

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie, UMR 7177

THÈSE présentée par :

Mathilde BERTHE

soutenue le : **6 septembre 2024**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie moléculaire et supramoléculaire

Modèles Supramoléculaires d'Hémoprotéines

THÈSE dirigée par :

Dr. Jennifer WYTKO
Dr. Jean WEISS

Chargée de recherches CNRS, Université de Strasbourg
Directeur de recherches CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Bernard BOITREL
Pr. Benoît COLLASON

Directeur de recherches CNRS, Université de Rennes
Professeur des Universités, Université Paris Cité

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Brigitte BIBAL

Professeure des Universités, Université de Bordeaux

Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier mes directeurs de thèse. Jean et Jennifer, merci pour toute la confiance que vous m'avez accordée et l'expérience que vous m'avez transmise tout au long de mes trois années de thèse. Je vous remercie infiniment d'avoir écouté mes trois cent dix millions d'états d'âmes et d'avoir su calmer la tornade qui sommeille en moi. Merci aussi de m'avoir fait autant voyager, tant au niveau scientifique, que lors des nombreux congrès, et de mes deux séjours au Japon. Et enfin, merci tout simplement pour les êtres humains que vous êtes. Merci Jennifer de m'avoir protégé en toutes circonstances des multiples dangers du laboratoire... Plus sérieusement, vous avez toujours été là pour prendre soin de moi (et des autres), merci beaucoup ! Je vous souhaite que la suite de vos recherches soit fructueuse. Jean, merci pour votre bonne humeur à toute épreuve et pour vos blagues intempestives. Quand la chimie n'est pas au rendez-vous, votre joie de vivre a toujours su me remonter le moral. Je vous souhaite une bonne retraite (par intérim), au fond, le laboratoire ne sera sûrement jamais très loin.

Je remercie mon jury de thèse, le Dr. Bernard Boitrel, le Pr. Benoit Colasson et la Pr. Brigitte Bibal d'avoir accepté et de prendre le temps d'évaluer mes travaux de thèse. Que de chemin depuis mes stages encadrés par Pr. Brigitte Bibal, finalement j'ai réussi à synthétiser un macrocycle !

Je tiens à remercier la Pr. Corinne Boudon sans qui, toutes les études électrochimiques n'auraient jamais été possibles. Après m'être tout d'abord frotté à l'électrochimie en solitaire au Japon, j'ai d'autant plus pu apprécier ton expertise et ta rigueur, qui ont été d'un très grand soutien. Merci pour ta patience lors de nos études avec des produits souvent capricieux et surtout pour nos moments partagés. J'espère qu'on pourra fêter la fin de ces trois années de recherche autour d'une Margaritta bien méritée. Have a lovely day 😊

J'aimerais aussi remercier Dr. Frédérique Melin, membre de mon comité de suivi de thèse, pour avoir partagé sa grande expertise sur les modèles de cytochrome c oxydase et de m'avoir permis de faire des études Raman.

Je souhaiterais aussi remercier la Pr. Sylvie Choua pour les études RPE qu'elle m'a permis de faire, et plus particulièrement la Dr. Nolwenn Le Breton pour le temps qu'elle m'a accordé lors de nos expériences et ses précieuses explications.

I would like to thank Pr. Hiroaki Kitagishi, Pr. Takashi Hayashi and Dr. Koji Oohora and all the members of their laboratories for welcoming me, and for sharing their expertise. I also wish to make a special thanks to Dr. Quy Mao, Dr. Yoshiyuki Kagawa and Chihiro Sonoda. Yoshi and Chihiro thank you for all the good times shared, the parties and the trips in Japan, in France, and for Chihiro, also in Canada. Yoshi-san, I hope you are enjoying your new work and, Chihiro-san, I wish you a very fruitful end of PhD. Quy Mao-san, thank you for the expertise you passed on to me. Always insightful and persevering, I hope all your efforts will be rewarded in the future.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du service d'analyse de la « fédération de chimie de l'Institut le Bel » et du magasin de chimie sans qui tous ces travaux n'auraient tout simplement jamais pu avoir lieu. Merci Maurice d'avoir accepté mes tubes RMN en retard sans sniper le soir après colonne. Merci aux membres du magasin de m'avoir fourni la liste de toutes les personnes ayant en leur possession du monoxyde de carbone sur le campus, même si j'ai fini par faire ces études au Japon, votre aide a été particulièrement appréciable !

Je souhaite aussi remercier tous les membres du labo anciennement CLAC et nouvellement CLIC, Romain, Christophe, Jean-Claude et Victor pour le soutien et l'expertise scientifique que vous m'avez apportée tout au long de ces trois années de thèse. Merci aussi à Agnès pour sa gestion efficace de toute la paperasse.

Mes remerciements vont en particulier à tous les doctorants et doctorants du laboratoire avec qui j'ai partagé de nombreux bons moments, des rires, de la chimie et beaucoup de bières. Jean et (Dr. ahah) Jordan, merci de m'avoir donné vos petits tips lors de mes débuts en paillasse. J'applique encore aujourd'hui certains de vos bons conseils. Eleanna et Laurie, merci pour votre gentillesse, toujours là pour aider les autres, votre présence en fin de thèse a été d'un grand soutien ! Je remercie évidemment aussi tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire. Plus spécialement Aline, qui j'espère, ne restera pas traumatisée des colonnes de porphyrines, ainsi qu'Hugo, avec qui, en plus des bières, j'ai partagé mon mec et un appartement.

Je remercie aussi toutes les autres personnes avec qui j'ai partagé tant de bons moments pendant cette thèse, Sonia, Auguste, Robin, Andres, Pierre, Maxime, David, Alice, Geordie et plus encore (pour ceux que j'ai sûrement oubliés). Je remercie plus

particulièrement Ambroise, ta bonne humeur, et tes petites blagues n'auront eu de cesse d'illuminer mes pauses déjeuner durant presque trois années. Je remercie bien sûr aussi Oscar. Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté, du premier au dernier jour de ma thèse. Tes qualités scientifiques et humaines m'ont toujours énormément impressionnée, j'en suis sûre qu'elles t'emmèneront loin !

Pour finir, je souhaite remercier ma famille, mon père, ma mère et mon frère. Si je suis l'adulte que je suis devenue aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous. Ces trois années loin de vous m'auront d'autant plus montré la place importante que vous occupez dans ma vie. Merci pour tout, je vous aime.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Les hémoprotéines et leurs modèles : relation structure-propriétés	3
I. Généralités sur les hémoprotéines.....	4
II. Les systèmes naturels	5
II.1. La myoglobine et l'hémoglobine	6
II.1.1. Site proximal.....	7
II.1.2. Site distal	8
II.2. Le cytochrome c oxydase	10
II.2.1. Structure du site actif	12
II.2.3. Mécanisme de réduction du dioxygène.....	13
III. Les modèles d'hémoprotéines solubles en milieu organique	15
III.1. Les porphyrines de fer encombrées comme modèles de myoglobine.....	16
III.2. Les porphyrines de fer/cuivre comme modèles de cytochrome c oxydase	19
III.2.1. Complexes fer/cuivre auto-assemblés comme modèles structurels du site actif de l'enzyme	20
III.2.2. Les porphyrines superstructurées fer/cuivre comme modèles fonctionnels de l'enzyme	22
IV. Modèles d'hémoprotéines solubles en milieu aqueux.....	27
IV.1. La création d'un environnement hydrophobe pour des transporteurs de dioxygènes artificiels	28
IV.2. Assemblages cyclodextrines/porphyrine comme agent antipoison.....	35
IV.3. Assemblage cyclodextrines/porphyrine comme modèle de cytochrome c oxydase	35
V. Conception du projet et objectifs	36
Chapitre 2 : Synthèse de complexes porphyriniques à environnement distal phénanthroline et bipyridine	43
I. Généralités sur les porphyrines.....	44
II. Généralités sur les cyclodextrines.....	45
III. Construction de modèles d'hémoprotéines supramoléculaires.....	46
III.1. Modèle à ligand distal bipyridine.....	46
III.1.1. Synthèse du nouveau dimère de cyclodextrines à espaceur bipyridine.....	47
III.2. Modèle à ligand distal phénanthroline.....	52
III.2.1. Synthèse du dimère de cyclodextrines à espaceur pyridine.....	53
III.2.2. Synthèse d'une nouvelle porphyrine à anse phénanthroline.....	53

IV.	Elaboration de porphyrines à anse bipyridine.....	60
IV.1.	Synthèse d'une nouvelle porphyrine anse bipyridine.....	61
IV.1.1.	Synthèse d'une anse bipyridine.....	62
IV.1.2.	Synthèse à effet de matrice.....	63
IV.2.	Synthèse d'une nouvelle porphyrine à double anse bipyridine.....	67
IV.3.	Synthèse d'une porphyrine de fer à anse bipyridine.....	69
V.	Conclusion.....	69

Chapitre 3 : Formation et caractérisation des modèles de cytochrome c oxydase..... 72

I.	Formation et caractérisation des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine de fer en milieu aqueux.....	73
I.1.	Complexe d'inclusion 30/Fe^{III}-21	73
I.1.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse.....	73
I.1.2.	Spectroscopie RPE.....	76
I.1.3.	Etude UV-visible en fonction du pH.....	79
I.2.	Complexe d'inclusion 22/Fe^{III}-31	80
I.2.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse.....	80
I.2.2.	Spectroscopie RPE.....	84
I.3.	Récapitulatif.....	85
II.	Formation et caractérisation des complexes d'inclusion fer/cuivre.....	86
II.1.	Complexe d'inclusion Cu^{II}-30/Fe^{III}-21	86
II.1.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse.....	87
II.1.2.	Etude UV-visible en fonction du pH.....	91
II.1.3.	Spectroscopie RPE.....	93
II.2.	Complexe 22/Cu^IFe^{III}-31	96
II.3.	Complexe Cu^IFe^{III}-32 soluble en milieu organique.....	102
III.	Conclusion.....	104

Chapitre 4 : Réactivité des modèles de cytochrome c oxydase..... 106

I.	Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par spectroscopie UV-visible.....	107
I.1.	Les porphyrines ferreuses.....	107
I.2.	Complexe d'inclusion 30/Fe^{II}-21 et Cu^I-30/Fe^{II}-21	108
I.3.	Complexe d'inclusion 22/Fe^{II}-31	112
I.4.	Récapitulatif.....	115
II.	Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par électrochimie.....	115
II.1.	Etude par voltampérométrie cyclique.....	115
II.2.	Etude par voltampérométrie hydrodynamique.....	118
II.2.1.	Electrode rotative à disque anneau.....	118

II.2.2. Analyse de Koutecky-Levich.....	123
II.3. Récapitulatif.....	127
Conclusion générale et perspectives.....	129
Experimental section.....	132

Introduction Générale

Les hémoprotéines, comprenant un hème (porphyrine de fer) comme cofacteur, sont responsables du transport, du stockage, de l'activation et de la conversion du dioxygène dans notre organisme. Cette réactivité finement orchestrée n'est possible que grâce à l'ajustement de la structure peptidique qui contrôle à la fois la solubilité, l'accès aux ligands exogènes et la réactivité de l'hème.

Parmi les hémoprotéines, le cytochrome *c* oxydase se distingue par son rôle dans la respiration cellulaire. Cette enzyme terminale de la chaîne respiratoire, avec un site actif fer/cuivre, catalyse sélectivement la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau. L'énergie libérée par cette réaction est utilisée pour la synthèse de l'ATP, source d'énergie universelle des cellules eucaryotes. La compréhension et la reproduction de cette réaction exergonique propre a motivé les recherches de nombreux chimistes au travers d'une approche biomimétique.

Dans ce contexte, de nombreux modèles de cytochrome *c* oxydase ont été élaborés afin d'établir une relation entre la structure de l'enzyme et sa réactivité et de reproduire au mieux ses propriétés catalytiques. L'objectif de cette approche biomimétique, n'est pas de reproduire exactement les architectures enzymatiques, bien trop complexes, mais plutôt de comprendre pourquoi la nature a choisi un motif précis pour réaliser la réduction sélective de l'oxygène moléculaire en eau, simple dans son principe mais compliquée dans sa réalisation.

Depuis plusieurs années, différents modèles fer/cuivre ont été développés dans le laboratoire à partir d'une porphyrine à anse phénantroline. Dans ces analogues synthétiques de cytochrome *c* oxydase, le fer est coordonné dans la porphyrine et le cuivre est lié à l'anse phénanthroline, qui stabilise le cuivre dans un état cuivreux **Cu^I**. Certains de ces modèles, avec un site métallique cuivreux **Cu^I** déjà activé pour la réduction du dioxygène, se sont montrés efficaces pour la réduction tétra-électronique du dioxygène en électro-catalyse.

Ces travaux de thèse se sont focalisés sur le développement de nouveaux modèles de cytochrome *c* oxydase comme catalyseur pour la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau. Dans cette optique, une nouvelle porphyrine avec une anse bipyridine a été préparée, *via* une approche synthétique supramoléculaire (à effet de matrice). Comme la porphyrine à

anse phénantroline, cette porphyrine a été utilisée comme modèle fer/cuivre du cytochrome c oxydase pour l'électro-réduction du dioxygène.

Par ailleurs, nous nous sommes également intéressés à une approche développée par le Pr. H. Kitagishi qui construit, à partir de complexes d'inclusion « cyclodextrines/porphyrine » auto-assemblés, des modèles supramoléculaires d'hémoprotéines solubles dans l'eau. Dans ces modèles, les deux unités de cyclodextrines, utilisées comme mime de la matrice protéique, encapsulent la porphyrine et fournissent un environnement hydrophobe à proximité du site actif de la porphyrine. Cette approche originale permet ainsi d'obtenir des modèles fonctionnels en milieu aqueux et, dans certains cas, biocompatibles. Grâce à la collaboration entre nos deux équipes, deux nouveaux modèles de cytochrome c oxydase solubles en milieu aqueux ont été développés :

- Un premier modèle où une nouvelle porphyrine à anse phénantroline, similaire à celle développée par notre laboratoire, a été associée à un dimère de cyclodextrine développé dans le laboratoire du Pr. H. Kitagishi.
- Un second modèle où une unité bipyridine, comme site de coordination pour le cuivre, à été incorporée dans un nouveau dimère de cyclodextrine qui a ensuite été associé à une porphyrine commerciale soluble dans l'eau.

Ces deux modèles de cytochrome c oxydase solubles dans l'eau, ont aussi été étudiés comme électro-catalyseurs pour la réduction du dioxygène.

Dans ce manuscrit, avant de présenter les travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse, un état de l'art, suivi de la présentation de nos objectifs, seront présentés dans le premier chapitre. Le second chapitre se focalisera sur la synthèse des nouvelles porphyrines et du nouveau dimère de cyclodextrine développés au cours de ces travaux. La formation et la caractérisation des assemblages porphyrine de fer/cyclodextrine, ainsi que des modèles fer/cuivre seront ensuite décrites dans le troisième chapitre. Enfin, dans le dernier chapitre, la réactivité de chacun des modèles sera présentée.

Chapitre 1. Les hémoprotéines et leurs modèles : relation structure-propriétés

TABLE DES MATIERES :

I.	Généralités sur les hémoprotéines	4
II.	Les systèmes naturels	5
II.1.	La myoglobine et l'hémoglobine	6
II.1.1.	Site proximal	7
II.1.2.	Site distal	8
II.2.	Le cytochrome c oxydase	10
II.2.1.	Structure du site actif	12
II.2.3.	Mécanisme de réduction du dioxygène	13
III.	Les modèles d'hémoprotéines solubles en milieu organique.....	15
III.1.	Les porphyrines de fer encombrées comme modèles de myoglobine.....	16
III.2.	Les porphyrines de fer/cuivre comme modèles de cytochrome c oxydase.....	19
III.2.1.	Complexes fer/cuivre auto-assemblés comme modèles structurels du site actif de l'enzyme	20
III.2.2.	Les porphyrines superstructurées fer/cuivre comme modèles fonctionnels de l'enzyme	22
IV.	Modèles d'hémoprotéines solubles en milieu aqueux.....	27
IV.1.	La création d'un environnement hydrophobe pour des transporteurs de dioxygène artificiels	28
IV.2.	Assemblages cyclodextrines/porphyrine comme agent antipoison	35
IV.3.	Assemblage cyclodextrines/porphyrine comme modèle de cytochrome c oxydase	35
V.	Conception du projet et objectifs	36

I. Généralités sur les hémoprotéines

Les hémoprotéines sont une classe de métalloprotéines particulièrement polyvalentes. Elles renferment une ou plusieurs porphyrines de fer, appelées hèmes, agissant comme cofacteurs dans la matrice protéique. Il existe différentes variantes de l'hème, telles que l'hème a, l'hème b, ou encore l'hème c (**Figure 1.1**), liées ou non de manière covalente aux résidus peptidiques de la poche protéique.¹ Les hémoprotéines sont capables de promouvoir trois grands types de fonctions :

- La fixation réversible du dioxygène assurée par l'hémoglobine et la myoglobine ;
- Le transfert d'électrons, à l'aide des cytochromes *a*, *b* et *c*, dans la chaîne respiratoire aérobie ;
- La catalyse enzymatique avec par exemple le cytochrome P₄₅₀ qui active l'oxygène moléculaire puis oxyde des substrats avec, ou le cytochrome *c* oxydase qui réduit le dioxygène en eau.²

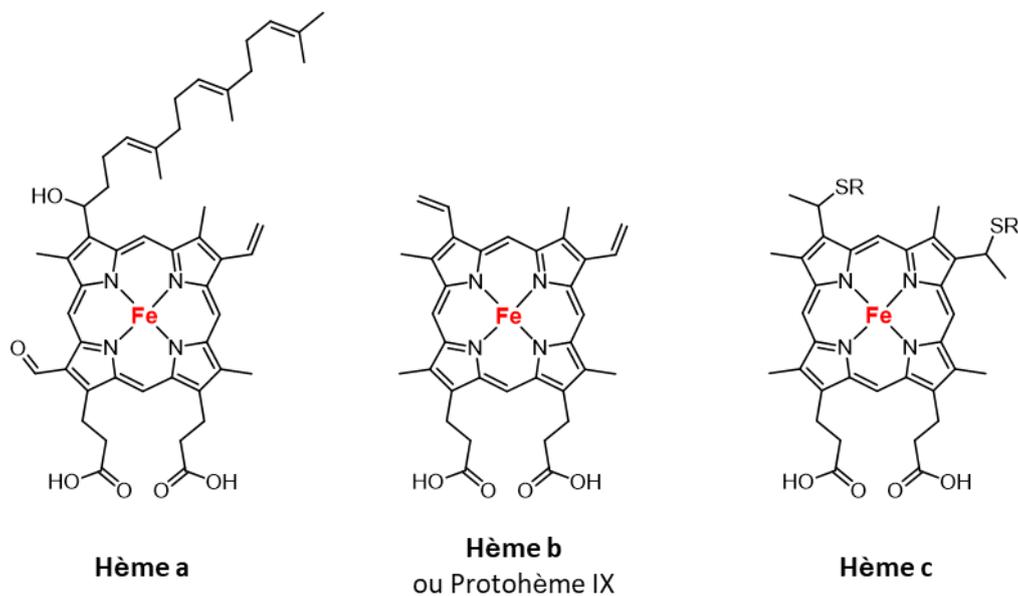


Figure 1.1. Structures moléculaires des porphyrines de fer présentes dans les systèmes naturels.

Bien que l'hème soit le dénominateur commun de ces différents processus biologiques, ce sont les variations de l'environnement protéique qui modulent ses propriétés et contrôlent sa réactivité. La combinaison d'interactions fortes (liaison covalente, coordination axiale du fer) et d'interactions faibles (liaison hydrogène, interaction hydrophobe...) présentes au sein de la matrice protéique définit les propriétés du site actif.

Cette panoplie d'interactions contribue aussi à l'ancrage du cofacteur porphyrinique dans la matrice protéique, à la stabilisation des différents degrés d'oxydation de l'hème et au contrôle l'approche de ligands exogènes et de substrats.³

Dans l'optique de mieux comprendre les relations structure-propriétés qui existent au sein de ces protéines, mais aussi, dans certains cas, d'en reproduire l'activité, les chimistes se sont intéressés à la conception et à l'étude de modèles de site actif d'hémoprotéines. L'objectif de ces approches est de reproduire, totalement ou partiellement, à l'aide d'un composé synthétique, la structure et/ou la réactivité du site actif considéré. Dans certains cas, les composés modèles peuvent même être exploités pour des applications biomédicales, ou encore environnementales.

Dans ce cadre, ces travaux de thèse se sont focalisés spécifiquement sur la conception et l'étude de modèles fonctionnels du cytochrome *c* oxydase, avec une partie de ces modèles vouée à être soluble dans l'eau. Le cytochrome *c* oxydase est une enzyme possédant un site actif fer/cuivre où le dioxygène est réduit en eau. Avant de détailler le fonctionnement de cette enzyme, il convient de décrire le fonctionnement d'hémoprotéines se coordonnant réversiblement au dioxygène sans l'activer : la myoglobine et l'hémoglobine. Ces rappels permettront de mettre en évidence la complémentarité des interactions hème/matrice protéique abordée ci-dessus et de corrélérer certaines de leurs caractéristiques structurales à leur fonction spécifique. Enfin, avant de décrire les objectifs de ces travaux de thèse, un aperçu des composés modèles associés à ces protéines solubles ou non dans l'eau sera présenté.

II. Les systèmes naturels

La respiration aérobie est le principal moyen de produire de l'énergie chez l'homme, les animaux, les champignons, de nombreuses levures et les bactéries. Plus de 95 % du dioxygène consommé par ces organismes est utilisé dans la respiration cellulaire aérobie.⁴ Dans ce processus, l'oxygène moléculaire, en tant qu'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire, est sélectivement réduit en eau. L'énergie libérée par cette réaction exergonique est par la suite utilisée pour la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP), source d'énergie de nos cellules. Avant d'être utilisé pour produire l'ATP, le dioxygène doit être acheminé puis stocké dans nos cellules. Chez l'homme, le transport, le stockage et la réduction de l'oxygène moléculaire sont respectivement assurés par l'hémoglobine, la myoglobine et le cytochrome

c oxydase. Les structures et les différentes fonctions de ces trois hémoprotéines sont décrites ci-après.

II.1. La myoglobine et l'hémoglobine

L'hémoglobine et la myoglobine sont des protéines respiratoires toutes deux capables de fixer réversiblement le dioxygène. L'hémoglobine se trouve principalement dans les globules rouges du sang et a pour rôle d'acheminer l'oxygène moléculaire des poumons vers les tissus où le dioxygène est ensuite libéré et transmis à la myoglobine. La myoglobine est ensuite responsable du stockage du dioxygène dans les cellules de différents tissus, jusqu'à son utilisation par les mitochondries lors de la phosphorylation oxydante, réaction produisant l'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules.

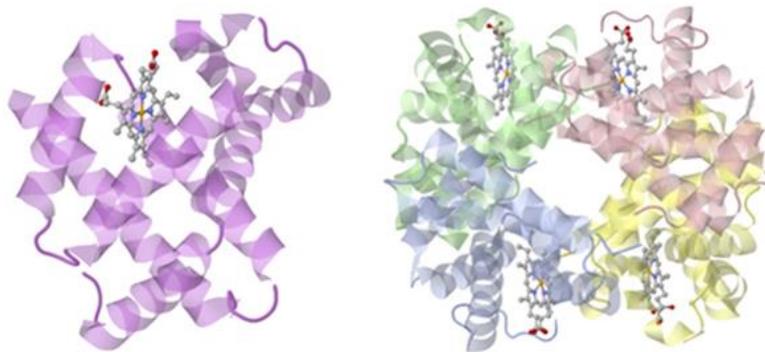


Figure 1.2. Structures aux rayons X de l'oxymyoglobine (code PDB 1MBO)⁵ et de l'oxyhémoglobine humaines (code PDB 1HHO).⁶

La myoglobine de cachalot et l'hémoglobine de cheval sont les premières structures protéiques déterminées à haute résolution par radiocristallographie aux rayons X, respectivement grâce aux travaux de Kendrew⁷ et Perutz,⁸ récompensés par le prix Nobel de Chimie en 1962.

La myoglobine est une protéine monomérique composée de huit hélices α qui forment un domaine protéique appelé globine, séquestrant le cofacteur porphyrinique dans une poche hydrophobe (gauche, **Figure 1.2**). Son repliement, en forme de pelote, est maintenu par une combinaison d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogène et de forces de van der Waals.⁹

L'hémoglobine, quant à elle, est une protéine multimérique constituée de quatre sous-unités polypeptidiques, deux sous-unités α et deux sous-unités β , renfermant chacune un hème (droite, **Figure 1.2**). Malgré de nombreuses différences dans leurs séquences d'acides

aminés, les sous-unités α et β de l'hémoglobine ont des structures tertiaires constituées de huit domaines hélicoïdaux, et donc très similaires à celle de la myoglobine. Le maintien de la structure tridimensionnelle de chaque sous-unité est assuré par la même combinaison d'interactions faibles que dans la myoglobine.¹⁰

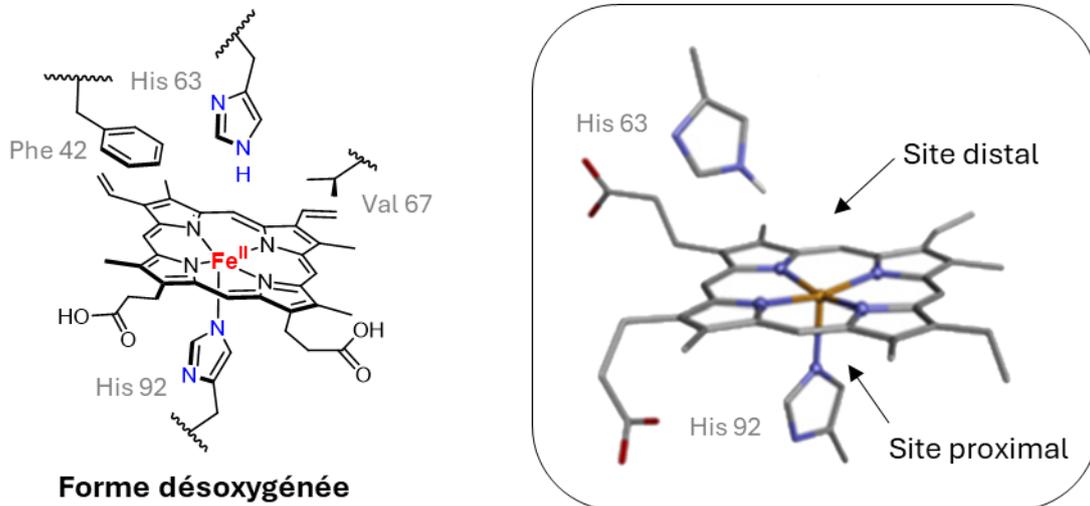


Figure 1.3. Représentation schématique et structure aux rayons X du site actif de la désoxyhémoglobine humaine de la sous-unité β (code PDB 2DN2).¹¹

Chez l'homme, les sites actifs de la myoglobine et de l'hémoglobine sont semblables (**Figure 1.3**). Ces sites actifs sont composés du protohème IX ou hème b, entouré de deux résidus non polaires, la phénylalanine et la valine, et de deux résidus polaires, deux histidines de part et d'autre du macrocycle porphyrinique.¹¹ Les différents résidus d'acides aminés entourant le cofacteur porphyrinique permettent, chez toutes les hémoprotéines, de différencier les deux faces de la porphyrine en fonction de son environnement : la face proximale et la face distale.

II.1.1. Site proximal

Le site proximal correspond à la face où le fer, situé au centre de la porphyrine, se coordine à un premier ligand axial. Dans les sites actifs de la myoglobine et de l'hémoglobine, ce ligand axial est un imidazole issu du résidu d'histidine (numéroté His 92 dans la sous-unité β de l'hémoglobine, **Figure 1.3**). En complétant la sphère de coordination du fer, l'imidazole proximal participe à l'ancrage du cofacteur porphyrinique dans la globine.

Ainsi, l'imidazole proximal, en apportant un premier ligand axial à l'hème, stabilise l'ion ferreux Fe^{II} dans un état haut spin $S = 2$ (forme désoxygénée, **Figure 1.3**). A ce degré

d'oxydation et dans cet état de spin, l'ion ferreux Fe^{II} volumineux, sort de 0,5 Å du plan de la porphyrine, ce qui contraint la porphyrine à adopter une conformation dôme. Lors de la fixation du dioxygène, le site ferreux Fe^{II} cède un électron à la molécule de dioxygène pour former un site ferrique Fe^{III} bas spin $S = 1/2$ lié à un radical anion superoxyde. L'ion ferrique Fe^{III} , devenu plus petit, se repositionne dans le plan de l'anneau porphyrinique, entraînant une réorganisation du site actif et de toute la structure tertiaire du polypeptide qui l'entoure.^{9,11}

Dans l'hémoglobine, le réarrangement de la structure tertiaire d'une des sous-unités entraîne le réarrangement de celle des sous-unités adjacentes, et finalement de toute sa structure quaternaire. Le tétramère, à faible affinité initiale pour le dioxygène, passe ainsi d'une conformation tendue T à une forme relâchée R, ayant une meilleure affinité pour le dioxygène. La première coordination du dioxygène, facilite la liaison des molécules de dioxygène suivantes, et ainsi de suite. Cet exemple d'effet allostérique est dépendant de la pression partielle en dioxygène et le passage d'une forme à l'autre est aussi contrôlé par la pression partielle en dioxyde de carbone ou encore le pH.^{10,12}

II.1.2. Site distal

La face distale de l'hème correspond au site de liaison de ligands exogènes. Dans la myoglobine et l'hémoglobine, le site distal est délimité par trois résidus d'acides aminés : la phénylalanine, la valine, et l'histidine (numérotés Phe 42, Val 67 et His 92 dans la sous-unité β de l'hémoglobine, **Figure 1.3**). Ces résidus peptidiques distants contrôlent l'approche des ligands exogènes sur le site actif sans interagir directement avec le fer situé dans l'hème.

Lorsque le dioxygène se fixe sur l'hème, il adopte un mode de coordination coudé dit « end-on » avec un angle Fe-O-O de 120° .¹³ La formation d'une liaison hydrogène entre l'atome terminal d'oxygène et le résidu d'histidine distal permet de stabiliser l'adduit oxygéné (forme oxygénée, **Figure 1.4**), en limitant entre autres les réactions d'auto-oxydation.¹⁴ Cette interaction semble par ailleurs contribuer à l'augmentation de l'affinité du dioxygène pour les sites actifs de la myoglobine et de l'hémoglobine. En effet, la substitution du résidu d'histidine distal par un résidu de phénylalanine supprimant la liaison hydrogène, augmente d'un facteur 100 la pression de demi-saturation du site actif de la myoglobine vis-à-vis du dioxygène.¹⁵

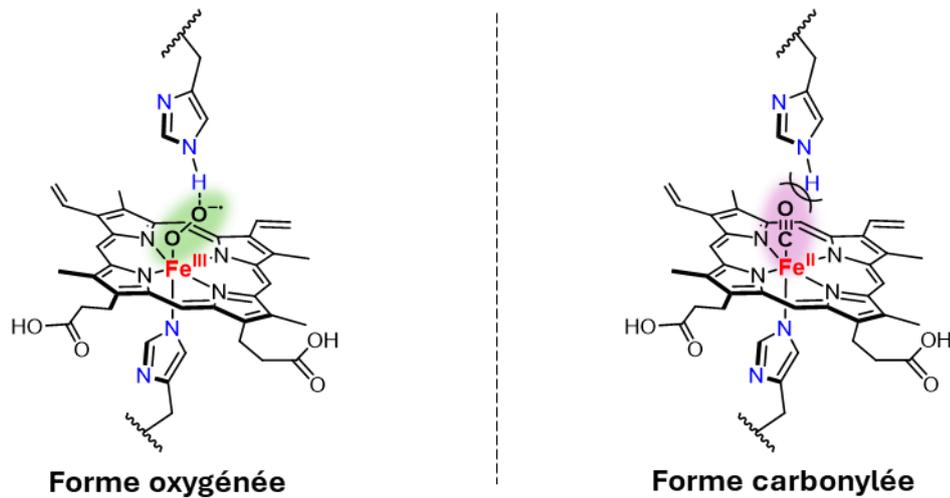


Figure 1.4. Représentation du site actif de l'hémoglobine (et de la myoglobine) sous ses formes oxygénée et carbonylée.

La pression de demi-saturation de la protéine $P_{1/2}$ correspond à la pression partielle d'un gaz, ici le dioxygène, nécessaire pour saturer la moitié des sites de la protéine (éq. 1). Etant inversement proportionnelle à la constante d'association K de la protéine avec le dioxygène, une petite valeur de pression de demi-saturation est typique d'une protéine à forte affinité pour le dioxygène. A l'inverse, une plus grande valeur est caractéristique d'une baisse d'affinité.

$$P_{1/2}(O_2) = \frac{1}{K} = \frac{[Mb] \times P(O_2)}{[Mb - O_2]} \quad (\text{éq. 1})$$

Outre le dioxygène, le monoxyde de carbone est un ligand biologiquement important pour la myoglobine et l'hémoglobine. Ayant une forte affinité pour les hèmes ferreux, il est un inhibiteur potentiel et puissant des hémoprotéines. Habituellement, le monoxyde de carbone adopte une coordination linéaire perpendiculaire au plan de la porphyrine (forme carbonylée, **Figure 1.4**). Cependant, les structures radiocristallographiques de la myoglobine et de l'hémoglobine montrent qu'au sein de leur site actif, le monoxyde de carbone adopte un mode de coordination légèrement coudé avec un angle de 175° .⁹ Cette distorsion est attribuée à la présence du résidu histidine distal trop encombrant pour que le monoxyde de carbone adopte un mode de coordination linéaire habituel. La présence de ce résidu semble donc contraindre la fixation du monoxyde de carbone sur les sites actifs de la myoglobine et de l'hémoglobine.

Bien que le site actif de la myoglobine et de l'hémoglobine semble plus adapté à la géométrie de coordination du dioxygène, leur affinité pour le monoxyde de carbone reste,

respectivement, 30 et 150 fois supérieure à leur affinité pour le dioxygène.¹⁶ Cette affinité relative M , étant calculée à partir du rapport entre la pression de demi-saturation en dioxygène et celle en monoxyde de carbone (éq. 2), une grande valeur de M est associée à une meilleure affinité pour le monoxyde de carbone que pour le dioxygène.

$$M = \frac{P_{\frac{1}{2}}(O_2)}{P_{\frac{1}{2}}(CO)} \quad (\text{éq. 2})$$

Ces valeurs restent cependant bien inférieures à celles de la plupart de leurs homologues synthétiques, ayant des valeurs de M le plus souvent comprises entre 10^3 et 10^5 .¹⁶ Cette différence démontre une fois de plus l'influence des ligands distaux lors de l'approche du dioxygène et du monoxyde de carbone. De plus, la globine, dont les contributions exactes ne sont pas complètement rationalisées, contribue sûrement à la discrimination du monoxyde de carbone par le biais d'un grand nombre d'interactions hydrophobes. L'hémoglobine et la myoglobine semblent clairement avoir été conçues par la nature pour transporter et stocker le dioxygène en présence de faibles quantités du poison qu'est le monoxyde de carbone.

II.2. Le cytochrome c oxydase

L'ATP est la source d'énergie universelle des organismes aérobies. Chez l'homme, elle est principalement produite dans la membrane interne mitochondriale, au cours du procédé de phosphorylation oxydante. Bien que nos cellules aient développé différentes stratégies pour se fournir en ATP, la phosphorylation oxydante prédomine de par la nature hautement exergonique d'une réaction particulière : la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau.

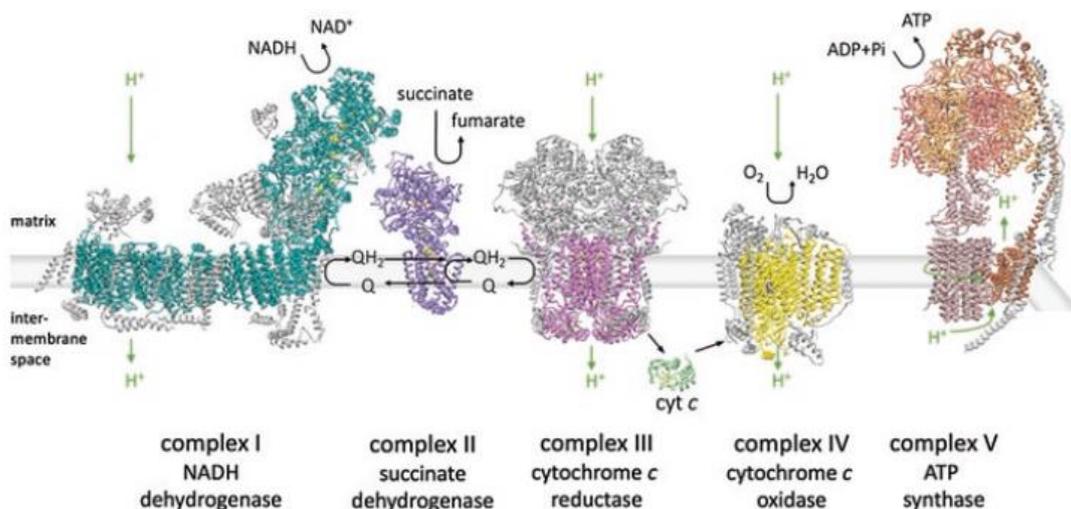


Figure 1.5. Représentation schématique de la phosphorylation oxydante.¹⁷

Durant le processus respiratoire, les électrons issus de l'oxydation de NADH et FADH₂ sont successivement transférés, au long de ce qu'on appelle la chaîne respiratoire (complexes I à IV **Figure 1.5**), d'un site donneur d'électrons, à fort potentiel, à un site accepteur d'électron, à plus faible potentiel. A la fin de cette chaîne, le dioxygène, accepteur final d'électrons, est réduit en eau par cytochrome *c* oxydase (complexe IV). L'énergie libérée par cette succession d'évènements rédox entraîne la translocation de protons à travers la membrane, de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Dans ce cadre, la réduction catalytique du dioxygène provoque l'extraction de huit protons issus de la matrice suivie de l'expulsion de quatre d'entre eux vers l'espace intermembranaire, les quatre protons restants étant utilisés pour former deux molécules d'eau, selon l'équation bilan suivante :¹⁸



Le pompage de ces protons au travers la membrane génère un gradient électrochimique, utilisé en dernier lieu par l'ATP-synthase (complexe V) pour synthétiser l'ATP à partir adénosine diphosphate (ADP) et de sel de phosphate inorganique.

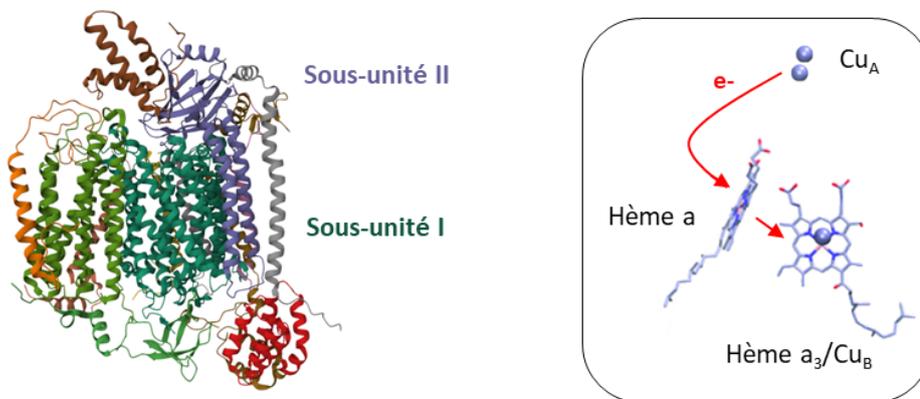


Figure 1.6. Structure aux rayons X du site actif du cytochrome *c* oxydase de cœur de bœuf dans l'état totalement réduit et agrandissement des centres rédox actifs (PDB 5B1B).¹⁹

En 1995, la publication quasi simultanée des structures par diffraction des rayons X du cytochrome *c* oxydase de cœur de bœuf²⁰ et bactérien²¹ (*Paracoccus denitrificans*) a permis de mieux comprendre les relations structure-propriétés existant au sein de cette enzyme. La protéine intermembranaire de cœur de bœuf, qui est prise comme modèle pour la suite de ce travail, est constituée de 13 sous-unités protéiques incluant quatre sites métalliques rédox-actifs (**Figure 1.6**). La sous-unité I comporte trois de ces quatre cofacteurs : l'hème a et l'hème a₃ associé à un site Cu_B; la sous-unité II comprend le site binucléaire contenant deux atomes

de cuivre Cu_A .¹⁷ Au sein de la protéine, les électrons issus de l'oxydation du cytochrome *c*, dernier site donneur d'électrons de la chaîne respiratoire avant le cytochrome *c* oxydase, sont transférés du site Cu_A à l'hème *a*, jusqu'au site catalytique de l'enzyme : hème a_3/Cu_B (**Figure 1.6**).

II.2.1. Structure du site actif

Dans son état réduit, le site actif du cytochrome *c* oxydase est composé d'une porphyrine ferreuse Fe^{II} haut spin $S = 2$ coordonné au résidu d'histidine proximal 376, et d'un site cuivreux Cu^I coordonné aux trois résidus d'histidines 290, 291 et 240, ce dernier résidu est lié de manière covalente à un résidu de tyrosine 244 (**Figure 1.7**). En position distale, des ligands exogènes, comme le dioxygène, s'insèrent entre l'atome de fer de l'hème a_3 et l'atome de cuivre du site Cu_B . La distance entre ces deux sites métalliques varie de 4,4 à 5,3 Å, en fonction du degré d'oxydation des métaux et de la nature des ligands exogènes coordonnés aux centres métalliques.²²

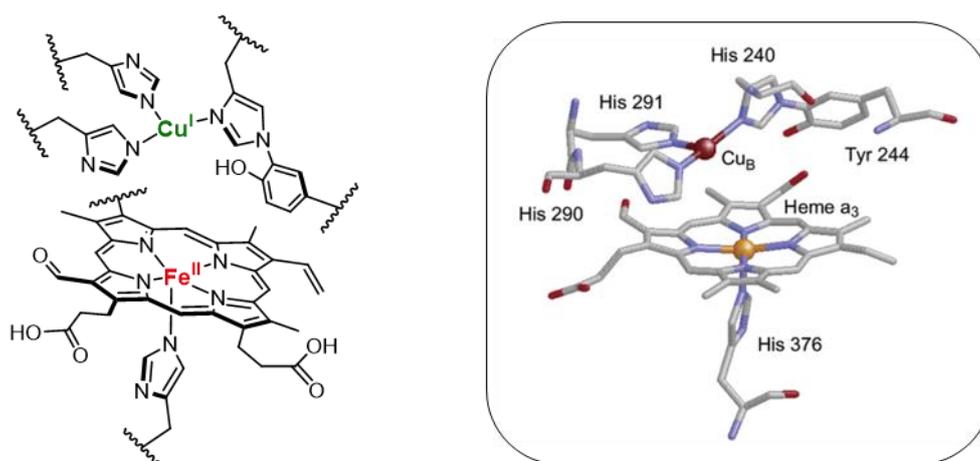


Figure 1.7. Représentation et structure aux rayons X du site actif du cytochrome *c* oxydase de cœur de bœuf dans son état réduit (PDB 1OCR).²³

D'après différentes études de susceptibilité magnétique, de RPE et de Mössbauer à l'état oxydé, le site actif de l'enzyme de spin global $S = 2$ serait constitué d'un site ferrique Fe^{III} bas spin $S = 5/2$ associé par un couplage antiferromagnétique au site cuivrique Cu^{II} $S = 1/2$.²⁴ Par ailleurs, contrairement à l'état réduit du site actif Fe^{II}/Cu^I où la présence d'aucun ligand exogène n'a été détectée, les données issues de structures cristallines du site actif oxydé Fe^{III}/Cu^{II} révèlent une densité électronique entre les deux métaux. Tout d'abord attribuée comme étant un pont peroxy, et bien que cette hypothèse soit en accord avec un couplage

antiferromagnétique entre les deux sites métalliques, elle a par la suite été écartée en raison des difficultés à intégrer cet intermédiaire dans le cycle catalytique de l'enzyme.²⁵ D'autres travaux ont envisagé la présence d'une molécule de dioxygène,²⁶ ou encore d'un ion hydroxyde associé à une molécule d'eau,²⁷ mais à ce jour, la précision des structures cristallographiques ne permet pas une attribution sans ambiguïté. Dans la description du cycle catalytique à venir, cette densité électronique sera attribuée à une molécule d'eau coordonnée au site Cu_B et un ion hydroxyde coordonné au fer de l'hème a_3 comme décrit récemment dans les travaux de Rousseau et ses collaborateurs.²⁸

II.2.3. Mécanisme de réduction du dioxygène

La résolution de structures radiocristallographiques du site actif réduit et oxydé associée aux analyses spectroscopiques (UV-visible, Raman, RPE...) d'intermédiaires réactionnels ont permis d'élucider en grande partie le mécanisme de réduction catalytique du dioxygène dans le cytochrome *c* oxydase (**Figure 1.8**).^{27,28,29} Ce cycle catalytique comprend une phase oxydante, dans laquelle l'enzyme réduite est oxydée par le dioxygène, et une phase réductrice, au cours de laquelle l'enzyme élimine deux molécules d'eau.

Au début du cycle catalytique, l'enzyme peut se trouver dans deux états rédox différents : soit entièrement réduit ou soit à valence mixte. L'état entièrement réduit de l'enzyme est caractérisé par un site Cu_A cuivreux complètement réduit Cu^I-Cu^I et un hème a ferreux bas spin Fe^{II} , tandis que l'état à valence mixte associe un site Cu_A à valence mixte $Cu^{II}-Cu^I$ et un hème a ferrique bas spin Fe^{III} . Dans ces deux cas, le site actif de l'enzyme hème a_3/Cu_B est dans un état réduit **R** avec un site ferreux haut spin Fe^{II} associé au site cuivreux Cu^I .²²

Le processus catalytique est initié par l'insertion du dioxygène dans le site actif réduit **R** de l'enzyme. Le dioxygène se lie au site ferreux Fe^{II} pour former l'intermédiaire **A**, un adduit superoxyde ferrique $Fe^{III}-O_2^{\bullet-}$ similaire à celui retrouvé dans les sites actifs de la myoglobine et de l'hémoglobine. Cette étape est suivie du clivage hétérolytique de la liaison **O-O** entraînant la conversion de l'adduit oxygéné **A** en un intermédiaire **P_R** constitué d'un site ferryl-oxo/hydroxyde cuivrique $Fe^{IV}=O/Cu^{II}-OH$ associé au résidu de tyrosinate 244 lui ayant cédé un proton. Lors de cette étape, trois électrons sont nécessaires au clivage de la liaison **O-O** : deux d'entre eux proviennent directement du site actif (oxydation du fer de l'hème a_3 et du cuivre de Cu_B) et le dernier, lorsque l'enzyme est dans son état réduit, est délivré par l'hème

a, cofacteur à proximité du site actif.³⁰ Cependant, si l'enzyme est dans un état à valence mixte, l'hème *a* ferrique Fe^{III} ne peut pas donner d'électrons au site actif. Dans ce cas, la rupture homolytique de la liaison **O-H** du résidu de tyrosine 244 permet de fournir temporairement le dernier électron manquant, entraînant la formation d'un intermédiaire transitoire P_M .³¹ Le résidu de tyrosine, en jouant le rôle de donneur d'électrons alternatif, prévient ainsi la formation éventuelle d'espèces oxygénées partiellement réduites toxiques dans le site actif. Une fois l'électron de l'hème *a* de nouveau disponible, l'intermédiaire P_M est converti en P_R *via* la réduction du radical tyrosyle en anion tyrosinate.³² L'entrée ultérieure d'un proton dans le site actif transforme l'intermédiaire P_R en espèce protonée **F**, où le ligand hydroxyde du site cuivrique serait protoné en eau au profit de l'ion tyrosinate. Par la suite, l'entrée d'un électron et d'un proton supplémentaires dans le site actif entraîne la conversion de l'intermédiaire **F** en O_H , où le groupement $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ est réduit en hydroxyde ferrique $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$.

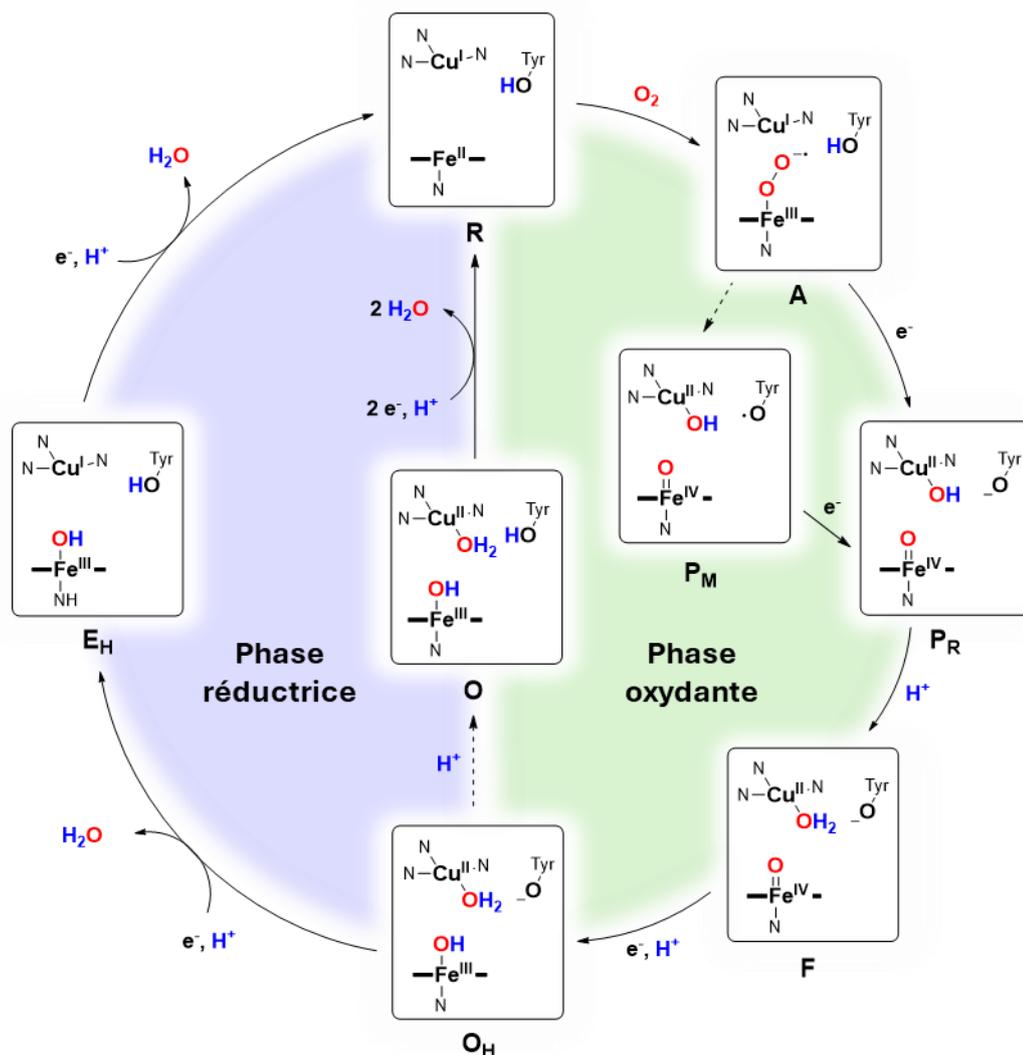


Figure 1.8. Cycle catalytique de réduction du dioxygène en eau par le cytochrome c oxydase.

Pendant cette phase oxydante, la translocation des protons à travers la membrane se produit lors des étapes $P_R \rightarrow F$ et $F \rightarrow O_H$. De plus, dans la phase réductrice, si O_H est immédiatement réduit, deux étapes supplémentaires de translocation de protons peuvent se produire pendant les transitions $O_H \rightarrow E_H$ et $E_H \rightarrow R$. Cependant, si la réduction est retardée, il semblerait que O_H se relaxe spontanément en une espèce au repos O , dont la réduction ultérieure en intermédiaire réduit R ne permettrait pas la translocation de protons au travers de la membrane.³³ Cette espèce O , où le résidu de tyrosine est de nouveau sous sa forme protonée, correspondrait aux structures cristallographiques de cytochrome *c* oxydase oxydé. Quelle que soit la voie empruntée lors de la phase réductrice, l'entrée subséquente de deux électrons et deux protons permet dans les deux cas de régénérer le site actif Fe^{II}/Cu^I sous sa forme réduite R , tout en libérant deux molécules d'eau. Par ailleurs, sans relaxation du site O_H en O des études IR ont montré que le résidu de tyrosine est protoné lors de la transition vers l'espèce $O_H \rightarrow E_H$.³⁰

Depuis maintenant plus de 50 ans, de nombreux chimistes se sont inspirés de la structure des sites actifs de ces différentes hémoprotéines afin de développer des modèles biomimétiques. Leur approche s'est le plus souvent concentrée sur la fonctionnalisation de porphyrines de fer encombrées afin de moduler l'environnement local des sites actifs. Cette approche offre la possibilité de rationaliser l'impact de divers facteurs sur leur fonctionnalité (environnement proximal et distal de l'hème, présence de l'atome de cuivre ou non...) ce qui n'est pas réalisable avec la protéine, édifice beaucoup plus complexe. Pour illustrer cette démarche, une série de modèles, allant des plus simples aux plus complexes, est présentée dans les paragraphes qui suivent.

III. Les modèles d'hémoprotéines solubles en milieu organique

La conception de modèles d'hémoprotéines fait face au défi récurrent de la formation de dimères porphyriniques à ponts μ -oxo, issue de l'oxydation des porphyrines ferreuses Fe^{II} exposées au dioxygène. Pour répondre à cette problématique, les chimistes ont développé différents types de porphyrines encombrées. En plus de prévenir la formation de dimères, cette approche permet souvent de créer deux environnements distincts de chaque côté du macrocycle pyrrolique et donc de mimer le site proximal et distal d'une hémoprotéine. Les différentes évolutions dans la structuration des modèles d'hémoprotéine ainsi que les

paramètres qui influencent leurs propriétés sont présentés dans les pages qui suivent, de manière non exhaustive, au travers de quelques exemples de modèles de myoglobine et de cytochrome *c* oxydase.

III.1. Les porphyrines de fer encombrées comme modèles de myoglobine

Les modèles de myoglobine ont pour objectif de coordiner le dioxygène réversiblement comme dans le site actif de la protéine. Un autre enjeu majeur est de favoriser la coordination du dioxygène par rapport à celle du monoxyde de carbone. A ces fins, de nombreux chimistes ont développé différents objets moléculaires présentés ci-après.

En 1973, le groupe de Collman fut le premier à concevoir un modèle de myoglobine synthétique fixant réversiblement le dioxygène à partir d'une porphyrine encombrée à piquets.³⁴ Cette porphyrine de fer **Fe-1** est fonctionnalisée avec quatre piquets orientés du même côté du macrocycle permettant de limiter l'approche de ligand volumineux sur la face encombrée (**Figure 1.9**). Ainsi, lorsque la face libre est déjà occupée par une base axiale *N*-méthyl imidazole, le dioxygène se fixe préférentiellement du côté encombré de la porphyrine.

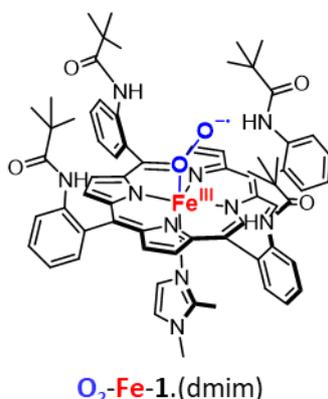


Figure 1.9. Structure moléculaire de la porphyrine de fer à piquets **Fe-1** coordonnée au 1,2-diméthylimidazole (dmim) en position proximale et au dioxygène en position distale.

L'introduction de piquets représente la première avancée dans la structuration des modèles d'hémoprotéines. Comme dans les systèmes naturels, les deux faces de la porphyrine de fer sont différenciées. Les piquets miment la poche distale de la myoglobine et évitent la formation de dimères μ -oxo, tandis que l'ajout d'une base axiale permet de reproduire son environnement proximal.

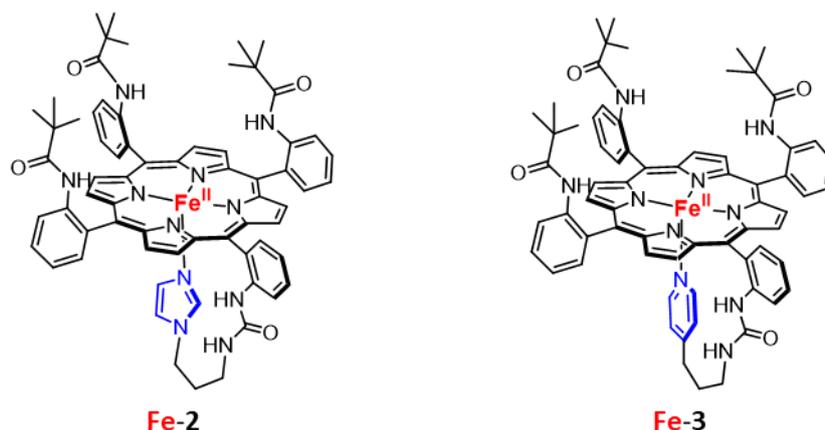


Figure 1.10. Structure moléculaire des porphyrines de fer à piquets avec une base axiale imidazole **Fe-2** et avec une base axiale pyridine **Fe-3**.

Une série de porphyrines à piquets, incorporant une base axiale imidazole **Fe-2** ou pyridine **Fe-3** directement liée à l'édifice a par la suite été développée (**Figure 1.10**).³⁵ De même que précédemment, le dioxygène se coordine réversiblement au site ferreux Fe^{II} du côté le plus encombré de la porphyrine. Au sein de cette série de modèles, les études d'affinité vis-à-vis du dioxygène ont permis de montrer que plus le pK_a du ligand proximal est élevé, plus la pression de demi-saturation du site associé est faible (**Tableau 1.1**). L'utilisation d'un imidazole proximal plus basique que la pyridine améliore donc l'affinité de la porphyrine de fer pour le dioxygène.

Tableau 1.1. Affinité de la myoglobine (Mb), l'hémoglobine (Hb) humaines et de différents modèles pour le dioxygène, le monoxyde de carbone, ainsi que leur affinité relative.¹⁶

Système	Milieu	$P_{1/2}(\text{O}_2)$ (Torr)	$P_{1/2}(\text{CO})$ (Torr)	M
Mb	Aqueux pH 7, 25 °C	0,69	0,023	30
Hb (forme R)	Aqueux pH 7, 25 °C	0,22	$1,4 \cdot 10^{-3}$	150
Fe-2	Toluène, 25 °C	1,26	$4,9 \cdot 10^{-5}$	26 000
Fe-3	Toluène, 25 °C	52,2	$6,4 \cdot 10^{-4}$	76 000
Fe-4	Toluène, 20 °C	2	$9 \cdot 10^{-5}$	20 000
Fe-5	Toluène, 20 °C	18	$1 \cdot 10^{-4}$	180 000
Fe-6 .(dmim)	Toluène, 20 °C	2,3	2,9	0,79

Le groupe de Momenteau a par ailleurs étudié l'influence de la présence d'un groupement donneur de liaison hydrogène situé à proximité du site de coordination sur l'affinité de la porphyrine de fer pour le dioxygène.³⁶ Dans cette optique, une série de porphyrines à double anse a été développée, avec une anse de part et d'autre du macrocycle

porphyrinique (**Figure 1.11**). Dans cette série, les deux porphyrines ont une première anse comprenant une molécule de pyridine comme base proximale du fer. La deuxième anse est fonctionnalisée soit avec des groupements amides, donateurs de liaisons hydrogène en position distale dans la porphyrine **Fe-4**, soit avec une simple chaîne alkyle, sans site donneur de liaison hydrogène pour la porphyrine **Fe-5**. Dans cet exemple, la présence des groupements donateurs de liaisons hydrogène augmente d'un facteur 10 l'affinité de la porphyrine pour le dioxygène (**Tableau 1.1**).

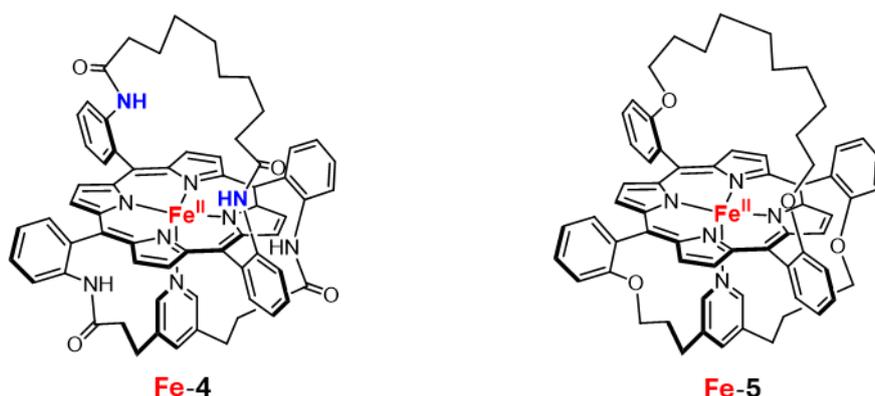


Figure 1.11. Structure moléculaire des porphyrines de fer à double anse à base axiale pyridine avec **Fe-4** et sans **Fe-5** groupement donneur de liaison hydrogène.

Ces différents travaux montrent une fois de plus l'importance de l'environnement proximal et distal des modèles d'hémoprotéine vis-à-vis de leur affinité avec le dioxygène. Cependant, comparé à la myoglobine et à l'hémoglobine, ces modèles ont une affinité pour le monoxyde de carbone encore bien trop élevée, impliquant de bien plus grandes valeurs de M que dans les systèmes naturels (**Tableau 1.1**). Dans ces différents modèles, l'encombrement du site distal, généré soit par des piquets, soit par une anse, ne semble pas être suffisant pour réduire l'affinité de la porphyrine vis-à-vis du monoxyde de carbone.

Quelques années plus tard, le développement de nouvelles porphyrines encombrées par un chapeau aza éther couronne a permis de drastiquement diminuer l'affinité de la porphyrine de fer pour le monoxyde de carbone.³⁷ L'une de ces porphyrines **Fe-6** est constituée d'un chapeau triazacyclononane (TACN), avec une base exogène imidazole coordonnée au fer en position proximale (**Figure 1.12**). Ce composé modèle est le premier à avoir une meilleure affinité pour le dioxygène que pour le monoxyde de carbone, impliquant une valeur de M inférieure à celles des systèmes naturels (**Tableau 1.1**).

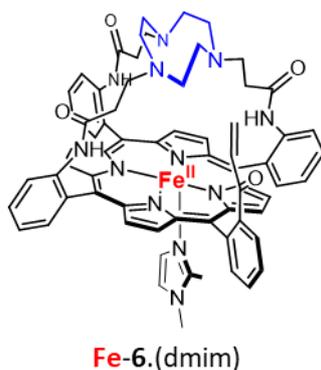
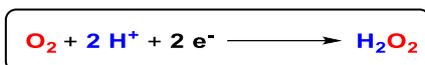


Figure 1.12. Structure moléculaire d'une porphyrine de fer à chapeau aza éther couronne **Fe-6** coordonnée au 1,2-diméthylimidazole (dmim) en position proximale.

Au fil des années, le développement d'édifices porphyriniques encombrés a largement contribué à fournir des modèles de myoglobine capables de discriminer le monoxyde de carbone par rapport au dioxygène. La conception de différents types de porphyrines super-structurées a aussi permis d'élaborer d'autres modèles d'hémoprotéines comme les modèles de cytochrome c oxydase.

III.2. Les porphyrines de fer/cuivre comme modèles de cytochrome c oxydase

À travers la littérature, deux grandes familles de modèles de cytochrome c oxydase se dégagent : les modèles structuraux et les modèles fonctionnels. Les modèles structuraux reproduisent l'état oxydé **O/O_H** ou réduit **R** du site actif de l'enzyme. Lorsqu'ils sont dans un état réduit **R**, ces modèles peuvent être mis en présence de dioxygène afin d'étudier et caractériser différents intermédiaires réactionnels associés au cycle catalytique de l'enzyme. De leur côté, les modèles fonctionnels sont destinés à reproduire l'activité de l'enzyme et donc à réduire le dioxygène en eau. Leur réactivité est étudiée en électrocatalyse, avec une électrode fournissant les électrons nécessaires à la réduction du dioxygène. Ces études permettent de déterminer le nombre d'électrons échangés durant l'électroanalyse ou encore de mesurer les potentiels de réduction. De plus, à l'aide d'une électrode tournante à disque de graphite et anneau de platine, il est possible de détecter la production éventuelle de peroxyde d'hydrogène, formé lors de la réduction di-électronique du dioxygène selon l'équation suivante :



Afin de comprendre dans quelles conditions il est possible de former les différents intermédiaires du cycle catalytique de l'enzyme et de reproduire son activité catalytique, la

conception de modèles de cytochrome *c* oxydase construits à partir de porphyrines de fer équipées d'un site de coordination du cuivre a émergé. Avant même la publication des premières structures cristallographiques de cytochrome *c* oxydase, de premiers modèles du site actif à l'état de repos **O** ont fait leur apparition. A cette époque, l'absence de signal RPE dans le site hème a_3/Cu_B oxydé suggérait un couplage antiferromagnétique entre le site ferrique Fe^{III} et le site cuivrique Cu^{II} avec possiblement la présence d'un ligand pontant entre les deux métaux. Dans le but d'identifier la nature de ce ligand, des chimistes se sont focalisés sur la construction de modèles pontés par des ligands oxo, halogénure, cyanure ou encore sulfure.²²

III.2.1. Complexes fer/cuivre auto-assemblés comme modèles structuraux du site actif de l'enzyme

Le groupe de Karlin a développé des modèles auto-assemblés par des ponts μ -oxo et μ -hydroxo. Dans ces édifices, une porphyrine de fer **Fe-7** est associée à un complexe de cuivre tripicolylamide **Cu-8** par l'intermédiaire du pont μ -oxo (**Figure 1.13**).³⁸ Son analogue à pont μ -hydroxo est formé par protonation du pont oxo à l'aide d'un acide fort. Le grand degré de liberté intrinsèque à ces systèmes permet d'étudier la géométrie préférentielle des complexes μ -oxo et μ -hydroxo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O(H)-Cu}^{\text{II}}$.

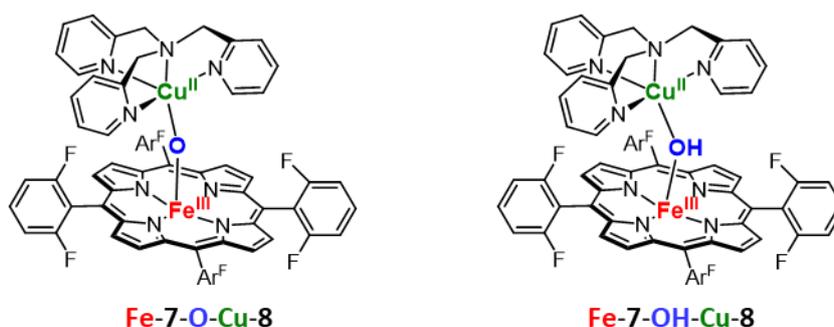


Figure 1.13. Structures moléculaires d'auto-assemblages fer/cuivre à pont μ -oxo **Fe-7-O-Cu-8** et à pont μ -hydroxo **Fe-7-OH-Cu-8**.

La structure radiocristallographique du modèle bimétallique à pont μ -oxo a mis en évidence une liaison $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Cu}^{\text{II}}$ quasi linéaire avec une distance fer-cuivre voisine de 3,6 Å.³⁹ Pour le complexe à pont μ -hydroxo, une liaison $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH-Cu}^{\text{II}}$ coudée avec une distance fer-cuivre de 3,7 Å a été déduite d'expériences d'absorption élargie des rayons X.⁴⁰ Bien que les propriétés magnétiques de ces modèles soient en accord avec celles du site actif de l'enzyme,

après la publication de la structure radiocristallographique du site actif de l'enzyme oxydée,²³ Karlin conclut qu'il n'est pas possible que les deux métaux du site actif soient pontés par un ligand oxo ou hydroxo. En effet, les distances fer-cuivre mesurées dans ses modèles auto-assemblés (3,6-3,7 Å) sont trop petites par rapport à celles relevées du site actif de l'enzyme (4,4-4,9 Å).²²

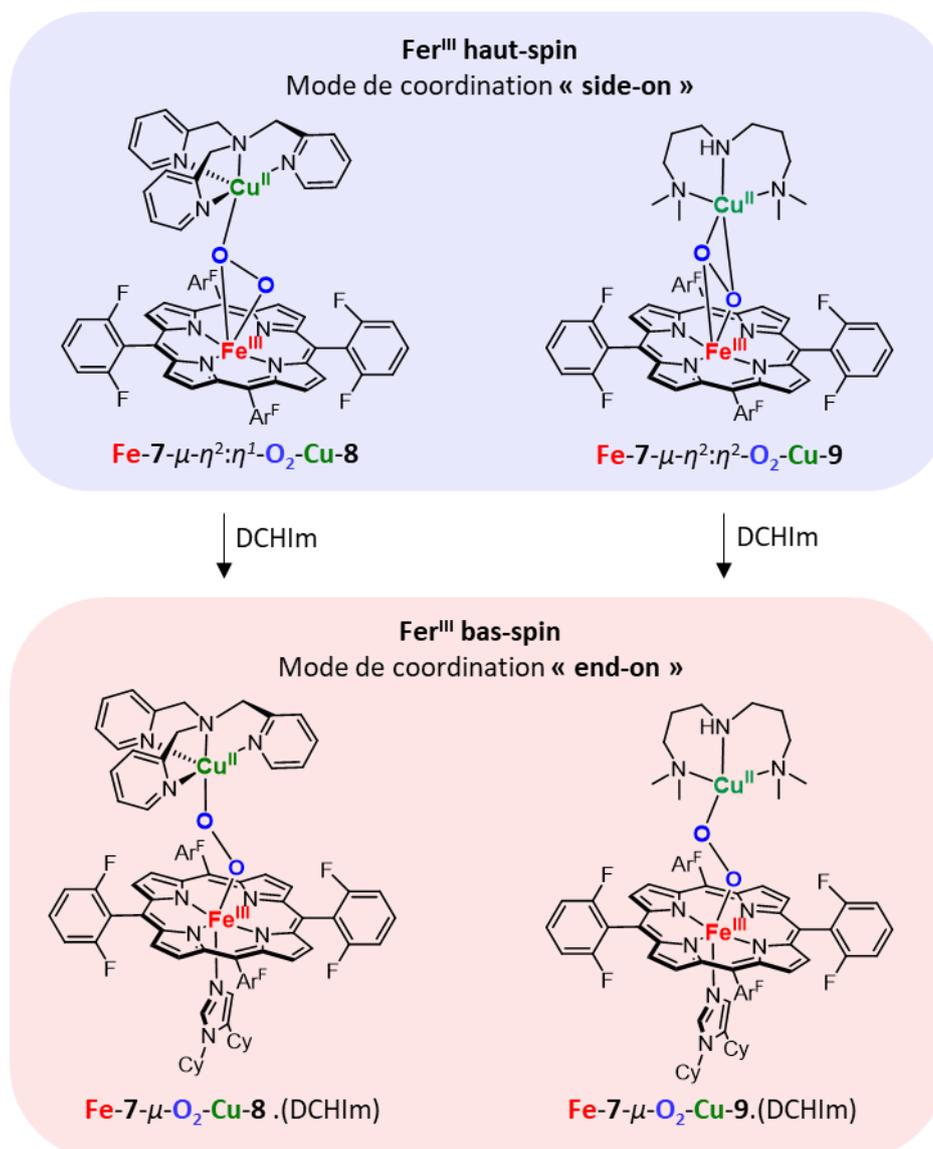


Figure 1.14. Structures moléculaires d'auto-assemblages fer/cuivre à pont peroxy **Fe-7-O₂-Cu-8** et **Fe-7-O₂-Cu-9** avec et sans base axiale 1,5-dicyclohexylimidazole (DCHIm).

Par la suite, ses travaux se sont orientés sur l'étude structurale de modèles fer/cuivre à pont peroxy.⁴¹ Des variations de l'environnement du cuivre, coordonné soit au ligand tétradente **8** ou soit au ligand tridente **9**, ont permis d'obtenir deux types de complexes oxygénés. Dans le premier complexe **Fe-7-O₂-Cu-8**, le mode de coordination du dioxygène est

de type $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1\text{-peroxo}$ « side-on », alors que dans le second **Fe-7-O₂-Cu-9**, son mode de coordination est $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo}$ « side-on » (encadré bleu, **Figure 1.14**). Par ailleurs, l'ajout d'une base axiale externe, entraînant la convention des deux sites ferriques initialement pentacoordinés haut spin en sites hexacoordinés bas spin, permet de générer deux nouveaux complexes à pont $\mu\text{-peroxo}$ « end-on » (encadré rouge, **Figure 1.14**). Ces derniers adduits oxygénés pourraient correspondre à un état métastable du site actif de l'enzyme, formé lors du clivage de la liaison **O-O** dans la transition **A** \rightarrow **P** du cycle catalytique. Ces études révèlent l'impact que peuvent avoir les sphères de coordination du fer et du cuivre sur le mode de coordination du dioxygène.

III.2.2. Les porphyrines superstructurées fer/cuivre comme modèles fonctionnels de l'enzyme

Les premiers modèles fonctionnels **Fe/Cu** de cytochrome *c* oxydase étudiés en électrocatalyse ont été publiés par le groupe de Collman en 1998.⁴² Ces modèles sont construits à partir de porphyrine à chapeau azoté, responsable de la coordination du cuivre, et d'une base axiale imidazole liée à l'anneau porphyrinique par l'intermédiaire d'un bras, responsable de la coordination proximale du fer (**Figure 1.15**).

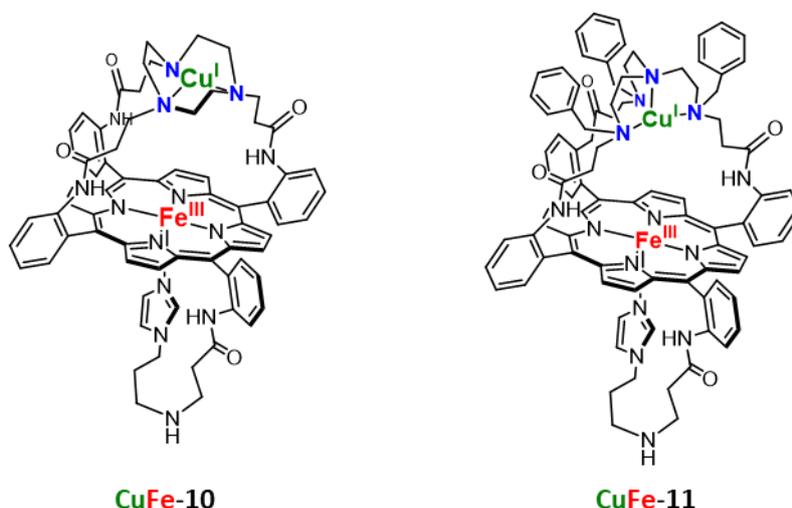


Figure 1.15. Structures moléculaires des porphyrines fer/cuivre à chapeau TACN **CuFe-10** et TBTren **CuFe-11**.

La seule différence entre ces deux modèles est leur chapeau respectif. Le premier modèle **CuFe-10** porte un chapeau TACN, tandis que le second **CuFe-11** a un chapeau tribenzyltris(aminoéthyl)amine (TBTren). Malgré leurs similitudes structurelles, ces deux

imidazoles, l'un d'entre eux est coordonné au fer en position proximale, les trois restants sont coordonnés au cuivre en position distale. Les espaceurs acétamides des piquets impliqués dans la coordination du cuivre permettent de maintenir une distance fer-cuivre similaire à celle retrouvée dans le site actif de l'enzyme (4,5 - 5,5 Å vs. 4,4 - 5,3 Å dans l'enzyme). Les études d'oxygénation du complexe **CuFe-12** complètement réduit ont révélé la formation du premier complexe superoxyde ferrique $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^{\bullet-}$ stable à température ambiante en présence d'un site cuivreux Cu^{I} .⁴⁵ Cet adduit oxygéné peut être considéré comme un analogue de l'intermédiaire **A** du cycle catalytique de l'enzyme. Ce modèle a, par la suite, été étudié en électrocatalyse et comparé à son analogue sans cuivre.⁴⁶ Durant le processus électrocatalytique, le complexe **CuFe-12** réduit quasi exclusivement le dioxygène en eau, tandis que son analogue sans cuivre **Fe-12** produit de petites quantités de peroxyde d'hydrogène. Dans cet exemple, le cuivre semble donc limiter la production d'espèces partiellement réduites.

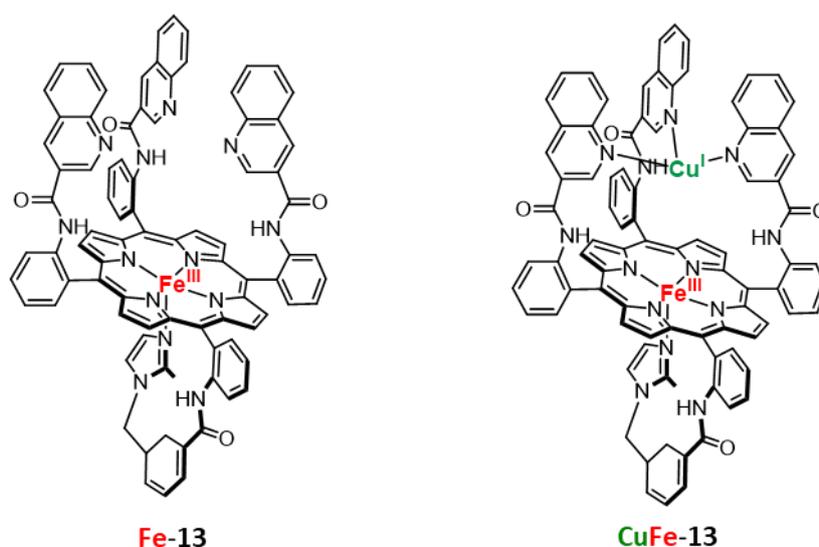


Figure 1.17. Structures moléculaires des porphyrines de fer **Fe-13** et fer/cuivre **CuFe-13** à piquets quinoléines.

Néanmoins, des études effectuées par le groupe de Boitrel ont mis en évidence que la présence d'un atome de cuivre n'est pas un prérequis à la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau.⁴⁷ La porphyrine de fer **Fe-13**, possédant trois piquets quinoléines se coordonnant au cuivre et un piquet imidazole assurant la coordination proximale du fer, a montré une activité électrocatalytique plus efficace que le complexe **CuFe-13** (**Figure 1.17**). Cette étude montre l'une des limitations de l'électrocatalyse, où les électrons sont délivrés bien plus rapidement que dans l'enzyme, et peuvent donc réduire assez rapidement le dioxygène en eau, sans assistance du cuivre. À l'inverse, en milieu enzymatique où le flux

d'électrons, beaucoup plus lent, est contrôlé par le cytochrome *c*, le cuivre peut jouer son rôle de réservoir d'électrons. Ainsi, dans un régime où les électrons sont délivrés plus rapidement, le cuivre perd sa fonction de médiateur électronique, et n'est donc plus essentiel à la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau.

Les équipes de Dey⁴⁸, ou encore de Mayer⁴⁹ ont par ailleurs développé des porphyrines de fer catalysant la réduction tétra-électronique du dioxygène avec de bonnes performances. Ces catalyseurs n'étant pas des complexes fer/cuivre, ils ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

Le rôle de la tyrosine a aussi été étudié par Collman et ses collaborateurs, dans le modèle **CuFe-14** (Schéma 1.1).⁵⁰ Ce modèle est construit à partir d'une porphyrine à piquets imidazoles avec un phénol lié de manière covalente à un des imidazoles distaux, comme mime du résidu peptidique. Comme pour son analogue **CuFe-12**, sans mime de tyrosine, les études d'oxygénation du complexe **CuFe-14** complètement réduit ont permis de former un intermédiaire superoxyde ferrique $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^{\bullet-}$ à $-60\text{ }^\circ\text{C}$. Par la suite, le clivage de la liaison **O-O** a été observé à partir de $-40\text{ }^\circ\text{C}$, entraînant la formation d'un composé ferryl-oxo et d'un radical phénoxy.⁵¹ Les auteurs ont ainsi démontré que le groupement phénolique se comportait comme donneur de proton et d'électron permettant la formation de l'ion hydroxyde coordonné au cuivre. Ce composé est un analogue à l'intermédiaire P_M du cycle catalytique de l'enzyme.

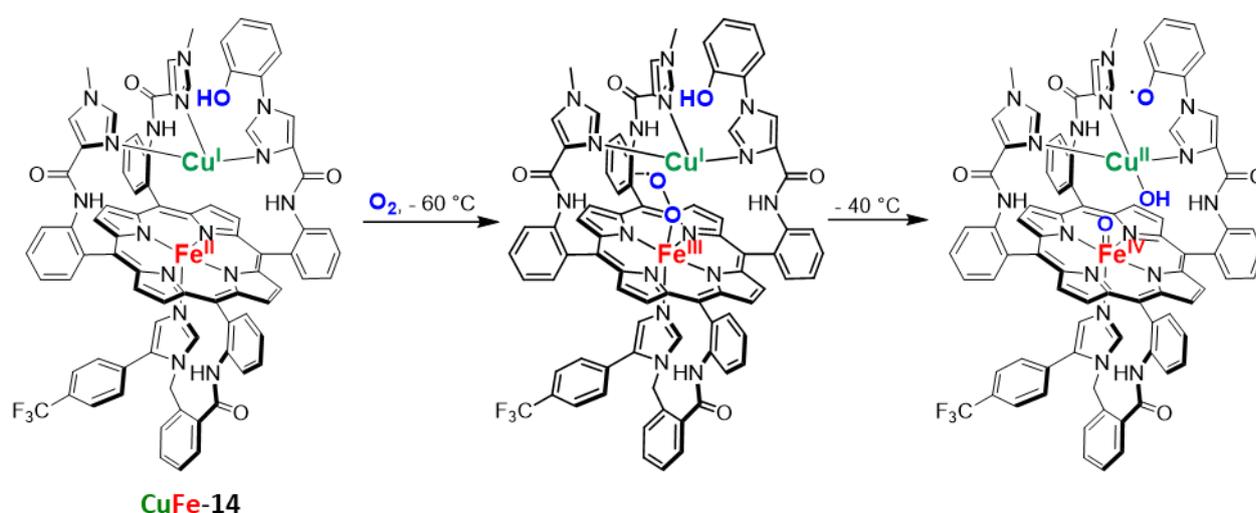


Schéma 1.1. Réaction entre le dioxygène et la porphyrine fer/cuivre à piquets imidazoles incorporant un mime de tyrosine **CuFe-14**.

La réactivité du complexe **CuFe-14** vis-à-vis du dioxygène a par la suite été étudiée en électrocatalyse. Il a été vu précédemment que, comparé au cytochrome *c* oxydase, une électrode génère un flux d'électrons bien plus rapide que dans le système naturel, ne permettant pas aux sites stockant des électrons de jouer leur rôle de médiateurs électroniques. Pour mettre en lumière le rôle de médiateur de la tyrosine, Collman et ses collaborateurs ont donc choisi d'incorporer leur catalyseur dans un film organique qui, une fois adsorbé à la surface d'une électrode, est capable de ralentir la diffusion des électrons.⁵² Pour ce faire, une électrode d'or a été modifiée par chimisorption de chaînes alkyl-thiols comportant une fonction azoture terminale. En parallèle, l'imidazole proximal du modèle **CuFe-15** a été fonctionnalisé avec un alcyne terminal. Par la suite, en effectuant une réaction de cycloaddition entre cet alcyne et les azotures terminaux de la monocouche auto-assemblée sur l'électrode, les auteurs ont obtenu une électrode modifiée avec le catalyseur **CuFe-15** fixé de manière covalente (**Schéma 1.2**). De la même manière, des électrodes modifiées comprenant, des porphyrines à piquets sans phénol ou des porphyrines à piquets sans phénol et sans cuivre, ont été préparées. Les efficacités de ces trois électrodes en électrocatalyse ont ainsi pu être comparées.

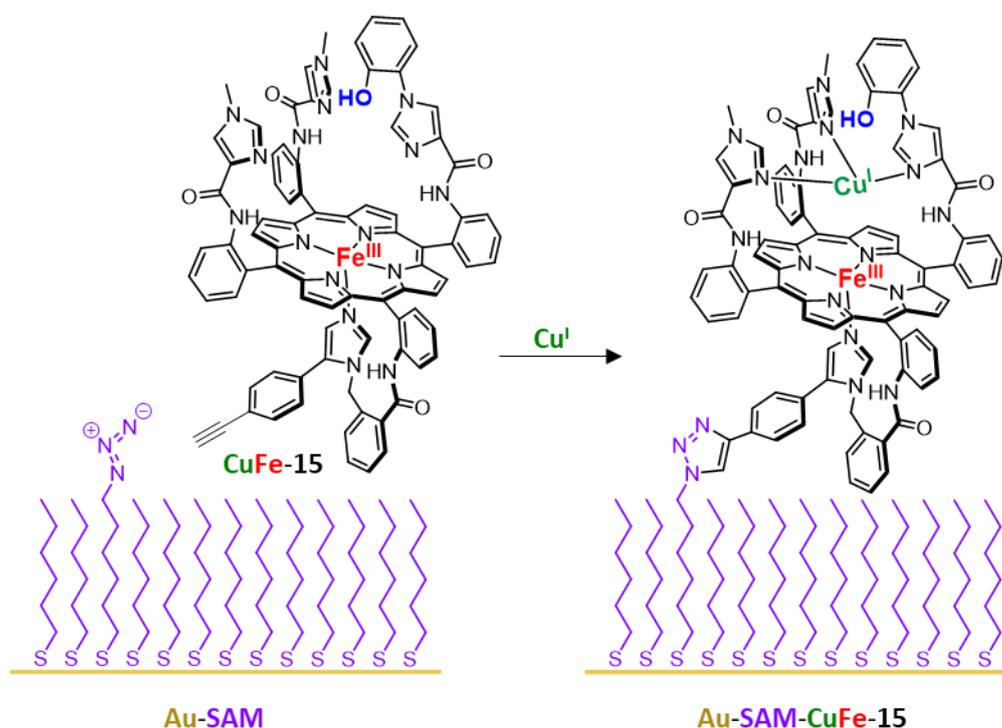


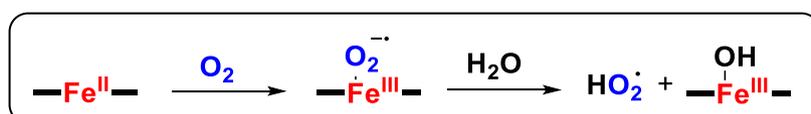
Schéma 1.2. Fixation du modèle **CuFe-15** sur une électrode modifiée avec une mono couche auto-assemblée **Au-SAM**.

L'électrode modifiée avec le catalyseur **CuFe-15** a réduit le dioxygène en eau à hauteur de 96 %. La sélectivité de l'électrode comprenant le catalyseur sans mème de tyrosine est ensuite tombée à 87 %, tandis que le catalyseur sans mème de tyrosine et sans cuivre de la dernière électrode s'est rapidement dégradé, probablement en raison d'une trop forte production d'espèces oxygénées partiellement réduites. Ces résultats confirment que dans un régime électronique lent, le cuivre et le résidu de tyrosine jouent effectivement un rôle de médiateur électronique afin de limiter la production d'espèce partiellement réduite toxique pour les organismes.

Les modifications de l'environnement proximal et distal de la porphyrine modulent clairement les propriétés de coordination du dioxygène sur le site hémique, ainsi que sa réactivité. Au-delà de reproduire la fonctionnalité des systèmes naturels, le greffage d'une base axiale, l'encombrement de la face distale, l'introduction d'un atome de cuivre ou d'un mème de tyrosine ont permis de mieux comprendre les relations structure-propriétés existant au sein des différentes hémoprotéines présentées. Cependant, contrairement aux systèmes naturels, tous les modèles d'hémoprotéines décrits précédemment sont solubles uniquement en milieu organique. Pour espérer rendre ces composés biocompatibles, il est nécessaire qu'ils soient solubles dans l'eau.

IV. Modèles d'hémoprotéines solubles en milieu aqueux

Comme vu précédemment, en milieu organique, sans encombrement stérique, les adduits oxygénés hème superoxo se décomposent en dimères μ -peroxo puis μ -oxo. En milieu protique aqueux, c'est la protonation de l'ion superoxyde qui entraîne la décomposition du complexe hème superoxo selon le mécanisme suivant :¹³



La conception de modèles de myoglobine et de cytochrome *c* oxydase fonctionnels en milieu aqueux nécessite donc de surpasser ce problème de décomposition.

Dans ce cadre, le groupe de Boitrel s'est intéressé à la fixation du dioxygène sur des porphyrines encombrées en milieu aqueux. A partir d'une porphyrine à chapeau

tris(aminoéthyl)amine (Tren) **Fe-16**,⁵³ ayant déjà montrée une bonne affinité pour le dioxygène en milieu organique, ils ont développé la nouvelle porphyrine **Fe-17**, avec des groupements pyridiniums, soluble en milieu aqueux (**Figure 1.18**).⁵⁴ Contrairement à son analogue **Fe-16**, la porphyrine **Fe-17** n'a pas pu fixer réversiblement le dioxygène. Les études de stabilité du complexe **Fe-17** oxygéné en présence d'un excès de base axiale ont révélé un temps de demi-vie de 7 min dans l'eau tamponnée à pH 7,4. La protonation rapide de l'ion superoxyde ne permet pas une fixation réversible du dioxygène.

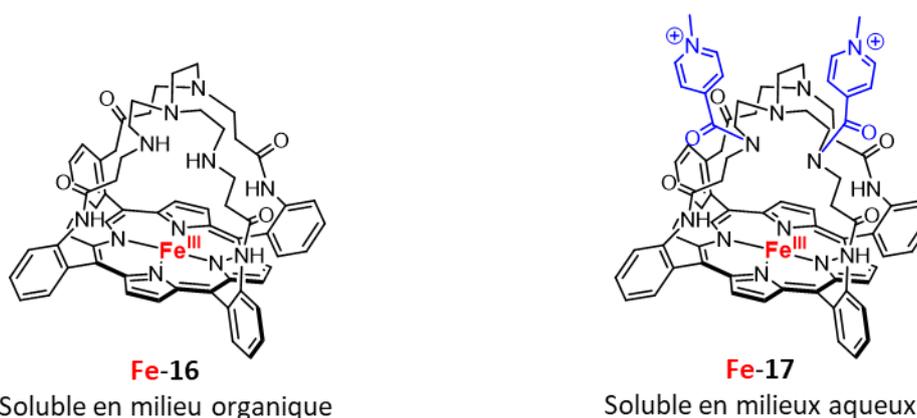


Figure 1.18. Structures moléculaires des porphyrines à chapeau Tren **Fe-16** et **Fe-17**.

Cet exemple montre donc que l'encombrement du site distal de la porphyrine n'est pas suffisant pour limiter les réactions d'auto-oxydation intrinsèque aux porphyrines de fer oxygénées en milieu aqueux. Pour limiter les phénomènes d'auto-oxydation, il semble donc essentiel de créer un environnement hydrophobe autour de la porphyrine, où les molécules d'eau sont strictement exclues.

IV.1. La création d'un environnement hydrophobe pour des transporteurs de dioxygène artificiels

Pour créer un environnement hydrophobe, l'équipe de Tsuchida a développé des vésicules à bicouche phospholipidique hydrophobe dans lesquelles le site d'oxygénation de la porphyrine est protégé (**Figure 1.19**).⁵⁵ Ces vésicules à bicouches phospholipidiques ont été formées à partir de la porphyrine de fer à piquets **Fe-18** fonctionnalisée par des groupements phospholipidiques zwitterioniques. En milieu aqueux, ces "lipido-porphyrines" **Fe-18** s'auto-assemblent *via* des interactions hydrophobes en vésicules d'environ 100 nm de diamètre. Dans ces vésicules, en présence d'un excès de base axiale, la formation réversible d'un complexe oxygéné a pu être observée. Le temps de demi-vie de l'adduit oxygéné a été estimé

à 50 h dans des conditions physiologiques (pH = 7,4 ; T = 37 °C). L'environnement lipidique hydrophobe permet donc bien de retarder la décomposition du complexe oxygéné.

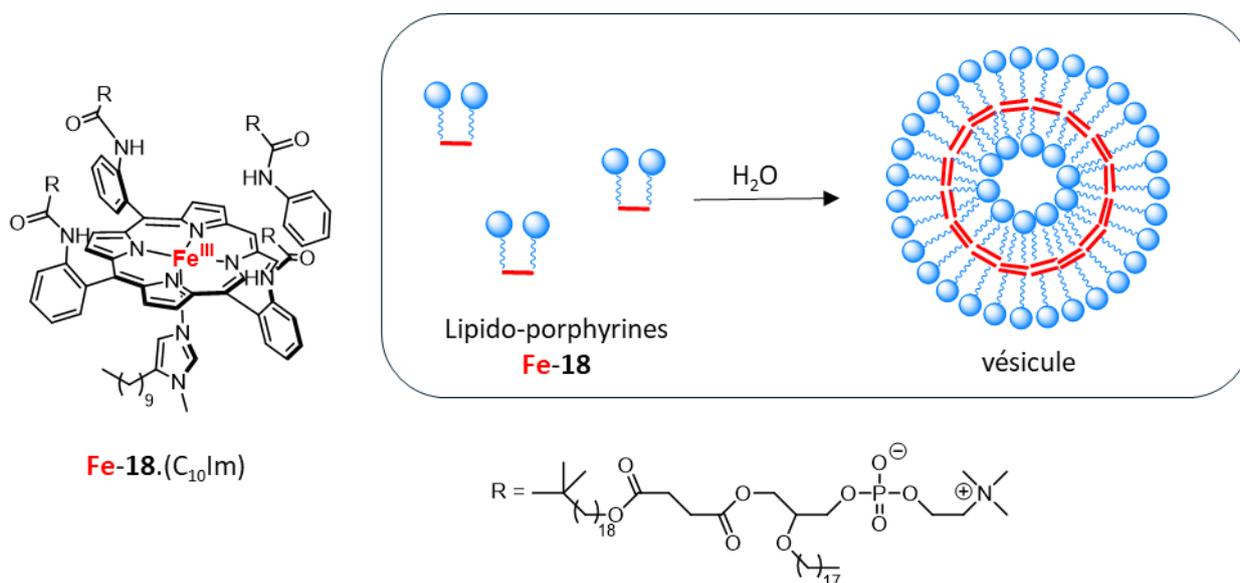


Figure 1.19. Structure moléculaire de la lipido-porphyrine de fer à piquets **Fe-18** et formation d'auto-assemblage en milieu aqueux.

En parallèle, le même groupe de recherche a incorporé les porphyrines de fer à piquets **Fe-19** dans une protéine de transport sanguine, l'albumine sérique humaine (**Figure 1.20**).⁵⁶ La sérum-albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin humain (35-50 g.L⁻¹ de sang) et elle circule dans le sang pendant plusieurs jours. Jusqu'à huit porphyrines peuvent se fixer à la protéine par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. L'environnement protéique de l'albumine fournit, de manière analogue à la bicouche lipidique, un environnement hydrophobe à la porphyrine de fer lui permettant de fixer le dioxygène réversiblement. La forme oxygénée d'un de ces systèmes a même un temps de demi-vie de 25 h dans des conditions physiologiques (pH = 7,3 ; T = 37 °C).

Suite à ces travaux, l'albumine sérique incorporant un cofacteur porphyrinique (protohème IX) a même été approuvée en 2008 pour des essais cliniques au Japon comme transporteur de dioxygène artificiel.⁵⁷ Plus récemment, l'équipe de Komatsu a développé des clusters albumine-hémoglobine comme transporteur de dioxygène artificiel,⁵⁸ mais cette approche étant très éloignée de celle du laboratoire, elle ne sera pas plus développée dans ce manuscrit.

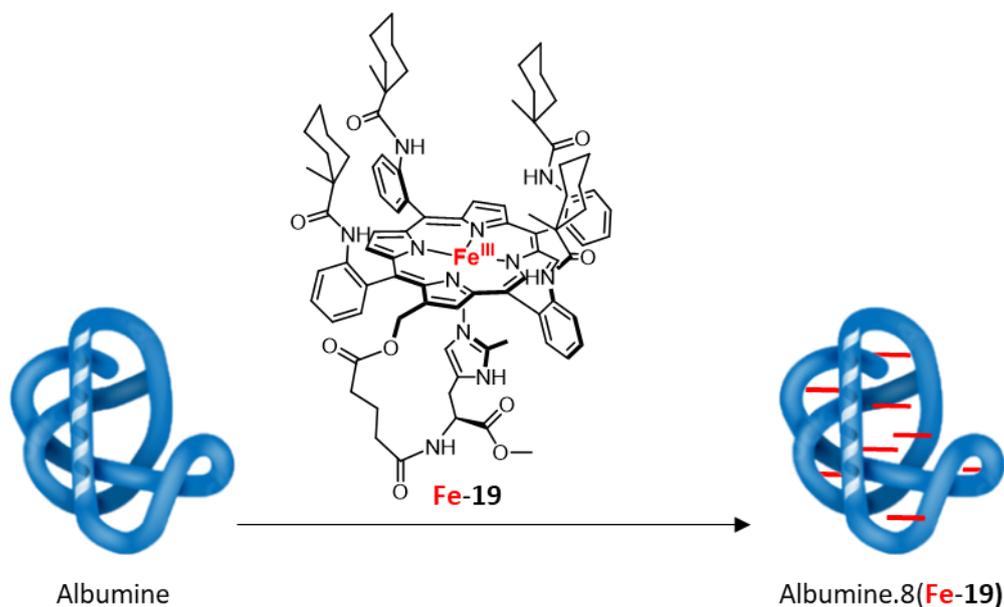


Figure 1.20. Structure moléculaire de la porphyrine de fer à piquets **Fe-19** et son absorption dans l'albumine humaine.

Une autre approche, permettant d'obtenir des complexes oxygénés relativement stables en solution aqueuse, se base sur la chimie hôte-invité. L'équipe de Tsuchida a ainsi développé des modèles d'hémoprotéines supramoléculaires associant une porphyrine de fer coordonnée à une base proximale à une cyclodextrine en milieu aqueux.⁵⁹

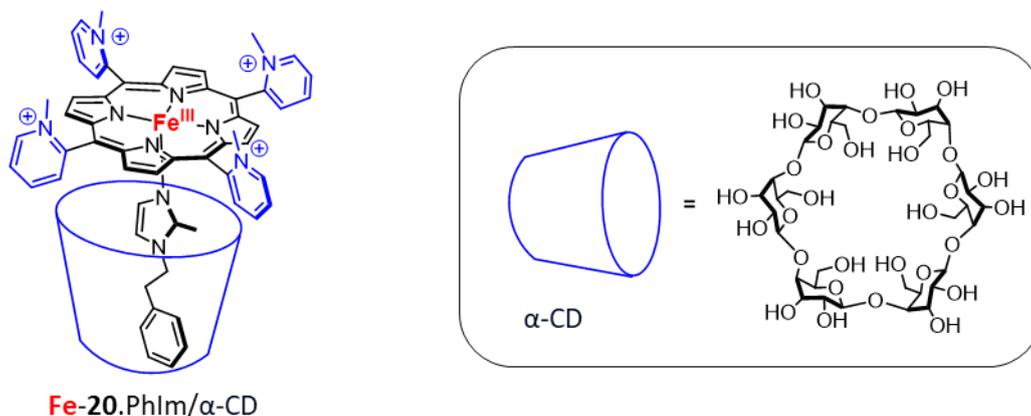


Figure 1.21. Structure moléculaire de la porphyrine de fer **Fe-20** coordonnée au 1-phényléthyl-2-méthylimidazole (PhIm) encapsulé par une α -cyclodextrrine native (α -CD).

Dans l'un de ces modèles, la porphyrine de fer **Fe-20**, portant des groupements pyridiniums hydrosolubles, est coordonnée à une molécule de 1-phényléthyl-2-méthylimidazole encapsulée par une α -cyclodextrrine dans un mélange DMF/H₂O (**Figure 1.21**).^{59b} Les cyclodextrrines étant des cavitands avec une face extérieure hydrophile et une cavité hydrophobe, elles forment des complexes d'inclusion avec les imidazoles présents en solution,

par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. La taille de la cavité de l' α -cyclodextrine, oligosaccharide cyclique composé de six unités de glucose, est adaptée à de petits invités tels que le 1-phényléthyl-2-méthylimidazole. Lors des études de stabilité du complexe oxygéné en milieu aqueux, les auteurs ont montré que ce modèle est capable de se coordonner réversiblement au dioxygène. La répulsion électronique entre les groupements pyridinium de deux unités porphyriniques empêche la formation de dimères μ -oxo et μ -peroxo. Cependant, sans environnement hydrophobe à proximité du site oxygéné, le complexe a un temps de demi-vie de seulement 40 min dans un mélange DMF/eau à 5 °C.

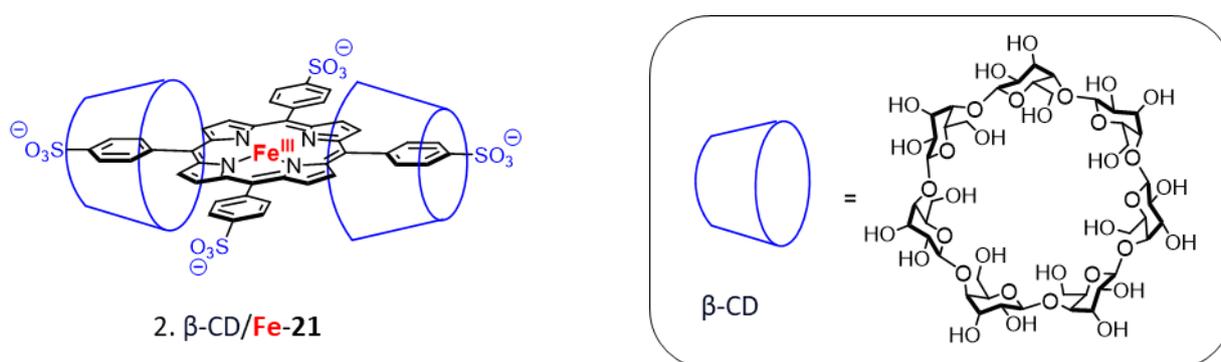


Figure 1.22. Structure moléculaire du complexe d'inclusion hôtes/invité entre deux β -cyclodextrines natives et une porphyrine tétraphénylsulfonate de fer 2(β -CD)/Fe-21.

Des complexes d'inclusions associant directement diverses porphyrines à des cyclodextrines ont ensuite été développés par différents groupes.⁶⁰ Le groupe de Mosseri a notamment décrit la formation d'un complexe d'inclusion soluble dans l'eau pure.^{60a} Ce complexe est constitué de la porphyrine tétraphénylsulfonate de fer Fe-21, déjà soluble dans l'eau, et de β -cyclodextrines natives (β -CD) (Figure 1.22). Les β -CD, oligosaccharides cycliques composés, cette fois-ci, de sept unités de glucose, ont été choisis pour encapsuler les groupements phénylsulfonate de la porphyrine. Bien que les auteurs aient décrit la formation d'un complexe d'inclusion β -CD/porphyrine 4:1, sa stœchiométrie a finalement été réexaminée comme étant de type trans 2:1 β -CD/porphyrine par le groupe de Ribo (Figure 1.22).⁶¹ Le groupe de Mosseri a néanmoins démontré que les β -CD empêchaient la formation d'agrégats porphyriniques μ -oxo, habituellement observés avec la porphyrine Fe-21 en solution aqueuse.

Par la suite, les groupes de Fornasier et Kano ont montré que l'utilisation de β -cyclodextrines per-*O*-méthylées (Me- β -CD), plutôt que les β -CD précédemment utilisées, permettait d'obtenir des complexes d'inclusion extrêmement stables en milieu aqueux.⁶² Par

exemple, le complexe étudié par l'équipe de Kano, associant une porphyrine tétraphénylsulfonate base libre **21** à deux Me-O- β -CD, a montré une constante trop grande pour être mesurée dans l'eau pure. L'utilisation d'un mélange 3:1 éthylène glycol/eau, diminuant la force des interactions hydrophobes mises en jeu lors de la formation de l'édifice, a permis d'estimer une constante d'association de $5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.^{62b} En comparaison, la constante d'association pour l'équilibre 2:1 du complexe d'inclusion formé entre la même porphyrine et des β -CD a été estimée à $2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ dans l'eau pure. Même après l'ajout d'un co-solvant qui déstabilise la formation de l'assemblage, la constante d'association du complexe formé avec les Me-O- β -CD reste plus élevée que celle de l'assemblage formé à partir de β -CD.

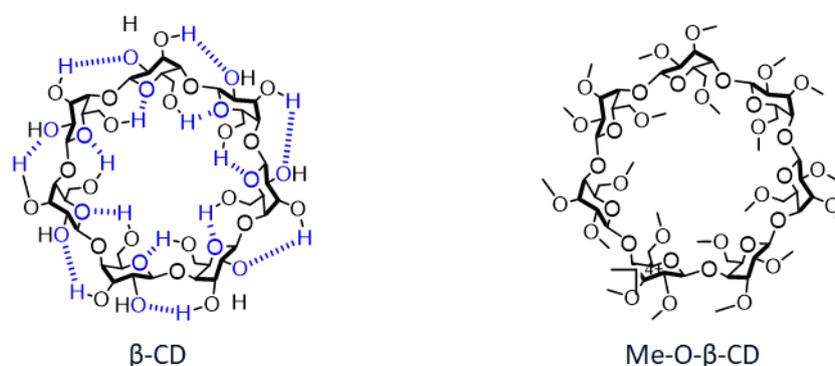


Figure 1.23. Structures moléculaires de la β -CD avec son réseau de liaisons hydrogène intramoléculaire et de la Me-O- β -CD.

Cette différence peut s'expliquer par l'existence d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires formé entre les groupements hydroxyles du col des β -CD, rigidifiant leur structure (**Figure 1.23**).⁶³ Au contraire, en l'absence de ce réseau de liaisons hydrogène, les Me-O- β -CD sont plus flexibles et sont ainsi capables d'adapter leurs conformations lors de l'inclusion d'invités.⁶⁴ La découverte de cet effet, permettant d'obtenir des assemblages Me-O- β -CD/porphyrine stables, s'est révélée cruciale pour la construction de modèles d'hémoprotéines fonctionnels en solution aqueuse. En plus de former des assemblages très stables en solutions aqueuses avec la porphyrine de fer **Fe-21**, les Me-O- β -CD, en créant un environnement hydrophobe autour de la porphyrine et de son site actif, miment la matrice protéique. L'étape suivante dans la conception de modèles d'hémoprotéines a été d'incorporer une base axiale pour le fer dans ces édifices, permettant, comme dans les systèmes naturels, de différencier les deux faces de la porphyrine.

Dans cette optique, le groupe de Kano, en reprenant les travaux préliminaires de Lawrence et ses collaborateurs,⁶⁵ a développé une série de dimères de Me-O- β -CD pontés par une base azotée **22-24**.⁶⁶ Ces dimères forment des complexes d'inclusion 1:1 très stables avec la porphyrine de fer **Fe-21**, où, en plus des interactions hydrophobes, une liaison de coordination fer-base azotée s'établit (**Figure 1.24**).

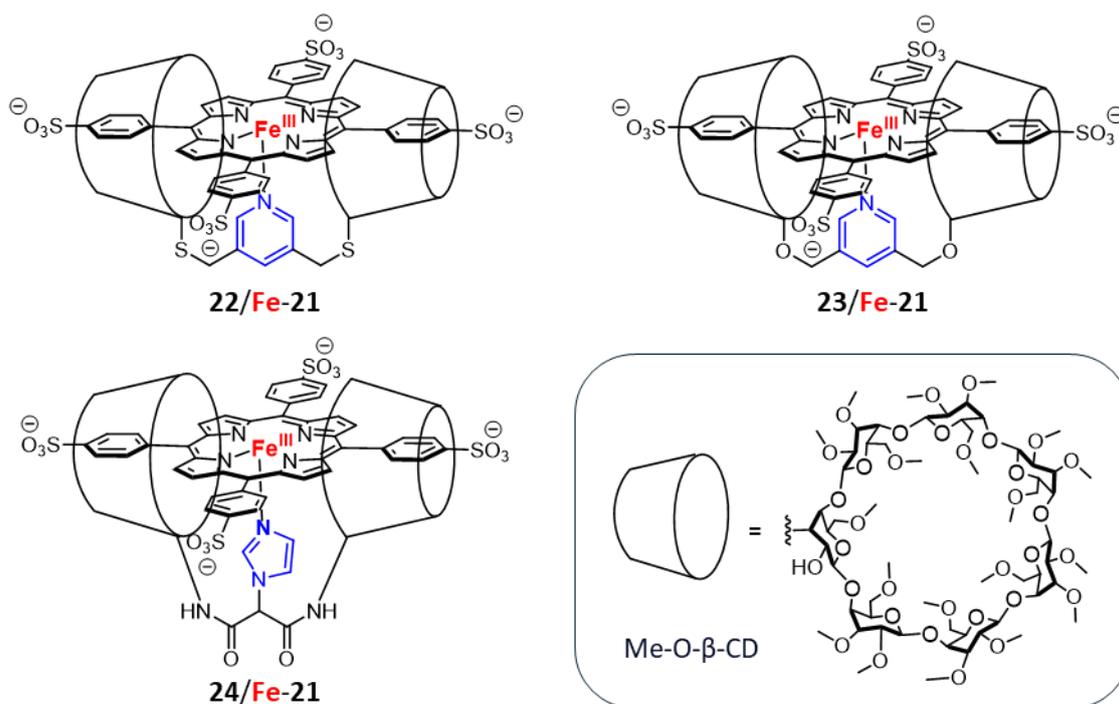


Figure 1.24. Structures moléculaires d'assemblages supramoléculaires entre la porphyrine de fer **Fe-21** et les dimères de Me-O- β -CD **22**, **23** et **24**.

Les études d'oxygénation du complexe **22/Fe-21** réduit ont révélé un temps de demi-vie de l'espèce oxygénée de 30 h dans l'eau tamponnée à pH 7, alors que sans le dimère de Me-O- β -CD à espaceur pyridine **22**, la porphyrine **Fe-21** s'auto-oxyde instantanément dans les mêmes conditions.^{66a} La cavité hydrophobe des Me-O- β -CD protège donc bien le site actif de ce modèle de myoglobine. Par ailleurs, la pression de demi-saturation en dioxygène du complexe **22/Fe-21** ($P_{1/2}(\text{O}_2) = 10$ Torr dans l'eau tamponnée à pH 7)⁶⁷ s'est révélée suffisante pour étudier son potentiel en tant que transporteur artificiel de dioxygène, en le couplant par exemple à l'albumine sérique.⁶⁸ Cependant, le complexe réduit **22/Fe-21** a une affinité bien plus élevée pour le monoxyde que pour le dioxygène ($P_{1/2}(\text{O}_2) = 10$ Torr vs. $P_{1/2}(\text{CO}) = 1,5 \times 10^5$ dans l'eau tamponnée à pH 7), impliquant une très grande valeur de M de $6,7 \times 10^5$.⁶⁷ Une affinité similaire a été mesurée pour l'assemblage **23/Fe-21** ($M = 3,2 \times 10^5$), mais l'utilisation

du dimère de Me-O- β -CD **24** avec un imidazole, plus basique, permet de faire diminuer cette valeur d'un facteur 2 ($M = 1 \times 10^3$).^{66b-c}

Afin d'améliorer l'affinité de ces assemblages pour le dioxygène par rapport à celle pour le monoxyde de carbone, en collaboration avec l'équipe de Boitrel, un modèle associant une porphyrine à anse et le dimère de Me-O- β -CD **23** a récemment été développé (**Figure 1.25**).⁶⁹ La porphyrine à anse **Fe-25** a été fonctionnalisée avec deux groupements phénoxypropyle pyridiniums servant de plateformes au dimère de Me-O- β -CD. De plus, dans l'optique de stabiliser l'adduit oxygéné, le groupement acide carboxylique de l'anse, à proximité du site distal, pourrait jouer le rôle de donneur de liaison hydrogène.

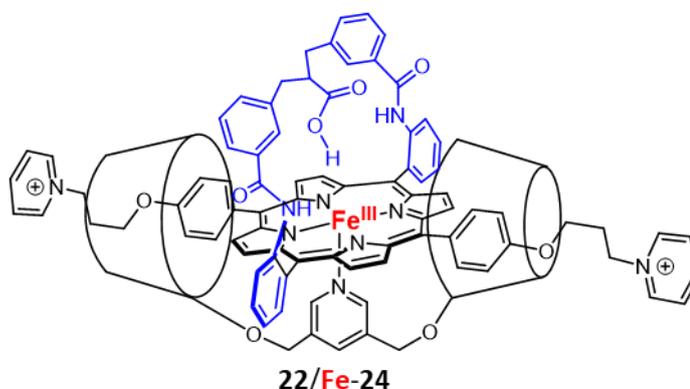


Figure 1.25. Structure moléculaire du complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD/porphyrine de fer **23/Fe-25**.

Pour étudier l'impact réel que l'anse pourrait avoir sur la coordination de ligands exogènes, la porphyrine de fer **Fe-26** sans anse avec les mêmes groupements phénoxypropyle pyridiniums a été préparée. En comparant les affinités des complexes d'inclusion **23/Fe-25** et **23/Fe-26** vis-à-vis du dioxygène, on observe une très faible différence ($P_{1/2}(O_2) = 6,3$ Torr pour **23/Fe-25** vs. $P_{1/2}(O_2) = 8$ Torr pour **23/Fe-26** dans l'eau tamponnée à pH 7). En revanche, la différence d'affinité est bien plus grande avec le monoxyde de carbone ($P_{1/2}(CO) = 2,1 \times 10^{-2}$ Torr pour **23/Fe-25** vs. $P_{1/2}(CO) = 3,8 \times 10^{-4}$ Torr **23/Fe-26** dans l'eau tamponnée à pH 7). L'encombrement stérique généré par l'anse du modèle **23/Fe-25** semble donc défavoriser la fixation du monoxyde de carbone. Cette faible affinité pour le monoxyde de carbone, permet au complexe d'inclusion **23/Fe-25** d'avoir une valeur de M du même ordre que celle de l'hémoglobine en conformation relâchée R ($M = 320$ pour **23/Fe-25** vs. $M = 150$ pour l'hémoglobine R).¹⁶ Cependant, le temps de demi de l'espèce oxygénée est bien plus faible, que celui de son analogue sans anse ($t_{1/2} = 7$ h **23/Fe-25** vs. $t_{1/2} = 30$ h **23/Fe-26**). Dans ce

système, l'encombrement stérique, généré par l'anse, semble agrandir l'espace entre les deux Me-O- β -CD, permettant aux molécules d'eau d'accéder plus facilement au site distal du complexe **23/Fe-25**.

IV.2. Assemblages cyclodextrines/porphyrine comme agent antipoison

Comme vu précédemment, le complexe **22/Fe-21** a une très grande affinité pour le monoxyde ($P_{1/2}(\text{CO}) = 1.5 \times 10^{-5}$ dans l'eau tamponnée à pH 7).⁶⁷ Cette affinité pour le monoxyde de carbone est environ 100 fois plus élevée que celle de l'hémoglobine relâchée R ($P_{1/2}(\text{CO}) = 1,4 \times 10^{-3}$).¹⁶ Cette différence d'affinité remarquable a conduit les auteurs à utiliser ce complexe comme antidote pour les intoxications au monoxyde de carbone. Dans des essais précliniques sur des souris intoxiquées au monoxyde de carbone, l'injection intraveineuse d'une solution aqueuse du complexe **22/Fe-21** réduit, a permis d'éviter la mort des souris intoxiquées.⁷⁰ En effet, une fois le complexe **22/Fe-21** injecté, le monoxyde de carbone, initialement fixé à l'hémoglobine, se coordine préférentiellement sur l'agent antipoison. Dès 30 minutes après l'injection, la forme carbonylée du complexe **22/Fe-21-CO** est éliminée par les urines.

De la même manière, le complexe **24/Fe-21** oxydé, ayant montré une affinité remarquable pour l'ion cyanure ($K(\text{CN}) = 2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$),⁷¹ il a aussi été utilisé lors d'essais précliniques comme agent antipoison contre le cyanure d'hydrogène,⁷² parfois généré lors d'incendies. Ces deux complexes peuvent être utilisés simultanément comme antidote à double cible pour éliminer en même temps le cyanure d'hydrogène et le monoxyde de carbone, qui sont tous deux les principaux gaz responsables de décès lors d'incendies domestiques.⁷³

IV.3. Assemblage cyclodextrines/porphyrine comme modèle de cytochrome c oxydase

En collaboration avec notre équipe, le groupe de Kano, aujourd'hui dirigé par le Pr. Kitagishi, a développé un complexe supramoléculaire soluble dans l'eau, modèle du site hétéro-binucléaire hème/cuivre du cytochrome c oxydase.⁷⁴ Ce complexe d'inclusion associe la porphyrine de fer **Fe-21** et le dimère de Me-O- β -CD **Cu-27** ponté par une terpyridine jouant le rôle de ligand pour le cuivre (**Figure 1.26**).

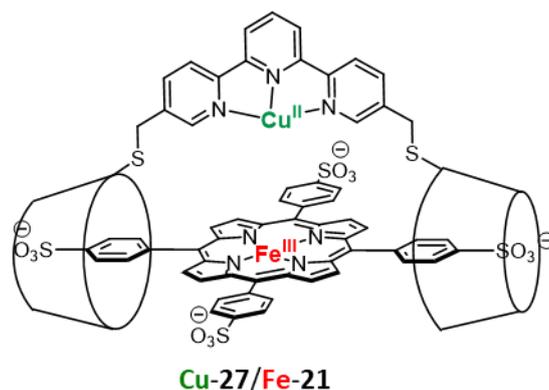


Figure 1.26. Structure moléculaire du complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD/porphyrine de fer **Cu-27/Fe-21**.

L'analyse de l'adduit oxygéné en spectroscopie Raman semble indiquer la formation d'un complexe ferrique superoxyde $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^{\bullet-}/\text{Cu}^{\text{I}}$ analogue de l'intermédiaire A du cycle catalytique de l'enzyme. Dans des études d'électroréduction du dioxygène, la sélectivité du catalyseur **Cu-27/Fe-21** pour la voie à quatre électrons s'est avérée n'être que de 50 %, avec les 50 % restants attribués à une réduction di-électronique. Bien que ce catalyseur ne soit pas sélectif pour la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau, il est, à notre connaissance, le premier et l'unique modèle fer/cuivre du site actif de l'enzyme soluble dans l'eau.

V. Conception du projet et objectifs

L'étude des modèles d'hémoprotéines a largement contribué à la compréhension de la relation structure-propriétés présente dans les systèmes naturels. Tous ces modèles sont construits à partir d'une porphyrine de fer superstructurée dont l'environnement proximal et distal est modulé en fonction de la réactivité souhaitée.

A cet égard, notre équipe de recherche a développé une porphyrine à anse phénanthroline **28** (**Figure 1.27**), avec deux sites de coordination distincts : le macrocycle porphyrinique pour le fer et la phénanthroline pour le cuivre.⁷⁵ Ainsi, la porphyrine de fer reproduit le centre hémique de l'enzyme, tandis que la coordination du cuivre à l'anse phénanthroline permet de mimer son l'environnement distal. Des travaux ultérieurs ont, par ailleurs, permis l'introduction d'une base axiale imidazole ou pyridine comme mime du site proximal de l'enzyme.⁷⁶ Certains de ces modèles se sont montrés particulièrement efficaces pour la réduction du dioxygène à quatre électrons en milieu aqueux. Cependant, ces modèles,

étant solubles uniquement en solvant organique, lors de ces études en milieu aqueux, ils ont dû être adsorbés sur une électrode.

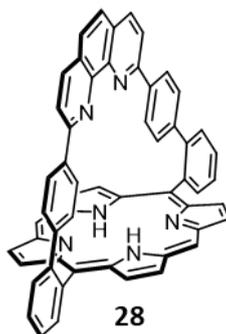


Figure 1.27. Structure moléculaire de la porphyrine à anse phénanthroline **28**.

Comme vu précédemment, de récents travaux issus de la collaboration de notre équipe avec celle du groupe du Pr. H. Kitagishi ont permis de construire à partir du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-27}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, un premier modèle de cytochrome *c* oxydase soluble en milieu aqueux.⁷⁴ Cependant, bien que ce modèle soit capable de réduire le dioxygène en solution aqueuse, il est loin d'être sélectif pour la voie à quatre électrons et produit une grande quantité d'espèces partiellement réduites. Ce manque de sélectivité a été attribué au ligand terpyridine qui, après électroréduction du site cuivrique Cu^{II} , est peu adapté à la géométrie de coordination du site cuivreux Cu^{I} qui préfère un environnement tétraédrique. Afin d'améliorer la sélectivité de ce premier modèle, ces deux équipes de recherche ont choisi de changer le site de coordination du cuivre.

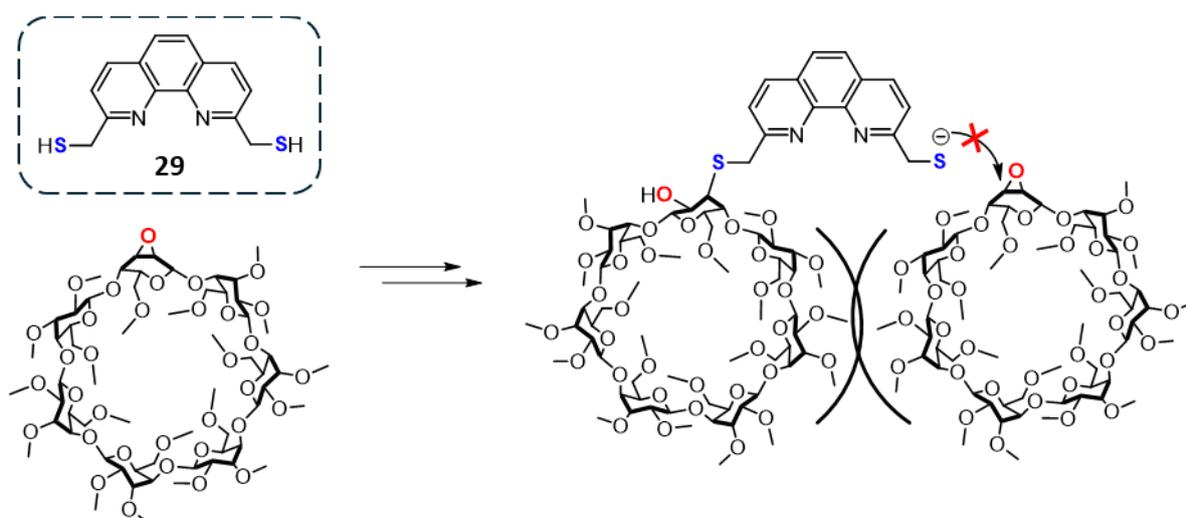


Schéma 1.3. Représentation schématique de la réaction d'ouverture d'époxyde avec la phénanthroline **29** comme nucléophile.

Dans des travaux non publiés, il a tout d'abord été envisagé de faire un nouveau dimère de Me-O- β -CD avec l'espaceur phénanthroline **29** comme site de coordination pour le cuivre, similaire à celui déjà utilisé par notre équipe dans le ligand **28** (encadré **Schéma 1.3**). Cependant, en raison de la rigidité de l'espaceur phénanthroline, il n'a pas été possible de synthétiser ce dimère. Bien que la formation d'un monomère Me-O- β -CD-phénanthroline ait été observée, aucune trace du dimère n'a été détectée. Il semblerait que, sans libre rotation de l'espaceur azoté, la deuxième Me-O- β -CD ne puisse pas approcher le monomère déjà formé, probablement pour des raisons stériques et/ou électroniques (**Schéma 1.3**).

C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse se sont en partie orientés vers la conception de complexes d'inclusions Me-O- β -CD/porphyrine comme modèle de cytochrome *c* oxydase soluble en milieu aqueux. Une partie de ces travaux s'est déroulée au Japon dans l'équipe du Pr. H. Kitagishi spécialisé dans la conception et l'étude de ces assemblages supramoléculaires.

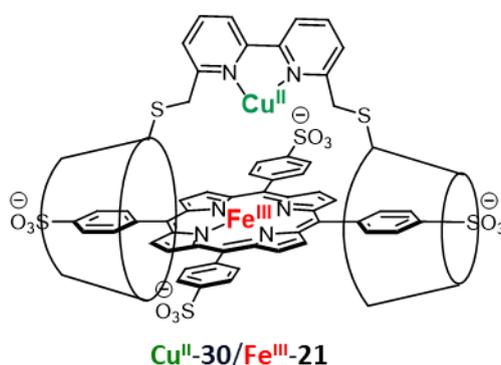


Figure 1.28. Structure moléculaire du complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD /porphyrine de fer **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**.

Le premier modèle **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** a été élaboré à partir du dimère de Me-O- β -CD **Cu^{II}-30** coordonné au cuivre et de la porphyrine tétraphénylsulfonate de fer **Fe-21**, déjà utilisée par l'équipe du Pr. H. Kitagishi pour former une grande variété de complexes d'inclusion (**Figure 1.28**). Dans ce nouveau modèle, la bipyridine, jouant à la fois le rôle d'espaceur entre les deux Me-O- β -CD et de ligand pour cuivre, a été choisie pour deux raisons. Tout d'abord, contrairement à la phénanthroline précédemment utilisée, cet espaceur, en autorisant la libre rotation du dimère en solution, permettrait de former la molécule **30** ciblée. De plus, en opposition à la terpyridine utilisée dans le modèle **Cu-27/Fe-21** précédemment, la bipyridine

s'adapte aussi bien au mode de coordination de l'ion cuivrique Cu^{II} et qu'au mode de l'ion cuivreux Cu^{I} .

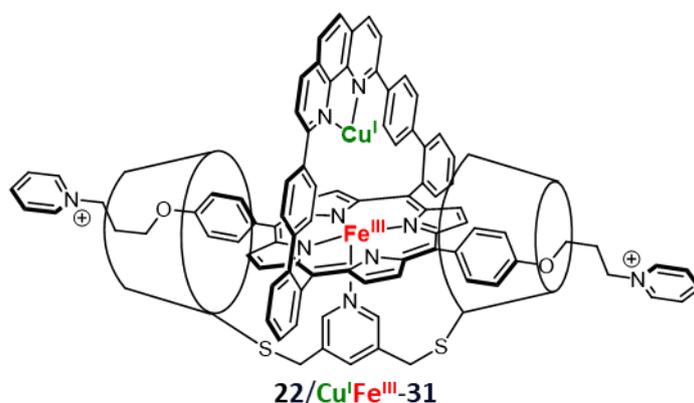


Figure 1.29. Structure moléculaire du complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD /porphyrine de fer-cuivre à anse **22/Cu^IFe^{III}-31**.

Un second modèle **22/Cu^IFe^{III}-31** a été construit à partir de la porphyrine à anse phénanthroline **28** largement étudiée par notre équipe (**Figure 1.29**). Cette porphyrine a été fonctionnalisée avec des groupements phénoxypropyle pyridiniums qui, comme dans le modèle développé par le Dr. B. Boitrel et le Pr. H. Kitagishi,⁶⁹ serviront de plateformes aux Me-O- β -CD, tout en augmentant la solubilité de la porphyrine **31** en milieu aqueux. Le dimère de Me-O- β -CD **22**, utilisé dans de précédents travaux par l'équipe de Pr. H. Kitagishi, a été choisi pour être associé à la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-31**. Avec son espaceur pyridine, ce dimère **22** fournira potentiellement une base proximale au fer de la porphyrine **Cu^IFe^{III}-31**.

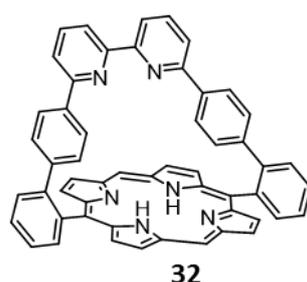


Figure 1.30. Structure moléculaire de la porphyrine à anse bipyridine **32**.

Enfin, dans un projet en collaboration avec le laboratoire de Pr. Hayashi, notre laboratoire a souhaité développer une porphyrine à anse bipyridine **32** plus souple (**Figure 1.30**). Comme dans l'analogue à anse phénanthroline **28**, cette porphyrine posséderait deux sites de coordination distincts, permettant de aussi l'utiliser comme modèle de cytochrome c oxydase.

-
- ¹ C. J. Reedy, and B. R. Gibney, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 617–650.
- ² J. Everse, Heme proteins in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, **2013**, Elsevier, 532-538.
- ³ A. Lombardi, F. Natri, and V. Pavone, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3165-3189.
- ⁴ G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 12971-12973.
- ⁵ S. E. V. Phillips, *J. Mol. Biol.* **1980**, *142*, 531-554.
- ⁶ B. Shaanan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 31-59.
- ⁷ a) J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. W. Wyckoff, and D. C. Phillips, *Nature* **1958**, *181*, 662-666. b) J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davis, D. C. Phillips, and V. C. Shore, *Nature* **1960**, *185*, 422- 427.
- ⁸ M. F. Perutz, M. G. Rossman, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, and A. C. T. North, *Nature* **1960**, *185*, 416-422.
- ⁹ B. A. Springer, S. G. Sligar, J. S. Olson, and G. N. Phillips, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699–714.
- ¹⁰ M. F. Perutz *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 327-386.
- ¹¹ S. Y. Park, T. Yokoyama, N. Shibayama, Y. Shiro, and J. R. H. Apprivoiser, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 690-701.
- ¹² A. Tsuneshige, S. Park, and T. Yonetani, *Biophysical Chemistry*, **2002**, *98*, 49-63.
- ¹³ M. Momenteau, and C. A. Reed, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659–698.
- ¹⁴ a) L. Pauling *Nature* **1964**, *203*, 182-183. b) B. Shaanan, *Nature* **1982**, *296*, 683-684.
- ¹⁵ M. L. Quillin, R. M. Arduini, J. S. Olson, and G. N. Phillips, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 140-155.
- ¹⁶ J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, and L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561–588.
- ¹⁷ J. R. Harris, and E. J. Boekema, Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (Subcellular Biochemistry Vol. 87 Springer Nature) **2018**, Springer Link, *87*, 167-227.
- ¹⁸ H. Michel, Respiratory Chain Complex IV in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, **2013**, Elsevier, 98-103.
- ¹⁹ N. Yano, K. Muramoto, A. Shimada, S. Takemura, J. Baba, H. Fujisawa, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, T. Tsukihara, and S. Yoshikawa, *J. Biol. Chem.* **2016**, *29*, 23882-23894,
- ²⁰ T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069.
- ²¹ S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660.
- ²² E. Kim, E. E. Chufán, K. Kamaraj, and K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1077-1134.
- ²³ S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, and T. Tsukihara, *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
- ²⁴ a) M. F. Tweedle, and L. J. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8065-8071. b) W. R. Hagen, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *708*, 82-98.
- ²⁵ a) J. Koepke, E. Olkhova, H. Angerer, H. Müller, G. Peng, and H. Michel, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 635-645. b) H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura, and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 2165-2169.
- ²⁶ F. Kolbe, S. Safarian, Z. Piórek, S. Welsch, H. Müller, and H. Michel, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6903.
- ²⁷ R. Andersson, C. Safari, R. Dods, E. Nango, R. Tanaka, A. Yamashita, T. Nakane, K. Tono, Y. Joti, P. Bath, É. Dunevall, R. Bosman, O. Noureki, A. Iwata, R. Neutze, and G. Brändén, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4518.
- ²⁸ a) I. Ishigami, A. Lewis-Ballester, A. Echelmeier, G. Brehm, N. A. Zatsepin, T. D. Grant, J. D. Coe, S. Lisova, G. Nelson, S. Zhang, Z. F. Dobson, S. Boutet, R. G. Sierra, A. Batyuk, P. Fromme, R. Fromme, J. C. H. Spence, A. Ros, S. R. Yeh, and D. L. Rousseau, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 3572-3577. b) I. Ishigami, R. G. Sierra, Z. Su, A. Peck, C. Wang, F. Poitevin, S. Lisova, B. Hayes, F. R. Moss, S. Boutet, R. E. Sublett, C. Hong Yoon, S.-R. Yeh, and D. L. Rousseau, *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 5752.
- ²⁹ a) A. A. Konstantinov, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 630–639. b) M. Wikström, K. Krab, and V. Sharma, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2469-2490.
- ³⁰ J. E. Morgan, M. I. Verkhovskiy, G. Palmer, and M. Wikström, *Biochem.* **2001**, *40*, 6882–6892.
- ³¹ Denis A. Proshlyakov, M. A. Pressler, C. Demaso, J. F. Leykam, D. L. Dewitt, and G. T. Babcock, *Science*, **2000**, *290*, 1588-1591.
- ³² a) E. A. Gorbikova, I. Belevich, M. Wikström, and M. I. Verkhovskiy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 10733-10737. b) E. A. Gorbikova, M. Wikström, and M. I. Verkhovskiy, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34907-34912.

- ³³ M. I. Verkhovskiy, A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morga, and M. Wikström, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *400*, 480–483.
- ³⁴ a) J. P. Collman, R. R. Gagne, T. R. Halbert, J. C. Marchon, and C. A. Reed, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7868–7870. b) J. P. Collman, R. R. Gagne, T. R. Halbert; C. A. Reed, G. Lang, and W. T. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1427.
- ³⁵ a) J. P. Collman, J. I. Brauman, K. M. Doxsee, T. R. Halbert, E. Bunnenberg, R. E. Linder, G. N. LaMar, J. Del Gaudio, G. Lang, and K. Spartalian, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4182–4192. b) J. P. Collman, J. I. Brauman, K. M. Doxsee, J. L. Sessler, R. M. Morris, and O. H. Gibson, *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 1427–1432.
- ³⁶ a) M. Momenteau, and D. Lavalette, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 341–343. b) D. Lavalette, C. Tetreau, J. Mispelter, M. Momenteau, and J.-M. Lhoste, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *145*, 555–565.
- ³⁷ J. P. Collman, P. C. Herrmann, L. Fu, T. A. Eberspacher, M. Eubanks, B. Boitrel, P. Hayoz, X. Zhang, J. I. Brauman, and V. W. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3481–3489.
- ³⁸ A. Nanthakumar, S. Renard, N. N. Murthy, K. D. Karlin, N. Ravi, B. Hanh Huynh, R. D. Orosz, E. P. Day, K. S. Hagen, and N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8513–8514.
- ³⁹ K. D. Karlin, A. Nanthakumar, S. Renard, N. N. Murthy, N. Ravi, B. Hanh Huynh, R. D. Orosz, and E. P. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4753–4763.
- ⁴⁰ S. Renard, A. Nanthakumar, M. Wikström, K. D. Karlin, and N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 24–34.
- ⁴¹ a) S. Hématien, I. Garcia-Bosch, and K. D. Karlin, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2462–2474. b) H.-Kim, S. K. Sharma, A. W. Schaefer, E. I. Solomon, and K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 15423–15432.
- ⁴² J. P. Collman, L. Fu, P. C. Herrmann, Z. Wang, M. Rapta, M. Bröring, R. Schwenninger, and B. Boitrel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3397–3400.
- ⁴³ J. P. Collman, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5145–5155.
- ⁴⁴ J. P. Collman, C. J. Sunderland, and R. Boulatov, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2282–2291.
- ⁴⁵ J. P. Collman, C. J. Sunderland, K. E. Berg, M. A. Vance, and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6648–6649.
- ⁴⁶ R. Boulatov, J. P. Collman, I. M. Shiryayeva, and C. J. Sunderland, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11923–11935.
- ⁴⁷ D. Ricard, A. Didier, M. L'Her, and B. Boitrel, *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 144–148.
- ⁴⁸ a) S. Bhunia, A. Rana, P. Roy, D. J. Martin, M. L. Pegis, B. Roy, and A. Dey, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9444–9457. b) A. Singha, K. Mittra, and A. Dey, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 7179–7186. c) S. Mukherjee, A. Nayek, S. Bhunia, S. Ghosh, and A. Dey, *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*, 14564–14576.
- ⁴⁹ a) C. T. Carver, B. D. Matson, and J. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5444–5447. b) D. J. Martin, and J. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11423–11434.
- ⁵⁰ J. P. Collman, R. A. Decréau, and C. Zhang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3546–3549.
- ⁵¹ J. P. Collman, R. A. Decréau, Y. Yan, J. Yoon, and E. I. Salomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5794–5795.
- ⁵² a) J. P. Collman, N. K. Devaraj, R. A. Decreau, Y. Yang, Y.-L. Yan, W. Ebina, T. A. Eberspacher, and C. E. D. Chidsey, *Science* **2007**, *315*, 1565–1568. b) J. P. Collman, and R. A. Decreau, *Chem. Commun.* **2008**, *41*, 5065–5076.
- ⁵³ D. Ricard, B. Andrioletti, B. Boitrel, and R. Guillard, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1331–1332.
- ⁵⁴ C. Ruzié, P. Even, and B. Boitrel, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1601–1604.
- ⁵⁵ a) E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Arai, K. Yamada, H. Nishide, and J. Fuhrhop, *J. Langmuir* **1995**, *11*, 1877–1884. b) T. Komatsu, M. Moritake, A. Nakagawa, and E. Tsuchida, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5469–5480.
- ⁵⁶ a) T. Komatsu, Y. Matsukawa and E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 397–402. b) A. Nakagawa, T. Komatsu, M. Iizuka, and E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 581–584. c) E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, and K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1419–1440.
- ⁵⁷ K. Kobayashi, *Biologicals* **2006**, *34*, 55–59.
- ⁵⁸ R. Funaki, W. Okamoto, C. Endo, Y. Morita, K. Kihira, and T. Komatsu, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1139–1145.
- ⁵⁹ a) K. Eshima, Y. Matsushita, M. Sekine, H. Nishid, E. Tsuchida, *Nippon Kagaku Kaishi* **1983**, 214–218. b) T. Komatsu, S. Hayakawa, E. Tsuchida, and H. Nishide, *Chem. Commun.* **2003**, *1*, 50–51.
- ⁶⁰ a) S. Mosseri, J. C. Mialocq, B. Perly, and P. Hambright, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4659–4663. b) S. K. Sur, and R. G. Bryant, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 4900–4905. c) J. Mosinger, M. Deumié, K. Lang, P. Kubát, D. M. Wagnerová, *J. Photochem. Photobiol.*, **2000**, *130*, 13–20.
- ⁶¹ J. M. Ribo, J.-A. Farrera, M. L. Valero, and A. Virgili, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3705–3712.
- ⁶² a) T. Carofiglio, R. Fornasier, V. Lucchini, C. Rosso, and U. Tonellato, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8019–8022. b) K. Kano, R. Nishiyabu, T. Asada, and Y. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9937–9944.
- ⁶³ N. Geue, J. J. Alcázar, and P. R. Campodónico, *Molecules* **2023**, *28*, 2625.
- ⁶⁴ a) K. Harata, K. Tsuda, K. Uekama, M. Otagiri, and F. J. Hirayama, *J. Inclusion Phenom.* **1988**, *6*, 135–142. b) G. L. Bertrand, J. R. Faulkner, S. M. Han, and D. W. Armstrong, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 6863–6867.
- ⁶⁵ T. Jiang, D. K. Sukumaran, S.-D. Soni, and D. S. Lawrence, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5149–5155.

-
- ⁶⁶ a) K. Kano, H. Kitagishi, M. Kodera, and S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435–438. b) K. Kano, H. Kitagishi, T. Mabuchi, M. Kodera, and S. Hirota, *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 358–366. c) K. Watanabe, H. Kitagishi, and K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6894–6897.
- ⁶⁷ a) K. Kano, H. Kitagishi, C. Dagallier, M. Kodera, T. Matsuo, T. Hayashi, Y. Hisaeda, and S. Hirota, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4448–4460. b) K. Kano, T. Ochi, S. Okunaka, Y. Ota, K. Karasugi, T. Ueda, and H. Kitagishi, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2946–2955.
- ⁶⁸ H. Kitagishi, H. Kawasaki, and K. Kano, *Chem. Asian J.*, **2015**, *10*, 1768–1775.
- ⁶⁹ Q. Mao, P. K. Das, S. Le Gac, B. Boitrel, V. Dorcet, K. Oohora, T. Hayashi, and H. Kitagishi, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 12392–12404.
- ⁷⁰ H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriya, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, and K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312–1315.
- ⁷¹ K. Watanabé, H. Kitagishi, and K. Kano, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 943–947.
- ⁷² T. Yamagiwa, A. T. Kawaguchi, T. Saito, S. Inoue, S. Morita, K. Watanabe, H. Kitagishi, K. Koji, and S. Inokuchi, *Hum. Exp. Toxicol.* **2014**, *33*, 360–368.
- ⁷³ Q. Mao, X. Zhao, A. Kiriya, S. Negi, Y. Fukuda, H. Yoshioka, A. T. Kawaguchi, R. Motterlini, R. Foresti, and H. Kitagishi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2023**, *120*, e2209924120.
- ⁷⁴ H. Kitagishi, D. Shimoji, T. Ohta, R. Kamiya, Y. Kudo, A. Onoda, T. Hayashi, J. Weiss, J. A. Wytko, and K. Kano, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 1989–1995.
- ⁷⁵ J. A. Wytko, E. Graf, and J. Weiss, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1015–1018.
- ⁷⁶ a) F. Melin, C. Boudon, M. Lo, K. J. Schenk, M. Bonin, P. Ochsenbein, M. Gross, and J. Weiss, *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2007**, *11*, 212–221. b) P. Vorburger, M. Lo, S. Choua, M. Bernard, F. Melin, N. Oueslati, C. Boudon, M. Elhabiri, J. A. Wytko, P. Hellwig, and J. Weiss, *Inorg. Chim. Acta.* **2017**, *468*, 232–238.

Chapitre 2. Synthèse de complexes porphyriniques à environnement distal phénanthroline et bipyridine

TABLE DES MATIERES :

I.	Généralités sur les porphyrines.....	44
II.	Généralités sur les cyclodextrines	45
III.	Construction de modèles d'hémoprotéines supramoléculaires	46
III.1.	Modèle à ligand distal bipyridine	46
III.1.1.	Synthèse du nouveau dimère de cyclodextrines à espaceur bipyridine	47
III.2.	Modèle à ligand distal phénanthroline.....	52
III.2.1.	Synthèse du dimère de cyclodextrines à espaceur pyridine	53
III.2.2.	Synthèse d'une nouvelle porphyrine à anse phénanthroline	53
IV.	Elaboration de porphyrines à anse bipyridine.....	60
IV.1.	Synthèse d'une nouvelle porphyrine anse bipyridine	61
IV.1.1.	Synthèse d'une anse bipyridine	62
IV.1.2.	Synthèse à effet de matrice	63
IV.2.	Synthèse d'une nouvelle porphyrine à double anse bipyridine.....	67
IV.3.	Synthèse d'une porphyrine de fer à anse bipyridine.....	69
V.	Conclusion.....	69

Les modèles de cytochrome *c* oxydase développés dans le cadre de ces travaux de thèse ont été construits à partir de porphyrines de fer. Afin de concevoir des modèles hydrosolubles, certains dérivés porphyriniques ont été associés à des dimères de Me-O- β -CD. Cependant, avant de décrire la synthèse des porphyrines et dimères de Me-O- β -CD développés durant de ces travaux de thèse, certaines caractéristiques et spécificités des porphyrines et des cyclodextrines seront tout d'abord décrites. A la suite de ces rappels, la synthèse des trois modèles de cytochrome *c* oxydase présentés précédemment sera détaillée, en commençant par celle des deux modèles solubles en milieu aqueux, suivie de celle du dernier modèle soluble en milieu organique.

I. Généralités sur les porphyrines

Les porphyrines sont des composés aromatiques comprenant 22 électrons π , dont 18 participent à l'aromaticité de la molécule (en gras **Figure 2.1**). Leur macrocycle est constitué de quatre unités pyrrole reliées entre elles par des ponts méthène en position α -pyrrolique. Les deux autres positions du macrocycle, appelées β -pyrroliques et méso, sont fonctionnalisables, souvent par l'intermédiaire de réactions de substitution électrophile aromatique. De plus, les quatre atomes d'azote du macrocycle porphyrinique peuvent chélater différents ions métalliques, comme le fer dans les hémoprotéines. Dans ce cas, on parle alors d'une « métalloporphyrine », alors que le ligand seul, non complexé à un métal, est appelé « porphyrine base libre » (**Figure 2.1**)

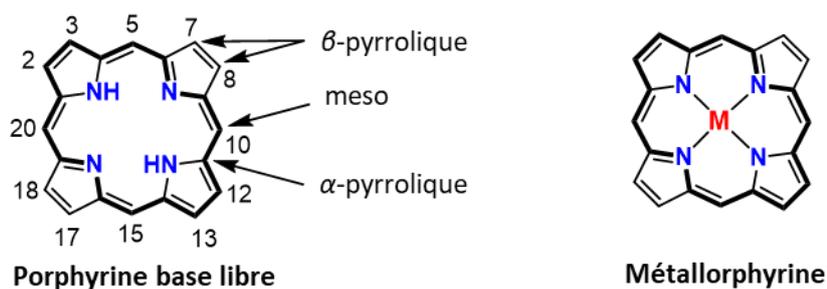


Figure 2.1. Porphyrine base libre numéroté suivant la nomenclature IUPAC et métalloporphyrine.

La présence d'un système π -conjugué étendu et donc d'un gap HOMO-LUMO restreint est responsable de la couleur intense des dérivés porphyriniques. Ces molécules présentent dans le domaine de l'ultraviolet (UV) et du visible deux types de bandes d'absorption : la bande de Soret et les bandes Q.⁷⁷ La bande de Soret, commune à toutes les porphyrines, est la plus intense ($\epsilon > 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et absorbe entre 380 et 500 nm. Elle correspond à une

transition $\pi-\pi^*$ entre le niveau fondamental S_0 et le deuxième niveau excité S_2 . Les bandes Q, de plus faibles intensités, absorbent dans le domaine du visible entre 500 et 750 nm. Ces bandes correspondent à des transitions $\pi-\pi^*$ interdites entre le niveau fondamental S_0 et le premier niveau excité S_1 . En général, les porphyrines bases libres présentent au moins quatre bandes Q, alors que les métalloporphyrines, qui sont plus symétriques, n'en ont que deux. L'intensité de ces bandes dépend de la nature et de la position qu'occupent les substituants sur le macrocycle porphyrinique.⁷⁸ Bien que moindre, le solvant ou encore l'environnement local de la porphyrine, comme lorsqu'elle est associée à des cyclodextrines, peuvent aussi avoir une influence sur ces propriétés spectrales.

II. Généralités sur les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composées de sous-unités α -D-glucopyranoses, reliées entre elles par des liaisons O-glycosidiques en position 1 et 4 de chaque sous-unité (**Figure 2.2**).⁷⁹ Ces oligosaccharides cycliques de forme conique possèdent deux faces distinctes : une face primaire et une face secondaire. La face primaire, plus étroite, est constituée des alcools primaires situés en position 6 de chaque sous-unité glucopyranose, tandis que la face secondaire, plus large, comprend les alcools secondaires des positions 2 et 3 de ces mêmes sous-unités. Ces groupements hydroxyle confèrent son caractère hydrophile à la molécule, tandis que leur squelette carboné crée un environnement hydrophobe à l'intérieur de leur cavité. Cet environnement hydrophobe est propice à l'encapsulation de molécules organiques en milieu aqueux.⁸⁰

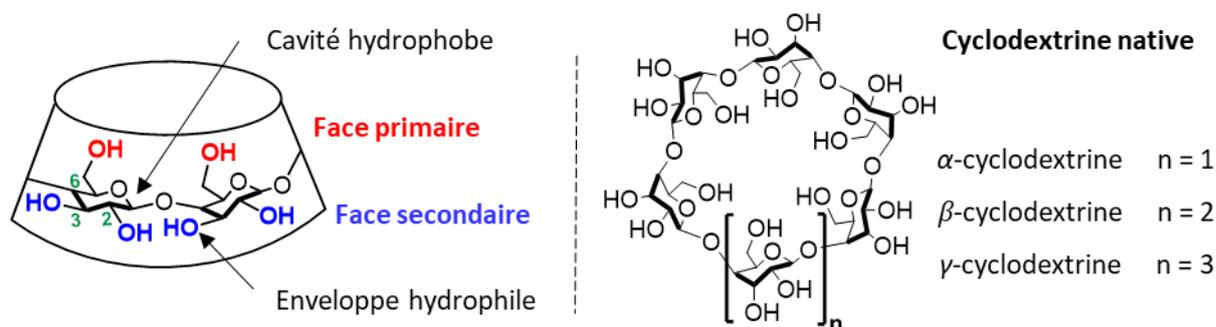


Figure 2.2. Représentation schématique et structure moléculaire d'une cyclodextrine.

Les cyclodextrines les plus courantes sont les α -, β - et γ -cyclodextrines, le préfixe définissant le nombre de sous-unités de glucose constituant le macrocycle ($\alpha = 6$, $\beta = 7$ et $\gamma = 8$, **Figure 2.2**). La taille de leur cavité varie de 4,7 à 5,3 Å pour les dérivés α , de 6 à 6,5 Å pour

les β -CD et de 7,5 à 8,3 Å pour les γ -cyclodextrines. En fonction de ce diamètre, elles peuvent encapsuler des molécules organiques de différentes tailles. Dans le cadre de ces travaux, cette propriété particulière a été utilisée pour former des complexes d'inclusions solubles en milieu aqueux assemblant dimères de Me-O- β -CD et porphyrines.

III. Construction de modèles d'hémoprotéines supramoléculaires

Comme présenté dans les objectifs, au cours de ces travaux de thèse, les deux complexes d'inclusions dimères de Me-O- β -CD/porphyrine **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31** comme modèles de cytochrome *c* oxydase hydrosolubles ont été développés (**Figure 2.3**). La construction de ces modèles nécessite d'assembler deux molécules entre elles : une porphyrine à un dimère de Me-O- β -CD.

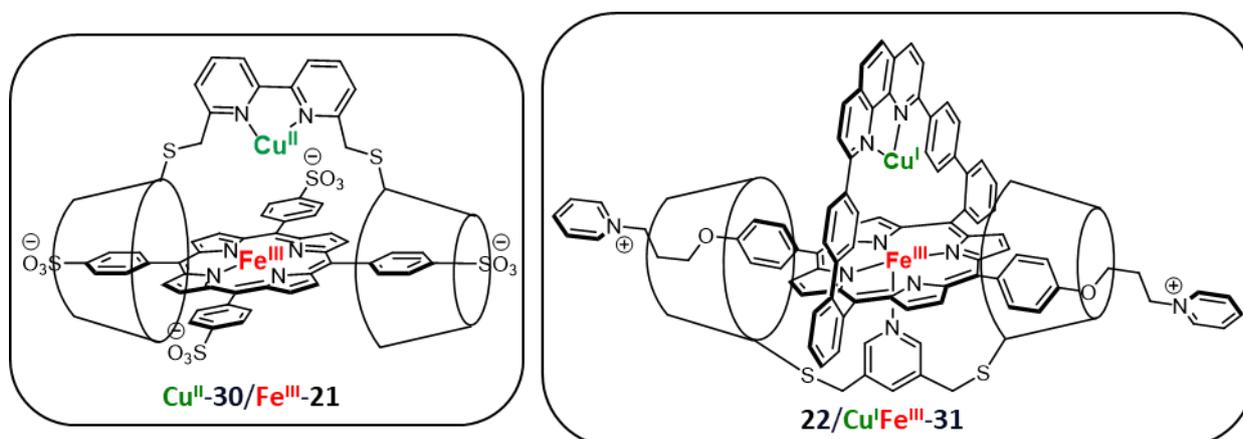


Figure 2.3. Représentation schématique des modèles de cytochrome *c* oxydase hydrosoluble **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31**.

Cette partie se focalise donc sur la synthèse des dimères de Me-O- β -CD et des porphyrines de fer utilisés pour construire les deux nouveaux modèles de cytochrome *c* oxydase hydrosolubles **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31**. La formation de ces assemblages supramoléculaires, ainsi que l'insertion du cuivre, seront décrites dans le chapitre suivant.

III.1. Modèle à ligand distal bipyridine

Le premier modèle de cytochrome *c* oxydase est composé du nouveau dimère **30** de Me-O- β -CD à espaceur bipyridine, et de la porphyrine tétraphénylsulfonate de fer **Fe^{III}-21** (**Schéma 2.1**). En plus de jouer le rôle d'espaceur entre les deux Me-O- β -CD, la bipyridine servant de ligand du cuivre mime l'environnement distal de l'enzyme. Par ailleurs, la

porphyrine de fer **Fe^{III}-21** étant disponible commercialement, sa synthèse ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

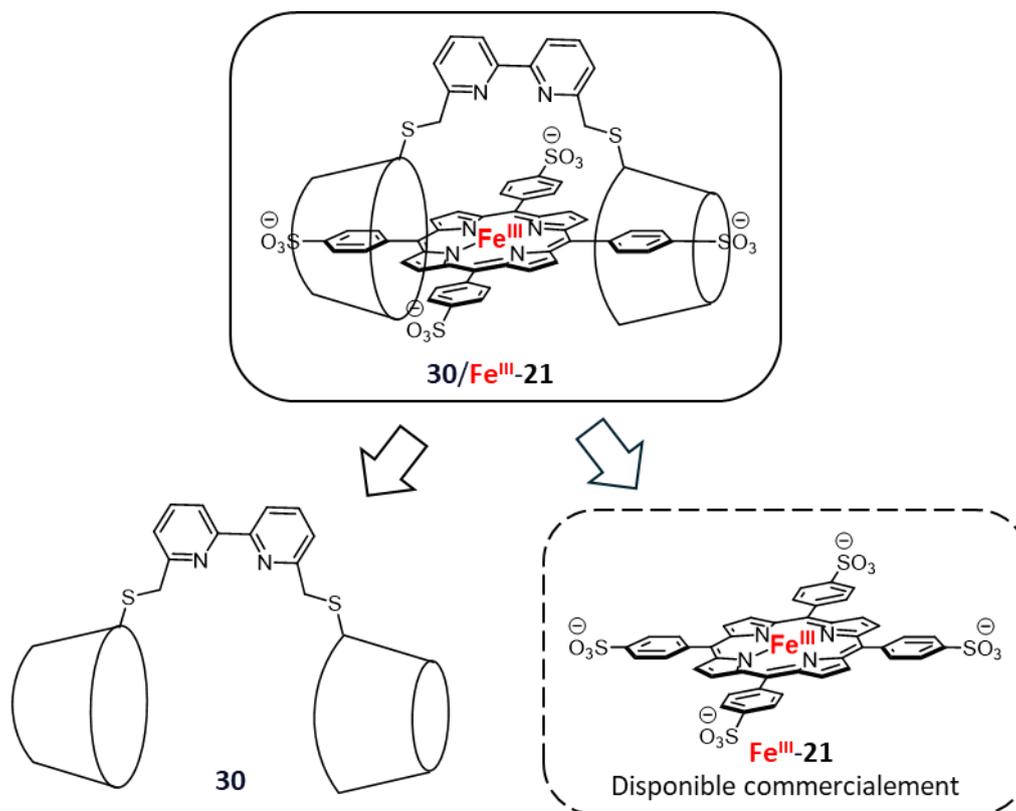


Schéma 2.1. Rétrosynthèse du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21**.

III.1.1. Synthèse du nouveau dimère de cyclodextrines à espaceur bipyridine

Pour synthétiser le dimère de Me-O- β -CD **30**, une stratégie de synthèse convergente, analogue à celle utilisée pour la synthèse des dimères de Me-O- β -CD déjà développée au laboratoire du Pr. H. Kitagishi, a été choisie (**Schéma 2.2**). Cette stratégie implique la préparation de deux synthons en parallèle : la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33** et la 6,6'-bis(mercaptométhyl)-2,2'-bipyridine **34**. La Me-O- β -CD **33** a été préparée par le groupe du Pr. H. Kitagishi, alors que la bipyridine **34** et le dimère de Me-O- β -CD **30** ont été synthétisés dans le cadre de ce travail.

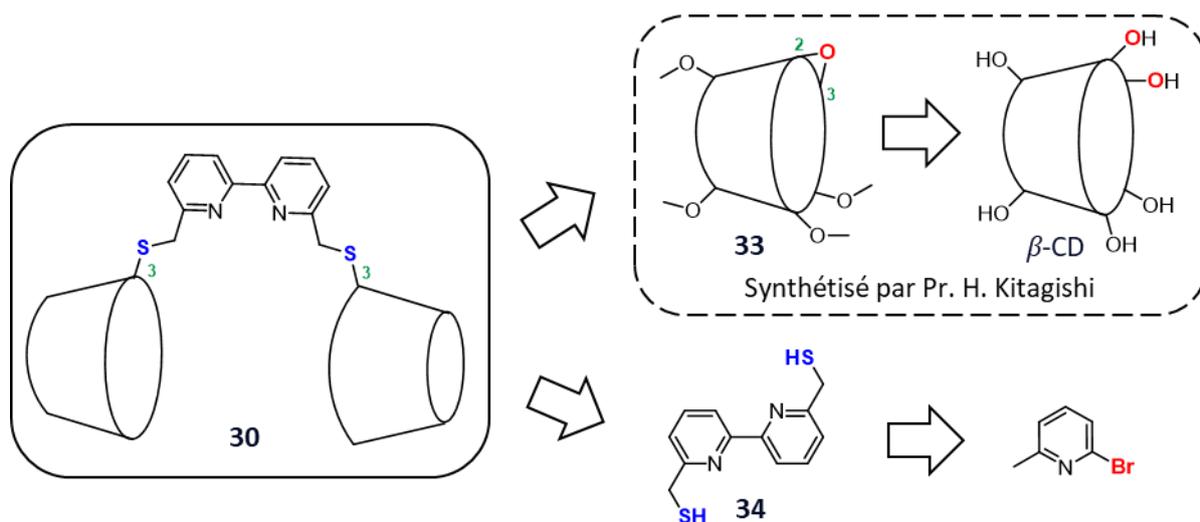


Schéma 2.2. Rétrosynthèse dimère de mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **30**.

La synthèse de la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33** a été effectuée en trois étapes à partir de la β -CD native en suivant les procédures décrites dans la littérature (**Schéma 2.3**)^{65,66a} Bien qu'elle ait été effectuée par le groupe du Pr. H. Kitagishi, par souci de clarté, cette synthèse est brièvement décrite ci-après.

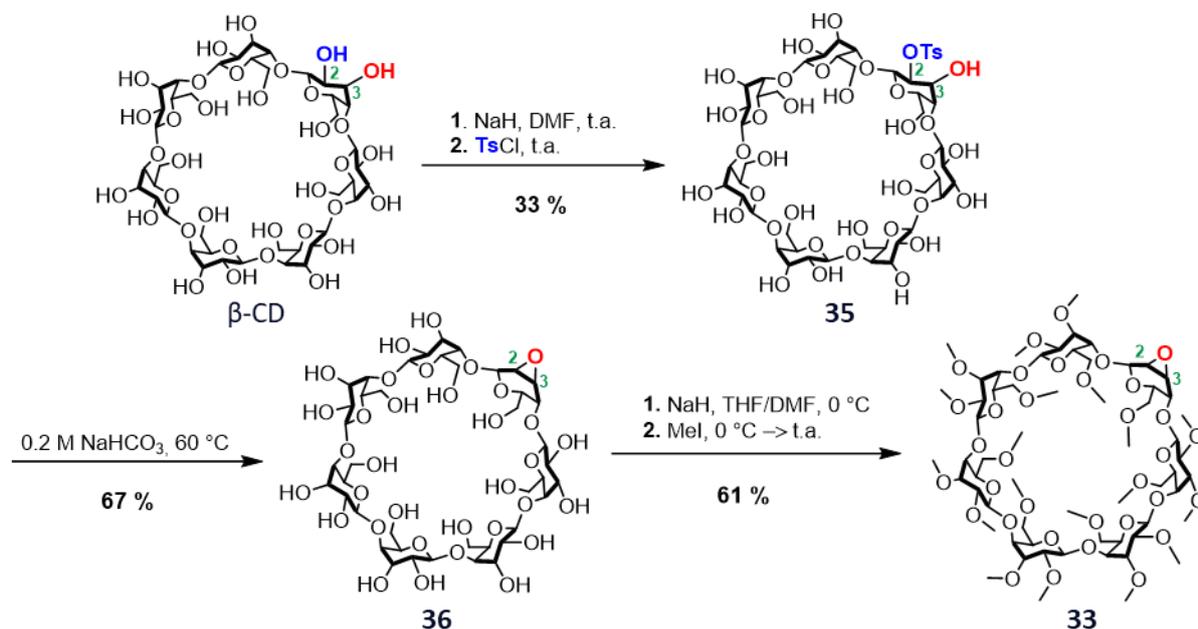


Schéma 2.3. Synthèse de la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33**.

Cette séquence réactionnelle débute, par une étape de monotosylation en position 2 de la β -CD. D'après la littérature, les protons des hydroxyles en position 2 sont légèrement plus acides que les autres, et sont donc étant préférentiellement déprotonés.⁸¹ Cette méthode permet d'obtenir la β -CD **35** monotosylée en position 2 avec un rendement de

33 %.⁶⁵ Ce faible rendement s'explique par la formation d'un mélange statistique de produits monotosylé et ditosylés en position 2, ainsi que de β -CD n'ayant pas réagi.⁸²

D'après la littérature, le traitement basique de la β -CD **35** permet de former la mono-2,3-époxymanose- β -CD **36**,^{65,83} isolée par le groupe de Pr. H. Kitagishi avec un rendement de 67 %.^{66a} Pour finir, la β -CD **36** a été méthylée afin d'obtenir la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33** avec un rendement de 61 %.^{66a}

En parallèle, la synthèse de la 6,6'-bis(mercaptométhyl)-2,2'-bipyridine **34** a été réalisée en quatre étapes à partir de 2-bromo-6-méthylpyridine **37** comme décrit dans la littérature (**Schéma 2.4**).⁸⁴ Ainsi, la 2-bromo-6-méthyl-pyridine a été engagée dans une première réaction d'homo-couplage catalysée au nickel, en présence d'une quantité stœchiométrique de zinc et de chlorure de lithium.^{84a} Après une chromatographie sur colonne, la 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine **37** a pu être isolée avec un rendement de 85 %.

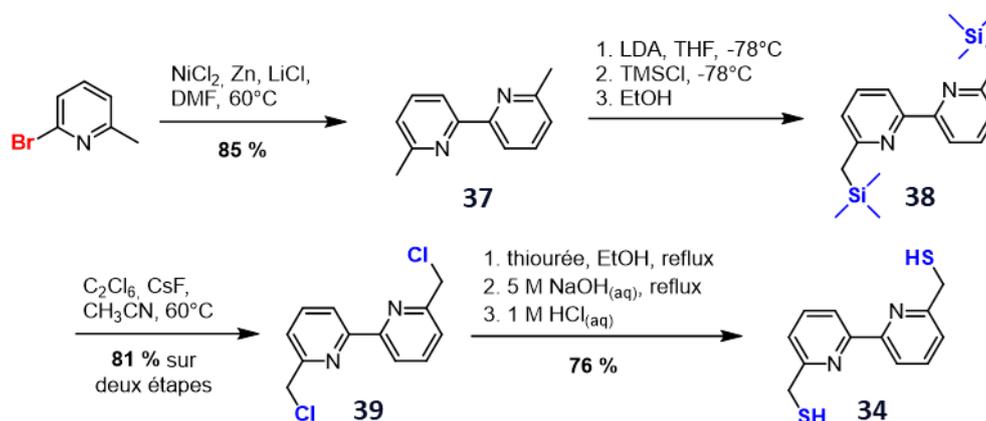


Schéma 2.4. Synthèse de la 6,6'-bis(mercaptométhyl)-2,2'-bipyridine **34**.

La bipyridine triméthyl silylée **38** a ensuite été obtenue par déprotonation des groupements méthyles de la bipyridine **37**, suivie de l'addition à basse température du chlorure de triméthylsilane (TMS).^{84b} La bipyridine **38**, sensible à l'eau, n'a pas été purifiée par colonne chromatographique. Le produit brut a été directement utilisé dans la réaction suivante. La substitution électrophile des groupements TMS par des ions chlorure a ensuite été effectuée avec de l'hexachloroéthane comme agent chlorant en présence de fluorure de césium.^{84b} Après purification, la 6,6'-bis(chlorométhyl)-2,2'-bipyridine **39** a été isolée avec un rendement de 81 % sur deux étapes.

La 6,6'-bis(mercaptométhyl)-2,2'-bipyridine **34** a ensuite été préparée par attaque nucléophile de la thiourée, suivie de l'hydrolyse des sels thiouroniums formés.^{84c} Après traitement acide, la bipyridine thiolée **34** a été obtenue avec un rendement de 76 %. Cette dernière étant sensible à l'air, elle a directement été engagée dans la réaction suivante sans plus de purification. La synthèse de cette bipyridine et la synthèse du dimère de Me-O- β -CD **30**, décrite ci-après, ont été réalisées au Japon durant un séjour de trois mois dans l'équipe du Pr. H. Kitagishi.

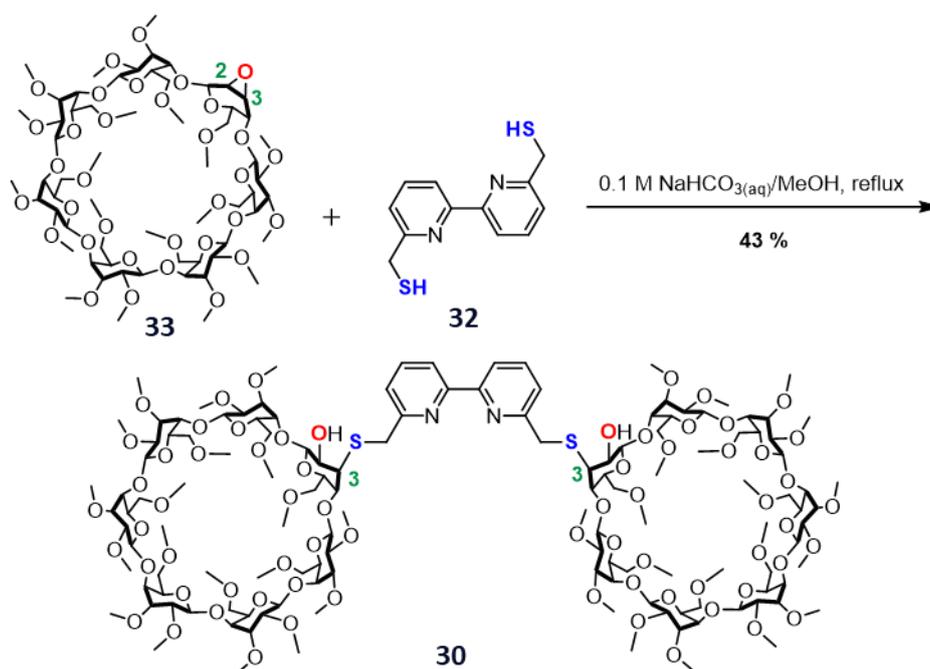


Schéma 2.5. Synthèse du dimère de Me-O- β -CD **30**.

Le dimère de Me-O- β -CD **30** a été préparé à l'aide d'une réaction d'ouverture en conditions basiques, à partir de la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33** avec 6,6'-bis(mercaptométhyl)-2,2'-bipyridine **34** comme nucléophile (**Schéma 2.5**). Les conditions utilisées sont similaires à celles développées par le laboratoire du Pr. H. Kitagishi pour la synthèse de précédent dimère.^{66a} D'après la littérature, l'attaque du nucléophile sur la sous-unité 2,3-époxymanose se fait préférentiellement en position 3, car l'attaque en position 2 implique le passage de la sous-unité par une conformation « bateau tordu », énergétiquement défavorable (**Schéma 2.6**).⁸⁵

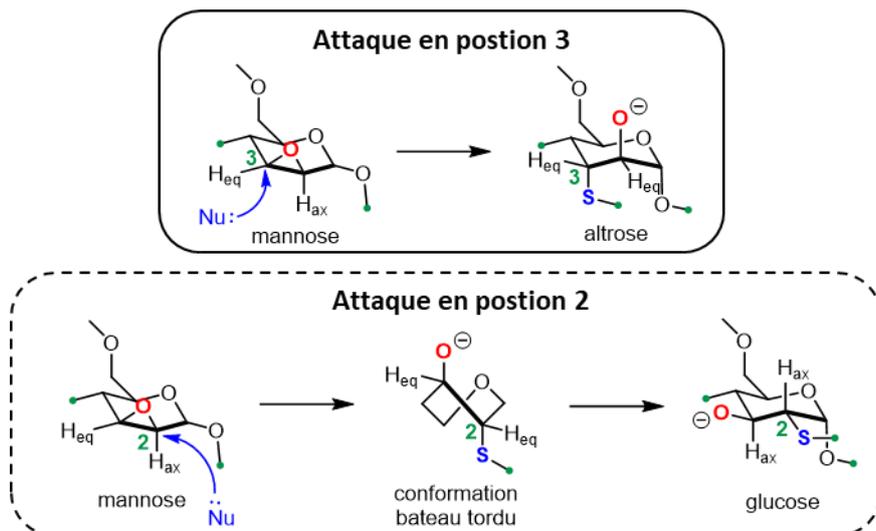


Schéma 2.6. Représentation schématique des possibles attaques nucléophiles sur la sous-unité 2,3-époxymanose de la Me-O- β -CD **33**.

L'analyse en spectrométrie de masse du brut réactionnel a permis de distinguer la formation de deux produits principaux, un produit mono fonctionnalisé bipyridine-Me-O- β -CD, et le dimère de Me-O- β -CD **30**. Après purification suivie d'une chromatographie par exclusion stérique, le dimère de Me-O- β -CD **30** a pu être isolé avec un rendement de 43 %. Cette dernière réaction, réalisée une unique fois, a permis d'obtenir quasiment 1 g de produit.

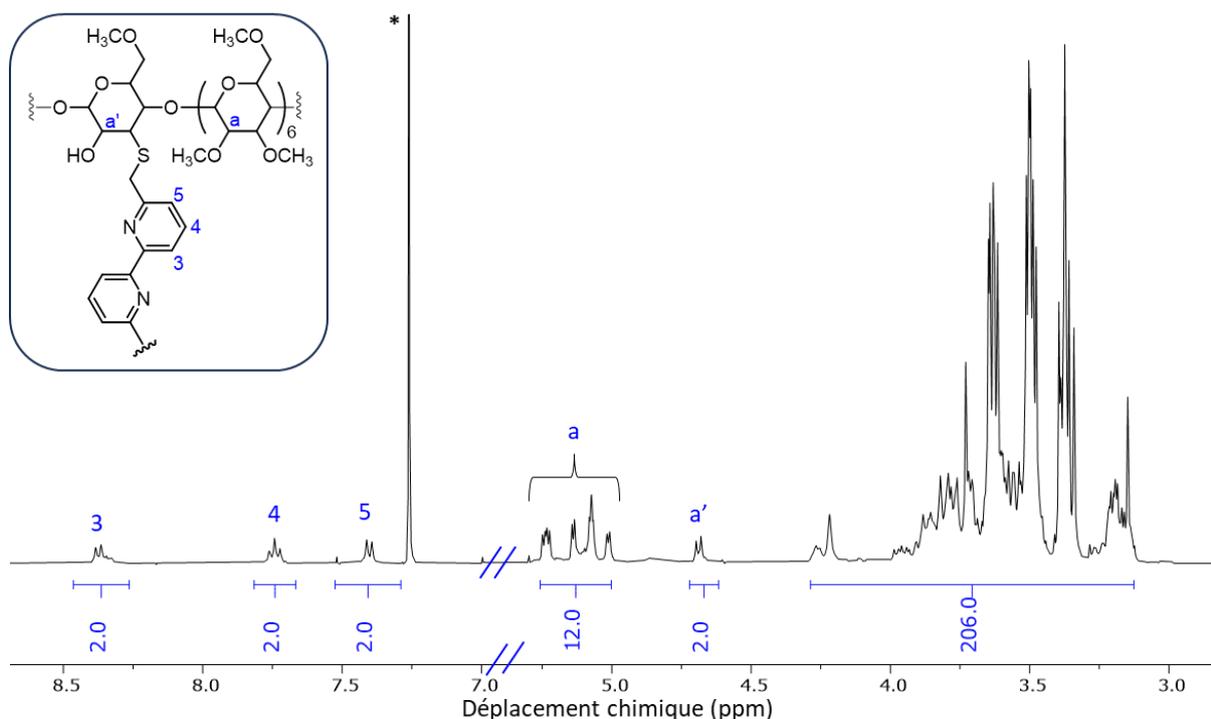


Figure 2.4. Spectre RMN ^1H 500 MHz du dimère de de Me-O- β -CD **30** à espaceur bipyridine dans du CDCl_3 à 25 °C (* : solvant).

La structure de la molécule a été confirmée par RMN ^1H et spectrométrie de masse. Cependant, la complexité du spectre RMN ^1H (**Figure 2.4**) ne nous a pas permis de confirmer la régiosélectivité et la stéréochimie du nouveau produit formé. Il est néanmoins possible de distinguer les protons de la bipyridine ($\text{H}_3\text{-H}_5$) dans la région des aromatiques, ainsi que les protons anomériques de la Me-O- β -CD ($\text{H}_a\text{-H}_a'$) entre 5,5 et 4,7 ppm, déblindés par rapport au massif à 206 protons. Les études d'association de ce dimère avec la porphyrine de fer **Fe^{III}-21**, ainsi que l'insertion du cuivre dans la bipyridine seront présentées dans le prochain chapitre.

III.2. Modèle à ligand distal phénanthroline

Le second modèle de cytochrome c oxydase est constitué d'une nouvelle porphyrine à anse phénanthroline **31**, et du dimère de Me-O- β -CD à espaceur pyridine **22** (**Schéma 2.7**).

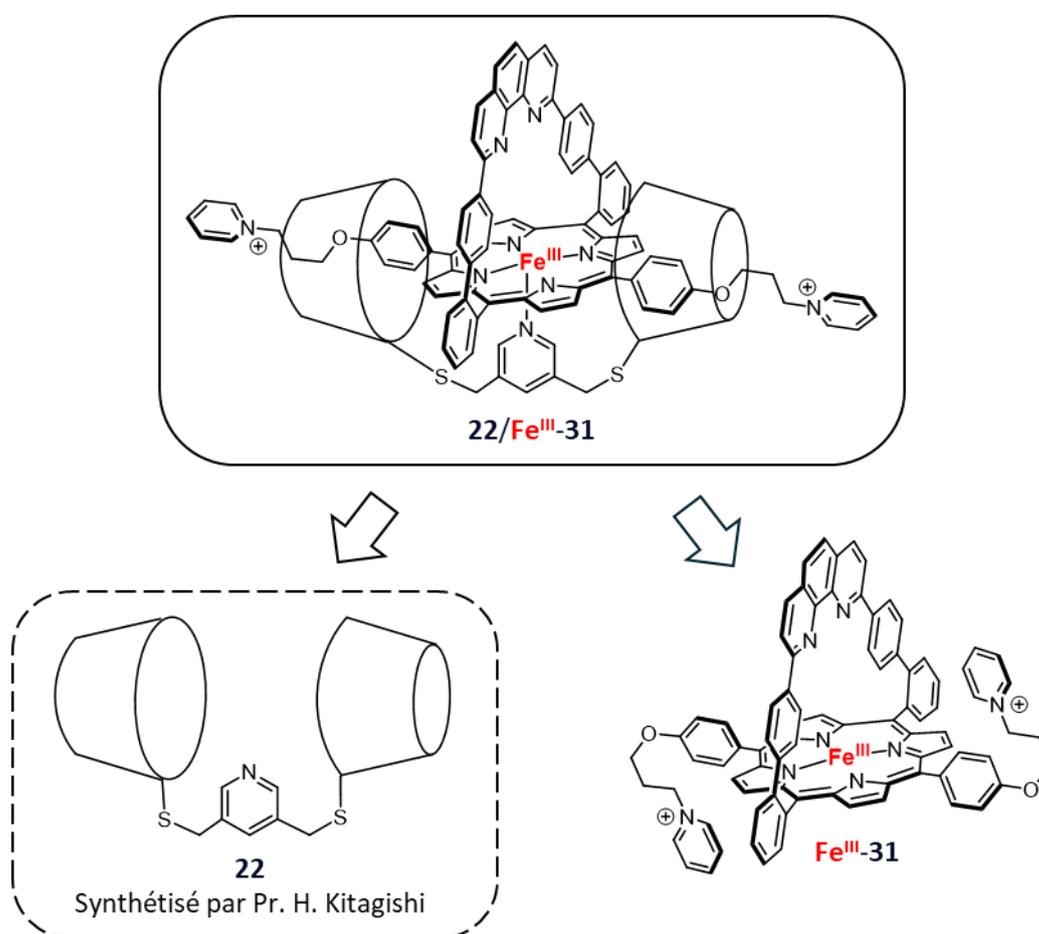


Schéma 2.7. Rétrosynthèse du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31**.

Dans ce modèle, la phénanthroline sert de ligand pour le cuivre à proximité du site distal, tandis que la pyridine apporte une base axiale au fer comme mime du site proximal. Le dimère de Me-O- β -CD **22** a été préparé par l'équipe du Pr. H. Kitagishi, tandis que la synthèse

de la porphyrine de fer à anse phénanthroline **31** a été effectuée dans le cadre de ce travail. Ainsi, après avoir brièvement décrit la voie de synthèse permettant d'accéder au dimère de Me-O- β -CDs **22**, la synthèse de la porphyrine à anse phénanthroline **31** sera ensuite détaillée.

III.2.1. Synthèse du dimère de cyclodextrines à espaceur pyridine

La synthèse du dimère de Me-O- β -CD **22** a été effectuée par le groupe du Pr. H. Kitagishi comme décrit dans la littérature, en suivant une stratégie de synthèse convergente similaire à celle utilisée pour le dimère de Me-O- β -CD **30** (Schéma 2.8).^{65,66a} D'un côté, la mono-2,3-époxymanose-Me-O- β -CD **33** a été synthétisée en suivant la même séquence réactionnelle que présentée précédemment.^{66a} De l'autre, l'espaceur pyridine **40** a été synthétisé à partir de la 3,5-bis(hydroxyméthyl)-pyridine en deux étapes en passant par un intermédiaire chloré.⁶⁵ La réaction finale d'ouverture d'époxyde, effectuée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la synthèse du dimère **30**, permet d'obtenir le dimère de Me-O- β -CD **22** avec un rendement de 20 %.^{66a}

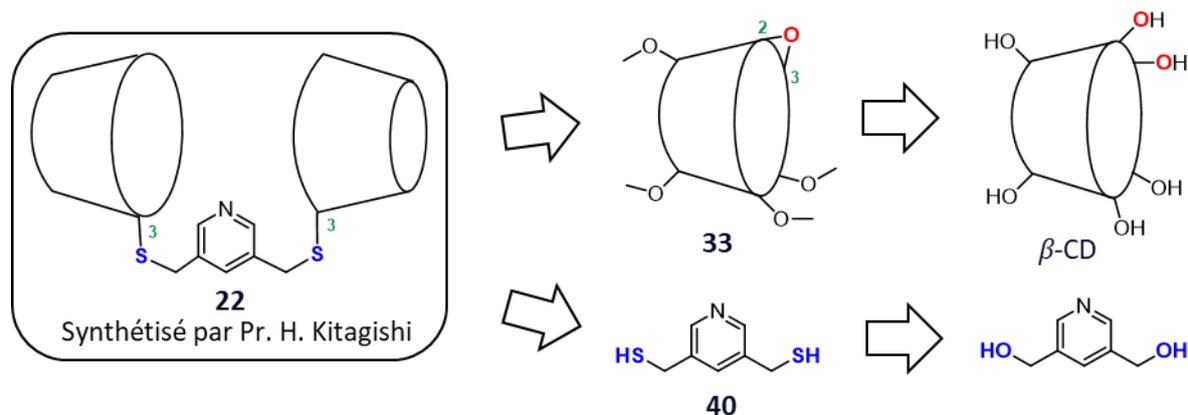


Schéma 2.8. Rétrosynthèse du dimère de Me-O- β -CD **22**.

III.2.2. Synthèse d'une nouvelle porphyrine à anse phénanthroline

Il y a 30 ans, la synthèse très efficace de la porphyrine à anse phénanthroline **28** a été décrite par notre laboratoire.⁷⁵ La condensation acido-catalysée entre deux équivalents de dipyrrométhane **41** et le dialdéhyde **42** en conditions diluées (10^{-4} M), permet après oxydation d'obtenir la porphyrine **28** avec des rendements allant jusqu'à 70 % (Schéma 2.9). En amont de cette étape, le composé **41**⁸⁶ et le dialdéhyde **42**^{75,87} ont respectivement été synthétisés à en deux étapes à partir du pyrrole et en trois étapes à partir de la 1,10-phénanthroline.

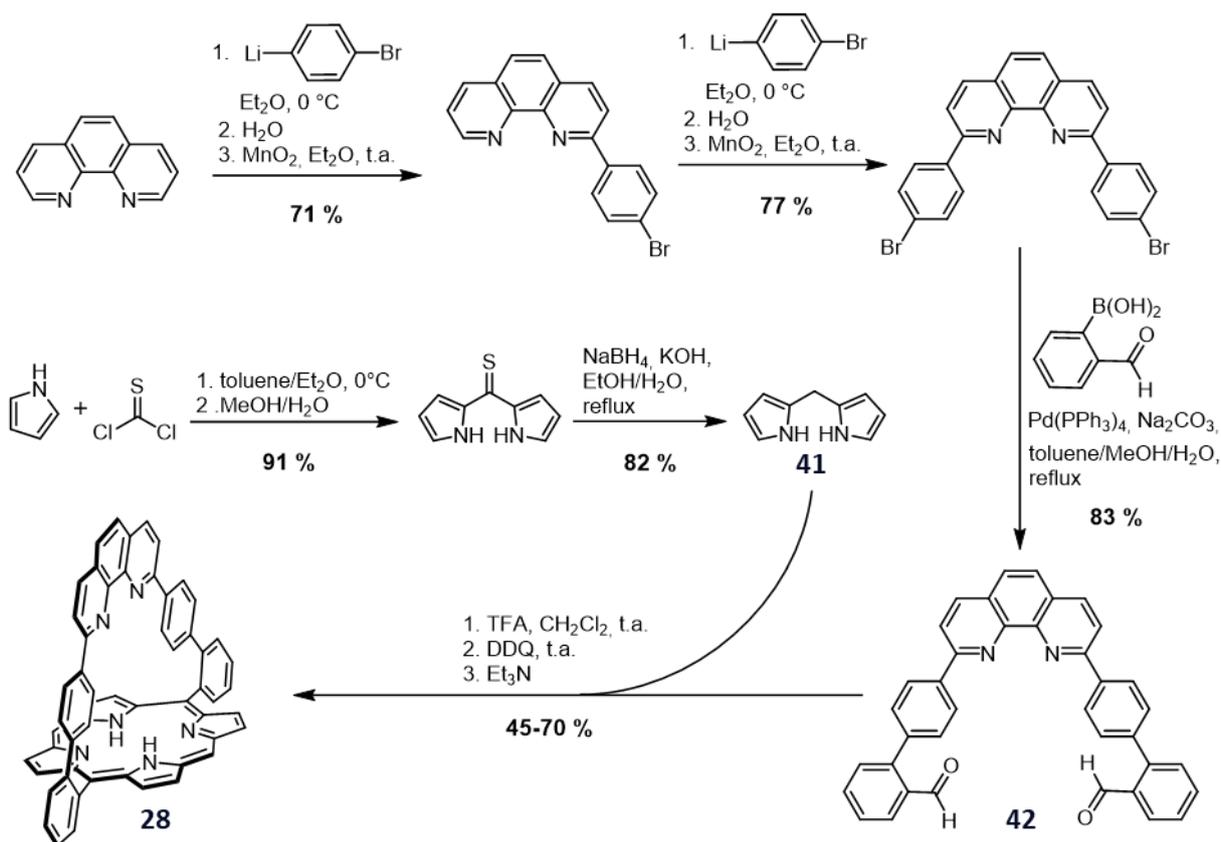


Schéma 2.9. Synthèse de la porphyrine à anse phénanthroline **28**.

Avec ces deux sites de coordination, des composés analogues à la porphyrine **28** ont été utilisés comme modèle fer/cuivre de cytochrome *c* oxydase. La synthèse de ces analogues a souvent impliqué une fonctionnalisation de la porphyrine **28** en position méso, soit pour augmenter la solubilité de la molécule, soit pour incorporer directement à l'édifice une base axiale pour le fer. Dans ce but, le laboratoire a exploré différentes stratégies de synthèse. Une première stratégie implique la condensation du dialdéhyde **42** avec un dérivé du dipyrrométhane fonctionnalisé en amont de l'étape finale de condensation, tandis qu'une deuxième utilise la porphyrine à anse **28** comme synthon de départ, qui est ensuite post-fonctionnalisée.

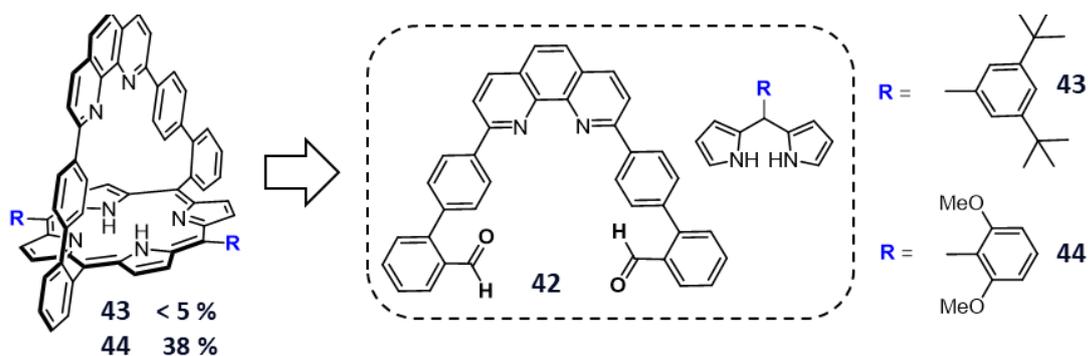


Schéma 2.10. Rétrosynthèse des porphyrines à anse **43** et **44** substituées en position méso.

La première stratégie a tout d'abord été étudiée par le Dr. F. Melin.⁸⁸ Après de nombreux essais, l'étape finale de condensation n'a permis d'obtenir la porphyrine à anse **43**, substituée en position méso, qu'avec un rendement inférieur à 5 % (**Schéma 2.10**). Cette différence de rendement entre la porphyrine **28** et la porphyrine substituée **43** lors de l'étape de condensation peut s'expliquer par des effets thermodynamiques. Dans le premier cas, la faible solubilité du porphyrinogène déplacerait l'équilibre de la réaction vers la formation du macrocycle. A l'inverse, la formation d'un porphyrinogène plus soluble déplacerait l'équilibre vers la formation d'oligomères. En changeant de substituant, le Dr. P. Vorburger a tout de même réussi à obtenir un meilleur rendement à 38 % avec la porphyrine **44** (**Figure 2.12**).⁸⁹ Suite à ces travaux, cette stratégie, impliquant des rendements plus faibles lors de l'étape de condensation a été écartée. La porphyrine **31** a donc été synthétisée en post-fonctionnalisant la porphyrine à anse **28** (**Schéma 2.11**). Ce ligand clef permet en dernier lieu d'accéder à la porphyrine de fer **Fe^{III}-31**.

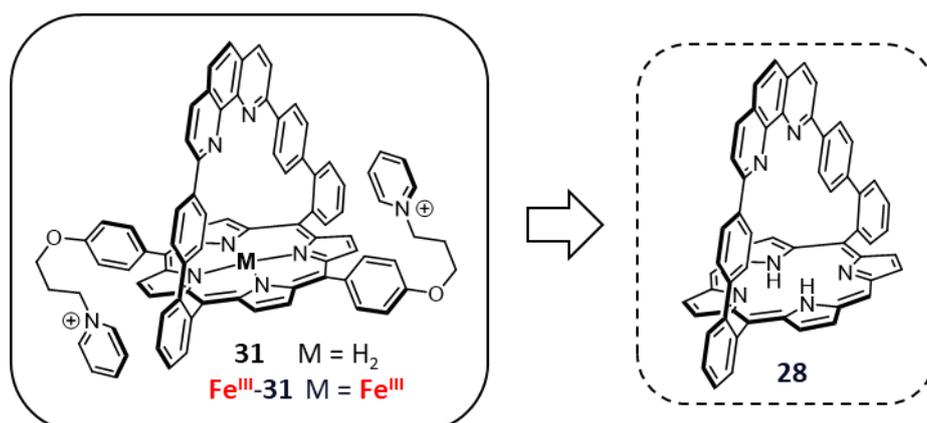


Schéma 2.11. Rétrosynthèse de la porphyrine base libre **31** et de la porphyrine de fer **Fe^{III}-31**.

Afin d'accéder à la porphyrine à anse **31**, la porphyrine **28** a tout d'abord été bromée en deux étapes, selon une procédure décrite par le laboratoire,⁹⁰ adapté de la littérature (**Schéma 2.12**).⁹¹ Pour cela, la porphyrine **28** a préalablement été métallée quantitativement avec un excès d'acétate de zinc, afin d'éviter lors de l'étape de bromation la formation de produits secondaires bromés en position β -pyrrolique.

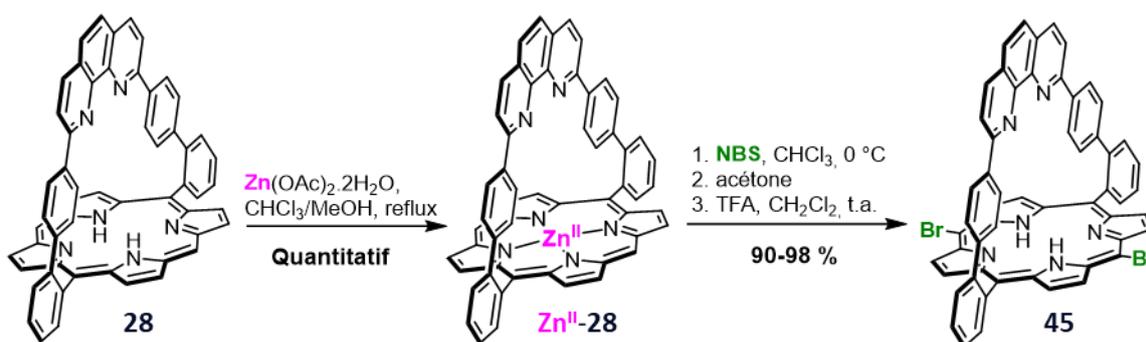


Schéma 2.12. Synthèse de la porphyrine à anse dibromée **45**.

La porphyrine de zinc **Zn^{II}-28** a ensuite été bromée en positions méso en utilisant 1,95 équivalent de *N*-bromosuccinimide (NBS) dans le chloroforme à 0 °C. Dans cette réaction, la porphyrine **Zn^{II}-28** est bromée selon un mécanisme de substitution électrophile. Dans ce cas, l'utilisation d'une base externe, piégeant le proton libéré lors de la réaromatisation de la porphyrine, n'est pas utile puisque la phénanthroline assure très bien ce rôle. Après démétallation de la porphyrine en milieu acide, le produit majoritaire dibromé **45** peut être si besoin séparé du produit monobromé par colonne chromatographique. Dans le meilleur des cas, la dibromo-porphyrine **45** a pu être isolée après extraction avec un rendement quasi-quantitatif.

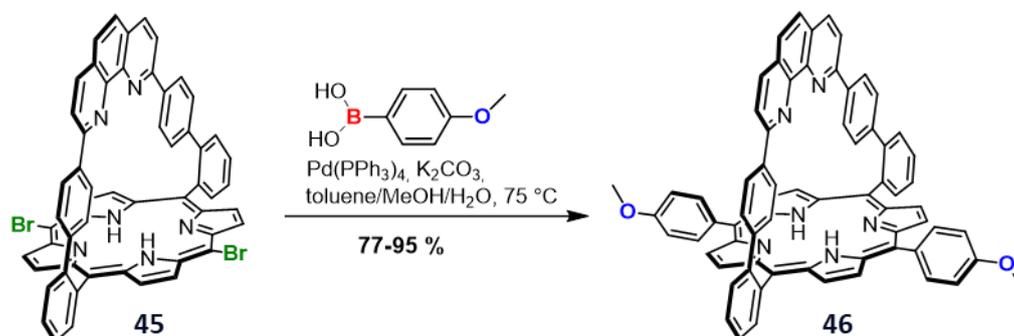


Schéma 2.13. Synthèse de la porphyrine à anse **46**.

Par la suite, deux substituants méthoxyphényle sont greffés sur la porphyrine **45** à l'aide d'un couplage de Suzuki effectué avec 3 équivalents d'acide boronique, dans des conditions classiques (**Schéma 2.13**). Après purification, la porphyrine bifonctionnalisée **46** a été isolée avec des rendements allant de 77 % à 95 %, en fonction de l'échelle utilisée. Dans l'étape suivante, les éthers de méthyle sont clivés en utilisant un excès de tribromure de bore (**Schéma 2.14**). La bis(*p*-hydroxyphényl)porphyrine **47** a été obtenue avec un rendement de 93 % après traitement. Elle a été utilisée sans plus de purification dans l'étape suivante.

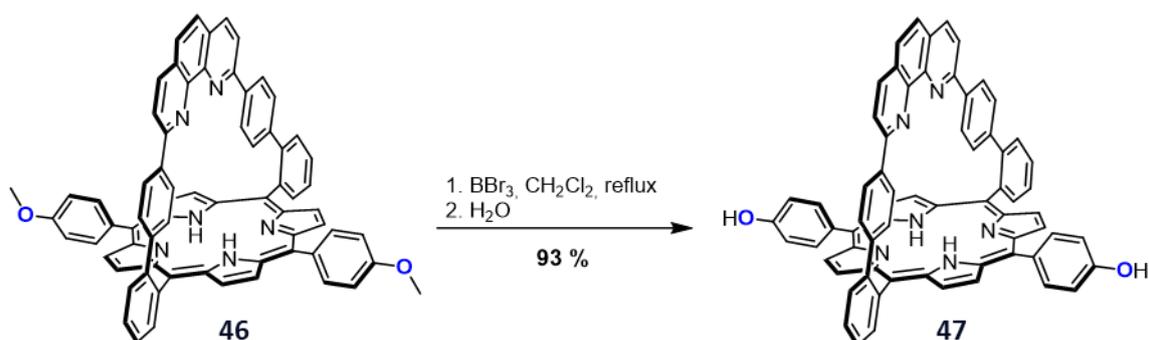


Schéma 2.14. Synthèse de la porphyrine à anse **47**.

La porphyrine **47** a ensuite été engagée dans une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2, en présence de 2,5 équivalents de carbonate de césium et d'un large excès de 1,3-dibromopropane (**Schéma 2.15**). Dans ces conditions, la réaction entraîne la formation de deux produits de substitution, un produit monosubstitué et la porphyrine disubstituée **48** isolée avec 54 % de rendement après colonne chromatographique. Bien que cette réaction ait duré 48 h, à ce jour, il n'a pas été possible d'obtenir un meilleur rendement de produit isolé. Des essais avec le carbonate de potassium ont néanmoins permis d'obtenir un plus grand ratio de bis(bromo-3-propyloxyphényl)porphyrine **48**, mais la formation systématique de produits d'éliminations, détectés en spectrométrie de masse et inséparables par colonne chromatographique, n'a pas permis, avec cette méthode, d'isoler la molécule **48** pure.

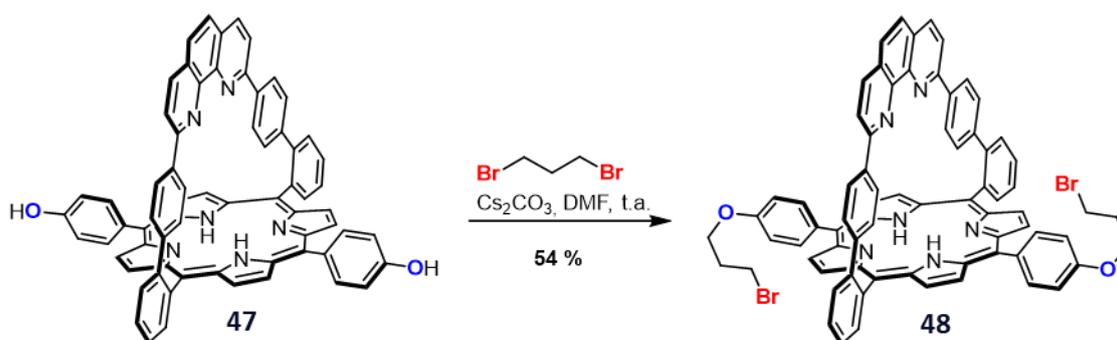


Schéma 2.15. Synthèse de la porphyrine à anse **48**.

Inspirée d'une méthode de la littérature,⁶⁹ la porphyrine **48** a été fonctionnalisée avec des groupements pyridiniums en chauffant la molécule **48** à reflux dans la pyridine (**Schéma 2.16**). Après une purification par colonne chromatographique, suivie d'une métathèse anionique, le sel porphyrinique **31** d'hexafluorophosphate a été isolé avec un rendement de 84 %.

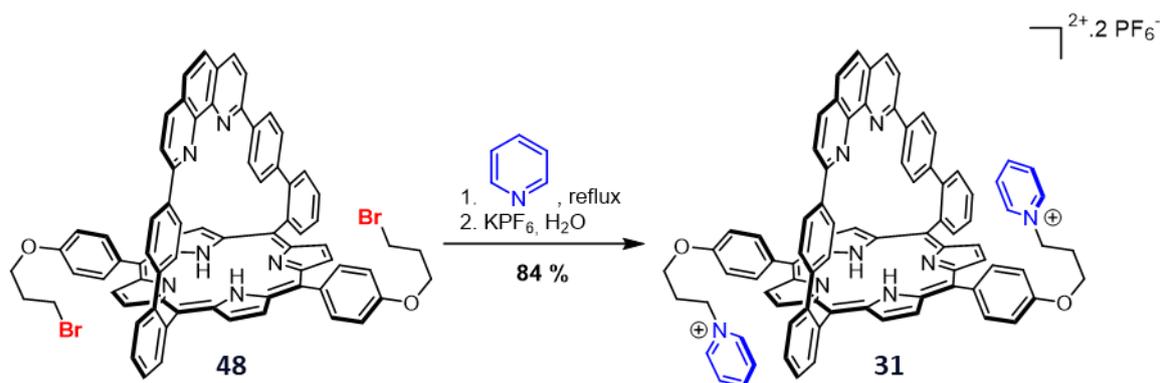


Schéma 2.16. Synthèse de la porphyrine base libre finale **31**.

Le spectre RMN ^1H de la porphyrine **31** dans acétone- d^6 (**Figure 2.5**) montre trois signaux dans la région des aromatiques correspondant aux deux unités de pyridinium (H_{20} - H_{22}). On y retrouve aussi les signaux de l'anse phénanthroline (H_3 - H_{14}), ainsi que ceux de la porphyrine, avec deux doublets associés aux protons β -pyrroliques dans la région aromatique et un singulet blindé, correspondant aux protons NH du noyau de la porphyrine. La structure de la porphyrine **31** a par ailleurs été confirmée par spectrométrie de masse, tandis que la présence des contre-ions hexafluorophosphates a été confirmée par RMN ^{18}F et ^{31}P .

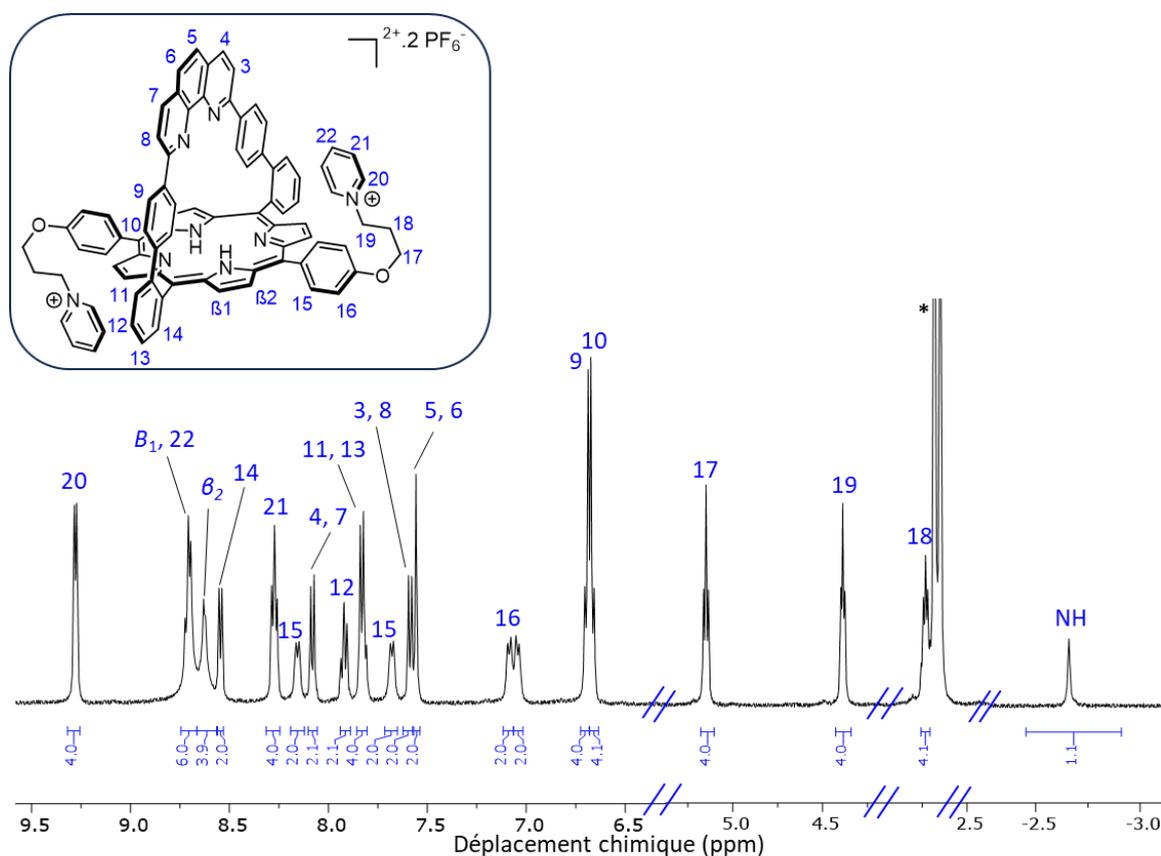


Figure 2.5. Spectre RMN ^1H 500 MHz de la porphyrine **31** dans l'acétone- d^6 à 25 °C (* : solvant).

Des cristaux ont aussi été obtenus par diffusion de vapeur du chlorobenzène dans l'acétone. La structure de la porphyrine **31** a ainsi pu être résolue par cristallographie aux rayons X au service d'analyse par Dr. N. Gruber (**Figure 2.6**). Le macrocycle tétrapyrrolique semble être légèrement ondulé, tandis que l'anse phénanthroline rigide ne semble subir aucune déformation. L'anse est légèrement inclinée par rapport au plan de la porphyrine, avec un angle dièdre de 80°. Néanmoins, aucune dissymétrie n'a été observée en spectroscopie RMN, indiquant qu'en solution l'anse est en mouvement. Ces caractéristiques sont communes à tous les dérivés de la porphyrine anse phénanthroline **28**.^{88,92}

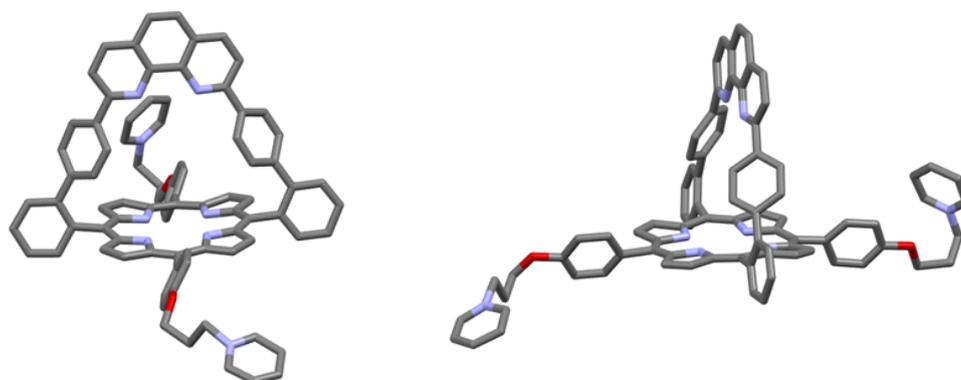


Figure 2.6. Structure aux rayons X de la porphyrine à anse base libre **31**, pour plus de clarté les anions PF_6^- et les molécules de solvants sont omis.

D'un point de vue structurel, la porphyrine **31** se différencie de ces précédents analogues de par ces substituants phénoxypropyle pyridiniums. La plus grande distance mesurée entre les extrémités de chaque substituant à l'état solide est d'environ 11,1 Å. Cette longueur laisse largement la place aux Me-O- β -CD d'inclure les substituants phénoxypropyle pyridiniums. Bien que cette structure apporte quelques informations sur la porphyrine, sa faible résolution ne permet pas de l'utiliser pour une future publication. Les structures des porphyrines **46** et **48**, de meilleure résolution, mais non présentées dans ce manuscrit, pourront être utilisées à cet effet.

Avant d'être assemblée avec le dimère de Me-O- β -CD **22**, la porphyrine base libre **31** a été métallée avec du chlorure de fer(II) dans des conditions classiques (**Schéma 2.17**).⁹³ La 2,6-lutidine a été utilisée comme base encombrée afin de piéger les atomes d'hydrogène de la porphyrine, sans coordonner le fer. Après conversion totale, la réaction est ouverte à l'air libre afin d'oxyder la porphyrine de fer. Après un traitement à l'acide chlorhydrique, suivi d'une

filtration sur alumine, la porphyrine de fer Fe^{III} -**31** associée à des contre-ions chlorure a été isolée avec un rendement de 82 %.

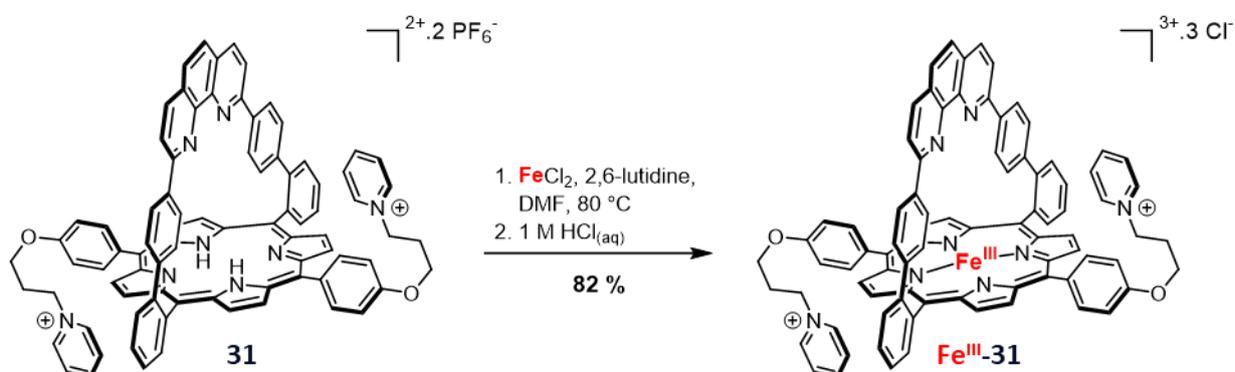


Schéma 2.17. Synthèse de la porphyrine de fer finale Fe^{III} -**31**.

La porphyrine de fer Fe^{III} -**31** étant paramagnétique, elle a uniquement été caractérisée par spectroscopie UV-visible et spectroscopie de masse. Par ailleurs, les contre-ions chlorure changent la solubilité du sel porphyrinique. Alors qu'avec des contre-ions hexafluorophosphate la porphyrine base libre **31** était soluble dans des solvants aprotiques polaires (acétone, acétonitrile, DMF), la porphyrine de fer Fe^{III} -**31** avec des ions chlorure est soluble dans des solvants aprotiques et protiques polaires (éthanol, DMF, méthanol). La porphyrine Fe^{III} -**31** n'est cependant toujours pas soluble dans l'eau. Les études d'association avec le dimère de Me-O- β -CD **22**, décrites dans le prochain chapitre permettront de voir si le complexe d'inclusion résultant est soluble dans l'eau.

IV. Elaboration de porphyrines à anse bipyridine

Dans ce dernier projet, nous avons souhaité étudier l'impact structural d'un changement d'environnement distal sur la porphyrine à anse phénanthroline **28**. Dans cette optique, l'anse phénanthroline rigide a été remplacée par une anse bipyridine un peu plus souple. Le développement de cette nouvelle anse bipyridine a permis d'explorer la synthèse des deux nouvelles porphyrines à anse bipyridine **32** et **49** (Figure 2.24).⁹⁴ Par ailleurs, afin d'étudier l'impact de ce changement de ligand distal sur les propriétés du modèle de cytochrome c oxydase associé, une nouvelle porphyrine fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -**32** a aussi été préparée (Figure 2.7).

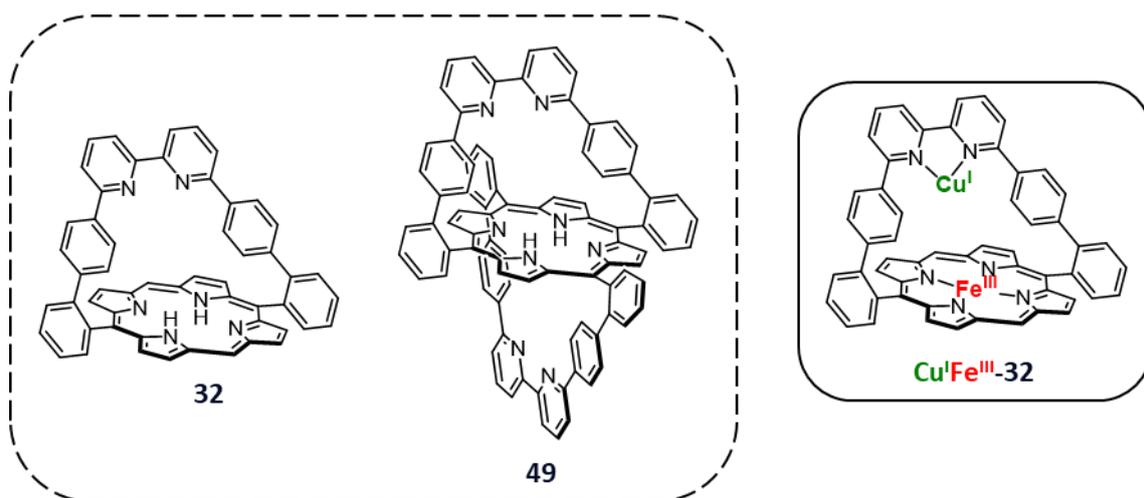


Figure 2.7. Structure moléculaire des porphyrines à anse bipyridine **32**, **49** et de la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32**.

Cette partie s'articule donc autour de la synthèse des nouvelles porphyrines à anse **32** et **49**. De la même manière que précédemment, la synthèse des ligands porphyriniques sera suivie de la synthèse du complexe de fer **Fe^{III}-32**. D'un autre côté, l'insertion du cuivre, permettant de former le modèle **Cu^IFe^{III}-32**, sera décrite dans le chapitre suivant.

IV.1. Synthèse d'une nouvelle porphyrine anse bipyridine

La synthèse de porphyrine à anse bipyridine **32** a été effectuée en suivant une stratégie convergente similaire à celle développée par notre laboratoire pour l'obtention de la porphyrine **28** (Schéma 2.18).⁷⁵ Avant de former le macrocycle porphyrinique, les deux synthons **41** et **50** ont dû être synthétisés. De la même façon que précédemment, le dipyrrométhane **41** a été synthétisé en deux étapes, comme décrit dans la littérature.⁸⁶ La synthèse de la nouvelle anse bipyridine est quant à elle décrite ci-après. Deux autres étudiants ont par ailleurs fortement contribué au développement de la nouvelle porphyrine **32** et de l'anse **50** associée : le Dr. Y. Kagawa et A. Riquet, un stagiaire de Master 1.

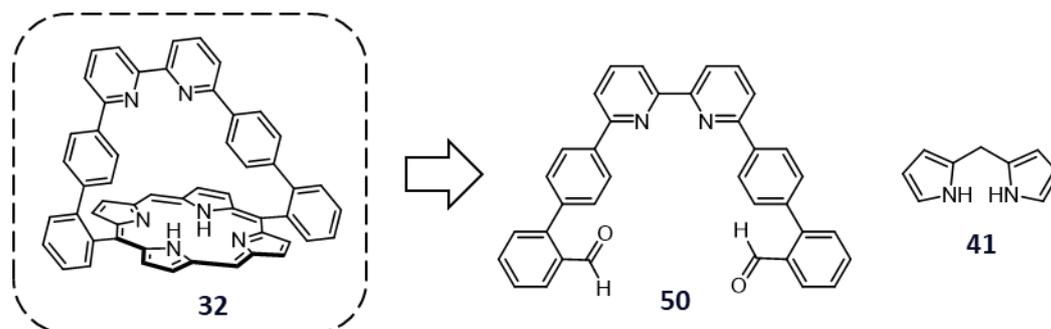


Schéma 2.18. Rétrosynthèse de la porphyrine à anse bipyridine **31**.

IV.1.1. Synthèse d'une anse bipyridine

Le Dr. Y. Kagawa et A. Riquet ont exploré différentes stratégies afin d'obtenir l'anse bipyridine **50** en trois étapes (**Schéma 2.19**). Les deux premières étapes de synthèse ont été effectuées comme décrit dans la littérature.⁹⁵ Un couplage de Suzuki a tout d'abord été effectué entre l'acide boronique **51** et le 1,4-dibromobenzène en excès, afin d'obtenir le biaryl **52** avec 71 % de rendement. Une réaction de Miyaura a ensuite été réalisée afin de fonctionnaliser le biaryl **52** avec un ester boronique. Le composé **53** a été isolé avec un rendement de 84 % après purification.

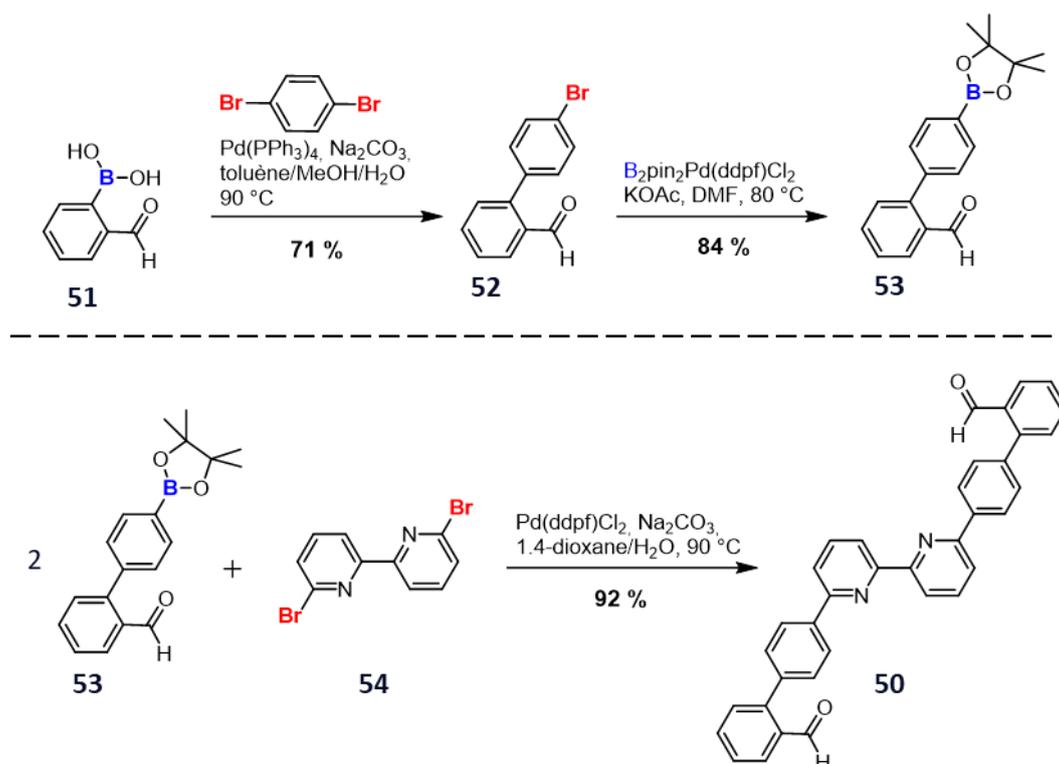


Schéma 2.19. Synthèse de l'anse bipyridine **50**.

Dans une dernière étape, le composé **53** a été engagé avec la 6,6'-dibromo-2,2'-bipyridine **54** dans un couplage de Suzuki pallado-catalysé dans des conditions classiques. Après colonne chromatographique et recristallisation ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}$), l'anse dialdéhyde **50** a été isolée avec un rendement de 92 %. La structure de cette bipyridine **50** a été résolue par cristallographie aux rayons X par C. Bailly au service de radiocristallographie de la Fédération Le Bel (**Figure 2.8**). À l'état solide, la bipyridine **50** adopte une conformation *anti*. Cette orientation, contrairement à l'anse phénathroline déjà préorganisée, défavorisera sûrement la formation du macrocycle porphyrinique dans la réaction de condensation finale.

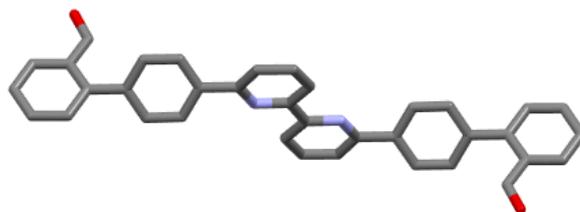


Figure 2.8. Structure aux rayons X de l'anse bipyridine **50**.

IV.1.2. Synthèse à effet de matrice

Bien qu'à l'état solide ou dans les solvants organiques, les dérivés de 2,2'-bipyridine adoptent une conformation *anti*,⁹⁶ lorsqu'elles sont en milieu assez acide pour être protonées ($pK_a = 4,34$ dans l'eau),⁹⁷ elles adoptent une conformation *syn*.⁹⁸ Dans notre cas, l'anse bipyridine **50** adopte aussi une conformation *anti* à l'état solide. Cependant, le milieu fortement acide utilisé dans la synthèse des porphyrines pourrait favoriser la conformation *syn* nécessaire à la cyclisation. L'utilisation d'un cation métallique coordonné à la bipyridine pourrait aussi, en vue de la condensation pour former la porphyrine **32**, préorganiser l'anse *via* un effet de matrice.

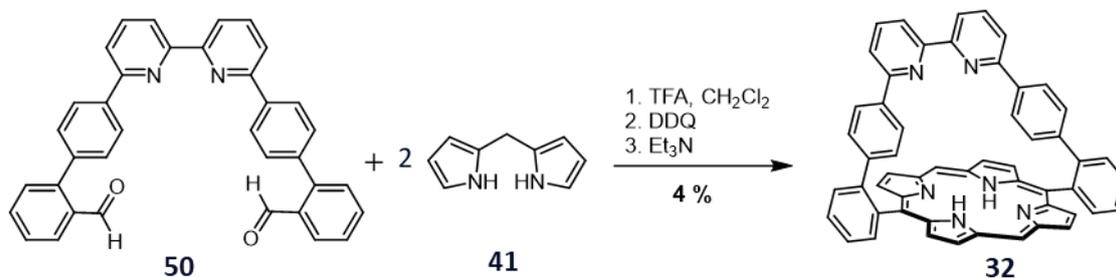


Schéma 2.20. Synthèse de la porphyrine à anse bipyridine **32**.

Le Dr. Kagawa et A. Riquet ont tout d'abord tenté de former la porphyrine à anse bipyridine **32** dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la formation de la porphyrine à anse phénanthroline **28** (**Schéma 2.20**).⁷⁵ La réaction de condensation entre le dialdéhyde **50** et deux équivalents de dipyrrométhane **41** a donc été effectuée en conditions diluées (10^{-4} M) en présence d'un excès d'acide trifluoroacétique (TFA). Après l'oxydation du macrocycle avec de la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), un traitement basique, une purification par colonne chromatographique suivie d'une recristallisation, la porphyrine à anse bipyridine **32** a pu être isolée avec un rendement de 4 %. Les conditions

acides utilisées dans cette réaction ne semblent donc pas être suffisantes pour préorganiser correctement l'anse bipyridine **50**.

La synthèse à effet de matrice a ensuite été explorée avec différents métaux par le Dr. Kagawa et moi-même (**Schéma 2.21**). L'utilisation d'un cation lithium monovalent, connu pour se lier faiblement aux 2,2'-bipyridines,⁹⁹ a tout d'abord été testée comme matrice métallique. Cependant, l'ajout de cinq équivalents d'acétate de lithium n'a permis d'isoler la porphyrine à anse **32** qu'avec un rendement de 9 %. L'utilisation d'un sel cuivreux, connu pour sa tendance à former des complexes de bis-bipyridine entrelacés,¹⁰⁰ a ensuite été envisagée, dans l'espoir de former, en plus de la porphyrine **32**, un caténane bis-porphyrinique. Pour cela, 0,5 équivalents de tétrakis(acétonitrile)cuivreux ont été ajoutés dans la réaction. Après un traitement supplémentaire à l'EDTA et au KCN, permettant d'éliminer l'ion cuivreux Cu^I , l'analyse par spectrométrie de masse du produit brut a montré des traces de caténane **32/32** ainsi que des pics plus intenses de porphyrine **32** et un pseudo-rotaxane **32/50**. Le mélange étant trop complexe, les essais de purification n'ont néanmoins pas permis d'isoler un de ces trois produits.

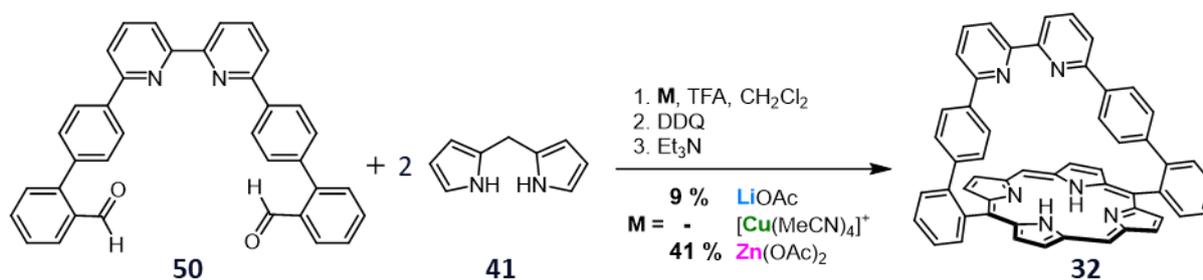


Schéma 2.21. Synthèse de la porphyrine à anse bipyridine **32** via différents effet matrice.

Par la suite, toujours dans le but de préorganiser l'anse **50**, le zinc(II), étant capable de former des complexes 1:1 zinc(II)-bipyridine stables,¹⁰¹ a été choisi comme matrice. De plus, même si ce cation est capable de se lier au macrocycle porphyrinique, son élimination facile, en condition acide, a renforcé ce choix. Un équivalent d'acétate de zinc(II) dihydrate $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a ainsi permis d'augmenter de plus de dix fois le rendement initial obtenu sans effet de matrice. Après optimisation, la porphyrine **32** a pu être isolée après une simple colonne chromatographique avec un rendement de 48 %. En plus de la préorganisation de la bipyridine, ce rendement est, comme pour la porphyrine à anse **28**, particulièrement élevé

surement à cause de la faible solubilité du porphyrinogène. Par ailleurs, aucune porphyrine de zinc n'a été détectée, probablement à cause de l'acidité du milieu réactionnel.

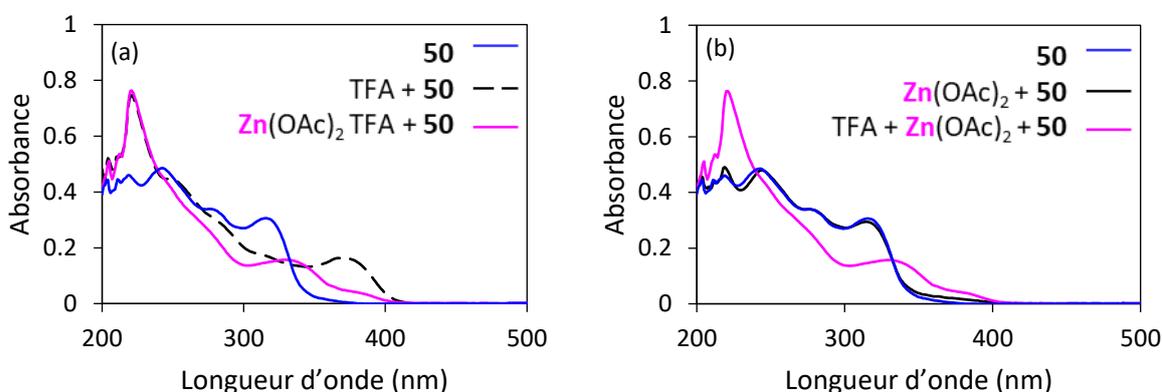


Figure 2.9. Spectres UV-visible de l'anse bipyridine **50** (0,1 mM) (a) après l'addition successive d'un excès de TFA (10 µL), et d'un équivalent d'acétate de zinc(II) ou (b) après l'addition successive d'un équivalent d'acétate de zinc(II) et d'un excès de TFA (10 µL).

La liaison zinc-anse bipyridine Zn^{II} -**50** a par ailleurs été mise en évidence en spectroscopie UV-visible. Lors de l'ajout d'un équivalent de $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ dans une solution diluée d'anse **50** (0,1 mM) en présence d'un excès de TFA, des changements spectraux dans la région UV ont pu être observés (**Figure 2.9 a**). En revanche, lors de l'ajout d'un équivalent $Zn(OAc)_2$ dans une solution d'anse **50** sans excès d'acide, aucun changement spectral n'a été observé (courbe noire, **Figure 2.9 b**). L'ajout ultérieur d'un excès d'acide permet néanmoins de retrouver les bandes observées dans la première expérience (courbe rose, **Figure 2.9 b**). Ainsi, le TFA en protonant les ligands acétate, base légèrement plus forte que la bipyridine ($pK_a = 4,76$ dans l'eau),¹⁰² générerait un complexe trifluoroacétate de zinc(II), avec des ions trifluoroacétate moins basiques ($pK_a = 0,4$ dans l'eau), et donc plus faiblement coordonnés au zinc. Le cation zinc deviendrait ainsi plus disponible, pour se coordonner à la bipyridine de l'anse **50**.

Par ailleurs, la structure de la porphyrine **32** a été confirmée par RMN 1H et spectroscopie de masse. Son spectre RMN 1H dans $CDCl_3$ (**Figure 2.10**) présente un jeu de signaux associé à l'anse bipyridine (H_3 - H_{11}) et un autre correspondant à l'anneau a porphyrinique, avec deux doublets caractéristiques des protons pyrroliques et un singulet associé aux deux protons NH. Une symétrie C_2 est observée en solution, avec un axe perpendiculaire au plan de la porphyrine passant par la liaison 2,2' entre les pyridines.

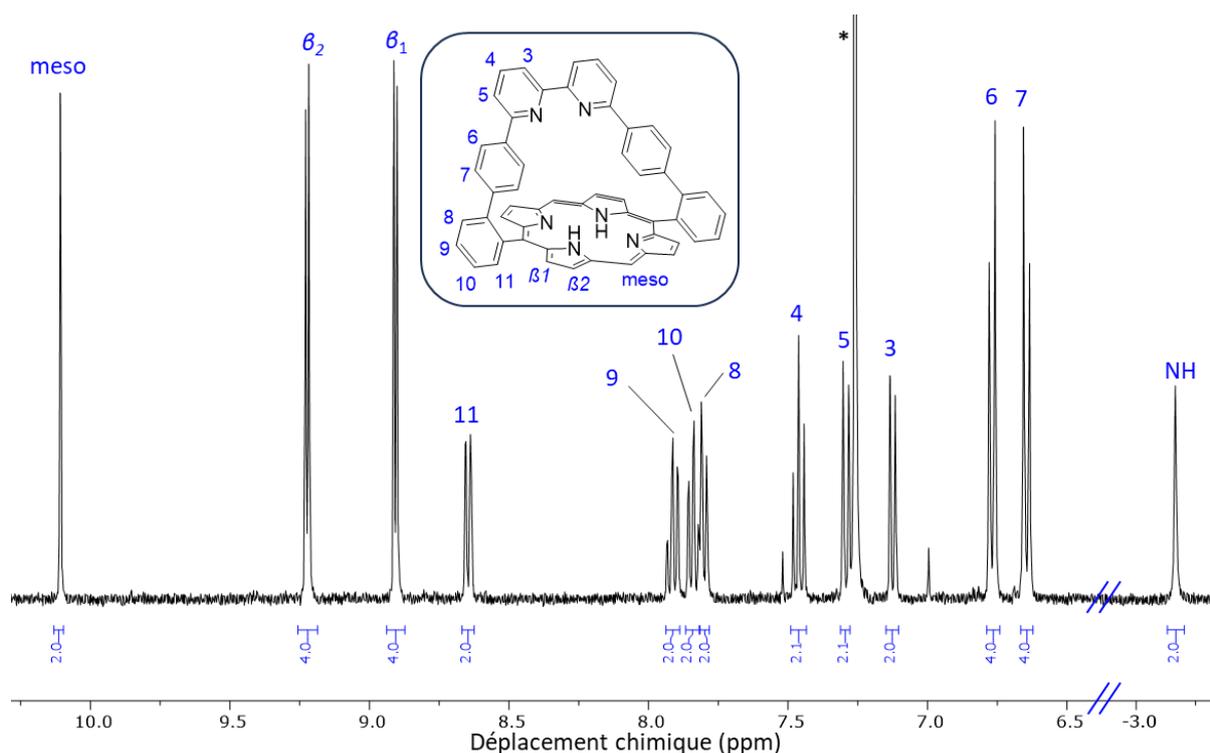


Figure 2.10. Spectre RMN ^1H 500 MHz de la porphyrine **32** dans CDCl_3 à 25 °C (* : solvant).

Des cristaux de la porphyrine **32** ont, par ailleurs, été obtenus par diffusion de vapeur du cyclohexane dans le dichlorométhane. La structure a été résolue par Dr. C. Bailly. En comparaison avec les dérivés de la porphyrine à anse phénanthroline **28**, la plus grande différence structurelle observée se trouve au niveau de l'anse (**Figure 2.11**).



Figure 2.11. Structure aux rayons X de la porphyrine à anse bipyridine base libre **32**, pour plus de clarté les molécules de solvants sont omises.

Contrairement à l'anse phénanthroline de la porphyrine **28**, la bipyridine de la porphyrine **32** n'est plus plane à l'état solide, avec une rotation de 31° d'une pyridine par rapport à l'autre. De plus, le plan moyen entre les deux unités pyridines est perpendiculaire au plan de l'anneau porphyrinique. Ainsi, en opposition aux dérivés de la porphyrine à anse phénanthroline **28**, le même axe de symétrie C_2 qu'en RMN ^1H peut être observé dans la structure cristallographique de la porphyrine **32**. Dans cette structure, pour s'adapter aux

contraintes induites par l'anse, le macrocycle porphyrine adopte une conformation en selle de cheval accompagné d'un léger ruffling.

IV.2. Synthèse d'une nouvelle porphyrine à double anse bipyridine

Il y a plusieurs années, la synthèse d'une porphyrine à double anse phénanthroline avait été tentée, mais sans succès, probablement à cause de la rigidité de l'anse phénanthroline. Ainsi, la plus grande souplesse de l'anse bipyridine **50** nous a incités à de nouveau explorer la synthèse d'une porphyrine à double anse **49**.

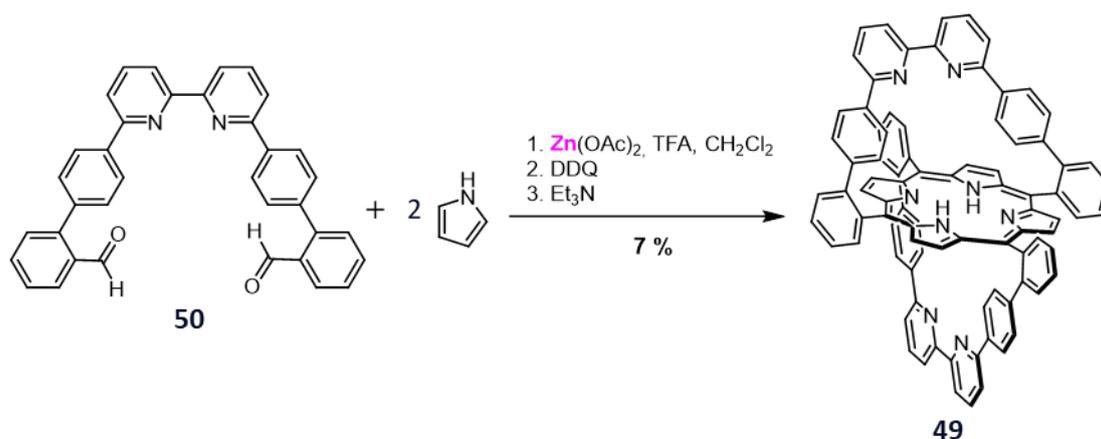


Schéma 2.22. Synthèse de la porphyrine à double anse bipyridine **49**.

Une réaction de condensation entre l'anse bipyridine **50** et deux équivalents de pyrrole a donc été effectuée en présence d'un équivalent de $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ et d'un excès de TFA dans des conditions diluées (10^{-4} M) (**Schéma 2.22**). Après purification par colonne chromatographique et recristallisation, la porphyrine **49** a pu être isolée avec un rendement de 7 %. Ainsi, le succès de cette réaction marque une nette différence entre l'anse bipyridine **50** et l'anse phénanthroline, plus rigide.

En spectrométrie RMN 1H dans le $CDCl_3$ (**Figure 2.12**) la différence la plus notable avec la porphyrine à anse **32** est la disparition des signaux correspondant aux positions méso. Par ailleurs, l'intégration des protons β -pyrroliques et de l'anse suggère une symétrie S_4 en solution avec un axe de symétrie perpendiculaire au plan de la porphyrine passant par la liaison 2,2' entre les pyridines. La spectrométrie de masse a apporté une confirmation supplémentaire de la formation de cette molécule **49**. De plus, des cristaux ont été obtenus par diffusion de vapeur du méthanol dans le dichlorométhane.

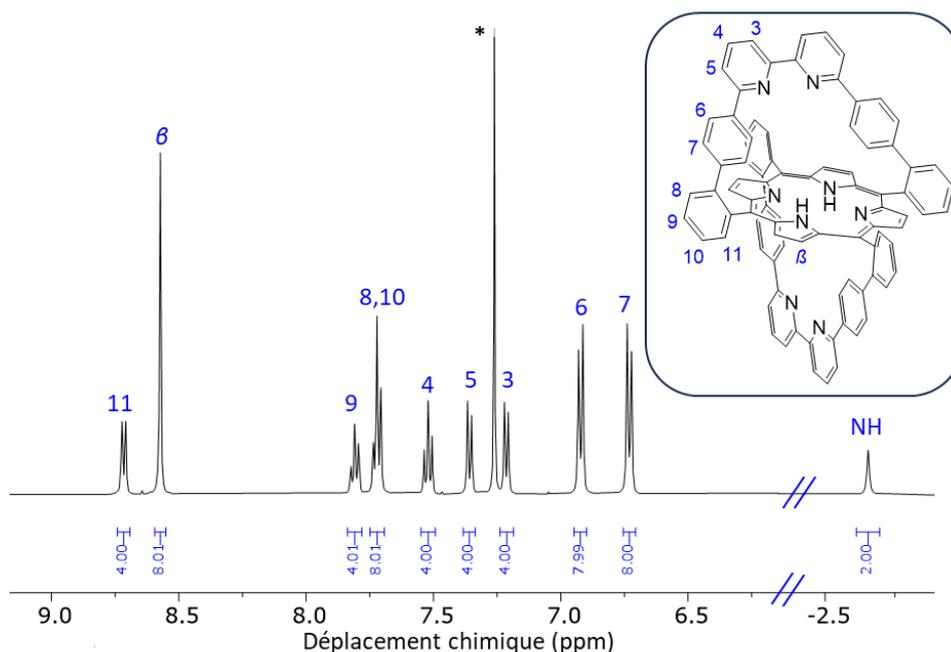


Figure 2.12. Spectre RMN ^1H 500 MHz de la porphyrine **31** dans CDCl_3 à 25 °C (* : solvant).

La structure aux rayons X, résolue par Dr. Bailly, a confirmé la connectivité des atomes au sein de l'édifice porphyrinique **49** (**Figure 2.13**). Les liaisons pyridine-pyridine présentent des angles de torsion respectivement de 25° et 47°. Les deux plans moyens passant par les unités de bipyridine sont perpendiculaires entre eux et perpendiculaires au plan de la porphyrine. Comme avec la porphyrine à anse bipyridine **32**, la symétrie S_4 observée en solution est conservée à l'état solide. Pour s'adapter aux contraintes générées par la fixation des deux anses, le macrocycle porphyrinique adopte une conformation ondulée, plus distordue que celle observée chez son analogue à simple anse **32**.

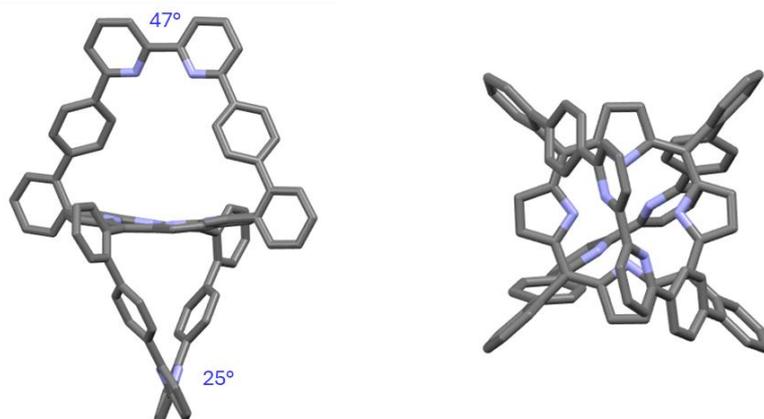


Figure 2.13. Structure aux rayons X de la porphyrine à double anse base libre **49**. Pour plus de clarté les molécules de solvants sont omises.

IV.3. Synthèse d'une porphyrine de fer à anse bipyridine

Afin d'étudier l'impact de ces changements conformationnels dans des réactions de réduction du dioxygène, le laboratoire a voulu synthétiser une porphyrine à anse bipyridine fer/cuivre **CuFe-32** comme modèle de cytochrome *c* oxydase. Dans cette optique, la porphyrine **32** a été métallée avec du chlorure ferreux FeCl_2 , en présence de 2,6-lutidine à 60 °C (**Schéma 2.23**).⁹³ En fin de réaction, le brut réactionnel est ouvert à l'air libre afin d'oxyder la porphyrine de fer. Après un traitement à l'acide chlorhydrique suivi d'une filtration sur alumine, la porphyrine de fer **Fe^{III}-32** associée à un ion chlorure a été isolée avec un rendement de 79 %.

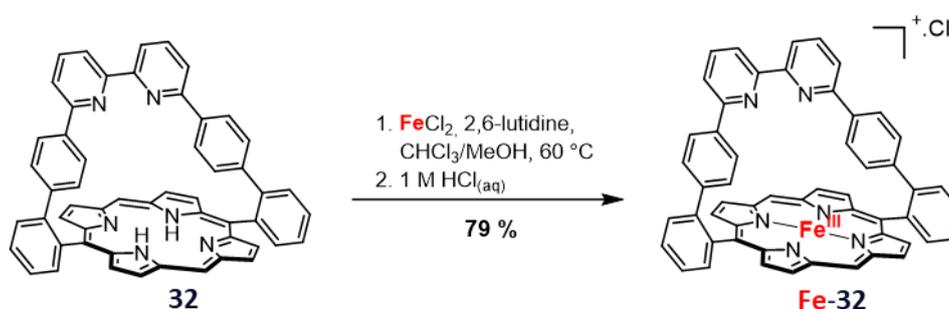


Schéma 2.23. Synthèse de la porphyrine de fer à anse bipyridine **Fe^{III}-32**.

La porphyrine de fer **Fe^{III}-32** étant paramagnétique, elle a uniquement été caractérisée par spectroscopie UV-visible et spectroscopie de masse. L'insertion du cuivre afin d'obtenir la molécule cible **CuFe^{III}-32** sera décrite dans le prochain chapitre.

V. Conclusion

Afin d'élaborer des modèles de cytochrome *c* oxydase solubles en milieu aqueux, deux dimères de Me-O- β -CD **22** et **30** ont tout d'abord été synthétisés par le groupe du Pr. H. Kitagishi et moi-même en respectivement six et huit étapes. Cependant, les difficultés de fonctionnalisation sélective des β -CD n'ont permis d'obtenir des rendements globaux que de 3 et 6 %. Par ailleurs, deux porphyrines de fer sont destinées à être auto-assemblées avec ces deux dimères : la porphyrine de fer **Fe^{III}-21**, disponible commercialement, et la porphyrine à anse phénanthroline **Fe^{III}-31**. Cette dernière porphyrine de fer a été synthétisée en 11 étapes avec un rendement global pouvant aller jusqu'à 11 %. Néanmoins, la porphyrine **Fe^{III}-31** n'est cependant pas soluble dans l'eau.

Toutes ces molécules sont les précurseurs de modèles de cytochrome c oxydase fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31** potentiellement hydrosolubles. La formation de ces complexes d'inclusion, l'insertion du cuivre dans ces assemblages supramoléculaires, ainsi que les caractérisations associées seront présentées dans le chapitre suivant.

Par ailleurs, deux nouvelles porphyrines à anse bipyridine **32** et **49** ont été préparées avec succès grâce à une matrice de zinc. La métallation de la porphyrine à anse **32** a ensuite permis d'obtenir la porphyrine **Fe^{III}-32** comme précurseur de modèle de cytochrome c oxydase fer/cuivre fonctionnel en milieu organique. Cette dernière porphyrine de fer a pu être isolée avec un rendement global de 18 %. De la même manière que pour les complexes précédant, la formation du complexe fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32** sera décrite dans le chapitre suivant.

⁷⁷ a) G. D. Dorough, J. R. Miller, and Frank M. Huennekens, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4315-4320. b) M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *6*, 138-163. c) R. Giovannetti, in *Macro To Nano Spectroscopy*, ed. J. Uddin, InTech, 2012, Ch. 6, doi: 10.5772/2503

⁷⁸ M. Gouterman, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139-1161.

⁷⁹ H. Dodziuk, *Introduction to Supramolecular Chemistry*, Springer: Dordrecht, 2007, Ch. 9. pp 165-272.

⁸⁰ L. X. Song, L. Bai, X. M. Xu, J. He, S. Z. Pan, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1276-1284.

⁸¹ A. Sarabia-Vallejo, M. D. M. Caja, A. I. Olives, M. A.; Martín, and J. C. Menéndez, *Pharmaceutics*, **2023**, *15*, 2345.

⁸² D. Rong, and V. T. D'Souza, *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 4275-4278.

⁸³ R. Breslow, A. W. Czarnik, M. Lauer, R. Leppkes, J. Winkler, and S. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1969-1979.

⁸⁴ a) L.-Y. Liao, X.-R. Kong, X.-F. Duan, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 777-782. b) A. P. Smith, J. S. Lamba and C. L. Fraser, *Org. Synth.* **2002**, *78*, 82. c) G. R. Newkome and D. K. Kohli, *Heterocycles*, **1981**, *15*, 739-742.

⁸⁵ N. R. Williams, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1970**, *25*, 109-179.

⁸⁶ a) P. S. Clezy and G. A. Smythe, *Aust. J. Chem.* **1969**, *22*, 239-249. b) C. Brukner, J. J. Posakony, C. K. Johnson, R. W. Boyle, B. R. James, and D. Dolphin, *J. Porphy. Phthalocyanines*, **1998**, *2*, 455-465.

⁸⁷ C. Dietrich-Buchecker, B. Colasson, M. Fujita, A. Hori, N. Geum, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, and J.-P. Sauvage *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5717-5725.

⁸⁸ F. Melin, *Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg* **2005**.

⁸⁹ P. Vorburger, *Thèse, Université de Strasbourg* **2012**.

⁹⁰ P. Dharam, F. Melin, C. Hirtz, J. A. Wytko, P. Ochsenbein, M. Bonin, K. Schenk, and J. Weiss, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3779-3787.

⁹¹ S. G. DiMagno, V. S.-Y. Lin, and M. J. Therien, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5983-5993.

⁹² J. Froideveaux, *Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg* **2005**.

⁹³ P. Weyermann, F. Diederich, J.-P. Gisselbrecht, C. Boudon, and M. Gross, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 571-598.

⁹⁴ M. Berthe, Y. Kagawa, A. Riquet, T. Hayashi, J. Weiss, and J. A. Wytko, *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 6718-6721.

⁹⁵ J. Fontana, C. Dong, C. Kiattisewee, V. P. Chavali, B. I. Tickman, J. M. Carothers, and J. G. Zalatan, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1618.

⁹⁶ P. E. Fielding, and R. J. W. Le Fevre, *J. Chem. Soc.* **1951**, 1811-1814.

⁹⁷ P. Krumholz, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3654-3656.

⁹⁸ S. T. Howard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10269-10274.

⁹⁹ a) J. Ghasemi, and M. Shamsipur, *J. Coord. Chem.* **1992**, *26*, 337-344. b) J. Ghasemi and M. Shamsipur, *J. Coord. Chem.* **1993**, *28*, 231-236. c) T. Madrakian, A. Afkhami, J. Ghasemi, and M. Shamsipur, *Polyhedron*, **1996**, *15*, 3647-3652.

¹⁰⁰ J. R. Price, J. K. Clegg, R. R. Fenton, L. F. Lindoy, J. C. McMurtrie, G. V. Meehan, A. Parkin, D. Perkins, and P. Turner, *Aust. J. Chem.* **2009**, *62*, 1014-1019.

¹⁰¹ E. E. Benson, A. L. Rheingold, and C. P. Kubiak, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1458-1464.

¹⁰² J. F. J. Dippy, S. R. C. Hughes, and A. Rozanski, *J. Chem. Soc.* **1959**, 2492-2498.

Chapitre 3. Formation et caractérisation des modèles de cytochrome c oxydase

TABLE DES MATIERES :

I.	Formation et caractérisation des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine de fer en milieu aqueux.....	74
I.1.	Complexe d'inclusion 30/ Fe^{III} -21	74
I.1.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse	74
I.1.2.	Spectroscopie RPE	76
I.1.3.	Etude UV-visible en fonction du pH.....	79
I.2.	Complexe d'inclusion 22/ Fe^{III} -31	80
I.2.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse	80
I.2.2.	Spectroscopie RPE	84
I.3.	Récapitulatif.....	85
II.	Formation et caractérisation des complexes d'inclusion fer/cuivre	86
II.1.	Complexe d'inclusion Cu^{II} -30/ Fe^{III} -21	86
II.1.1.	Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse	87
II.1.2.	Etude UV-visible en fonction du pH.....	91
II.1.3.	Spectroscopie RPE	93
II.2.	Complexe 22/ Cu^{I} Fe^{III} -31	96
II.3.	Complexe Cu^{I} Fe^{III} -32 soluble en milieu organique	102
III.	Conclusion	104

Dans le chapitre précédent, les deux dimères de Me-O- β -CD **22** et **30**, ainsi que la porphyrine de fer **Fe^{III}-31** avec des groupements polaires hydrophiles, ont été synthétisés. Ces composés sont des précurseurs des modèles de cytochrome *c* oxydase fer/cuivre potentiellement hydrosolubles **Cu^I-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31**. Par ailleurs, une deuxième porphyrine de fer **Fe^{III}-32** a été synthétisée comme précurseur de modèle de cytochrome *c* oxydase soluble en milieu organique. Ce chapitre est dédié à la formation et à la caractérisation des trois modèles de cytochrome *c* oxydase. La formation de tous ces complexes a été suivie par spectroscopie UV-visible, tandis qu'ils ont principalement été caractérisés par spectrométrie de masse et par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Une première partie sera exclusivement dédiée à la formation et la caractérisation des complexes d'inclusion **30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** en solution aqueuse, sans cuivre. Une seconde partie se focalisera sur l'insertion du cuivre dans les complexes **30/Fe^{III}-21**, **22/Fe^{III}-31** et **Fe^{III}-32**, ainsi qu'à la caractérisation des complexes **Cu^I-30/Fe^{III}-21**, **22/Cu^IFe^{III}-31** et **Cu^IFe^{III}-32** correspondants.

I. Formation et caractérisation des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine de fer en milieu aqueux

La spectroscopie UV-visible s'est révélée être une méthode de choix pour suivre la formation des complexes d'inclusion **30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** ainsi que pour quantifier l'importance des interactions dimère de Me-O- β -CD/porphyrine de fer. Afin de confirmer la formation de ces deux complexes d'inclusion et d'élucider leur structure, la spectrométrie de masse et la spectroscopie RPE ont aussi été utilisées.

I.1. Complexe d'inclusion 30/Fe^{III}-21

I.1.1. Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse

Le dosage de la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** (10 μ M), suivi par spectroscopie UV-visible, a été effectué en solution aqueuse avec des ajouts successifs d'une solution aqueuse de dimère de Me-O- β -CD **30** en allant de 0,1 à 2 équivalents (**Figure 3.1**). Le pH des deux solutions est fixé par l'utilisation d'un tampon phosphate (pH = 7). D'après la littérature, ces ions sont

trop volumineux pour se coordonner à la porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ associée à des Me-O- β -CD, il devrait donc en être de même pour nos composés.¹⁰³

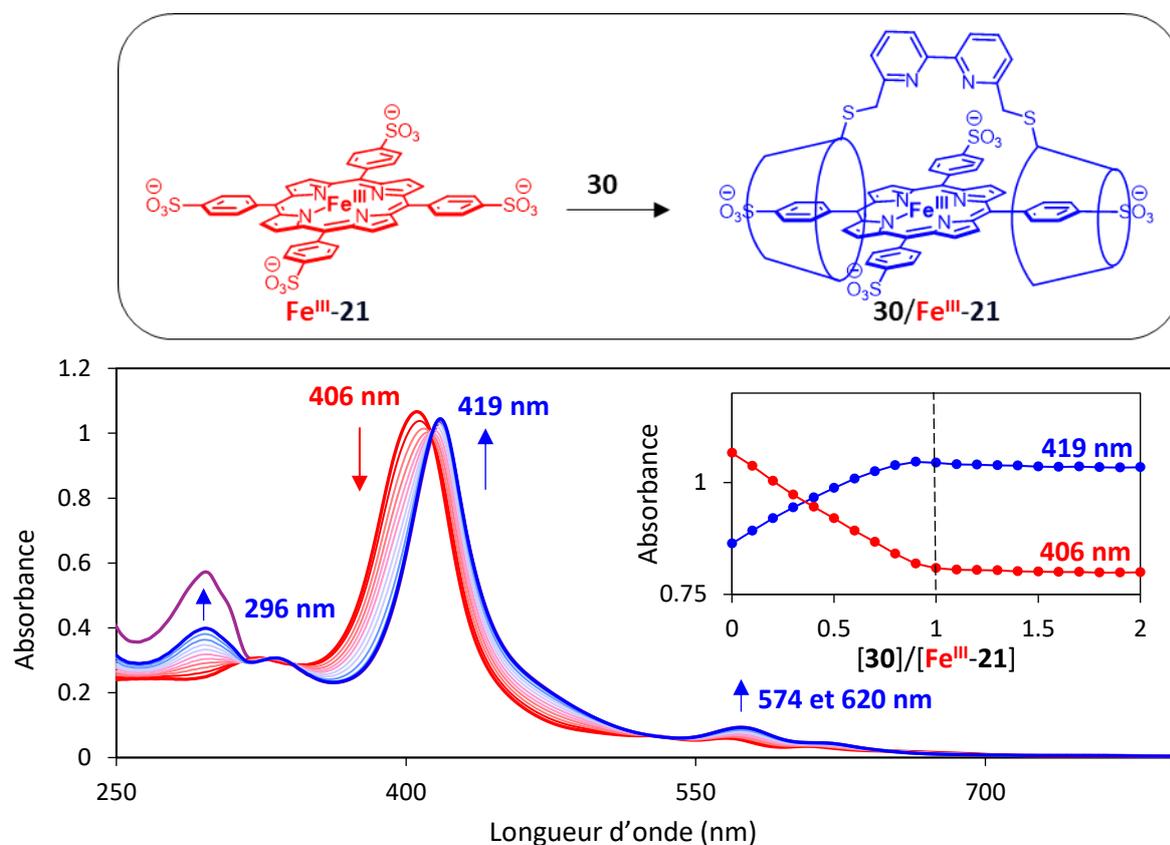


Figure 3.1. Dosage UV-visible de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ (10 μM) dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7, avec une solution de **30** dans un tampon de phosphate à pH = 7. L'encart montre les changements d'absorbance à 406 et 419 nm en fonction du rapport des concentrations de $[\text{30}]/[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}]$.

Le spectre initial correspondant à la porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ présente une bande de Soret à 406 nm et des bandes Q à 566 et 608 nm (courbe rouge en gras, **Figure 3.1**). L'addition du dimère de Me-O- β -CD **30** provoque le déplacement des bandes de la porphyrine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ vers le rouge ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande dans la région UV à 296 nm, correspondant à l'absorption de la bipyridine du dimère de Me-O- β -CD **30**. Après l'addition d'un équivalent de dimère de Me-O- β -CD **30**, les bandes de la porphyrine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ se stabilisent à 419, 574 et 620 nm respectivement (courbe bleue en gras, **Figure 3.1**). Plus aucun changement n'a été observé après l'équivalence, excepté dans le domaine UV où la bande associée au dimère de Me-O- β -CD **30** continue de croître (courbe violette pour 2 équivalents de dimère de Me-O- β -CD **30**, **Figure 3.1**). Le déplacement bathochrome des bandes de la porphyrine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ est cohérent avec les données décrites dans la littérature pour la formation du complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD à espaceur pyridine/porphyrine de fer **22/Fe^{III}**-

21 de stœchiométrie 1:1.^{66a} On notera également que les différents points isobestiques obtenus durant le titrage sont cohérents avec la formation d'une unique espèce **30/Fe^{III}-21**.

Les changements d'absorbance accompagnant la formation du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** peuvent être utilisés pour déterminer sa constante d'association. Selon une méthode décrite dans la littérature,¹⁰⁴ la constante d'association $K_{1:1}$ a été estimée comme étant supérieure à 10^7 M^{-1} dans l'eau tamponnée à pH 7. En effet, comme déjà décrit par le groupe de Pr. H. Kitagishi avec certains complexes d'inclusion Me-O- β -CD/porphyrine de fer,^{62b,66a} la constante d'association s'est révélée trop grande pour être calculée plus précisément, indiquant la formation d'un complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** très stable en solution aqueuse.

Le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** a ensuite été caractérisé par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI mode négatif). Pour cela, une solution du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** dans l'eau pure a été préparée en mélangeant des quantités équimolaires du dimère de Me-O- β -CD **30** à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21**.

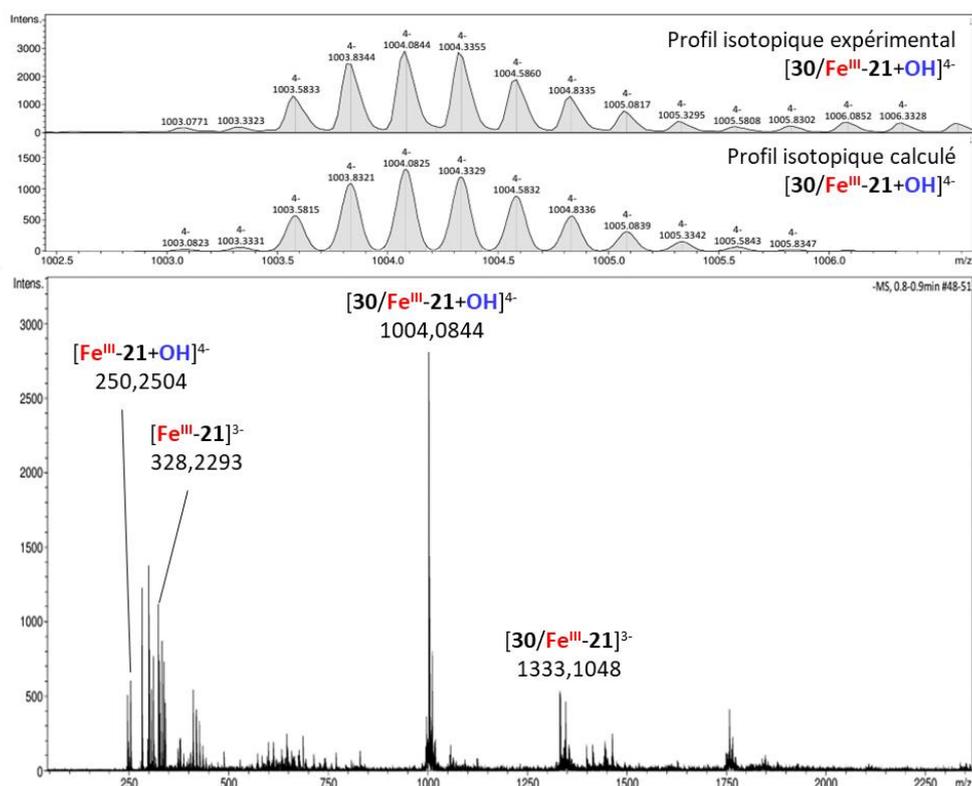


Figure 3.2. Spectre de masse ESI mode négatif et profil isotopique du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21**.

Le pic le plus intense à $m/4z = 1004,0844$ correspond au complexe d'inclusion 1:1 $[30/Fe^{III}-21+OH]^{4-}$ associé à un ion hydroxyde (**Figure 3.2**). Cet ion, sûrement coordonné à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21**, indique qu'en solution aqueuse, le site ferrique **Fe^{III}** de la porphyrine

est potentiellement pentacoordiné haut spin. Un second pic à $m/z = 1333,1048$ correspond aussi à la formation de l'assemblage $[30/\text{Fe}^{\text{III}}-21]^3-$ sans coordination en position axiale de la porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}-21$. Les autres pics correspondent à des dérivés de porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}-21$ libre ou à des espèces non identifiées.

Les études de spectroscopie UV-visible et de spectrométrie de masse indiquent la formation d'un complexe d'inclusion $30/\text{Fe}^{\text{III}}-21$ de stœchiométrie 1:1 très stable dans l'eau à pH 7. Cependant, la sphère de coordination du fer, et plus spécifiquement le ou les ligands axiaux qui sont coordonnés à ce site métallique, ne sont pas encore définis. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser la spectroscopie RPE.

I.1.2. Spectroscopie RPE

L'ion ferrique Fe^{III} comporte cinq électrons d dans sa couche valence, c'est un métal d^5 . Dans une porphyrine ferrique Fe^{III} , la nature et le nombre de ligands axiaux influencent la structure électronique du complexe. En fonction de ces ligands, la porphyrine ferrique Fe^{III} peut adopter trois principaux états de spin : l'état bas spin $S = 1/2$, l'état haut spin $S = 5/2$, ou encore l'état de spin intermédiaire $S = 3/2$ (**Figure 3.3**).¹⁰⁵

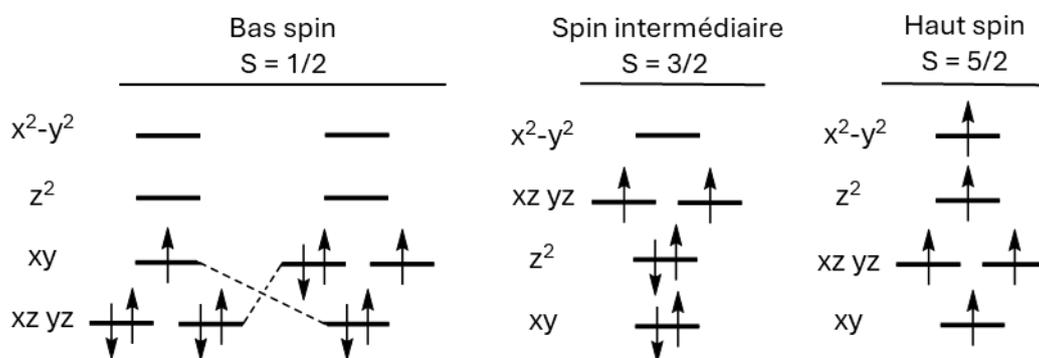


Figure 3.3. Configurations électroniques possibles des porphyrines ferriques Fe^{III} .

En général, les porphyrines ferriques Fe^{III} haut spin sont pentacoordinées avec un ligand axial de champ faible (chlorure, bromure...) tandis que les porphyrines ferriques Fe^{III} bas spin sont hexacoordinées avec deux ligands axiaux de champ fort (imidazole, pyridine...).^{105,106}

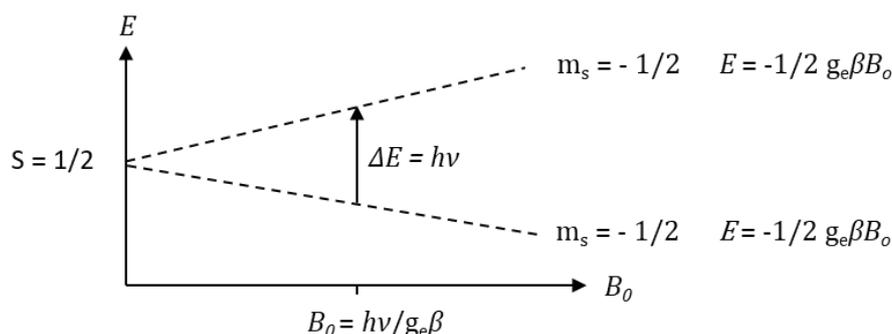


Figure 3.4. Niveau d'énergie E d'un spin $S = 1/2$ en fonction du champ magnétique B_0 .

Les porphyrines ferriques Fe^{III} , avec au moins un électron non apparié, peuvent donc être étudiées en RPE. Cette technique repose sur l'interaction du moment magnétique de l'électron μ avec un champ magnétique externe B_0 (effet Zeeman). Ainsi, lorsqu'un électron de spin $S = 1/2$ est soumis à un champ magnétique B_0 , une dégénérescence de son spin a lieu avec l'apparition de deux niveaux d'énergie E , ayant un nombre quantique magnétique de spin m_s de $-1/2$ pour le niveau de plus basse énergie, et de $+1/2$ pour celui de plus haute énergie (**Figure 3.4**). L'électron peut passer d'un niveau à l'autre en absorbant une radiation électromagnétique B_1 , dont l'énergie doit être exactement égale à la différence d'énergie ΔE entre ces deux niveaux. Cet événement est appelé la condition de résonance et est défini selon l'équation (éq. 3) :¹⁰⁷

$$\Delta E = h\nu = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g_e\beta B_0 \quad (\text{éq. 3})$$

Avec :

$h = 6,6256 \cdot 10^{-34}$ J.s, la constante de Planck.

ν la fréquence du spectromètre en Hz

g_e le facteur de Landé

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

B_0 le champ magnétique en T

Le principe de la RPE repose sur la détection de cette transition énergétique. Dans l'équation (éq. 3), le tenseur g , aussi appelé facteur de Landé, caractérise l'interaction électronique entre l'électron non apparié et le champ magnétique appliqué. Pour un électron "libre", le tenseur g , notée g_e est de 2,0023. Dans une molécule ou un complexe paramagnétique, cette valeur varie en fonction de l'environnement du ou des électrons célibataires. De plus, le facteur de g de nombreuses espèces paramagnétiques, comme les porphyrines ferriques Fe^{III} , est anisotrope, ce qui signifie qu'il dépend de l'orientation de ces

molécules par rapport au champ magnétique. Il se décompose en trois valeurs de g , g_x , g_y et g_z , suivant un système cartésien. Dans les systèmes anisotropiques, on distingue deux types de symétrie, la symétrie axiale, où $g_x = g_y \neq g_z$, et la symétrie rhombique, où $g_x \neq g_y \neq g_z$. A noter, que les valeurs g_x et g_y sont rassemblées dans le terme g_{\perp} , lorsqu'elles sont équivalentes, et la valeur g_z est alors dénommée $g_{//}$.

Ainsi, en fonction de ces valeurs, il est possible de déterminer l'état de spin d'une porphyrine ferrique Fe^{III} . Cet état de spin étant, directement lié à la théorie du champ des ligands, il est possible d'en déduire des informations sur la nature et le nombre de ligands axiaux coordonnées à une métalloporphyrine. Afin d'obtenir ces informations, le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** a donc été étudié en solution aqueuse gelée, par spectroscopie RPE (bande X, fréquence $\nu = 9,31$ GHz), avec l'aide du Dr. N. Le Breton.

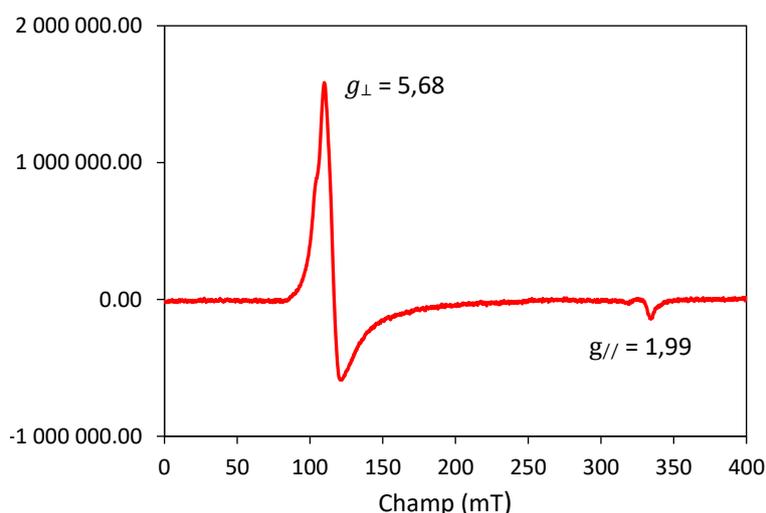


Figure 3.5. Spectre RPE de **30/Fe^{III}-21** (0,5 mM) à 25 K dans un tampon de phosphate (0,025 M) à pH 7.

Comme précédemment, le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** (0,5 mM) a été préparé en mélangeant des quantités équimolaires de la porphyrine **Fe^{III}-21** et du dimère de Me-O- β -CD **30** dans un tampon de phosphate (0,025 M) à pH 7. Le spectre du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** à 25 K montre une symétrie axiale avec des valeurs g effectives $g_{\perp} = 5,68$ et $g_{//} = 1,99$ (**Figure 3.5**). Ce spectre est caractéristique d'une porphyrine ferrique Fe^{III} haut spin $S = 5/2$ pentacoordinée avec un état fondamentale $(d_{xy})^1 (d_{xz}, d_{yz})^2 (d_{z^2})^1 (d_{x^2-y^2})^1$.^{106a} En solution aqueuse à pH 7, la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** semble donc être coordonnée à un ion hydroxyde, comme observé plus tôt en spectrométrie de masse. Dans le même esprit, l'équipe du Pr. H. Kitagishi a aussi montré que la porphyrine **Fe^{III}-21** associée

à des Me-O- β -CD est coordonnée, à pH 7, à un ion hydroxyde.¹⁰⁸ Les données concernant le complexe **30/Fe^{III}-21** sont donc cohérentes avec la littérature. Dans ses travaux, l'équipe du Pr. H. Kitagishi a par ailleurs montré qu'il existe un équilibre acido-basique entre la porphyrine pentacoordinée à un ion hydroxyde et la porphyrine hexacoordinée à deux molécules d'eau. Afin d'élucider cet équilibre avec le complexe **30/Fe^{III}-21**, un dosage pH métrique, suivi par spectroscopie UV-visible est décrit dans la partie qui suit.

I.1.3. Etude UV-visible en fonction du pH

Le dosage pH métrique du complexe **30/Fe^{III}-21** (10 μ M), suivi par spectroscopie UV-visible, a été réalisé dans un tampon de perchlorate de sodium (0,1 M) en allant de pH = 2 à pH = 12. Les ions perchlorates ont été choisis, car, en plus de permettre de travailler sur une large gamme de pH, étant volumineux, ils ont l'avantage de ne pas se coordiner à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** lorsqu'elle est associée à des Me-O- β -CD.¹⁰⁸ En début de dosage, le pH de la solution a été ajusté à 2 à l'aide d'une solution diluée d'acide perchlorique. En cours de dosage, le pH de la solution a été suivi à l'aide d'un pH-mètre et ajusté avec une solution aqueuse de soude jusqu'à pH 12.

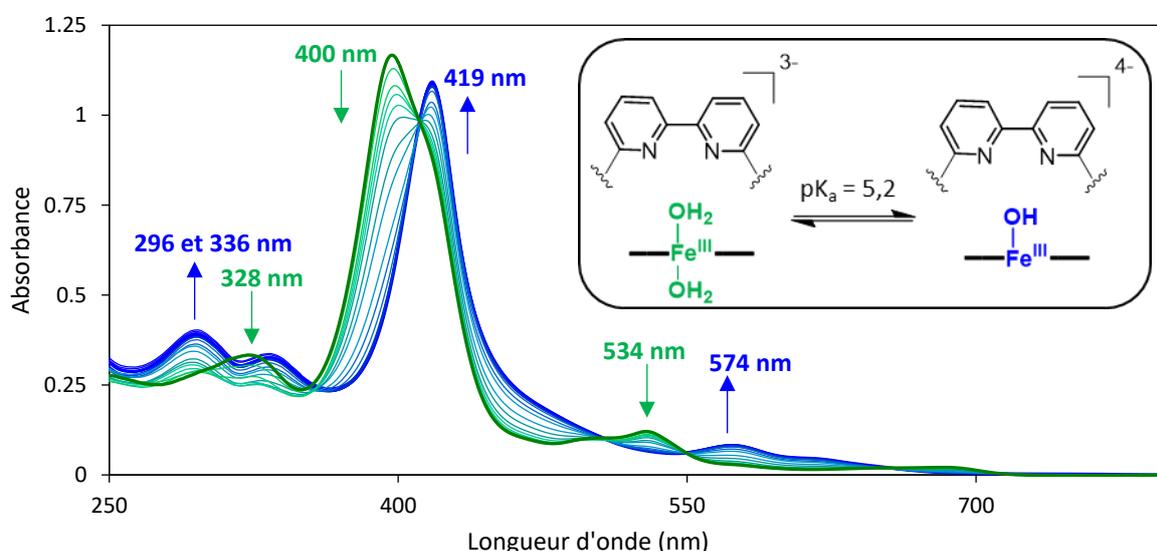


Figure 3.6. Suivi UV-visible du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** (10 μ M) dans une solution aqueuse tamponnée au perchlorate de sodium (0,1 M) en fonction de pH 2 à pH 12.

De la même manière que pour le complexe d'inclusion Me-O- β -CD/**Fe^{III}-21** étudié par le groupe de Pr. H. Kitagishi,¹⁰⁸ un équilibre entre deux espèces est observé en fonction du pH, avec un pK_a estimée à 5,2 (**Figure 3.6**). Au-dessus de pH = 5,2, le complexe **30/Fe^{III}-21**, présentant une bande de Soret à 419 nm, est pentacoordiné haut spin (courbes bleues, **Figure 3.6**). Ce dosage confirme donc que le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** coordonné à un ion

hydroxyde est l'espèce prédominante à pH 7. Toujours en se basant sur les résultats du groupe du Pr. H. Kitagishi,¹⁰⁸ l'espèce prédominante en dessous de pH = 5,2, ayant une bande de Soret à 400 nm, correspondrait au complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** bas spin coordonné à deux molécules d'eau (courbes vertes, **Figure 3.6**). De plus, en s'intéressant aux bandes de la bipyridine, on remarque qu'en milieu très acide, les bandes de la bipyridine à 296 et 336 nm observées à pH 7, se regroupent en une bande à 328 nm. Cette dernière bande correspondrait potentiellement à la bipyridine protonée. Le pK_a entre les formes protonée et déprotonée de la bipyridine dans l'assemblage **30/Fe^{III}-21** a été estimée à 2,7.

Le premier complexe de **30/Fe^{III}-21** étant maintenant complètement caractérisé, nous pouvons passer à la formation et à la caractérisation du second complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** en solution aqueuse.

I.2. Complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31**

I.2.1. Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse

La porphyrine **Fe^{III}-31** n'étant pas soluble dans l'eau, un premier dosage de la porphyrine de fer **Fe^{III}-31** (10 μM) a été réalisé dans une solution aqueuse contenant 25 % de méthanol. Le méthanol a été choisi plutôt qu'un autre solvant, car en tant que solvant protique, il déstabilise moins les interactions hydrophobes mises en jeu lors de la formation d'assemblage Me-O-β-CD/porphyrine que les solvants non protiques.¹⁰⁹ Par ailleurs, l'eau milli-Q, plutôt qu'un tampon de phosphate, a été choisie pour effectuer ce dosage, car la cinétique de formation de l'assemblage en milieu tamponné était de l'ordre de 30 min, contre 5 min dans un mélange méthanol/eau milli-Q. Par ailleurs, pour limiter les effets de solvant, la solution aqueuse du dimère de Me-O-β-CD **22** a aussi été préparée dans un mélange 1:3 méthanol/eau milli-Q. Avant de commencer le titrage, le pH des solutions aqueuses de porphyrine **Fe^{III}-31** et de dimère de Me-O-β-CD **22** a été ajusté à 7 à l'aide de solutions diluées de soude et d'acide chlorhydrique. La solution de dimère de Me-O-β-CD **22** a ensuite successivement été ajoutée à la première solution de porphyrine de fer **Fe^{III}-31** en allant de 0,1 à 5 équivalents (**Figure 3.7**). Après chaque ajout, le spectre correspondant a été enregistré après 10 min.

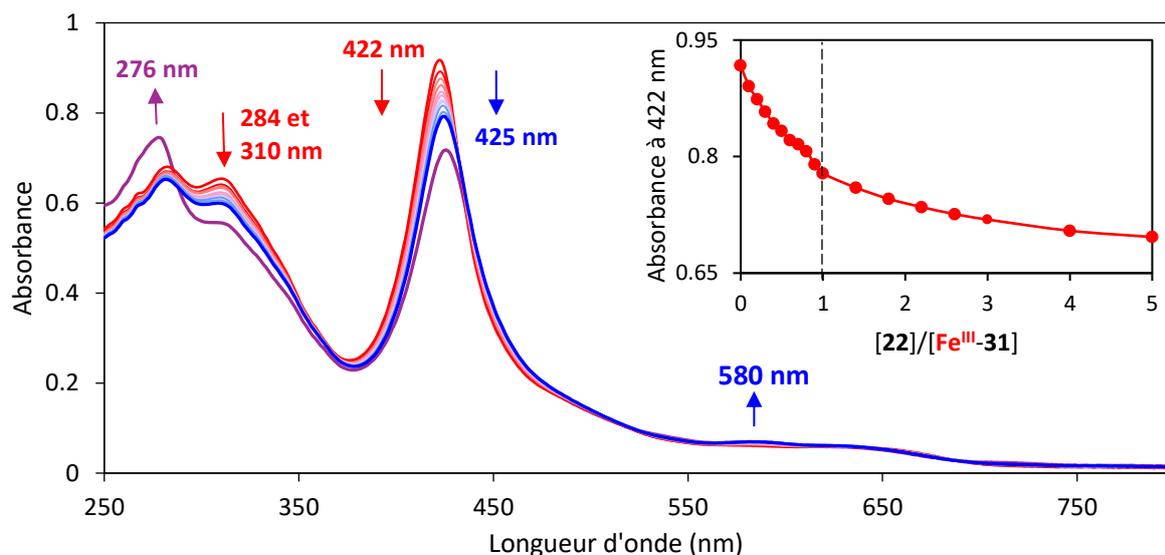
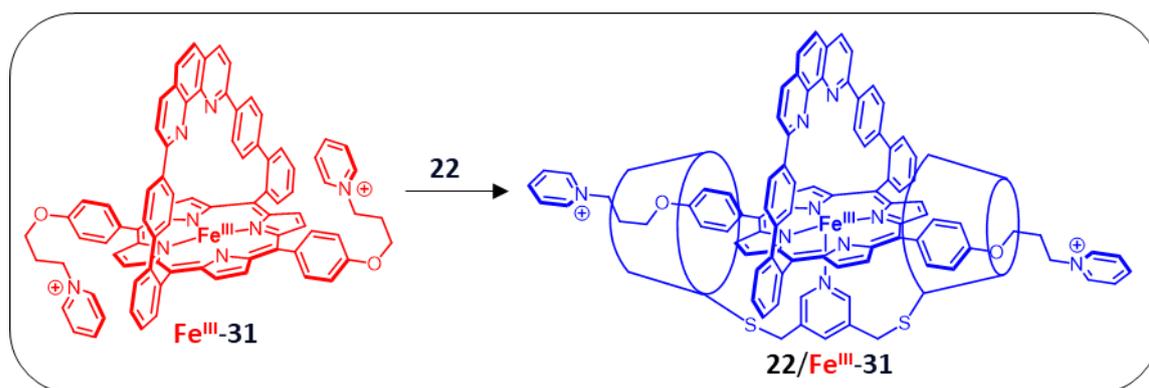


Figure 3.7. Dosage UV-visible de **Fe^{III}-31** (10 μ M) dans un mélange 1:3 méthanol/eau à pH = 7, avec une solution de **22** dans un mélange 1:3 méthanol/eau à pH = 7. L'encart montre les changements d'absorbance à 422 nm en fonction du rapport des concentrations de $[22]/[Fe^{III}-31]$.

Le spectre initial, correspondant à la porphyrine à anse **Fe^{III}-31**, présente une bande de Soret à 422 nm, une bandes Q à 580 nm et deux bandes à 284 et 310 nm attribuées à la phénanthroline (courbe rouge, **Figure 3.7**). L'ajout de la solution de dimère de Me-O- β -CD **22** provoque le déplacement bathochrome de la bande de Soret à 425 nm, accompagné d'un effet hypochrome plus marqué (courbe bleue, **Figure 3.7**). Les bandes de la phénanthroline à 284 et 310 nm subissent un effet hypochrome similaire. Après l'équivalence, une bande à 276 nm, correspondant à la pyridine du dimère de Me-O- β -CD **22** apparaît, tandis que la bande de Soret à 425 nm et la bande de la phénanthroline à 310 nm continue toujours d'évoluer selon un effet hypochrome (courbe violette pour 5 équivalents de dimère de Me-O- β -CD **22**, **Figure 3.7**). En s'appuyant sur les changements d'absorbance au niveau de la Soret, il semble compliqué de déterminer la stœchiométrie du complexe d'inclusion formé. En revanche, l'effet hyperchrome observé au niveau de la bande Q à 580 nm pourrait permettre de conclure sur la nature exacte de l'assemblage formé.

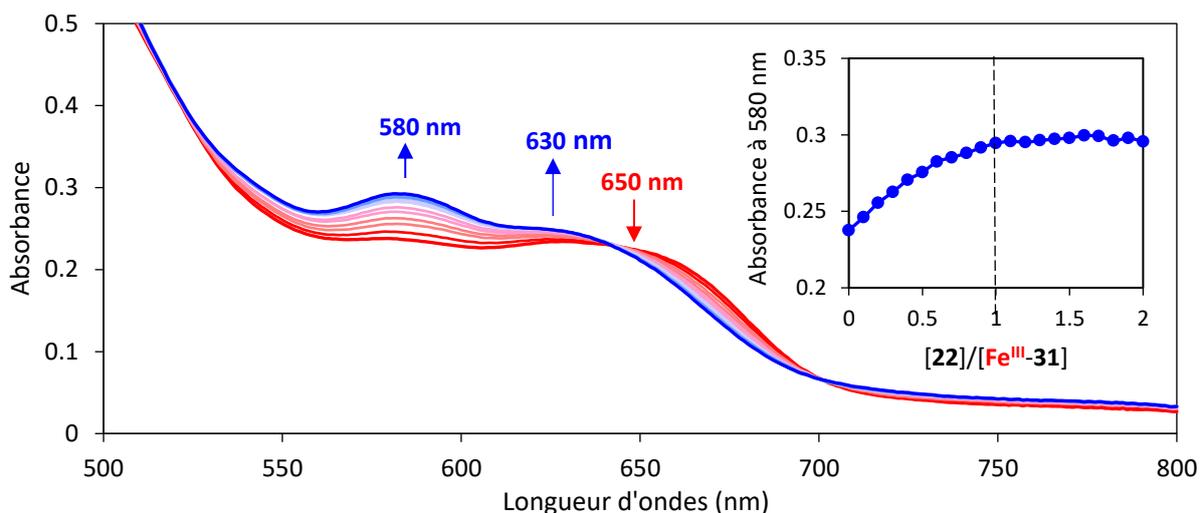


Figure 3.8. Dosage UV-visible de **Fe^{III}-31** (50 μ M) dans un mélange 1:2 méthanol/eau à pH = 7, avec une solution de **22** dans un mélange 1:2 méthanol/eau à pH = 7. L'encart montre les changements d'absorbance à 580 nm en fonction du rapport des concentrations de **[22]/[Fe^{III}-31]**.

En employant les mêmes précautions que pour le précédent titrage, un second dosage se focalisant sur la région des bandes Q a donc été effectué en milieu plus concentré (50 μ M) dans un mélange 1:2 méthanol/eau milli-Q. Grâce à ce dosage, il est possible de clairement distinguer deux bandes Q de la porphyrine **Fe^{III}-31** à 580 et 650 nm (courbe rouge, **Figure 3.8**). L'addition d'un équivalent de dimère de Me-O- β -CD entraîne un déplacement hypsochrome de la bande Q de 650 nm vers 630 nm accompagné d'un effet hypochrome, tandis que la bande Q à 580 nm subit uniquement un effet hyperchrome (courbe bleue, **Figure 3.8**). Après l'équivalence, plus aucun changement n'est observé au niveau des bandes Q, révélant la formation d'un complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** de stœchiométrie 1:1. Les deux points isobestiques à environ 640 et 700 nm sont en accord avec la formation d'une unique espèce **22/Fe^{III}-31**. D'après les données de ce dosage, la constante d'association $K_{1:1}$ a été estimée à $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dans un mélange 1:2 méthanol/eau milli-Q. Cette constante d'association est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le complexe d'inclusion dimère de Me-O- β -CD/porphyrine à anse **23/Fe^{III}-25** décrit par le Pr. H. Kitagishi et le Dr. B. Boitrel.⁶⁹

Le complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** a aussi été caractérisé par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI mode positif). Pour cela, une solution du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** dans un mélange 1:2 méthanol/eau milli-Q, a été préparée en mélangeant des quantités équimolaires du dimère de Me-O- β -CD **22** à la porphyrine de fer **Fe^{III}-31**. Le pic le plus intense à $m/z = 1402,2502$ confirme la formation d'un complexe d'inclusion **[22/Fe^{III}-31]³⁺** de stœchiométrie 1:1 en solution aqueuse (**Figure 3.9**). Les autres

pics correspondent à des dérivés de porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ libre, au dimère de Me-O- β -CD **22** libre ou à des espèces non identifiées.

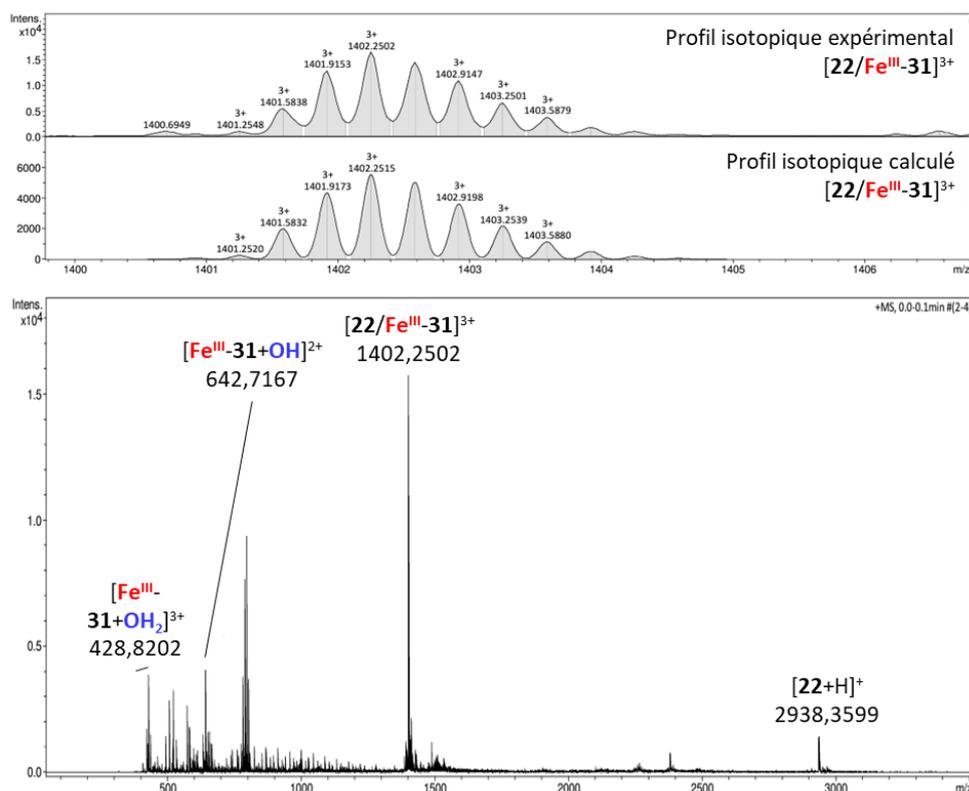


Figure 3.9. Spectre de masse ESI mode positif et profil isotopique du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31**.

Concernant la solubilité du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** dans l'eau, deux tests ont été effectués dans des solutions aqueuses tamponnées ou non contenant 33 % de méthanol avec 0,5 mM de complexe **22/Fe^{III}-31**. Pour s'assurer que toute la porphyrine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$, insoluble dans l'eau, soit encapsulée, 1,1 équivalent de dimère de Me-O- β -CD **22** ont été utilisés. Dans un mélange méthanol/eau milli-Q, après évaporation du méthanol, le complexe **22/Fe^{III}-31** reste soluble, alors que dans un mélange méthanol/tampon de phosphate (0,05 M à pH 7), après évaporation du méthanol, le complexe **22/Fe^{III}-31** précipite. Dans ce dernier cas, une métathèse entre les contre-ions chlorures, initialement associés au complexe **22/Fe^{III}-31**, et les ions phosphates de la solution tamponnée se produirait, modifiant en conséquence la solubilité du complexe **22/Fe^{III}-31** dans l'eau. L'utilisation d'autres tampons à pH 7 n'a pas été possible soit pour les mêmes raisons, soit à cause de leur interaction avec les Me-O- β -CD, avec lesquelles ils sont susceptibles de former des complexes hôte/invité.

En conclusion, le complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** de stœchiométrie 1:1 semble bien se former dans un mélange méthanol/eau, avec une constante d'association de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Afin d'éviter la précipitation du complexe **22/Fe^{III}-31** en milieu tamponné, dans les expériences de spectroscopie RPE, présentés ci-après, du méthanol ainsi qu'un léger excès de dimère de Me-O- β -CD **22** ont été ajoutés pour étudier le complexe **22/Fe^{III}-31** en milieu tamponné.

I.2.2. Spectroscopie RPE

Le complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** a été étudié par spectroscopie RPE (bande X, fréquence $\nu = 9,31$ GHz), avec l'assistance du Dr. Le Breton. L'échantillon du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** (0,4 mM) a été préparé en mélangeant 1 équivalent de la porphyrine **Fe^{III}-31** et 1,1 équivalent du dimère de Me-O- β -CD **22** dans un mélange 1:2 méthanol/tampon de phosphate (0,025 M) à pH 7.

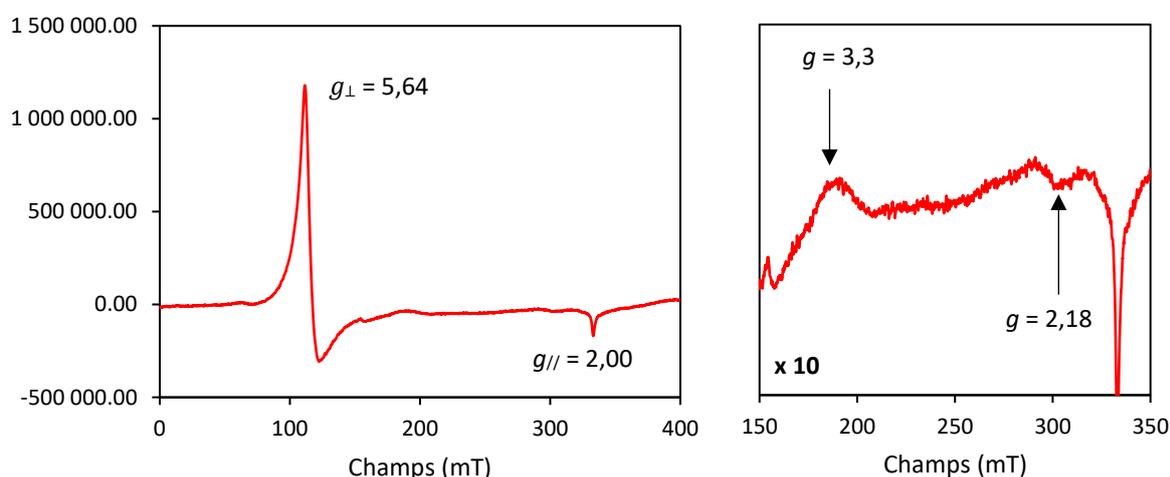


Figure 3.10. Spectre RPE de **22/Fe^{III}-31** (0,4 mM) à 6 K dans un mélange 1:2 méthanol/tampon de phosphate (0,025 M) à pH 7 (à gauche) et agrandissement entre 150 et 350 mT (à droite).

Le spectre du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** a été mesuré à 6 K, car le spectre à 25 K n'était pas assez résolu (**Figure 3.10**). Ce spectre montre une première espèce de symétrie axiale avec des valeurs g effective $g_{\perp} = 5,64$ et $g_{//} = 2,00$, caractéristique d'une porphyrine ferrique **Fe^{III}** haut spin $S = 5/2$ pentacoordiné avec un état fondamentale $(d_{xy})^1 (d_{xz}, d_{yz})^2 (d_z^2)^1 (d_{x^2-y^2})^1$.^{106a} Deux autres signaux moins bien définis, avec des valeurs de g à environ 3,30 et 2,18, sont attribués à un complexe ferrique **Fe^{III}** bas spin hexacoordiné avec un état fondamentale $(d_{xy})^2 (d_{xz}, d_{yz})^3$.¹⁰⁶ Les valeurs de g obtenue pour ces deux espèces sont cohérentes avec les valeurs obtenues dans de précédents travaux avec des dérivés de la porphyrine à anse phénanthroline **26** haut spin et bas spin, solubles en milieu organique.^{89,110}

En solution aqueuse tamponnée à pH 7 contenant 33 % de méthanol, un équilibre entre deux espèces existe vraisemblablement.

Il y a plusieurs années, D. Rousseau et ses collaborateurs ont étudié la sphère de coordination de la myoglobine *Aplysia* (lièvre des mers) ferrique Fe^{III} par spectroscopie Raman en milieux aqueux.¹¹¹ Dans ces travaux, les auteurs montrent qu'entre pH 6 et 7,5 l'hème est en équilibre entre une forme pentacoordinée haut spin et une forme hexacoordinée en équilibre de spin, haut spin/bas spin. L'espèce pentacoordinée a été attribuée à la coordination du résidu d'histidine proximal sur le site ferrique Fe^{III} tandis que l'espèce hexacoordinée a été attribuée à la coordination supplémentaire d'une molécule d'eau, connue pour favoriser la formation d'espèces de spins mélangés. De la même manière, la porphyrine Fe^{III} -**31** pourrait donc être pentacoordinée haut spin avec la pyridine du dimère de Me-O- β -CD **22** comme cinquième ligand, et/ou hexacoordiné en équilibre de spin avec une molécule d'eau comme sixième ligand. Dans tous les cas, la pyridine semble donc être coordonnée à la porphyrine de fer et joue donc bien son rôle de base axiale.

I.3. Récapitulatif

Le dimère de Me-O- β -CD **30** et la porphyrine de fer Fe^{III} -**21** s'auto-assemblent dans l'eau tamponnée à pH 7 avec une constante d'association $K_{1:1}$ supérieure à 10^7 M^{-1} , le complexe d'inclusion résultant **30/Fe^{III}-21** est donc considéré comme très stable en solution aqueuse. Dans ces mêmes conditions, le centre ferrique Fe^{III} du complexe **30/Fe^{III}-21** est pentacoordiné haut spin $S = 5/2$, avec un ligand axial hydroxyde. Un titrage en fonction du pH a par ailleurs montré que cette forme du complexe **30/Fe^{III}-21** est prédominante de pH 5,2 à 12.

Par ailleurs, la porphyrine Fe^{III} -**31** n'étant pas soluble dans l'eau, la constante d'association $K_{1:1}$ du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** a été estimée à $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dans une solution aqueuse à pH 7 contenant 33 % de méthanol. En comparaison avec le premier modèle **30/Fe^{III}-21**, l'utilisation de méthanol contribue sûrement à diminuer la force des interactions hydrophobes lors de la formation de l'assemblage **22/Fe^{III}-31**.^{62b} La spectroscopie RPE a par ailleurs montré qu'en milieu tamponné à pH 7 avec 33 % de méthanol en solution, deux formes du complexe d'inclusion sont en équilibre : un complexe haut spin pentacoordiné et un complexe bas spin hexacoordiné. Bien que ces formes n'aient pas été caractérisées plus

précisément à l'aide d'un titrage pH-métrique suivi par spectroscopie UV-visible, la pyridine du dimère de Me-O- β -CD **22**, en tant que base proximale pour le fer, semble bien être coordonnée à la porphyrine de fer **Fe^{III}-31**.

Les deux complexes d'inclusion **30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** ont donc été formés avec succès. Dans la prochaine partie, l'insertion du cuivre dans ces édifices permettra d'obtenir les complexes fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31** cibles, comme de nouveaux modèles de cytochrome *c* oxydase.

II. Formation et caractérisation des complexes d'inclusion fer/cuivre

Dans cette partie, en plus de décrire la préparation des deux complexes d'inclusion fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{III}-21** et **22/Cu^IFe^{III}-31**, solubles en solution, la formation du complexe fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32**, soluble en milieu organique sera aussi présentée. Comme dans la partie précédente, la formation de ces trois complexes fer/cuivre a le plus souvent été suivie par spectroscopie UV-visible. De plus, quand cela a été possible, ces complexes ont aussi été caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie RPE.

II.1. Complexe d'inclusion **Cu^I-30/Fe^{III}-21**

Pour former le complexe de fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{III}-21** il est possible d'utiliser deux voies de synthèse (**Schéma 3.1**). Dans la première voie, le complexe fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{III}-21** est formé à partir du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** déjà assemblé en solution aqueuse auquel du cuivre est ajouté. Cependant, en suivant cette voie, il n'a pas été possible de travailler avec un tampon de phosphate à pH 7, car le cuivre, formant des complexes avec les ions phosphates, précipite dans ce milieu. Dans la seconde voie, le complexe de cuivre bipyridine **Cu^I-30** peut être préalablement formé dans l'eau pure, puis être associé à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** en milieu tamponné à pH 7 avec des ions phosphates. Afin de suivre la formation du complexe d'inclusion final **Cu^I-30/Fe^{III}-21** en milieu tamponné à pH 7, la seconde voie a été choisie.

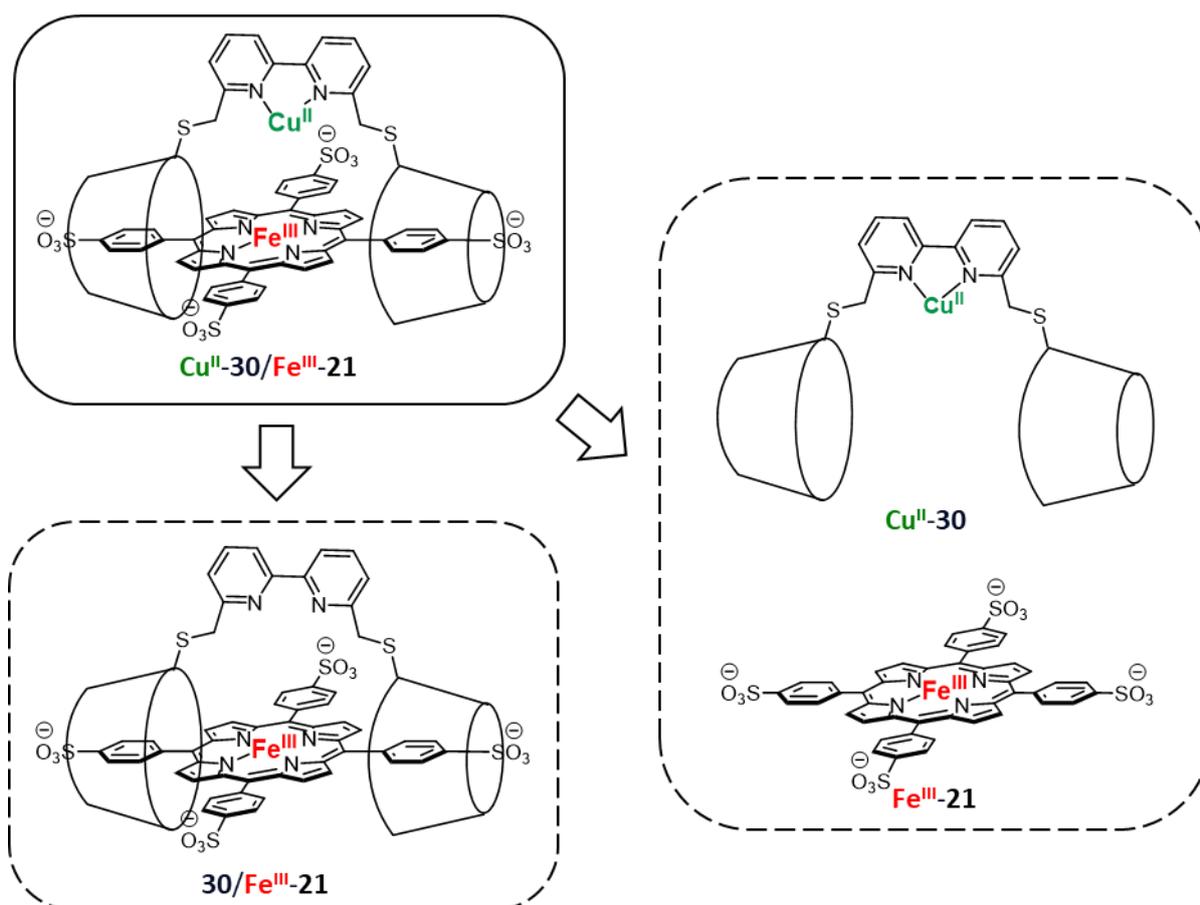


Schéma 3.1. Rétrosynthèse du complexe d'inclusion fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$.

II.1.1. Spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse

Afin de déterminer la constante d'association du cuivre avec le ligand **30**, un premier dosage du dimère de Me-O- β -CD **30** ($32 \mu\text{M}$) a été effectué dans de l'eau milli-Q avec des ajouts successifs, de 0,1 à 2 équivalents, d'une solution concentrée de sulfate de cuivre(II) pentahydrate $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**Figure 3.11**). Avant de débiter le titrage, le pH des deux solutions a été ajusté à 7 à l'aide de solutions diluées de soude et d'acide chlorhydrique.

Le spectre initial, correspondant au dimère de Me-O- β -CD **30**, présente deux bandes dans la région UV à 240 et 295 nm avec respectivement un épaulement à 248 et 306 nm (courbe orange, **Figure 3.11**). L'addition de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ provoque un déplacement bathochrome de ces bandes à 248 et 308 nm avec, pour cette dernière, deux épaulements à 321 et 340 nm (courbe verte foncée, **Figure 3.11**). Après l'équivalence, plus aucun changement spectroscopique n'a été observé. Les propriétés spectrales du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}$ sont cohérentes avec celles d'autres complexes 1:1 de 2,2'-bipyridine cuivrique Cu^{II} décrits dans la

littérature.¹¹² De plus, les deux points isobestiques à environ 265 et 300 nm sont en accord avec la formation d'une unique espèce **Cu^{II}-30**.

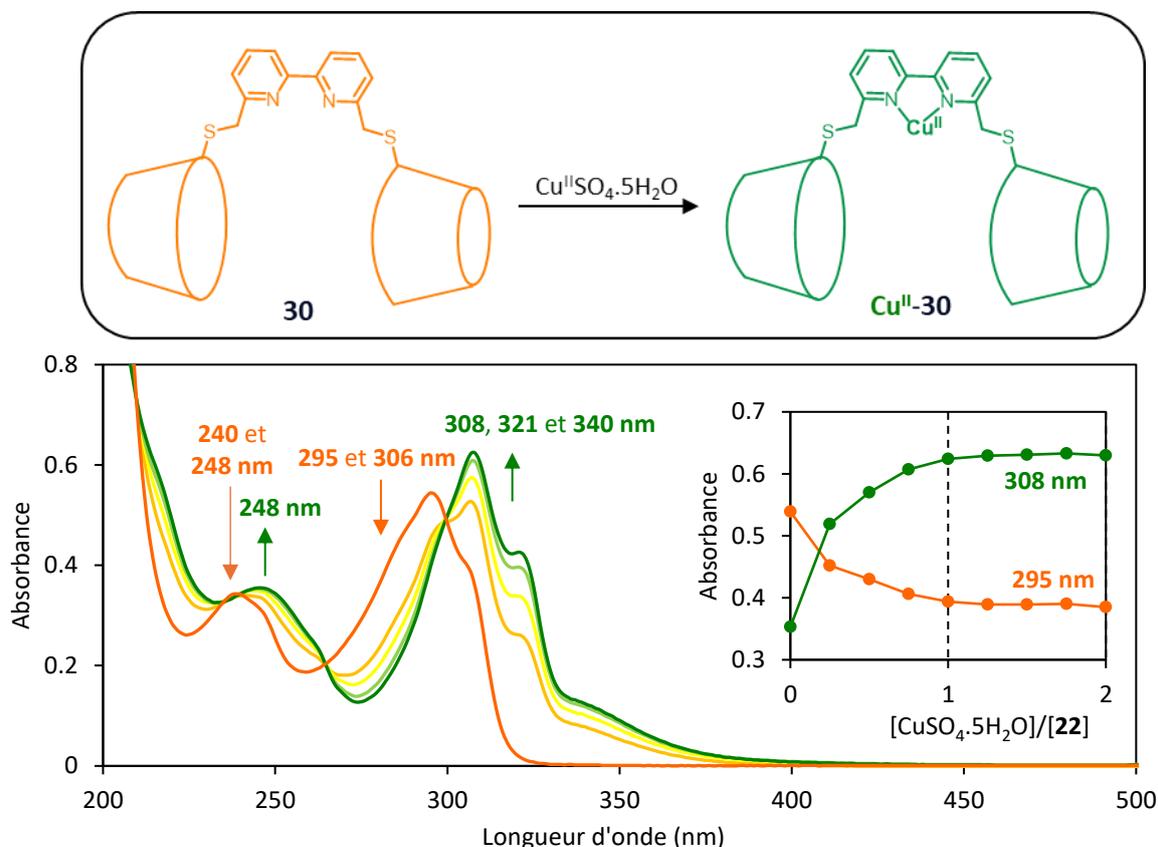


Figure 3.11. Dosage UV-visible de **30** (32 μM) dans l'eau milli-Q à pH = 7 avec une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ l'eau milli-Q à pH = 7. L'encart montre les changements d'absorbance à 295 et 308 nm en fonction du rapport des concentrations de $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]/[\mathbf{30}]$.

La constante d'association entre l'ion cuivrique **Cu^{II}** et le dimère de Me-O- β -CD **30** a été estimée à $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dans l'eau à pH 7. Le complexe **Cu^{II}-30** est donc stable dans ces conditions. De plus, le mélange de quantité équimolaire du dimère de Me-O- β -CD **30** et du CuSO_4 dans de l'eau milli-Q a permis de confirmer l'obtention du complexe 1:1 par spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'addition ultérieure de sels de phosphate dans une solution aqueuse n'a pas provoqué de précipitation du cuivre. Le complexe **Cu^{II}-30** peut ainsi être associé à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** en milieu tamponné à pH 7.

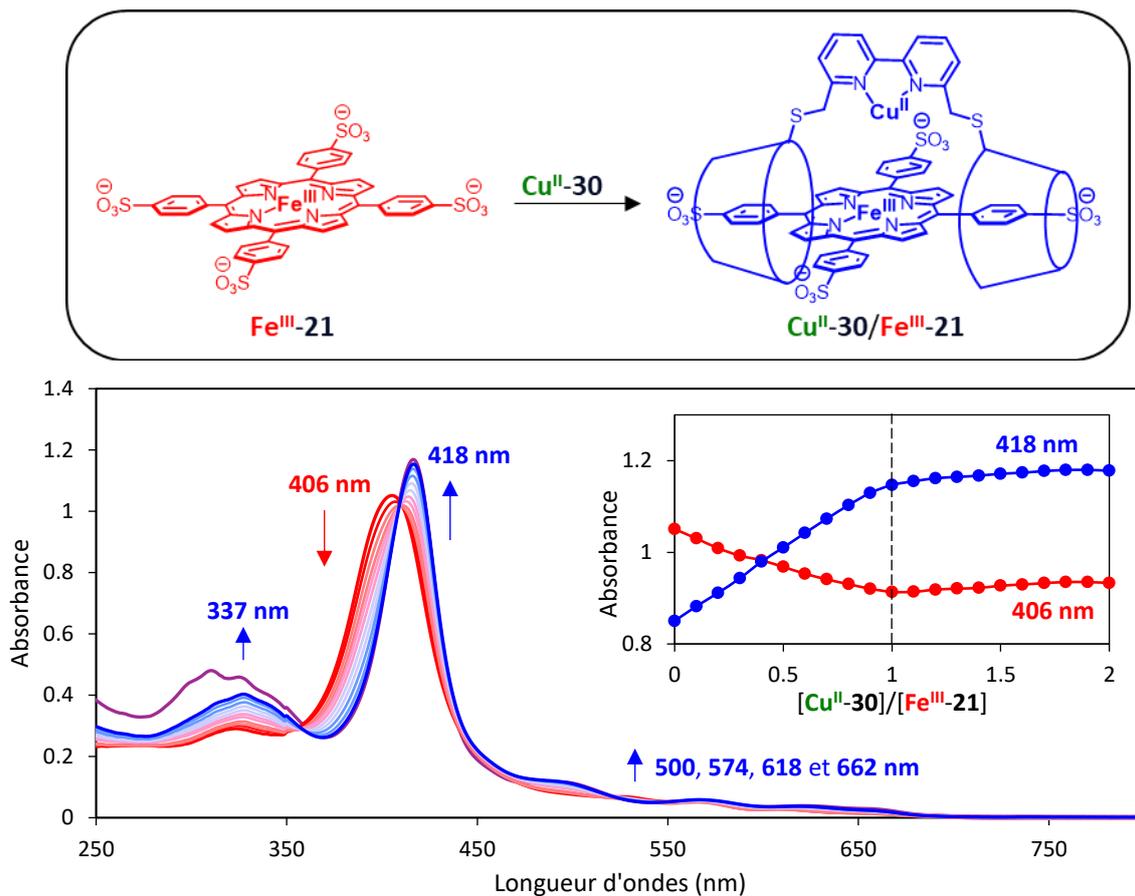


Figure 3.12. Dosage UV-visible de **Fe^{III}-21** (10 μ M) dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7 avec une solution de **Cu^{II}-30** dans un tampon de phosphate à pH = 7. L'encart montre les changements d'absorbance à 406 et 418 nm en fonction du rapport des concentrations de $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}]/[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}]$.

Dans cette optique, le dosage de la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** (10 μ M), suivi par spectroscopie UV-visible, a été effectué en milieu tamponné avec des ajouts successifs, de 0,1 à 2 équivalents, d'une solution concentrée du complexe **Cu^{II}-30** dans l'eau milli-Q (**Figure 3.12**). Le spectre initial, correspondant à la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** (courbe rouge, **Figure 3.12**), présente les mêmes bandes d'absorption à 406, 566 et 608 nm qu'observées précédemment. L'addition du complexe **Cu^{II}-30** provoque le même déplacement bathochrome de la bande de Soret de 406 à 418 nm que lors du titrage de **Fe^{III}-21** avec le dimère de Me-O- β -CD **30** non complexé au cuivre (courbe bleue, **Figure 3.12**). En plus de ce déplacement, on remarque que l'espèce formée a quatre bandes Q à 500, 574, 618 et 662 nm, alors que le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** sans le cuivre en avait uniquement deux. De même, dans la région UV, la bande à 337 nm appartenant au complexe **Cu^{II}-30** se différencie de celle précédemment observée à 296 nm pour le complexe **30/Fe^{III}-21**. Le complexe d'inclusion fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** final semble donc bien avoir été formé. Après l'équivalence, plus aucun changement spectral n'a été observé au niveau des bandes de la

porphyrine, indiquant que le complexe de stœchiométrie 1:1 $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ est le seul produit formé (courbe violette pour 2 équivalents de complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}$, Figure 3.12). Les différents points isobestiques obtenus sont également en accord avec la formation d'une unique espèce $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$. De plus, comme avec son analogue $\text{30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sans cuivre, la constante d'association a été estimée comme étant supérieure à 10^7 M^{-1} , indiquant la formation d'un complexe d'inclusion très stable.

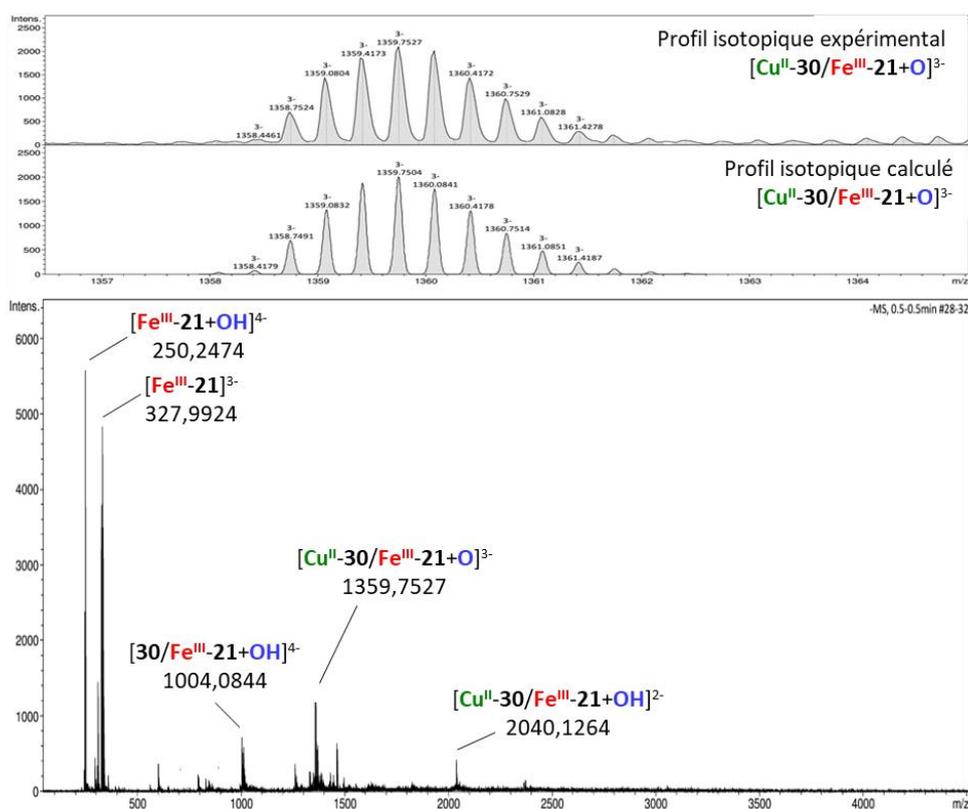


Figure 3.13. Spectre de masse ESI mode négatif et profil isotopique du complexe d'inclusion fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$.

Le complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ a par ailleurs été caractérisé par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI mode négatif). Pour cela, une solution du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ dans l'eau milli-Q a été préparée en mélangeant du CuSO_4 , du dimère de Me-O- β -CD **30** et de la porphyrine de fer **Fe**^{III}-**21** en quantités équimolaires.

Les pics les plus intenses correspondent à deux dérivés de porphyrine de fer **Fe**^{III}-**21** désassemblés, et au complexe d'inclusion fer/cuivre $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21+O}]^{3-}$ associé à un ion oxyde à $m/3z = 1359,7527$ (Figure 3.13). Cet ion oxyde est probablement coordonné au fer et au cuivre, formant un complexe ponté $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ μ -oxo. Un second pic à $m/2z = 2040,1254$ correspond au complexe d'inclusion $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21+OH}]^{2-}$ associé à un ion

hydroxyde. L'ion hydroxyde, comme l'ion oxyde, est sûrement pontant entre le fer et le cuivre, formant un complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ μ -hydroxo. D'autres pic moins intenses correspondent à un dérivé du complexe d'inclusion $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sans le cuivre ou à des espèces non identifiées.

Les complexes pontés fer/cuivre sont des espèces qui ont largement été étudiées par le groupe de K. Karlin en milieu organique.³⁹⁻⁴¹ Dans ces travaux, le complexe μ -hydroxo est formé par protonation, à l'aide d'un acide fort, du complexe μ -oxo. En milieu aqueux, ces espèces sont donc dépendantes du pH. Afin de définir clairement quelle espèce prédomine à pH 7, nous nous sommes donc aussi intéressés à cet équilibre. Pour cela, comme avec le complexe $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sans cuivre, un dosage pH métrique suivi par UV-visible, décrit ci-après, a été réalisé.

II.1.2. Etude UV-visible en fonction du pH

Après avoir préparé une solution $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ (14 μM) dans un tampon de perchlorate de sodium (0,1 M), le pH de la solution a été ajusté à 2 avec une solution diluée d'acide perchlorique. Le pH de la solution a ensuite été augmenté par paliers successifs jusqu'à 12, à l'aide d'une solution aqueuse de soude.

Quatre espèces ont été observées durant ce titrage (**Figure 3.14**). A pH acide, une première espèce, avec une bande Soret à 398 nm, est attribuée au complexe d'inclusion fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ avec, comme dans le précédent titrage pH-métrique, un complexe de fer bas spin hexacoordiné avec deux molécules d'eau en position axiale (courbes vertes, **Figure 3.14**). D'après les constantes d'équilibre pK_a issues de ce titrage, cette espèce est prédominante entre les pH 2 et 5,3. Par ailleurs, dans de récents travaux, Hématian et ses collaborateurs ont décrit la formation d'un complexe fer/cuivre ponté par une molécule d'eau en milieu organique.¹¹³ En complément des études UV-visible, des études en RMN ^1H paramagnétique ont permis d'élucider la structure de ce complexe ponté appelé μ -aquo. Dans notre cas, bien qu'un complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ μ -aquo puisse potentiellement être présent en solution aqueuse, il n'a pas été possible de prouver l'existence de cette espèce en RMN ^1H paramagnétique, car le spectre du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ s'est révélé trop complexe pour permettre une attribution précise.

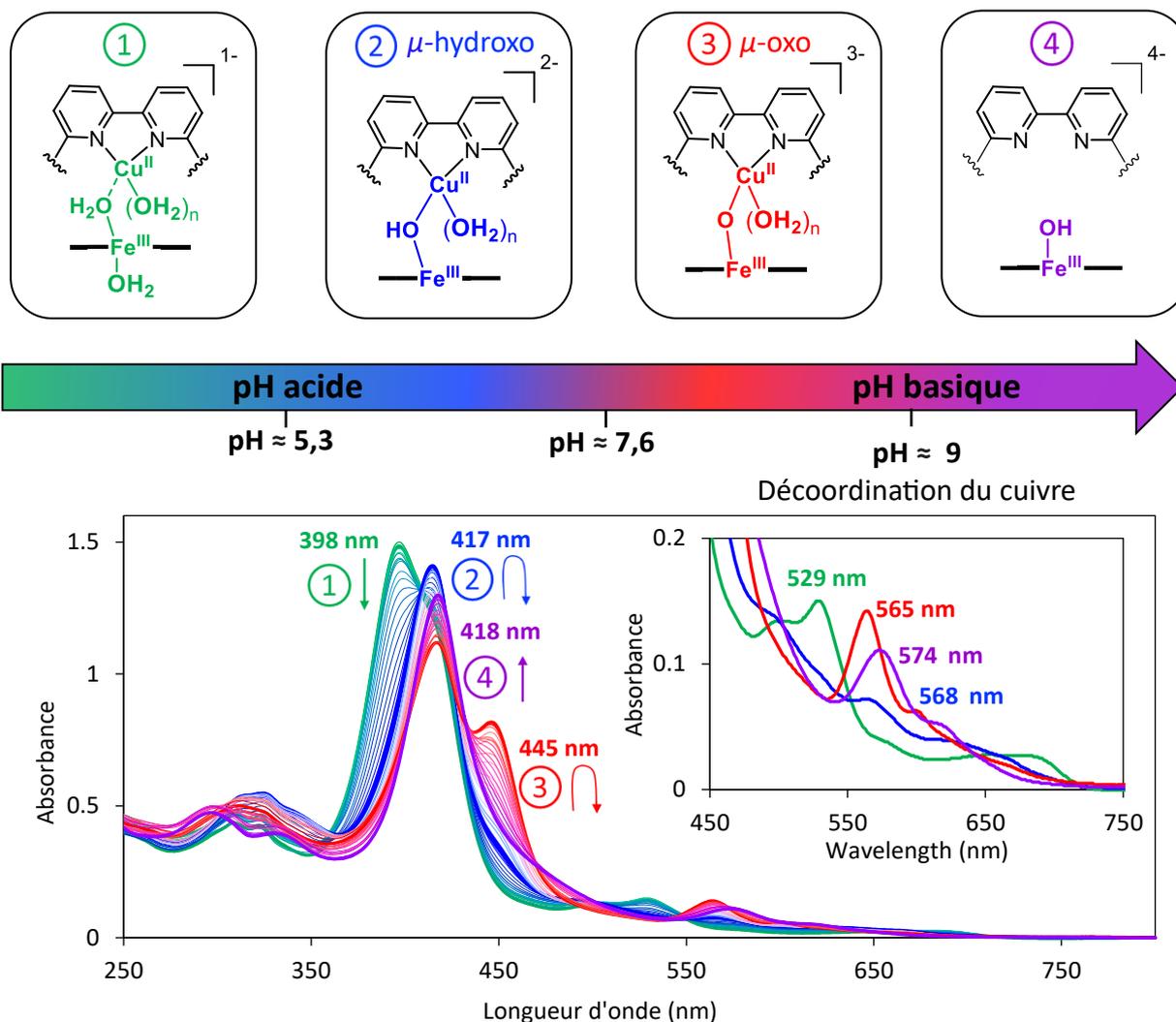


Figure 3.14. Suivre UV-visible du complexe d'inclusion Cu^{II}-30/Fe^{III}-21 (14 μM) dans une solution aqueuse tamponné au perchlorate de sodium (0,1 M) en fonction du pH.

A partir de pH 5,3 une nouvelle espèce avec une bande de Soret à 417 nm est apparue (courbes bleues, **Figure 3.14**). Cette bande, très proche de celle du complexe 30/Fe^{III}-21 avec un fer pentacoordiné à un ion hydroxyde, est attribuée au complexe μ-hydroxo Cu^{II}-30/Fe^{III}-21 avec un ion hydroxyde pontant entre le fer et le cuivre. Cette espèce est prédominante entre les pH 5,3 et 7,6. Ensuite, une nouvelle espèce avec une bande de Soret à 445 nm apparaît progressivement (courbes rouges, **Figure 3.14**). D'après les travaux du groupe de K. Karlin, cette longueur d'onde est caractéristique des complexes μ-oxo.⁴¹ Cette espèce est donc attribuée au complexe μ-oxo Cu^{II}-30/Fe^{III}-21 avec un ion oxyde pontant entre le fer et le cuivre, elle est prédominante entre les pH 7,6 et 9.

A partir du pH 9 une dernière espèce avec une bande de Soret 418 nm a été observée (courbes violettes, **Figure 3.14**). Contrairement aux trois précédents, ce complexe présente

deux bandes à 296 et 336 nm dans la région UV. Ces deux bandes sont caractéristiques du complexe **30/Fe^{III}-21** sans cuivre. A pH basique, il est donc possible de conclure que le cuivre se décoordine de la bipyridine.

L'espèce prédominante à pH 7 semble donc être un complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** de type μ -hydroxo. A pH plus basique, un complexe de type μ -oxo semble prédominer, tandis qu'à pH plus acide, sans avoir la certitude qu'une espèce de type μ -aquo ait été formée, un complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** avec l'ion ferrique **Fe^{III}** hexacoordiné à deux molécules d'eau semble être présent en solution. En revanche, à partir de pH 9, une décoordination du cuivre a été observée. Le complexe d'inclusion **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est donc stable entre pH 2 à pH 9. Bien que ce titrage ait permis d'élucider la sphère de coordination du fer, celle du cuivre est en partie indéterminée. Des études RPE présentées ci-après permettraient donc de répondre à cette question. Par ailleurs, dans le cytochrome *c* oxydase, la RPE associée à des études de susceptibilité magnétique ont démontré l'existence d'un couplage antiferromagnétique entre les ions ferrique **Fe^{III}** et cuivrique **Cu^{II}** au sein de l'enzyme dans son état oxydé (resting state). Ces études RPE pourraient permettre de déterminer si le fer et le cuivre sont donc couplés.

II.1.3. Spectroscopie RPE

Comme l'ion ferrique **Fe^{III}**, l'ion cuivrique **Cu^{II}** est paramagnétique, il a une structure électronique d^9 . Les complexes cuivriques **Cu^{II}** peuvent présenter une large gamme de géométries, telles que plan carrée, bipyramide à base trigonale, pyramide à base carrée ou encore octaédrique. La coordination octaédrique du cuivre d^9 présente généralement une forte distorsion de Jahn-Teller.¹¹⁴ Outre les géométries précédemment citées, des géométries plus irrégulières, en particulier en milieu aqueux, sont souvent observées dans les complexes cuivriques **Cu^{II}**.¹¹⁵

Afin d'obtenir plus d'informations sur la structure du complexe **Cu^{II}-30**, deux échantillons du complexe **Cu^{II}-30** (0,5 mM) dans l'eau milli-Q à pH 7, ou en milieu tamponné à pH 7, ont été analysés par spectroscopie RPE (bande X, fréquence $\nu = 9,31$ GHz), avec l'aide du Dr. Le Breton. Ces échantillons ont été préparés en mélangeant des quantités équimolaires du dimère de Me-O- β -CD **30** et du CuSO₄ dans de l'eau milli-Q. Pour le premier échantillon analysé dans l'eau milli-Q, le pH de la solution a simplement été ajusté à 7 avec des solutions diluées de soude et d'acide chlorhydrique. Pour la préparation du second échantillon en milieu

tamponné, après avoir évaporé l'eau milli-Q, le complexe **Cu^{II}-30** a été à nouveau dissout dans un tampon de phosphate à pH 7 (0,025 M).

Les spectres des deux solutions aqueuses du complexe **Cu^{II}-30** ont été mesurés à 25 K (**Figure 3.15**). Le spectre du complexe dans l'eau pure montre la présence d'une espèce de symétrie rhombique avec une bonne simulation obtenue pour des valeurs $g_z = 2,18$, $g_y = 2,06$ et $g_x = 2,03$. Les valeurs de g indiquent que dans le complexe **Cu^{II}-30** l'électron célibataire est dans l'orbitale $d_{x^2-y^2}$ ($g_z > g_y$ et g_x). D'après la littérature, ces paramètres peuvent correspondre à une géométrie octaédrique allongée, pyramide à base carrée ou plan carré.¹¹⁶ Le site cuivrique **Cu^{II}** du complexe **Cu^{II}-30** est donc coordonné à entre deux et quatre molécules d'eau. Le second spectre en milieu tamponné montre la présence de deux espèces, dont une de symétrie rhombique et l'autre de symétrie rhombique ou axiale. Dans ce deuxième échantillon, les ions phosphates interagissent sûrement avec le complexe de cuivre **Cu^{II}-30**. Au moins une des deux espèces observées sur le spectre a donc un ou plusieurs anions phosphates coordonnés à l'ion cuivrique **Cu^{II}**. Par ailleurs, quel que soit le spectre, aucune valeur de couplage hyperfin (interaction spin nucléaire/spin électronique) n'a été extraite.

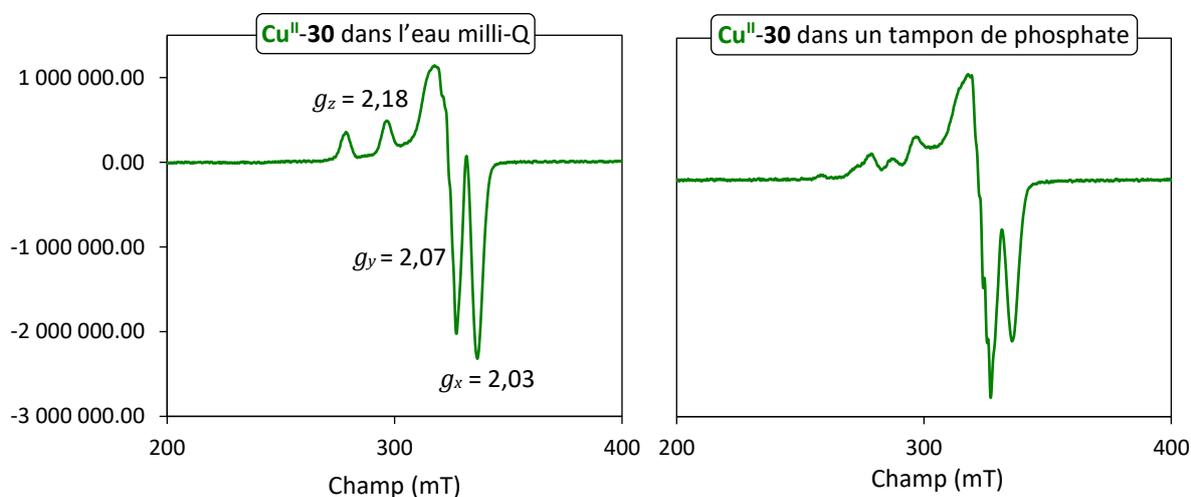


Figure 3.15. Spectres RPE du complexe **Cu^{II}-30** (0,5 mM) à 25 K dans l'eau milli Q à pH 7 (à gauche) et dans un tampon de phosphate à pH 7 (0,025 M) à pH 7 (à droite).

Ensuite, afin de voir si dans le complexe d'inclusion fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** (0,5 mM), le fer et le cuivre sont couplés, une dernière expérience à 25 K a été effectuée dans un tampon de phosphate à pH 7 (0,025 M). L'échantillon a été préparé en mélangeant du CuSO_4 avec du dimère de Me-O- β -CD **30** et de porphyrine de fer **Fe^{III}-21** en quantité équimolaire dans l'eau

milli-Q. Puis, après avoir évaporé l'eau milli-Q, le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ a été à nouveau dissout dans un tampon de phosphate à pH 7 (0,025 M).

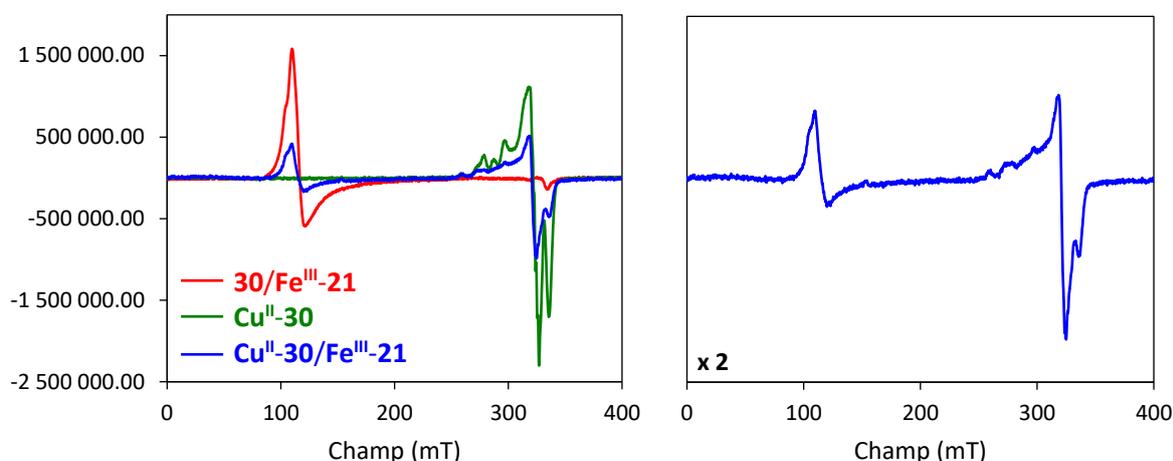


Figure 3.16. Spectres RPE des complexes $30/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}$ et $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ (0,5 mM) à 25 K dans un tampon de phosphate (0,025 M) à pH 7 (à gauche) et agrandissement sur le complexe fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ (à droite).

Contrairement à l'absence de signal observée par RPE pour le cytochrome c oxydase dans son état oxydé,¹¹⁷ deux signaux, correspondants à l'ion ferrique Fe^{III} et cuivrique Cu^{II} sont observés sur le spectre du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ (courbe bleue, **Figure 1.16**). Tout d'abord, en se focalisant sur la région associée à l'ion cuivrique Cu^{II} entre 200 et 300 mT, comme avec le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}$ en milieu tamponné, deux espèces cuivriques Cu^{II} , dont au moins une coordonnée à un ou des ions phosphates, sont observées sur le spectre du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$. En milieu tamponné avec des ions phosphates, au moins une partie des sites cuivriques Cu^{II} , du complexe d'inclusion fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, est coordonnée à des ions phosphates. Par ailleurs, en comparaison avec les spectres du complexe d'inclusion $30/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sans cuivre (courbe rouge, **Figure 1.16**), et le spectre du complexe de cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30}$ dans un tampon de phosphate (courbe verte, **Figure 1.16**), les signaux du complexe fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sont de plus faible intensité. A concentrations identiques, cet affaiblissement suggère qu'une partie des sites ferriques Fe^{III} et Cu^{II} cuivriques, du complexe d'inclusion $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, sont couplés électroniquement. Ce résultat soutient l'hypothèse selon laquelle le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ est ponté par un ligand μ -hydroxo à pH 7. Un couplage électronique similaire a par ailleurs été observé dans le précédent modèle de cytochrome c oxydase $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ développé en collaboration avec l'équipe du Pr. H. Kitagishi, également ponté par un ligand μ -hydroxo à pH 7.⁷⁴

En conclusion, le complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** dans son état oxydé a été formé et caractérisé avec succès. Dans le prochain chapitre, les propriétés de coordination du complexe **Cu^I-30/Fe^{II}-21** réduit et sa réactivité vis-à-vis du dioxygène, seront présentées.

II.2. Complexe **22/Cu^IFe^{III}-31**

Dans les précédents modèles de cytochrome *c* oxydase construits à partir de dérivés de la porphyrine à anse phénanthroline **26**, le tétrakis(acétonitrile) cuivreux [Cu(MeCN)₄]⁺ a été utilisé pour former les complexes associant fer/cuivre en milieu organique. Dans ces composés, l'ion cuivreux **Cu^I** a été choisi pour se coordiner à la phénanthroline, car l'encombrement généré par les substituants phényle en position 2 et 9 de la phénanthroline, a tendance à stabiliser la géométrie tétraédrique de l'ion cuivreux **Cu^I**, plutôt que celle de l'ion cuivrique **Cu^{II}**.¹¹⁸ En outre, les porphyrines à anse phénanthroline-**Cu^I** résultantes se sont révélées être stables à l'air en milieu organique.⁹² En plus de stabiliser la géométrie tétraédrique préférentielle de l'ion cuivreux **Cu^I**, l'environnement encombré fourni par l'anse phénanthroline semble aussi le protéger de l'oxydation à l'air. De manière analogue, très récemment, le groupe d'Au-Yeung a développé un caténane de bis(phénanthroline) cuivreux hydrosoluble avec les ligands phénanthrolines substitués en position 2 et 9.¹¹⁹ Dans cet exemple, en plus de prévenir de l'oxydation à l'air du complexe cuivreux **Cu^I**, l'environnement encombré des phénanthrolines semble aussi protéger le site métallique de la dismutation habituellement observée en solution aqueuse.¹²⁰

Dans le complexe **22/Cu^IFe^{III}-31**, l'environnement encombré de l'anse phénanthroline de la porphyrine **Fe^{III}-31**, associé à l'environnement hydrophobe induit par l'encapsulation de cette porphyrine par le dimère de Me-O-β-CD **22**, pourrait donc aussi permettre d'éviter la dismutation de l'ion cuivreux **Cu^I** en solution aqueuse. Cette perspective non triviale nous a donc poussé à tenter de former le complexe d'inclusion fer/cuivre **22/Cu^IFe^{III}-31** dans l'eau. Pour y parvenir, deux voies de synthèse ont été envisagées (**Schéma 3.2**). Dans la première voie, le complexe d'inclusion **22/Cu^IFe^{III}-31** est formé en ajoutant du [Cu(MeCN)₄]⁺ au complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** sans le cuivre, déjà auto-assemblé en solution aqueuse. Dans la seconde voie, la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-31** est préalablement formée en milieu organique, afin d'ensuite être associée au dimère de Me-O-β-CD **22** en milieu aqueux.

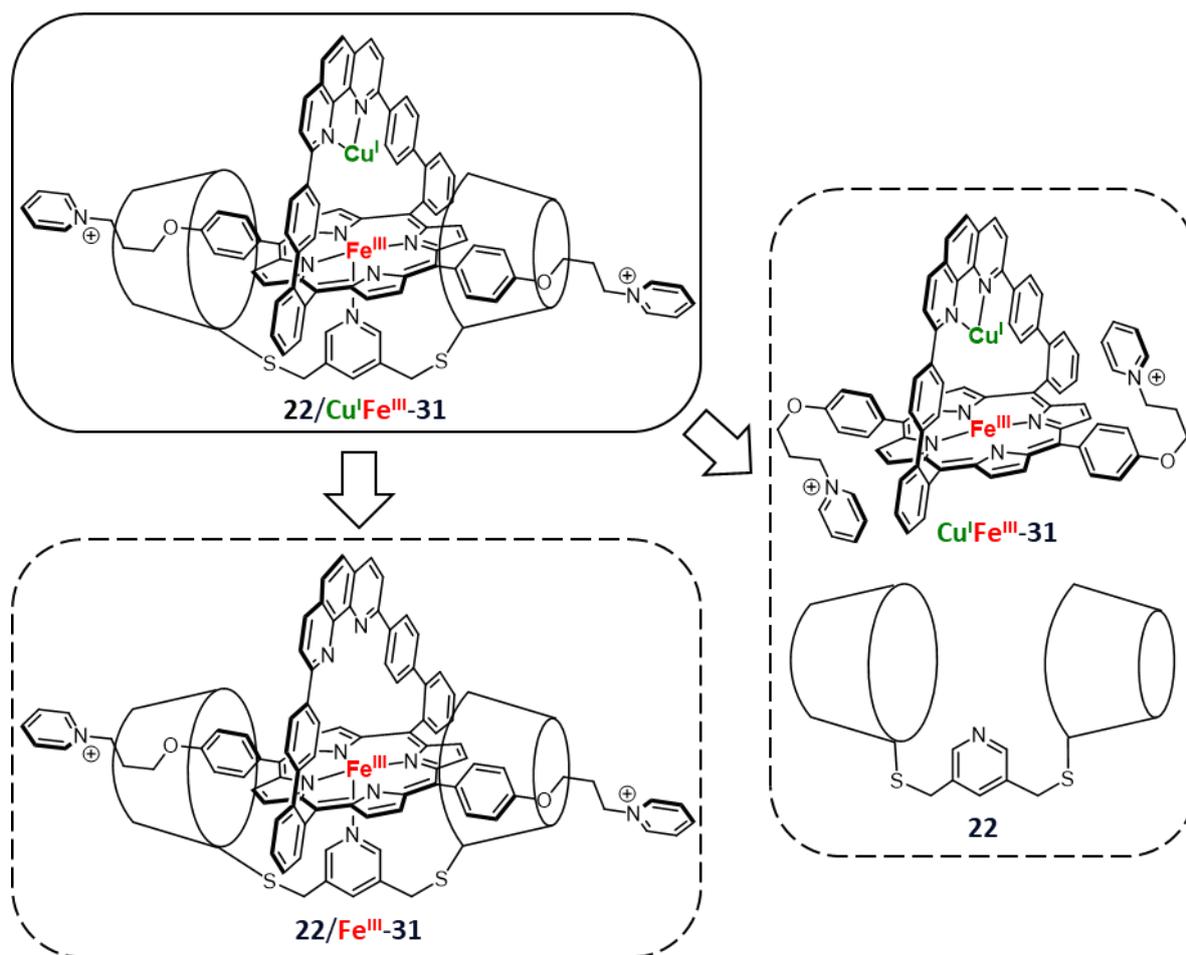


Schéma 3.2. Rétrosynthèse du complexe d'inclusion fer/cuivre $22/\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$.

Afin de suivre la formation du complexe d'inclusion $22/\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ en milieu aqueux par spectroscopie UV-visible, la première voie a donc été suivie. Pour cela, un dosage suivi par spectroscopie UV-visible, du complexe d'inclusion $22/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ dans un mélange désoxygéné 1:4 acétonitrile/eau milli-Q a été effectué avec des ajouts successifs d'une solution de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ dans l'acétonitrile préalablement dégazé, en allant de 0,2 à 4 équivalents (**Figure 3.17**). La solution aqueuse, contenant 20 % d'acétonitrile, du complexe d'inclusion $22/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ a été préparée en mélangeant des quantités équimolaires de porphyrine de fer $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ et de dimère de Me-O- β -CD **22**. Dans ce cas, l'acétonitrile a été choisi, plutôt que le méthanol précédemment utilisé, afin de limiter les effets de solvant lors de l'ajout de la solution de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$. Le pH de la solution aqueuse de complexe $22/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ contenant 20 % d'acétonitrile a par ailleurs été ajusté à 7 en utilisant des solutions diluées d'acide chlorhydrique et de soude. De plus, afin d'éviter l'oxydation de l'ion cuivreux Cu^{I} et potentiellement celle du complexe $22/\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ résultant, le dosage a été effectué dans une cuve cellule UV de type Schlenk sous atmosphère inerte.

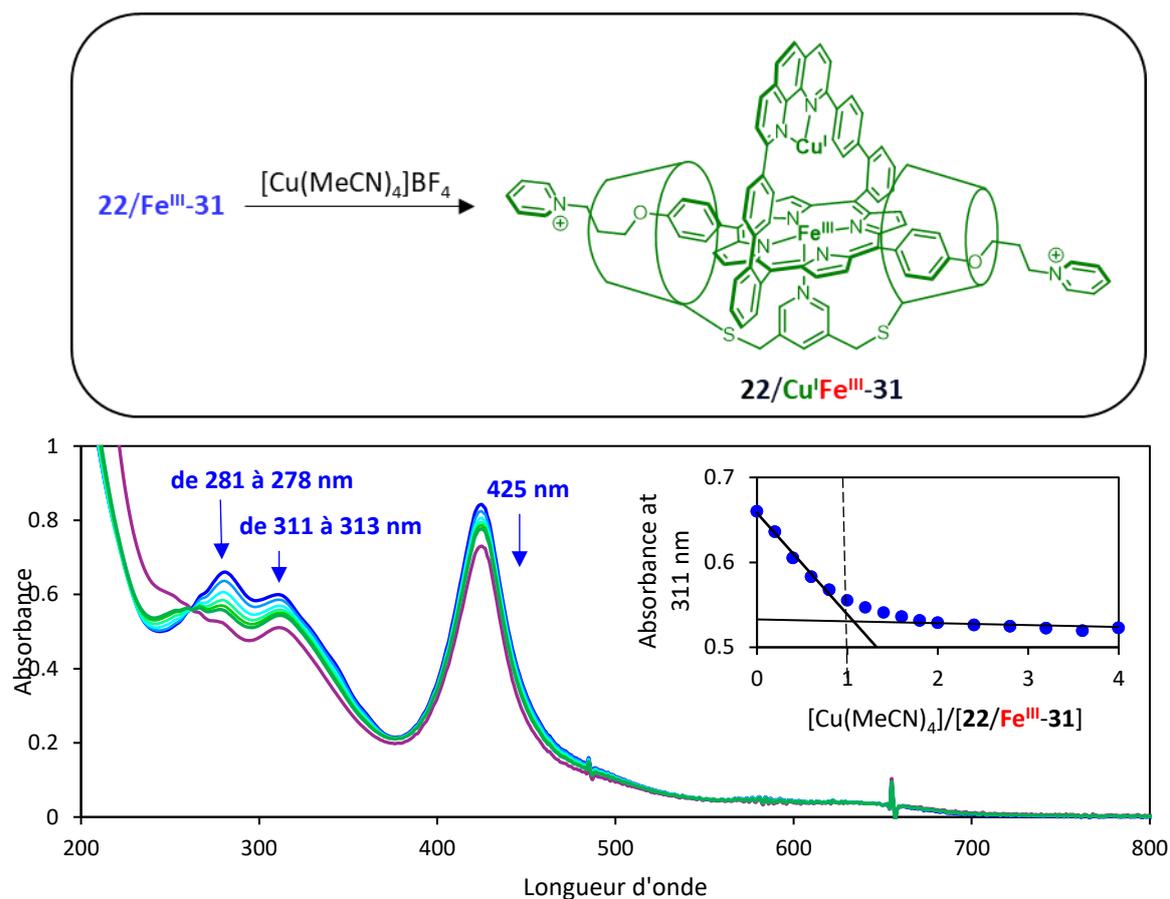


Figure 3.17. Dosage UV-visible de **22/Fe^{III}-31** (10 μ M) dans un mélange 1:4 acétonitrile/eau milli-Q à pH = 7 avec une solution de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ dans l'acétonitrile. L'encart montre les changements d'absorbance à 311 nm en fonction du rapport des concentrations de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]/[\text{22/Fe}^{\text{III}}\text{-31}]$.

Le spectre initial correspondant au complexe d'inclusion de la porphyrine de fer **22/Fe^{III}-31** présente une bande de Soret à 425 nm et 608 nm et deux bandes à 281 et 311 nm attribuées à la phénanthroline (courbe bleue, **Figure 3.17**). Ces bandes sont similaires à celles précédemment observées dans un mélange méthanol/eau milli-Q l'assemblage **22/Fe^{III}-31** semble donc bien s'être formé dans le mélange 1:4 acétonitrile/eau milli-Q. L'addition du $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ ne provoque pas de déplacement particulier au niveau de la Soret, mais seulement un effet hypochrome (courbe verte, **Figure 3.17**). L'ajout d'acétonitrile dans la solution aqueuse, est potentiellement responsable de cet effet, d'autant plus que le même effet hypochrome est observé au niveau des deux bandes de la phénanthroline à 281 et 278 nm. Par ailleurs, la bande à 281 nm subit un léger déplacement hypsochrome vers 278 nm, tandis que la bande à 311 nm subit un petit déplacement bathochrome vers 313 nm (courbe verte, **Figure 3.17**). Après l'équivalence, l'intensité de toutes ces bandes continuent de diminuer, mais de manière moins marquée qu'avant l'équivalence (courbe violette pour 2 équivalents de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$, **Figure 3.17**). La diminution de cet effet hypochrome montre

que l'acétonitrile n'est pas exclusivement responsable des changements spectraux précédemment observés. L'ion cuivrique Cu^I semble donc s'être inséré dans l'anse phénanthroline du complexe d'inclusion $\mathbf{22/Fe^{III}-31}$. Cependant, bien que le complexe fer/cuivre $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ ait potentiellement été formé, sa stabilité en milieu aqueux reste incertaine. Les faibles changements spectraux observés, entre le complexe d'inclusion $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ avec et sans cuivre, n'ont pas permis de suivre une éventuelle décoordination du cuivre, associée à sa dégradation.

Par ailleurs, en passant par cette voie, il n'a pas été possible d'identifier $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$, ou un de ses dérivés coordonné à des ligands exogènes, par spectrométrie de masse. Seul le complexe $\mathbf{22/Fe^{III}-31}$ sans le cuivre, la porphyrine de fer $\mathbf{Fe^{III}-31}$ et le dimère de Me-O- β -CD $\mathbf{22}$ seuls ont été observés. Deux raisons peuvent expliquer pourquoi il n'a pas été possible d'identifier le complexe $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ par spectrométrie de masse. Soit le cuivre se décoordine à cause des conditions utilisées durant l'analyse, soit le cuivre se décoordine de l'assemblage $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ car l'environnement hydrophobe fourni par la Me-O- β -CD n'est pas suffisant pour éviter sa dismutation. Pour confirmer l'une de ces hypothèses, la seconde voie de synthèse, où le complexe $\mathbf{Cu^I Fe^{III}-31}$ a préalablement été préparé en milieu organique, a été explorée au Japon, lors d'un séjour dans le laboratoire Pr. Hayashi, en profitant de l'opportunité d'avoir un spectromètre de masse utilisable en libre accès. Ainsi, une fois le complexe $\mathbf{Cu^I Fe^{III}-31}$ synthétisé en milieu organique, les bonnes conditions d'ionisation pourront être trouvées en utilisant ce dernier complexe. Ensuite, si en utilisant ces mêmes conditions, le second complexe $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ n'est pas identifié, nous pourrions conclure que le complexe $\mathbf{22/Cu^I Fe^{III}-31}$ n'est pas stable dans l'eau.

Dans cette optique, la porphyrine fer/cuivre $\mathbf{Cu^I Fe^{III}-31}$ a tout d'abord dû être synthétisée (**Schéma 3.3**). Pour cela, la porphyrine de fer $\mathbf{Fe^{III}-31}$ et 6 équivalents de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ ont été solubilisés dans l'acétonitrile désoxygéné, puis traités pendant 1 min au bain à ultrasons, sous atmosphère inerte. Afin d'isoler le complexe $\mathbf{Cu^I Fe^{III}-31}$ sans excès de cuivre, après évaporation de l'acétonitrile, le solide obtenu a été trituré dans le chloroforme, filtré puis lavé abondamment avec du chloroforme. Aucun rendement n'est donné pour cette méthode de synthèse, car elle a été effectuée uniquement deux fois, à l'échelle de 4 à 5 mg.

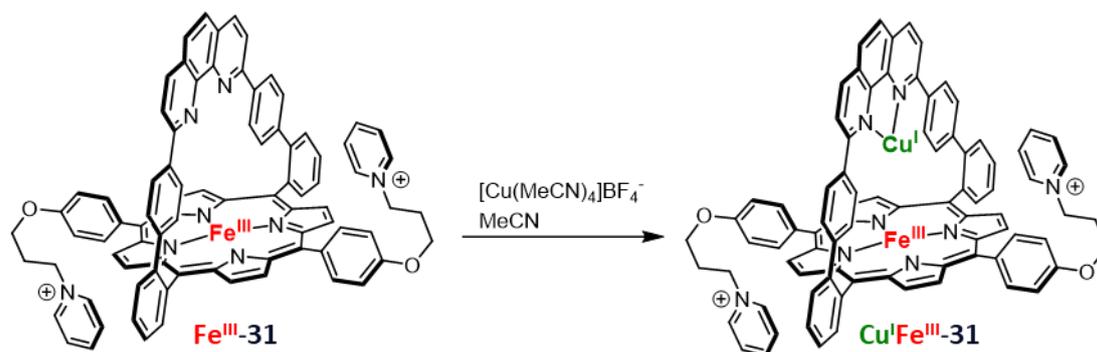


Schéma 3.3. Synthèse de la porphyrine fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$.

Une solution du complexe $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ dans l'acétonitrile a ensuite été analysée par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI mode positif, **Figure 3.18**). Afin de trouver des conditions limitant la décoordination du cuivre, plusieurs essais d'ionisation ont été effectués.

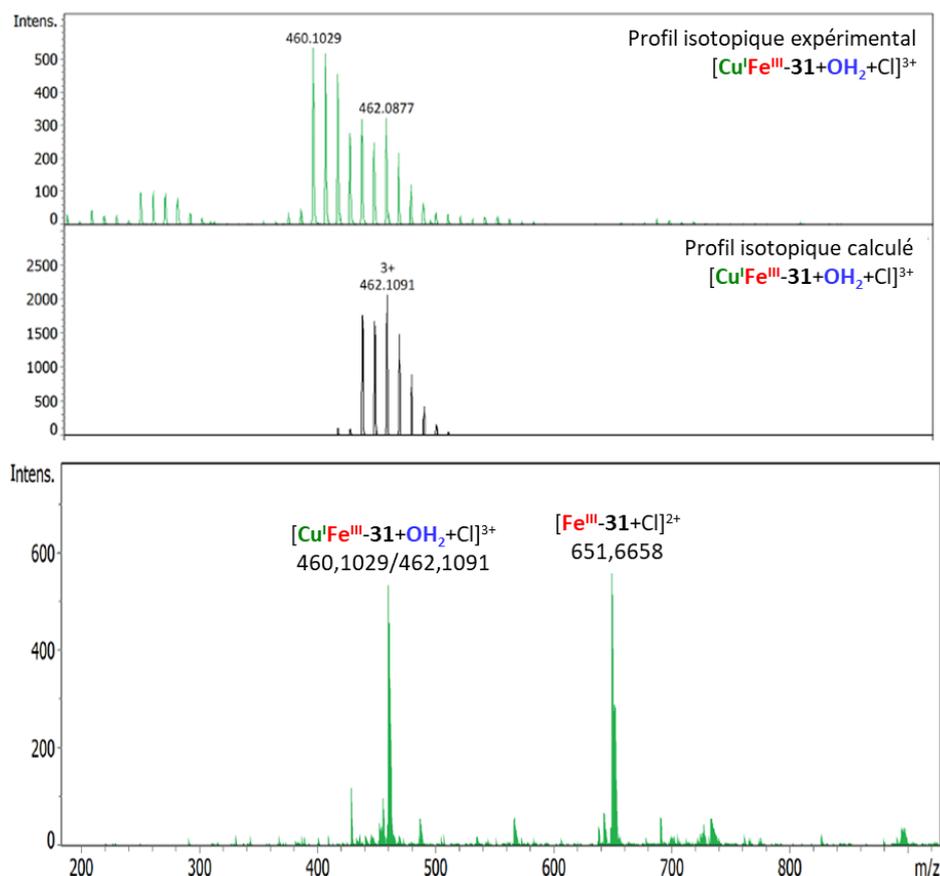


Figure 3.18. Spectre de masse ESI mode positif et profil isotopique de la porphyrine fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$.

Le meilleur spectre obtenu présente deux pics d'intensité équivalente correspondant à des dérivés du complexe $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ avec et sans cuivre. Les pics à $m/z = 460,1029$ et $m/z = 462,0877$ sont respectivement attribués aux complexes $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}+\text{MeOH}+\text{OH}]^{3+}$ et $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-31}]^{3+}$.

$31+OH_2+Cl]^{3+}$, le méthanol venant probablement du précédent essai d'ionisation du complexe **Cu^IFe^{III}-31** solubilisé dans le méthanol. Les pics à $m/z = 651,6658$ correspondent aux complexes **[Fe^{III}-31+Cl]** sans cuivre, tandis que les autres pics, de plus faibles intensités, correspondent à des espèces non identifiées. Cette méthode, ayant permis d'identifier le complexe **Cu^IFe^{III}-31** avec une intensité de pic raisonnable, semble donc être assez douce pour limiter la décoordination du cuivre. Ainsi, elle a été utilisée pour essayer d'identifier le complexe **22/Cu^IFe^{III}-31**.

Par la suite, afin de former le complexe d'inclusion fer/cuivre final **22/Cu^IFe^{III}-31**, une solution concentrée du complexe **Cu^IFe^{III}-31** dans l'acétonitrile désoxygéné a été mélangée à une solution aqueuse de dimère de Me-O- β -CD **22** désoxygénée, en quantité équimolaire. Après 10 min sous agitation, la solution résultante a été diluée dans l'eau milli-Q, préalablement dégazée à l'argon, de sorte qu'il reste moins de 5 % d'acétonitrile, déstabilisant la formation de l'assemblage, dans la solution finale, puis immédiatement analysée par spectrométrie de masse. En utilisant la même méthode que précédemment, il n'a pas été possible d'observer le complexe d'inclusion **22/Cu^IFe^{III}-31**, ou même la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-31**. Par ailleurs, il n'a pas été possible d'identifier ces mêmes espèces en utilisant d'autres méthodes d'ionisation. Comme précédemment, le complexe **22/Fe^{III}-31** sans le cuivre, la porphyrine de fer **Fe^{III}-31** et le dimère de Me-O- β -CD **22** désassemblés ont uniquement été observés. L'environnement hydrophobe fourni par les Me-O- β -CD du composé **22** ne semble donc pas être suffisant pour empêcher la décoordination associée à la dismutation de l'ion cuivreux **Cu^I**.

Toujours afin de former le complexe d'inclusion fer/cuivre **22/Cu^IFe^{III}-31**, un dosage a été effectué avec du $CuSO_4$, mais aucun changement spectroscopique n'a été observé. De même, la spectrométrie de masse n'a non plus permis de distinguer le complexe **22/Cu^IFe^{III}-31** formé à partir de $CuSO_4$. Comme décrit dans la littérature, les complexes cuivriques **Cu^{II}** constitués de phénanthroline encombrée en positions 2 et 9 ne sont pas stables.¹¹⁸ De ce fait, de même qu'avec le $[Cu(MeCN)_4]BF_4$, l'utilisation de $CuSO_4$ n'a pas non plus permis de former le complexe d'inclusion fer/cuivre **22/Cu^IFe^{III}-31**. En conséquence, seules les propriétés du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** sans cuivre seront présentées dans le prochain chapitre.

II.3. Complexe Cu^IFe^{III}-32 soluble en milieu organique

Le dernier modèle fer/cuivre de cytochrome *c* oxydase, développé au cours de ces travaux de thèse, a été construit à partir de la nouvelle porphyrine à anse bipyridine **Fe^{III}-32**. Afin de se rapprocher au mieux de la structure du site actif du cytochrome *c* oxydase, la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32** doit être formée. Pour les mêmes raisons qu'avec la porphyrine à anse phénanthroline **26**, le [Cu(MeCN)₄]BF₄ a été choisi pour former ce complexe. Pour cela, le dosage suivi par spectroscopie UV-visible de la porphyrine **Fe^{III}-32** a été effectué dans le dichlorométhane dégazé avec des ajouts successifs allant de 0,125 à 2 équivalents d'une solution désoxygénée de [Cu(MeCN)₄]BF₄ dans le dichlorométhane. Afin de travailler sous atmosphère inerte, une cellule de type Schlenk a de nouveau été utilisée.

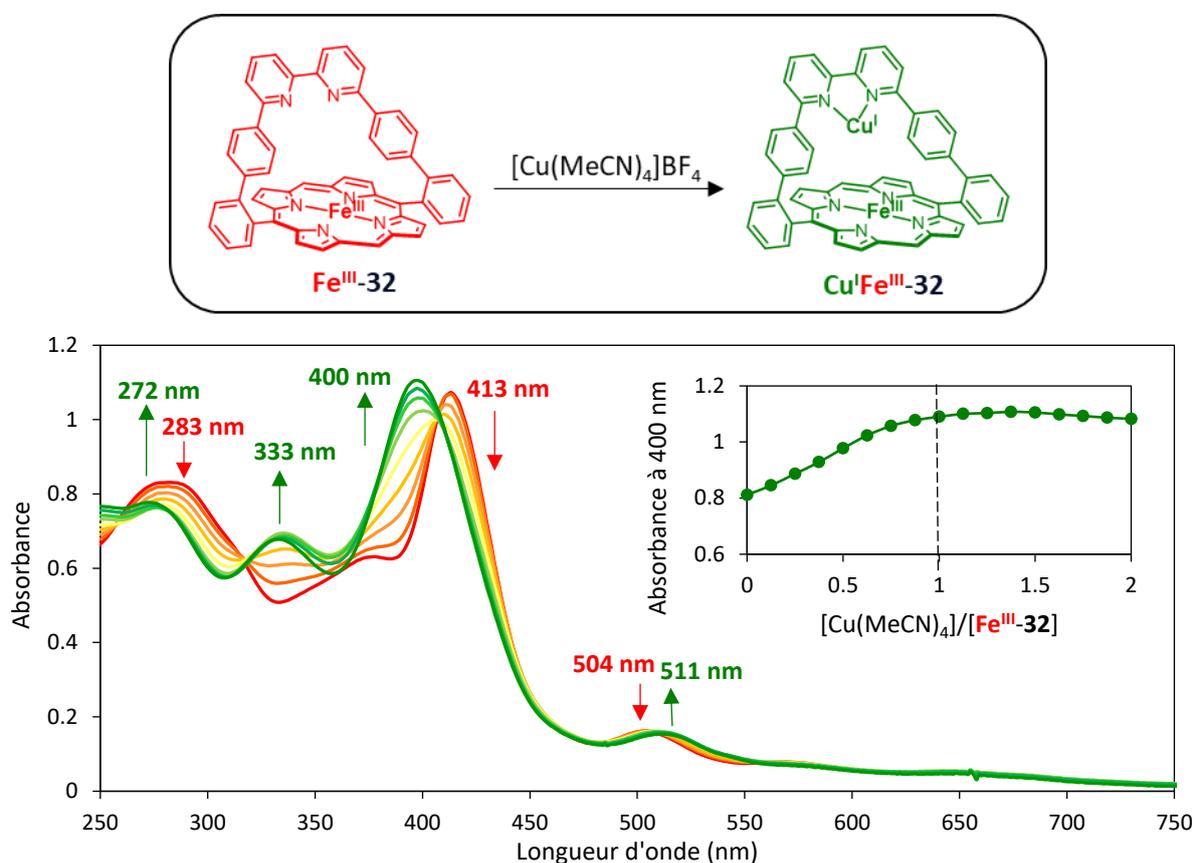


Figure 3.19. Dosage UV-visible de **Fe^{III}-32** (10 μ M) dans le dichlorométhane avec une solution de solution de [Cu(MeCN)₄]BF₄ dans le dichlorométhane. L'encart montre les changements d'absorbance à 311 nm en fonction du rapport des concentrations de [Cu(MeCN)₄]/[**22/Fe^{III}-31**].

Le spectre initial de la porphyrine de fer **Fe^{III}-32** présente une bande de Soret à 413 nm avec un épaulement à 370 nm, des bandes Q à 504 et 569 nm et une bande à 283 nm attribuée à la bipyridine de l'anse (courbe rouge, **Figure 3.19**). D'après la littérature la bande à 377 nm pourrait correspondre à la formation du dimère porphyrinique 2(**Fe^{III}-32**) μ -oxo.¹²¹ L'addition

de la solution de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ provoque un déplacement hypsochrome de la bande de Soret vers 400 nm et de la bande de la bipyridine vers 272 nm (courbe verte, **Figure 3.19**). De plus, une nouvelle bande apparaît à 333 nm, tandis que la bande Q à 504 nm subit un déplacement bathochrome vers 511 nm. Après l'équivalence, plus aucun changement spectral n'a été observé au niveau des bandes de la porphyrine à anse **Fe^{III}-32**, indiquant la formation du complexe **Cu^IFe^{III}-32** avec une stœchiométrie 1:1. Par ailleurs, les nombreux points isobestiques, associés aux déplacements des bandes de la porphyrine **Fe^{III}-32**, confirment qu'un seul complexe, **Cu^IFe^{III}-32**, a été formé. D'après ce titrage, la constante d'association $K_{1:1}$ a été estimée à $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

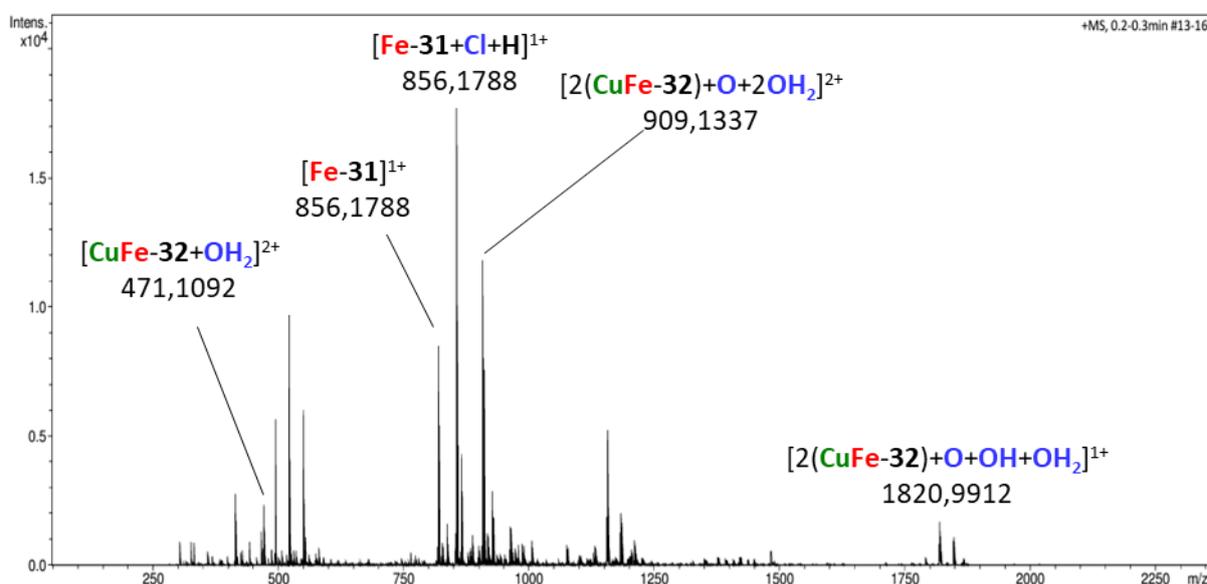


Figure 3.20. Spectre de masse ESI mode positif de la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32**.

Pour confirmer que le complexe **Cu^IFe^{III}-32** ait bien été formé, une solution de dichlorométhane désoxygénée dans laquelle des quantités équimolaires de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$ et de la porphyrine de fer **Fe^{III}-32** ont été mélangées, a été analysée par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI mode positif, **Figure 2.20**). Plusieurs pics pourraient être associés à des dérivés de la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32**. Des simulations sont en attente, et permettrons d'apporter plus de précisions. Les autres pics correspondent soit à la porphyrine de fer **Fe^{III}-32**, sans le cuivre, soit à des composés non identifiés.

Le composé **Cu^IFe^{III}-32** comme modèle de cytochrome c oxydase soluble en milieu organique a donc été formé avec succès. Ses propriétés en tant que catalyseur pour la réduction du dioxygène seront décrites dans le prochain chapitre.

III. Conclusion

Avant de former le premier modèle de cytochrome *c* oxydase soluble **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** en milieu aqueux, le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** sans cuivre a été préparé et caractérisé avec succès à pH 7. Par la suite, le complexe **Cu^{II}-30** a aussi été formé avec succès, avec une constante d'association $K_{1:1}$ entre le dimère **30** et l'ion cuivrique **Cu^{II}** estimée à $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ dans l'eau à pH 7. Ce complexe s'auto-assemble avec la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** dans l'eau tamponnée à pH 7 avec une constante d'association $K_{1:1}$ supérieure à 10^7 M^{-1} . Le complexe d'inclusion résultant **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est donc très stable en solution aqueuse. Comme dans le cytochrome *c* oxydase, dans le complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** les sites ferrique **Fe^{III}** et cuivrique **Cu^{II}** sont couplés électroniquement à pH 7. Des études en fonction du pH ont par ailleurs permis de montrer que ces sites métalliques sont pontés par un ligand μ -hydroxo à pH 7. Les mêmes études ont révélé que le complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est stable de pH 2 à pH 9, alors qu'au-dessus de pH 9 le cuivre se décoordine de la bipyridine.

En conclusion, le modèle de cytochrome *c* oxydase fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** a été formé et caractérisé dans son état oxydé à pH 7 avec succès. Ce modèle peut donc ensuite être étudié dans son état réduit en présence de ligand exogène tel que le dioxygène. Dans le prochain chapitre, le complexe **Cu^I-30/Fe^{II}-21** réduit sera ainsi étudié en UV-Visible et en électrochimie dans des réactions de réduction du dioxygène. En électrochimie, ses propriétés seront aussi comparées à son analogue **30/Fe^{III}-21** sans cuivre.

Concernant le second modèle **22/Cu^IFe^{III}-31** de cytochrome *c* oxydase soluble en milieu aqueux, tout d'abord, bien qu'il ait été possible de former le complexe **22/Fe^{III}-31**, sa faible solubilité en milieux aqueux n'a souvent permis de le caractériser que dans des mélanges de solvants. Par la suite, que ce soit en utilisant du CuSO_4 ou du $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{BF}_4$, il n'a pas été possible de caractériser le complexe d'inclusion fer/cuivre **22/Cu^IFe^{III}-31** en solution aqueuse. En conséquence, seules les propriétés du complexe **22/Fe^{III}-31** sans le cuivre seront explorées en UV-visible et en électrochimie.

Enfin, le dernier modèle de cytochrome *c* oxydase fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32** soluble en milieu organique a été formé et caractérisé avec succès. La constante d'association entre le cuivre et le complexe **Fe^{III}-32** a par ailleurs été estimée à $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ dans le dichlorométhane.

Dans le prochain chapitre, la porphyrine fer/cuivre $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -32 sera étudiée comme électrocatalyseur pour la réduction du dioxygène en milieu aqueux.

-
- ¹⁰³ K. Kano, H. Kitagishi, S. Tamura, and A. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202-15210.
- ¹⁰⁴ J. R. Miller, and G. D. Dorough, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3977-3981.
- ¹⁰⁵ F. A. Walker, and U. Simonis, Iron Porphyrin Chemistry in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, **2011**, Wiley, 1-132.
- ¹⁰⁶ a) F. A. Walker, D. Reis, and V. L. Balke *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6888-6898. b) C. T. Watson, S. Cai, N. V. Shokhirev, and F. A. Walke, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7468-7484.
- ¹⁰⁷ Continuous-Wave EPR in *eMagRes* **2016**, *5*, 1411-1421.
- ¹⁰⁸ K. Kano, H. Kitagishi, S. Tamura, and A. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15202-15210.
- ¹⁰⁹ H. Yoshii, T. Furuta, A. Yasunishi and H. Hirano, *J. Biochem.* **1994**, *115*, 1035-1037.
- ¹¹⁰ M. Lo, *Thèse Université de Strasbourg* **2009**.
- ¹¹¹ D. L. Rousseau, Y. C. Ching, M. Brunori, and G. M. Giacometti, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7878-7881.
- ¹¹² a) W. S. Lee, C. T. Yeung, K. C. Sham, W. T. Wong, and H. L. Kwong, *Polyhedron*. **2011**, *30*, 178-186. b) S. M. Barnett, K. I. Goldberg, and J. M. Mayer, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 498-502.
- ¹¹³ M. C. Carrasco, K. J. Dezarn, F. S. T. Khan, and S. Hematian, *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *225*, 111593.
- ¹¹⁴ a) P. Comba, and M. Zimmer, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5368-5369. b) J. Conradie, *Inorg. Chim. Acta.* **2019**, *486*, 193-199.
- ¹¹⁵ I. Persson, D. Lundberg, E. G. Bajnóczi, K. Klementiev, J. Just, and K. G. V. Sigfridsson Clauss, *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 9538-9550.
- ¹¹⁶ E. Garribba, and G. Micera, *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1229-1232.
- ¹¹⁷ B.F. Van Gelder, and H. Beinert, *Biochim. Biophys. Acta. - Bioenerg.* **1969**, *189*, 1-24.
- ¹¹⁸ P. Yang, X.-J. Yang, and B. Wu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *20*, 2951-2958.
- ¹¹⁹ M. P. Tang, L. Zhu, Y. Deng, Y.-X. Shi, S. Kin-Man Lai, X. Mo, X.-Y. Pang, C. Liu, W. Jiang, E. C. M. Tse, and H. Y. Au-Yeung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, e202405971.
- ¹²⁰ C. S. Day, and R. Martin, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 6601-6616.
- ¹²¹ V. Faraon, R. I. Bunghez, S. F. Pop, R. Senin, S. Doncea, and R. M. Ion, *J. Optoelectron. Adv. M.* **2011**, *13*, 917-920.

Chapitre 4. Réactivité des modèles de cytochrome *c* oxydase

TABLE DES MATIERES :

I. Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par spectroscopie UV-visible	107
I.1. Les porphyrines ferreuses	107
I.2. Complexe d'inclusion 30/Fe ^{II} -21 et Cu ^I -30/Fe ^{II} -21	108
I.3. Complexe d'inclusion 22/Fe ^{II} -31	112
I.4. Récapitulatif	115
II. Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par électrochimie.....	115
II.1. Etude par voltampérométrie cyclique	115
II.2. Etude par voltampérométrie hydrodynamique.....	118
II.2.1. Electrode à disque-anneau tournante	118
II.2.2. Analyse de Koutecky-Levich	123
II.3. Récapitulatif	127

Chapitre 4. Réactivité des modèles de cytochrome c oxydase

Dans le précédent chapitre, les trois modèles de cytochrome c oxydase **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, **22/Fe^{III}-31** et **Cu^IFe^{III}-32** ont pu être préparés et caractérisés. L'intérêt majeur des modèles de cytochrome c oxydase réside dans leur capacité à réduire le dioxygène en eau. Ce chapitre se focalise donc sur la réactivité de ces modèles vis-à-vis du dioxygène.

Dans un premier temps, les propriétés de coordination des modèles **Cu^I-30/Fe^{II}-21**, **22/Fe^{II}-31** dans leur état réduit avec le dioxygène, mais aussi avec le monoxyde de carbone, seront explorées par spectroscopie UV-visible en milieu aqueux. Dans un second temps, les réactivités des complexes d'inclusion **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** solubles en milieu aqueux vis-à-vis du dioxygène, ainsi que celle de la porphyrine fer/cuivre **Cu^IFe^{III}-32** soluble en milieu organique, seront étudiées en électrochimie.

I. Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par spectroscopie UV-visible

La coordination des deux modèles de cytochrome c oxydase **30/Fe^{II}-21**, **Cu^I-30/Fe^{II}-21** et **22/Fe^{II}-31** dans leur état réduit, avec le dioxygène et le monoxyde de carbone a été étudiée par spectroscopie UV-visible. Dans ces études, les complexes oxydés **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **30/Fe^{III}-21** seront tout d'abord réduits en **30/Fe^{II}-21**, **Cu^I-30/Fe^{II}-21** et **22/Fe^{II}-31**, puis associés aux deux gaz précédemment évoqués. Ces expériences ont toutes été effectuées au Japon dans les laboratoires de Pr. H. Kitagishi et Pr. T. Hayashi. Cependant, avant de présenter les résultats obtenus, il convient tout d'abord de brièvement décrire les propriétés électroniques et spectroscopiques des porphyrines ferreuses **Fe^{II}**.

I.1. Les porphyrines ferreuses

L'ion ferreux **Fe^{II}** comporte six électrons sur sa couche externe d. Comme dans les porphyrines ferriques **Fe^{III}**, l'état de spin des porphyrines ferreuses **Fe^{II}** est influencé par le nombre et la nature des ligands axiaux coordonnés au site métallique. Ainsi, en fonction de son environnement, une porphyrine ferreuse peut adopter trois états de spin différents, un état bas spin $S = 0$, un état de spin $S = 1$ et un état haut spin $S = 2$ (**Figure 4.1**).

En général, les porphyrines ferreuses Fe^{II} haut spin $S = 2$ sont pentacoordinées avec un ligand axial de champ faible, les bas spin $S = 0$ sont hexacoordinées avec deux ligands axiaux de champ fort et celles de spin intermédiaire $S = 1$ sont tétracoordinées et donc sans ligand en position axiale.¹⁰⁵

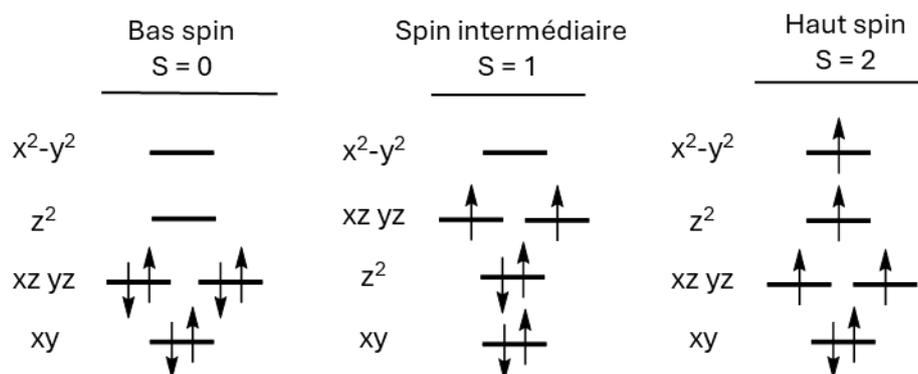


Figure 4.1. Configurations électroniques possibles des porphyrines ferreuses Fe^{II} .

La spectroscopie UV-visible, en fonction des longueurs d'onde des maxima d'absorption observés, permet de déterminer l'état de spin d'une porphyrine ferreuse Fe^{II} seule ou en présence de dioxygène ou de monoxyde de carbone. Ainsi, une porphyrine ferreuse Fe^{II} pentacoordinée présente une bande de Soret autour de 440 nm, tandis que la bande de Soret d'une porphyrine ferreuse Fe^{II} hexacoordinée se situe plutôt autour de 420 nm.^{105,113} A titre d'exemple, le spectre de la désoxymyoglobine pentacoordinée haut spin présente une Soret à 434 nm et une première bande Q à 556 nm, alors que l'oxymyoglobine présente une bande de Soret à 418 nm et une bande Q à 542 nm.¹¹⁴ De la même manière que l'oxymyoglobine, la carboxymyoglobine hexacoordinée bas spin présente une Soret à 423 nm et une bande Q à 540 nm.¹¹⁴ Les propriétés spectrales de la myoglobine réduite, oxygénée et carbonylée seront utilisées comme points de comparaison avec celles des composés modèles **30/Fe^{II}-21**, **Cu^I-30/Fe^{II}-21** et **22/Fe^{II}-31** réduits dont les études avec le monoxyde de carbone et le dioxygène sont présentées ci-après.

I.2. Complexes d'inclusion **30/Fe^{II}-21** et **Cu^I-30/Fe^{II}-21**

Afin d'étudier les propriétés de coordination du complexe **30/Fe^{II}-21**, le complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21**, inactif vis-à-vis du dioxygène et du monoxyde de carbone, a été tout d'abord dû être réduit. Pour ce faire, un excès de dithionite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, réducteur assez puissant pour réduire le site ferrique Fe^{III} en site ferreux Fe^{II} ,¹¹⁵ a été ajouté dans une

solution aqueuse désoxygénée et tamponnée à pH 7 du complexe **30/Fe^{III}-21**. La réduction du complexe **30/Fe^{III}-21** ferrique initial (courbe verte, **Figure 4.2**), entraîne un déplacement bathochrome de la bande de Soret de 418 nm à 432 nm avec un effet hyperchrome très marqué, tandis que la bande Q à 573 nm subit un déplacement hypsochrome à 555 nm aussi accompagné d'un effet hyperchrome (courbe noire, **Figure 4.2**). Les propriétés spectrales du complexe d'inclusion **30/Fe^{II}-21** réduit sont similaires à celle de la désoxymyoglobine pentacoordinée, le complexe **30/Fe^{II}-21** désoxygéné possède donc un site ferreux Fe^{II} pentacoordiné haut spin. Comme son analogue **30/Fe^{III}-21** ferrique, le complexe **30/Fe^{II}-21** ferreux est donc sûrement coordonné à un ion hydroxyde dans l'eau tamponnées à pH 7.

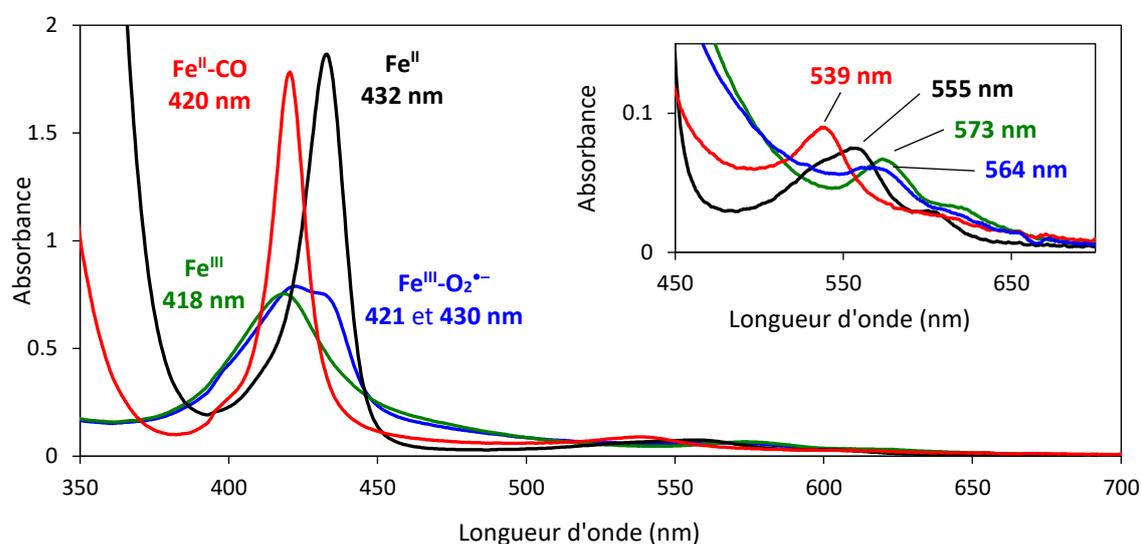


Figure 4.2. Spectres UV-visible du complexe d'inclusion de **30/Fe^{III}-21** oxydé en vert (environ 8 µM), **30/Fe^{II}-21** réduit en noir et **30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé en rouge à température ambiante et **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné en bleu à 10 °C dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7.

Afin de former le complexe **30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé, du monoxyde de carbone a été barboté pendant 2 min dans la solution de complexe **30/Fe^{II}-21** réduit. La coordination du monoxyde carbone provoque un déplacement hypsochrome de la bande de Soret jusqu'à 420 nm et de la bande Q à 539 nm (courbe noire, **Figure 4.2**). Les propriétés spectrales du complexe **30/21-Fe^{II}-CO** sont proches de celles de la carboxymyoglobine. Comme cette dernière, le complexe **30/21-Fe^{II}-CO** est donc sûrement hexacoordiné bas spin. En plus du monoxyde de carbone, une molécule d'eau est donc sûrement coordonnée au site ferreux Fe^{II} du complexe **30/21-Fe^{II}-CO**.

Avant de former le complexe **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné, il est nécessaire d'éliminer l'excès de dithionite Na₂S₂O₄, qui en présence d'oxygène génère des espèces oxygénées

partiellement réduites pouvant dégrader le complexe d'inclusion **30/Fe^{II}-21** et ses dérivés. Dans cette optique, l'excès de Na₂S₂O₄ a été éliminé en utilisant une colonne Sephadex G-25 selon deux méthodes. Suivant la première méthode décrite dans la littérature entre autres par les groupes de Pr. H. Kitagishi et Pr. T. Hayashi,^{74,116} la colonne est effectuée en condition aérobie, permettant de récupérer directement une solution de complexe **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné, qui est ensuite immédiatement analysée. Dans la seconde méthode, une solution concentrée du complexe **30/Fe^{II}-21** réduit est tout d'abord préparée puis filtrée sur colonne Sephadex G-25 en condition inerte dans une boîte à gant. L'échantillon est ensuite introduit dans une cellule de type Schlenk à l'intérieur de la boîte à gant, puis est dilué dans un tampon oxygéné à l'extérieur de la boîte à gant.

Le meilleur spectre du complexe **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné a été obtenu avec la seconde méthode, en diluant le complexe **30/Fe^{II}-21** désoxygéné dans un tampon saturé à l'air, refroidi à 10 °C (courbe bleue, **Figure 2.2**). Après dilution, l'échantillon fraîchement oxygéné a été placé dans la chambre du spectromètre thermostaté à 10°C, et son spectre a ensuite immédiatement été enregistré. D'un côté, le dédoublement de la bande de Soret à 421 et 430 nm montre qu'au moins deux espèces sont présentes dans cet échantillon. D'après ces longueurs d'onde les espèces observées correspondent sûrement à un mélange des complexes **30/Fe^{II}-21** réduit et peut être **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné. D'un autre côté, en se focalisant sur la région des bandes Q, zone particulièrement sensible au changement de degré d'oxydation, on observe que la bande à 564 nm est plutôt éloignée de celle de l'oxymyoglobine à 542 nm. De plus la longueur d'onde à 564 nm, proche de celle du complexe **30/Fe^{III}-21** oxydé, laisse entrevoir que cette troisième espèce est aussi sûrement présente dans l'échantillon. A cause de ce mélange d'espèces, la réaction d'échange de ligand dioxygène/monoxyde de carbone, habituellement utilisée pour confirmer la formation des complexes oxygénés, n'a pas été effectuée.

Les complexes d'inclusion fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{II}-21** désoxygéné, **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé et **Cu^I-30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné ont ensuite été formés en reproduisant les mêmes expériences que celles utilisées pour former les complexes **30/Fe^{II}-21** désoxygéné, **30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé et **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné sans cuivre. Dans ce cas, la Na₂S₂O₄ permet à la fois de réduire les sites ferrique **Fe^{III}** et cuivrique **Cu^{II}** en sites ferreux **Fe^{II}** et cuivreux **Cu^I**.¹¹⁵

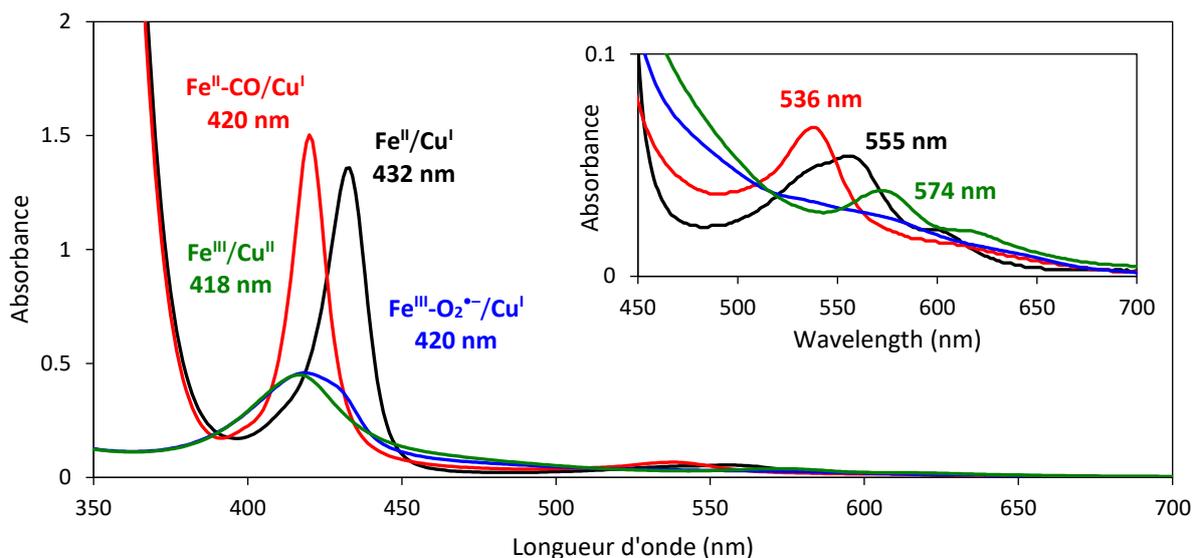


Figure 4.3. Spectres UV-visible du complexe d'inclusion de **Cu^I-30/Fe^{II}-21** oxydé en vert (environ 6 μ M), **Cu^I-30/Fe^{II}-21** réduit en noir et **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé en rouge à température ambiante et **Cu^I-30/21-Fe^{III}-O₂⁻** oxygéné en bleu à 10 °C dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7.

Les spectres des espèces **Cu^I-30/Fe^{II}-21** désoxygénée et **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO** carbonylée sont semblables à ceux obtenus pour le même complexe sans cuivre (courbes noire et rouge, **Figure 4.3**). Comme pour leur analogue sans cuivre, le complexe **Cu^I-30/Fe^{II}-21** désoxygéné, avec une Soret à 432 nm, est pentacoordiné haut spin, tandis que le complexe **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé, avec une Soret à 420 nm, est hexacoordiné bas spin. Cependant, bien que la bande Soret du complexe **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO** carbonylé à 420 nm ait la même longueur d'onde que celle du complexe **30/21-Fe^{II}-CO** sans cuivre, sa première bande Q à 536 nm est décalée de 3 nm dans le bleu (**Tableau 4.1**). D'après des études effectuées par le groupe de Momenteau, avec une série de porphyrines à anse ayant un site distal plus ou moins encombré, plus le site distal de la porphyrine est encombré, plus la bande Q du complexe carbonylé associé est déplacée vers le bleu.¹¹⁷ Les auteurs concluent que ce déplacement hypsochrome est dû à une distorsion du mode de coordination préférentiel du monoxyde de carbone (coudé plutôt que linéaire). Le déplacement hypsochrome de la bande Q de 539 nm à 536 nm pourrait donc indiquer que la coordination du monoxyde de carbone est plus distordue dans le complexe **Cu^I-30/21-Fe^{II}-CO**, ayant un atome de cuivre encombrant son site distal, que dans le **30/21-Fe^{II}-CO**. Néanmoins, même si ce déplacement suggère que dans le complexe **30/21-Fe^{II}-CO** au moins une partie du monoxyde de carbone se coordine en position distale, il peut, tout comme le dioxygène, aussi se coordiner sur le site proximal de la porphyrine ferreuse **Fe^{II}**, non encombré par une base axiale.

Tableau 4.1. Comparaison de la bande de Soret et la première bande Q des complexes d'inclusion **30/Fe-21**, **Cu-30/Fe-21** et **Cu-27/Fe-21**⁷⁴ dans leur état oxydé, réduit, carbonylé et oxygéné.

Composés	30/Fe-21	Cu-30/Fe-21	Cu-27/Fe-21 ⁷⁴
Soret (nm)			
Oxydé	418	418	418
Réduit	432	432	431
Carbonylé	420	420	420
Oxygéné	"421/430"	"420"	419
1^{ere} Bande Q (nm)			
Oxydé	573	574	565
Réduit	555	555	555
Carbonylé	539	536	542
Oxygéné	"564"	-	538

Concernant la coordination du dioxygène, comme avec son analogue sans cuivre **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}**, le meilleur spectre obtenu du complexe **Cu^I-30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné est en réalité un mélange de plusieurs espèces (courbe bleue, **Figure 4.3**). Cet échantillon a été obtenu en utilisant la même méthode et analysé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour former le complexe **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné sans cuivre. Cette fois, une seule bande de Soret à 420 nm est observée, alors qu'aucune bande Q n'est apparente, probablement à cause du mélange de plusieurs espèces : les complexes **Cu^I-30/Fe^{II}-21** réduit, **Cu^I-30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** superoxo ou **30-Cu^I-O₂-Fe^{III}-21** peroxo oxygénés et **Cu^I-30/Fe^{II}-21**. A cause de ce mélange, aucune réaction d'échange de ligand dioxygène/monoxyde de carbone n'a été effectuée. Les bandes de Soret des complexes oxygénés **Cu^I-30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** avec et **30/21-Fe^{III}-O₂^{•-}** sans cuivre, respectivement situées à 420 nm et 421 nm, sont néanmoins très proches de celle observée à 419 nm pour le précédent complexe d'inclusion fer/cuivre **Cu^I-27/Fe^{III}-21-O₂^{•-}** peroxo publié en collaboration avec le groupe du Pr. H. Kitagishi⁷⁴ (**Tableau 4.1**).

I.3. Complexe d'inclusion **22/Fe^{II}-31**

Il a été vu précédemment que la solubilité du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** était relativement réduite en milieu taponné par des ions phosphate à pH 7. Cependant, le milieu moins concentré (10 µM) que celui utilisé pour les tests de solubilité (0,5 mM), permet d'étudier le complexe d'inclusion en spectroscopie UV-visible en milieu tamponné à pH 7 avec environ 0,25 % de méthanol. Pour cela, une solution concentrée du complexe d'inclusion

22/Fe^{II}-31 (1 mM) a été préparée en mélangeant 1 équivalent de la porphyrine **Fe-31** et 1,1 équivalent du dimère de Me-O- β -CD **22** dans un mélange 1:3 méthanol/tampon de phosphate (0,05 M) tamponné à pH 7. Cette solution est ensuite diluée par 100 afin d'obtenir le premier spectre UV-visible du complexe **22/Fe^{III}-31** oxydé (courbe verte, **Figure 4.4**). Ce composé présente dans l'eau tamponnée à pH 7 contenant 0,25 % de méthanol une bande de Soret à 428 nm et une bande Q à 580 nm.

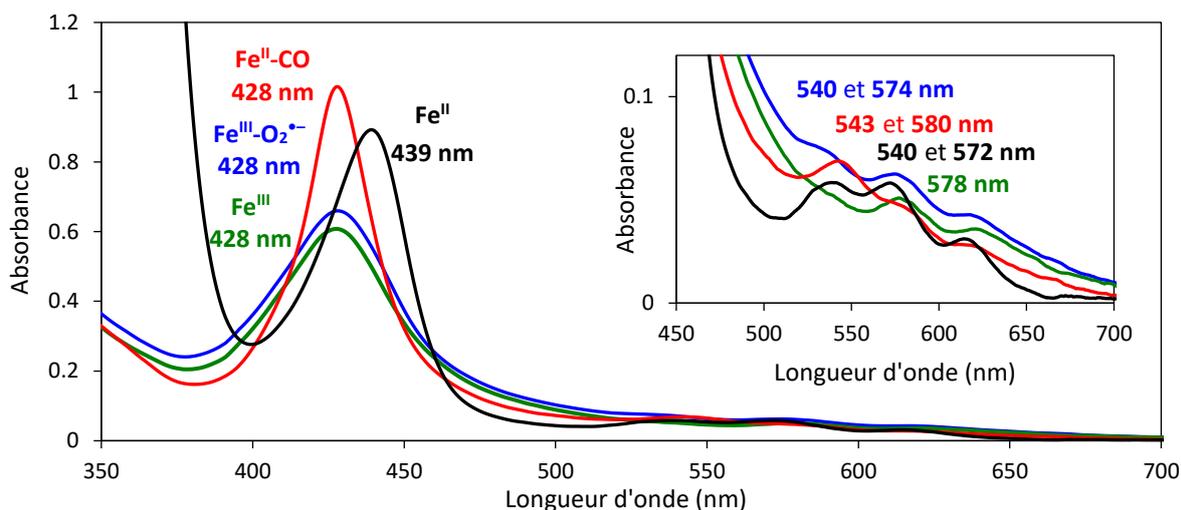


Figure 4.4. Spectres UV-visible du complexe d'inclusion de **22/Fe^{III}-31** oxydé en vert (environ 10 μ M), **22/Fe^{II}-31** réduit en noir et **22/31-Fe^{II}-CO** carbonylé en rouge à température ambiante et **22/31-Fe^{III}-O₂⁻** oxygéné en bleu à 10 °C dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7 contenant environ 0,25 % de méthanol.

Comme précédemment, le complexe **22/Fe^{II}-31** a été réduit en ajoutant un excès de dithionite dans une solution dégazée à l'argon de complexe **22/Fe^{III}-31** initialement oxydé. L'espèce **22/Fe^{II}-31** désoxygénée obtenue présente une bande de Soret à 439 nm et une première bande Q à 540 nm (courbe noire, **Figure 4.4**). Ces bandes sont typiques d'un complexe ferreux **Fe^{II}** pentacoordiné haut spin. En solution aqueuse, le site ferreux **Fe^{II}** de la porphyrine **Fe^{II}-31** est donc sûrement coordonné à la pyridine du dimère de Me-O- β -CD **22**. Par ailleurs, une deuxième bande Q relativement intense a été observée à 572 nm. Cette bande, proche de celle du complexe **22/Fe^{III}-31** initial, pourrait correspondre à une impureté oxydée.

Le complexe **22/31-Fe^{II}-CO** carbonylé a cette fois-ci été préparé à partir d'une solution de complexe **22/Fe^{II}-31** fraîchement réduit et filtré en boîte à gant, afin de limiter la contamination de cet échantillon par des espèces **22/Fe^{III}-31** oxydées. La solution concentrée du complexe **22/Fe^{II}-31** a ensuite été introduite dans une cellule de type Schlenk à l'intérieur de la boîte à gant, puis une fois la cellule à l'extérieur, l'échantillon a été dilué dans le tampon

saturé en monoxyde de carbone. L'insertion du monoxyde de carbone sur le complexe **22/Fe^{II}-31** initialement réduit provoque un déplacement hypsochrome de la bande de Soret à 428 nm caractéristique de la formation d'un complexe hexacoordiné bas spin (courbe rouge, **Figure 4.4**). Dans la région des bandes Q, la première bande à 543 nm semble cohérente avec la formation du complexe **22/31-Fe^{II}-CO** carbonylé, alors que l'épaulement observé à environ 580 nm correspond potentiellement à des traces de complexe **22/Fe^{III}-31** oxydé.

Pour finir, le complexe **22/31-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné a été préparé de la même manière que les précédents complexes oxygénés, à partir d'une solution concentrée de complexe **22/Fe^{II}-31** fraîchement réduit en boîte à gant. Le spectre du complexe **22/31-Fe^{III}-O₂^{•-}** oxygéné enregistré à 10 °C présente une bande de Soret à 428 nm et trois bandes Q à 540, 574 et 623 nm (courbe bleue, **Figure 4.4**). La bande Q à 540 nm pourrait correspondre au complexe oxygéné tandis que celle à 574 nm semble appartenir au complexe **22/Fe^{III}-31** oxydé.

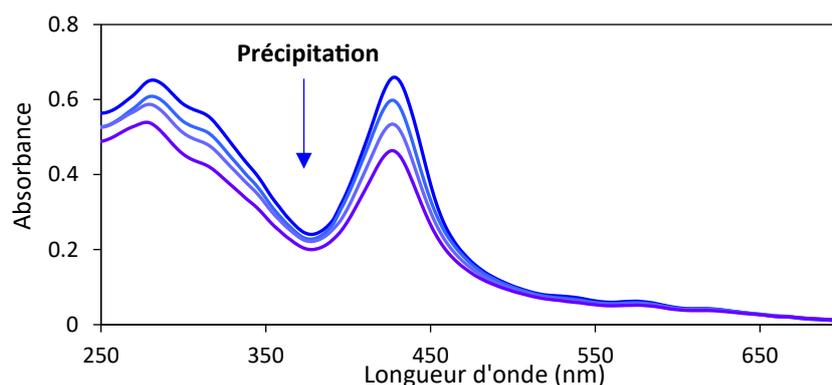


Figure 4.5. Précipitation d'un dérivé du complexe oxygéné **22/31-Fe^{III}-O₂^{•-}** (environ 10 µM) dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH = 7 contenant environ 0,25 % de méthanol.

Une fois de plus, du fait de la grande sensibilité de ce complexe au dioxygène, il n'a pas été possible d'observer sa forme oxygénée pure. De plus, après exposition au tampon oxygéné, un précipité a systématiquement été observé (**Figure 4.5**). Cette précipitation est probablement due au désassemblage du dimère de Me-O-β-CD **22** et de la porphyrine **Fe^{III}-31**. En effet, les groupes méthyle sur les bords et la paroi carbonnée de la cavité des Me-O-β-CD sont polarisés positivement, en raison de l'effet inductif des oxygènes éthers.⁶¹ Après réoxydation de la porphyrine ferrique **Fe^{III}-31**, la répulsion électronique entre ces groupes méthyles et la cavité des Me-O-β-CDs et le site ferrique **Fe^{III}**, chargé positivement, de la porphyrine **Fe^{III}-31**, entraînerait un désassemblage du complexe **22/Fe^{III}-31**. Après désassemblage, la porphyrine **Fe^{III}-31** libre, non soluble dans l'eau, pourrait ainsi précipiter.

I.4. Récapitulatif

Les complexes **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** dans leurs états réduit et carbonylé ont pu être caractérisés par spectroscopie UV-visible. D'après les déplacements observés, tous les complexes réduits sont pentacoordinés haut spin alors que les complexes carbonylés associés sont hexacoordinés bas spin. Néanmoins, il n'a pas été possible d'identifier clairement les dérivés oxygénés des complexes **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31**, probablement à cause de leur auto-oxydation rapide en milieu aqueux.

II. Etude des complexes d'inclusion dimère de cyclodextrines/porphyrine par électrochimie

Les métallo-porphyrines sont au cœur de nombreux processus biologiques mettant en jeu des transferts d'électrons (chaîne respiratoire, photosynthèse...). Dans le site actif du cytochrome *c* oxydase, deux sites métalliques redox actifs, la porphyrine de fer et le cuivre, sont impliqués dans ce type de processus électronique et catalysent coopérativement la réduction du dioxygène en eau. Cette réaction redox catalysée par l'enzyme ou des composés modèles peut ainsi être étudiée en électrochimie.

Dans cette optique, les modèles de cytochrome *c* oxydase **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** solubles en milieux aqueux ont été étudiés en solution homogène par voltampérométrie cyclique et en phase hétérogène adsorbés sur une électrode rotative à disque anneau par voltampérométrie hydrodynamique. Concernant les modèles **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32** solubles en milieu organique, leurs études par voltampérométrie cyclique en milieu organique étant toujours en cours, seuls les résultats obtenus lors des expériences avec une électrode rotative à disque anneau seront présentés. L'ensemble de ces mesures électrochimiques a été réalisé en collaboration avec le Pr. C. Boudon, du laboratoire d'Electrochimie et Chimie Physique du Corps Solide à l'Institut de Chimie de Strasbourg.

II.1. Etude par voltampérométrie cyclique

Les complexes d'inclusion **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31**, modèles de cytochrome *c* oxydase, ont tout d'abord été étudiés par voltampérométrie cyclique sous argon (**Figure 4.6**). Les complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** (0,5 mM) ont été étudiés en milieu tamponnée à pH 7 par des ions phosphate (0,05 M) tandis que le complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-**

31 (0,5 mM) moins soluble en milieu tamponné a été étudié dans un mélange 1:2 méthanol/tampon de phosphate (0,05 M) à pH 7. Le sulfate de sodium Na₂SO₄ (0,5 M) a été utilisé comme électrolyte support. Par ailleurs, une électrode saturée au calomel (ECS) a été utilisée comme référence. Tous les potentiels sont donnés par rapport à cette référence.

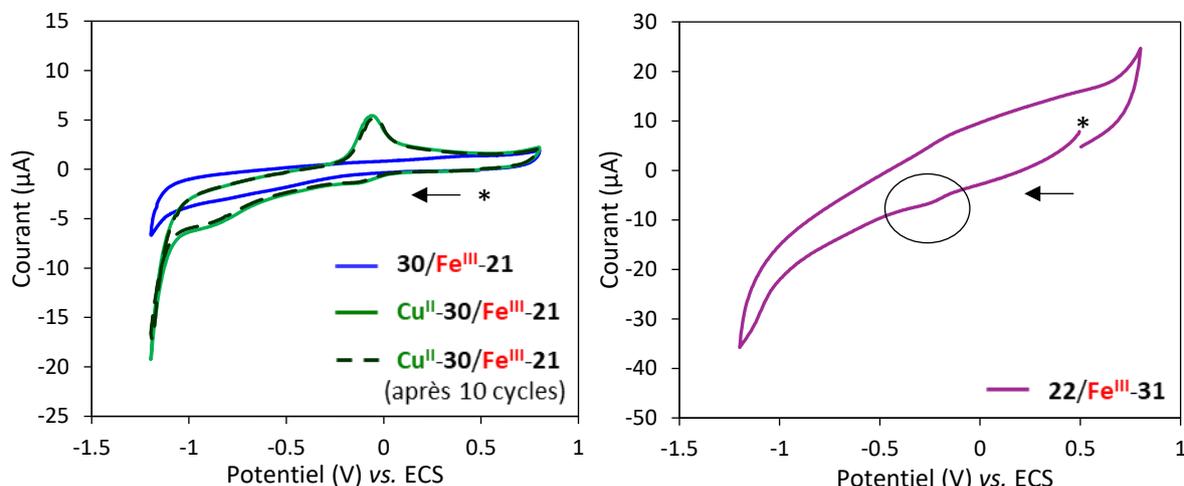


Figure 4.6. Voltampérogrammes des complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** dans un tampon de phosphate (0,05 M) à pH 7 (+ Na₂SO₄ 0,5 M) dégazé à l'argon (à gauche) et du complexe **22/Fe^{III}-31** dans un mélange 1:2 méthanol/tampon de phosphate (0,05 M) à pH 7 (+ Na₂SO₄ 0,5 M) dégazé à l'argon (à droite).

Alors que le potentiel d'oxydoréduction du couple **Fe^{III}/Fe^{II}** de la porphyrine **Fe^{III}-21** coordiné à une molécule d'eau a été estimé à $-0,23$ V (vs. ECS) dans l'eau de pH 1 à 7 par Meyer et ses collaborateurs,¹¹⁸ le voltampérogramme du complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** sans cuivre ne présente aucune vague d'oxydoréduction (à gauche en bleu, **Figure 4.6**). Le même résultat a par ailleurs été obtenu en enregistrant le voltampérogramme du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31** (à droite en violet, **Figure 4.6**). D'après des études effectuées par le groupe du Pr. H. Kitagishi sur un complexe d'inclusion Me-O- β -CD/porphyrine de manganèse **Mn^{III}-21** en voltampérométrie cyclique,¹¹⁹ les Me-O- β -CDs, entourant la métallo-porphyrine **Mn^{III}-21** rédox active, inhiberaient la détection du signal électrochimique. Ce serait donc pour cette même raison qu'aucun signal associé au couple **Fe^{III}/Fe^{II}** n'a pu être détecté lors de l'étude en solution des complexes **30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31**. En outre, malgré l'ajout de 33 % de méthanol dans la solution aqueuse du complexe **22/Fe^{III}-31**, un précipité a été observé, associé à une vague à $-0,25$ V (à droite entourée, **Figure 4.6**). Ce phénomène, similaire à celui observé lors des précédentes études par spectroscopie UV-visible, semble confirmer que les changements de charge d'un site ferreux **Fe^{II}** à site ferrique **Fe^{III}** provoquent le désassemblage

du complexe d'inclusion **22/Fe^{III}-31**. En conséquence, les études en solution n'ont pas été poursuivies avec ce complexe.

Le voltampérogramme du complexe d'inclusion fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** présente un pic anodique $E_{p_a} = -0,06$ V (vs. ECS) mieux résolu que le pic cathodique (à gauche en vert, **Figure 4.6**). Cette non-réversibilité indique que le site cuivrique **Cu^{II}** est probablement partiellement réduit en ion cuivreux **Cu^I**. Par ailleurs, le voltampérogramme du catalyseur **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** reste inchangé après 10 cycles d'oxydoréduction, le cuivre ne semble donc pas se décoordonner dans ces conditions (à gauche en vert pointillé, **Figure 4.6**).

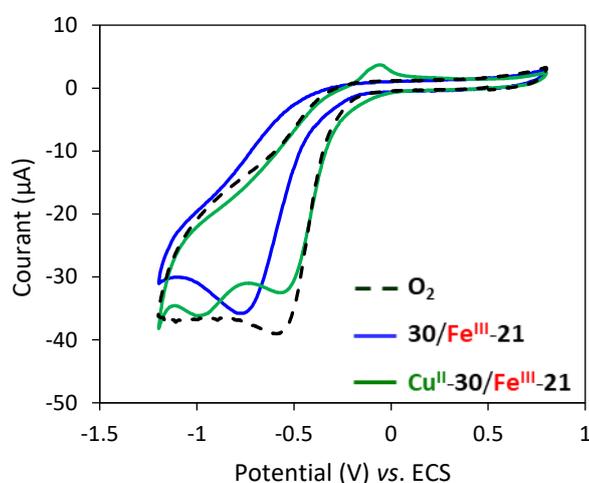


Figure 4.7. Voltampérogrammes de la réduction du dioxygène non catalysé en pointillé noir, et catalysé par les complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** dans un tampon phosphate (0,05 M) à pH 7 (+ Na₂SO₄ 0,5 M) saturé en dioxygène.

Ces études par voltampérométrie cyclique ont été poursuivies pour les deux complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** en solution aqueuse saturée avec du dioxygène dans les mêmes conditions que les expériences sous argon (**Figure 4.7**). Les voltampérogrammes des complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** présentent un pic cathodique irréversible de grande intensité, correspondant à la réduction du dioxygène catalysée. A première vue, les potentiels des pics cathodiques associés à la réduction du dioxygène catalysé par les complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** étant déplacés cathodiquement par rapport à celui de la réduction du dioxygène non catalysée, la réduction du dioxygène ne semble pas être facilitée d'un point de vue énergétique. Cependant, en y regardant de plus près, dans le cas du complexe fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, il est possible de distinguer que le potentiel d'amorçage de son pic cathodique à environ $E = -0,1$ V (vs. ECS) est déplacé anodiquement par rapport à celui de la réduction du dioxygène non catalysée à environ $-0,2$ V (vs. ECS). En

présence du catalyseur $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, une moins grande surtension, associée à un coût énergétique plus faible, est donc nécessaire pour enclencher le processus catalytique. En revanche, le potentiel d'amorçage associé à la réduction du dioxygène catalysé par le complexe $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ sans cuivre est le même que celui observé sans catalyseur. L'utilisation de ce complexe ne facilite donc pas la réduction du dioxygène d'un point de vue énergétique.

Quoiqu'il en soit, il est important de noter que le pic associé à la réduction du dioxygène non catalysé correspond à la réduction bi-électronique du dioxygène en peroxyde d'hydrogène. En admettant que nos systèmes catalysent préférentiellement le dioxygène en eau, il reste donc difficile de formellement comparer le potentiel de leurs pics cathodiques à celui de la réduction du dioxygène non catalysé en peroxyde d'hydrogène. Afin de déterminer par quelle voie les catalyseurs $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ et $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ réduisent préférentiellement le dioxygène des études par voltampérométrie hydrodynamique ont été entreprises. Ces études, présentées dans la partie qui suit, ont aussi été effectuées avec les catalyseurs $\text{22/Fe}^{\text{III}}\text{-32}$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-32}$ et $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-32}$.

II.2. Etude par voltampérométrie hydrodynamique

II.2.1. Electrode rotative à disque anneau

Afin d'étudier la sélectivité de nos catalyseurs dans la réaction de réduction du dioxygène, une électrode rotative à disque anneau a été utilisée. Cette électrode est largement utilisée pour étudier la réduction du dioxygène, car elle permet de détecter la production de peroxyde d'hydrogène. L'électrode est constituée d'un disque en graphite pyrolytique, où le catalyseur peut être déposé, et d'un anneau en platine. Pendant la mesure, le potentiel du disque se déplace vers des valeurs plus négatives afin de pouvoir réduire l'oxygène. La rotation de l'électrode permet d'apporter de manière constante du dioxygène à réduire au niveau du disque. Dans le même temps, cette rotation permet au peroxyde d'hydrogène formé de diffuser vers l'anneau dont le potentiel est fixé à 0,8 V (vs. ECS) afin de pouvoir rapidement le réoxyder. Grâce à ce système, le pourcentage de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 % formé et le nombre d'électrons moyen n impliqué dans l'électro-réduction du dioxygène peuvent être calculés selon l'équation (éq. 4).¹²⁰

$$n = \frac{4I_d N_c}{I_d N_c + I_r} = \frac{4 - 2 \text{ H}_2\text{O}_2\%}{100} \quad (\text{éq. 4})$$

Avec :

n Nombre moyen d'électrons

I_d Courant limite du disque en A

I_r Courant limite de l'anneau A

N_c Facteur de collection

Cette équation dépend des courants limites du disque I_d et de l'anneau I_r détectés durant l'électro-catalyse, ainsi que du facteur de collection N_c de l'électrode. En effet, durant l'électro-réduction du dioxygène, lorsque du peroxyde d'hydrogène est produit, seulement une partie atteint l'anneau et est donc réoxydé et détecté. Le facteur N_c peut être calculé selon l'équation (éq. 5) en mesurant les courants de l'anneau et du disque durant l'électro-réduction du dioxygène sans catalyseur, produisant exclusivement du peroxyde d'hydrogène. Avec notre système, il a été estimé à 0,21.¹²⁰

$$N_c = \frac{I_r}{I_d} \quad (\text{éq. 5})$$

Dans le cadre de ce travail, toutes les mesures de voltampérométrie hydrodynamique ont été effectuées en plongeant l'électrode rotative à disque anneau dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7 par des ions phosphates (0,05 M) et saturée en dioxygène, avec comme électrolyte support du Na_2SO_4 (0,5 M). La vitesse de rotation de l'électrode a été fixée à 100 RPM. Les catalyseurs **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32** (2,5 nmol) solubles en milieu organique ont simplement été adsorbés sur le disque, alors qu'afin d'empêcher la désorption des catalyseurs **30/Fe^{III}-21**, **Cu^I-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-32** solubles dans l'eau (2,5 nmol), leurs dépôts ont été recouverts avec une membrane protectrice échangeuse d'ion (Nafion, 10 μL).

Le signal obtenu en régime hydrodynamique lors de la réduction du dioxygène sans catalyseur est représenté en noir **Figure 4.8**. En bas, on observe les courants associés à la réduction bi-électronique du dioxygène en fonction du balayage de potentiel. En haut, on observe le courant associé à la réoxydation du peroxyde d'hydrogène en fonction du même balayage.

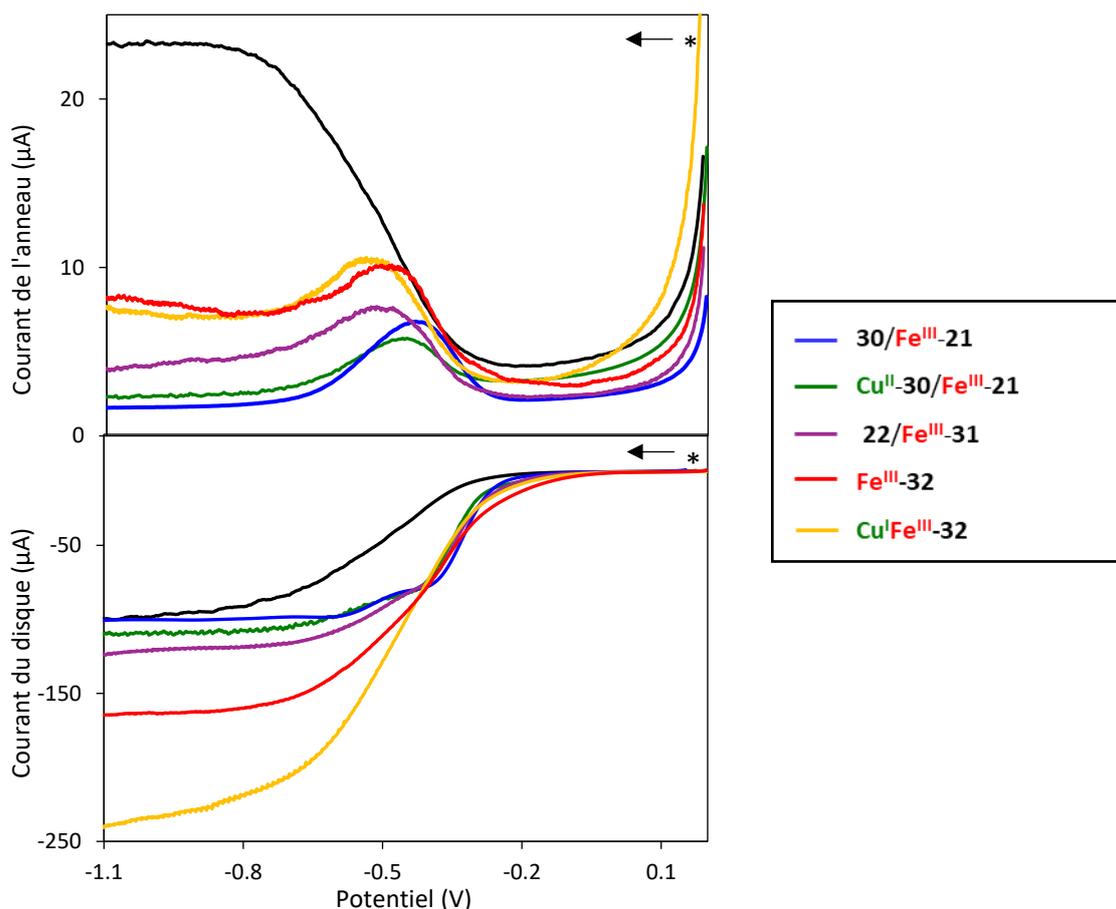


Figure 4.8. Courants du disque (en bas) et de l'anneau (en haut) d'une électrode rotative à disque anneau, modifiée sur le disque par l'adsorption des différents catalyseurs en fonction du potentiel imposé au disque dans un tampon de phosphate (0,05) à pH 7 (+ Na₂SO₄ 0,5 M) saturé en dioxygène.

Les voltampérogrammes stationnaires des catalyseurs **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, **22/Fe^{III}-32**, **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32** sont représentés de la même façon **Figure 4.8**. Pour les catalyseurs **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32**, il s'agit du premier voltampérogramme enregistré, car dès le deuxième voltampérogramme, les courants limites obtenus en réduction (au niveau du plateau) se sont révélés inférieurs d'au moins 25 % à ceux obtenus pour le premier voltampérogramme (en bas, **Figure 4.8**). Par ailleurs, dans des expériences non présentées avec les catalyseurs **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32** recouverts par une membrane Nafion, des diminutions de signaux similaires ont aussi été observées. La dégradation de ces catalyseurs, par des espèces radicalaires partiellement réduites formées durant l'électro-catalyse, est donc probablement responsable de cette diminution. La dégradation de catalyseurs non fonctionnalisés en position méso, et donc sensibles à l'oxydation, a déjà été documentée dans la littérature.¹⁶ Ce phénomène de dégradation n'a pas été observé avec les catalyseurs **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-32**.

Quoi qu'il en soit, pour tous les catalyseurs, les courants limites d'oxydation (à l'anneau) sont plus faibles que ceux observés lors la réduction di-électronique du dioxygène sans catalyseur (en haut, **Figure 4.8**). Tous les catalyseurs semblent donc réduire, au moins en partie, le dioxygène en eau par voie tétra-électronique. Toujours en oxydation, on observe néanmoins, qu'entre les potentiels d'environ -0,3 et -0,7 V (vs. ECS) les catalyseurs produisent une plus grande quantité de peroxyde d'hydrogène qu'au niveau du plateau. En début d'électro-catalyse les catalyseurs semblent donc tout d'abord réduire le dioxygène en peroxyde d'hydrogène qui est réoxydé et détecté à l'anneau. Ensuite, à partir d'environ -0,6 V (vs. ECS), la décroissance des signaux de l'anneau indique que dès qu'une surtension suffisante est atteinte, les catalyseurs sont probablement capables de réduire le peroxyde d'hydrogène formé. Passé ce potentiel, une partie du peroxyde d'hydrogène semble donc être réduit en eau et, en conséquence, ne peut plus être réoxydé et détecté par l'anneau. Malgré cette approximation, le nombre moyen d'électrons impliqués dans l'électro-réduction du dioxygène, ainsi que le pourcentage de peroxyde d'hydrogène ont été calculés à partir de l'équation (éq. 4) pour chaque catalyseur à -1 V et sont présentés dans le **Tableau 4.2**.

Tableau 4.2 Comparaison des nombres d'électrons moyens échangés et du pourcentage d'eau et de peroxyde d'hydrogène produit à -1 V.

Catalyseur	Nombre d'électrons échangés	% H ₂ O	% H ₂ O ₂
30/Fe ^{III} -21 + Nafion	3,5	75	25
Cu ^{II} -30/Fe ^{III} -21 + Nafion	3,6	80	20
22/Fe ^{III} -31 + Nafion	3,4	70	30
Cu ^{II} -27/ Fe ^{III} -21 + Nafion ⁷⁴	3*	50	50
Fe ^{III} -32	3,2	60	40
Cu ^I Fe ^{III} -32	3,5	75	25
Fe ^{III} -56 ^{76a}	3,3	65	35
Cu ^I Fe ^{III} -56 ^{76a}	3,5	75	25

*Valeur issue de la littérature calculée à -1,2 V.

S'agissant des complexes Fe^{III}-32 et Cu^IFe^{III}-32 solubles en milieu organique, le nombre d'électrons moyen (3,2 vs. 3,5 e⁻) impliqué dans l'électro-catalyse indique clairement que le cuivre participe aussi à la réduction du dioxygène et contribue à la sélectivité du modèle Cu^IFe^{III}-32. Ces valeurs sont similaires à celles observées avec les porphyrines à anses

phénanthroline **Fe^{III}-56** et **Cu^IFe^{III}-56** développées par Dr. F. Melin associées au *N*-méthylimidazole (**Figure 4.9/Tableau 4.2**).^{76a} Avec le complexe, **Cu^IFe^{III}-32** le dioxygène pouvant aussi se coordiner sur le site proximal sans atome de cuivre, l'utilisation d'une base axiale pourrait permettre d'encore améliorer sa sélectivité pour la réduction tétra-électronique du dioxygène. Pour valider cette hypothèse, des expériences avec du *N*-méthylimidazole comme base axiale pour le fer seront prochainement effectuées.

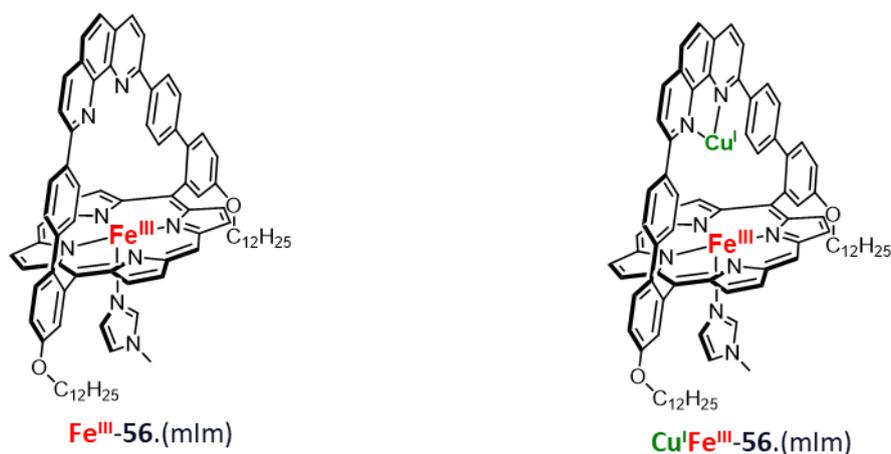


Figure 4.9. Structure moléculaire des porphyrines à anse **Fe^{III}-56** et **Cu^IFe^{III}-56** coordonnées au *N*-méthylimidazole (mlm) en position proximale.

Pour des modèles **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** sans cuivre, les nombres d'électrons moyens impliqués dans l'électro-réduction du dioxygène catalysé sont très proches (3,6 vs. 3,5 e⁻). Les études de voltampérométrie cyclique ont montré que l'ion cuivrique **Cu^{II}** est seulement partiellement réduit en ion cuivreux **Cu^I** durant l'électro-catalyse. Ce comportement pourrait expliquer son faible impact sur la sélectivité de la réaction. Le modèle **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** réduit néanmoins plus sélectivement le dioxygène en eau que le précédent modèle **Cu^{II}-27/Fe^{III}-21**, avec une terpyridine, développé par le Pr. H. Kitagishi (3,6 vs. 3 e⁻).⁷⁴ Il est néanmoins important de noter que le Nafion peut aussi avoir une incidence sur la sélectivité de la catalyse. Dans certains cas, son utilisation peut entraîner une baisse de sélectivité par rapport aux expériences effectuées en solution homogène sans dépôt.¹²¹ Quoiqu'il en soit, l'une des limitations de ces modèles est l'absence de base proximale coordonnée au fer, empêchant le dioxygène de se coordiner sur ce site. Un essai de préparation d'un complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** coordonné à un dérivé d'imidazole a été effectué, mais ce type de base azotée formant aussi des complexes d'inclusion avec les Me-O- β -CD,¹²² son ajout en solution

a provoqué le désassemblage du complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$. Des essais avec des bases azotées plus encombrées et solubles dans l'eau pourraient à l'avenir être explorés.

Pour finir, la sélectivité du complexe $\text{22/Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ ayant une base proximale pyridine ne s'est pas révélée meilleure que celles de ces deux analogues solubles dans l'eau, avec une moyenne d'électrons impliqués dans l'électro-réduction du dioxygène de seulement 3,4. Cette estimation reste néanmoins très proche du nombre d'électrons moyen calculé pour l'électro-réduction du dioxygène catalysé par les modèles $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ et $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$. Pour tenter de préciser ces résultats, une deuxième méthode permettant de calculer plus précisément le nombre d'électrons moyen impliqué dans l'électroanalyse a été explorée : l'analyse de Koutecky-Levich. Les résultats obtenus à partir de cette analyse sont présentés ci-après.

II.2.2. Analyse de Koutecky-Levich

L'analyse de Koutecky-Levich permet, en mesurant les courants du disque à un potentiel fixe en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode, de remonter au nombre d'électrons moyen impliqué dans l'électro-réduction selon l'équation (éq. 6).¹²³

$$\frac{1}{I_m} = \frac{1}{I_k} + \frac{1}{B_L} \omega^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{éq. 6})$$

Avec :

I_m courant mesuré en A

I_k courant cinétique en A

B_L paramètre de Levich

ω Rotation angulaire en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$

La représentation graphique de cette équation (I_m^{-1}) = $f(\omega^{-1/2})$ conduit à une droite dont la pente $1/B_L$ est inversement proportionnelle au nombre d'électrons échangés. Cette analyse nécessite donc d'enregistrer des courbes à différentes vitesses de rotation de l'électrode à disque-anneau. Pour cela, cinq vitesses de rotation (100, 200, 300, 400 et 500 RPM) ont été choisies. Les mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales et avec la même électrode que dans les expériences de voltampérométrie stationnaire présentées dans la partie précédente. Les électrodes modifiées ont été préparées de la même manière que précédemment. A cause de l'instabilité des catalyseurs $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-32}$ et $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{-32}$ évoquée précédemment, seules les expériences avec les catalyseurs $\text{30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-30/Fe}^{\text{III}}\text{-21}$ et $\text{22/Fe}^{\text{III}}\text{-31}$ stables dans le temps pendant l'électro-catalyse ont été réalisées. Afin d'obtenir

une droite de Koutecky-Levich de référence pour la réduction du dioxygène à deux électrons, cette expérience a aussi été effectuée avec l'électrode sans catalyseur.

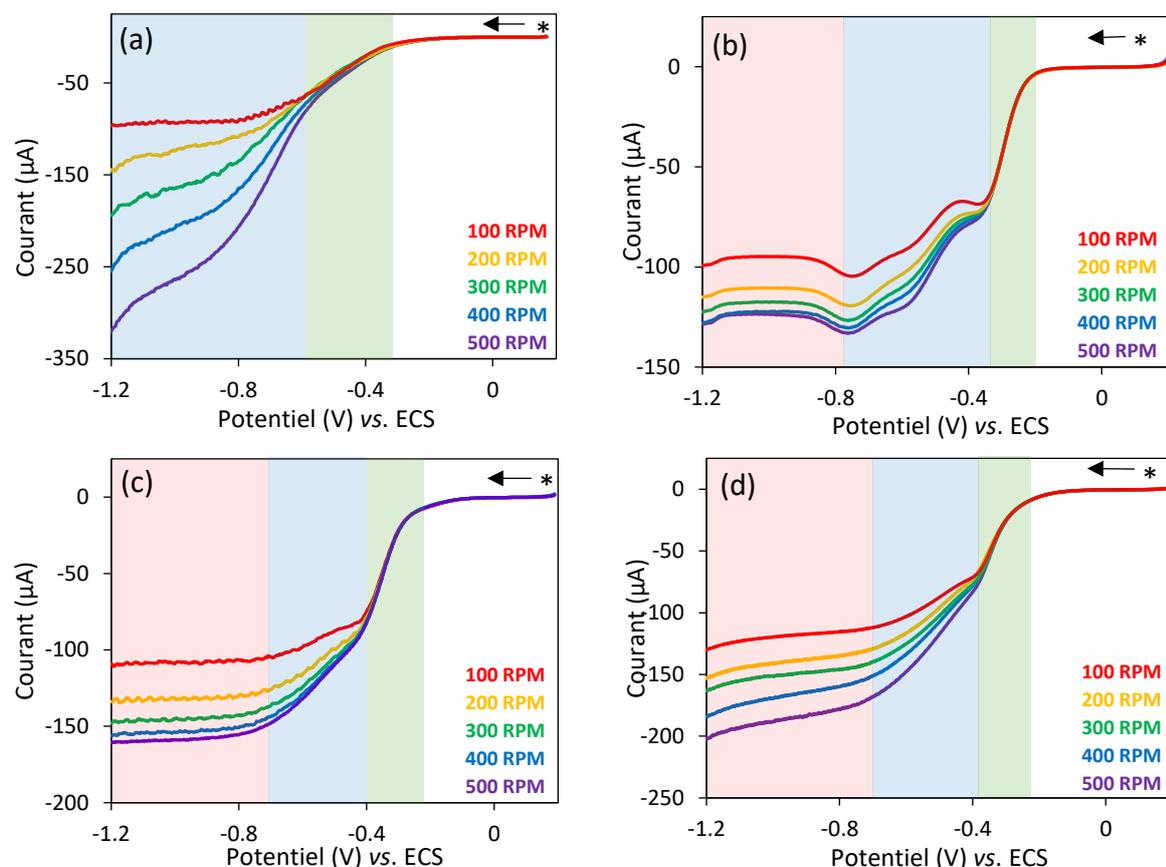


Figure 4.10. Voltampérommes stationnaires à différentes vitesses de rotation obtenus à partir d'une électrode rotative à disque anneau on modifiée (a) ou modifiée avec le catalyseur **30/Fe^{III}-21** recouvert avec du Nafion (b), le catalyseur **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** recouvert avec du Nafion (c) et le catalyseur **22/Fe^{III}-31** recouvert avec du Nafion (d) dans un tampon de phosphate (0,05) à pH 7 (+ Na₂SO₄ 0,5 M) saturé en dioxygène.

Les voltampérommes de la réduction du dioxygène sans catalyseur et avec les catalyseurs **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** à différentes vitesses de rotation sont représentés **Figure 4.10**. Sur chaque série de voltampérommes, il est possible de distinguer trois régions représentées en vert, bleu et rouge. Dans la région en vert, le courant est indépendant de la vitesse de rotation et ne dépend que du potentiel appliqué. Cette région est uniquement contrôlée par la cinétique du transfert des électrons de l'électrode au catalyseur.¹²³ Dans la région en bleu, le courant augmente avec le potentiel et la vitesse de rotation. Dans ce cas, le courant est à la fois contrôlé par la cinétique du transfert électronique et le transport de masse, c'est-à-dire dans notre cas le dioxygène et les protons disponibles à proximité du catalyseur adsorbé sur l'électrode. En sélectionnant des potentiels dans cette

région, à partir d'une droite de Koutecky-Levich, il est possible de calculer le nombre d'électrons impliqués dans l'électro-réduction du dioxygène.¹²³ Enfin, dans la dernière région en rouge, le courant atteint un plateau et augmente uniquement en fonction des vitesses de rotation, cette région est donc contrôlée par le transport de masse. En sélectionnant un potentiel dans cette région, à partir de la droite de Koutecky-Levich tracée, il est possible d'obtenir des informations cinétiques de l'ordonnée à l'origine $1/I_k$.¹²³

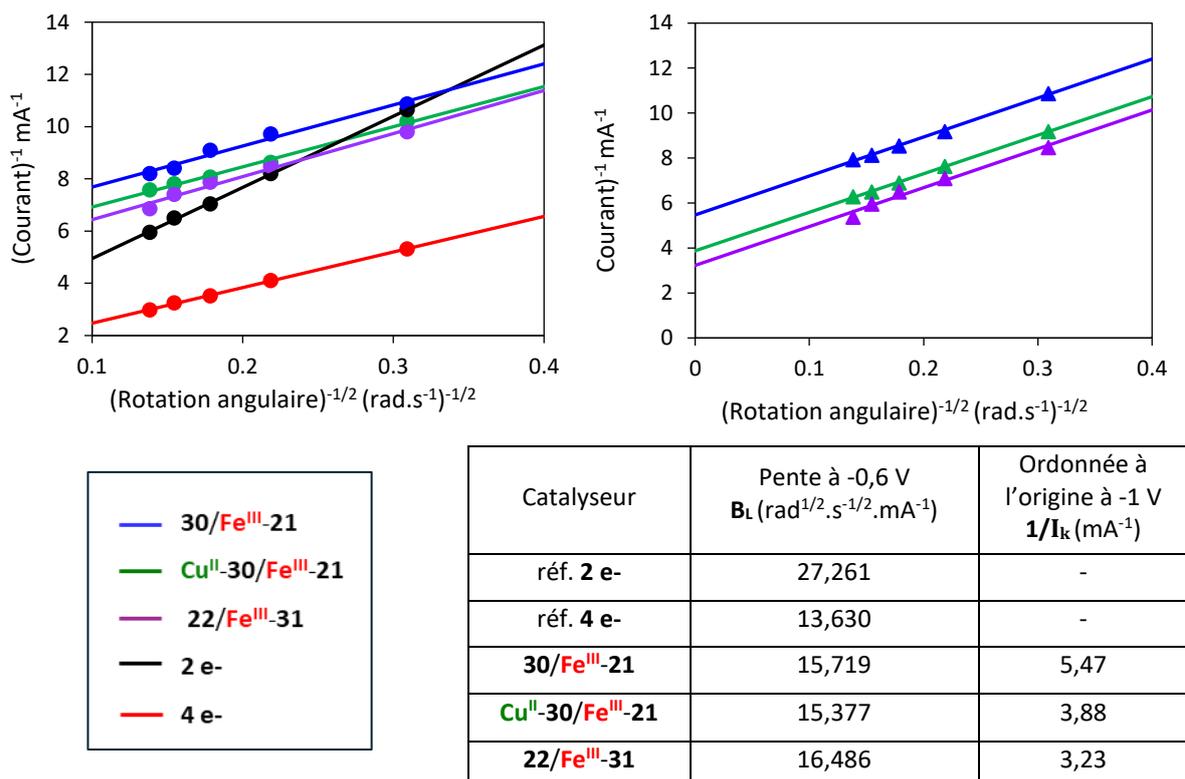


Figure 4.11. Droites de Koutecky-Levich tracées à un potentiel de - 0,6 V (à gauche) et -1 V (à droite) et paramètres graphiques associés (en bas).

Dans l'optique d'obtenir ces différentes informations, les droites de Koutecky-Levich pour chaque catalyseur ont été tracées **Figure 4.11** à partir des courants obtenus à différentes vitesses de rotation au potentiel de - 0,6 V et - 1 V. Une droite associée à la réduction du dioxygène bi-électronique mesurée expérimentalement et une droite simulée de la réduction tétra-électronique du dioxygène sont aussi représentées à - 0,6 V.

Pour les droites tracées à un potentiel de - 0,6 V, en plus des droites associées à la réduction du dioxygène catalysé par les composés **30/Fe^{III}-21**, **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** on observe qu'elles ont une pente très proche de celle de la droite associée à la réduction tétra-électronique du dioxygène. Les nombres d'électrons moyens calculés avec cette méthode sont donnés dans le **Tableau 4.3** et comparés aux résultats obtenus lors des précédentes

expériences avec une électrode rotative à disque anneau. Cette méthode a par ailleurs été appliquée à différents potentiels dans la même région (- 0,55 V, - 0,65 V et - 0.7 V) et a permis de confirmer les valeurs d'électrons moyens obtenus à - 0,6 V. En résumé, les tendances sont les mêmes que celles précédemment lors des expériences avec une électrode rotative à disque anneau. Le catalyseur **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est toujours le plus sélectif pour la réduction tétra-électronique du dioxygène, tandis que le catalyseur **22/Fe^{III}-31** reste le moins sélectif. En comparaison, les valeurs calculées avec l'électrode rotative à disque anneau, pour tous les catalyseurs, on observe une légère baisse de sélectivité pour la voie tétra-électronique. Cette méthode aura donc permis d'affiner les résultats précédemment obtenus.

Par ailleurs, en s'intéressant aux droites de Koutecky-Levich associées à la réduction du dioxygène au niveau des courants limites (à - 1 V), on remarque qu'aucune droite ne coupe l'axe des ordonnées à zéro. Cela signifie que même dans la région théoriquement exclusivement contrôlée par le transport de masse, il existe une limitation cinétique intrinsèque à la réaction de réduction du dioxygène catalysée par nos trois systèmes. L'ordonnée à l'origine étant inversement proportionnelle au courant cinétique I_k , plus elle est éloignée de zéro, plus la catalyse est limitée d'un point de vue cinétique.

Tableau 4.3. Comparaison du nombre d'électron moyens échangés et du pourcentage d'eau produit à - 0,6 V avec l'électrode rotative à disque anneau (RRDE) et à - 1 V avec la méthode de Koutecky-Levich (KL).

Catalyseur	Nombre d'électrons échangés		% H ₂ O	
	- 1 V (RRDE)	- 0,6 V (KL)	- 1 V (RRDE)	- 0,6 V (KL)
30/Fe^{III}-21 + Nafion	3,5	3,47	75	74
Cu^{II}-30/Fe^{III}-21 + Nafion	3,6	3,55	80	78
22/Fe^{III}-31 + Nafion	3,4	3,31	70	66
Cu^{II}-27/ Fe^{III}-21 + Nafion ⁷⁴	-	3*	-	-

*Valeur issue de la littérature calculée à - 1,2 V.

D'après les droites de Koutecky-Levich obtenues au potentiel de - 1 V, le système le plus limité cinétiquement est le catalyseur **30/Fe^{III}-21**. La cinétique de la réaction de réduction du dioxygène catalysée par son analogue fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est néanmoins plus rapide. Dans ce système, d'un point de vue cinétique, le cuivre contribue à accélérer la réduction du dioxygène. Ensuite, par rapport aux deux complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, le complexe

d'inclusion **22/Fe^{III}-31** avec une porphyrine à anse est finalement le système le moins limité cinétiquement.

Dans des travaux présentés en introduction, les groupes du Dr. B. Boitrel et du Pr. H. Kitagishi ont montré que la forme oxygénée du complexe **23/25-Fe^{III}-O₂^{•-}** également construit à partir d'une porphyrine à anse, s'auto-oxyde plus rapidement que son analogue **23/26-Fe^{III}-O₂^{•-}** sans anse. Le complexe **23/25-Fe^{III}-O₂^{•-}** s'auto-oxyderait plus rapidement en milieu aqueux que son analogue **23/26-Fe^{III}-O₂^{•-}**, car l'encombrement stérique induit par la présence d'une anse, induirait une plus grande ouverture de l'interstice entre les deux unités de Me-O- β -CD du dimère de Me-O- β -CD **23**. Le site oxygéné de ce complexe serait donc plus accessible à l'eau, source de proton, induisant une auto-oxydation du complexe oxygéné **23/25-Fe^{III}-O₂^{•-}** plus rapide. Dans le cas de la réduction du dioxygène, afin de pouvoir être réduit, il est nécessaire que des protons soient disponibles à proximité du site oxygéné. La protonation des différents intermédiaires oxygénés peut donc être vue comme un des facteurs limitants de la catalyse. Un autre facteur limitant de la catalyse peut aussi être la fixation du dioxygène sur le site actif de la porphyrine, qui dans tous nos systèmes est entouré par des Me-O- β -CDs. En effet, le groupe du Pr. A. Aukauloo a récemment montré, à partir d'une série de porphyrine à piquets réduisant le dioxyde de carbone, que moins le site ferreux de la porphyrine était encombré, plus la cinétique de la réaction de réduction était rapide.¹²⁴

L'accessibilité des molécules d'eau, sources de proton durant l'électro-catalyse, et du dioxygène au site actif de nos modèles sont donc sûrement, d'un point de vue cinétique, les deux facteurs limitant la réduction du dioxygène catalysé par tous nos modèles. Finalement, de tous les complexes d'inclusion étudiés dans ces travaux, grâce à l'anse phénanthroline de la porphyrine **Fe^{III}-31** encombrante, le complexe **22/Fe^{III}-31** aurait donc le site actif plus accessible à la fois au dioxygène et aux molécules d'eau, ce qui lui permet, d'un point de vue cinétique, de réduire plus efficacement que ces analogues **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** le dioxygène.

II.3. Récapitulatif

Les modèles **Fe^{III}-32** et **Cu^IFe^{III}-32** solubles en milieu organique ont respectivement montré une sélectivité pour la voie à quatre électrons de 60 et 75 %. Le cuivre facilite donc la réduction du dioxygène à 4 électrons. Pour tenter d'améliorer cette sélectivité, des essais

d'électro-catalyse pourront être effectués avec le complexe **Cu^IFe^{III}-32** coordonné à une base axiale encombrante, obligeant le dioxygène à se coordiner uniquement sur le site distal de la porphyrine, à proximité de l'atome de cuivre. Par ailleurs, des études de voltampérométrie cyclique en cours, permettront de déterminer les potentiels des couples **Cu^{II}/Cu^I** et **Fe^{III}/Fe^{II}**.

Concernant les modèles solubles en milieu aqueux, les modèles **30/Fe^{III}-21** et **Cu^I-30/Fe^{III}-21** sont viables pour réduire le dioxygène en milieu homogène, tandis que à cause de problèmes de désassemblage et de solubilité, il n'est finalement possible de travailler avec le modèle **22/Fe^{III}-31** qu'en milieu hétérogène, c'est-à-dire adsorbé sur électrode. Le modèle le plus sélectif pour la réduction du dioxygène tétra-électronique s'est révélé être le complexe d'inclusion fer/cuivre **Cu^I-30/Fe^{III}-21** (80 %). D'un point de vue cinétique, c'est le modèle **22/Fe^{III}-31**, avec un site actif à la fois plus accessible aux molécules d'eau et au dioxygène, qui s'est montré le plus performant.

¹¹³ C. Ruzié, Thèse, Université de Rennes, **2005**.

¹¹⁴ K. M. Lange, R. Golnak, S. Bonhommeau, and E. F. Azizb, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4163-4165.

¹¹⁵ S. G. Mayhew, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 85, 535-547.

¹¹⁶ T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, D. Murata, and Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11226-11227.

¹¹⁷ M. Momenteau, B. Loock, C. Tetreau, D. Lavalette, A. Croisy, C. Schaeffer, C. Huel, and J.-M. Lhoste, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1987**, 249-257.

¹¹⁸ M. H. Barley, K. J. Takeuchi, and Thomas J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5876-5885.

¹¹⁹ K. Kano, H. Kitagishi, Y. Sone, N. Nakazawa, and M. Kodera, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4043-4053.

¹²⁰ W. Xing, G. Yin, and J. Zhang, Rotating electrode methods and oxygen reduction electrocatalysts, Elsevier: Amsterdam, **2014**, Chapter 6, 199-228.

¹²¹ M. L. Rigsby, D. J. Wasylenko, M. L. Pegis, and J. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4296-4299.

¹²² A. Ribeiro, A. Figueiras, D. Santos, and F. Veiga, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2008**, 9, 1002-1009.

¹²³ W. Xing, G. Yin, and J. Zhang, Rotating electrode methods and oxygen reduction electrocatalysts, Elsevier: Amsterdam, **2014**, Chapter 5, 171-198.

¹²⁴ P. Gotico, L. Roupnel, R. Guillot, M. Sircoglou, W. Leibl, Z. Halime, and A. Aukauloo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 22451-22455.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de composés modèles du cytochrome *c* oxydase pour la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau. Pour cela, trois complexes porphyrine de fer/cuivre **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, **22/Cu^IFe^{III}-31** et **Cu^IFe^{III}-31** ont été ciblés.

Deux complexes d'inclusions dimères de Me-O- β -CD/porphyrines de fer **30/Fe^{III}-21** et **22/Fe^{III}-31** sans cuivre, comme précurseurs de modèles fer/cuivre de l'enzyme solubles en milieu aqueux, ont été préparés avec succès. La constante d'association entre le dimère de Me-O- β -CD **30** et la porphyrine de fer **Fe^{III}-21** est particulièrement élevée dans l'eau à pH 7 ($K_{1:1} > 10^7$), permettant l'obtention d'un complexe d'inclusion **30/Fe^{III}-21** très stable. L'association entre le dimère de Me-O- β -CD **22** et la porphyrine de fer **Fe^{III}-31** s'est révélée plus modérée dans un mélange 1:2 MeOH/H₂O à pH 7 et le complexe résultant **22/Fe^{III}-31** a montré une solubilité dans l'eau assez faible.

Pour compléter le modèle du site actif Fe-Cu de cytochrome *c* oxydase, le complexe **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** a été préparé et caractérisé avec succès. Des études par spectroscopie UV-visible en fonction du pH ont entre autres montré que ce complexe est stable dans l'eau de pH 2 à pH 9. De son côté, le complexe **22/Cu^IFe^{III}-31** n'est pas stable en milieu aqueux. En conséquence, seule la réactivité de son analogue sans cuivre a pu être étudiée en électrochimie et par spectroscopie UV-visible.

Les études électrochimiques ont établi que le modèle **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** est le plus sélectif pour la réduction tétra-électronique du dioxygène en eau avec 80 % de sélectivité contre 75 % pour son analogue sans cuivre et 70 % pour le complexe **22/Fe^{III}-31**. Néanmoins, lors de ces études, la réoxydation du site ferreux **Fe^{II}** en un site ferrique **Fe^{III}** du complexe **22/Fe^{II}-31** solubilisé en solution aqueuse a systématiquement entraîné le désassemblage du complexe **22/Fe^{III}-31**, suivi de la précipitation de la porphyrine **Fe^{III}-31**. Ce complexe semble donc difficilement viable pour réduire le dioxygène en solution homogène aqueuse. Par ailleurs, l'étude par spectroscopie UV-visible des complexes **30/Fe^{III}-21** et **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** oxygénés n'a pas permis de les caractériser de manière fiable. Dans les deux cas, une réaction d'auto-oxydation rapide en milieu aqueux semble être la cause des difficultés rencontrées lors de la caractérisation de ces complexes.

Une des stratégies utilisées pour stabiliser le complexe oxygéné serait d'introduire, de manière analogue au résidu d'histidine distale du site actif de la myoglobine, un groupement donneur de liaison hydrogène.¹²⁵ Par des études comparant les propriétés catalytiques de porphyrines de fer avec des groupements acides carboxyliques plus ou moins proches du site de liaison du dioxygène, le groupe de Mayer a notamment montré qu'une porphyrine avec des groupements donneurs de liaison hydrogène les plus proches du site d'oxygénation était la plus sélective pour la réduction tétra-électronique du dioxygène.¹²⁶

L'introduction dans le modèle **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** de groupement donneur de liaison hydrogène pourrait à la fois stabiliser l'adduit oxygéné et améliorer sa sélectivité lors de l'électro-réduction catalysée du dioxygène. Dans cette optique, un nouveau complexe d'inclusion, analogue du modèle **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21**, avec un dimère de β -CD non perméthylé, ayant de nombreux groupements hydroxyles donneurs de liaisons hydrogène, pourrait permettre d'améliorer encore plus sa sélectivité (**Figure C.1**).

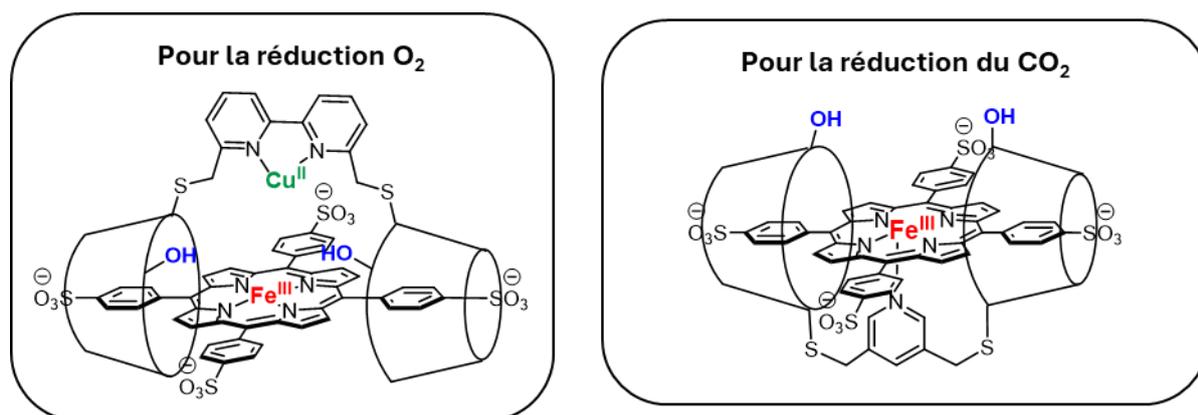


Figure C.1. Structures moléculaires des complexes d'inclusion dimère de β -CD/porphyrine de fer **Fe^{III}-31**. Tous les groupements -OH des β -CD ne sont pas représentés pour une question de clarté.

De manière analogue dans des réactions de réduction du dioxyde de carbone en monoxyde catalysées par des porphyrines de fer, le groupe de Savéant a montré que la présence de groupements donneur de liaison hydrogène à proximité du site actif améliorerait également les performances de leur catalyseur tant au niveau énergétique que d'un point de vue cinétique.¹²⁷ L'exploration des propriétés catalytiques d'un complexe d'inclusion dimère de β -CD/porphyrine de fer pourrait donc aussi être une perspective intéressante (**Figure C.1**).

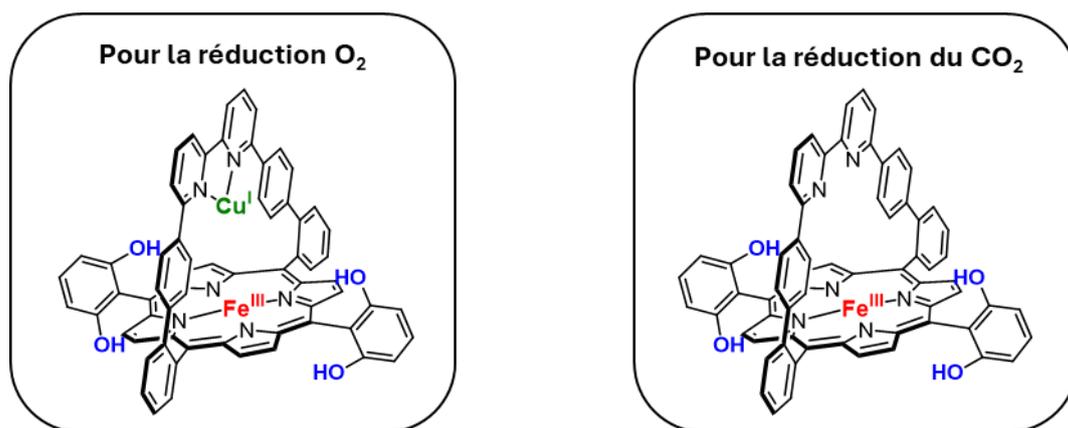


Figure C.2. Structures moléculaires des porphyrines de fer et fer/cuivre à anse bipyridine fonctionnalisées avec des groupements -OH donateurs de liaison hydrogène.

Par ailleurs, grâce au développement d'une nouvelle porphyrine à anse bipyridine **32** dans notre laboratoire, nous avons pu faire un nouveau modèle fer/cuivre de cytochrome *c* oxydase **Cu^IFe^{III}-32**. Ce modèle a montré des propriétés intéressantes en réduction tétra-électronique du dioxygène avec une sélectivité de 80 %. Pour les mêmes raisons que précédemment, il pourrait être intéressant de développer un dérivé du complexe **Cu^IFe^{III}-32** avec des sites donateurs de liaison hydrogène afin d'améliorer la sélectivité de ce modèle pour la réduction tétra-électronique du dioxygène (**Figure C.2**). Les propriétés catalytiques de son analogue sans cuivre pourraient par ailleurs être explorées pour la réduction du dioxyde de carbone (**Figure C.2**).

¹²⁵ P. Nagaraju, T. Ohta, J.-G. Liu, T. Ogura, and Y. Naruta, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 7213-7216

¹²⁶ C. T. Carver, B. D. Matson, and J. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 5444-5447.

¹²⁷ C. Costentin, S. Drouet, M. Robert, and J.-M. Savéant, *Science*, **2012**, 338, 90-94.

Experimental section

Materials and methods

Compounds **22**,^{66a} **28**,⁷⁵ **33**,^{66a} **34**,^{84c} **35**,⁶⁵ **36**,⁶⁵ **37**,^{84a} **38**,^{84b} **39**,^{84b} **41**,⁸⁶ **42**,^{75,87} **45**,⁹⁰ **52**⁹⁵ and **53**⁹⁵ were synthesized according to previously described procedures. CH₂Cl₂ stabilized with ~0.2% EtOH was purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and used as received. When necessary, CH₂Cl₂ was distilled over P₂O₅. Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0) was prepared by dissolving the appropriate quantities of NaH₂PO₄ and NaHPO₄ in Q-milli water (18.2 MΩ.cm). Aqueous NaClO₄ buffer (0.1 M) was prepared by dissolving the appropriated quantities of NaClO₄ in Q-milli water (18.2 MΩ.cm). Other chemical substances and reagents were purchased from TCI, ABCR, Sigma-Aldrich, Fischer Scientific, FULKA or FUJIFILM Wako and used as received. Thin layer chromatography was performed with TLC silica gel 60 or aluminum oxide F254. Column chromatography was performed with silica gel from Merck (Kieselgel 60; 63-200 μm) or alumina (Merck aluminum oxide 60 standardized).

NMR

¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁹F NMR, and ³¹P NMR spectra were recorded on Bruker Advance 300 MHz, 400 MHz, 500 MHz spectrometers or a JNM-ECA500 500 MHz spectrometer. Chemical shifts are given in ppm and were determined by taking the solvent as a reference. All coupling constants are in Hz.

Mass spectroscopy

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectra were obtained on a Bruker Autoflex II TOF-TOF spectrometer at the "Service de Spectrométrie de Masse de la Fédération de Chimie Le Bel" or Bruker Daltonics Autoflex speed spectrometer. Electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were recorded on a Bruker Daltonics MicroTOF mass spectrometer at the "Service de Spectrométrie de Masse de la Fédération de Chimie Le Bel" or Bruker Daltonics micrOTOF-II mass spectrometer.

X-ray analysis

X-ray analysis and solving were performed either by Lydia Karmazin, Corinne Bailly or Nathalie Kyritsakas-Gruber (Service de radiocristallographie, Fédération de Chimie "Le Bel", Strasbourg) using a Bruker APEX II DUO Kappa-CCD diffractometer using Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) or using Cu-K α radiation ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$).

UV-visible spectroscopy

UV-visible spectra were recorded on a Shimadzu 1500 spectrometer, a Shimadzu 3600 double-beam spectrometer, an Agilent 8453E spectrometer, an Agilent Cary 60 or an Agilent Cary 5000 double-beam spectrometer. For all titration experiments monitored by UV-vis spectroscopy the changes in concentrations were negligible (<5%) and the UV-vis spectra shown are uncorrected.

General procedure for pH titration

In a 100 mL beaker equipped with a magnetic stir bar and a pH-meter, the pH of **30/Fe^{III}-21** (20 μM, 50 mL) or **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** (14 μM, 50 mL) in an NaClO₄ (0.1 M) solution was firstly adjusted to 2 with HClO₄, and 3 mL of the solution were introduced in a quartz optical cell (1 cm). The corresponding UV-visible spectrum was recorded from 200 nm to 800 nm. Then the pH was adjusted with NaOH or HClO₄ solutions and the same process was repeated for every 0.2 or 0.5 increment of pH from 2 to 12.

EPR spectroscopy

EPR spectra were recorded on a Bruker EMX spectrometer operating at X-band (9.31 GHz) with a standard rectangular cavity (TE 102). An ESR900 cryostat (Oxford Instruments) was used for the low

temperature measurements. Sample solutions (0.4-0.5 mM) in 0.025 M phosphate buffer at pH 7 or Q-milli water (18.2 M Ω .cm) at pH 7 mixed or not with 33% HPLC grade MeOH in quartz tubes (4 mm of diameter) were degassed with helium by three freeze-thaw cycles in liquid N₂.

Preparation of reduced, carboxylated and oxygenated complexes

- Procedure 1:

Reduced Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} complexes were prepared by adding an excess of Na₂S₂O₄ to a solution of Fe^{III} or Cu^{II}/Fe^{III} in argon degassed phosphate buffer (0.05 M) at pH 7.0. Carboxylated complexes were prepared by bubbling CO for 2 min in the reduced Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} solutions.

- Procedure 2:

Reduced Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} complexes were prepared by adding an excess of Na₂S₂O₄ to a concentrated solution of Fe^{III} or Cu^{II}/Fe^{III} (1 mM) in phosphate buffer (0.05 M) at pH 7.0 in an N₂ atmosphere UNILab glovebox (MBRAUN). Excess Na₂S₂O₄ was removed by a Sephadex G-25 desalting column to give the pure Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} complexes inside of the glove box and then the appropriate amount of concentrated solutions of the Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} complexes was transferred to a quartz cuvette and sealed with a septum and the cuvette was removed from the glovebox. To obtain the carboxylated complexes, a concentrated solution of the Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} complexes was diluted in CO-saturated phosphate buffer (0.05 M) at pH 7.0 at ambient temperature. To obtain the oxygenated complexes, a concentrated solution of Fe^{II} or Cu^I/Fe^{II} was diluted in O₂-saturated phosphate buffer (0.05 M) at pH 7.0 at 10 °C.

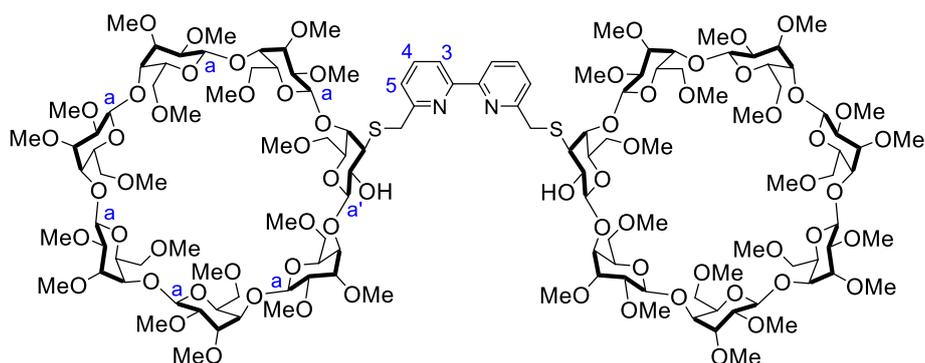
Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry experiments were carried out in 0.05 M phosphate buffer at pH 7 containing or not 33% HPLC grade MeOH with 0.5 M Na₂SO₄ as electrolyte in a classical three-electrode cell. The working electrode was a glassy carbon disk electrode (3 mm in diameter) used for cyclic voltammetry at 0.1 V.s⁻¹ scan rate, from 0.5 V to -1.2 V, and then from -1.2 V to 0.5 V, unless otherwise specified. The auxiliary electrode was a Pt wire, and the reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE). The cell was connected to an Autolab PGSTAT30 potentiostat (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) driven by a GPSE software running on a personal computer.

Rotating ring-disk electrode and linear sweep voltammetry

The rotating ring-disk assembly (AFMT29TGEPT from Pine Instruments Company) consisted of edge-oriented pyrolytic graphite disk (EOPG diameter 5.6 mm) surrounded by a platinum ring (inner diameter 6.2 mm, outer diameter 7.9 mm). The EOPG disk and the ring are separated by an insulating ring of Teflon. A bipotentiostat Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) was used to control the potential of the disk and to maintain the ring potential at 0.8 V vs. SCE. A platinum wire was used as the counter-electrode. The reference electrode was an SCE saturated electrode. Prior to depositing a catalyst, the electrode was cleaned with a wet 600 grit SiC paper and sonicated for 1 min in H₂SO₄, and then rinsed with water. For deposition of the catalyst, 10 μ L of a 0.25 mM aqueous solution of catalyst were coated with Nafion 5 wt% dispersion (10 μ L) on the EOPG disk electrode. Measurements were carried out in O₂-saturated 0.05 M phosphate buffer at pH 7 containing 0.5 M Na₂SO₄ as electrolyte.

Me-O- β -CD dimer **30**



To a degassed solution of compound **33** (2.00 g, 1.45 mmol) in 0.1 M aqueous NaHCO_3 (50 mL), a suspension of 6,6'-bis(mercaptomethyl)-2,2'-bipyridine (195 mg, 0.79 mmol) in methanol (20 mL) was added. The mixture was refluxed under argon for 16 h. After cooling to room temperature, the solution was extracted with chloroform (3 x 100 mL). The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , and filtered. After removal of the solvent, the crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , CHCl_3 /acetone: 5/2 to CHCl_3 to CHCl_3 /methanol: 95/5). The last fraction was further purified by a size exclusion chromatography system equipped with a GS310 GPC column eluted with methanol to yield **30** (925 mg, 0.31 mmol, 43%) as a white powder.

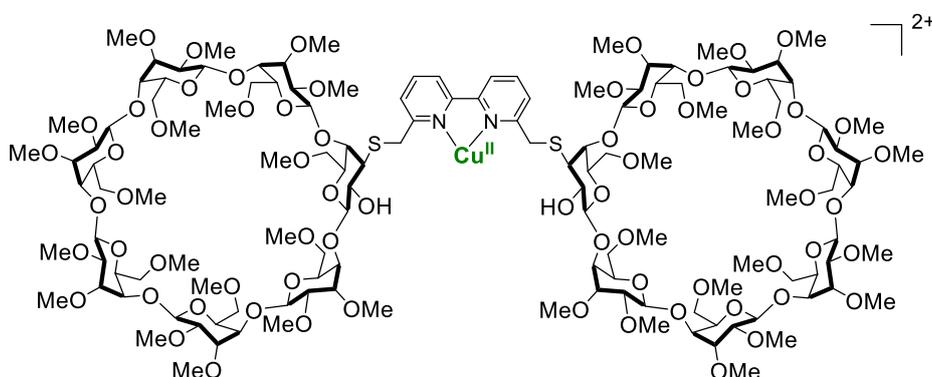
UV-visible λ_{max} (H_2O)/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 240 (11 000), sh 248 (9 400), 295 (17 000), sh 298 (12 000).

^1H NMR (500 MHz, CHCl_3) δH (ppm) 8.36 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H, H_3), 7.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H, H_4), 7.39 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H, H_5), 5.25–4.99 (m, 12 H, H_a), 4.68 (d, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $\text{H}_{a'}$), 4.26 – 3.05 (m, 204 H).

MS (MALDI-TOF): Calculated for $\text{C}_{134}\text{H}_{224}\text{N}_2\text{O}_{68}\text{S}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: m/z 3036.347; Found: 3036.411. Calculated for $\text{C}_{134}\text{H}_{224}\text{N}_2\text{O}_{68}\text{S}_2\text{K}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$: m/z 3052.321; Found: 3052.289.

C, H, N analysis: % Calculated for $\text{C}_{134}\text{H}_{224}\text{N}_2\text{O}_{68}\text{S}_2 + \text{H}_2\text{O}$: C 53.06, H 7.51, N 0.92; found: C 52.90, H 7.47, N 1.01.

Me-O- β -CD dimer **Cu^{II}-30**

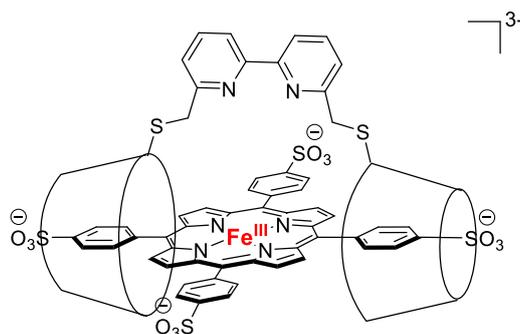


The **Cu^{II}-30** complex was formed *in situ* by mixing equimolar solutions of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in Q-milli water and **30** in Q-milli water. If necessary, water could be removed under vacuum and the **Cu^{II}-30** could be dissolved in phosphate buffer (0.05 M) at pH 7.

UV-visible λ_{\max} (H₂O)/nm ($\epsilon/M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 248 (11 000), 308 (19 000), sh 321 (13 000), sh 340 (3 800), 592 (130).

MS (ESI-HRMS): Calculated for C₁₃₄H₂₂₄CuN₂O₆₈S₂ [M]²⁺: m/z 1539.1448; Found: 1539.1427.

30/Fe^{III}-21 assembly

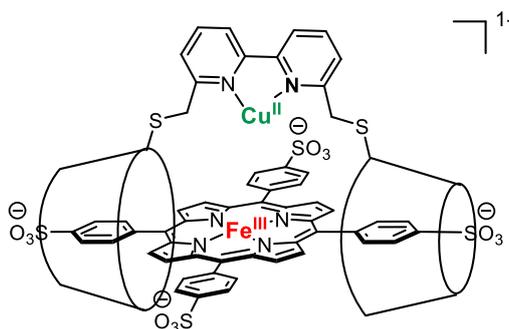


The **30/Fe^{III}-21** complex was formed *in situ* by mixing equimolar solutions of **30** in phosphate buffer (0.05 M) at pH 7 and **Fe^{III}-21** in phosphate buffer (0.05 M) at pH 7. Same procedure can be done with perchlorate buffer (0.1 M).

UV-visible λ_{\max} (Phosphate buffer at pH 7)/nm ($\epsilon/M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 298 (39 000), 336 (30 000), 419 (104 000), 574 (9 200), 620 (4 300).

MS (ESI-HRMS): Calculated for C₁₇₈H₂₄₉FeN₆O₈₁S₆ [M+OH]⁴⁻: m/z 1004.0825; Found: 1004.0828.

Cu^{II}-30/Fe^{III}-21 assembly

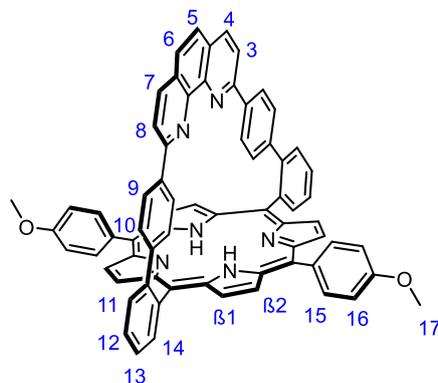


The **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** complex was formed *in situ* by mixing equimolar solutions of CuSO₄·5H₂O in Q-milli water, **30** in Q-milli water, and **Fe^{III}-21** in Q-milli water. If necessary, water could be removed under vacuum and **Cu^{II}-30/Fe^{III}-21** could be dissolved in phosphate buffer (0.05 M) at pH 7 or in perchlorate buffer (0.1 M).

UV-visible λ_{\max} (Phosphate buffer at pH 7)/nm ($\epsilon/M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 337 (38 000), 418 (115 000), sh 500 (11 000), 574 (5 900), 618 (3 700), sh 662 (1 800).

MS (ESI-HRMS): Calculated for $C_{178}H_{248}CuFeN_6O_{81}S_6$ $[M+O]^{3-}$: m/z 1359.7504; Found: 1539.7527.
Calculated for $C_{178}H_{249}CuFeN_6O_{81}S_6$ $[M+OH]^{2-}$: m/z 2040.1293; Found: 2040.1254.

Porphyrin 46



$Pd(PPh_3)_4$ (50 mg, 0.044 mmol) was added to a degassed mixture of porphyrin **45** (420 mg, 0.44 mmol), K_2CO_3 (610 mg, 4.4 mmol), and 4-methoxyphenylboronic acid (3 eq, 200 mg, 1.3 mmol) in toluene/MeOH/ H_2O (60/4/4 mL). The brown mixture was heated at 75 °C under argon overnight, in the absence of the light. After cooling the mixture to room temperature, a 2 M NaOH aqueous solution (100 mL) was added. The two phases were separated, and the organic layer was washed with water (100 mL), dried over Na_2SO_4 and filtered. After removal of the solvent, the product was purified by column chromatography (Al_2O_3 , CH_2Cl_2 /cyclohexane: 2/3) to yield porphyrin **46** (340 mg, 0.34 mmol, 77%) as a purple powder. If necessary, the product could be recrystallized from CH_2Cl_2 /MeOH.

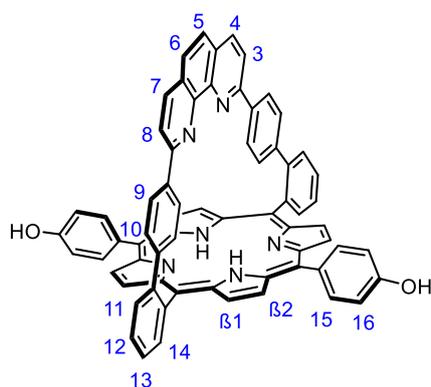
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.77 (d, J = 4.7 Hz, 4 H, $H_{\beta 2}$), 8.74 (d, J = 4.7 Hz, 4 H, $H_{\beta 1}$), 8.67 (dd, J = 7.4, 1.4 Hz, 2 H, H_{14}), 8.46 (br s, 2 H, H_{15}), 7.98 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, $H_{4,7}$), 7.95 – 7.85 (m, 6 H, $H_{11,12}$), 7.81 (td, 2 H, J = 7.4, 1.4 Hz, H_{13}), 7.78 (br s, 2 H, H_{15}), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, $H_{3,8}$), 7.51 (s, 2 H, $H_{5,6}$), 7.25 (br s, 2 H, H_{16}), 7.17 (br s, 2 H, H_{16}), 6.81 (d, J = 8.4 Hz, 4 H, H_9), 6.57 (d, J = 8.4 Hz, 4 H, H_{10}), 4.04 (s, 6 H, H_{17}), -2.41 (s, 2 H, H_{NH}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 159.3, 158.3, 146.0, 143.8, 141.2, 140.5, 138.8, 136.4, 135.4, 134.7, 129.7, 129.1, 128.9, 127.9, 127.4, 125.9, 125.5, 121.7, 119.6, 118.3, 112.2, 55.7.

MS (ESI-HRMS): Calculated for $C_{70}H_{47}N_6O_2$ $[M+H]^+$: m/z 1003.3755; found: 1003.3736. Calculated for $C_{70}H_{48}N_6O_2$ $[M+2H]^{2+}$: m/z 502.1914; found: 502.1943.

C, H, N analysis: % Calculated for $C_{70}H_{46}N_6O_2 + CH_2Cl_2 + H_2O$: C 77.10, H 4.56, N 7.60; found: C 76.95, H 4.39, N 7.81.

Porphyrin 47



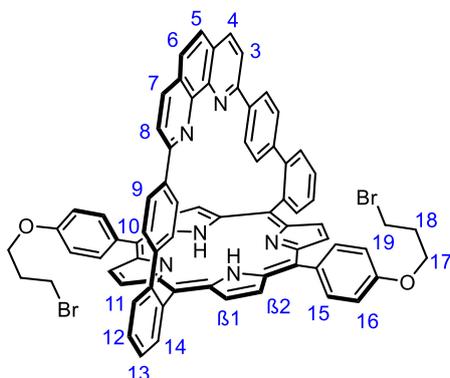
A 1 M boron tribromide solution in CH_2Cl_2 (2.9 mL, 2.9 mmol) was added to a solution of porphyrin **46** (300 mg, 0.29 mmol) in 150 mL of distilled CH_2Cl_2 under argon. The green solution was refluxed under argon for 4 h. After cooling to room temperature, water (100 mL) was added to the solution, and the CH_2Cl_2 was removed under vacuum. The resulting precipitate was filtered on a sintered glass funnel, and then washed with water (5 x 50 mL) to yield the porphyrin **47** (266 mg, 0.27 mmol) as a brown powder that used without further purification for the next reaction.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δH (ppm) 9.87 (s, 2 H, H_{OH}), 8.81 (d, $J = 4.7$ Hz, 4 H, $\text{H}_{\beta 2}$), 8.75 (d, $J = 4.7$ Hz, 4 H, $\text{H}_{\beta 1}$), 8.62 (dd, $J = 7.3, 1.4$ Hz, 2 H, H_{14}), 8.41 (br s, 2 H, H_{15}), 8.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{4,7}$), 8.02 (td, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 2 H, H_{12}), 7.93 (td, $J = 7.3, 1.4$ Hz, 2 H, H_{13}), 7.89 (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 2 H, H_{11}), 7.73 (s, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{3,8}$), 7.62 (br s, 2 H, H_{15}), 7.15 (br s, 2 H, H_{16}), 7.08 (br s, 2 H, H_{16}), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 4 H, H_9), 6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 4 H, H_{10}), -2.65 (s, 2 H, H_{NH}).

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δC (ppm) 157.3, 156.6, 145.1, 143.2, 141.1, 139.5, 138.0, 136.8, 136.0, 135.4, 134.3, 131.4, 129.5, 129.4, 128.7, 127.3, 127.2, 126.1, 121.8, 120.4, 118.2, 113.9

MS (MALDI-TOF): Calculated for $\text{C}_{68}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: m/z 975.345; found: 975.500.

Porphyrin 48



Porphyrin **47** (540 mg 0.55 mmol) was added to a degassed mixture of Cs_2CO_3 (450 mg, 1.4 mmol) and 1,3-dibromopropane (30 mL, 295 mmol) in 30 mL of anhydrous DMF. The red solution was stirred at room temperature under argon for 48 h. The solvent was removed under vacuum, and the crude product was taken in 50 mL of CH_2Cl_2 , washed with water (3 x 200 mL), dried over Na_2SO_4 , and filtered.

After removal of the solvent, the product was purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/cyclohexane: 2/3, to CH₂Cl₂) to yield the porphyrin **48** (390 mg, 0.32 mmol, 54% over two steps) as a purple powder. If necessary, the product could be recrystallized from CH₂Cl₂/MeOH.

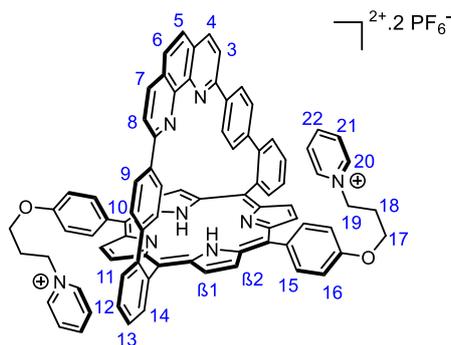
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δH (ppm) 8.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 4 H, H_{β2}), 8.73 (d, *J* = 4.7 Hz, 4 H, H_{β1}), 8.67 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 2 H, H₁₄), 8.45 (br s, 2 H, H₁₅), 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H_{4,7}), 8.01 - 7.95 (m, 2 H, H_{11,12}), 7.82 (td, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 2 H, H₁₃), 7.78 (br s, 2 H, H₁₅), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H_{3,8}), 7.51 (s, 2 H_{5,6}), 7.26 (br s, 2 H, H₁₆), 7.16 (br s, 2 H, H₁₆), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, H₉), 6.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, H₁₀), 4.35 (t, *J* = 6.2 Hz, 4 H, H₁₇), 3.75 (t, *J* = 6.2 Hz, 4 H, H₁₉), 2.48 (p, *J* = 6.2 Hz, 4 H, H₁₈), -2.41 (s, 2 H, H_{NH}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δC (ppm) 158.5, 158.3, 146.0, 143.8, 141.2, 140.5, 138.8, 136.4, 135.9, 135.3, 135.0, 129.7, 129.1, 128.9, 127.9, 127.4, 125.9, 125.5, 121.7, 119.6, 118.3, 112.8, 65.7, 32.8, 30.3.

MS (MALDI-TOF): Calculated for C₇₄H₅₅Br₂N₆O₂ [M+H]⁺: *m/z* 1217.275 ; found 1217.433.

C, H, N analysis: % Calculated for C₇₄H₅₄Br₂N₆O₂ + 3 H₂O: C 69.92, H 4.60, N 6.61; found: C 69.83, H 4.72, N 6.34.

Porphyrin **31**.2PF₆⁻

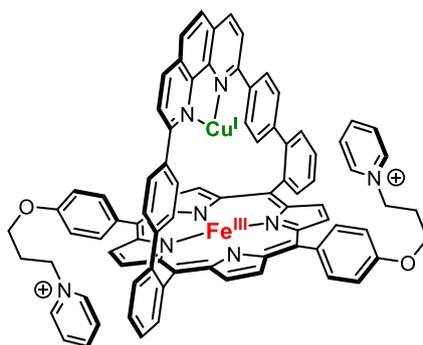


A solution of porphyrin **48** (116 mg, 0.095 mmol) in 30 mL of distilled pyridine was refluxed under argon for 8 h. After cooling the purple mixture to room temperature, the solvent was removed under vacuum and the product was purified by column chromatography (SiO₂, MeCN/H₂O/saturated aqueous KNO₃: 80/5/2). After removal of the solvent, the last fraction was dissolved in 10 mL of MeOH and 5 mL of water. The product was precipitated by the addition of 150 mL of saturated aqueous KPF₆ solution, filtered on sintered glass funnel, and washed with 3 x 50 mL of water to yield porphyrin **31** (120 mg, 0.080 mmol, 84%) as a purple powder.

UV-visible λ_{max} (DMSO)/nm (ε/M⁻¹.cm⁻¹): 280 (64 000), 310 (51 000), sh 330 (41 000), sh 345 (34 000), sh 410 (56 000), 427 (340 000), sh 490 (3 700), 521 (14 000), 558 (7 900), 596 (4 400), 653 (4 100).

¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆) δH (ppm) 9.41 (dd, *J* = 6.9, 1.4 Hz, 4 H, H₂₀), 8.84 – 8.79 (m, 6H, H_{β1,22}), 8.76 (d, *J* = 4.8 Hz, 4 H, H_{β2}), 8.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, H₁₄), 8.40 (t, *J* = 7.8, 6.9 Hz, 4 H, H₂₁), 8.29 (br d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H₁₅), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H_{4,7}), 8.08 – 8.01 (m, 2 H, H₁₂), 7.98 – 7.91 (m, 4H, H_{11,13}), 7.81 (br d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H₁₅), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H_{3,8}), 7.69 (s, 2 H, H_{5,6}), 7.22 (br d, *J* = 8.4 Hz, 4 H, H₁₆), 7.18 (br d, *J* = 8.4 Hz, 4 H, H₁₆), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 4 H, H₉), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 4 H, H₁₀), 5.28 (t, *J* = 6.5 Hz, 4 H, H₁₉), 4.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 4 H, H₁₇), 2.91 – 2.82 (m, 4 H, H₁₈), -2.53 (s, 2 H, H_{NH}).

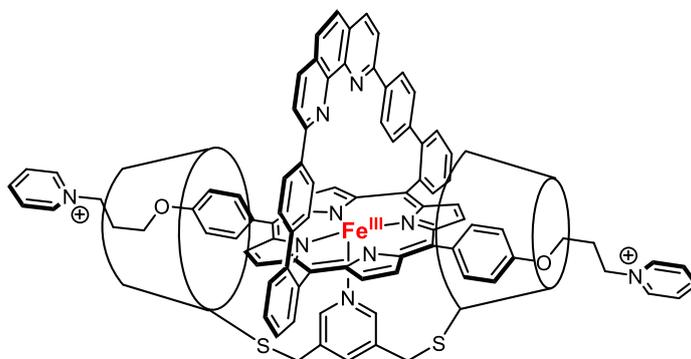
Porphyrin Cu^IFe^{III}-31



A degassed solution of a $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]^+\text{BF}_4^-$ (1 mL, 0.016 mmol) was added to a degassed solution of **Fe^{III}-31**.3Cl (4 mg, 0.0027 mmol) in MeCN (3 mL). The resulting solution was sonicated for 1 min under N_2 atmosphere. After removal of the solvent, 15 mL of CHCl_3 were added and the suspension were sonicated for 5 min. The crude product was filtered and washed with CHCl_3 (5 x 10 mL) until the complete disappearance of the yellowish color of the filtrate, to give 3 mg of porphyrin **Cu^IFe^{III}-31** as dark brown powder.

MS (ESI-HRMS): Calculated for $\text{C}_{84}\text{H}_{62}\text{CuFeN}_8\text{O}_3\text{Cl}$: m/z 462.1091 ; found: 462.0877.

22/Fe^{III}-31 assembly

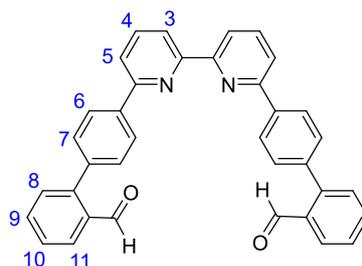


The **22/Fe^{III}-31** inclusion complex was formed *in situ* by mixing a 1.0:1.1 ratio of a solution of **22** in Q-milli water and a solution of **Fe^{III}-31**.3Cl in MeOH. The resulting **22/Fe^{III}-31** solution was diluted with Q-milli water **22/Fe^{III}-31** to get a solution with maximum 33% of MeOH and after 10 min of stirring the complex **22/Fe^{III}-31** was fully formed. The same procedure could be done with phosphate buffer instead of Q-milli water. In this case, the inclusion complex **22/Fe^{III}-31** was fully formed after 1 h of stirring.

UV-visible λ_{max} (MeOH/Phosphate buffer at pH 7: 1/3)/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 284 (57 000), sh 316 (47 000), 427 (63 000), 580 (6 900), 635 (6 000)

MS (ESI-HRMS): Calculated for $\text{C}_{213}\text{H}_{281}\text{FeN}_9\text{O}_{70}\text{S}_2$ $[\text{M}]^{3+}$: m/z 1402.2515; found: 1102.2452.

4',4'''-[2,2'-Bipyridine]-6,6'-diyl]bis([(1,1'-biphenyl]-2-carbaldehyde)) **50**



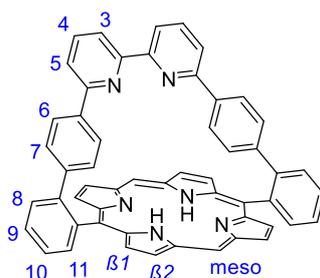
To a degassed mixture of compound **54** (1.13 g, 3.36 mmol) and 6,6'-dibromo-2,2'-bipyridine **55** (550 mg, 1.75 mmol) in 2 M Na₂CO₃ aq. (1 mL) and 1,4-dioxane (5 mL), Pd(dppf)Cl₂ (26 mg, 0.035 mmol) was added. The mixture was stirred at 90 °C for 20 h. After cooling to room temperature, the mixture was extracted with CH₂Cl₂ and the organic layer was dried over MgSO₄. After removal of solvent under reduced pressure, the residue was filtered through a SiO₂ column (CH₂Cl₂) and recrystallized from CH₂Cl₂/Et₂O to yield compound **50** (832 mg, 1.61 mmol, 92%) as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δH (ppm) 10.10 (2 H, d, *J* = 0.7 Hz, H_{CHO}), 8.67 (2 H, dd, *J* = 7.8, 0.8 Hz, H₃), 8.30 (4 H, dt, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H₆), 8.08 (2 H, dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, H₁₁), 7.99 (2 H, t, *J* = 7.8 Hz, H₄), 7.88 (2 H, dd, *J* = 7.8, 0.8 Hz, H₅), 7.72–7.67 (2 H, m, H₉), 7.58–7.52 (8 H, m, H_{7,8,10}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δC (ppm) 192.4, 156.0, 155.6, 145.5, 139.3, 138.4, 137.9, 133.9, 133.7, 130.8, 130.6, 128.0, 127.8, 127.1, 120.5, 119.9.

MS (ESI HRMS): Calculated for C₃₆H₂₅N₂O₂ [M+H]⁺: *m/z* 517.1911; ; found: 517.1909.

Porphyrin **32**



To a degassed solution of **50** (250 mg, 0.48 mmol) and Zn(OAc)₂·2H₂O (106 mg, 0.48 mmol) in CH₂Cl₂ (stabilized with 0.2% EtOH; 1.75 L), dipyrromethane (140 mg, 0.97 mmol) and then TFA (3 mL, 39 mmol) were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature in the absence of the light, then DDQ (1 g, 4.4 mmol) was added, and the solution was stirred for 4 h. NEt₃ (12 mL) was added, and the solution was stirred for 20 min. The organic layer was washed with H₂O (3 x 1.5 L) and dried over Na₂SO₄. After removal of the solvent, the product was purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/CHCl₃: 4/1) to yield porphyrin **32** (175 mg, 0.23 mmol, 48%) as a purple powder.

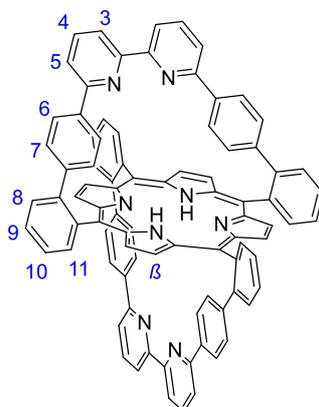
UV-visible λ_{max} (CH₂Cl₂)/nm (ε/M⁻¹.cm⁻¹): 284 (23 000), sh 396 (2 900), 413 (150 000), sh 479 (2 100), 506 (7 500), 539 (2 400), 579 (3 000), sh 586 (3 000), 635 (1 300).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δH (ppm) 10.11 (2 H, s, H_{meso}), 9.23 (4 H, d, $J = 4.5$ Hz, $\text{H}_{\beta 2}$), 8.91 (4 H, d, $J = 4.5$ Hz, $\text{H}_{\beta 1}$), 8.65 (2 H, dd, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H_{11}), 7.92 (2 H, td, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H_9), 7.84 (2 H, td, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H_{10}), 7.82 (2 H, td, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H_8), 7.46 (2 H, t, $J = 7.8$, H_4), 7.30 (2 H, dd, $J = 7.8, 0.9$, H_5), 7.12 (2 H, dd, $J = 7.8, 0.9$, H_3), 6.77 (4 H, m, H_6), 6.65 (4 H, m, H_7), -3.16 (2 H, s, H_{NH}).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δC (ppm) 157.5, 157.3, 147.2, 145.3, 144.8, 141.6, 139.9, 136.8, 136.7, 134.6, 131.7, 130.5, 129.2, 128.8, 128.7, 126.3, 125.6, 120.6, 119.6, 117.2, 105.4.

MS (MALDI-TOF): Calculated for $\text{C}_{54}\text{H}_{35}\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 767.292; found: 767.320.

Porphyrin 49



To a degassed solution of **50** (250 mg, 0.48 mmol) and $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (106 mg, 0.48 mmol) in degassed CH_2Cl_2 (1.75 L), freshly distilled pyrrole (67 μL , 0.97 mmol) and then 1 mL of TFA were added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature in the absence of light, then DDQ (1.1 g, 4.8 mmol) was added, and the solution was stirred for 4 h. NEt_3 (30 mL) was added, and the solution was stirred for 20 min. The organic layer was washed with H_2O (3 x 1.5 L) and dried over Na_2SO_4 . After removal of the solvent, the product was purified by column chromatography (SiO_2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CHCl}_3$: 4/1). The first red fraction was recrystallized from $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ to yield porphyrin **49** (20 mg, 0.016 mmol, 7%) as a purple powder.

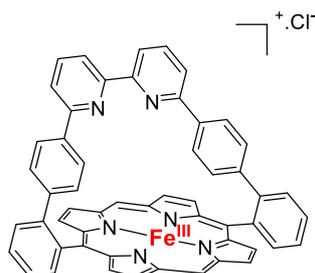
UV-visible λ_{max} (CH_2Cl_2)/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): (CH_2Cl_2)/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 287 (92 000), sh 412 (56 000), 430 (305 000), 491 (3 600), 524 (16 000), 559 (6 200), 599 (5 400), 656 (2 800).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δH (ppm) 8.72 (4 H, d, $J = 7.3$, H_{11}), 8.57 (8 H, s, H_8), 7.81 (4 H, dt, $J = 7.4, 1.4$, H_9), 7.73 (8 H, m, $\text{H}_{8,10}$), 7.52 (4 H, t, $J = 7.8$, H_4), 7.36 (4 H, d, $J = 7.8$, H_5), 7.21 (4 H, d, $J = 7.8$, H_3), 6.92 (8 H, d, $J = 8.5$, H_6), 6.73 (8 H, d, $J = 8.5$, H_7), -2.65 (2 H, s, H_{NH}).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δC (ppm) 157.9, 157.5, 144.4, 142.0, 140.8, 140.7, 136.9, 135.3, 129.2, 129.0, 128.4, 126.7, 125.4, 120.6, 119.8, 118.1.

MS (ESI-HR MS): Calculated for $\text{C}_{88}\text{H}_{55}\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1223.4544; found: 1223.4525. Calculated for $\text{C}_{88}\text{H}_{56}\text{N}_8$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 612.2308; found: 612.2315.

Porphyrin **Fe^{III}**-**32**.Cl⁻



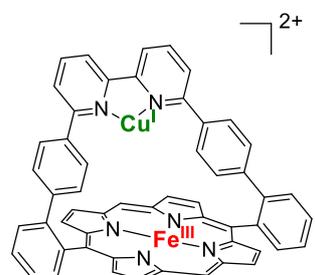
FeCl₂ (20 mg, 0.16 mmol) was added to a degassed solution of porphyrin **32** (40 mg, 0.052 mmol), and lutidine (15 μ L, 0.11 mmol) in 10 mL of CHCl₃/MeOH: 4/1, and the reaction was stirred at 60 °C for 24 h. After opening the brown-dark mixture to the air and cooling to room temperature, the mixture was washed with 1 M HCl (3 x 20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and filtered. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified on column chromatography (Al₂O₃, CHCl₃/MeOH: 9/1) to yield **Fe^{III}**-**32**.Cl⁻ (35 mg, 0.041 mmol, 79%) as a dark brown powder.

UV-visible λ_{max} (CH₂Cl₂)/nm (ϵ /M⁻¹.cm⁻¹): 283 (83 000), sh 378 (63 000), 414 (106 000), 504 (15 000).

MS (ESI-HR): calculated for C₅₄H₃₂FeN₆ ([M]⁺): m/z 820.2034. Found 820.2032; calculated for C₅₄H₃₃FeN₆Cl ([M+H]⁺): m/z 856.1801. Found 856.1798.

C, H, N analysis: % calculated for C₅₄H₃₂FeN₆ + 2 CHCl₃ + 1 MeOH: C 69.21, H 4.28, N 8.28; found: C 69.33, H 4.03, N 8.32.

Porphyrin **Cu^I****Fe^{III}**-**32**



The **Cu^I****Fe^{III}**-**32** complex was formed *in situ* by mixing equimolar degassed solutions of [Cu(MeCN)₄]⁺BF₄⁻ in CH₂Cl₂ and [**Fe^{III}**Porph-Cu**bipy**]²⁺ in CH₂Cl₂.

UV-visible λ_{max} (CH₂Cl₂)/nm (ϵ /M⁻¹.cm⁻¹): 278 (77 000), 335 (68 000), 400 (110 000), 510 (15 000).

Modèles Supramoléculaires d'Hémoprotéines

Résumé

Ces travaux portent sur la conception de modèles fer/cuivre de cytochrome *c* oxydase pour l'électroréduction du dioxygène. Deux modèles de l'enzyme ont été élaborés à partir de complexes d'inclusion cyclodextrines/porphyrine de fer auto-assemblés en milieu aqueux. Dans ces modèles, les cyclodextrines assurent l'hydrosolubilité de l'édifice supramoléculaire et imitent la globine de la protéine en créant un environnement hydrophobe à proximité de la porphyrine. Une fois ces modèles formés, les sphères de coordination du fer et du cuivre ont été étudiées en milieu aqueux par spectroscopie UV-visible et RPE, tandis que la réactivité des complexes vis-à-vis du dioxygène a été étudiée en électrochimie. En parallèle, une nouvelle porphyrine à anse bipyridine a été synthétisée via une synthèse à effet de matrice. Après avoir formé son complexe fer/cuivre associé, soluble en milieu organique, ses propriétés en tant qu'électrocatalyseur pour la réduction du dioxygène ont été explorées.

Hémoprotéine, cytochrome *c* oxydase, modèle hydrosoluble, porphyrine, cyclodextrine, effet de matrice, assemblage supramoléculaire, réduction du dioxygène, électrochimie

Résumé en anglais

This thesis focused on the design of iron/copper cytochrome *c* oxidase models for the electro-reduction of dioxygen. Two models were developed based on cyclodextrin/porphyrin inclusion complexes that self-assembled in aqueous media. In these models, cyclodextrins ensure the water-solubility of the supramolecular edifice and mimic the globular protein environment by creating a hydrophobic environment near the porphyrin active site. Once formed, the coordination spheres of these model compounds were investigated in aqueous media by UV-visible and EPR spectroscopies, whereas their reactivity towards oxygen was studied by electrochemistry. In parallel, a new porphyrin with a bipyridine strap was synthesized using a supramolecular template approach. After forming the associated iron/copper complex, which is soluble in organic media, its properties as an electrocatalyst for the reduction of dioxygen to water were also explored.

Hemoprotein, cytochrome *c* oxidase, water-soluble model, porphyrin, cyclodextrin, template effect, supramolecular assembly, oxygen reduction, electrochemistry