs élevés, il faut ajouter l'oxydant d'un coup.

Les résultats de catalyse d'oxydation du thioanisole à différents pH montrent une dépendance en pH qui peut être due à l'intermédiaire réactionnel formé. Il a été montré dans la partie précédente, qu'à température ambiante, l'intermédiaire Fe^{III}-peroxo est formé dans le biohybride. Plus le pH est élevé, plus l'intermédiaire Fe^{III}-peroxo est favorisé, et plus les TONs sont élevés.

En absence de pousse seringue, les résultats de catalyse sont corrects. Cependant, pour connaître l'effet de l'environnement de la protéine sur l'oxydation du substrat, il faut étudier l'excès

énantiomérique. Ils sont déterminés par HPLC sur colonne chirale. Uniquement les échantillons où H_2O_2 est ajoutée au pousse seringue ont été analysés par HPLC.

Comme attendu, pour la catalyse d'oxydation du thioanisole par le complexe en solution, aucun excès énantiomérique n'a été mesuré. Lorsque le catalyseur est $BLG-L_5^2Fe^{II}$, il a été observé un maximum d'excès énantiomérique de 20 % à 30 min (Figure 45), qui décroît ensuite.

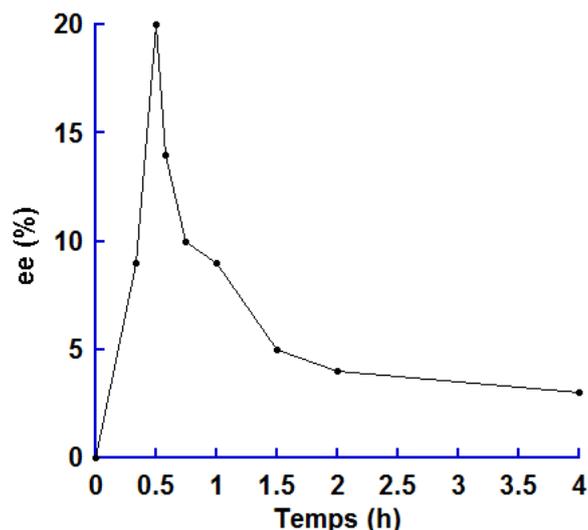


Figure 45: Evolution de l'excès énantiomérique en fonction du temps au cours de la catalyse de sulfoxydation du thioanisole, par $BLG-L_5^2Fe^{II}$ dans HEPES 50 mM pH 8, H_2O_2 ajouté au pousse seringue.

La diminution de l'excès énantiomérique dans le temps peut s'expliquer par la détérioration probable de la protéine par H_2O_2 , détruisant petit à petit la seconde sphère de coordination du site actif, qui sert à induire une stéréosélectivité.

Pour valider ou infirmer cette hypothèse, les échantillons où l'oxydant a été injecté d'un coup doivent être analysés par HPLC. Ces analyses sont en cours.

4. Conclusion

La nouvelle métalloenzyme artificielle $BLG-L_5^2Fe^{II}$ a été synthétisée et caractérisée. Il a été montré de manière reproductible que le complexe est greffé sur la cible (Cys121) de la BLG. Le complexe dans la métalloenzyme artificielle est réactif vis-à-vis de l'échange de ligand exogène (CN^-) mais la réaction est équilibrée contrairement au complexe en solution. Cette propriété, associée à un changement des propriétés spectroscopiques du complexe a été exploitée pour mettre au point un nouveau dosage du complexe de fer(II). Un nouveau dosage efficace du fer(II) conjugué à la protéine a été mis au point. Les tests de réactivité de $BLG-L_5^2Fe^{II}$ ont permis de mettre en évidence la formation de l'intermédiaire

BLG-L₅²Fe^{III}(η^2 -O₂) à température ambiante. Les premiers tests en catalyse d'oxydation du thioanisole ont mis en avant un excès énantiomérique de 20% au bout de 30 min, pour un TON très faible. Lorsque H₂O₂ est ajouté d'un coup, les TONs sont plus élevés et dépendent du pH. Plus le pH est élevé, meilleurs sont les TONs, ce qui montre probablement l'implication directe de l'intermédiaire Fe^{III}-peroxo dans la métalloenzyme artificielle. Cependant, pour ces échantillons, la détermination des excès énantiomériques est en cours.

Références

- (1) B. Y. Qin, M. C. B., L. K. Creamer, H. M. Baker, E. N. Baker, and G. B. Jameson *Biochemistry* **1998**, *37*, 1014.
- (2) Qin, B. *Thèse* **1998**.
- (3) Qin, B. Y.; Jameson, G. B.; Bewley, M. C.; Baker, E. N.; Creamer, L. K. *Protein Science* **1999**, *8*, 75.
- (4) K. Kuwata, M. H., V. Forge, S. Era, C. A. Batt, and Y. Goto *Protein Science* **1999**, *8*, 2541.
- (5) J. J. Adams, B. F. A., G. E. Norris, L. K. Creamer, G. B. Jameson *Journal of Structural Biology* **2006**, *154*, 246.
- (6) K. M. G. Oliveira, V. L. V.-M., M. M. Botelho, L. Sawyer, S. T. Ferreira, and I. Polikarpov *Eur. J. Biochem* **2001**, *268*, 477.
- (7) Chen, Y.; Parr, T.; Holmes, A. E.; Nakanishi, K. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 5.
- (8) C. K. Jankowski, D. I. S. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2003**, *629*, 185.
- (9) Mialane, P.; Nivorojkine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 1085.
- (10) Bernal, I.; Jensen, I. M.; Jensen, K. B.; McKenzie, C. J.; Toftlund, H.; Tuchagues, J.-P. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995**, 3667.
- (11) Duelund, L.; Hazell, R.; McKenzie, C. J.; Preuss Nielsen, L.; Toftlund, H. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, 152.
- (12) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.
- (13) Herrero, C.; Quaranta, A.; Sircoglou, M.; Senechal-David, K.; Baron, A.; Marin, I. M.; Buron, C.; Baltaze, J.-P.; Leibl, W.; Aukauloo, A.; Banse, F. *Chemical Science* **2015**, *6*, 2323.
- (14) Yen, T. Y.; Joshi, R. K.; Yan, H.; Seto, N. O.; Palcic, M. M.; Macher, B. A. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2000**, *35*, 990.
- (15) Bradofrd, M. M. *Analytical Biochemistr* **1976**, *72*, 248.
- (16) Ed. Harlow, D. L. *Library of Congress cataloging-in-Publication data* **1988**.
- (17) Oddon, F. *Thèse* **2006**.
- (18) T. Pérez-Ruiz, C. M.-L., V. Tomás and J. Fenoll *Analyst* **2000**, *125*, 507.
- (19) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Muñoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 7285.
- (20) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 3182.
- (21) Girerd, J. J.; Banse, F.; Simaan, A. J. *Structure and bonding*; Vol. 97.
- (22) Simaan, A. J., Université Paris Sud
2000.
- (23) Simaan, A. J.; Döpner, S.; Banse, F.; Bourcier, S.; Bouchoux, G.; Boussac, A.; Hildebrandt, P.; Girerd, J.-J. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, *2000*, 1627.
- (24) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat Chem* **2010**, *2*, 1069.
- (1) B. Y. Qin, M. C. B., L. K. Creamer, H. M. Baker, E. N. Baker, and G. B. Jameson *Biochemistry* **1998**, *37*, 1014.
- (2) Qin, B. *Thèse* **1998**.
- (3) Qin, B. Y.; Jameson, G. B.; Bewley, M. C.; Baker, E. N.; Creamer, L. K. *Protein Science* **1999**, *8*, 75.
- (4) K. Kuwata, M. H., V. Forge, S. Era, C. A. Batt, and Y. Goto *Protein Science* **1999**, *8*, 2541.
- (5) J. J. Adams, B. F. A., G. E. Norris, L. K. Creamer, G. B. Jameson *Journal of Structural Biology* **2006**, *154*, 246.

- (6) K. M. G. Oliveira, V. L. V.-M., M. M. Botelho, L. Sawyer, S. T. Ferreira, and I. Polikarpov *Eur. J. Biochem* **2001**, 268, 477.
- (7) Chen, Y.; Parr, T.; Holmes, A. E.; Nakanishi, K. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, 5.
- (8) C. K. Jankowski, D. I. S. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2003**, 629, 185.
- (9) Mialane, P.; Nivorojkine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, 38, 1085.
- (10) Bernal, I.; Jensen, I. M.; Jensen, K. B.; McKenzie, C. J.; Toftlund, H.; Tuchagues, J.-P. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995**, 3667.
- (11) Duelund, L.; Hazell, R.; McKenzie, C. J.; Preuss Nielsen, L.; Toftlund, H. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, 152.
- (12) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 691.
- (13) Herrero, C.; Quaranta, A.; Sircoglou, M.; Senechal-David, K.; Baron, A.; Marin, I. M.; Buron, C.; Baltaze, J.-P.; Leibl, W.; Aukauloo, A.; Banse, F. *Chemical Science* **2015**, 6, 2323.
- (14) Yen, T. Y.; Joshi, R. K.; Yan, H.; Seto, N. O.; Palcic, M. M.; Macher, B. A. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2000**, 35, 990.
- (15) Bradofrd, M. M. *Analytical Biochemistr* **1976**, 72, 248.
- (16) Ed. Harlow, D. L. *Library of Congress cataloging-in-Publication data* **1988**.
- (17) Odon, F. *Thèse* **2006**.
- (18) T. Pérez-Ruiz, C. M.-L., V. Tomás and J. Fenoll *Analyst* **2000**, 125, 507.
- (19) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Muñoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, 46, 7285.
- (20) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, 14, 3182.
- (21) Girerd, J. J.; Banse, F.; Simaan, A. J. *Structure and bonding*; Vol. 97.
- (22) Simaan, A. J., Université Paris Sud
2000.
- (23) Simaan, A. J.; Döpner, S.; Banse, F.; Bourcier, S.; Bouchoux, G.; Boussac, A.; Hildebrandt, P.; Girerd, J.-J. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, 2000, 1627.
- (24) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat Chem* **2010**, 2, 1069.
- (1) B. Y. Qin, M. C. B., L. K. Creamer, H. M. Baker, E. N. Baker, and G. B. Jameson *Biochemistry* **1998**, 37, 1014.
- (2) Qin, B. *Thèse* **1998**.
- (3) Qin, B. Y.; Jameson, G. B.; Bewley, M. C.; Baker, E. N.; Creamer, L. K. *Protein Science* **1999**, 8, 75.
- (4) K. Kuwata, M. H., V. Forge, S. Era, C. A. Batt, and Y. Goto *Protein Science* **1999**, 8, 2541.
- (5) J. J. Adams, B. F. A., G. E. Norris, L. K. Creamer, G. B. Jameson *Journal of Structural Biology* **2006**, 154, 246.
- (6) K. M. G. Oliveira, V. L. V.-M., M. M. Botelho, L. Sawyer, S. T. Ferreira, and I. Polikarpov *Eur. J. Biochem* **2001**, 268, 477.
- (7) Chen, Y.; Parr, T.; Holmes, A. E.; Nakanishi, K. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, 5.
- (8) C. K. Jankowski, D. I. S. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2003**, 629, 185.
- (9) Mialane, P.; Nivorojkine, A.; Pratviel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sainton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorganic Chemistry* **1999**, 38, 1085.
- (10) Bernal, I.; Jensen, I. M.; Jensen, K. B.; McKenzie, C. J.; Toftlund, H.; Tuchagues, J.-P. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995**, 3667.

- (11) Chang, H. R.; McCusker, J. K.; Toftlund, H.; Wilson, S. R.; Trautwein, A. X.; Winkler, H.; Hendrickson, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 6814.
- (12) Lubben, M.; Meetsma, A.; Wilkinson, E. C.; Feringa, B.; Que, L. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34*, 1512.
- (13) Duelund, L.; Hazell, R.; McKenzie, C. J.; Preuss Nielsen, L.; Toftlund, H. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, 152.
- (14) Ségaud, N.; Rebilly, J.-N.; Sénéchal-David, K.; Guillot, R.; Billon, L.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Reinaud, O.; Banse, F. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 691.
- (15) Herrero, C.; Quaranta, A.; Sircoglou, M.; Senechal-David, K.; Baron, A.; Marin, I. M.; Buron, C.; Baltaze, J.-P.; Leibl, W.; Aukauloo, A.; Banse, F. *Chemical Science* **2015**, *6*, 2323.
- (16) Yen, T. Y.; Joshi, R. K.; Yan, H.; Seto, N. O.; Palcic, M. M.; Macher, B. A. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2000**, *35*, 990.
- (17) Bradofrd, M. M. *Analytical Biochemistr* **1976**, *72*, 248.
- (18) Ed. Harlow, D. L. *Library of Congress cataloging-in-Publication data* **1988**.
- (19) Oddon, F. *Thèse* **2006**.
- (20) T. Pérez-Ruiz, C. M.-L., V. Tomás and J. Fenoll *Analyst* **2000**, *125*, 507.
- (21) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Muñoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 7285.
- (22) Martinho, M.; Dorlet, P.; Rivière, E.; Thibon, A.; Ribal, C.; Banse, F.; Girerd, J.-J. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 3182.
- (23) Girerd, J. J.; Banse, F.; Simaan, A. J. *Structure and bonding*; Vol. 97.
- (24) Simaan, A. J., Université Paris Sud, 2000.
- (25) Simaan, A. J.; Döpner, S.; Banse, F.; Bourcier, S.; Bouchoux, G.; Boussac, A.; Hildebrandt, P.; Girerd, J.-J. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, *2000*, 1627.
- (26) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat Chem* **2010**, *2*, 1069.

Conclusion et perspectives

Le but de ce travail était de synthétiser des complexes de fer non-hémiques capables de modéliser de façon fonctionnelle les sites actifs de monooxygénases à fer telle que le cytochrome P450 en utilisant plusieurs approches. Le choix des ligands utilisés s'est inscrit dans le prolongement des ligands bien connus au laboratoire et qui ont permis à la fois la caractérisation d'intermédiaires réactionnels mais aussi l'oxydation de petites molécules organiques telles que le cyclohexane, le cyclooctène, l'anisole et le thioanisole.

Le **chapitre 2** résumait la caractérisation et l'étude en température de nouveaux complexes tétradentes et hexadentes dont les ligands ont été renforcés par la présence de deux groupements méthyle en position α des pyridines. Le premier ligand est un dérivé du ligand L_4^2 (BPMEN) et le second ligand est un dérivé du ligand TPEN. Les complexes obtenus avec ces nouveaux ligands, ont la même première sphère de coordination que leur complexe parent à l'état solide et en solution. Le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ présente un équilibre chimique en solution dans l'acétonitrile avec le complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$. Ce complexe $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(ACN)_2]^{2+}$ présente un équilibre de spin à température ambiante. Lorsque la température est abaissée, la proportion en complexe bas spin augmente. A température ambiante, l'équilibre chimique ainsi que la conversion de spin ont lieu simultanément. Le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{III}]^{2+}$ est dans un état majoritairement bas spin à température ambiante, ce qui explique le manque de réactivité de ce complexe vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène contrairement au complexe $[(TPEN)Fe^{II}]^{2+}$.

Le **chapitre 3** était consacré à la synthèse et à la caractérisation d'intermédiaires réactionnels à partir du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$. L'addition de 1.2 éq. de $HClO_4$ pour protonner une pyridine et libérer un site de coordination, a permis de générer l'intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(OOH)]^{2+}$. Cet intermédiaire a été caractérisé par RPE et spectroscopie UV-visible avec une bande d'absorption à 530 nm. L'addition de 4 éq. de NEt_3 a conduit à la formation de l'intermédiaire sa forme déprotonée $[(2MeL_6^2)Fe^{III}(\eta^2-O_2)]^+$ qui absorbe à 730 nm et qui a également été caractérisé par RPE et par spectrométrie de masse. Cet intermédiaire a été testé à $-50^\circ C$ pour l'oxydation de la cyclohexanone. L'intermédiaire stable plusieurs heures à $-50^\circ C$ se dégrade en 100 minutes en présence de substrat. De la caprolactone a été détectée par GC/MS. Des tests en catalyse à $-50^\circ C$ devront être effectués pour mettre en évidence une réactivité de type Bayer-Villiger. Un intermédiaire $[(2MeL_6^2)Fe^{IV}(O)]^{2+}$ a été généré avec le complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ par addition de PhIO, présentant une bande d'absorption caractéristique à 750 nm. La cinétique de dégradation de l'intermédiaire suit une cinétique d'ordre 1 avec un temps de demi-vie de 20 minutes. Ce temps de demi-vie est un peu plus faible en comparaison

avec ceux des complexes analogues $[(\text{TPEN})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$ et $[(\text{L}_6^{24\text{E}})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})]^{2+}$. En effet, leurs cinétiques de dégradation suivent une loi complexe mêlant une cinétique d'ordre 1 et une cinétique d'ordre 2 révélant la dégradation du ligand. La différence des cinétiques de dégradation implique que le nouveau ligand est plus robuste et ne subit que très minoritairement la dégradation par coupure oxydante.

Les résultats préliminaires de catalyse d'oxydation de différents substrats ont permis de mettre en avant les différents mécanismes mis en jeu selon le type de ligand du catalyseur. Dans le cas de l'oxydation du cyclooctène et du cyclohexane, les complexes à ligands de type L_4^2 présentent des rendements et une sélectivité importants. Au contraire, dans le cas de l'hydroxylation du noyau aromatique de l'anisole, les complexes à ligands de type L_6^2 sont moyennement efficaces dans les conditions testées, mais présentent une grande sélectivité. Les nouveaux complexes à ligands protégés ont présenté des meilleurs résultats dans le cas de l'oxydation du cyclohexane avec des sélectivités plus importantes, et dans le cas de l'hydroxylation du noyau aromatique de l'anisole, les rendements sont plus élevés pour ces complexes protégés.

Le **chapitre 4** a présenté un travail qui s'inscrit dans le projet ANR Cathyméthoxy (tâches 3 et 6). Le ligand L_5^2NOS dont la synthèse a été mise au point par Sihem Groni du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de l'Université Paris Diderot, est basé sur un ligand L_5^2 auquel un bras thioctique a été ajouté. Ce ligand a été conçu pour le greffage du complexe associé sur électrode d'or. La synthèse des complexes est assez difficile à cause de la présence de la longue chaîne carbonée qui augmente considérablement la solubilité des complexes. Pour cette raison, le complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})](\text{PF}_6)$ a pu être isolé en faible quantité et le complexe $[(\text{L}_5^2\text{NOS})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$ n'a pas été isolé. L'étude en solution de ces deux complexes a mis en avant des échanges chimiques entre les ligands exogènes OTf^- et le solvant (acétonitrile ou acétone).

La mise au point des SAMs a été effectuée de différentes façons. Un point important est que l'organisation de la SAM semble dépendre de la méthode de formation et du solvant d'étude. Les complexes sont bien greffés sur la surface d'or par la formation de liaisons S-Au qui sont détectées par XPS. Les analyses de surface ont mis en avant des monocouches homogènes. Comme en solution, il a été intéressant d'observer des équilibres chimiques entre les ligands exogènes et le solvant. D'autre part, le comportement du complexe $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})]^+$ sur les SAMs a présenté une réactivité différentes dans les sels de fond TBACl et TBAOTf a montré une stabilité importante des systèmes SAM- $[\text{LFe}^{\text{II}}\text{Cl}]^+$ dans TBACl et SAM- $[\text{LFe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$ dans TBAOTf. Les premiers tests de réactivité de la SAM avec le dioxygène ont été également effectués. En effectuant un balayage de potentiel jusqu'à -1.2 V, la réduction de O_2 en $\text{O}_2^{\bullet-}$ a été observée ainsi que l'oxydation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en O_2 au balayage retour. D'autre part, la présence d'un épaulement à -0.85 V dans le pied du pic de réduction du dioxygène pourrait

correspondre à la réduction de l'adduit $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ à la surface de l'électrode, ce qui s'accompagne d'une modification du signal électrochimique du complexe. Ces observations indiquent que le complexe de fer voit sa structure modifiée lorsque l'électrode est sondée à des potentiels de réduction suffisamment bas afin que le dioxygène puisse être réduit.

Le **chapitre 5** est centré sur la synthèse, la caractérisation, la quantification et la réactivité d'une nouvelle métalloenzyme artificielle. Ce travail regroupe les tâches 4 et 5 du projet ANR Cathyméthoxy. Dans un premier temps un nouveau ligand de structure L_5^2 a été fonctionnalisé avec un bras maléimide. Le complexe correspondant $[(\text{L}_5^2_{\text{maléimide}})\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}](\text{PF}_6)$ a été synthétisé et caractérisé. Ce complexe a ensuite été greffé par couplage covalent au sein de la β -lactoglobuline, grâce à l'unique cystéine libre. Le couplage est quantitatif et sélectif sur cette cystéine. La quantification de la solution de biohybride obtenue a été effectuée grâce à la mise au point d'une nouvelle méthode de titration du fer(II) par les cyanures. Cette méthode permet un dosage sur des très petites quantités ($V \approx 160 \mu\text{L}$) et est sélective du fer(II) complexé dans la protéine.

Des tests en réactivité et des essais en catalyse ont été effectués. Le suivi par UV-visible de l'addition d'un excès de H_2O_2 sur une solution de $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ a mis en avant la formation d'une espèce intermédiaire $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{III}}(\eta^2\text{-O}_2)$ absorbant à 660 nm et confirmée par RPE. Ce résultat est très intéressant car à présent, à notre connaissance, un seul exemple d'intermédiaire réactionnel dans une métalloenzyme artificielle a été publié.

D'autre part, les tests préliminaires de l'oxydation du thioanisole par H_2O_2 catalysés par $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ ont montré une différence d'activité selon le mode d'injection de l'oxydant. Un excès énantiomérique de 20 % a été détecté sur un échantillon, montrant l'influence de la protéine pour la stéréosélectivité de la réaction.

Partie expérimentale

1. Techniques et conditions expérimentales

1.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres et études réalisées à température fixée ont été enregistrés sur le spectrophotomètre Varian Cary 50. Les solutions préparées sur rampe, sont transférés à l'aide d'une seringue dans une cuve en verre à double paroi placé sous flux d'argon.

Une sonde optique à immersion Hellma dont le corps est parcouru par un flux d'argon pour éviter toute condensation est plongée dans la cuve. Deux fibres optiques la relient au spectrophotomètre. Une cale en quartz, fixée à l'aide de ruban Teflon®, permet de diminuer le trajet optique sondé de 1 cm à 1 mm si nécessaire.

De l'éthanol absolu est mis en circulation autour de la cuve à double paroi par un cryostat Phoenix ThermoHaake CT90L pour atteindre des températures jusqu'à -80°C. La vitesse de balayage utilisée pour enregistrer les spectres à l'aide du logiciel Cary WinUv (mode « scan » ou « scanning kinetics ») est de 2016 nm min⁻¹.

1.2. Spectroscopie RMN

Les composés organiques ont été solubilisés dans le chloroforme deutéré CDCl₃ ou le dichlorométhane CD₂Cl₂ et les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC250 (250 MHz), ou AM300 (300 MHz) ou AM360 (360 MHz). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (partie par million).

1.3. Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires des poudres synthétisées ont été effectuées par le service de microanalyse de Gif-sur-Yvette. Pour cela, les échantillons sont dissous en milieu très acide et chaque type d'atome présent peut être quantifié.

1.4. Spectrométrie de masse

1.4.1. ESI (haute résolution)

Les spectres de masse enregistrés en mode électrospray ont été réalisés sur un spectromètre Bruker 2009 à analyseur tandem (quadripôle couplé à un temps de vol). Les concentrations des solutions injectées varient de 10^{-4} M à 10^{-3} M.

1.4.2. MALDI TOF

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par Vincent Guérineau (laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN, Gif-sur-Yvette). Le spectromètre MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen) a été utilisé pour toutes les expériences de caractérisation du biohybride. Les spectres de masse ont été obtenus en mode ion positif linéaire. L'intensité du laser a été réglée de façon à obtenir le meilleur rapport signal sur bruit. Toutes les données ont été traitées par le logiciel FlexAnalysis (Bruker Daltonics).

De l'acide sinapique acheté chez Sigma Aldrich a été utilisé comme matrice pour les expériences de MALDI-TOF. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 40 μ M. La solution de matrice a été préparée à une concentration de 45 mM dans $H_2O/CH_3CN/TFA$ 1/1/0.1. L'échantillon a été préparé par mélange de la solution de biohybride avec la solution de matrice avec un rapport en volume de 1/9.

1.4.3. Orbitrap

Les analyses par orbitrap ont été effectuées par Jean-Pierre Le Caer (laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN, Gif-sur-Yvette). Elles ont été effectuées sur l'appareil MicroOTOFq Bruker pour l'ESI-MS haute résolution et sur le LTQ-Orbitrap Thermo instruments. Les échantillons ont été introduits à l'aide d'une source nanospray, avec des aiguilles capillaires d'introduction directe Thermo Scientific.

1.4.4. Protéomique

Les conditions pour la protéomiques sont les suivantes : dans un premier temps les protéines sont dénaturées avec de l'urée à 8 M et diluées avant trypsinolyse pour obtenir une concentration maximale de 1 M. Conditions de réduction : par le DTT ou le TCEP, et conditions pour l'alkylation : par l'iodoacétamide. Ensuite les protéines sont digérées par la trypsine, (coupure derrière K et R), V8 (coupure derrière D et E), et chymotrypsine (coupure derrière W, F, L, Y, M). Plusieurs types de digestions des protéines ont eu lieu afin d'augmenter la couverture de la séquence.

1.5. Spectroscopie RPE

Les spectres RPE ont été enregistrés par Laurianne Billon, Eric Rivière et Christian Herrero, en mode de détection perpendiculaire, en bande X (9.47 GHz) sur un spectromètre Bruker Elexsys 500 E équipé d'un cryostat à flux d'hélium liquide (5 K) ou d'azote liquide (100 K) et d'un système de contrôle de la température Oxford Instrument E 500. Les spectres ont été enregistrés en solution gelée.

Les prélèvements de 150 μL pour les études RPE des espèces intermédiaires ont été réalisés avec une micropipette munie d'une canule. La solution prélevée est transférée dans le tube RPE et gelé dans de l'azote liquide.

1.6. Voltamétrie cyclique

L'électrolyte support utilisé est l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (TBAPF_6) à 0.1 M dans l'acétonitrile ou dans l'acétone. Les mesures ont été réalisées sous flux d'argon ou à l'air. Les voltamogrammes ont été enregistrés avec une électrode de carbone vitreux, à une vitesse de balayage de 0.1 Vs^{-1} pour les systèmes étudiés en solution et avec une électrode d'or à une vitesse de balayage de 10 Vs^{-1} pour les complexes greffés sur électrode d'or.

Un montage classique à trois électrodes a été utilisé :

- Une électrode de travail :
 - Une électrode de travail à disque de carbone vitreux de diamètre 3 mm a été polie à l'aide d'une pâte diamantée de $1 \mu\text{m}$ de granulométrie avant chaque mesure. Elle est ensuite rincée à l'éthanol absolu, bain ultrasonique pendant 15 secondes, puis séchée avec un sèche-cheveux.
 - Des électrodes de travail d'or de diamètres 3 mm et 1.6 mm ont été polies à l'aide de suspensions d'alumine de $1 \mu\text{m}$, $0.3 \mu\text{m}$ et de $0.05 \mu\text{m}$ pendant 3 minutes pour chaque taille. Elles ont été ensuite rincées à l'eau, l'éthanol absolu puis à l'acétone dans un bain ultrasonique pendant 3 min.
- Une électrode de référence au calomel saturé (ESC) ($E^\circ = 0.235 \text{ V/ENH}$) est protégée de la solution étudiée par un pont rempli d'électrolyte support.
- Une contre électrode de platine permet la mesure du courant.

En conditions sèches, le solvant distillé est séché sur tamis puis alumine sous argon. L'électrolyte support a été recristallisé, la verrerie séchée à l'étuve.

Electrodéposition du ligand et des complexes :

Une solution de complexe ou de ligand à 10 μM est placée dans la cellule électrochimique. Le logiciel pour piloter le potentiostat pendant l'électrodéposition est NOVA. 186 cycles sont effectués de la façon suivante : 5 s à -0.4 V puis un voltamogramme de -0.4 \rightarrow 0.9 \rightarrow -0.40 V, avec un balayage de 10 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.

La solution de MCH utilisée est à 0.5 mM dans l'acétonitrile.

Les wafers d'or utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich, et sont composés d'un dépôt cristallin d'or sur du verre lié par du titane.

1.7. Spectroscopie par émission atomique (ICP)

Les analyses d'ICP-AES ont été réalisées par Philippe Méjanelle de l'IUT d'Orsay (Université Paris Sud). Elles ont été effectuées sur le Thermo ICAP 6500 par détection axiale. Les paramètres utilisés sont les suivants : argon comme gaz refroidissant 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; argon comme gaz auxiliaire et nébulisation sous flux d'argon 0.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les pics d'émission ont été mesurés en utilisant la ligne spectrale du Fe 238.204 nm.

1.8. Spectroscopie de photoélectrons X

Les spectres XPS sur poudre et sur surface ont été réalisés à l'ICMMO par Diana Drago sur un spectromètre K Alpha (Thermo Fisher) équipé d'une source Aluminium mono chromatisée (Al, K_{α} = 1 486,6 eV). La taille du spot est de 200 μm .

Les échantillons ont été introduits sans nettoyage préalable de la surface. La surface de la référence Au a été nettoyée par abrasion ionique (Ar^+). La pression de la chambre d'analyse était de 2×10^{-9} mbar. L'analyseur hémisphérique est utilisé en mode CAE (Constant Analyser Energy). Les énergies de passage sont de 200 eV pour l'acquisition des surveys et 50 eV pour l'acquisition des fenêtres haute-résolution. Les énergies sont enregistrées avec un pas de 1 eV pour les surveys et 0,1 eV pour les fenêtres haute-résolution. La compensation de charge est effectuée par irradiation de la surface avec des électrons basse énergie (5 eV maximum).

1.9. Diffraction des rayons X

Les structures cristallographiques ont été résolues par Régis Guillot par diffraction des rayons X sur monocristal sur un diffractomètre Bruker KAPPA-APEX II à détecteur CCD. Les données cristallographiques ont été enregistrées à 100 K, la température étant maintenue par une soufflette à azote liquide OXFORD Cryostream 700 series.

1.10. Microscopie à force atomique (AFM)

Les images ont été réalisées par Sandra Mazerat. Elles ont été acquises en mode tapping par une pointe en silicone Nanosensors (PPP NCSTR) avec une gamme de fréquence de 76 à 263 kHz. Les images ont été enregistrées avec le logiciel WsXM (en accès libre sur internet). La topographie en mode tapping et le phasage des images sont effectués par le biais du logiciel Innova AFM Bruker avec NanoDrive v8.02.

1.11. Catalyse et chromatographie gazeuse

Les réactions de catalyse ont été réalisées directement dans les vials pour analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC). L'ordre d'ajouts des composants est toujours le suivant : complexe/acétonitrile/substrat/oxydant (ajouté au pousse-seringue). La réaction se déroule sur 2h, sous forte agitation.

L'introduction d'un étalon interne (acétophénone ou cyclopentanone) a permis de quantifier les produits d'oxydation formés. Le volume est ajusté lors de l'étalonnage, et fixé à quelques microlitres. Des solutions diluées par 100 dans l'acétonitrile ont été utilisées, puis 3 ou 5 μL sont prélevés et injectés dans le mélange réactionnel. La formule du calcul de la quantité de produits formés est :

$$C_{\text{pdt}} = C_{\text{et}} \cdot fr \cdot \frac{\text{Aire}_{\text{pdt}}}{\text{Aire}_{\text{et}}}$$

avec C_{pdt} , la concentration en produit

C_{et} , la concentration en étalon

fr, le facteur de réponse de la colonne pour le produit considéré

Aire_{pdt} , l'aire du pic du produit

Aire_{et} , l'aire du pic de l'étalon interne.

Les résultats sont la moyenne de deux ou trois expériences concordantes. Les conditions chromatographiques sont rappelées dans le tableau suivant :

Substrats	Conditions	Produits d'oxydation
Cyclohexane	100°C → 230°C 4°C.min ⁻¹	cyclohexanol cyclohexanone
Cyclooctène	100°C → 220°C 4°C.min ⁻¹	1,2-époxyoctane cyclooctan-1,2-diol
Anisole	150°C → 230°C 6°C.min ⁻¹	<i>ortho</i> -méthoxyphénol <i>mé</i> ta-méthoxyphénol <i>para</i> -méthoxyphénol
Thioanisole	100°C → 130°C 5°C.min ⁻¹	phénylméthylsulfoxyde phénylméthylsulfone

	Puis 130°C → 300°C 50°C.min ⁻¹	
--	---	--

1.12. Conditions de la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

Les analyses HPLC du chapitre 3 ont été réalisées sur une chaîne U3000 (Thermo-Dionex) avec un détecteur à barrette de diodes (UV) et un détecteur Corona. Les séparations ont été développées sur une colonne Nucléodur C18 EC (L : 250mm; di : 3mm; dp : 5µm) avec un éluant eau/acétonitrile et un gradient de 90/10 à 40/60 en 30 min à 25°C.

Les analyses HPLC du chapitre 5 ont été réalisées sur une colonne Chiracel OD-H pour déterminer les excès énantiomériques avec un éluant isopropanol/n-hexane 95/5, avec un débit de 1 mL/min.

2. Synthèse des ligands

2.1. Synthèse du trispicen amine

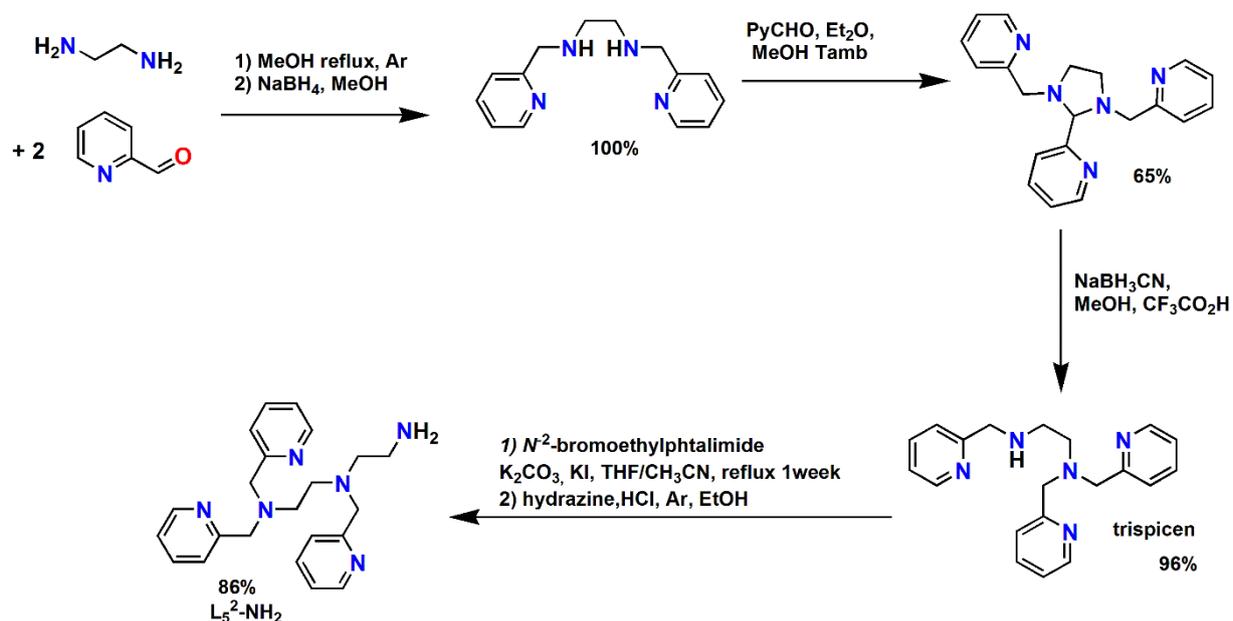
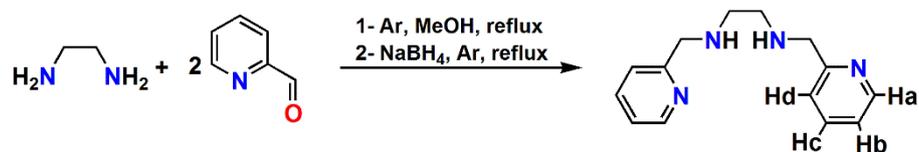


Figure 1: Schéma bilan de la synthèse du ligand trispicen amine

Première étape :

La première étape consiste à préparer le ligand appelé bispicen ou L_4^2 : N,N'-bis[(2-pyridyl)methyl]-1,2-diaminéthane.



Dans un ballon bicol de 250 mL surmonté d'un réfrigérant, 100 mL de MeOH sont introduits, et 2 équivalents de 2-pyridinecarboxaldéhyde (0.2 moles, 19 mL), puis progressivement est ajouté 1 équivalent d'éthylène diamine (0.1 moles, 6.8 mL). La solution est jaune foncé. Le contenu du ballon est dégazé trois fois puis chauffé au reflux toute une nuit (65°C) sous agitation et atmosphère d'argon. Après retour à température ambiante, le ballon bicol est placé dans un bain de glace. La solution est marron foncé. Ensuite, NaBH₄ est ajouté petit à petit au mélange réactionnel. La solution brune prend une teinte un peu plus orangée. Le montage est remis au reflux, sous agitation et sous argon, pendant 24 h. Après retour à température ambiante, la solution est de couleur jaune-orange. 10 mL d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel pour quencher l'excès de NaBH₄ (environ 10 mL). Le méthanol restant est évaporé, ce qui conduit à l'obtention d'une huile jaune vif. L'huile est dissous dans 250 mL de DCM et 100 mL d'eau distillée sont ajoutés. Après séparation des phases, la phase aqueuse est extraite avec 2 fois 100 mL de DCM. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec 150 mL d'eau distillée saturée en NaHCO₃ puis séchées sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation du DCM, une huile orange est obtenue avec un rendement de 53 % (13.2 g, 54.5 mmol).

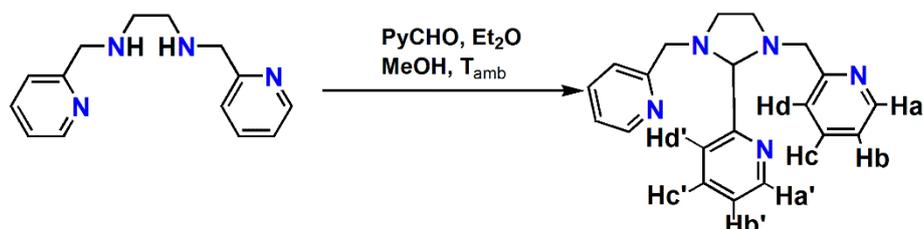
Formule brute : C₁₄H₁₈N₄

Masse molaire : 242.3 g/mol

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.19 (singlet large, 2H, **NH**) ; 2.78 (s, 4H, N-CH₂-CH₂-N) ; 3.88 (s, 4H, CH₂-Py) ; 7.12 (t, J = 4.7 Hz, 2H, **Hb**) ; 7.28 (d, J = 7.8 Hz, 2H, **Hd**) ; 7.60 (td, J = 7.5 Hz, J = 2.2 Hz, 2H, **Hc**) ; 8.50 (d, J = 4.7 Hz, 2H, **Ha**).

Deuxième étape :

La seconde étape est une étape de condensation entre le ligand L_4^2 et le formaldéhyde, qui conduit à l'aminal présenté ci-dessous :



Dans un ballon monocol de 1 L, 350 mL d'éther diéthylique sont ajoutés au bispicen (peu soluble) (13.2 g, 54.5 mmoles) ainsi que quelques gouttes de méthanol (pour solubiliser le bispicen). 2.2 équivalents de pyridine carboxaldéhyde (11 mL, 119 mmoles) en solution dans 50 mL d'éther diéthylique sont **lentement** ajoutés à la solution précédente. La solution orangée est dégazée 3 fois et laissée sous agitation et sous flux d'argon pendant 2 jours. Au bout de quelques minutes, un solide blanc précipite. Après deux jours, une huile rouge apparait aussi. Après évaporation des solvants, le produit est ne solubilisé à chaud dans l'éther diéthylique et après une nuit au congélateur des cristaux blancs sont obtenus. Ils sont filtrés sur fritté, rincés avec de l'éther diéthylique froid et séchés sous vide. Le solide blanc est obtenu avec 66 % de rendement (11.95 g, 36.5 mmoles).

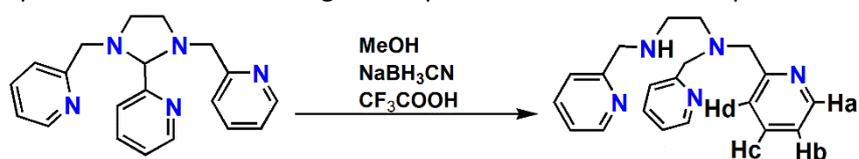
Formule brute : $C_{20}H_{21}N_5$

Masse molaire : 331.4 g/mol

RMN 1H (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 2.72 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -N) ; 3.32 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2 -N) ; 3.63 (d, J = 14 Hz, 2H, CH_2 -Py) ; 3.92 (d, J = 14 Hz, 2H, CH_2 -Py) ; 4.25 (s, 1H, CH-Py) ; 7.06 (t, J = 5.0 Hz, 2H, **Hb**) ; 7.17 (td, J = 5.0 Hz, J = 1.2 Hz, H, **Hb'**) ; 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 2H, **Hd**) ; 7.54 (td, J = 7.5 Hz, J = 2.0 Hz, 2H, **Hc**) ; 7.67 (td, J = 7.5 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, **Hc'**) ; 7.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H, **Hd'**) ; 8.44 (d, J = 4.5 Hz, 2H, **Ha**) ; 8.48 (d, J = 5.0 Hz, 1H, **Ha'**).

Troisième étape :

Cette étape permet la formation du ligand L_5^2 par réduction de l'aminal précédent.



Dans un ballon bicol sous argon, un équivalent d'aminol (9.05 g, 27.3 mmoles) est dissous dans 200 mL de méthanol. La solution est de couleur jaune, limpide. Sous agitation, un équivalent de NaBH_3CN est ajouté (1.71 g, 27.3 mmoles). **Un bain de glace est placé sous le ballon**, une fois que le mélange réactionnel est froid, 2 équivalents d'acide trifluoroacétique (4.2 mL, 54.6 mmoles) sont ajoutés **au goutte à goutte**. Une « fumée » est observée traduisant la réaction exothermique acide/MeOH. La solution est de couleur jaune. La solution est agitée 17 h. 200 mL de solution de soude à 15 % massique sont ajoutés lentement dans le milieu réactionnel, car la réaction est légèrement exothermique. La solution hétérogène de couleur jaune est agitée 30 minutes puis elle est extraite avec 3 x 150 mL de DCM. Les phases organiques réunies sont lavées avec 150 mL de solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur sulfate de sodium anhydre et le DCM est évaporé. Le produit est obtenu sous forme d'une huile orangée avec un rendement de 97 % (8.8 g, 26.4 mmoles).

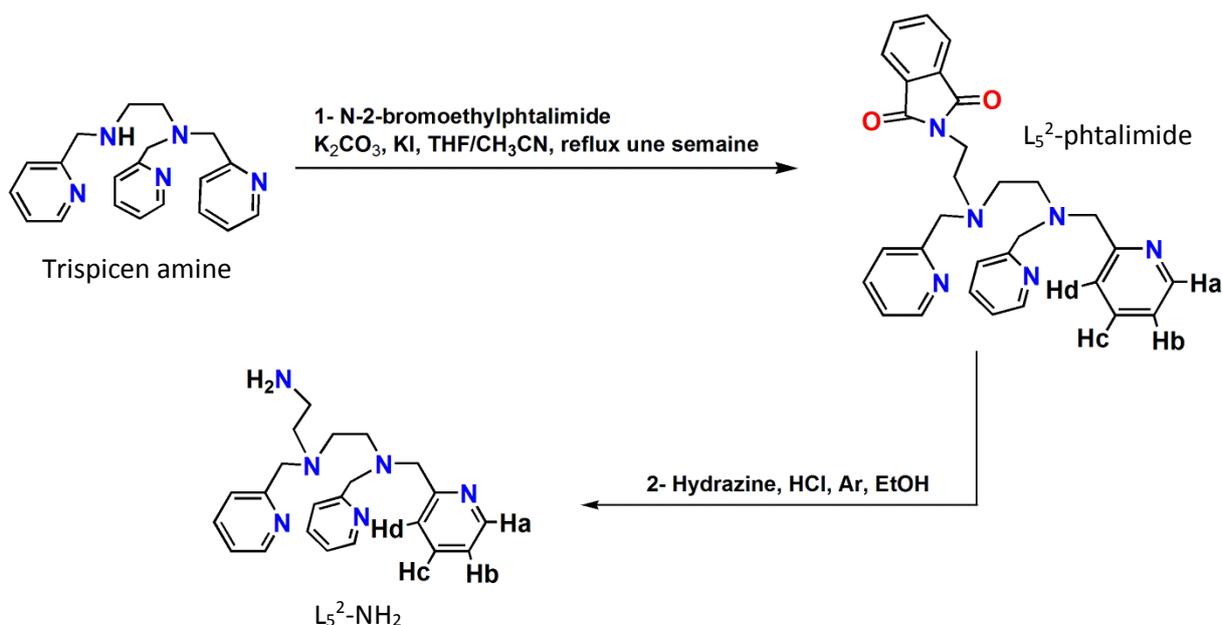
Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5$

Masse molaire : 333.4 g/mol

RMN ^1H (360 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 2.45 (s large, 1H, NH) ; 2.80 (s, 4H, N- CH_2 - CH_2 -N) ; 3.84 (s, 6H, CH_2 -Py) ; 7.14 (t, J = 6.0 Hz, 3H, **Hb**) ; 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H, **Hd**) ; 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 2H, **Hd**) ; 7.64 (m, 3H, **Hc**) ; 8.51 (d, J = 5.0 Hz, 3H, **Ha**).

Quatrième étape :

La formation du ligand trispicen amine, $\text{L}_5^2\text{-NH}_2$, se fait en deux étapes.



- 1) Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, 1 équivalent de trispicen est introduit (3.02 g, 9.06 mmoles), ainsi que 9.9 équivalents de K_2CO_3 (12.4 g, 89.7 mmoles) et 0.32 équivalent de KI

(0.48 g, 2.89 mmoles). Sous argon, 30 mL d'acétonitrile sont ajoutés. Dans un tube de Schlenck 1.2 équivalents de N-(2-bromoéthyl)phtalimide (2.74 g, 10.8 mmoles) sous argon sont dissous dans 20 mL de THF. Cette solution incolore est ajoutée au goutte à goutte à la suspension du milieu réactionnel. Le mélange hétérogène est chauffé au reflux du THF, sous forte agitation pendant **une semaine**. Après retour du mélange à la température ambiante le milieu réactionnel est filtré sur célite. Le solide est rincé au DCM jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore. Après évaporation des solvants, le produit obtenu est une huile brune. Après une **purification sur colonne d'alumine neutre (éluant : DCM/Et₂O (v/v 1/1))**, le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 70 % (3.18 g, 6.28 mmoles).

Formule brute : C₃₀H₃₀N₆O₂

Masse molaire : 506.6 g/mol

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.72 (m, 6H, N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-N_{phtalimide}) ; 3.69 (s, 2H, CH₂-N_{phtalimide}) ; 3.76 (s, 6H, CH₂-Py) ; 7.1-7.7 (m, 13 H, **Hb, Hc, Hd, H_{phtalimide}**) ; 8.37 (d, J = 5.5 Hz, 1H, **Ha**), 8.50 (d, J = 5.5 Hz, 2H, **Ha**).

- 2) Dans un bicol de 250 mL surmonté d'un réfrigérant, 1 équivalent de L₅²phtalimide (3.18 g, 6.28 mmoles) est dissous dans 150 mL d'éthanol absolu. La solution de couleur jaune clair translucide est dégazée 3 fois puis 8.8 équivalents d'hydrazine monohydratée sont ajoutés (4.11 mL, 55.2 mmoles), et le mélange est chauffé au reflux. Après une heure au reflux, un solide blanc précipite au fond du ballon. Après retour à la température ambiante, le milieu réactionnel est refroidi dans un bain de glace puis de l'acide chlorhydrique concentré (7,4 mL, 10 éq., 62.8 mmoles) est ajouté précautionneusement. Le milieu hétérogène est de nouveau chauffé au reflux de l'éthanol pendant une nuit. Le lendemain, la solution est jaune avec un précipité blanc. Après filtration de ce sous-produit sur fritté, rinçage du solide à l'éthanol. Le filtrat est évaporé. Il est redissous dans 100 mL de DCM et 150 mL de solution de NaOH (2 M) sont ajoutés. Après séparation des phases, la phase aqueuse est extraite avec 2 x 100 mL de DCM. Les phases organiques réunies sont lavées avec 75 mL de solution de NaCl saturée, séchées sur Na₂SO₄, puis le DCM est évaporé. Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 38 % (2.4 g, 6.3 mmoles).

Formule brute : C₂₂H₂₈N₆

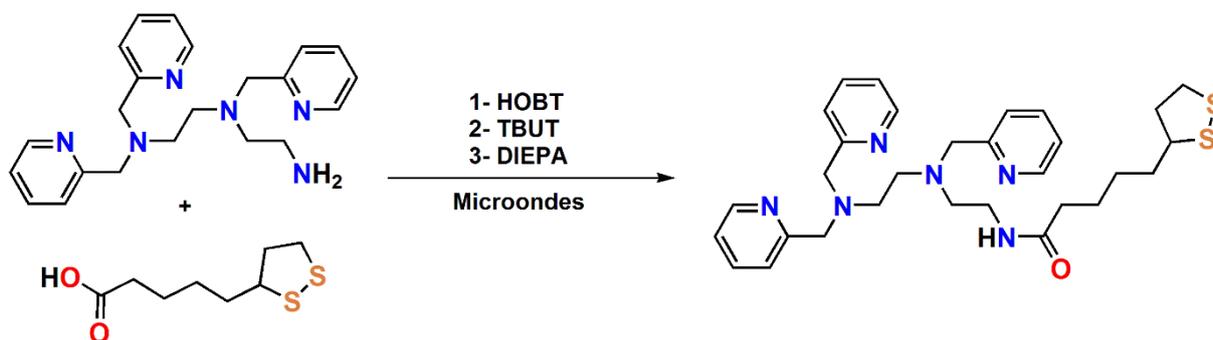
Masse molaire : 376.5 g/mol

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.277 (s, 2H, NH₂) ; 2.53 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂) ; 2.71 (m, 6H, N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-NH₂) ; 3.67 (s, 2H, CH₂-Py) ; 3.74 (s, 2H, CH₂-Py) ; 7.07-7.71 (m, 9H, **Hb, Hc, Hd**) ; 8.48 (d, J = 5.8 Hz, 1H, **Ha**) ; 8.54 (d, J = 5.5 Hz, 2H, **Ha**).

2.2. Synthèse des ligands ${}_{2\text{Me}}\text{L}_4^2$, et ${}_{2\text{Me}}\text{L}_6^2$

La synthèse des ligands ${}_{2\text{Me}}\text{L}_4^2$ et ${}_{2\text{Me}}\text{L}_6^2$ a été effectuée selon le protocole décrit dans le manuscrit de thèse de Véronique Jollet.¹

2.3. Synthèse du ligand L_5^2NOS



Dans un réacteur pour microondes de 30 mL, 107 mg (0.52 mmoles) d'acide lipoïque sont dissous dans 10 mL de THF anhydre. Les réactifs suivants sont ajoutés respectivement : 0.52 mmoles de trispicene-amine (194 mg) ; 0.56 mmoles de HOBT (1.1 éq., 77 mg) ; 0.56 mmoles de TBUTU (1.1 éq. 182 mg) et enfin 1.03 mmoles de DIEPA (2 éq., 181 μL). Le mélange est agité dans le four à microondes pendant 18 minutes à 50°C. Après refroidissement, le THF est évaporé avec un bain à 30°C. Le produit obtenu est dissous dans 20 mL de dichlorométhane, puis lavé avec une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique est lavée 2 x 20 mL d'eau puis séchée sur Na_2SO_4 . Une huile marron foncée est obtenue, avec un rendement de 83 % (0.24 g, 0.42 mmoles).

Formule brute : $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{OS}_2$

Masse molaire : 564.81 g/mol

RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.29 (m, 2H, S-CH-CH₂-CH₂-CH₂), 1.5 (m, 4H, SCH-CH₂-CH₂), 1.74 (m, 1H, SCH₂-CH₂), 2.01 (t, J = 7.5 Hz, 2H, COCH₂), 2.28 (m, 1H, SCH₂-CH₂), 2.47 (m, 2H, NHCH₂-CH₂), 2.58 (m, 2H, NCH₂-CH₂-N), 2.63 (m, 2H, NCH₂-CH₂-N), 2.98 (m, 2H, SCH₂), 3.17 (m, 2H, NHCH₂), 3.39 (m, 1H, SCH), 3.57 (m, 2H, NHCH₂-CH₂-NCH₂-C_{py}), 3.68 (m, 4H, NCH₂-CH₂-NCH₂-C_{py}), 7.01 (m, 3H, NCHCH), 7.10 (m, 1H, NCCH), 7.23 (s, 1H, NH), 7.32 (m, 2H, NCH₂-CH₂-NCH₂-CCH), 7.47 (m, 3H, NCCHCH), 8.38 (m, 3H, NCH).

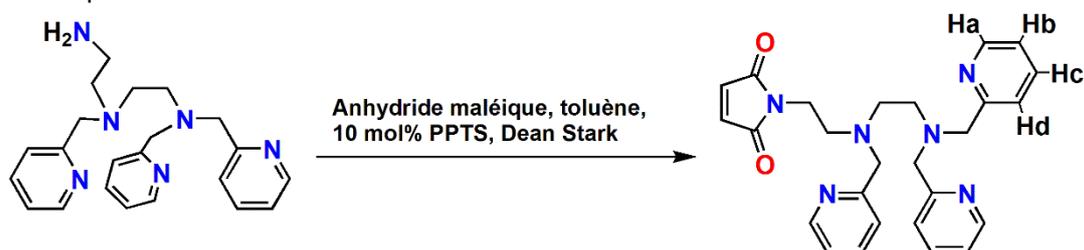
RMN- ^{13}C (100.6MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 25.3 (s, SCHCH₂-CH₂), 28.8 (s, COCH₂-CH₂), 34.4 (s, SCHCH₂), 36.1 (s, COCH₂), 37.1(s, NHCH₂), 38.2 (s, SCH₂), 40.0 (s, SCH₂-CH₂), 51.5 (s, NCH₂-CH₂-N), 52.0 (s, NCH₂-CH₂-N),

52.8 (s, NHCH₂CH₂), 56.2 (s, SSC_H), 60.3 (s, NCH₂CH₂NCH₂C_{py}), 121.9 (s, C_{py}, NCH₂CH), 122.9 (s, C_{py}, NC_H), 136.2 (s, C_{py}, NCCH₂CH), 148.7 (s, C_{py}, N_{CH}), 159.1 (s, C_{py}, NCCH₂), 172,5 (s, CO).

Masse ESI (EI+): pour C₃₀H₄₀N₆OS₂, m/z (théorique) = 564.27, m/z (calculée) = 564.2

2.4. Synthèse du ligand L₅²maléimide.

Cette étape est celle de formation du nouveau ligand avec la fonction maléimide, L₅²maléimide, à partir du trispicen amine.



Dans un ballon bicol de 250 mL surmonté d'un réfrigérant, 1 équivalent de trispicen amine (0,96 g, 2.55 mmoles) est dissous dans 100 mL de toluène. La solution devient jaune. La solution d'anhydride maléique (265 mg dans 10 mL de toluène (1.06 éq., 2.70 mmoles)) est ajoutée au goutte à goutte. Le milieu réactionnel se trouble légèrement. Le PPTS est ajouté (0.1 éq., 69 mg, 0.27 mmoles). Des taches brunes sont observées dans le fond du ballon. Le montage Dean-Stark est placé sur le ballon et le mélange est chauffé légèrement en dessous du reflux pendant une nuit, puis au reflux du toluène (130 °C) pendant 24 h. L'eau est éliminée au fur et à mesure de sa formation et le toluène est évaporé en majorité à l'aide du Dean-Stark, puis à l'évaporateur rotatif. Une huile orangée foncée est obtenue. Pour le traitement, il faut être très rapide afin d'éviter l'hydrolyse de la fonction maléimide. Une solution de NaHCO₃ (5 % massique) est préparée et versée dans le ballon ainsi que 80 mL de DCM. La phase aqueuse est extraite par 3 x 80 mL de DCM. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de NaCl saturée, puis séchées sur Na₂SO₄ ; après filtration et évaporation du DCM, une huile marron est obtenue. Le rendement avant colonne est de 95 %, mais l'huile étant marron, une purification par chromatographie sur colonne est effectuée (alumine, DCM/EtOAc, (1/1, v/v), puis ajout de DCM/EtOAc/EtOH (1/1/0.2, v/v). Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 39 % (630 mg, 1.4 mmoles).

Formule brute : C₂₆H₂₈N₆O₂

Masse molaire : 456.5 g/mol

RMN ¹H (360 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm) : 2.55-2.70 (2m, 6H, N-CH₂-CH₂-N-CH₂), 3.51 (t, J = 6.4Hz, 2H, CH₂-N_{maléimide}), 3.66 (s, 2H, CH₂-py), 3.73 (s, 4H, CH₂-py), 6.58 (s, 2H, H maléimide), 7.09 (m, 3H, H_b), 7.18 (d,

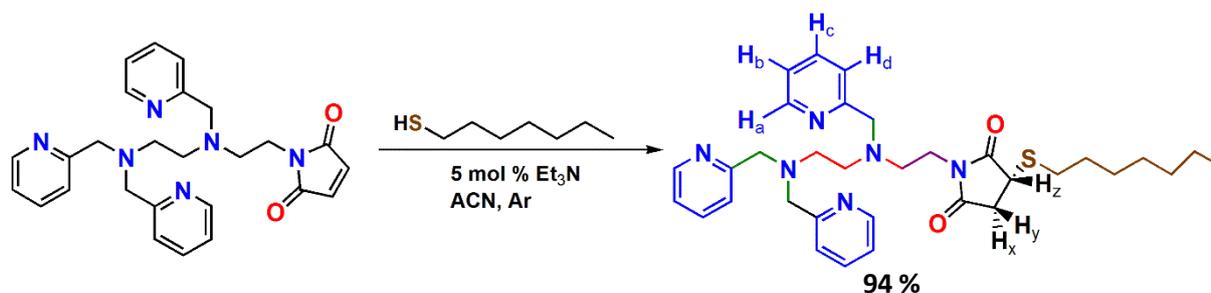
$J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_d), 7.43 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$, 2H, H_d), 7.49 (td, $J = 7.5\text{ Hz}$, $J = 1.8\text{ Hz}$, 1H, H_c), 7.58 (td, $J = 7.5\text{ Hz}$, $J = 1.8\text{ Hz}$, 2H, H_c), 8.39 (d, $J = 5.1\text{ Hz}$, 1H, H_a), 8.43 (d, $J = 4.8\text{ Hz}$, 2H, H_a)

RMN ^{13}C (360 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm): δ 35.8 (CH_2 -maléimide), 52.1-52.4 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2$), 60.5-60.7 (CH_2 -py), 121.7 (C_b), 121.7-122.8 (C_d), 134.0 (CH maléimide), 136.0-136.1 (C_c), 148.8-148.9 (C_a), 159.8-159.9 (C_e), 170.6 (CO).

HR ESI-MS (uma): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 457.2341$ (cal. 457.2347) pour $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2$; $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 479.2157$ (cal. 479.2166) pour $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}$.

2.5. Test de réactivité du ligand L_5^2 maléimide avec l'heptane thiol

Afin de savoir si la fonction maléimide est bien réactive, le couplage avec de l'heptane thiol a été effectué.



Sous argon dans un ballon de 100 mL, 1 équivalent de ligand maléimide (103.2 mg, 0.226 mmoles) est dissous dans de l'acétonitrile distillé (10 mL). Le mélange est placé sous forte agitation jusqu'à dissolution totale du ligand (solution jaune). La triéthylamine (10 μL , 1.12 M) est alors ajoutée (2.13 10^{-6} moles). Le milieu réactionnel est refroidi dans un bain de glace et 1.1 équivalent d'heptanethiol (39.0 μL , 0.249 mmoles) sont ajoutés à la solution. Le mélange est placé sous vive agitation toute une nuit. Après évaporation de l'acétonitrile, l'huile est dissoute dans 50 mL de DCM et 40 mL d'eau saturée en NaCl sont ajoutés. Après séparation des phases, la phase aqueuse est extraite avec 25 mL de DCM. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na_2SO_4 , puis filtrées et le DCM est évaporé. Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 94 % (391 mg, 0.664 mmoles).

Formule brute : $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$

Masse molaire : 588.8 g/mol

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.86 (t, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H, CH_3) ; 1.25 (m, 8H, $\text{H}_3\text{C-(CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$) ; 1.60 (q, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_3\text{C-(CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$) ; 2.40 (dd, $J = 18.6\text{ Hz}$, $J = 3.9\text{ Hz}$, 1H, H_y) ; 2.66-2.89 (m, 8H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2 + \text{S-CH}_2$) ; 3.03 (dd, $J = 18.9\text{ Hz}$, $J = 9.0\text{ Hz}$, 1H, H_z) ; 3.51-3.68 (m, 3H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2 + \text{H}_z$) ; 3.71 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Py}$) ; 3.77 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-Py}$) ; 7.10 (t, $J = 4.8\text{ Hz}$, 3H, H_b) ; 7.27 (d, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_d) ; 7.42 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$, 2H, H_d) ; 7.56 (m, 3H, H_b) ; 8.46 (m, 3H, H_a).

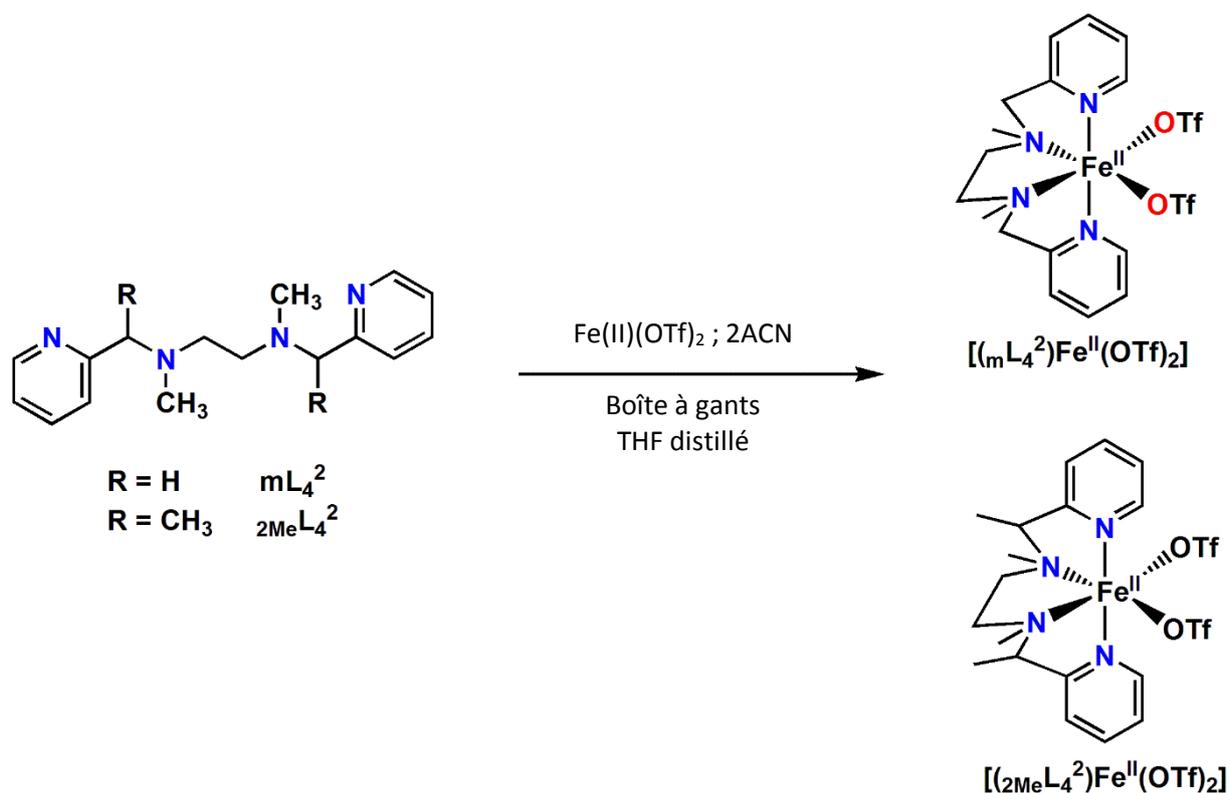
HR-ESI-MS : $m/z [M + H]^+ = 589.3370$ (cal. 589.3319) pour $C_{33}H_{45}N_6O_2S$

$[M + Na]^+ = 611.3158$ (cal. 611.3139) pour $C_{33}H_{44}N_6NaO_2S$.

3. Synthèse des complexes et caractérisations

3.1. Synthèse des complexes $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$ et $[(2MeL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$

La synthèse de ces deux complexes a été faite en boîte à gants selon le protocole décrit par Britovsek et al. en 2005.²



Les ligands, le triflate de fer(II) ainsi que le THF distillé sont introduits en boîte à gants. Les ligands mL_4^2 et $2MeL_4^2$ sont placés dans des Schlenks et dissous dans 5 mL de THF. Dans un erlenmeyer, 1 éq. de triflate de fer(II) est partiellement dissous dans le THF. La solution de fer est ajoutée à la solution de ligand correspondante, et sous agitation toute une nuit. Une fine poudre jaune est en suspension en solution. Les Schlenks sont sortis de la boîte à gants, et les solutions sont concentrées de moitié sous rampe à vide. Les précipités sont filtrés sous argon, rincés au THF (2 fois 5 mL), puis séchés sous vide (rampe à vide).

Pour le complexe $[(mL_4^2)Fe^{II}(OTf)_2]$, une poudre jaune pâle est isolée avec un rendement de 26 % (114 mg, 0.18 mmoles).

Pour le complexe $[(2_{\text{Me}}\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$, une poudre jaune pâle est isolée avec un rendement de 35 % (69 mg, 0.11 mmoles).

Réactifs	Quantités	Volume de THF
$m\text{L}_4^2$	1 éq. (311 mg, 0.71 mmoles)	Dissous dans 5 mL de THF
$\text{Fe}(\text{OTf})_2$; 2ACN	1 éq (194 mg, 0.71 mmoles)	
$2_{\text{Me}}\text{L}_4^2$	1 éq. (91 mg, 0.31 mmoles)	Dissous dans 5 mL de THF
$\text{Fe}(\text{OTf})_2$; 2ACN	1 éq (133 mg, 0.31 mmoles)	

- $[(m\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$:

Formule brute: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{FeN}_4\text{O}_6\text{S}_2$

Masse molaire: 624 g/mol

HR-MS (ESI): m/z $[\text{LM}(\text{OTf})]^+ = 475.0706$ (cal. 475.0709) pour $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{FeN}_4\text{O}_3\text{S}$

Spectroscopie UV-visible : (CH_3CN) λ_{max} (nm) [ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)]: 372 (3 700), 260 (>20 000).

- $[(2_{\text{Me}}\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2]$:

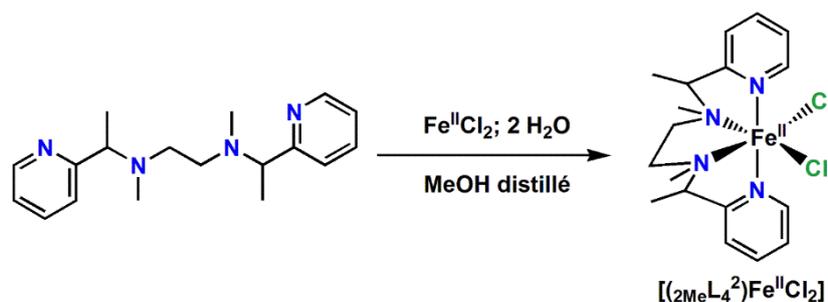
Formule brute: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{FeN}_4\text{O}_6\text{S}_2$

Masse molaire: 652 g/mol

HR-MS (ESI): m/z $[\text{LMCl}]^+ = 503.1030$ (cal. 503.1022) pour $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{FeN}_4\text{O}_3\text{S}$

Spectroscopie UV-visible : (CH_3CN) λ_{max} (nm) [ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)]: 375 (3 690), 260 (>20 000).

3.2. Synthèse du complexe $[(2_{\text{Me}}\text{L}_4^2)\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$



Dans un premier Schlenck sous argon, 1 éq. de ligand $2_{\text{Me}}\text{L}_4^2$ est dissous (252 mg, 0.85 mmoles) dans un minimum de MeOH. Dans un second Schlenck sous argon, 1 éq. de $\text{FeCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (137 mg, 0.85 mmoles) est dissous dans 10 mL de MeOH. La solution de fer est limpide et d'un jaune-vert très clair. La solution contenant le ligand est limpide orange-marron. Avec une canule en téflon, sous argon la solution de fer est transvasée sur celle du ligand et le Schlenck est rincé avec du MeOH. Le mélange réactionnel jauni et il y a apparition d'un fin solide jaune or. Après 30 min sous agitation, le Schlenck est placé au congélateur toute une nuit. Le solide est filtré sous argon et lavé à l'éther diéthylique (2 x

5 mL), puis séché sous vide. Le filtrat est remis au congélateur, pour faire précipiter plus de complexe. En rassemblant les deux fractions, une poudre jaune vif est isolée avec un rendement de 37 % (133 mg, 0.32 mmoles).

Formule brute: $C_{18}H_{26}FeN_4Cl_2$

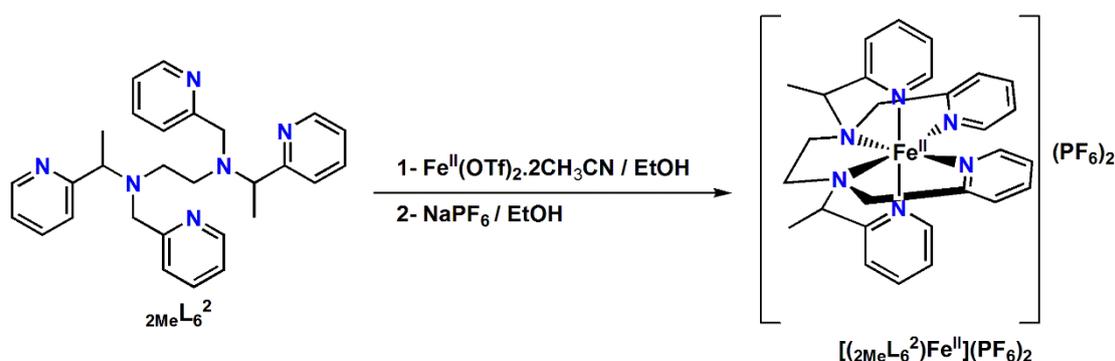
Masse molaire: 425 g/mol

HR-MS (ESI): m/z $[LMCl]^+ = 389.1195$ (cal. 389.1190) pour $C_{18}H_{26}ClFeN_4$

Spectroscopie UV-visible : (MeOH) λ_{max} (nm) $[\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 366 (2 000), 260 (>20 000) ; (CH₃CN) λ_{max} (nm) $[\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 344 (1 200), 410 (1 300), 260 (>20 000).

3.3. Synthèse du complexe $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$

Cette synthèse est effectuée en boîte à gants, sous atmosphère d'argon.



En boîte à gants, dans un premier Schlenk, 1 éq. de ligand $2MeL_6^2$ (179 mg, 0.40 mmoles) est dissous dans le minimum d'éthanol. Dans un second Schlenk, 1 éq. de $Fe(OTf)_2 \cdot 2CH_3CN$ (173 mg, 0.40 mmoles) est dissous dans un minimum d'éthanol. L'ajout de la solution contenant le sel de fer sur la solution de ligand conduit à l'observation d'une coloration de la solution marron-jaune foncé. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 2h. Dans un erlenmeyer, 2.2 éq. de $NaPF_6$ (148 mg, 0.87 mmoles) sont dissous dans un minimum d'éthanol, puis introduits au goutte à goutte dans le milieu réactionnel. On observe alors l'apparition d'un précipité marron-rouge. La solution est laissée sous agitation pendant 2 h. La poudre en suspension dans la solution est rouge brique. Le Schlenk est sorti de la boîte à gants. Le précipité est filtré sous argon, rincé à l' Et_2O (2 fois 5 mL), puis séché sous vide (rampe à vide). Une poudre marron-ocre est isolée avec un rendement de 45 % (141 mg, 0.18 mmoles).

Formule brute: $C_{28}H_{32}F_{12}FeN_6P_2$

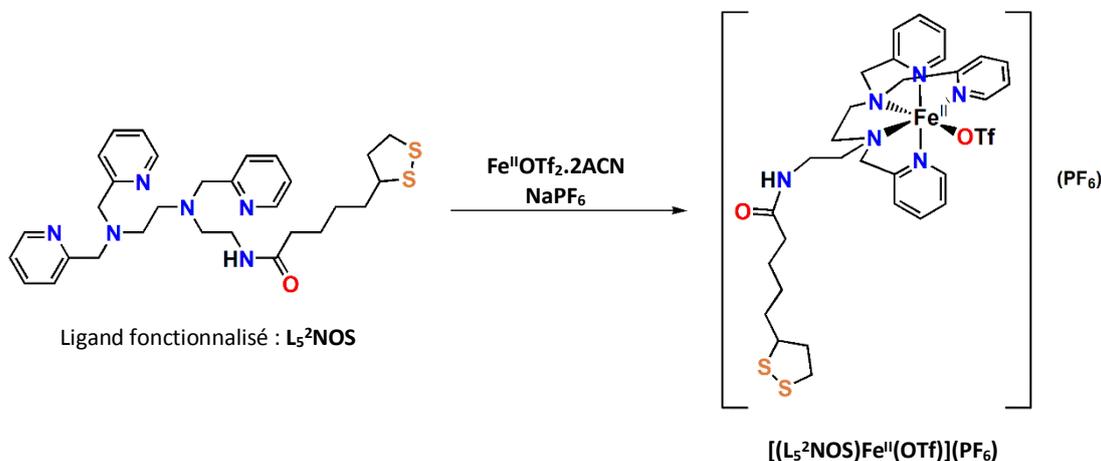
Masse molaire: 797,8 g/mol

HR-MS (ESI): m/z $[LM]^{2+} = 254.1047$ (cal. 254.1013) pour $C_{28}H_{32}FeN_6$

Spectroscopie UV-visible : (MeOH) λ_{max} (nm) $[\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 420 (12 900), 250 (>25 000) ; (CH₃CN) λ_{max} (nm) $[\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 419 (12 900), 250 (>25 000).

3.4. Synthèse du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(OTf)](OTf)$

La synthèse du complexe est effectuée à partir du ligand L_5^2NOS en boîte à gants.



Dans un premier Schlenck, 1 éq. de ligand L_5^2NOS (214 mg, 0.38 mmoles) est dissous dans 10.5 mL de THF distillé, la solution est de couleur marron-jaune clair. Dans un second Schlenck, 1.2 éq. de $Fe^{II}(OTf)_2 \cdot 2CH_3CN$ (330 mg, 0.76 mmoles) sont dissous dans 15 mL d'acétonitrile distillé, la solution est de couleur jaune. La solution de fer est ajoutée au goutte à goutte sur la solution de ligand. Le mélange réactionnel devient de couleur marron-jaune foncé, et est laissé sous agitation toute une nuit. La solution est translucide. Le Schlenck est sorti de la boîte à gants. 2.2 éq. de $NaPF_6$ (64 mg, 0.38 mmoles) sont dissous dans du THF puis sont ajoutés au mélange réactionnel. Le Schlenck est placé au congélateur pendant 1h30. La solution restant toujours limpide, elle est concentrée sous rampe à vide jusqu'à changement de la viscosité, et placée au congélateur pendant 15 min. Du solide est aperçu dans le Schlenck, du THF distillé (25 mL) est ajouté au mélange. La solution se trouble mais une huile marron se forme et colle aux parois du Schlenck. Le mélange réactionnel est alors tiré à sec sous rampe à vide. Un mélange d'huile marron et de solide orangé est obtenu. Du méthanol distillé (5 mL) est ajouté dans le Schlenck pour essayer de solubiliser l'huile et dissoudre le solide. L'huile reste collée aux parois du Schlenck. 2 mL d'acétonitrile sont alors ajoutés au goutte à goutte, ce qui permet de solubiliser l'huile. Le Schlenck est placé au congélateur toute une nuit. Un solide est présent dans le fond du Schlenck. Le précipité est filtré sous argon, rincé à Et_2O (2 fois 5 mL), puis séché sous vide (rampe à vide). Une poudre jaune-marron est isolée avec un rendement de 14 % (51 mg, 0.63 mmoles).

Formule brute : $C_{31}H_{40}F_9FeN_6O_4PS_3$

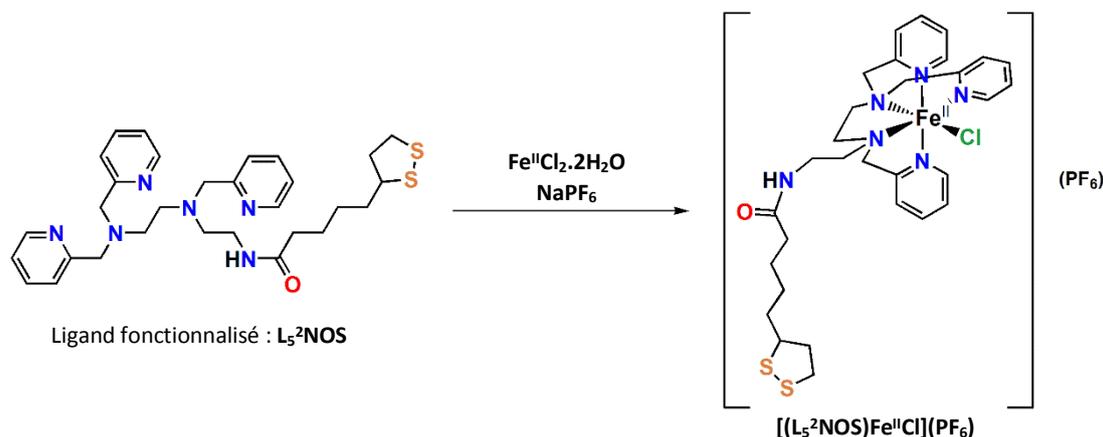
Masse molaire : 914.7 g/mol

HR-MS (ESI): $m/z [LM]^{2+} = 310.1035$ (cal. 310.1022) pour $C_{30}H_{40}FeN_6OS_2$; $[LM(OTf)]^+ = 769.1573$ (cal. 769.1573) pour $C_{31}H_{40}F_3FeN_6O_4S_3$

Spectroscopie UV-visible : (MeOH) λ_{\max} (nm) [ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 347 (1 800), 250 (10 000) ; (CH₃CN) λ_{\max} (nm) [ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 380 (3 300), 250 (10 000).

3.5. Synthèse du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^{II}(Cl)](PF_6)$ non isolé

La synthèse du complexe est effectuée à partir du ligand L_5^2NOS .



Dans un premier Schlenck, sous argon, 1 équivalent de ligand L_5^2NOS (35 mg, 62 μ moles) est dissous dans 4 mL d'acétonitrile distillé et 0.5 mL de MeOH pour dissoudre le ligand resté collé sur les parois du Schlenck. La solution de ligand est jaune vif. Dans un second Schlenck, 1 équivalent de $Fe^{II}Cl_2 \cdot 2H_2O$ (10.1 mg, 62 μ moles) est dissous dans un minimum d'acétonitrile (1.5 mL) et est ajouté sur la solution de ligand. La solution devient de couleur marron. La concentration de la solution est estimée à 10 mM. La composition de la solution est analysée par voltamétrie cyclique. Sur l'ensemble de la solution de complexe non isolé ont été ajoutés du triflate d'argent (15.4 mg, 60 10^{-6} moles), puis 1 équivalent de $NaPF_6$ (10.4 mg, 62 10^{-6} moles). La solution a été filtrée sur une membrane en nylon de 0.2 μ m.

Formule brute : $C_{30}H_{40}ClF_6FeN_6OPS_2$

Masse molaire : 801.1 g/mol

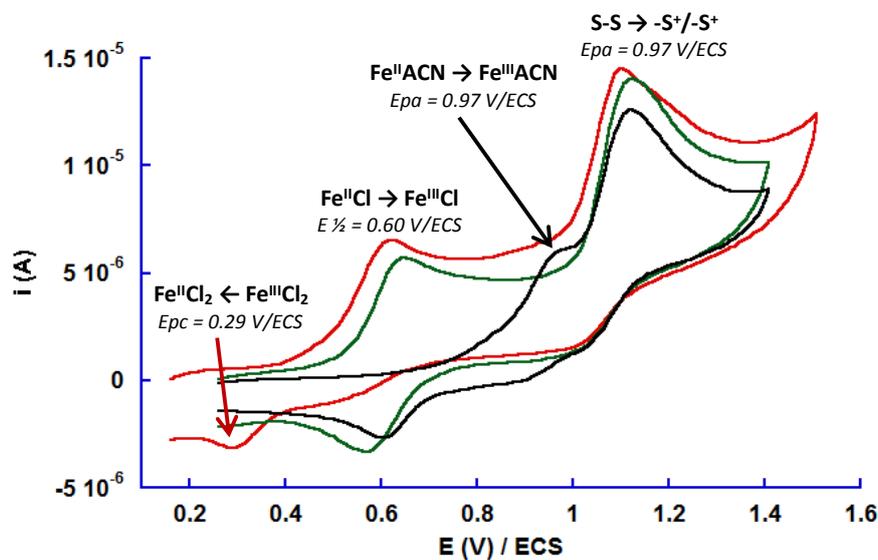
HR-MS (ESI): m/z $[LM]^{2+} = 655.1765$ (cal. 655.1738) pour $C_{30}H_{40}ClFeN_6OS_2$

Spectroscopie UV-visible : (CH₃CN) λ_{\max} (nm) [ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)]: 372 (1 600), 250 (10 000).

La solution a été tirée sous vide, puis après le complexe a été redissous dans l'acétone et dans l'acétonitrile afin d'avoir deux solutions stock.

L'acétonitrile a été évaporé à sec (rampe à vide), puis le complexe a été redissous dans 2.73 mL d'acétone (10 mM) et 4.05 mL d'acétonitrile (10 mM) afin de récupérer deux solutions stock.

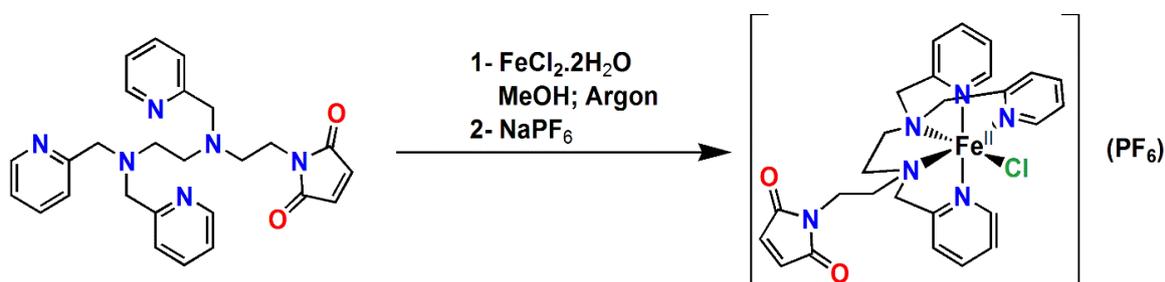
La concentration de la solution est estimée à 10 mM. La composition de la solution est analysée par voltamétrie cyclique.



Voltamogramme du complexe $[(L_5^2NOS)Fe^II(Cl)]^+$ non isolé (rouge), après ajout de 1 équivalent de AgOTf (vert), après ajout de deux équivalents de AgOTf (noir) [TBAPF₆ 0.1, ACN distillé, 0.1 V/s]

L'étude par voltamétrie cyclique d'une petite partie de la solution de complexe a montré que l'équivalent de chlorures qui n'a pas réagi avec le fer est libre en solution, ce qui se traduit par un potentiel cathodique de 0.29 V/ECS. Après oxydation de Fe^{II}Cl en Fe^{III}Cl, il y a un équilibre chimique qui conduit à la formation de l'espèce Fe^{III}Cl₂, ce qui explique l'absence de la vague en retour de Fe^{III}Cl → Fe^{II}Cl. L'ajout de 1 équivalent de AgOTf, permet la disparition de cette vague Fe^{III}Cl₂ → Fe^{II}Cl₂, et permet d'observer la réversibilité de la vague du système Fe^{III}Cl/Fe^{II}Cl. L'ajout d'un second équivalent de AgOTf, conduit comme attendu à la disparition de la vague Fe^{III}Cl/Fe^{II}Cl à E_{1/2} = 0.60 V/ECS, et conduit à l'apparition d'une vague non réversible à 0.97 V/ECS qui correspond au système Fe^{III}(ACN)/Fe^{II}(ACN).

3.6. Synthèse du complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$



Dans un premier Schlenck sous argon, 1 éq. de ligand (148.3 mg, 0.32 mmoles) est dissous dans un minimum de méthanol. Dans un second Schlenck sous argon, 1 éq. de $Fe^{II}Cl_2 \cdot 2H_2O$ (52.7 mg, 0.32 mmoles) est dissous dans un minimum de méthanol. Les deux solutions sont jaunes pâles. Avec une canule, la solution de fer(II) est ajoutée sur la solution de ligand maléimide. La solution de complexe est agitée pendant 3 heures ; la solution se colore en jaune vif. Sous argon, dans un troisième Schlenck, 1.1 éq. de $NaPF_6$ (60.1 mg, 0.36 mmoles) sont dissous dans le minimum de méthanol. Cette solution est ajoutée à la seringue sur le mélange réactionnel ; un peu de précipité jaune vif se forme. Le mélange réactionnel reste sous agitation à température ambiante pendant une nuit puis il est placé au congélateur pendant 3 heures. Le précipité est filtré sous argon, rincé à l'éther diéthylique froid (2 fois 5 mL), puis séché sous vide (rampe à vide). Un solide jaune vif est isolé avec un rendement de 58 % (131 mg, 0.19 mmoles).

Formule brute : $C_{26}H_{28}ClFeF_6N_6O_2P$

Masse molaire : 692.3 g/mol

HR-MS (ESI): $m/z [M]^+ = 547.1302$ (cal. 547.1307) pour $C_{26}H_{28}ClFeN_6O_2$

Analyse élémentaire: $C_{26}H_{28}ClF_6FeN_6O_2P \cdot 0.95 H_2O$: C 43.99, H 4.25, N 11.84; mesuré: C 43.79, H 4.07, N 11.78

Spectroscopie UV-visible : (CH_3CN) λ_{max} (nm) [ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)]: 400 (1900), 260 (>20 000).

3.7. Synthèse de la métalloenzyme artificielle BLG- $L_5^2Fe^{II}$

La β -lactoglobuline bovine provient de chez Sigma Aldrich (L7880 (variant A) et L8005 (variant B)). Une solution de protéine à 1.1 mg/mL est préparée dans du tampon PBS 10 mM, pH 7.4, pendant 2 h sous argon. 1.8 mL de cette solution est ensuite incubée 4 jours à 4°C avec 200 μL d'une solution de complexe $[(L_5^{2\text{maléimide}})Fe^{II}Cl](PF_6)$ à 2.0 mM dans l'acétonitrile.

Après 4 jours, la solution jaune claire et limpide obtenue, est purifiée sur une colonne X5 Zeba spin de 5 mL (< 1 000 Da), avec un tampon d'imprégnation choisi pour les analyses ou tests en catalyse futur, selon le tableau suivant :

Rappels de tampons adaptés aux différentes caractérisations, quantifications et réactivité du biohybride.

	NBIC 10 mM pH 8	HEPES 50 mM pH 8	PBS 10 mM pH 7.4	HEPES 10 mM pH 7.4
MALDI	Oui	Oui	Non	Oui
Orbitrap	Oui	Non	Non	Non
Cristallographie	Non	Non	Non	Oui
UV-vis	Oui	Oui	Oui	Oui
ICP	Oui	Non	Non	Non
Titration du Fe(II)	Oui	Oui	Oui	Non
Réactivité	Non	Oui	Non	Non

3.8. Table cristallographique

Tableau 1: Données cristallographiques et détails d'affinement des structures des complexes $[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$, $[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$ et $[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl](PF_6)$.

Composé	$[(2MeL_4^2)Fe^{II}Cl_2]$	$[(2MeL_6^2)Fe^{II}](PF_6)_2$	$[(L_5^2\text{maléimide})Fe^{II}Cl](PF_6)$
CCDC	1038991	1038990	1059102
Empirical Formula	C ₁₈ H ₂₆ Cl ₂ Fe N ₄	C ₂₈ H ₃₂ F ₁₂ Fe N ₆ P ₂	C ₂₆ H ₂₈ Cl F ₆ Fe N ₆ O ₂ P
M_r	425.18	798.39	692.81
Crystal size, mm ³	0.08 x 0.08 x 0.01	0.04 x 0.19 x 0.31	0.120 x 0.080 x 0.015
Description / color	Plate / yellow	Plate / orange	Plate / yellow
Crystal system	monoclinic	monoclinic	orthorhombic
Space group	$P 2_1/n$	$P 2_1/c$	$P b c a$
a, Å	8.3684(3)	13.4041(8)	25.690(3)
b, Å	14.9937(5)	13.4369(10)	8.2485(11)
c, Å	15.0138(5)	18.3201(13)	27.243(4)
α , °	90	90	90
β , °	90.627(2)	106.691(2)	90
γ , °	90	90	90
Cell volume, Å ³	1883.72(11)	3160.6(4)	5772.8(13)
Z	4	4	8 ; 1
T, K	100(1)	100(1)	100(1)
F ₀₀₀	888	1624	2832
μ , mm ⁻¹	1.093	0.682	0.746
θ range, °	1.92 – 30.59	1.91 – 28.45	1.495 – 23.290
Reflection collected	35 524	23 544	40586
Reflections unique	5 772	6 831	4155
R _{int}	0.0777	0.0332	0.1083
GOF	1.027	1.165	1.024
Refl. obs. ($I > 2\sigma(I)$)	3 742	5 774	2339
Parameters	230	507	388
wR ₂ (all data)	0.0997	0.2212	0.0851
R value ($I > 2\sigma(I)$)	0.0420	0.0937	0.2525
Largest diff. peak and hole (e ⁻ ·Å ⁻³)	-0.564 ; 0.710	-0.767 ; 1.446	-0.902 ; 1.747

4. Dosages protéiques et du Fer

4.1. Test de Bradford

Pour l'échantillon de BioH_B : Concentration en protéine initialement utilisée : 1.1 mg/mL.

Faire la gamme d'étalonnage de **0 µg/mL à 10 µg/mL par tranche de 2 µg/mL**.

Cuve de spectroscopie à utiliser : celles en plastique avec le faible volume d'analyse (volume total : 1.100 mL)

Solution de bleu de Coomassie pour le test de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie dans 50 mL d'éthanol. Agiter vigoureusement. Ajouter 100 mL d'acide phosphorique 85 %. Compléter à 1 L avec de l'eau distillée. Filtrer pour enlever l'excès de bleu de Coomassie non dissout. Cette solution est stable 1 à 2 semaines au froid.

Attention : le complexe n'est stable que pendant un temps limité :

- Il faut préparer en même temps les mélanges pour la gamme étalon et pour les échantillons, à température ambiante.
- Il faut effectuer les lectures de la gamme étalon et des échantillons au même moment.

Le pigment forme un complexe avec les protéines : sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde maximale est déplacée de 495 nm à 595 nm.

Travail sur un volume total de **1.100 mL : 100 µL de solution de BLG + 1.000 mL de solution de brillant blue G**.

Préparation de la gamme d'étalon :

1. Concentration de la solution mère de BLG_B : 1.0 mg/mL

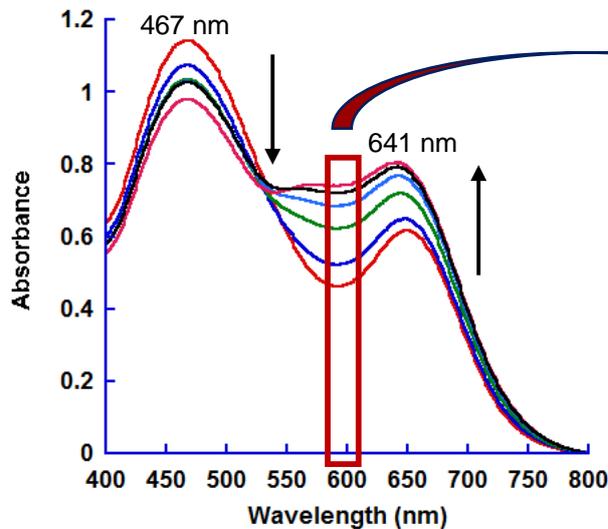
Il faut préparer une solution fille de BLG_B à 110 µg/mL pour que 100 µL de solution à 110 µg/mL soit à 10 µg/mL dans 1100 µL de tampon après dilution.

2. Préparation de la solution fille à 110 µg/mL : 0.110 mg/mL → 1.0 mL

1.0 mg/mL → 110 µL + 890 µL de solution tampon

Concentration (µg/mL)	0	2	4	6	8	10
Volume (µL) de solution à 110 µg/mL	0	20	40	60	80	100
Volume de tampon à ajouter (µL)	100	80	60	40	20	0

Puis ajout de 1.0 mL de solution saturée en Brilliant Blue G.



La courbe d'étalonnage suit l'équation de droite suivante :

$$Abs_{595} = 0.0360 \times [BLG] + 0.4628$$

$$R = 0.99464$$

Spectre UV-visible des différents échantillons pour l'établissement de la courbe d'étalonnage

4.2. Test au Rose Bengal

Pour l'échantillon de BioH_B : Concentration en protéine initialement utilisée : 1.1 mg/mL.

Faire la gamme d'étalonnage de **0 mg/mL à 2 mg/mL par tranche de 0.25 mg/mL** de BLG-B.

Cuve de spectroscopie à utiliser : celles en plastique avec le faible volume d'analyse (volume total : 1.100 mL). ATTENTION : prendre la cuve spectro de 1 mm de trajet optique d'électrochimie.

Travail sur un volume total de **1.100 mL : 1.0 mL de solution de BLG-B de concentration différente + 100 µL de solution de Rose de Bengal à 1 mg/mL.**

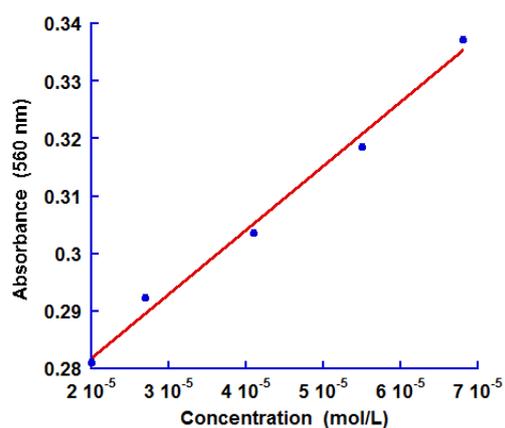
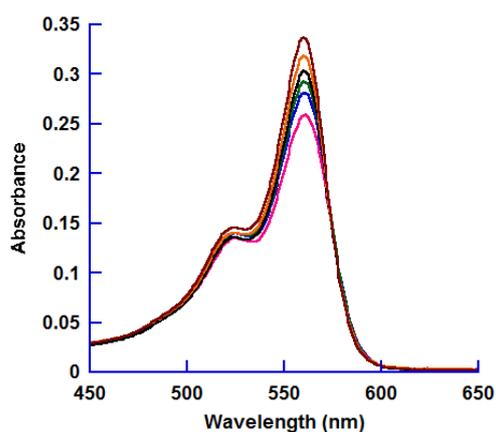
Préparation de la gamme d'étalon :

1. Concentration de la solution mère de BLG-B : 2.0 mg/mL dans tampon NBIC, pH 8, 10 mM.
2. Préparation de la gamme d'étalon :

Concentration (mg/mL)	0	0.125	0.25	0.375	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
Volume (µL) de solution à 2 mg/mL	0	62.5	125	187.5	250	375	500	625	750	875	1000
Volume de tampon à ajouter (µL)	1000	937.5	875	812.5	750	625	500	375	250	125	0

Concentration x 10 ⁻⁵ mol/L	0	0.68	1.4	2.0	2.7	4.1	5.5	6.8	8.2	9.6	10.9
---	---	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

- 100 μL de solution de Rose de Bengal à 1 mg/mL sont ajoutés à chacun des échantillons.
- Agitation vigoureuse des échantillons, puis incubation pendant 2 à 5 minutes à température ambiante.
- Ajout de 100 μL d'acide acétique dilué de moitié.
- Lecture de l'absorbance à 560 nm permet de remonter à la concentration protéique.
- Une fois la gamme d'étalonnage obtenue, la concentration en protéine des échantillons contenant le BioH-B peut être déterminée selon le même protocole.



$$\text{Abs}^{560} = 0.25966 + 1112.5 [\text{BLG}]$$

$$R = 0.99477$$

4.3. Titration du Fer(II) dans le complexe modèle $[(mL_5^2)Fe(II)Cl](PF_6)$:

Trois expériences ont été effectuées afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire du complexe $[(mL_5^2)Fe(II)(CN)]^+$ dans différents tampons.

	$\epsilon([(mL_5^2)Fe(II)Cl]^+) (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$	$\epsilon([(mL_5^2)Fe(II)CN]^+) (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$
PBS 10 mM pH 7.4	990	6080
NBIC 10 mM pH 8	1500	7200
HEPES 50 mM pH 8	4030	8530

Les dosages d'une solution de biohybride dans trois tampons différents ont été effectués. La concentration de chaque solution est déterminée à partir du coefficient d'extinction molaire de l'espèce $\text{BLG-Fe}^{\text{II}}\text{CN}$ spécifique au tampon.

4.4. Titration du Fe^{II} du complexe dans $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$

Tampon PBS 10 mM pH 7.4

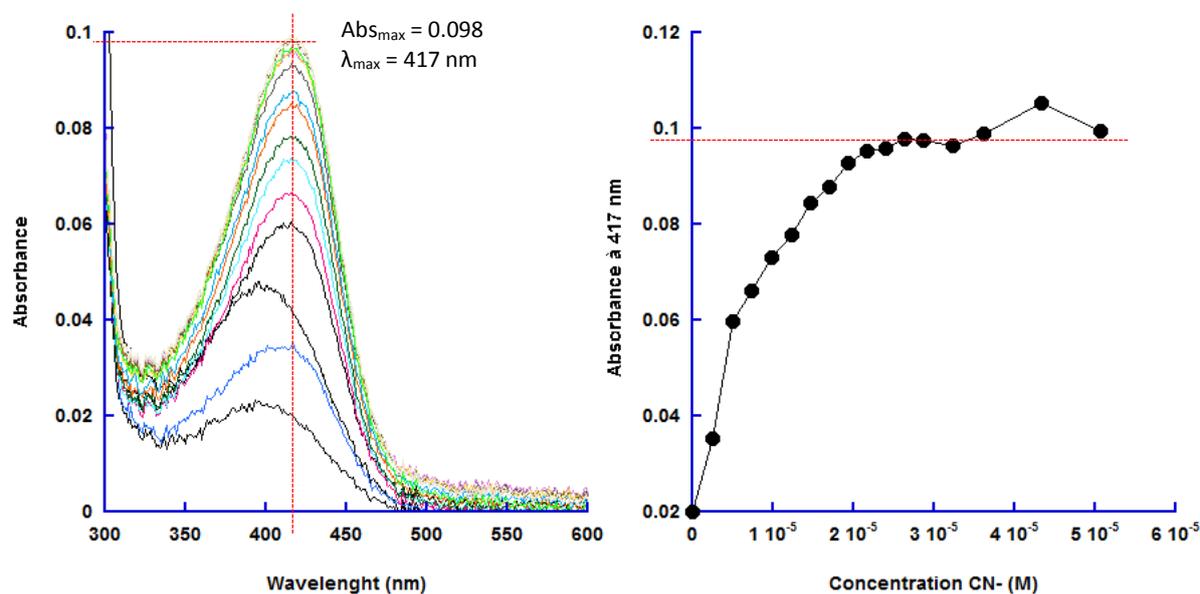


Figure 2 : **A gauche** : évolution de la transition MLCT des orbitales t_{2g} du Fe^{II} vers les orbitales π^* des pyridines de $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ suite à l'addition progressive de CN^- dans le tampon PBS 10 mM pH 7.4. **A droite** : Evolution de l'absorbance à 417 nm en fonction de la concentration finale de CN^- .

Tampon NBIC 10 mM pH 8

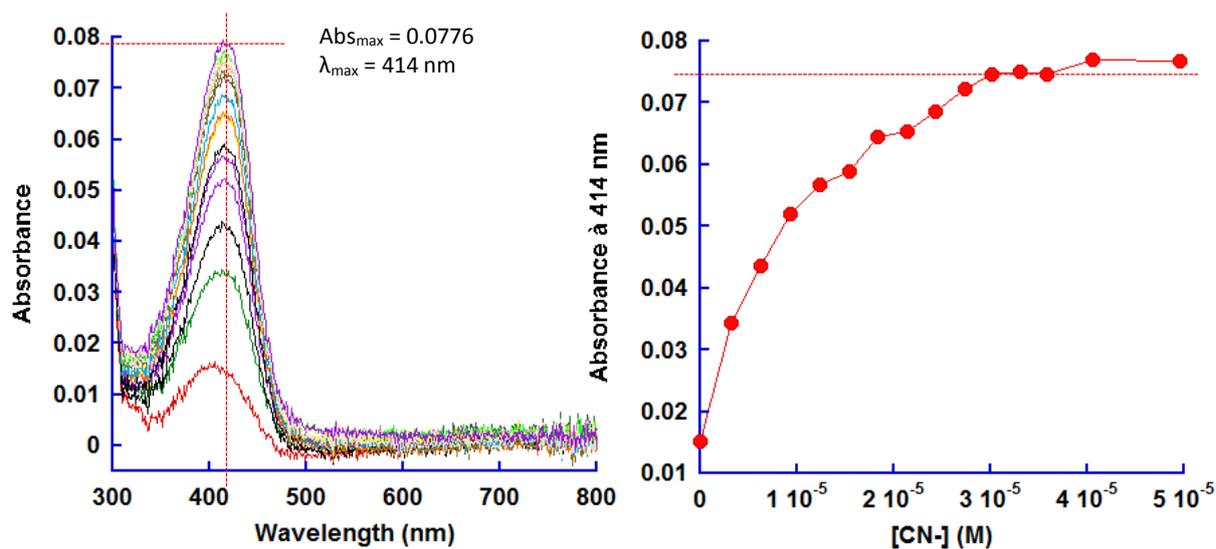


Figure 3 : **A gauche** : évolution de la transition MLCT des orbitales t_{2g} du Fe^{II} vers les orbitales π^* des pyridines de $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ suite à l'addition progressive de CN^- dans le tampon NBIC 10 mM pH 8. **A droite** : Evolution de l'absorbance à 414 nm en fonction de la concentration finale de CN^- .

Tampon HEPES 50 mM pH 8

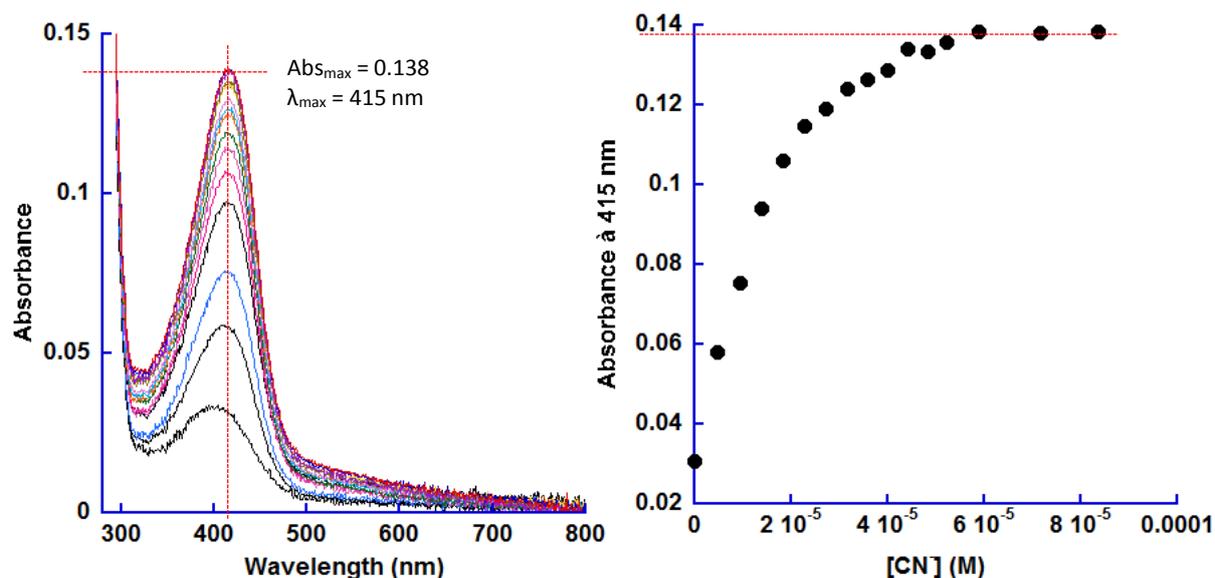
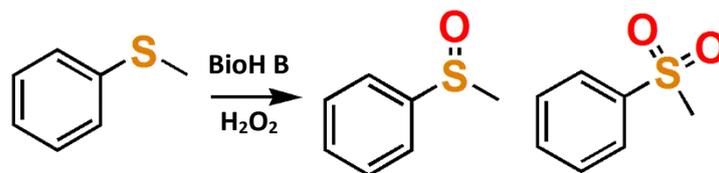


Figure 4 : **A gauche** : évolution de la transition MLCT des orbitales t_{2g} du Fe^{II} vers les orbitales π^* des pyridines de $\text{BLG-L}_5^2\text{Fe}^{\text{II}}$ suite à l'addition progressive de CN^- dans le tampon HEPES 50 mM pH 7.4. **A droite** : Evolution de l'absorbance à 415 nm en fonction de la concentration finale de CN^- .

5. Conditions de catalyse de sulfoxydation

5.1. Conditions de réaction



	BIOH B	H_2O_2	THIOANISOLE	
EQUIVALENTS	1	100	1000	
CONCENTRATION	0.026	2.6	26	mM
VOLUME	400	50	50	μL

5.2. Préparation des solutions mères:

H_2O_2 : prélever 100 μL de solution commerciale d'eau oxygénée (11.7 M) et diluer dans 9.9 mL d'acétonitrile ($C_1 = 0.117 \text{ M}$). Prélever 111 μL de cette solution et ajouter 389 μL ($C_2 = 26 \text{ mM}$). 50 μL de cette solution dans 450 μL correspondent à une concentration totale en H_2O_2 de 2.6 mM.

Thioanisole : Prélever 31 μL de thioanisole et diluer dans 9.97 mL d'acétonitrile ($C_f = 260 \text{ mM}$). 50 μL de cette solution dans 450 μL correspondent à une concentration totale en thioanisole de 26 mM.

Benzophénone (étalon) : 22 mg de benzophénone sont dissout dans 3 mL d'acétonitrile. ($C_i = 4.02 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$).

En parallèle, une réaction avec le complexe modèle $[(mL_5^2)Fe^{II}Cl](PF_6)$ est lancée. Une solution de ce complexe à $3.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a été préparée. Le complexe est dissout dans la solution tampon choisie.

Solution tampon utilisée : HEPES 50 mM pH 8

5.3. Extraction

L'extraction du sulfoxide et de la sulfone est effectuée de la façon suivante : 150 μL d'acétate d'éthyle sont ajoutés aux 500 μL de solution dans le vial. La solution est agitée vigoureusement 20 fois, puis est décantée (centrifugeuse : 2 min à 13 rpm). 100 μL de la phase organique sont prélevés à l'aide d'une micropipette et sont ajoutés dans un Eppendorf de 2 mL. Ce point est répété 2 fois supplémentaires. Ensuite la phase organique est séchée sur une pointe de sulfate de magnésium. La solution est filtrée sur du coton dans une pipette pasteur.

5.4. Vérification des temps de rétention et des solutions initiales

Conditions de la GC : 10 min à 180°C, puis 18°C par minute jusqu'à 240°C pendant 5 min. La colonne est de 0.25 mm de diamètre, 30 m de long et finesse du film : 0.25 μm .

Benzophénone : 5 μL de la solution + 300 μL d'acétate d'éthyle ($C_f = 6.59 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

Thioanisole : 50 μL de solution de catalyse + 450 μL d'acétate d'éthyle.

Molécule	Temps de rétention
Thioanisole	5.5 min
Benzophenone	17 min
Sulfoxide	13.1 min
Sulfone	14.1 min

5.5. Blancs

BLG + thioanisole

BLG + thioanisole + H_2O_2

H_2O_2 + thioanisole

Complexe + thioanisole

Les blancs sont effectués dans les tampons de l'étude.

5.6. Equations des courbes d'étalonnage

D'après la courbe d'étalonnage établie par Fabien Hammerer, les équations des courbes sont :

$$\text{Pour le sulfoxyde : } 0.4904 * A_{\text{sulfoxyde}} / A_{\text{étalon}} * [\text{étalon}] = [\text{sulfoxyde}] \quad R^2 = 0.98585$$

$$\text{Pour la sulfone : } 0.4971 * A_{\text{sulfone}} / A_{\text{étalon}} * [\text{étalon}] = [\text{sulfone}] \quad R^2 = 0.97911$$

Ainsi, à partir des rapports des aires en étalon et produit, il est possible de déterminer une concentration en sulfoxyde et sulfone, et un turn over number.

5.7. Préparation des échantillons pour la HPLC

La phase organique restant dans les vials de catalyse est récupérée et ajoutées à celles qui ont été injectées. Condition d'injection : colonne chiral OD-H (isopropanol/n-hexane (95/5 (v/v)), 1 mL/min) pour déterminer l'excès énantiomérique.

Références

- (1) Jollet, V., Université Paris Sud, 2011.
- (2) Britovsek, G. J. P.; England, J.; White, A. J. P. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 8125.

