



Année Universitaire : 2009-2010

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Synthèse et structure des complexes analogues du site
actif des métalloenzymes à cuivre**

Présenté par:

TOUGHZAoui Abdelilah

Encadré par:

- Pr. EL Houssine ALILOU
- Pr. Hanane TOUZANI

Soutenu Le 25 Juin 2010 devant le jury composé de:

- Pr. EL Houssine ALILOU.
- Pr. Hanane TOUZANI.
- Pr. Hassan GRECHE.
- Pr. Youssef Kandri Rodi.
- Pr . Mohamed EL Asri.

**Stage effectué à :Laboratoire des molécules bioactives : Structures et fonctions-
FST de Fès.**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: TOUGHZAOUI Abdelilah

Année Universitaire : 2009/2010

**Titre: Synthèse et structure des complexes analogues du site actif des
métalloenzymes à cuivre**

Résumé

Le travail que nous avons présenté se divise en trois parties

Une première concernant les métalloenzymes à cuivre : galactose oxydase l'Hémocyanine ,la tyrosinase la catéchol oxydase .DBH et PAM .

Une deuxième traite la modélisation chimique et les recherches réalisés sur les métalloenzymes à cuivre pour synthétiser des modèles chimiques .

Une troisième correspond aux travaux effectués au laboratoires en essayant de synthétiser des analogues chimique pouvant être des modèles chimiques pour les métalloenzymes à cuivre :Hémocyanine et tyrosinase

Mots clés : Métalloenzymes ; cuproprotéines ; monooxygénases à cuivre ; complexes de cuivre ;Site actif ; modèles chimique



Introduction

Ce mémoire de fin d'études s'insère dans un thème de recherche générale concernant la modélisation du site actif de métalloenzyme.

La modélisation chimique consiste à reproduire artificiellement des propriétés essentielles d'un ou plusieurs systèmes biologiques. En exploitant des mécanismes de la nature pour les appliquer dans différents domaines technologiques. En accédant à de nouvelles structures et interfaces moléculaires capables de reproduire certaines fonctions de l'organisme.

la synthèse organique de ligands repose sur la conception de complexes généralement de poids moléculaire assez faibles qui copient ou s'approchent des sites actifs biologiques en termes de composition, type de ligands, structure et degrés d'oxydation. De tels modèles, ou analogues synthétiques, ne peuvent pas bien évidemment simuler strictement les effets stériques et les contraintes structurelles imposées par la conformation de la protéine entière. on parle de deux type de synthèse.

- **Synthèse des analogues structuraux**, qui reproduisent la structure du site actif enzymatique ce qui permet des études approfondies des caractéristiques et propriétés du site actif sans pour autant être gêné par la matrice protéique.

- **Synthèse des analogues fonctionnels**, qui reproduisent la réaction catalytique qui transforme le substrat en produit comme le fait la métalloenzyme sans pour autant conserver systématiquement les mêmes rendements et stœchiométries.

Il est possible d'obtenir un modèle fonctionnel qui ne soit pas un bon modèle structurel mais idéalement un modèle structurel très fidèle à l'enzyme sera probablement un bon modèle fonctionnel.

Dans notre étude on va focaliser sur la **Galactose oxydase** la **DBH** le **PAM**, l'**Hémocyanine** la **Catéchol oxydase** .qui sont des cupro-enzyme servent à transporter l'oxygène et en particulier la transformation de substrat organique.



Liste des abréviations

Cys	Cystéine
Met	Méthionine
His	Histidine
PAM	Peptidylglycine α -Amidating Monooxygénase
PHM	Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygénase
PAL	Peptidyl α -hydroxyglycine α -Amidating Lyase
DBH	Dopamine β -Hydroxylase
Hc	Hémocyanine
Tyr	Tyrosinase
GO	Galactose Oxydase
CO	Catéchol Oxydase
Exafs	Extended x-ray absorption fine structure
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
IR	Infra-Rouge
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
UV-vis	Ultraviolet-visible
KDa	Kilo Dalton
nm	nano-mètre



Table de matières

Introduction	
Chapitre I: Métallo enzymes à cuivre	
I-1 Métalloprotéine et cuivre	1
I-1-1 Définition	1
I-1-2 Chimie de cuivre	2
I-2 Galactose oxydase	3
I-2-1 Définition	3
I-2-2 Structure de site actif	4
I-3 Dopamine β hydroxylase et PAM : Peptidylglycine α -Amidating	5
I-3-1 Définition	5
I-3-2 Structure du DBH	6
I-3-3 Mécanisme catalytique	7
I-4 Hémocyanine	8
I-5 Catéchol oxydase	9
I-5-1 Définition	9
I-5-2 Caractérisation spectroscopique de la CO	10
I-5-3 Structure de la CO	10
I-5-4 mécanisme d'action propose pour la CO	12
CHAPITRE II : Modélisation chimique des cuproproteines	
Introduction	16
II-1-Modèles fonctionnel de l'hémocyanine :	17
II-1-1. Espèce μ - η^2 : η^2 peroxy	20
II-1-2. Espèce μ -1,2 peroxy trans	20
II-2 Modèle bi nucléaire : modèle de tyrosinase	20
II-2-1 Modèle de Karlin	20
II-2-2 Modèle de Réglie	22
Chapitre III : Partie expérimentale : synthèses de analogues chimiques.	
Introduction	25
III-1 Complexes mononucléaire	25
III-1-1 Préparation d'analogues 20 et 21	25
III-1-2 Préparation des complexes 20a et 21a	26
III-2 complexes bi nucléaire	27
III-2-1 Préparation de ligands 25 et 26	27
III-2-2 Préparation des ligands 29 et 30	29
Résultats et discussion	31
Matériels et méthodes	
1-Instrumentation	31
2-Complexes mononucléaire	31
2-1 Préparation de analogues 20 et 21	31
2-1-1 Mode opératoire	31
3-Complexes binucléaire	38



3-1 Préparation de ligands 25 et 26	38
3-1-1 Mode opératoire de la préparation du chlorure d'acide.....	38
3-1-2 Mode opératoire 25 ,26	38
3- 2 Préparation de ligands 29 et 30.....	39
3-2-1 Mode opératoire	39

Conclusion

Bibliographie

I-1 Métalloenzymes à cuivre.

I-1-1 Définitions.

Une **enzyme** est une molécule permettant d'abaisser l'énergie d'activation d'une réaction et d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire sans modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction : ce sont des catalyseurs biologiques (ou biocatalyseurs).

métalloprotéine est le terme générique pour toute protéine qui comporte un cofacteur métallique ; ce dernier peut être un ion directement lié aux chaînes latérales des acides aminés de la protéine ou peut être coordonné à un ligand non protéinique.

La fonction des **métalloprotéines** est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques faibles. Une fois fixés, les substrats vont réagir et se transformer en produit.

En effet, le rôle prédominant des **métalloenzymes à cuivre** est l'activation du dioxygène et l'oxydation d'un substrat qui en découle. (figure 1) Logiquement, le cuivre en biologie ne permet que des réactions à un électron alternant entre les degrés d'oxydation Cu(I) et Cu(II). Le degré d'oxydation Cu(III) est considéré comme inaccessible à cause du haut potentiel redox du couple Cu(III)/Cu(II) ($E^\circ \approx +2,3V$ / ENH à 25°C) dans les complexes qui possèdent des ligands d'acides aminés (typiquement imidazole ou phénolate).

Dans ces métalloenzymes, le cuivre peut se trouver sous des configurations mononucléaires ou multinucléaires (généralement binucléaires)

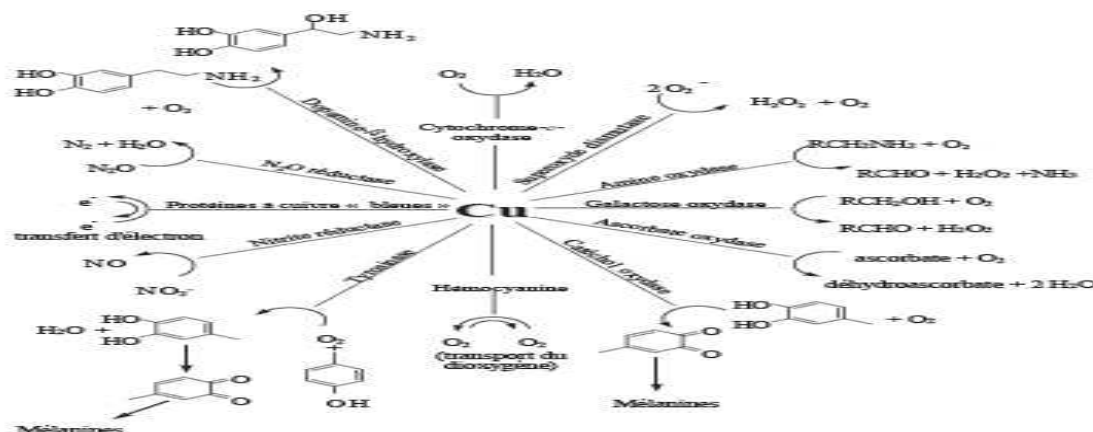


Figure1 : différents réactions que catalysent les métalloenzymes à cuivre .

I-1-2.Chimie de cuivre



On peut rencontrer quatre états d'oxydation pour le cuivre : $\text{Cu}^{(0)}$, $\text{Cu}^{(I)}$, $\text{Cu}^{(I)}$ et $\text{Cu}^{(III)}$ [4-5] plus rare. Les degrés I et II sont les états d'oxydation du cuivre les plus fréquents que l'on trouve dans les metalloenzymes. De nombreuses études physicochimiques sur le cuivre [6,7] ont montré que la géométrie autour de ce dernier était étroitement liée à son degré d'oxydation (I et II) : Le $\text{Cu}^{(I)}$ est diamagnétique ($3d^{10}$), les coordinations possibles sont **deux** (géométrie linéaire), **3** (géométrie trigonale) ou **4** (géométrie tétraédrique). Il est stabilisé par des ligands (mous) contenant des atomes de soufre et d'azote (imine, pyridine, cystéine, histidine...).

Le $\text{Cu}^{(II)}$ est paramagnétique ($3d^9$), les coordinations possibles sont 4 (usuellement géométrie plan carré), 5 (géométrie bipyramide à base trigonale ou pyramide à base carrée) ou 6 (géométrie octaédrique mais très rare). Avec la coordination 6, l'effet de **Jahn Teller** exclut de l'octaèdre régulier.

Ces metalloenzymes utilisent par la plupart d'entre elles le dioxygène comme agent d'oxydation. D'une grande diversité, les centres actifs à cuivre des metalloenzymes ont été classés par type [1-3].

-type I : (les cuproprotéines bleues) : elle sont impliqués dans le transfert d'électrons ; le centre actif est mononucléaire (exemple : azurine, plastocyanine).

-type II : ce type d'enzymes est impliqué dans la catalyse de réaction redox (exemple : galactose oxydase, DBH).

-type III : ces enzymes catalysent l'activation ou le transport d'oxygène. Le centre actif est binucléaire et les atomes de cuivre sont couplés magnétiquement dans l'état oxydé (exemples : hémocyanine, tyrosinase, catéchol oxydase). Ceci est illustré dans la figure 2.

	Type I	Type II	Type III	Type Cu_A	Autres
Etat	Mononucléaire	Mononucléaire	Dinucléaire	Dinucléaire	Polynucléaires
Spécificité, fonction biologique	Transfert d'électrons	Catalyse, réactions redox, oxydases	Activation de O_2 pour le transport et l'oxygénation	Transfert d'électrons	Oxydases, oxygénases
Exemples d'enzyme	Plastocyanine, azurine	<i>Galactose oxydase</i> , superoxyde dismutase, Cu_B (Cyt c oxydase) dopamine- β -hydroxylase	Hémocyanine, tyrosinase, catéchol oxydase	N_2O réductase, cytochrome-c-oxydase	Méthane monoxygénase, laccases, ascorbate oxydase...
Atomes coordonnants	S^- (Cys), 2 N (His), S (Met)	Généralement 3 N (His) + 1 site vacant	S^- (Cys), 2 N (His), S (Met)	2 S^- (Cys), 2N (His), S^- (Met)	N (His), OH^- (ou ^-OOH)
RPE	Faible couplage hyperfin	Généralement classique d'un système $\text{Cu}^{(II)}$	Silencieuse	Faible couplage hyperfin	Non silencieuse
UV-Vis	LMCT ^(a) $\text{Cys}^- \rightarrow \text{Cu}^{(II)}$	Pas de LMCT ^(a) intense	LMCT ^(a) $\text{O}_2^{2-} \rightarrow \text{Cu}^{(II)}$	Absorption dans le proche IR	LMCT ^(a) $\text{O}_2^{2-} \rightarrow \text{Cu}^{(II)}$

(a) : « Ligand to Metal Charge Transfert » : bandes de transfert de charge du ligand vers le métal.

Tableau 1: propriétés des différents centres à cuivre

Tableau 1: Classification de cuproprotéines selon le type de cuivre.

I-2 Galactose oxydase

I-2-1 Définition

La galactose oxydase $\text{GO}^{[8]}$ est une metalloenzyme à cuivre de poids moléculaire 68,5 kDa de type II isolée d'un champignon (dactylium dendroïdes entre autre). Elle fait parti de la classe des

oxydase radicalaire. Elle catalyse l'oxydation à 2 électrons du D-galactose en présence de dioxygène avec arrachage de l'hydrogène **pro-s** du substrat (fig2). Les produits de réaction sont le sucre oxydé (D-galactose) et le peroxyde de l'hydrogène ^[9].

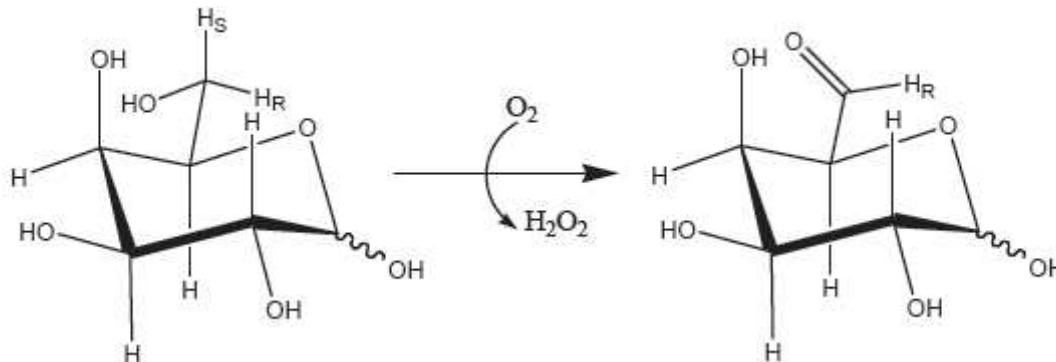


Figure 2 : oxydation de D galactose par la GO

Cependant, il est intéressant de noter que l'enzyme accepte comme substrats, en plus du D galactose, un très grand nombre d'alcool primaire incluant d'autres sucres (D-glucose, L-lactose...), des alcools aliphatiques (méthanol, glycérol ...) et des alcools aromatiques (alcools benzylique) ^[8].

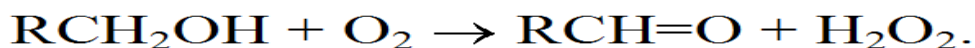


Figure 3 : Oxydation des alcools par la GO.

A noter que les alcools secondaires ne sont pas oxydés : l'enzyme est très sélective sur la classe de l'alcool, mais peu sélective sur la nature de l'alcool primaire.

Cette faible sélectivité vis-à-vis du substrat de type alcool primaire, qui peut apparaître surprenante pour une enzyme n'est qu'un (défaut) apparent. Il est fort probable que la fonction physiologique de la GO ne soit pas l'oxydation même du substrat, mais plutôt la production d'eau oxygénée : cette dernière aurait un rôle bactéricide ^[8] ou (carburant) pour les peroxydases extracellulaires (lignine peroxydase) comme c'est le cas pour la Glyoxal oxydase ^[9].

I-2-2. Structure du site actif

La structure par diffraction de la GO a été résolue par Ito et al ^[10] en 1994 sous sa forme inactive intermédiaire [Cu(II)-o-Ar], avec une résolution de 1,7 Å, en milieu tampon acetate. La protéine de poids moléculaire 68 kDa, contient 639 acides aminés répartis en trois domaines structuraux ^[11,56] : Les domaines I, II, III. C'est dans le domaine II où se trouve le site actif.

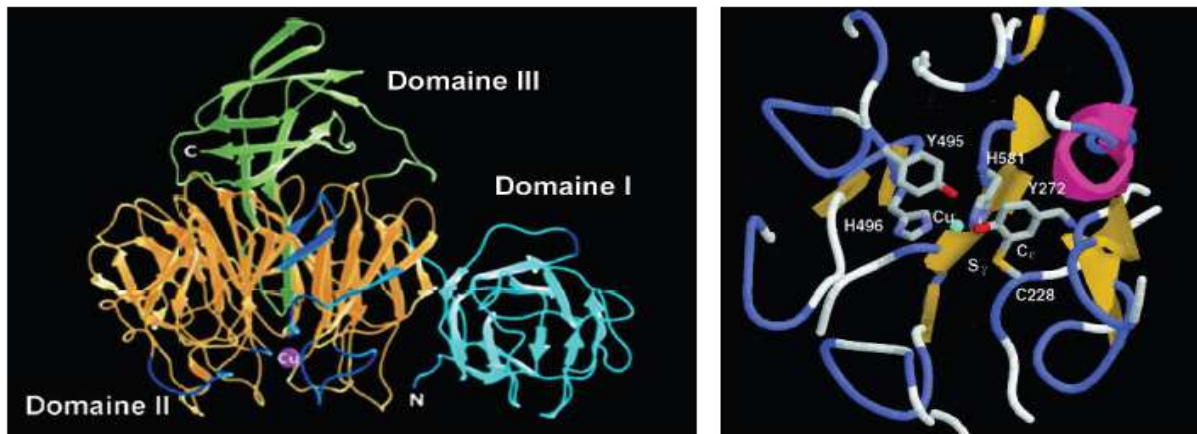


Figure 4 : à gauche :structure cristallographique de la GO (domaine I en cyan,domaine II en orange,domaine III en vert, le cuivre est représenté par un disque violet) ;à droite :agrandissement du site actif .

Un fait remarquable est la présence d'un lien thioether entre le soufre du Cys-228 et le Tyr-272 ^[10] (en position ortho de la fonction phénol de la tyrosinase), qui module la réactivité de cette tyrosine comme nous le verrons par la suite :

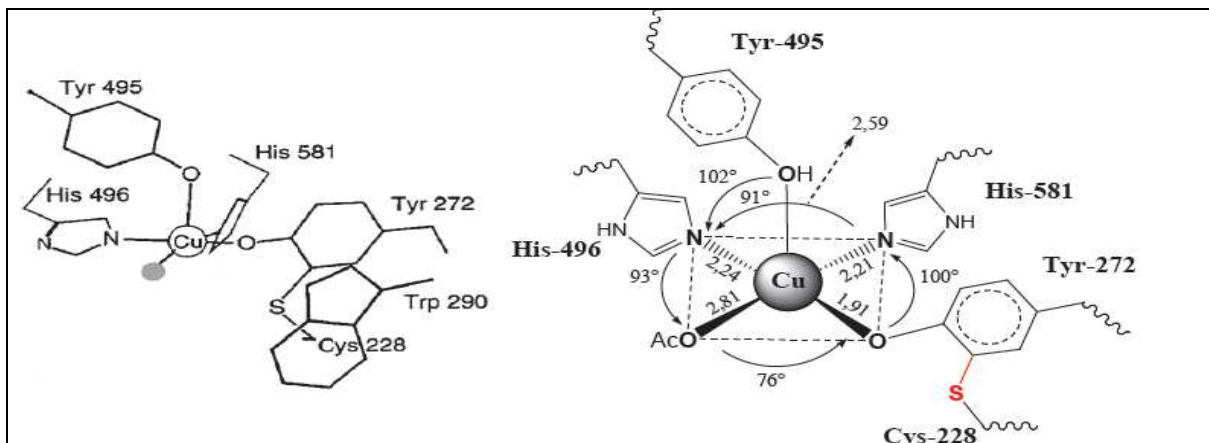


Figure5 :structure cristallographique simplifié du site actif (à gauche),le solvant exogène est indiqué par un disque gris) et quelques distances(A°) et angles(°) (à droite) ; la liaison covalente avec le résidu Cys-228 est en rouge .

I-3. BDH :Dopamine β -Hydroxylase et PAM :Peptidylglycine α -Amidating.

I-3-1. Définition.

La **DBH** est un cupro-protéine qui catalyse l'hydroxylation de la dopamine vers le norepinephrine (noradrénaline), alors que le **PAM** catalyse la biosynthèse des hormones peptidiques qui contiennent un amide dans son c – terminal .(figure 6a).

La **PAM** est un cupro-proteine de poids moléculaire de 120 KDa ^[12] possède deux domaines différents :**PAM** : peptidyl glycine α - hydroxylating mono oxygénase , le domaine du **PHM** correspond à l'activité du monooxygénase ;le domaine du **PAL** correspond à l'activité du lyase .(figure 6b).

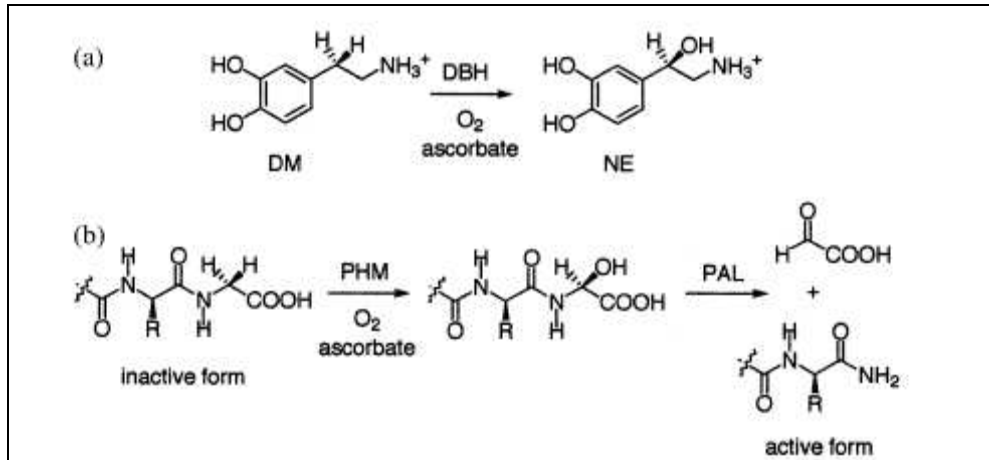


Figure 6 : réactions catalysés par DBH(a) et PAM(b).

Indépendant de ce fait les deux enzymes catalyse l'insertion stéréospécifique d'un atome d'oxygène dans la liaison C-H, DBH et PAM montrent une forte similarité première en tous. Les deux s'impliquent dans la biosynthèse des neurotransmetteurs. Chaque enzyme catalyse de très importantes réactions dans différents chemins biologiques liés aux centres et des périphérique du système nerveux des mammifères. De plus ces deux enzymes montre une analogie structurale et une similarité de réaction de contrôle et dans la séquence homologique [13][67].

Bien que DBH était le sujet de beaucoup d'étude structurales, il ya pas de donnée cristallographique spécifique à cette enzyme alors que la structure par rayon X des domaine de PHM et PAM était récemment résolu [14]. Cette structure confirme que le domaine PHM contient le cuivre de type II dans son site actif :

Ce site actif de la PHM est constitué par deux atomes de cuivre Cu_A et Cu_B et la distance qui les sépare est de 11Å. Cu_A est coordonné à 3 histidine et une molécule d'eau, alors que Cu_B est lié à deux histidines et une mélanine dans sa forme réduite. (figure 6)

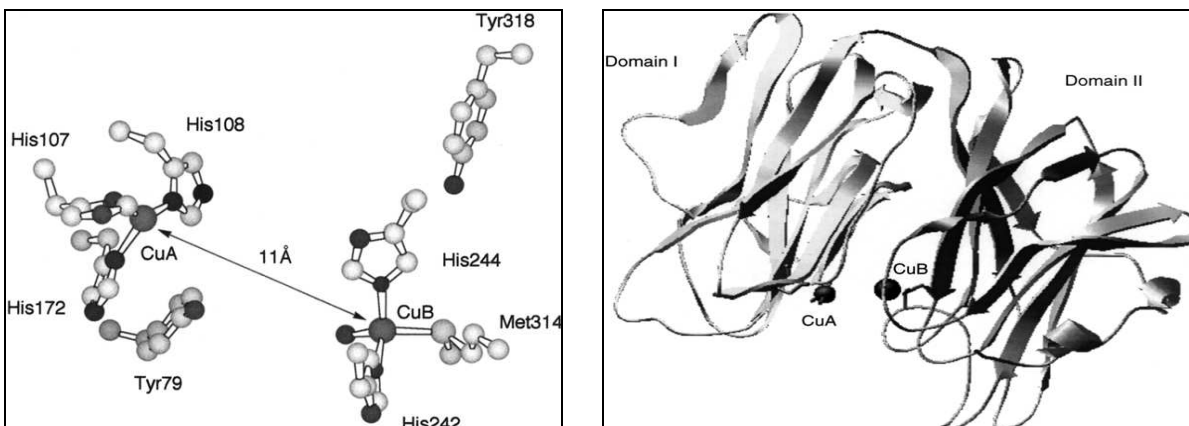


Figure 6 : Site actif de la PHM .

I- 3- 2structure de DBH

La DBH existe sous deux formes une soluble et l'autre membranaire. La difficulté résidant dans la détermination de sa structure implique plusieurs interprétations mais la plus proche est que les deux atomes de cuivre situés dans son site actif ne sont pas couplés magnétiquement et auraient des fonctions distinctes Cu_B s'implique dans la réaction d'hydroxylation de la dopamine via l'espèce hydroperoxo de $Cu(II)$ alors que Cu_A servirait de relais dans le transfert des électrons vers le premier site.

I-3- 3 Mécanisme catalytique du DBH

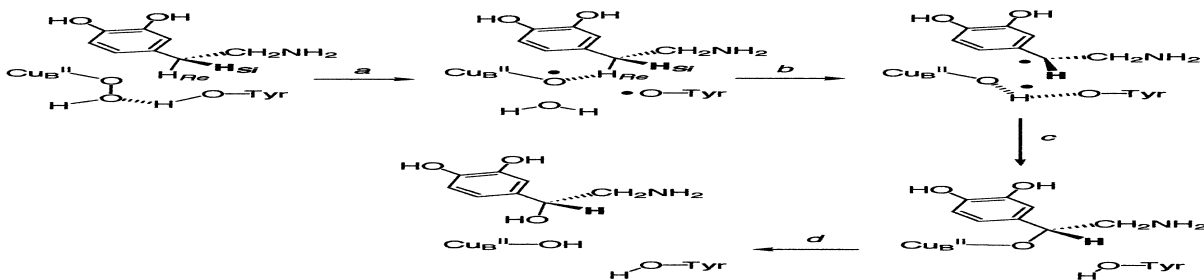


Figure 7: mécanisme catalytique de l'hydroxylation de la DBH proposé par klinman .

Etape a: l'interaction du DBH avec l'oxygène moléculaire conduit à l'espèce hydroperoxo du cuivre $Cu(II)$ OOH qui est l'intermédiaire formé par l'activation de l'oxygène. [15]

Etape b : le clivage homolytique de la liaison hydroperoxo assisté par le tyrosine, produit avant que le substrat est activé par la formation de l'espèce radicalaire très réactif $Cu(II)$ supposé associé avec le tyrosine $O\cdot$.

Etape c: la réaction commence par l'abstraction de l'hydrogène **pro R** benzylique pour donner le benzène radicalaire.

Etape d: la recombinaison du radical antérieur de l'espèce $Cu(II)O\cdot$ avec le radical benzylique produit avec la rétention de configuration et forme une liaison cuivre alkoxide qui s'hydrolyse et se dissocie dans le site actif. Ceci a été démontré par Réglie et col. en utilisant l'amino-indole comme substrat (figure 8). Et voici le schéma

:

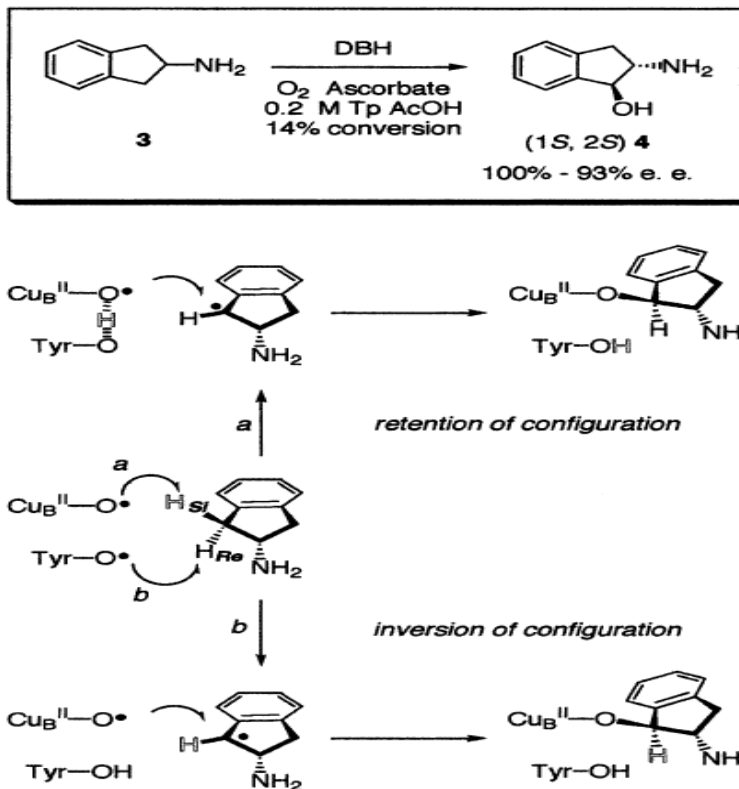


Figure 8: Mécanisme de formation de (1S,2S)-2-amino-1-indanol(4) montrant la rétention ou l'inversion de la configuration du carbone benzylique.

I-4 Hémocyanine :

Il existe deux sources majeures d'hémocyanine : l'hémocyanine des mollusques et l'hémocyanine des arthropodes. La structure^[16] de ces deux types d'hémocyanines diffère complètement l'une de l'autre. Celle des arthropodes est un hexamère (ou multihexamère) dans les sous-unités ont une masse moléculaire de 75 kDa. Celle des mollusques est un oligomère cylindrique de masse moléculaire égale ou supérieure à 400 kDa^[17-28]. La structure cristallographique de l'hémocyanine extraite d'un arthropode (*Panulirus interruptus*), montre que cette cuproprotéine est un hexamère : chaque sous-unité comprend une paire d'ions cuivre responsable du transport de l'oxygène moléculaire^[18-19]. Chaque atome de cuivre est tri-coordonné. Des études spectroscopiques^[20-21] sur la forme oxy-HC ont fourni une description détaillée sur la nature de la géométrie de l'oxyhémocyanine. Des études par résonance RAMAN^[18-20], spectroscopie optique^[22], et CD^[22] ont montré que les deux atomes de cuivre sont fortement couplés antiferromagnétiquement^[20] ce qui est bien une caractéristique des centres binucléaires de type 3. En 1994, la résolution structurale par diffraction des rayons X^[23] d'une hémocyanine extraite d'un arthropode (*Limulus polyphemus*) qui est une cuproprotéine de poids moléculaire 3.3103 kDa et est composée de 48 sous-unités^[24-25] divisées en 8 hexamères. Chaque sous-unité a un poids moléculaire de 73 kDa et contient deux atomes de cuivre par site actif^[26]. La géométrie autour de chaque atome de cuivre se trouve dans un environnement de pyramide à base carrée et est lié à trois histidines. La nature de l'oxygène ponteur entre les deux atomes de cuivre est de la forme $\mu-\eta^2:\eta^2$. (figure 9).

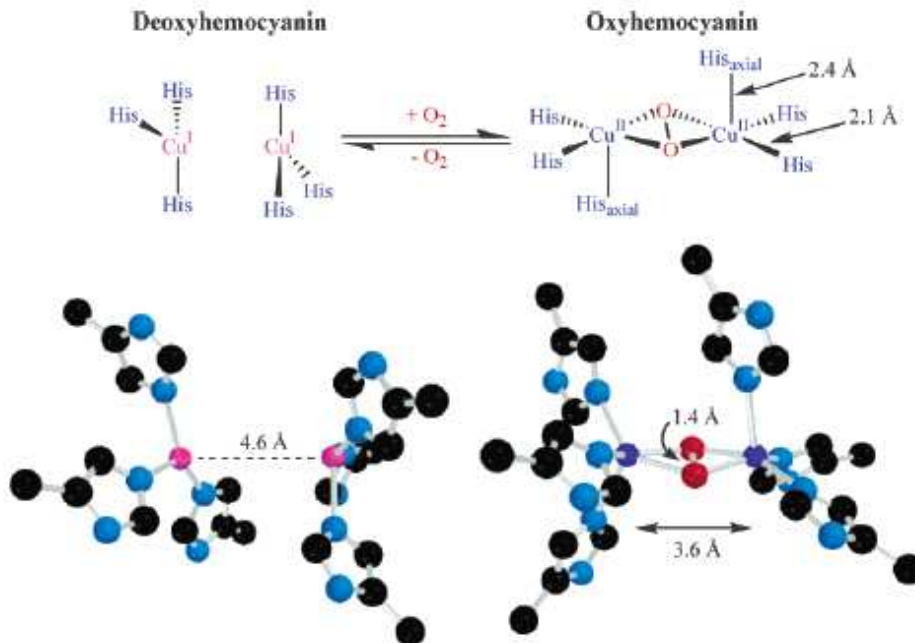


Figure 9 : site actif de l'hémocyanine [66].

I- 5 La Catéchol Oxydase et Tyrosinase

I-5-1 Définition

La Catéchol Oxydase (CO) est une cuproenzyme de type III (binucléaire couplée) qui catalyse l'oxydation des catéchols (*o*-diphénol) en *o*-quinones correspondantes en présence d'oxygène. La tyrosinase (Tyr), une autre cuproenzyme de type III, possède en plus de l'activité oxydase, une activité monooxygénase (activité crésolase) qui lui permet de transformer les phénols en *o*-diphénols

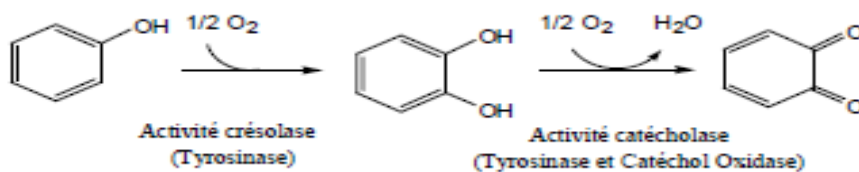


Fig. 10 : activité crésolase et cathécolase de GO et Tyr) [27] .

La CO est présente chez les plantes, quelques crustacés et les insectes [28] De nombreuses fonctions lui sont attribuées chez plantes supérieures en fonction de sa location. [29] Elle est



impliquée dans la photosynthèse et la coloration des fleurs. Sa fonction la plus vraisemblable serait son rôle dans la résistance des plantes supérieures aux agents pathogènes et les insectes. En effet, l'auto-polymérisation de l'*o*-quinone en mélanine polyphénolique aurait une action protectrice vis-à-vis des agents pathogènes ou insectes. La CO est utilisée pour diagnostiquer la présence des catécholamines hormonales comme la dopamine, l'adrénaline ou noradrénaline.^[30]

La CO a été identifiée la première fois en 1937.^[31] Par la suite, la CO a été purifiée d'une grande variété de plantes et de fruits (pomme de terre, pomme, épinard et litchi). En 1965, quelques isoenzymes de la CO ont été identifiées chez *Ipomoea batatas* (patate douce, ibCO). Une enzyme de 33 kDa a été séparée et nommée *p*-D glucose hydroxylase et plus tard renommée Catéchol Oxydase.^[32]

Les deux fractions de masse molaire (une comprise entre 38 et 45 kDa, l'autre entre 55-60 kDa) sont trouvées en fonction de la localisation et l'organisme. Des enzymes de plus petites masses (30 kDa) sont également isolées, mais elles proviennent de la protéolyse de protéines matures.

I-5 -2 Caractérisation spectroscopique de la CO

Sous sa forme *met* {Cu^{II}-Cu^{II}}, les deux cuivres(II) sont couplés magnétiquement ($-2J > 600 \text{ cm}^{-1}$) avec un état de spin $S=0$ caractéristique d'un centre de type III. Un signal RPE est cependant détectable après la dénaturation de l'enzyme. Le spectre UV-vis de l'enzyme native d'ibCO montre des bandes caractéristiques à 290 et 690 nm. Cette dernière est très faible et peut être attribuée à la transition d-d du Cu^{II} dans une géométrie plan carré.

La forme *oxy* bleue {Cu^{II}-O₂²⁻-Cu^{II}} est obtenue par addition de peroxyde d'hydrogène à une solution de la forme *met*. Cette forme est caractérisée dans son spectre UV-vis par deux absorbances maximales à 343 nm ($\epsilon=6500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) et à 580 nm ($\epsilon=450 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Ces deux bandes sont attribuées à la transition de transfert de charge O₂²⁻ → Cu^I.

La première étude en résonance Raman d'ibCO a montré la présence d'une bande à 749 cm⁻¹ (vibration *stretching* O-O) indiquant une liaison $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ d'un groupement peroxy. Le spectre de résonance Raman de l'*oxy*-CO de feuille de peuplier noir (*Populus nigra*) présente une bande plus intense à 277 cm⁻¹. Par analogie avec le spectre Raman de l'*oxy*-Tyr et l'*oxy*-Hemocyanine (Hc), cette bande est attribuée à la liaison Cu-N_{ax} (histidine axiale).^[27]

Une étude EXAFS de la forme *met*-ibCO a révélé que la sphère de coordination des cuivres contient trois histidines et une molécule d'oxygène et que la distance Cu-Cu est de 2.9 Å. Pour la forme *oxy*, cette étude a montré que la distance Cu-Cu est de 3.8 Å et que la coordination des atomes de cuivres est constituée de quatre atomes donneurs N/O.^[33]

I-5-3 La structure de la CO

La détermination de la structure monomérique de la *met*-ibCO (39 kDa) par diffraction des rayons X de CO a été obtenue avec une résolution de 2.5 Å.^[34] Elle a permis de mieux comprendre son mécanisme d'action. La *met*-ibCO possède une forme ellipsoïdale avec des axes d'environ 55, 45 et 45 Å. La structure secondaire est dominée par 6 hélices α , dont quatre d'entre-elles incorporent le centre catalytique binucléaire (Fig. 13).

Les deux atomes cuivriques sont coordonnés par trois atomes d'azote d'histidine confirmant l'étude EXAFS. Un point important révélé par cette étude est la présence d'une liaison covalente entre la Cys92 et l'His109. Ce type de liaison avait déjà été observée dans la structure de Tyr de *Neurospora crassa*^[35] et Hc d'*Octopus dofleini*.^[45]

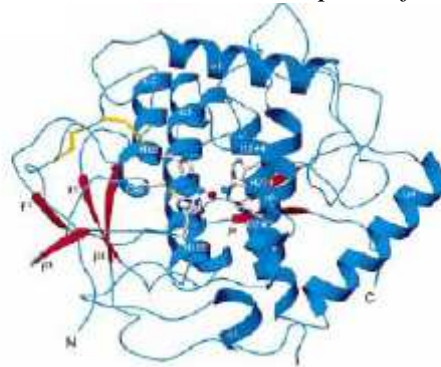


Figure 11. Structure de l'ibCO obtenue par diffraction des rayons X.^[34]

-Les centres bicuivrique en états différents

A. Forme met

Dans la forme *met* les deux cuivres sont distants de 2.9 Å et ont une sphère de coordination de type pyramide à base triangulaire constituées par 3 histidines (Cu A : His109 et His 88 et His 118). CuB : His 240 et His 244 , His 274 et l'oxygène d'une molécule d'eau qui lie des cuivres(II) (Fig. 12).

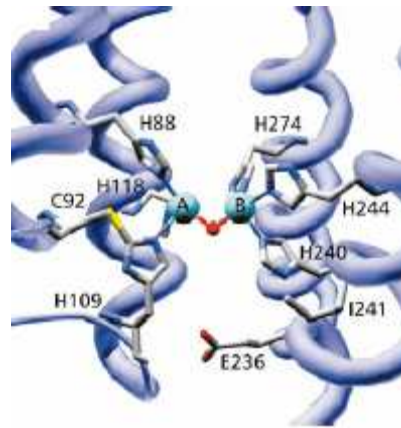


Figure 12. La sphère de coordination de centre actif binucléaire à cuivre de *met-ibCO*.^[43]

B. Forme deoxy

La structure RX de la forme *deoxy* a révélée que la distance de $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$ est augmentée à 4.4 Å. La coordination autour de Cu_B est plan carré (3 histidines), alors que celle autour de Cu_A est pyramide à base triangulaire déformée (3 histidines, molécule d'eau).

I -5 -4 Mécanisme d'action proposé pour la CO.

Tyr et CO possèdent de nombreux points communs structuraux qui se traduisent par de très fortes analogies au niveau de leur mécanisme. Grâce aux données biochimiques, spectroscopiques et structurales accumulées pour la Tyr et la CO, un mécanisme d'oxydation a été proposé par Solomon et coll. (Fig. 12).^{[27],[37]}

Ce mécanisme propose que le cycle crésolase commence par la forme *oxy* car celle-ci est présente à 15% dans la Tyr (85% pour la forme *met*). Lors de la première étape, le phénol se lie à la forme *oxy* pour être oxydé en catéchol. Cette réaction libère la forme *met* qui réagit ensuite avec un catéchol pour former un complexe bidentate.

Cette forme conduit à la formation de la quinone et de la forme *deoxy* qui est reoxydée en forme *oxy* par réaction avec le dioxygène (**cycle A**).

Le mécanisme proposé pour l'activité catécholase peut commencer indifféremment par les formes *oxy* ou *met*. En effet, le substrat catéchol peut se lier à la forme *met* comme précédemment décrit produisant l'*o*-quinone et la forme *deoxy* de l'enzyme, mais également sur la forme *oxy* (cycle **B**) pour conduire à la forme *met* avec production concomitante de quinone.

Il a été aussi observé qu'un excès de phénol pouvait causer l'inhibition temporaire de la Tyr. Cette inhibition est due à la réaction d'un excès de phénol avec la forme *met*-Tyr (voie C).

L'activité crésolase peut être réactivée par un excès de catéchol qui déplace le phénol lié à la forme *met*-Tyr et permet ainsi la continuation du cycle catalytique. Grâce aux structures de Tyr et CO, il est proposé que la différence entre CO et Tyr réside dans l'accès du substrat au Cu_A. En effet, dans *ib*-CO, cet accès est bloqué expliquant pourquoi cette enzyme ne possède pas d'activité crésolase [38].

Mécanisme de fonction de CO :

Sur la base des informations structurales et spectroscopiques ainsi que le mécanisme catalytique proposé pour la CO et la Tyr, nous nous sommes intéressés aux nouveaux complexes comme modèles structuraux et fonctionnels de la CO. [57]

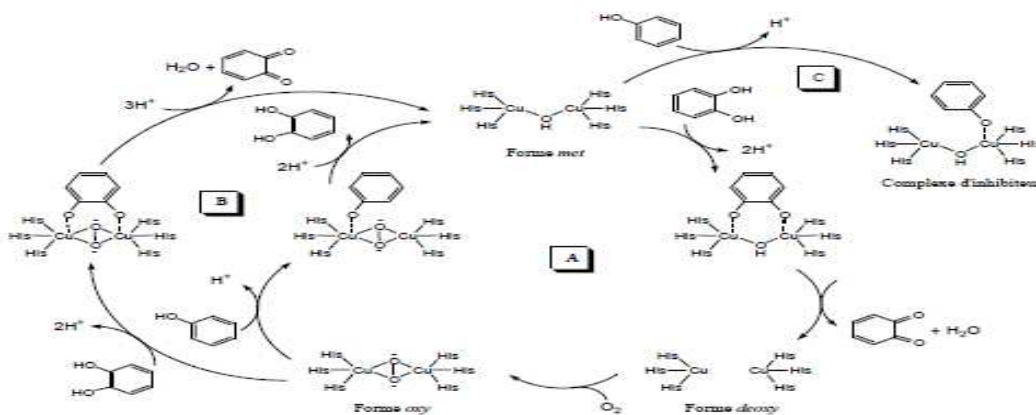


Figure 13 : Mécanisme proposé par Solomon et coll. en incluant les résultats plus récents concernant l'activité crésolase et catécholase de Tyr et/ou CO.



Chapitre II

Modélisation chimique des cuproproteines

Introduction

La stratégie consiste à préparer des complexes modèles des métalloenzymes à cuivre en s'inspirant du site actif de ces enzymes. Ces modèles doivent respecter à la fois le nombre de coordination autour de l'atome du cuivre (modèles structuraux), ainsi que leur réactivité avec l'oxygène moléculaire vis-à-vis de leurs substrats organique comme il le fait l'enzyme (modèles fonctionnels). Ceci est illustré dans la figure ci-dessous :

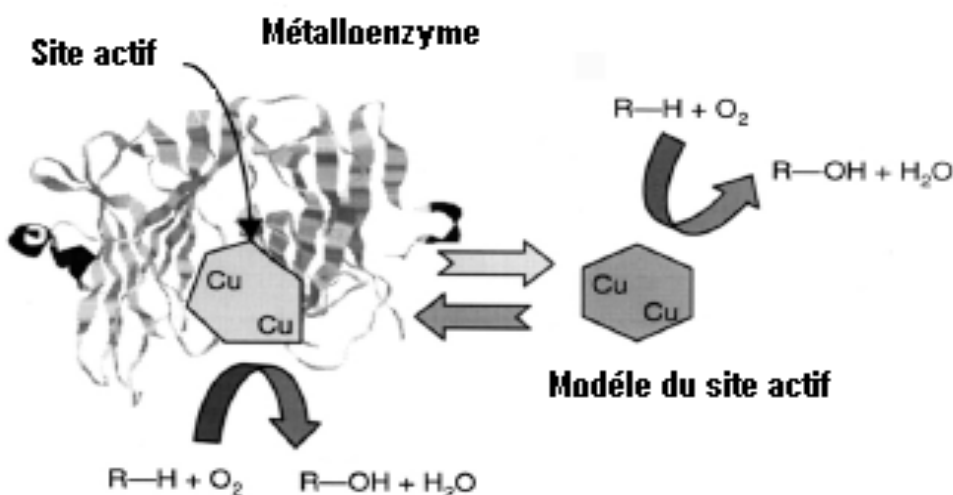


Figure 14 : Modélisation chimique du site actif des métalloenzymes.

De nombreux travaux ont été réalisés dans cet objectif et nous nous citerons dans cette partie uniquement les plus marquants qui résume les travaux sur la réactivité des modèles vis-à-vis l'oxygène moléculaire et son insertion dans la liaison C—H du ligand. Comme nous savons l'oxygène peut se lier avec les métaux de plusieurs façons.

II1 Modèles fonctionnels de l'Hémocyanine

1.1. Espèce $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy :

L'oxydation du complexe **1**, avec de le dioxygène moléculaire à -80°C conduit à la formation du complexe **2**, stable de couleur pourpre (figure 13). Des études spectroscopiques par EXAFS, RPE et par spectrophotométrie UV-vis ont montré que la nature de l'espèce oxygénée pontant les deux atomes du cuivre est de type : $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy du cuivre (II).

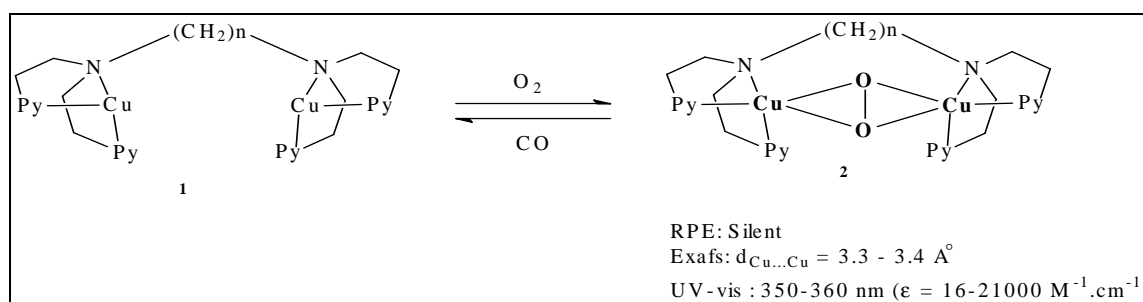


Figure 15 : Espèce $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy de Karlin.

Un autre complexe, **4** a été isolé par Tolman ^[59] en faisant réagir l'oxygène moléculaire sur le complexe du cuivre (I) **3**, à -80°C dans le dichlorométhane est de même nature que celui de Karlin, espèce $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy de cuivre(II), (figure 16).

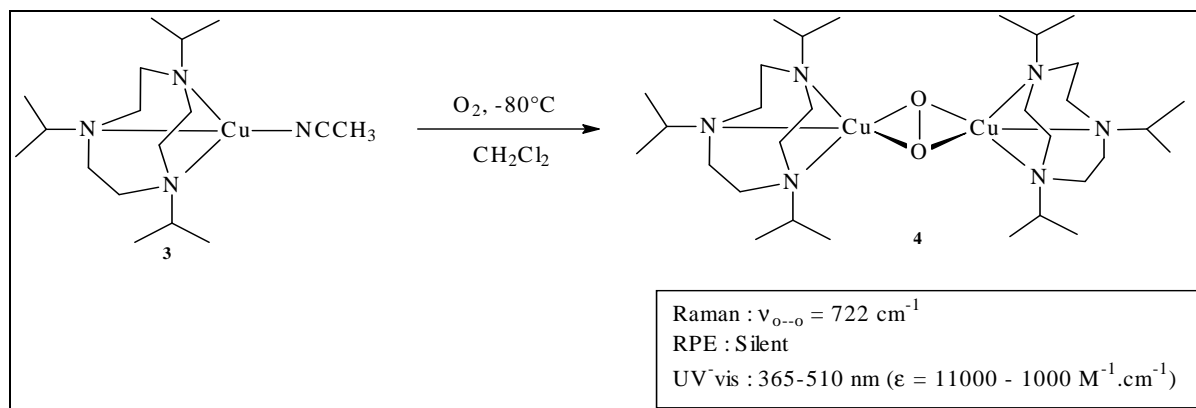


Figure 16 : Espèces $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy de Tolman.

En 1989, le premier complexe $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy **7** a été caractérisé par diffraction des rayons-x par Kitajima et coll¹. Ce complexe est obtenu soit par réaction du complexe **5** avec le dioxygène, soit par réaction du complexe, **6** avec de l'eau oxygénée.

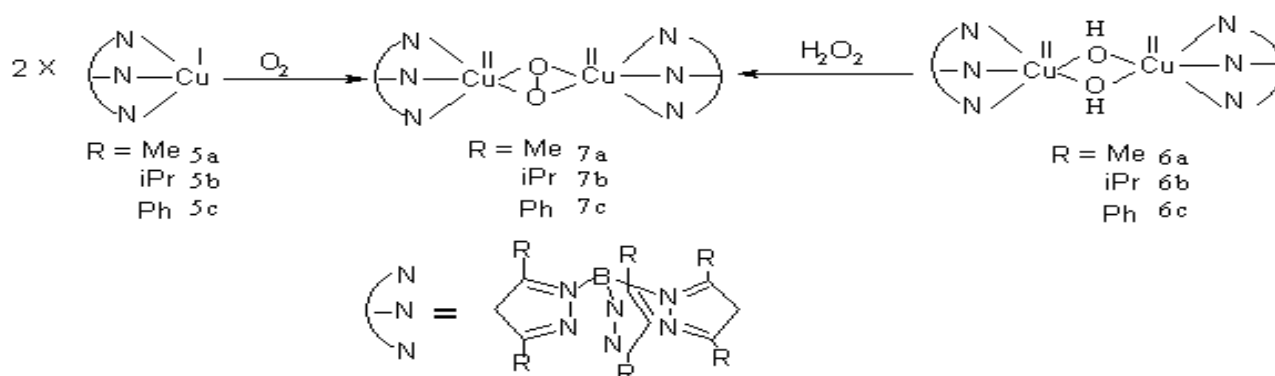


Figure 17 : Espèces $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy de Kitajima.

Dans ce complexe, les deux atomes de cuivre sont liés par l'oxygène moléculaire dans la forme $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy. Ces deux atomes d'oxygène ponteurs se trouvent sur un axe de symétrie et la distance O—O est égale à 1.412 \AA . La distance Cu...Cu, est égale à $3.560(3) \text{ \AA}$, est pratiquement égale à la distance calculée par Exafs dans l'oxy-Hc ($3.58 - 3.66 \text{ \AA}$) ^[61-58] et dans l'Oxy-tyrosinase (3.63 \AA) ^[62] et est plus courte que la distance dans le complexe binucléaire

(4.359(1) Å^[63], dont les deux ions cuivres sont pontés par l'oxygène de la forme μ -1,2-peroxo trans. Les deux atomes de cuivres se trouvent dans un environnement de pyramide à base carrée très déformée.

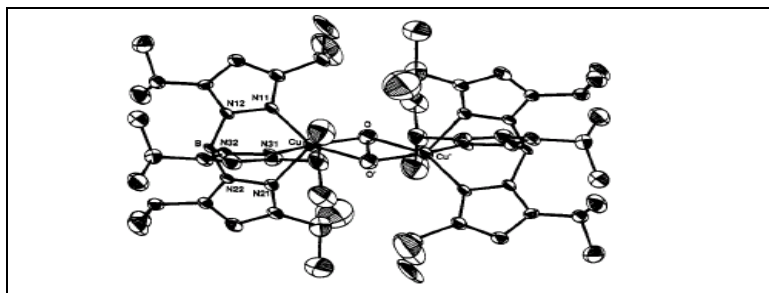


Figure 18 : Structure cristalline de l'espèce de l'espèce μ - η^2 : η^2 peroxo de cuivre (II) du complexe 7b.

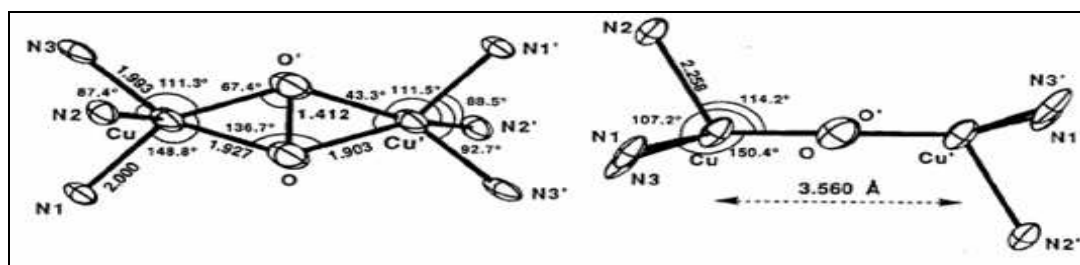


Figure 19 : Structure moléculaire de l'espèce μ - η^2 : η^2 peroxo de cuivre (II) du complexe 7b.

Le tableau résume les propriétés physico-chimiques des complexes 7a, 7b, 7c, l'Oxy-Hémocyanine et la Tyrosinase.

Tableau 2 : Données physicochimiques des complexes du cuivre (7a, 7b, 7c) μ - η^2 : η^2 peroxo, oxy-Hémocyanine et oxy-Tyrosinase :

Physicochemical data for μ -peroxo copper (II) complexes (7a, 7b, 7c), Oxy-Hemocyanin, and Oxy-Tyrosinase.				
Complex	Absorption bands (nm)	ν (O-O) (cm^{-1})	Cu—Cu (Å)	Magnetism
[Cu(HB(3,5-Me ₂ pz) ₃) ₂ (O ₂) ₂] ^{7a}	338, 530	731	—	diamag.
[Cu(HB(3,5-IPr ₂ pz) ₃) ₂ (O ₂) ₂] ^{7b}	349, 551	741	3.56	diamag.
[Cu(HB(3,5-Ph ₂ pz) ₃) ₂ (O ₂) ₂] ^{7c}	355, 542	759	—	diamag.
Oxy-Hemocyanin	340, 580	744 ~ 752	3.5 ~ 3.7	diamag.
Oxy-Tyrosinase	345, 600	755	ca. 3.6	diamag.

La comparaison des données spectrales des complexes

7a, 7b et 7c avec celles de l'oxy-Hémocyanine et la Tyrosinase est donnée dans le tableau 2. L'analyse de ces données nous montre clairement qu'il y a de très fortes similitudes entre les complexes et les deux cuproprotéines, ce qui fait, que la nature de l'oxygène ponteur entre les deux atomes de cuivre dans les formes de l'oxy-Hc et l'oxy-Tyr sont de la forme $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxy.

II -1-1 Espèce $\mu\text{-}1,2$ peroxy trans.

le complexe **9** est obtenue par karlin ^[41] par réaction de $[(\text{TMPA})\text{Cu}(\text{RCN})]^+$ **8** avec O_2 à -80°C dans CH_2Cl_2 ou EtCN .

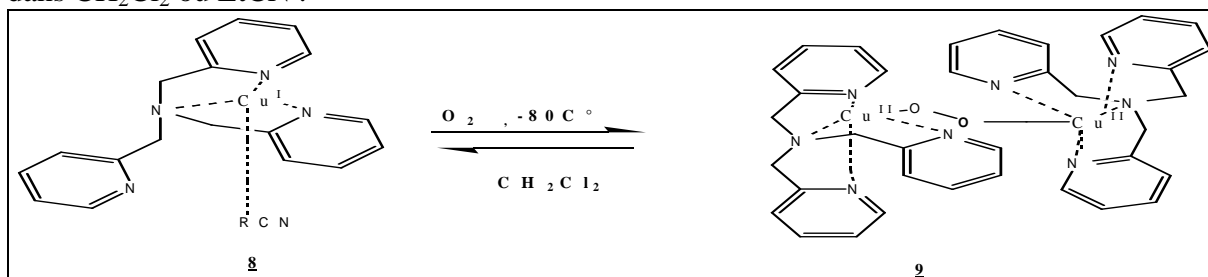


Figure 20: Modèle de l'Hémocyanine de karlin

C'est une espèce peroxy binucléaire de Cu. La nature est $\mu\text{-}1,2\text{-O}_2^{(2-)}$ *trans* faisant le pont sur les deux atomes de cuivre Cu(II). La distance Cu-Cu est égale à $4,359\text{Å}$. Sa structure montre que chaque atome de cuivre est pentacoordiné et que le cuivre adopte une géométrie de bipyramide trigonale déformée : L'amine et l'oxygène occupent les positions axiales et les trois atomes d'azote des pyridines des positions équatoriales. Ce complexe n'est pas un bon modèle de l'hémocyanine dont Cu adopte une géométrie de pyramide à base carrée. On sait, grâce à des travaux par EXAFS ^[45,46], que la distance entre les deux atomes de cuivre est proche de $3,6\text{Å}$ dans la protéine ^[47] où les deux atomes de cuivre sont pontés par un peroxy *trans*- $1,2\text{-O}_2^{(2-)}$.

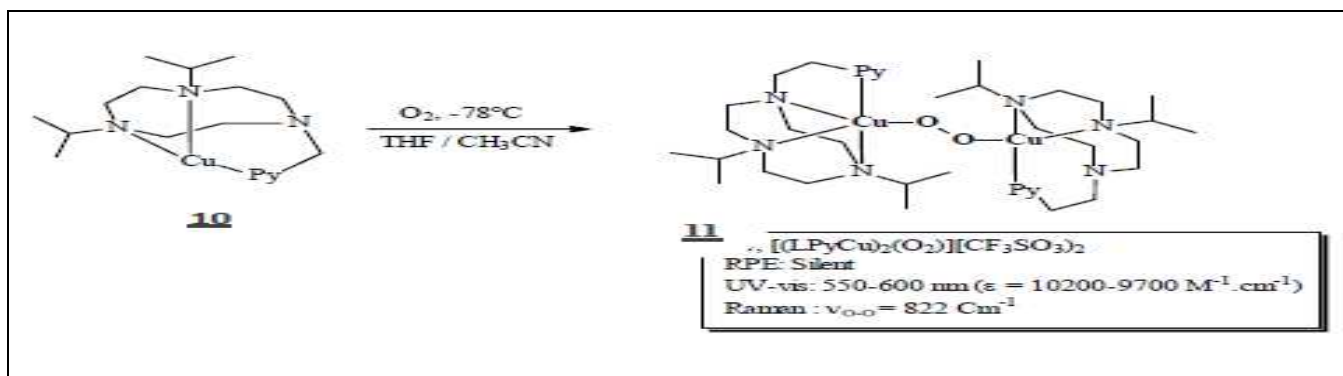


Figure 21: Modèle $\mu\text{-}1,2$ peroxy trans de Tolman

Un autre complexe similaire au complexe **9** a été isolé par Tolman en oxydant le complexe **10** par l'oxygène moléculaire dans le THF/ CH_3CN à -78°C pour conduire au complexe **11**. L'analyse de ce dernier par les méthodes spectroscopique (UV-vis, Résonance Raman) montrent que la nature de peroxy liant les deux atomes de cuivre est de géométrie $\mu\text{-}1,2$ peroxy *trans*.

II- 2 Modèle bi nucléaire : modèle de tyrosinase.

II- 2- 1 Modèle de Karlin

Ce modèle est un ligand constitué essentiellement par deux bras qui permettent la complexation des atomes de cuivre par des atomes donneur d'é qui sont ,soit des atomes d'azote provenant de pyridine ou d'amine tertiaire, soit des atomes d'oxygene.ces deux bras sont séparés par le m-xylyl jouant le rôle de spacer^[50-52] entre les deux bras .

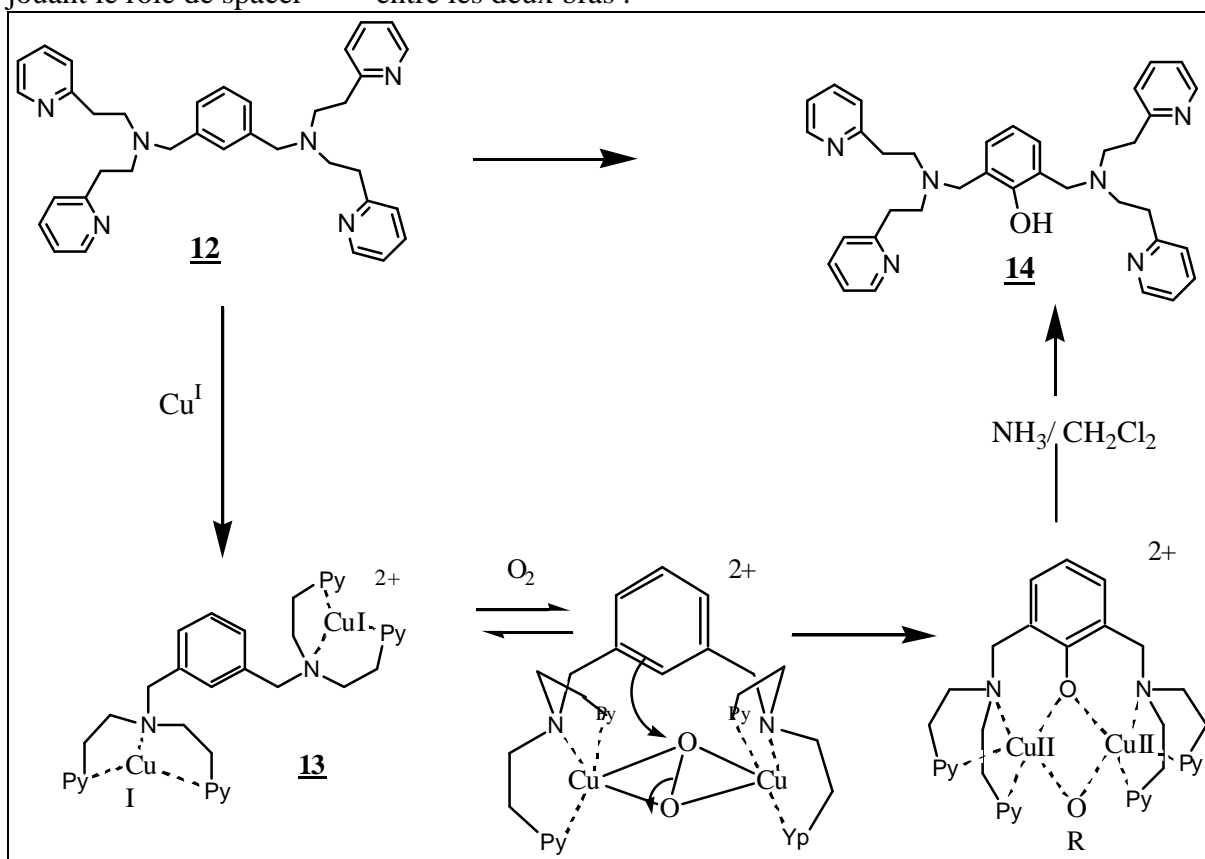


Figure 22 :hydroxylation du noyau aromatique par des modèles de Karlin.

La structure du complexe **13** révèle que chaque atome de cuivre est tricoordonné est lié à deux atome d'azote des pyridines et un atome d'azote de l'amine tertiaire .les distance de liaison Cu-N sont comparable à celle trouvés dans d'autre complexes tri-coordonné ^[53-54], cependant la distance Cu-NPy est plus courte de 0,08Å° que la distance trouvée dans un autre complexe tétra-coordonnée de cuivre (I) ^[55].la coordination autour de chaque atome de cuivre est un plan triangulaire déformé.

II -2- 2 .Modèle de Réglier.

Le complexe bi nucléaire **15** a été préparé ^[64-65] par addition du ligand imine **15** sur 2 équivalents de $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ dans l'acétonitrile dégazé est sous argon.la réactivité de $\frac{1}{2}$ équivalent d'oxygène moléculaire sur le complexe **16** conduit au complexe μ -oxo de cuivre II **17** .

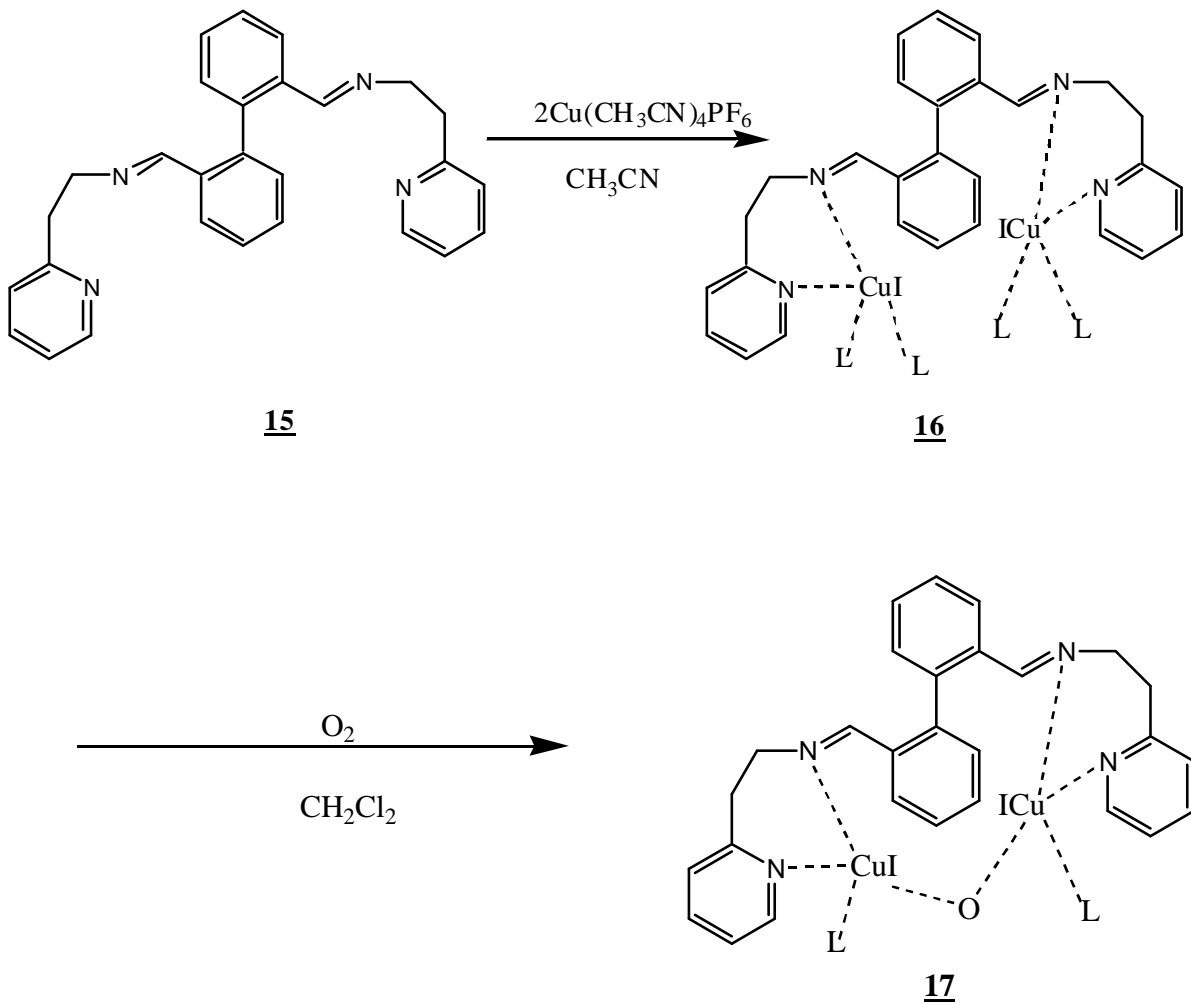


Figure 23 : Modèle de Réglier

Les études de réactivité du complexe **16**, sur les phénols et les catéchols montrent que ce complexe se révèle un bon modèle de la tyrosinase puisqu'il produit les réactions de phénolases (transforme **DTBP** en **DTBQ** en présence de O_2) et de catécholases (transforme **DTBC** en **DTBQ** en présence de O_2) dans le mécanisme catalytique proposé par Solomon^[39] et Karlin^[40].

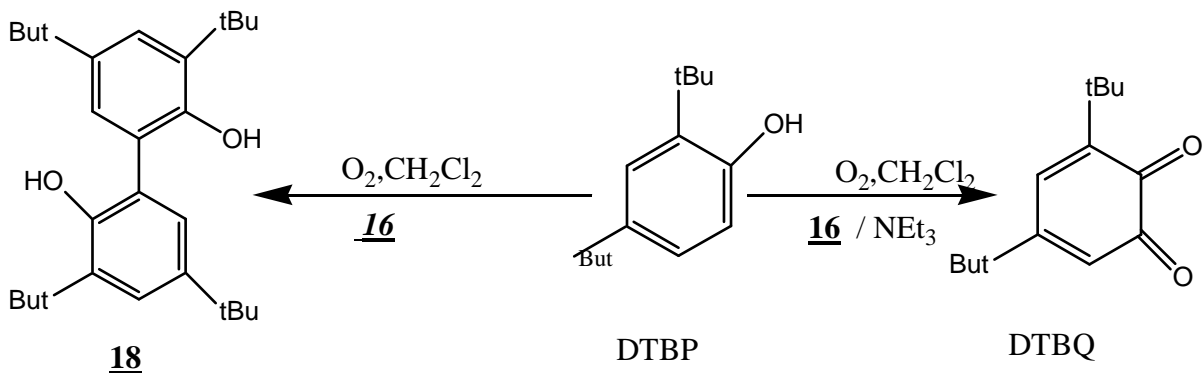


Figure 24: Réaction pour l'Activité phénolase.

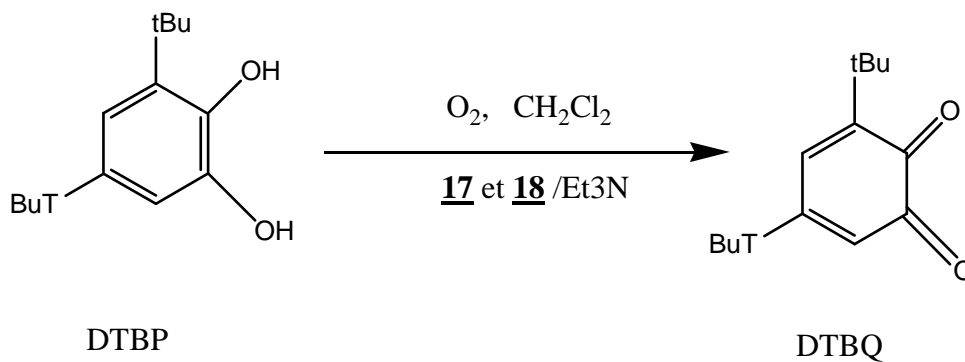


Figure 25 : Réaction pour l'activité cathécolase.



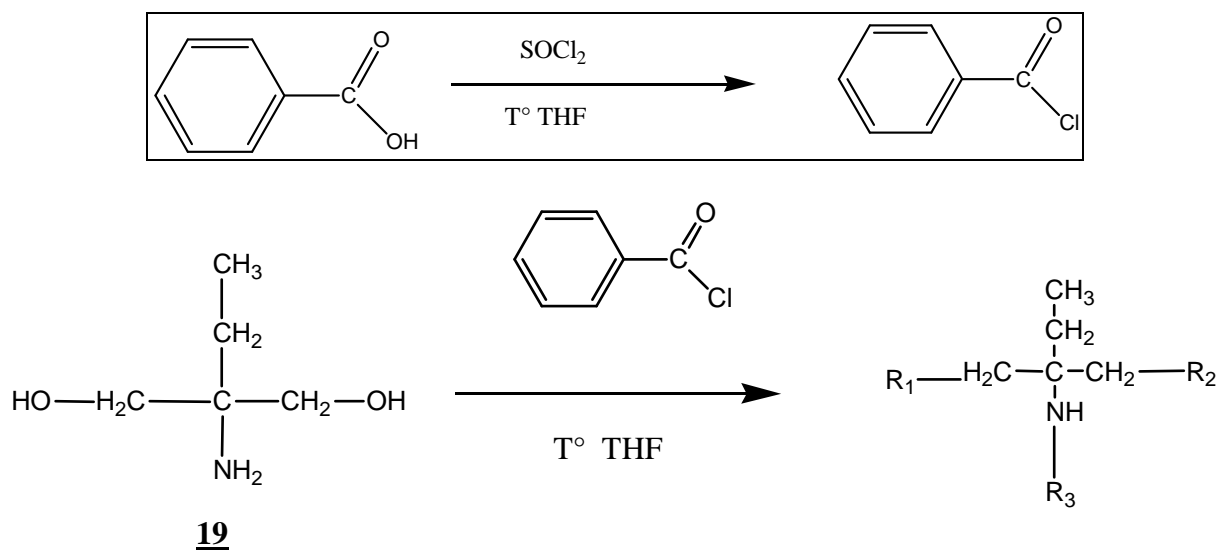
Introduction

Dans cette partie nous avons essayé de synthétiser des analogues chimiques de la tyrosinase en partant des composés chimiques de structures simples mais qui nous permettent de trouver un environnement chimique similaire à celui du site actif de ces cuproprotéines étudiées précédemment et bien il faut qu'il présente une coordination égale et le plus important est avoir la capacité d'effectuer une réaction catalytique même que la réaction réelle, rencontrée dans ces métalloenzymes.

III-1. Complexes mononucléaires .

III-1.1. Préparation des ligands 20 et 21.

L'addition de chlorure de benzoyle (par réaction d'alkylation) ou de l'acide benzoïque (par réaction d'estérification) conduit à deux produits de réactions 20 et 21. Ces deux produits sont séparés par chromatographie et leur analyse par RMN (^1H , ^{13}C) confirment les structures proposées pour ces deux composés. (Tableau x).



Composés	R1	R2	R3

<u>20</u>			
<u>21</u>		OH	

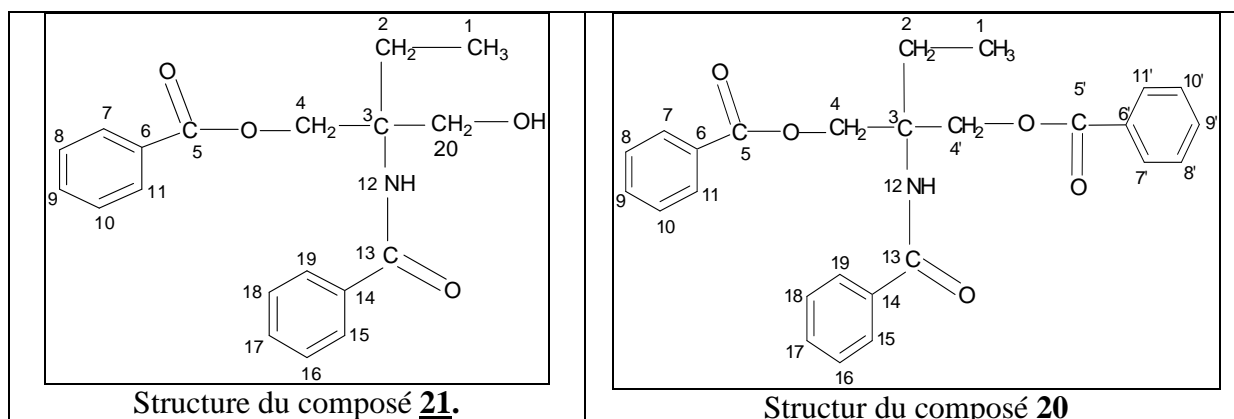
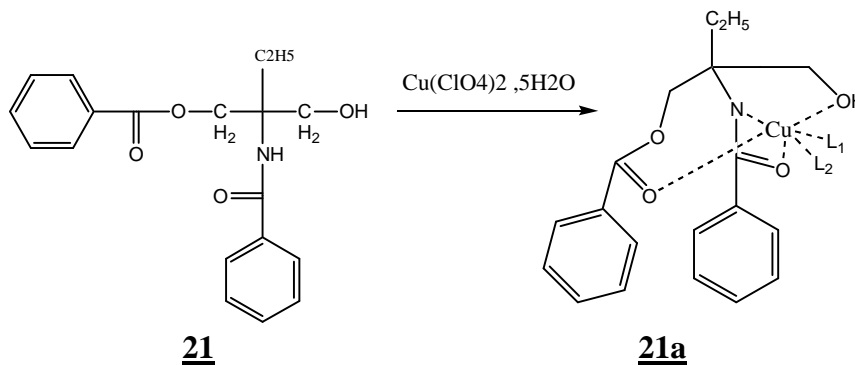


Figure 26 : Synthèse des ligands **20** et **21** :

III-1.2. Préparation des complexes **20a** et **21a**.

La complexation de ligand **20** et **21** par le $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ conduit respectivement aux complexes **20a** et **21a**. En l'absence de monocristaux pour analyse par diffraction des rayons X, nous nous pouvons que proposer des structures de ces deux complexes qui nous semblent proches à la réalité.



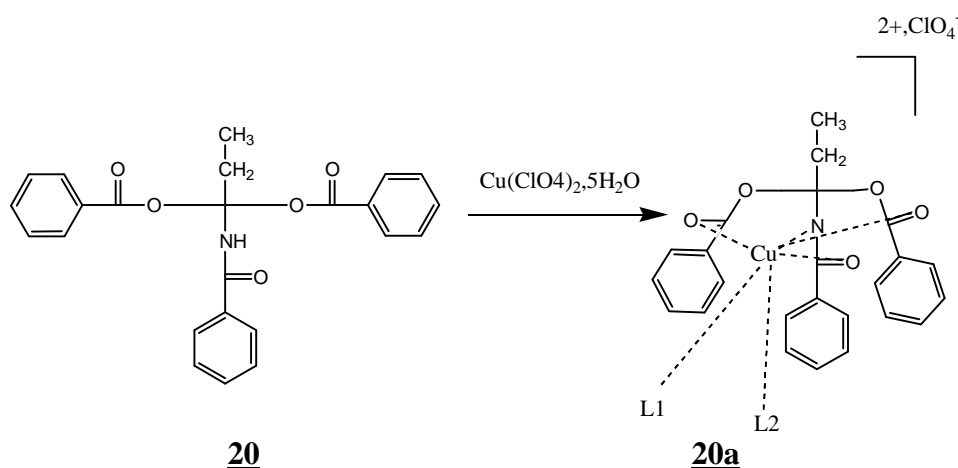
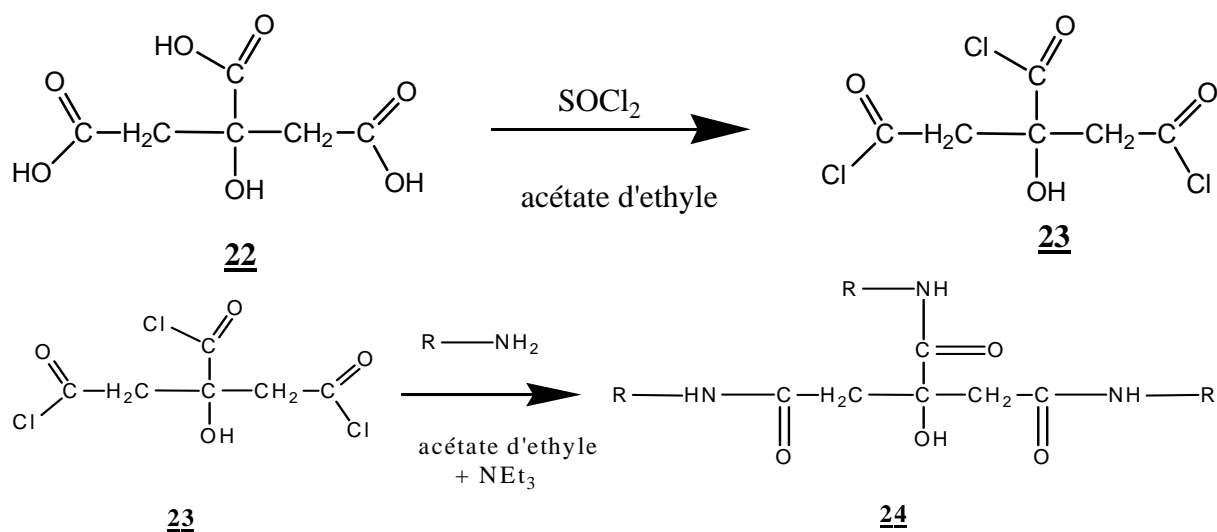


Figure 27 : Préparation des complexes 20a et 21a.

III-2 complexes bi nucléaires.

III-2-1 préparation des ligands 25 , 26.

Les ligands 25 et 26 ont été synthétisé de la même manière que leurs homologues 20 et 21 à partir de l'acide citrique, l'addition de chlorure de thionyle sur l'acide citrique conduit au composé 23 qui par alkylation par L'aminopyridine conduit au ligand 25 et par l'éthylène amine conduit au ligand 26 (figure 28).

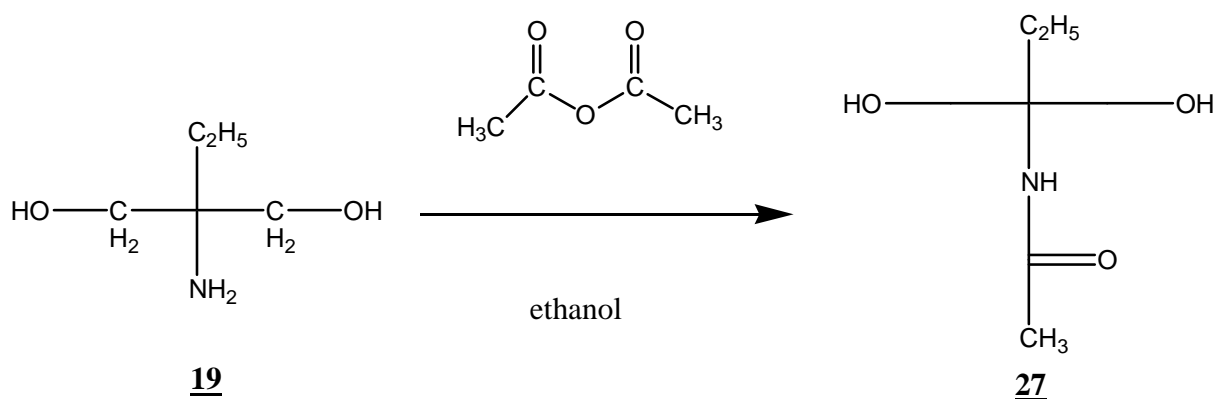




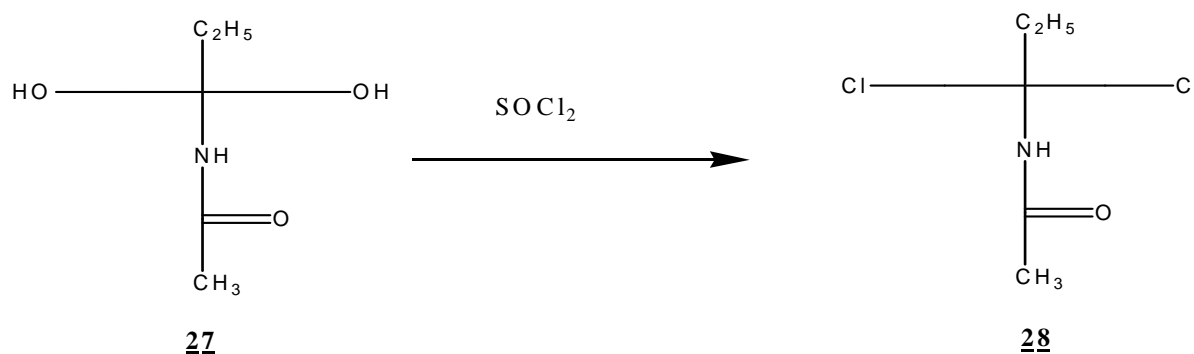
Composés	R—NH ₂
<u>25</u>	
<u>26</u>	

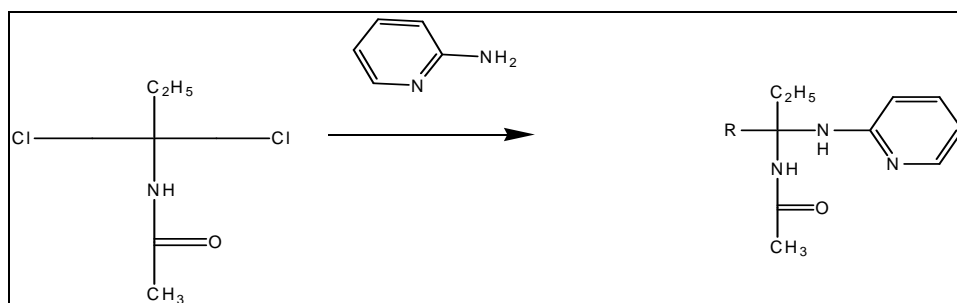
Figure 28 : Synthèse des ligands 25 et 26.

III-2-2. Préparation des ligands 29 et 30.

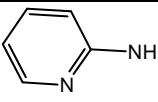


Le composé 27 est préparé par addition de l'anhydride acétique sur l'aminoalcool qui par chloration avec le chlorure de thionyle (SOCl₂) conduit au composé 28. L'addition de ce dernier sur l'aminopyridine permet l'obtention du composé 29 et 30. Tous ces produits ont été purifiés sur colonne chromatographique. Par manque de temps nous ne pouvons pas donner les analyses spectrales (RMN ¹H, ¹³C) détaillées de ces composés.





29 : R=Cl

30 : R= 

Résultats et discussion

* *Matériel d'analyse :*

1. Instrumentation :

Les produits obtenus ont été analysés par les techniques suivantes : la spectroscopie de la RMN du ^1H , ^{13}C et l'infrarouge IRTF.

◇ RMN



Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un appareil **BRUCKER AVANCE II**, opérant à la fréquence de 300 MHz en proton et 75 MHz en ^{13}C en utilisant le CDCl_3 comme solvant.

Les abréviations suivantes correspondent à :

d = doublet

dd = doublet dédoublé

s = singulet

t = triplet

m = multiplet

q = quadruplet

*Méthodes de préparations des analogues

2. Complexes mononucléaires.

2-1. Préparation des ligands 20, 21 .

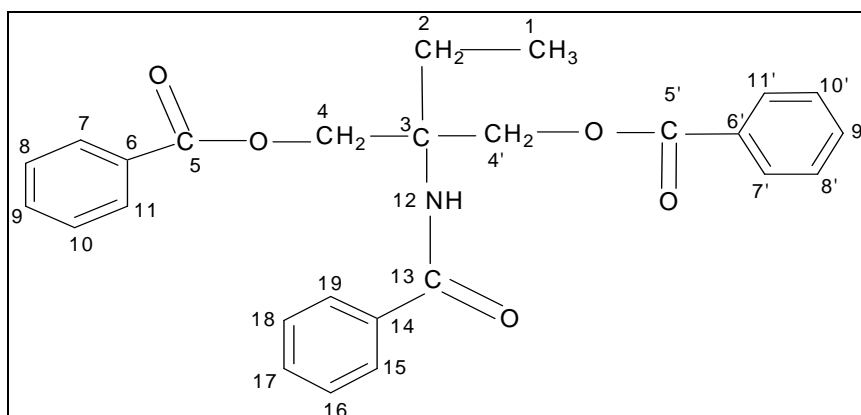
2-1-1. Mode opératoire :

Dans un ballon de 250 ml, on introduit 1.6 g de **2-amino-2éthyl-propane-1,3-diol** 19 avec 50 ml de Toluène, auquel on ajoute goutte à goutte le SOCl_2 à 0°C . Ensuite on ajoute 7.32 g de l'acide benzoïque pour obtenir les produits 20 et 21. L'agitation est maintenue pendant 2 heures à T° ambiante, puis le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 2 heures. Le solvant est évaporé, puis on neutralise le milieu réactionnel avec une solution de NaHCO_3 anhydre. On fait l'extraction avec le CH_2Cl_2 , puis on sèche la phase organique par Na_2SO_4 anhydre et on évapore le solvant à l'aide de l'évaporateur rotatif.

Le produit obtenu est sous forme liquide, de couleur marron avec un rendement de 60 %.

↳ Purification

Bien qu'on a un mélange de 2 composés révélés par chromatographie sur couche mince ccm et montre la présence de deux taches. Ainsi, la purification a été effectuée à l'aide de la chromatographie liquide sur colonne en utilisant le mélange éluant : Hexane/acétate d'éthyle (3/1).



Structure du produit obtenu 20 lors de la séparation sur colonne

a) RMN ¹H

Sur le spectre RMN ¹H dans le CDCl₃ du composé **20**, l'attribution des δ(ppm) est répartie en deux zones, l'une comprise entre 1.1-4.5 ppm et l'autre entre 6.9-8.05 ppm. Dans la zone spectrale aromatique (6.9-8.05 ppm), On note la présence du premier doublet dédoublé le plus déblindé à δ = 8.05 ppm, avec 2 constantes de couplage ³J = 7.2 Hz et ⁴J = 1.5 Hz qui correspond au proton C-Har en ortho par rapport de la fonction amide (en se basant sur l'intégration, elle permet de déceler la présence d'un seul proton aromatique en position ortho par rapport au C=O amidique).

Le Har le plus déblindé est attribué au C-Har qui se trouve dans le cône de déblindage du C=O de l'amide (d'où le phénomène de la **chélation** qui se produit, ainsi le -CH₂-O-CO-Ar donne lieu à un système AB voir après).

Le dd le plus intense à 8.01 est attribuable au 4 C-Har (confirmés par intégration) en ortho par rapport à la fonction ester dans les 2 cycles aromatiques avec ³J = 8.4 Hz et ⁴J = 1.3 Hz.

Le 3^{ème} dd résonnant à δ = 7.82 ppm pourrait correspondre à l'autre C-Har en **ortho'** par rapport au C=O de l'amide, qui se trouve loin de l'effet de l'anisotropie avec ³J = 8.4 Hz et ⁴J = 1.3 Hz.

Les 9 protons restants sortent sous forme de multiplets entre 7.60-7.34 ppm et correspondent aux différents protons aromatiques en position méta et para des 3 cycles aromatiques.

Concernant la première région, on note les signaux caractéristiques suivants.

Le δ à 1.1 sous forme de triplet correspond aux 3 protons du groupement CH₃, avec ³J = 7.58

Le quadruplet à 2.3 ppm est attribué aux 2 protons du groupement CH₂, avec ³J = 7.6 Hz

Sur le spectre RMN ¹H on remarque l'existence d'un **système AB** qui correspond à la présence de 4 protons des 2 groupements -CH₂-O-CO-Ar symétriques, ceci est dû au phénomène de **chélation**.



Le système **AB** sort sous forme de 2 doublets dont le premier proton résonne à $\delta = 4.78$ ppm avec une constante de couplage $^2J_{\text{geminé}} = 11.4$ Hz, et le second doublet dont le proton apparaît au $\delta_{\text{HA}} = 4.9$ ppm avec la même constante de couplage $^2J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz.

Les données de la RMN du ^1H sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

Tableau 3 :

^1H	(t, 3H)	(q, 2H)	(d, 2H)	(d, 2H)	(m, 9Har)	(dd, 1Har)	(dd, 4Har)	(dd, 1Har)
$\delta(\text{ppm})$	1.1	2.3	4.78	4.9	7.06-7.34	7.82	8.01	8.05

On note l'absence du signal du proton de la fonction amide ($-\text{CO}-\text{NH}$).

b) RMN ^{13}C

Le spectre RMN ^{13}C a été enregistré selon la séquence 2 J modulée et permet de différencier entre les carbones pairs (quaternaires et $-\text{CH}_2$) vers le haut et les impairs vers le bas (CH_3 , CH).

Sur le spectre RMN ^{13}C du composé **20**, On remarque la présence de :

- Un signal à 14.27 ppm relatif au groupement CH_3 ,
- Un signal à 25.03 ppm correspond au groupement CH_2 ,
- Un signal à 60.93 ppm dus au C quaternaire C_3 ,
- Deux signaux à 59.66 ppm relatifs au $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{Ar}$,
- Le pic à 65.68 ppm est attribuable au $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{Ar}$
- Le $\text{C}=\text{O}$ de la fonction ester résonne à 166.67 ppm probablement qui se trouve dans la **zone chélatée**,
- La valeur de 167.43 est imputée au $\text{C}=\text{O}$ de la fonction amide,
- Le carbone aromatique quaternaire lié à la fonction amide est retrouvé à la valeur de 134.78, et l'autre carbone aromatique lié à la fonction ester résonne au $\delta = 129.67$ ppm
- Les signaux qui sortent vers le bas du spectre $\text{C}_{\text{ar}}-\text{H}$ impairs correspondent aux 9 carbones aromatiques $\text{C}_{\text{ar}}-\text{H}$ dont 6 sont symétriques.

L'ensemble des résultats de la RMN du ^{13}C est illustré dans le tableau ci-dessous.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)

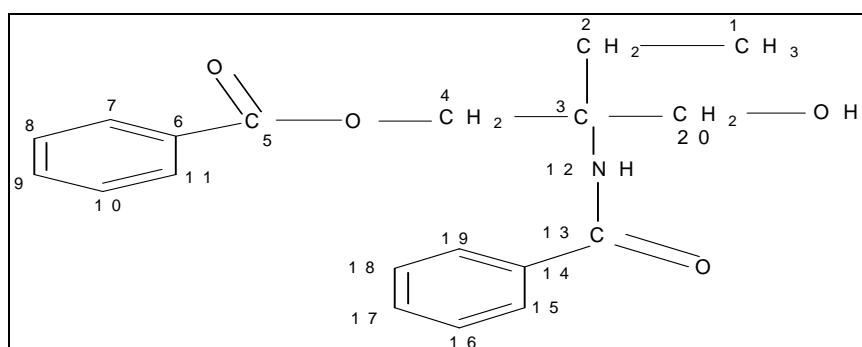
Tableau 4 :



^{13}C	C_1	C_2	C_3	C_4	C_4'	$\text{C}_5 = \text{C}'_5$	$\text{C}_{q6} = \text{C}_{q6}'$	$\text{C}_7 = \text{C}'_7$
$\delta(\text{ppm})$	14.27	25.03	60.93	59.66*	65.68*	166.67	129.67	126.98

$\text{C}_8 = \text{C}'_8$	$\text{C}_9 = \text{C}'_9$	C_{13}	C_{q14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}
128.3	132.8	167.4	134.78	128.5	129.5	131.6

*les deux signaux peuvent être inversés.



Structure de produit obtenu **21**

a) RMN ^1H

Dans le spectre RMN ^1H du produit **21**, on note la présence d'un triplet à $\delta = 1.25$ ppm correspond au méthyle, un quadruplet à $\delta = 1.85$ ppm avec une constante de couplage $^3J = 7.58$ Hz. La présence d'un système AB avec deux doublets dédoublets, dont le premier est à $\delta = 4.42$ ppm et le deuxième à $\delta = 4.49$ ppm attribuer aux protons de deux $\text{CH}_2\text{-O-CO-Ar}$

$$\delta_{\text{HA}} = 4.42 \text{ ppm}, 1 \text{ H}, ^2J_{\text{gem}} = 11.4 \text{ Hz}$$

$$\delta_{\text{HB}} = 4.49 \text{ ppm}, 1 \text{ H}, ^2J_{\text{gem}} = 11.4 \text{ Hz}$$

Le second système AB de faible intensité rapport à l'autre, montre la présence de deux doublets dont l'un chevauche avec le doublet de l'autre système AB.

Le 1^{er} doublet correspond au : $\delta_{\text{HA}'} = 4.39$ ppm, $^2J_{\text{gem}} = 14.23$ Hz et le 2^{ème} doublet qui chevauche, se trouve vers $\delta_{\text{HB}'} = 4.45$ ppm, $^3J_{\text{gem}} = 14.23$ Hz.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :



Tableau 5 :

¹ H	(t, 3H)	(q, 2H)	(d, 1H) -CH ₂ - O-CO	(d, 1H) -CH ₂ - O-CO	(d, 1H) -CH ₂ - OH	(d, 1H) -CH ₂ - OH
δ(ppm)	1.25	1.85	4.42	4.49	4.39	4.45
^m J(Hz)	³ J =7.58	³ J =7.58	² J _{gem} =11.4	² J _{gem} =11.4	² J _{gem} =14.23	² J _{gem} =14.23

(s, N-H et O-H)	(dd, 4Har)	(m, 6H)
6.35	7.45	8.2-7.3

La RMN du ¹H a bien montré l'existence des 2 protons N-H et O-H sous forme de signal large et ayant le même déplacement chimique (sur la base de l'intégration) .

b) RMN ¹³C

Quant à la RMN ¹³C, on note les déplacements chimiques suivants : 166.2 et 171.3 ppm correspondants respectivement au C=O de la fonction ester et au C=O de la fonction amide.

Les δ entre 133.1-128.3 ppm sont attribuable aux 10 Car -H impairs et par raison de symétrie, on note l'apparition de 6 signaux.

On peut aussi signaler la présence des carbones aromatiques quaternaires à δ =130 ppm, lié à la fonction ester et à δ = 133.3 ppm lié à la fonction amide.

On remarque la présence d'un signal vers 14.18 ppm relatif au groupement CH₃, et un signal vers 27.47 ppm correspond au groupement CH₂.

Le δ à 60.1 ppm est attribuable au C₃.

Le signal qui résonne à 67.1 ppm pourrait correspondre au -CH₂-O-CO-Ar.

Et enfin la valeur du δ à 55.70 ppm correspond probablement au -CH₂-OH.

Ces deux derniers valeurs, peuvent être inversées (C₄ et C₂₀).

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) :

Tableau 6 :

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₂₀	C ₅	C ₆	C ₇ = C ₁₁	C ₈ = C ₁₀
--	----------------	----------------	----------------	----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------------------------	----------------------------------



^{13}C									
$\delta(\text{ppm})$	14.18	27.47	60.1	67.1 *	55.70 *	166.2	130	126.9	128.3

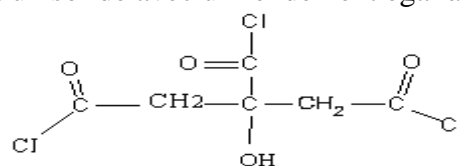
C_9	C_{13}	C_{q14}	$\text{C}_{15} = \text{C}_{19}$	$\text{C}_{16} = \text{C}_{18}$	C_{17}
133.1	171.3	133.3	128.6	129.6	130.3

3- Complexes bi nucléaires .

3.1. Préparation de ligands 25, 26.

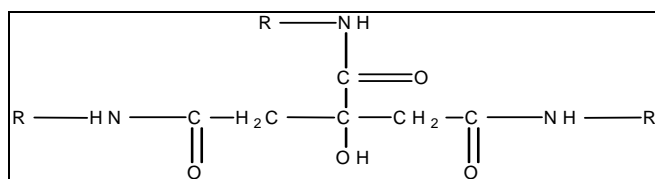
3-1-1. Mode opératoire de la préparation du chlorure

Dans un ballon de 250 ml, On place 1.5 g de acide citrique monohydrate $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, qu'on dissout dans 50 ml d'acétate d'éthyle distillé. Ensuite, on additionne 2.1 ml de chlorure de thionyle (SOCl_2). Le mélange est porté à reflux à 105°C , en maintenant la réaction sous agitation. On arrête la réaction lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux de dioxyde de soufre (SO_2) ; puis on évapore le solvant. Le produit obtenu est un solide avec un rendement égal à 86.4%.

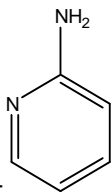


3-1-2. Mode opératoire du 25, 26

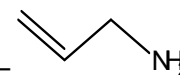
2g de chlorure d'acide sont placés dans un ballon de 250 ml auxquels on ajoute 50 ml de l'acétate d'éthyle fraîchement distillé. On ajoute goutte à goutte 2 g de l'amine tout en maintenant l'agitation constante. Au cours de l'addition une pâte visqueuse se forme et la réaction est maintenue sous agitation et à température ambiante pendant deux heures jusqu'à ce que le mélange réactionnel devienne homogène. On évapore le solvant, puis on solubilise le produit dans le dichlorométhane et on lave deux fois avec une solution saturée de NaHCO_3 . A l'aide d'une ampoule à décanter on extrait la phases organique et on la sèche sur MgSO_4 puis on filtre. Le solvant est évaporé et le produit obtenu est purifié sur colonne avec un mélange de solvant hexane/acétate d'éthyle (2/1)



25 :R-NH2=



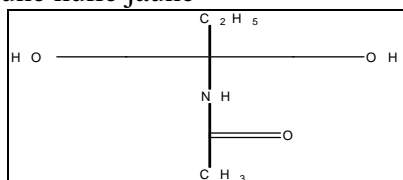
26 :R-NH2=



3-2 Préparation de ligands **29**, **30** .

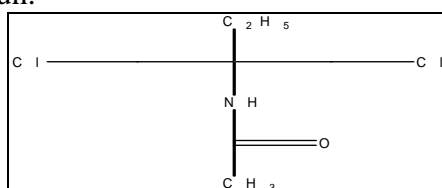
3-2-1. Mode opératoire

Dans un ballon de 250 ml on met 1.5 g de l' aminoalcool avec 20 ml de l'éthanol anhydre on agitant en maintenant la température à 40 °C puis on ajoute goutte à goutte l'anhydride acétique à l'aide de l'ampoule à brome le mélange est porté à reflux pendant «30 min, après on évapore le solvant et on obtient une huile jaune



On met 1.4g de l'amide obtenue dans 30 ml de CHCl_3 anhydre sont placé dans un ballon sous agitation magnétique ensuite le mélange est placé dans un bain de glace ,après on additionne doucement 3ml de SOCl_2 solubilisé dans 25 ml de CHCl_3 en contrôlant la temperature entre 10°C et 15°C .

après le mélange est agité pendant 30 min à temperature ambiante ensuite le mélange est porté à reflux pendant 30 min une fois la réaction est terminé le mélange réactionnel est refroidit immédiatement à 30°C et on évapore le solvant et on lave avec une solution de NaHCO_3 puis on extrait avec CH_2Cl_2 après on sèche sur NaSO_4 puis on filtre et on évapore CH_2Cl_2 on obtient un produit liquide brun.



Les rendements des la réactions sont donnés au tableau6 .

produit	28	29	30
rendement	90%	70%	60%



Conclusion

Les systèmes présentés ici sont de type monooxygénase, c'est-à-dire qu'un atome d'oxygène provenant de O_2 est inséré dans le substrat.

Même si ces systèmes sont très étudiés, des incompréhensions persistent, toujours dans leur aspect mécanistique. C'est pourquoi l'étude de systèmes modèles est importante. En ce qui nous concerne, car notre but est la synthèse des complexes modèles de la tyrosinase et la dopamine β hydroxylases.

Les nouveaux intermédiaires obtenus à partir de ces complexes pourraient nous donner des informations importantes sur le mécanisme d'activation du dioxygène par ces enzymes.



Bibliographie

- [1] Solomon E. I.; Baldwin M. J.; Lowery M. D., *Chem. Rev.* ; **1992** , 92 , 521 .
- [2] Solomon E. I. ; and . Lowery M. D. ; *science*, 1993 , 259 , 1575.
- [3] kaim W and Rall J ; *angrew. chem . int .Ed Engl.*, **1996** , 35 , 43.
- [4] Diadarrio L., L. , Robinson W. R., Margerun D. W., *Inorg Chem .*, **1998** , 22 , 1021 .
- [5] Boussu F. P. , Chellapa K. L., Margerun D. W., *J. Am. Chem. Soc.* , **1977**, 99, 2195 .
- [6] Osterberg R., *Coord. Chem. Rev.*, **1974** , 12, 390.
- [7] Hathaway B. , Billing. D. E., *Coord. Chem . Rev.*, **1970** , 5, 143 .
- [8] Whittaker J. w. *Advances in protein chimistry*. **2002** . 60.
- [9] Whittaker M. M., Kersten P. J., Nobuhumi N., Sanders-Loehr J., Schweizer E. S., Whittaker J. W. , *J. Bio . Chem .*, **1996** , 271 , 681.
- [10] Ito N., Philips S. E. V., Yadav K. D. S., Knowles P. F. , *J . Mol . Biol.*, **1994** , 238 , 794 .
- [11] Whittaker J. w. , *Chem Rev*. **2003** . 103. 2347 .
- [12] Boswell J. S., Reedy B. J. Kulathila, Merkler R., D. and Blackburn N. J., *biochemistry*, **35**, **1996**. 12241-12250.
- [13] Southan, C., Kruse, L. I., **1989**. Sequence similarity between dopamine beta-hydroxylase and peptide alpha-amidating enzyme: evidence for a conserved catalytic domain. *FEBS Lett.* 255, 116_120 .
- [14] Prigge, S. T., Kolhekar, A. S., Eipper, B. A., Mains, R. E., Amzel, L. M., **1997**. Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine _hydroxylating monooxygenase. *Science* 278, 1300_1305.
- [15] Miller, S. M., Klinman, J. P., **1985**. Secondary isotope effects and structure reactivity correlations in the dopamine __ monooxygenase reaction. *Biochemistry* 24, 2114_2127.
- [16] Magnus, K. A.; Hazes, B.; Ton-That, H.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J.; Hol, W. G. J. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1994**, 19, 302-309
- [17] (a) Gaykema W. P. J., Hol W. G. J. ? Vereijken J. M., Soeter N. M., Back H. J. and Beintema J. J., *Nature*, **1984**, 309, 23-29.
- (b) Gaykem A W. P. J., Volbeda A. And Hol W. G. J., *J. Mol. Boil.*, **1985**, 187, 255-275.
- (c) Volbeda, A., Hol, W. G., *Mol. Biool.*, **1989**, 209, 2496279.
- [18] Van Holde K. E. and Miller K. I. Q., *Rev. Biophys.*, **1982**, 15, 1- 129.
- [19] Himmelwright R. S., Eickman N. C., LuBien C. D., Lerch K. and Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 733967344.
- [20] Freedman T. B.; Lothr J. S., Lothr T. M., *J. Am., Chem., Soc.*, **1976**. 92, 2809-2815.
- [21] (a) Eickman N. C., Himmelwright R. S., Solomon E. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* **1979**, 76, 2094-2098.



- (b) Himmelwright R. S., Eickman N. C., LuBien C. D., Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1576-1586.
- (c) Himmelwright R. S., Eickman N. C., LuBien C. D., Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 5378- 5388.
- (d) Wilcox D. E., Long L. R., Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2186-2194.
- [22] Moss T. H., Gould D. C., Ehrenberg A., Lothr J. S., Mason H. S., *Bioche.*, **1973**, 12, 2444-2449.
- [23] (a) Karen A. Magnus, Hoa Ton-That and Joan E. capenter , "Bioinorganic Chemistry of copper", K. D. Karlin and Z. Tyekàr Eds. (Chapman and Hall, New York), **1993**, 143-150.
- (b) K. A. Magnus, B. Hazes, H. Ton-That and J. Carpenter, *Chem., Rev.*, **1994**, 94, 727.
- (c) K. A. Magnus, B. Hazes, H. Ton-That, C. Bonaventura, J. Bonaventura and W. G. J. Hol, *Proteins*, **1994**, 19, 302.
- [24] M. Brenowitz, C. Bonaventura J. Bonaventura, *Biochemistry*, **1984**, 23, 879.
- [25] M. Brouwer, C. Bonaventura, J. Bonaventura, *Biochemistry*, **1977**, 16, 3897.
- [26] M. Brenowitz., C. Bonaventura, J. Bonaventura, E. Gianazza, *Arch. Biochem. Bioph.* **1981**, 210, 748.
- [27] Gerdemann C., Eicken C., Krebs B., *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 183.
- [28] Hughes A. L., *Immunogenetics* **1999**, 49, 106.
- [29] Walker J. R., Ferrar P. H., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1998**, 15, 457.
- [30] Eicken C., Krebs B., Sacchettin J. C., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 677.
- [31] Mayer A. M., Harel E., *Phytochemistry* **1979**, 18, 193.
- [32] Hyodo H., Uritani I., *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 122, 299.
- [33] Eicken C., Zippel F., Büldt-Karentzopolus K., Krebs B., *FEBS Lett.* **1998**, 436, 293.
- [34] Klabunde T. Eicken, C., Sacchettini J.C., Krebs B., *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 1084.
- [35] Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 677.
- [36] Cuff M. E., Miller K. I., van Holde K. E., W. A. Hendrickson, *J. Mol. Biol.* **1998**, 278,



855.

- [37] Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T.E., *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563.
- [38] Decker H., Tuzcek F., *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 392.
- [39] Winkler M., Lerch K., Solomon e. I., *J. Am. chem. Soc.* **1981**, 103, 7001-7003.
- [40] Nasir M. S., Cohen B.I., Karlin K. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2482.
- [41] Jacobson R. R., Tyekar Z., Farooq A., Karlin K. D., Liu S. and Zubieta J., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3690-3692.
- [42] Pate J. E., Cruse R. W., Karlin K. D. and Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2624-2630.
- [43] Ghosh P., Tyekar Z., Karlin K. D., Jakobson R. R. and Zubieta J., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6889-6891.
- [44] Karlin K. D., Hayes J. C., Gultneh, Y., Cruse R. W., McKown J. W., Hutchinson J. P., Zubieta J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2121-2128.
- [45] Jacobson R. R.; Tyekar Z.; Farooq A., Karlin K. D., Liu S. and Zubieta J., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3690-3692.
- [46] (a) Co M. S., Hodgson K. O., Eccles T. K., Lontie R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 984-986.
- (b) Brown J. M., Power L., Kincaid B., Larrabee J. A., Spiro T. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 4210-4216.
- [47] Tyeklar Z., Paul P. P., Jakobson R. R., Farooq A., Karlin K. D. AND Zubieta J., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 388-389.
- [48] Kitajima N., Fujisawa K., Moro-oka Y., *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 357-58.
- [49] Kitajima N., Koda T., Hashimoto S., Kitagawa T., Moro-oka Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4201-4216.
- [50] "Copper Coordination Chemistry: Biochemical and Inorganic perspectives": Karlin K. D., Zubieta J. Eds.; Adenine Press: Guilderland, NY, **1983**, 457-472.
- [51] Karlin K. D., Dahlstrom P. L., Cozzettes S. N., Scensney P. M., Zubieta J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 881-882.
- [52] Sorrell T. N., Malachowski M.R., Jameson D. L., *Ibid*, **1982**, 21, 3250-3252.
- [53] Lewin A. H., Michl R. J., Ganis P., Lepore V., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 661-662.
- [54] Gagne R. R., Krech R. P., Dodge J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6817-6927.



- [55] Karlin K. D., Hayes J. C., Juen S Hutchinson J. P., Hyde J.R., Zubieta J. *Inorg. Chim. Acta* **1982**, 64, L 219-220 .
- [56] Mei M., Whittaker and James W., Whittaker *.inorg.chem* 278 , **2003**, 22090–22101.
- [57] Anindita De., Sukanta M., Rabindranath M. *Inorg .Biochem* 102 ,**2008**, 1170–1189.
- [58] Co M.S., Hodgson K.O., Eccles T.K., Lontie R., *J. Am .chem. soc.* **1981**, 103, 984-986.
- [59] Mahapatra S., Halfen J. A., and Tolman W. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11575-11586.
- [60] Kitajima N ., Fujiisawa K., Moro- oka Y., *Inorg. Chema.* **1990**, 29, 357-58.
- [61] Brown J. M., Power L., Kincaid B., Larrabee J. A., Spiro T. G., *J. Am. Chema . Soc.*, **1980**, 102, 4210-4216.
- [62] Wooley G. L., Powers L., Winkler M., Solomon E. I., Spiro T. G., *J. Am. Chema. Soc.*, **1984**, 106, 86-92.
- [63] Jacobson R. R; Tyekar Z; Farooq A., Karlin K. D., Liu S. and Zubieta J., *J. Am. Chema. Soc.* **1988**, 110, 3690-3692.
- [64] Réglie M., Jorand C. and Waegell B., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 1752.
- [65] (a) Alilou E. H., Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille III, **1993**.
- (b) Alilou E. H., Thèse de Doctorat d'état, université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, **1998**.
- [66] Liviu M. M., Deanne J. R., Michael A., Vance, E. I. Solomon., Keith O. H., Britt H, and T. Daniel P. S *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (8), 2654-2665.
- [67] Blain. I., Slama. P., Giorgi. M., Tron .T., Réglie. M., *Rev Molecular Biotechnology.* 90 ,**2002**. 95_112.

