

ECOLES NORMALES SUPERIEURES

CONCOURS D'ADMISSION 2020

JEUDI 23 AVRIL 2020 - 8h00 – 14h00

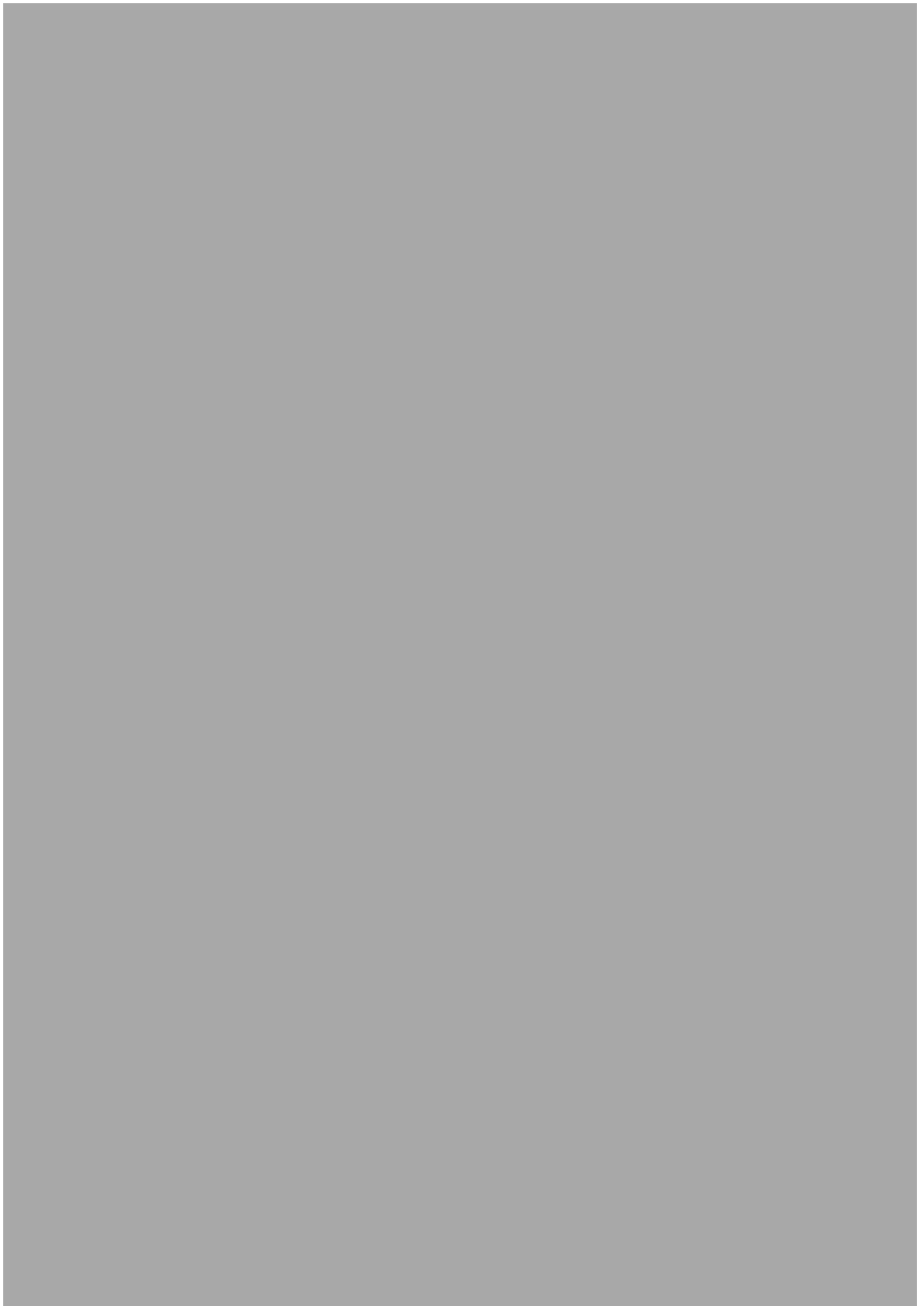
FILIERE PC - Epreuve n° 7

CHIMIE B

(U)

Durée : 6 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve



Le sujet comprend 24 pages numérotées de 1 à 24.

* * *
Début du sujet

Étude d'un médicament anti-cholestérol

Dans les pays industrialisés, le traitement des maladies coronariennes est un enjeu majeur car celles-ci induisent une mortalité supérieure à l'ensemble des cancers. Dès la fin du XX^e siècle, des efforts considérables ont visé à identifier des traitements efficaces et minimisant les effets secondaires. Une cible majeure est l'athérosclérose, liée principalement à des accumulations de dépôts gras, réduisant l'efficacité de la circulation sanguine et accélérant le vieillissement du cœur. Ces accumulations sont en particulier liées à des taux élevés de cholestérol, apporté par l'alimentation mais aussi par biosynthèse dans le foie. Une avancée importante a reposé sur le développement de médicaments permettant un contrôle ciblé de la formation du cholestérol. Ce sujet porte sur l'un d'entre eux, l'acide zaragozique A, représenté à la figure 1.

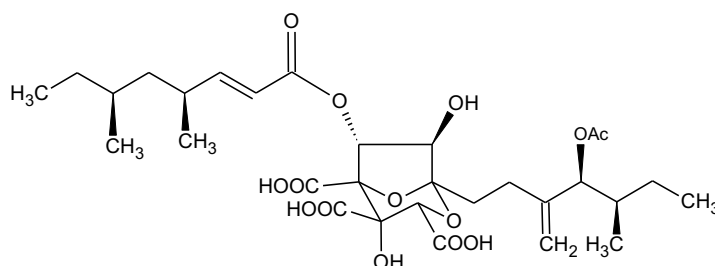


FIGURE 1 – Acide zaragozique A (**1**).

La partie 1 aborde l'étude de la structure, caractérisation et purification des protéines. La partie 2 s'intéresse au mode d'action de l'acide zaragozique A sur l'organisme. La partie 3 traite de la synthèse totale de ce principe actif.

Les parties 1, 2 et 3 sont indépendantes. Si au cours de l'épreuve un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale dans sa copie et poursuit sa composition en indiquant les raisons des initiatives qu'il est amené à prendre. Une indication du poids relatif de chaque partie dans le barème total est donnée à la suite du titre de chaque partie.

Un soin particulier est attendu dans l'écriture des mécanismes réactionnels ; les formules utilisées devront faire apparaître les doublets non liants, les lacunes électroniques et les formes mésomères des intermédiaires réactionnels s'il y a lieu. L'écriture des mécanismes, lorsqu'elle est demandée dans la question, pourra se faire sous une forme simplifiée (les parties de la molécule non impliquées dans le mécanisme réactionnel seront écrites avec les symboles R, R', R"... en précisant la simplification effectuée).

Des données pertinentes pour les différentes parties sont fournies en annexe à la fin du sujet.

1 Première partie : Structure, caractérisation et purification des protéines

Cette partie représente environ 40% du total des points.

1.1 Étude structurale des enzymes et protéines

Chez les êtres vivants, la majorité des fonctions biologiques repose sur l'action de protéines, macromolécules du milieu biologique. Certaines, comme les enzymes, accélèrent les réactions chimiques, alors que d'autres jouent un rôle de défense, emmagasinent ou transportent des substances, interviennent dans les communications cellulaires, permettent de produire le mouvement ou soutiennent les tissus. Les protéines sont des polymères d'acides aminés, molécules possédant un groupement amine et un groupement acide carboxylique (figure 2).

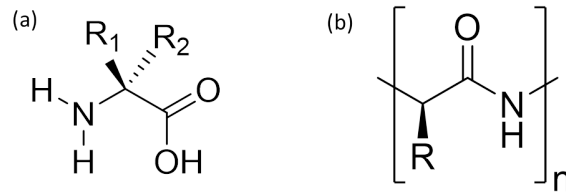


FIGURE 2 – (a) Structure générale d'un acide aminé, où R_1 et R_2 représentent chacun un atome d'hydrogène ou une chaîne carbonée. (b) Schéma général d'un acide aminé impliqué dans la structure primaire d'une protéine.

Une protéine est caractérisée non seulement par sa séquence, c'est-à-dire l'ordre dans lequel ses acides aminés constitutifs sont liés, mais également par sa conformation tridimensionnelle, par exemple repliée ou dépliée.

Q. 1. Indiquer quelles interactions entre acides aminés favorisent la forme repliée d'une protéine. Préciser pour chacune l'ordre de grandeur de l'énergie d'interaction et le comparer avec l'énergie thermique à 300 K.

La plupart des protéines sont actives sous leur forme repliée, et perdent leur activité lorsqu'elles se déplient. Ce phénomène dit de dénaturation correspond à la désorganisation de la structure spatiale mais n'affecte pas la séquence.

Q. 2. À partir des interactions proposées à la question 1, justifier qu'une variation de pH puisse entraîner la dénaturation d'une protéine.

Une variation de quelques degrés Celsius suffit en général pour entraîner une dénaturation thermique. Pour déterminer précisément la température à laquelle une protéine se dénature, on utilise un calorimètre différentiel à balayage (figure 3). Un tel dispositif est composé d'une enceinte contenant deux calorimètres identiques, parfaitement isolés thermiquement. L'un contient l'échantillon à analyser, l'autre contient une référence. Les deux compartiments sont initialement à la même température, puis sont chauffés de façon à maintenir l'égalité des températures dans les deux compartiments. L'information recueillie est la différence de puissance nécessaire à fournir aux deux compartiments afin qu'ils conservent une température identique.

La température T à un instant t durant un balayage linéaire en température est

$$T = T_0 + \alpha t,$$

où α est la vitesse de balayage en température.

Q. 3. Exprimer la chaleur totale q_p fournie au système à l'instant t en fonction de sa capacité calorifique C_p et de la vitesse de balayage α . On supposera que la capacité calorifique est indépendante de la température dans la petite gamme de températures balayée.

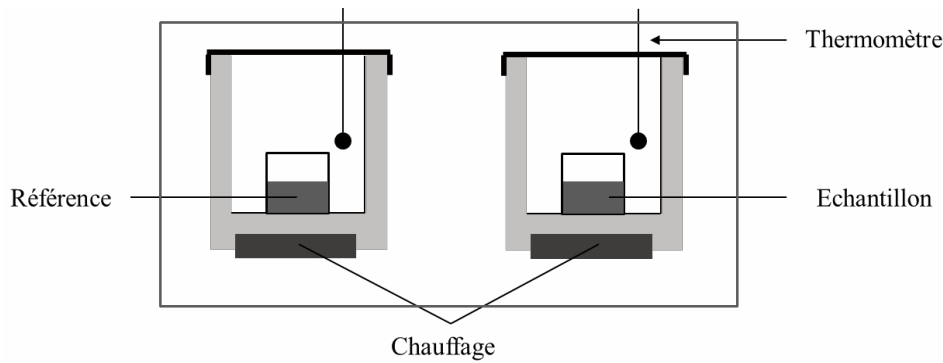


FIGURE 3 – Calorimètre différentiel à balayage.

Lorsqu'un processus endothermique comme la dénaturation d'une protéine a lieu au sein de l'enceinte contenant l'échantillon, il faut fournir une énergie supplémentaire q_p^{ex} afin d'obtenir la même variation de température que dans l'enceinte de référence. Cet excédent d'énergie peut être exprimé comme une contribution supplémentaire à la capacité calorifique, qu'on notera C_p^{ex} .

Q. 4. Exprimer la capacité calorifique C_p^{ex} en fonction de l'excédent de puissance électrique P^{ex} nécessaire pour égaliser les températures dans les deux compartiments.

Pour déterminer la température au-dessus de laquelle une protéine perd sa structure native, on trace un thermogramme, représentant C_p^{ex} en fonction de la température. La figure 4 présente le thermogramme de l'ubiquitine, une protéine.

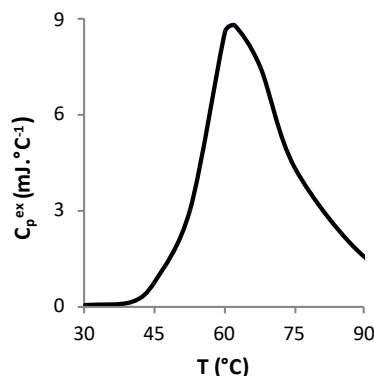


FIGURE 4 – Thermogramme de l'ubiquitine.

Q. 5. À l'aide du thermogramme, déterminer la température au-dessus de laquelle l'ubiquitine commence à perdre sa structure native. Comment ferait-on pour déterminer la variation d'enthalpie associée au processus de dénaturation à partir du thermogramme ?

Très souvent la dénaturation entraîne la perte de solubilité de la protéine et donc sa précipitation. On peut alors utiliser ce phénomène pour isoler une protéine, ou séparer les protéines de plus petites molécules.

Q. 6. En s'appuyant sur un schéma pour argumenter la réponse, expliquer comment la dénaturation pourrait entraîner la précipitation d'une protéine dans l'eau.

1.2 Étude des protéines par osmométrie

Une fois la protéine isolée, il est possible de lui faire retrouver sa forme repliée native en la replaçant dans ses conditions biologiques : elle reprend alors sa conformation initiale. Une fois

renaturée, la protéine peut être mise en solution et étudiée par osmométrie, technique permettant de caractériser la masse molaire moyenne en nombre du polypeptide.

Lorsque l'on place dans un compartiment A un solvant pur, séparé d'un compartiment B contenant le même solvant ainsi qu'un soluté, par une membrane perméable *uniquement* au solvant (figure 5.a), on observe un passage spontané de solvant pur du compartiment A vers le compartiment B . C'est le phénomène d'osmose. On appelle pression osmotique Π la pression qui devrait être appliquée à la solution (compartiment B) afin d'empêcher le flux de solvant de A vers B (figure 5.b). L'osmométrie est une méthode permettant d'accéder à la masse molaire du soluté par mesure de la pression osmotique à différentes concentrations en soluté ; et dans le cas de macromolécules en solution, à la masse molaire moyenne en nombre.

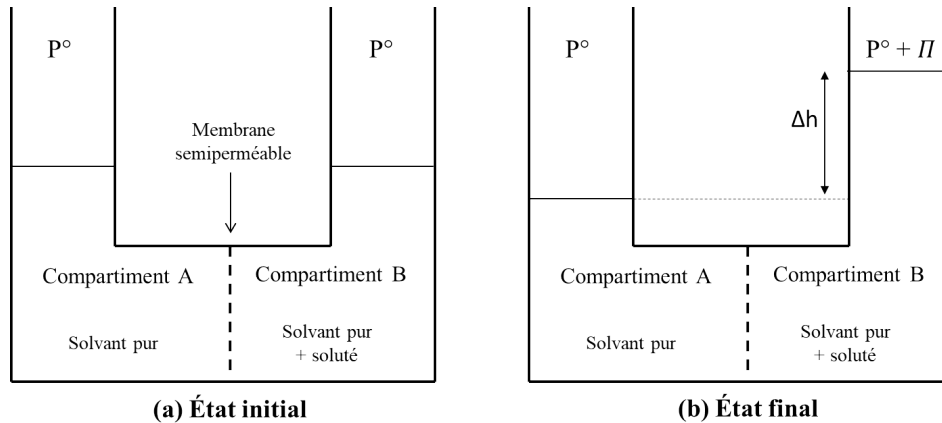


FIGURE 5 – (a) État initial avant passage du solvant de A vers B . (b) État final à l'équilibre, après passage du solvant de A vers B .

Pour la suite de cette partie, la fraction molaire du solvant est notée x_1 , celle du soluté x_2 , et la pression P° est égale à 1 bar.

On rappelle que pour un polymère constitué de n_i chaînes de masse molaire M_i , on définit :

- la masse molaire moyenne en nombre $\overline{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$
- la masse molaire moyenne en masse $\overline{M}_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$.

Q. 7. Justifier qu'à l'état initial (figure 5.a), le système n'est pas à l'équilibre et que l'on observe le passage du solvant pur de A vers B .

Q. 8. En supposant la solution du compartiment B idéale, et sachant que l'on travaille en conditions diluées, établir l'expression de la pression osmotique Π en fonction de la concentration C_2 en soluté. Cette égalité est la relation de van 't Hoff.

Q. 9. Démontrer que dans le cas où le soluté est un polymère en solution, la relation de van 't Hoff peut s'écrire :

$$\frac{\Pi}{C_m} = \frac{RT}{\overline{M}_n}, \quad (1)$$

où \overline{M}_n est la masse molaire moyenne en nombre du polymère et C_m sa concentration massique.

Q. 10. Sans la relation de van 't Hoff précédente, indiquer si on aurait pu prévoir le type de masse molaire moyenne (en nombre ou en masse) mesurable par osmométrie. La réponse pourra s'appuyer sur le raisonnement fourni à la question 7.

Afin de déterminer la masse molaire d'une enzyme, on mesure les pressions osmotiques de solutions de concentrations croissantes de cette enzyme à 298 K. Les données sont reportées dans le tableau 1 et tracées dans la figure 6.

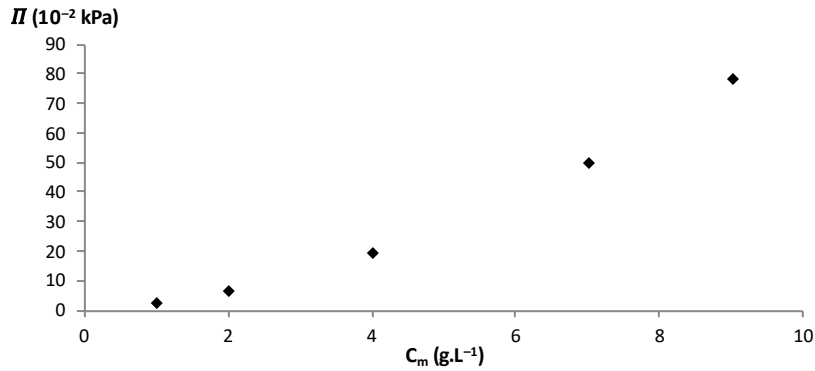


FIGURE 6 – Pression osmotique Π en fonction de la concentration massique pour des solutions d'une enzyme à 298 K.

| | | | | | |
|------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| C_m (g · L ⁻¹) | 1,00 | 2,00 | 4,00 | 7,00 | 9,00 |
| Π (10 ⁻² kPa) | 2,75 | 6,96 | 19,70 | 50,00 | 78,50 |

TABLEAU 1

Le graphique de la figure 6 montre que la relation 1 établie à la question 9 ne convient pas : les interactions entre le soluté et le solvant ne peuvent être négligées. On utilise alors une expression corrigée de la loi de van 't Hoff :

$$\frac{\Pi}{RTC_m} = \frac{1}{M_n} + A_2C_m . \quad (2)$$

Le terme A_2 tient compte de l'écart à l'idéalité. Un nouveau tracé, représenté figure 7, montre que l'expression 2 apporte une description satisfaisante des données.

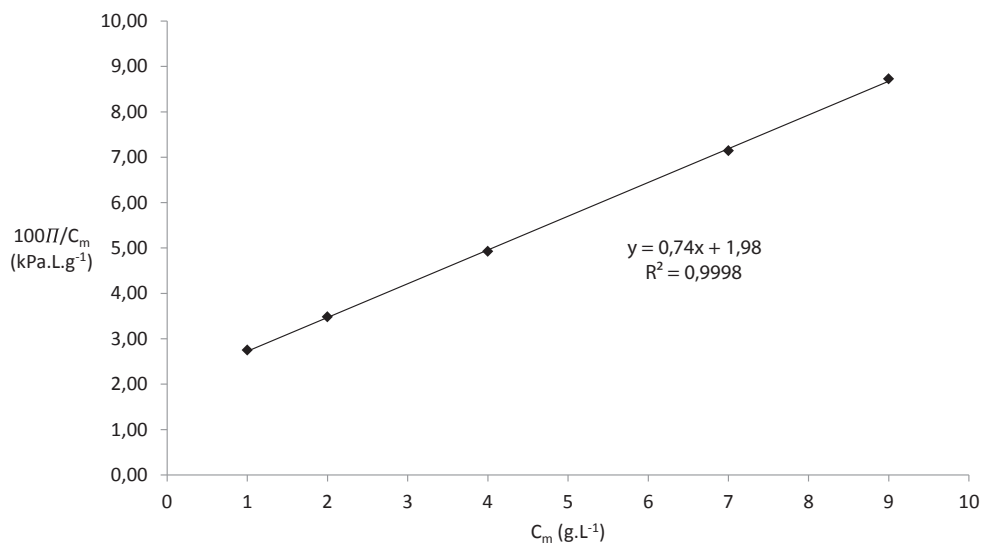


FIGURE 7 – Ratio entre pression osmotique et concentration massique tracé en fonction de la concentration massique.

Q. 11. Déterminer à partir de la figure 7 la valeur de la masse molaire moyenne en nombre de l'enzyme.

Q. 12. À partir de la figure 7, déterminer la valeur du terme A_2 .

On décrit le polymère en solution par le modèle de la pelote statistique : c'est une conformation d'un polymère dans laquelle les unités de monomères sont orientées de façon aléatoire, en étant néanmoins liées aux unités adjacentes (figure 8). Cette description correspond à une répartition statistique de la forme des macromolécules en solution.



FIGURE 8 – Représentation d'une pelote statistique.

Le terme A_2 permet de décrire l'interaction entre le polymère en solution et le solvant. Lorsque le terme A_2 est positif, on qualifie le solvant de “bon solvant” : il interagit favorablement avec le polymère et le solvate. Lorsqu'il est négatif, le solvant est qualifié de “mauvais solvant”.

Q. 13. Justifier d'un point de vue thermodynamique qu'une macromolécule dans un “bon solvant” n'adopte pas la conformation d'une chaîne étirée.

Q. 14. Illustrer à l'aide d'un schéma une macromolécule en “bon solvant”.

Q. 15. Représenter la macromolécule dans un “mauvais solvant”.

1.3 Utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique

La méthode précédente permet d'accéder uniquement à la valeur de la masse molaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) et non à la masse molaire moyenne en masse (\overline{M}_w). Une autre méthode de caractérisation, la chromatographie d'exclusion stérique, permet d'accéder à ces deux grandeurs.

La chromatographie d'exclusion stérique est le nom donné à la séparation, par chromatographie liquide, de macromolécules selon leur taille. Une phase mobile liquide contenant le polymère est injectée en tête de colonne, et est ensuite entraînée à travers la colonne par l'action d'une pompe. La phase stationnaire est un matériau poreux, constitué de petites billes sphériques gonflées par le solvant de la phase mobile. Chaque bille contient des pores de *volume variable*.

Le solvant d'éluion est choisi de façon à être un “bon solvant” (terme introduit dans la partie précédente) du polymère étudié. Le suivi de l'évolution de l'éluion des macromolécules constituant le polymère étudié est réalisé en sortie de colonne grâce à un détecteur qui mesure généralement la différence d'indice de réfraction entre la fraction éluée et une référence.

Q. 16. Pourquoi doit-on choisir un “bon solvant” comme éluant ?

Q. 17. Discuter de l'interaction d'une macromolécule avec un pore, en fonction de la taille de la macromolécule.

Q. 18. Expliquer comment la chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les macromolécules en fonction de leur taille, puis comparer de façon qualitative la taille des macromolécules ayant suivi les chemins **1** et **2** indiqués sur la figure 9.

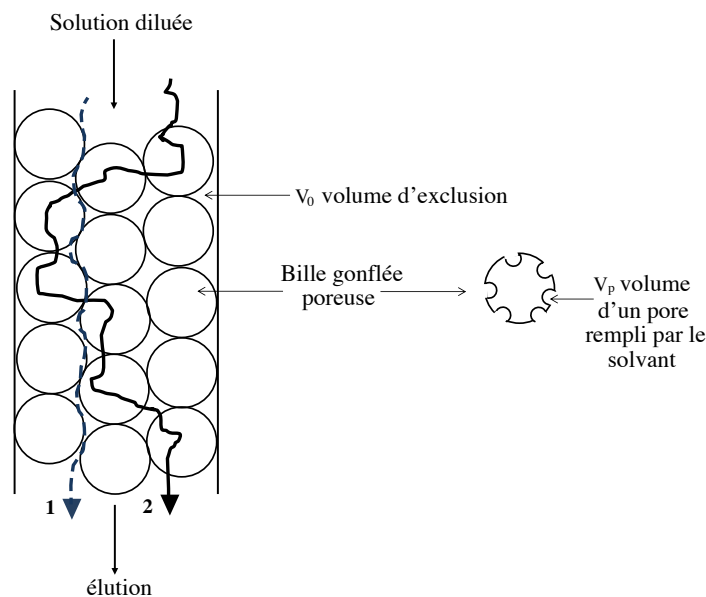


FIGURE 9 – Représentation schématique d'une chromatographie d'exclusion stérique.

Afin de déterminer la masse molaire des macromolécules éluées, il est nécessaire d'effectuer une courbe d'étalonnage au préalable. Pour cela, on élue des échantillons étalons dont les masses molaires moyennes en nombre et en masse sont connues. La figure 10 représente le chromatogramme typique d'une solution étalon de macromolécules. Les macromolécules sont détectées en sortie de colonne entre le volume d'exclusion V_0 , et le volume V_t qui correspond à la somme du volume d'exclusion et de celui des pores.

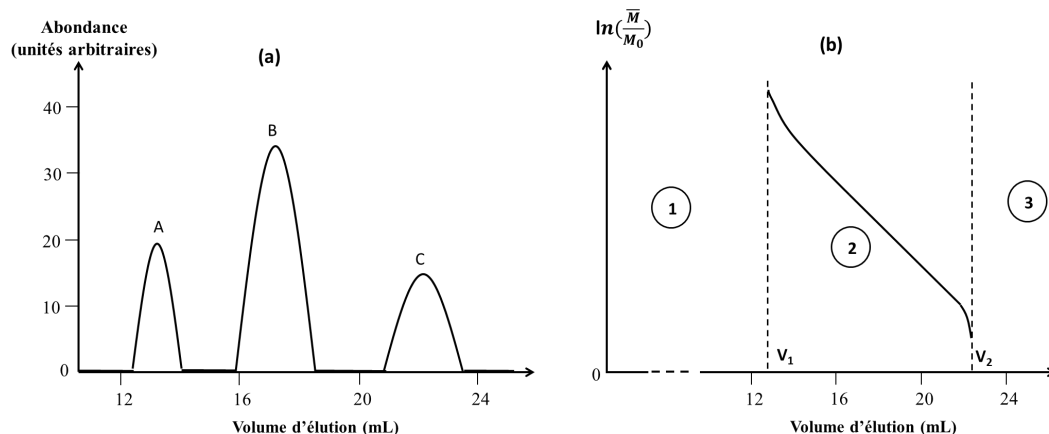


FIGURE 10 – (a) Chromatogramme d'une solution étalon. (b) Courbe d'étalonnage des masses molaires représentant $\ln(\bar{M}/M_0)$ en fonction du volume d'élution (l'allure est la même pour \bar{M}_n et \bar{M}_w ; $M_0 = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Q. 19. Donner l'expression du volume d'élution d'une macromolécule donnée, en fonction du volume d'exclusion V_0 , du volume V_t et de x_j , la fraction du volume total des pores accessibles à la macromolécule j . Préciser à quel volume sont éluées les plus petites macromolécules.

Q. 20. Indiquer à quoi correspondent les zones 1, 2 et 3 de la courbe d'étalonnage des masses molaires représentée à la figure 10.b. Indiquer à quoi correspondent les volumes V_1 et V_2 de cette même figure.

En pratique, l'expérimentateur doit d'une part, découper le diagramme représentant la réponse du détecteur en fonction du volume d'élution en un grand nombre de tranches verticales de hauteur h_i et de fraction volumique ΔV_i , et d'autre part, se servir de la courbe d'étalonnage donnant la correspondance entre le volume d'élution V_e et la masse M_i .

Q. 21. Expliquer comment on peut déterminer les masses molaires moyennes en nombre et en masse à partir de cette découpe du diagramme. La réponse pourra s'appuyer sur un schéma.

1.4 Chromatographie d'affinité

Dans le milieu biologique il n'est pas rare de trouver des protéines de masses moléculaires proches. La chromatographie d'exclusion stérique n'est alors pas le moyen le plus efficace pour isoler une protéine particulière afin de l'étudier. La chromatographie d'affinité a été développée dans ce but. C'est une méthode qui permet l'extraction et la purification d'enzymes, la purification d'anticorps ou encore l'isolement des protéines et acides nucléiques. Cette technique de chromatographie permet de séparer un composé en utilisant des interactions entre un ligand spécifique greffé sur une matrice macromoléculaire, et le substrat à isoler. Nous allons ici nous intéresser à la purification d'une protéine par cette méthode.

Dans la pratique, on réalise une colonne dont le support solide interagit spécifiquement avec la protéine que l'on souhaite isoler. On élue ensuite la solution contenant la protéine d'intérêt ainsi que des protéines non désirées. La protéine d'intérêt se fixe sur la phase stationnaire de la colonne, tandis que les autres éluent à travers la colonne. Une fois toutes les impuretés éluées, on décroche la protéine d'intérêt de la phase stationnaire à l'aide d'un éluant spécifique, et on récupère ainsi la protéine purifiée.

La chromatographie d'affinité sur ions métalliques est une des techniques couramment utilisées pour ce type de chromatographie. On synthétise dans un premier temps un gel (phase stationnaire), fonctionnalisé avec des ligands permettant la complexation d'un ion métallique. Cet ion métallique est ensuite introduit et fixé quantitativement sur la phase stationnaire. Afin que la protéine d'intérêt interagisse spécifiquement avec cet ion métallique, on introduit par génie génétique un marqueur poly-histidine (six histidines au moins) dans sa séquence. Le groupement imidazole de l'histidine (figure 11) présente une très bonne affinité pour certains ions métalliques, notamment les ions cuivre(II), permettant ainsi à la protéine de se lier au gel. La figure 12 présente les différentes étapes de préparation du gel.

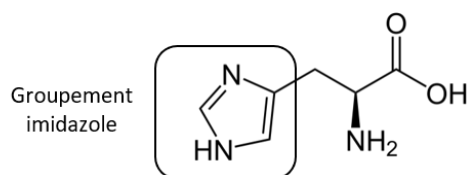


FIGURE 11 – Résidu histidine avec son groupement imidazole.

Le mélange à purifier est élué avec deux solutions aqueuses :

- **Solution 1** : tampon phosphate $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, imidazole $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7
- **Solution 2** : tampon phosphate $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, imidazole $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7

En sortie de colonne, on suit l'évolution de l'absorbance à 280 nm en fonction du volume élué. Le résultat est donné dans la figure 13.

Q. 22. Donner le mécanisme de la fonctionnalisation de la chaîne par l'acide iminodiacétique (IDA) (voir figure 12). Préciser pourquoi on se place à pH 10.

On s'intéresse au complexe formé par interaction de l'ion cuivre(II) avec le gel. Dans un premier temps, on étudie un complexe de cuivre en géométrie octaédrique : $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Le

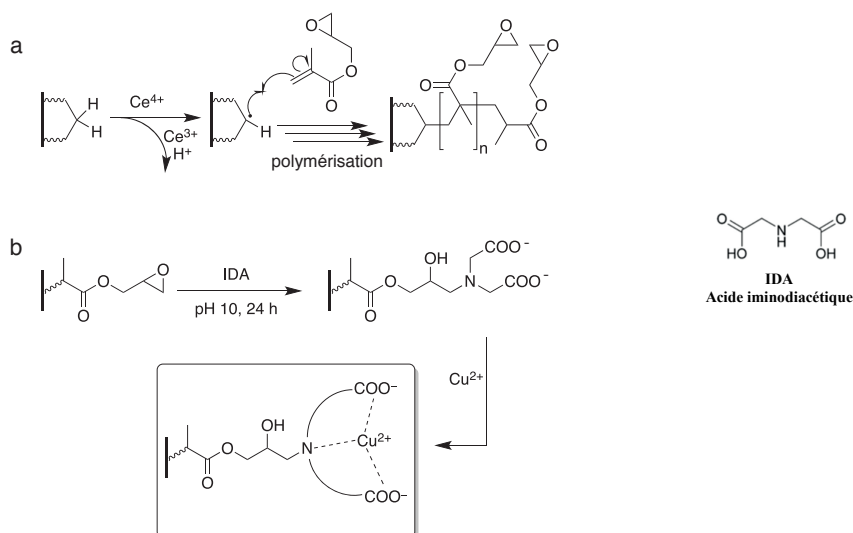


FIGURE 12 – Étapes de préparation du gel. (a) Greffage des fonctions époxydes. (b) Fonctionnalisation de la chaîne par l'acide iminodiacétique et fixation des ions cuivre(II).

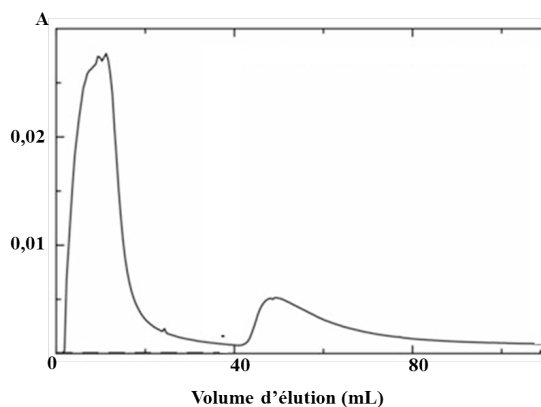


FIGURE 13 – Absorbance à 280 nm en fonction du volume d'éluion (d'après J. Chromatogr. A (2013) 1272, 145-149).

diagramme d'orbitales moléculaires de ce complexe ainsi que les orbitales du fragment $(\text{H}_2\text{O})_6$ sont donnés dans la figure 14.

Q. 23. Donner les critères à considérer pour que des orbitales puissent interagir. Donner les orbitales du cuivre à considérer pour la construction du diagramme du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ et les représenter.

Q. 24. À quel type de ligand appartient H_2O ? En le justifiant, donner les interactions des orbitales du fragment $(\text{H}_2\text{O})_6$ avec celles du métal. *Les éléments de symétrie des différentes orbitales seront présentés sous forme de tableau. L'orientation des axes donnée dans la figure 14 devra être respectée.* Justifier la levée de dégénérescence des orbitales d du métal observée.

Lorsque la protéine marquée par la chaîne poly-histidine se lie à l'ion cuivre(II) du gel, le complexe adopte une géométrie tétraédrique.

Q. 25. En le justifiant, préciser par quel atome du groupement imidazole l'histidine se lie au complexe de cuivre. Indiquer à quelle catégorie de ligands appartiennent les ligands de ce complexe.

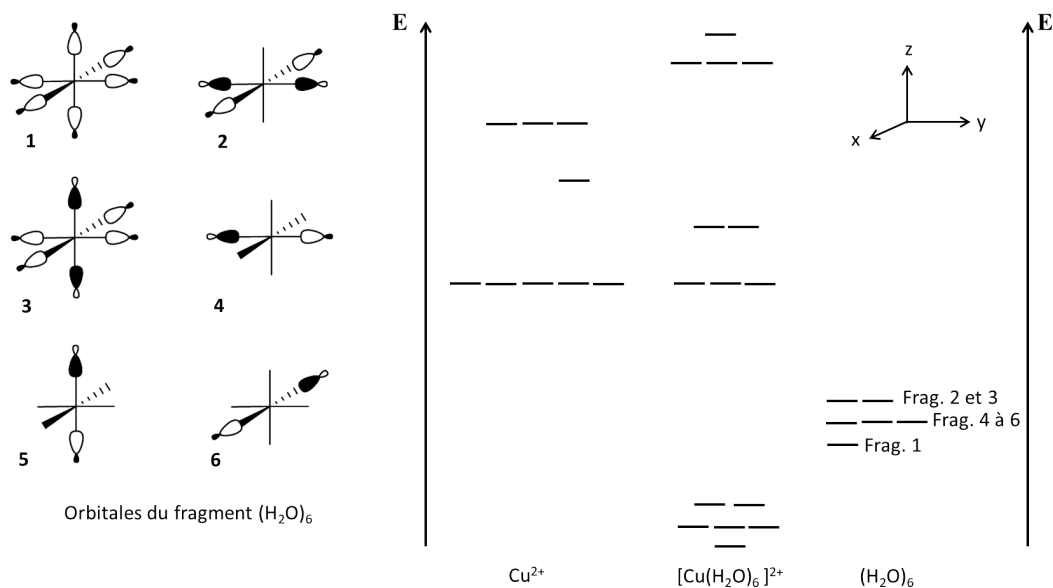


FIGURE 14 – Orbitales du fragment $(\text{H}_2\text{O})_6$ et diagramme d'orbitales moléculaires du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

Pour simplifier son étude, on modélise le complexe formé dans le gel par le complexe tétraédrique $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Pour construire le diagramme d'orbitales moléculaires de ce complexe, on place le métal au centre d'un cube, et les ligands sur la moitié des sommets de ce cube. On considère chaque ligand NH_3 comme étant uniquement σ -donneur, et l'orbitale σ par laquelle il intervient sera modélisée par une orbitale s . Les orbitales du fragment $(\text{NH}_3)_4$ sont représentées dans la figure 15.

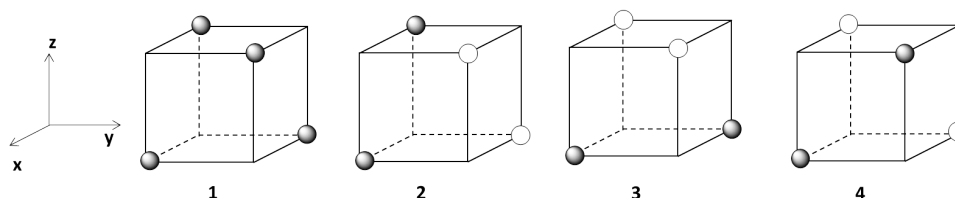


FIGURE 15 – Orbitales simplifiées du fragment $(\text{NH}_3)_4$. On place le repère au centre du cube.

Q. 26. Sachant qu'une orbitale du métal interagit *au maximum* avec une orbitale de fragment, représenter les quatre orbitales moléculaires *liantes* issues de l'interaction de Cu^{2+} avec $(\text{NH}_3)_4$. Justifier de façon concise le raisonnement employé.

Q. 27. À l'aide de la question précédente et du diagramme de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, représenter le diagramme d'orbitales moléculaires de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Indiquer par des traits en pointillés de quelles orbitales de fragment sont issues les orbitales moléculaires. La forme des orbitales moléculaires ne sera pas représentée. Effectuer le remplissage électronique de ce diagramme et conclure sur la stabilité du complexe tétraédrique $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$.

Q. 28. Lors de la préparation du gel, pourquoi réalise-t-on une polymérisation pour greffer les groupements époxydes au lieu de directement fixer une petite molécule avec une fonction époxyde ?

Q. 29. Justifier pourquoi deux vagues sont observées sur le chromatogramme figure 13. Expliquer alors pourquoi on utilise deux solutions différentes pour l'élution.

Q. 30. Préciser pourquoi on se place à pH 7 dans les solutions d'éluion.

Q. 31. La solution **1** contient de l'imidazole en concentration $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. L'imidazole n'est pas nécessaire pour cette solution, néanmoins il améliore la purification. Proposer une explication quant à son utilisation dans cette solution.

Q. 32. Donner le rôle de l'imidazole dans la solution **2**, et justifier notamment sa concentration élevée. Indiquer quelle serait l'allure du chromatogramme figure 13 si on utilisait une solution **2** dix fois moins concentrée en imidazole.

Le mélange initial de protéines, ainsi que la protéine purifiée, peuvent être analysés par électrophorèse. L'électrophorèse classique est une méthode de caractérisation analogue à la chromatographie sur couche mince : les composés à analyser sont déposés sur un gel, puis on applique un champ électrique afin de réaliser une migration différentielle des molécules en fonction de leur mobilité électrique.

Q. 33. Justifier pourquoi on ne réalise pas une chromatographie sur couche mince classique pour l'analyse des protéines.

Pour étudier la mobilité d'une espèce dans un champ électrique, on considère dans un premier temps une particule sphérique de charge q , de rayon hydrodynamique r et immergée dans un solvant de viscosité η . Cette particule est mise en mouvement par l'action d'un champ électrique E , et subit une force de frottement due au solvant de norme F_f telle que

$$F_f = 6\pi\eta r v, \quad (3)$$

où v est la vitesse de la particule.

Q. 34. Montrer que la particule accélère jusqu'à atteindre une vitesse constante v proportionnelle à E telle que $v = \mu_l E$. Donner l'expression du facteur μ_l appelé mobilité limite.

Afin de décrire la réalité du milieu électrophorétique, on ne considère plus une particule seule dans un solvant mais des particules de charge q en solution dans un liquide de pH donné et de force ionique fixe. On considère que durant l'expérience, le champ électrique est uniforme dans toute la solution, et que la force ionique et le pH de la solution restent inchangés. Le milieu, globalement neutre, est constitué d'anions et de cations, et chaque particule s'entoure donc d'un nuage d'ions (figure 16).

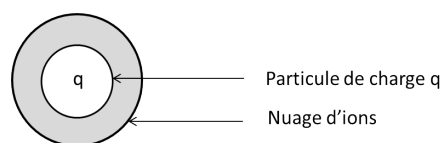


FIGURE 16 – Particule de charge q , en milieu ionique, entourée d'un nuage d'ions.

Q. 35. Déterminer la charge globale du nuage d'ions entourant une particule de charge q . Lorsque l'électrophorèse commence, on observe, par rapport à la situation de la question 34, l'apparition d'une nouvelle force F_r qui s'exerce sur la particule. Proposer une interprétation moléculaire pour cette force, et déterminer sa direction.

Q. 36. Donner l'expression de la mobilité μ_e d'une particule en milieu électrophorétique en fonction notamment de F_r , et comparer cette mobilité μ_e à la mobilité μ_l . Pour des milieux de force ionique et de viscosité croissantes, discuter l'évolution de μ_e . Indiquer quels paramètres de l'expérience peuvent être adaptés pour optimiser la séparation par électrophorèse dans ces conditions.

La vitesse à laquelle se déplace une protéine dans l'eau sous l'effet d'un champ électrique a été mesurée à différentes valeurs du pH. Les résultats sont regroupés dans le tableau 2. Le point isoélectrique est le pH pour lequel une espèce ionique présente une charge globale nulle.

| pH | 4,20 | 4,60 | 5,20 | 5,65 | 6,30 | 7,00 |
|---|------|------|-------|-------|-------|-------|
| v ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) | 0,50 | 0,18 | -0,25 | -0,65 | -0,90 | -1,25 |

TABLEAU 2 – Vitesse d'une protéine sous l'action d'un champ électrique $E = 150 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ en fonction du pH.

Q. 37. À partir des données du tableau, déterminer le point isoélectrique de cette protéine. Déterminer sa mobilité électrophorétique μ_e à pH = 4,2.

L'inconvénient de l'électrophorèse classique pour séparer des protéines est qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille d'une protéine et sa charge nette. Ainsi, on ne sépare pas les protéines en fonction de leur masse moléculaire mais en fonction de leur charge. Pour y remédier, on a recours à la technique de SDS-PAGE. Dans cette méthode, le mélange initial de protéines, ainsi que les fractions éluées lors de la chromatographie d'affinité, sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent ionique chargé dont la longue chaîne carbonée peut interagir avec la chaîne peptidique hydrophobe de la protéine. Ces interactions provoquent le dépliement de la protéine (voir figure 17). On retrouve en moyenne une molécule de SDS tous les deux acides aminés de la chaîne peptidique.

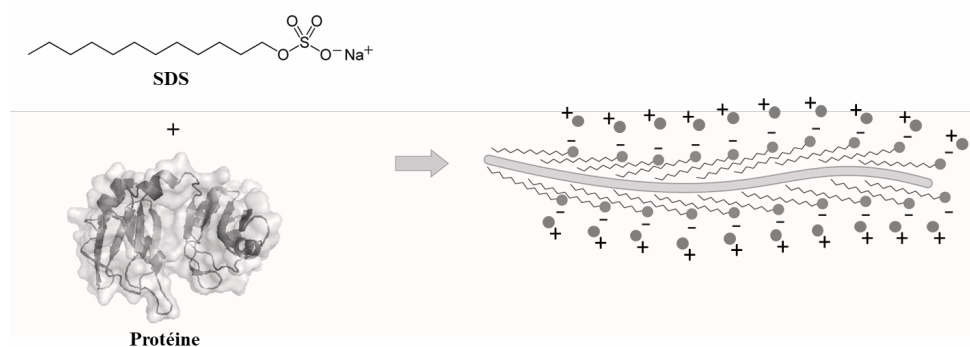


FIGURE 17 – Représentation schématique de l'interaction du SDS avec une protéine.

La figure 18 présente le résultat de la SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont révélées à l'aide d'un indicateur coloré.

Q. 38. Justifier pourquoi le SDS permet de faire une séparation des protéines en fonction de leur masse molaire par rapport à une électrophorèse classique.

Q. 39. Analyser la SDS-PAGE réalisée à la figure 18. Conclure quant à la purification effectuée, et donner une valeur en kDa du poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

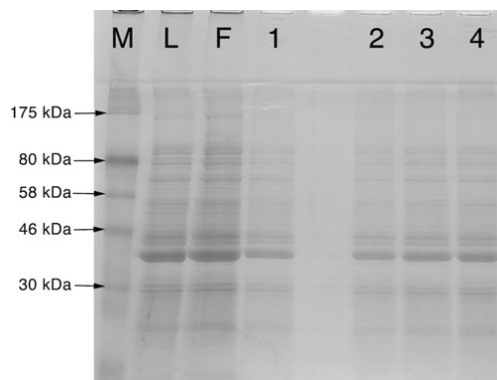


FIGURE 18 – SDS-PAGE du mélange initial (L), pendant le passage de la solution **1** (F), pendant le passage de la solution **2** (fractions 1 à 4 collectées au cours de la chromatographie d'affinité). M est un marqueur de masse moléculaire (d'après J. Chromatogr. A (2013) 1272, 145-149).

2 Deuxième partie : Action de l'acide zaragozique A sur l'organisme

Cette partie représente environ 15% du total des points.

2.1 Activité biologique de l'acide zaragozique A

Les médicaments interviennent dans l'organisme au niveau des voies métaboliques de production de certaines espèces. Par exemple l'aspirine est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui inhibe la production de prostaglandines (agents de signalisation de l'organisme provoquant une inflammation locale), par interaction avec deux enzymes qui permettent leur production.

Pour qu'un médicament soit efficace avec un minimum de nocivité, il faut qu'il agisse sur la production d'une espèce responsable de la pathologie que l'on souhaite traiter, sans intervenir dans la production d'autres espèces. Dans le cas du cholestérol, deux principes actifs majeurs sont utilisés pour inhiber sa production : le Mevacor et l'acide zaragozique A. Leur mode d'action est représenté dans la voie métabolique du cholestérol sur la figure 19.

Q. 40. Si on considère le groupe transformé équivalent à un ester, indiquer quel type de transformation est mis en jeu pour former l'acide mévalonique **4**. Préciser quel réactif chimique pourrait être utilisé pour une telle réaction, et quel est l'avantage à mettre en œuvre une enzyme.

Q. 41. Justifier lequel des deux médicaments est le plus indiqué pour limiter les effets secondaires, en lien avec la figure 19.

2.2 Cinétique enzymatique : inhibition compétitive de la squalène synthase par l'acide zaragozique A

L'acide zaragozique A ralentit l'activité de l'enzyme squalène synthase, en formant de manière réversible un adduit inactif avec l'enzyme. C'est un inhibiteur compétitif efficace.

L'enzyme squalène synthase catalyse la réaction de dimérisation du farnesyl-pyrophosphate **5**, selon un profil cinétique caractéristique d'un mécanisme de Michaelis–Menten. L'évolution de la vitesse de formation du produit de réaction, en absence et en présence de l'inhibiteur **I** est représentée dans le graphe suivant (figure 20), suite à une étude cinétique.

Le mécanisme de l'enzyme michaelienne est décrit par 2 étapes successives. La première correspond à l'équilibre d'association de l'enzyme **E** avec le substrat **S**, formant l'adduit **ES**. La constante de l'équilibre de dissociation de **ES** est K_M , la constante michaelienne. La deuxième étape correspond à l'étape élémentaire de formation du produit **P**, avec la constante de vitesse k . En présence de l'inhibiteur **I**, un équilibre compétitif s'ajoute, avec l'association de l'enzyme **E** et de **I**, formant l'adduit **EI**. La constante de l'équilibre de dissociation de **EI** est K_I , la constante d'inhibition.

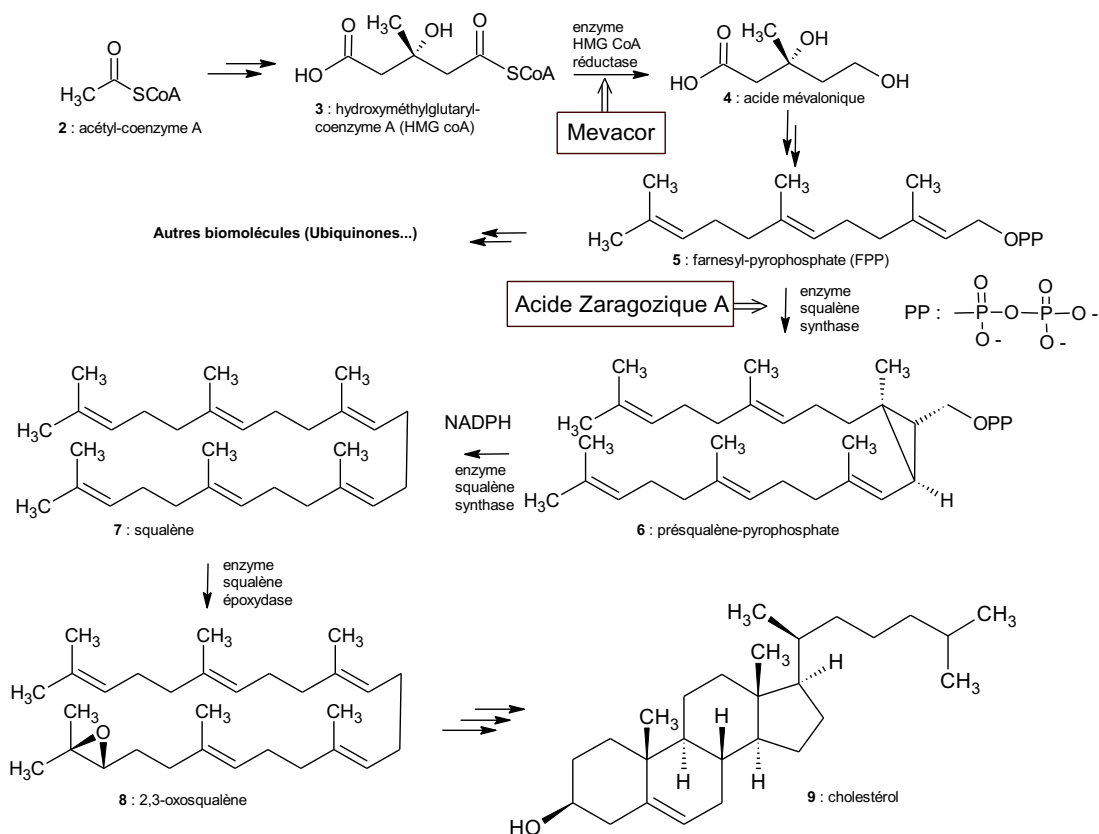


FIGURE 19 – Voie métabolique simplifiée du cholestérol 9.

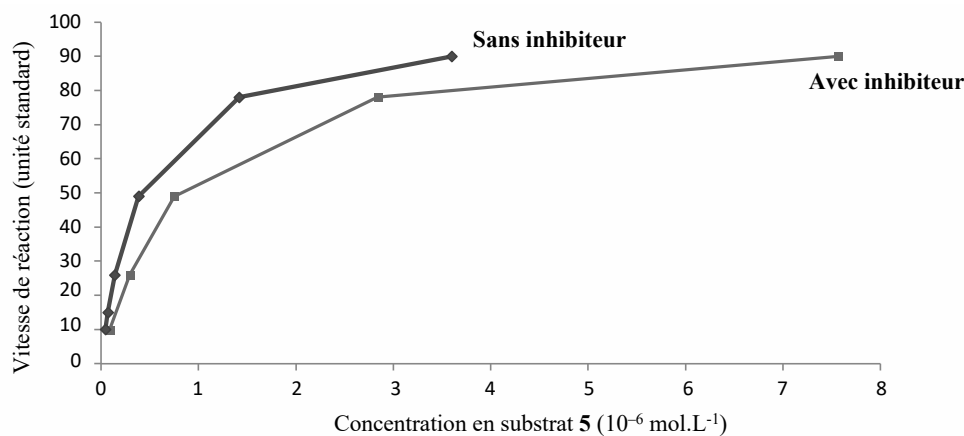


FIGURE 20 – Dépendance de la vitesse de réaction de l'enzyme **E** squalène synthase, en fonction de la concentration en substrat **S** 5; mesures en absence d'inhibiteur **I**, ou en présence de l'inhibiteur **I** acide zaragozique A, à la concentration de $8 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$.

Q. 42. Les enzymes sont essentielles pour les êtres vivants car elles catalysent de nombreuses réactions. Donner l'allure d'un profil réactionnel simple avec et sans catalyseur. Expliciter l'influence de la catalyse sur la thermodynamique et la cinétique d'une réaction.

Q. 43. Représenter les schémas réactionnels sans et avec l'inhibiteur **I**. Exprimer V , la loi cinétique de l'étape de formation du produit **P**.

Q. 44. En absence d'inhibiteur, exprimer le bilan de matière de l'enzyme. Exprimer la vitesse maximale de réaction V_{\max} , en fonction de la concentration totale introduite de l'enzyme $[E]_T$. Exprimer la vitesse de réaction V , en fonction de V_{\max} , de K_M et de la concentration en substrat

[S].

Q. 45. Si l'on se place dans les conditions réactionnelles où la vitesse de réaction V mesurée est égale à la moitié de V_{\max} , estimer la valeur numérique de K_M à partir des données expérimentales de la figure 20.

Q. 46. En présence de l'inhibiteur **I**, exprimer le bilan de matière de l'enzyme. Exprimer la vitesse maximale de réaction V_{\max} , en fonction de la concentration totale introduite de l'enzyme $[E]_T$. Conclure sur l'effet de l'inhibiteur compétitif **I** sur la vitesse maximale de l'enzyme michaelienne.

Q. 47. Exprimer la vitesse de réaction V , en fonction de V_{\max} , de K_M , de K_I , des concentrations en substrat [S] et inhibiteur [I].

On note la constante michaelienne apparente K_M^{app} :

$$K_M^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{C^{\circ} K_I} \right) \quad (4)$$

où $C^{\circ}=1 \text{ mol.L}^{-1}$ est la concentration standard.

Q. 48. Si l'on se place dans les conditions réactionnelles où la vitesse de réaction V mesurée est égale à la moitié de V_{\max} , estimer la valeur numérique de K_M^{app} à partir des données expérimentales de la figure 20.

Q. 49. Indiquer le rapport numérique entier entre les valeurs de K_M^{app} et de K_M . Dans ces conditions, estimer la valeur numérique de K_I à partir des données expérimentales de la figure 20.

Du point de vue pharmacologique, il est commode d'estimer l'efficacité de l'inhibition d'une enzyme par la valeur CI_{50} de la concentration en inhibiteur permettant de limiter l'activité enzymatique à 50%. La formule de Cheng-Prusoff permet d'estimer cette valeur :

$$K_I = \frac{CI_{50}}{C^{\circ} + \frac{[S]}{K_M}} \quad (5)$$

Les tests d'efficacité pharmacologique ont été réalisés pour une concentration en substrat optimale de 5 micromoles par litre.

Q. 50. Estimer la valeur de la CI_{50} . Que penser de l'efficacité de l'acide zaragozique? Un inhibiteur peut être caractérisé par deux grandeurs, K_I et CI_{50} , comparer la pertinence de ces deux indicateurs en vue d'une utilisation médicale.

3 Troisième partie : Synthèse totale de l'acide zaragozique A

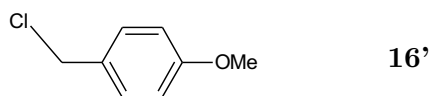
Cette partie représente environ 45% du total des points.

Les acides zaragoziques sont une famille de molécules naturelles produites par deux champignons : *Sporomielles intermedia* et *L. elatius*. Ils ne sont cependant accessibles qu'en petite quantité via ces champignons, et il a été nécessaire de mettre au point la synthèse totale de l'acide zaragozique A.

3.1 Première cible : l'intermédiaire clé 31

La premier réactif est très peu coûteux car il est utilisé pour la préparation industrielle du solvant THF, il s'agit du but-2-yne-1,4-diol **16**.

Q. 51. Proposer les conditions permettant la préparation du di-éther **17** correspondant, à partir du chlorure de *para*-méthoxybenzyle Cl-PMB **16'**. Vous discuterez du choix de la base. Proposer la structure de **17**.



La seconde étape correspond à l'hydrostannation de la fonction alcyne de **17**, par réaction du tributylstannane Bu_3SnH , en présence de $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$, générant l'alcène **18**. Le cycle catalytique est proposé à la figure 21.

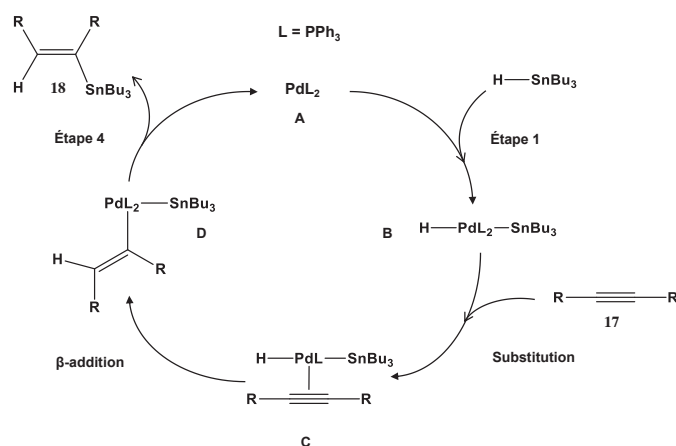
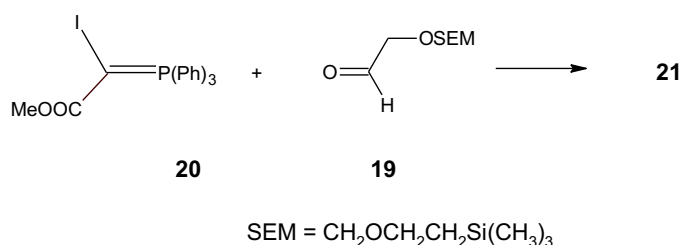


FIGURE 21 – Cycle catalytique de la réaction d'hydrostannation.

Q. 52. Nommer les étapes 1 et 4 du cycle et donner le degré d'oxydation du palladium dans les intermédiaires **A**, **B**, **C** et **D**. Préciser la structure du produit **18** formé.

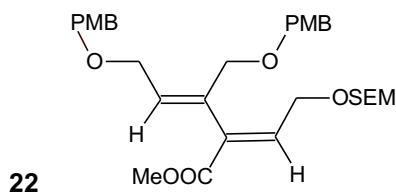
Q. 53. Illustrer à l'aide d'orbitales moléculaires les phénomènes de σ -donation et de π -rétrodonation ayant lieu lors de la coordination d'un alcyne avec le palladium. On limitera l'étude aux orbitales π de l'alcyne pointant vers le palladium. En déduire alors si un appauvrissement électronique du complexe de palladium permet de favoriser cette coordination.

Le deuxième réactif est l'alpha-aldol protégé **19**. Il réagit avec l'ylure de phosphore **20**, générant le produit **21**.



Q. 54. Donner la structure du produit **21** formé, sachant qu'il est de stéréochimie *Z*. Expliquer pourquoi le groupe hydroxyle du réactif **19** doit être protégé.

Les produits **18** et **21** sont ensuite couplés par réaction de Stille, catalysée au palladium, conduisant au produit **22** suivant :



L'étape suivante met en œuvre une réaction de dihydroxylation asymétrique, utilisant OsO₄ en présence d'un ligand optiquement actif.

Q. 55. Préciser le degré d'oxydation du métal osmium et en déduire son caractère électrophile ou nucléophile, et donc la double liaison de l'intermédiaire **22** qui devrait réagir préférentiellement lors de la dihydroxylation

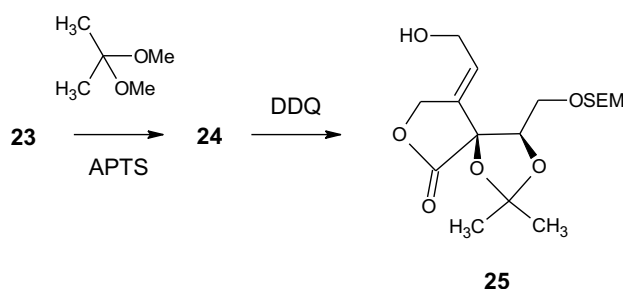
En réalité, c'est l'autre double liaison qui réagit très sélectivement. L'étude de la structure cristalline de **22** par diffraction des rayons X montre que le groupement ester est perpendiculaire à l'alcène.

Q. 56. Expliquer pourquoi ce n'est pas la géométrie attendue, et quelle pourrait être la cause de cette déformation. Expliquer en quoi cela modifie significativement les propriétés électroniques de l'alcène voisin, et proposer la structure du produit **23** formé.

Le composé **23** réagit avec le 2,2-diméthoxypropane, en présence d'une quantité catalytique de l'acide *para*-toluènesulfonique APTS, pour former le cétal **24**.

Q. 57. Donner la structure du produit **24**. Par analogie avec le mécanisme de la cétalisation par une cétone, proposer un mécanisme pour la formation de **24**. Quel est le rôle de l'APTS ?

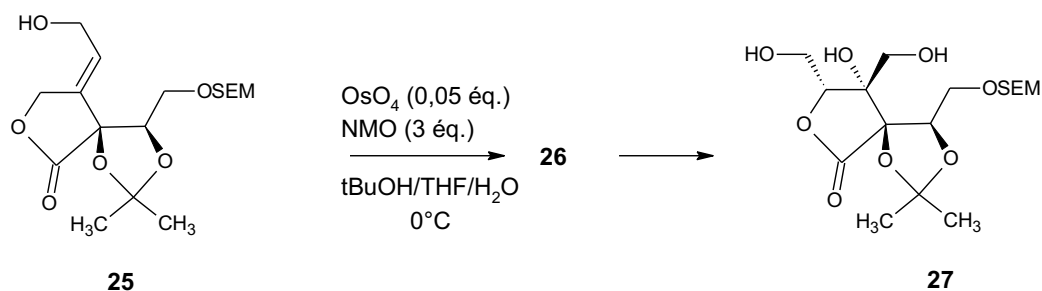
L'étape suivante est la déprotection sélective du produit **24**, par oxydation douce en employant la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ). Après hydrolyse *in situ*, le diol obtenu se cyclise et génère le produit **25**.



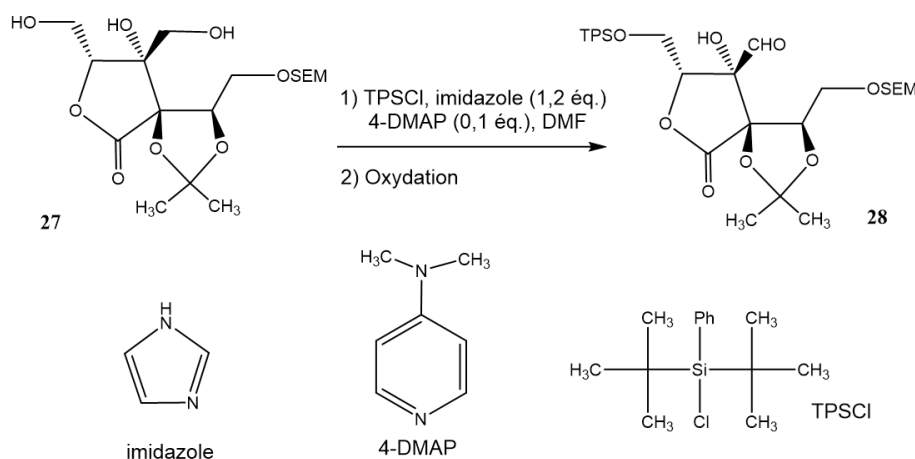
Q. 58. Indiquer le rôle de l'étape formant **24**. Comment se nomme la réaction de cyclisation générant **25** ? Expliquer pourquoi elle est régiosélective.

L'étape suivante met en jeu le tétraoxyde d'osmium en quantité catalytique et l'oxydant *N*-oxo-*N*-méthylmorpholine NMO. Le produit **26** obtenu présente un seul diastéréoisomère.

Q. 59. Donner les deux stéréoisomères de **26** que l'on peut obtenir. Proposer le mécanisme pour la formation de **27** en milieu acide, sans tenir compte de la stéréochimie. En déduire le stéréoisomère de **26** qui se forme effectivement.



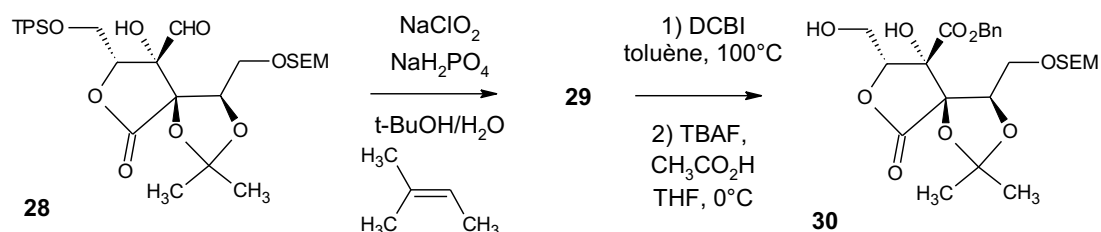
La première étape de la réaction suivante met en œuvre le di-tert-butylchlorophénylsilane TPSCl, en présence d'imidazole et de 4-diméthylaminopyridine (4-DMAP).



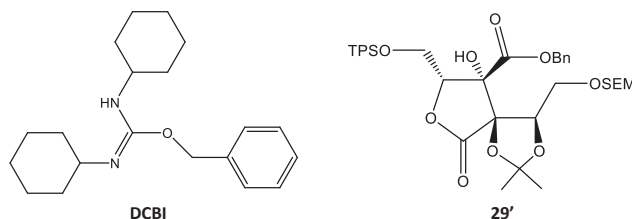
Q. 60. Quel type de transformation s'établit lors de la première étape? Expliquer l'importance de l'encombrement des substituants du silicium pour la régiosélectivité de la réaction.

L'étape suivante forme l'intermédiaire **29** par réaction d'oxydoréduction.

Q. 61. Calculer les degrés d'oxydation du chlore et du phosphore, dans les réactifs employés. Les degrés d'oxydation stables du phosphore et du chlore sont respectivement : +III, +IV, +V et 0, -I. En déduire le réactif actif en oxydoréduction. Préciser le site réactif de **28**. Le 2-méthylbut-2-ène piège le dichlore. Proposer les 2 couples redox mis en jeu, les demi-réactions redox impliquées et la réaction bilan. En déduire la structure de **29**.



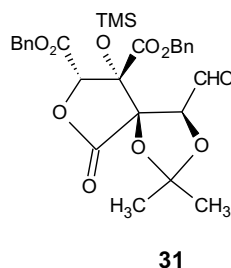
La réaction suivante conduit à la formation de l'ester benzylique **30**. Dans une première étape, **29** réagit avec le DCBI (N,N'-dicyclohexyl-O-benzylisourée), en libérant l'alcool benzylique pour former **29'**.



La seconde étape correspond à la déprotection de l'alcool silylé, par réaction avec le fluorure de tétrabutylammonium TBAF, pour former le produit **30**.

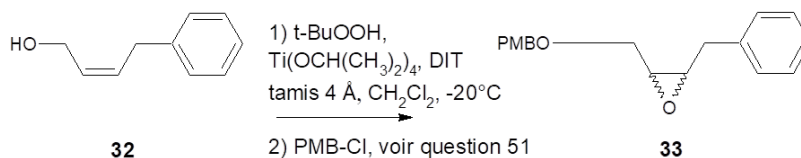
Q. 62. Comparer la réactivité de TBAF par rapport à celle de NaF.

Une dernière série d'ajustements fonctionnels conduit à la formation de l'intermédiaire clé **31**, pour la synthèse de l'acide zaragozique A :



3.2 Deuxième cible : chaîne latérale aliphatique C₁ **38**

L'alcool allylique **32** subit dans un premier temps une époxydation asymétrique, puis dans un second temps, la protection de la fonction alcool, dans les mêmes conditions que celles développées à la question 51, générant le produit **33**.



Le réactif utilisé dans l'époxydation asymétrique permet d'associer un hydroperoxyde ($t\text{-BuOOH}$) au titane, avec un ligand énantiomériquement pur, le (-)-D-tartrate de diisopropyle DIT.

Q. 63. Expliquer pourquoi cet hydroperoxyde présente une réactivité analogue à celle des peroxyacides.

Q. 64. Sachant que cet hydroperoxyde réagit en tant qu'électrophile, identifier l'orbitale frontalière de l'alcène avec laquelle il interagit. En déduire la direction d'approche optimale de l'oxygène vers l'alcène.

En présence du ligand DIT, l'état de transition de la réaction d'époxydation peut être représenté par le complexe suivant, en figure 22.

Q. 65. À l'aide du mode de coordination de l'alcool allylique sur le titane représenté figure 22, et de la question précédente, représenter l'approche la plus favorable entre l'oxygène et l'alcène

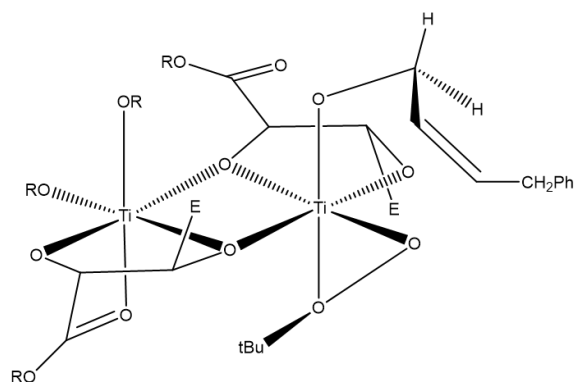


FIGURE 22 – Proposition d'état de transition pour l'époxydation asymétrique.

dans le complexe de titane représenté figure 22. En déduire la stéréochimie de l'énantiomère majoritairement obtenu (excès énantiomérique de 81%).

L'époxyde obtenu peut être qualitativement décrit par les orbitales moléculaires (O.M.) du cycle de l'oxirane C_2H_4O (figure 23). Elles sont générées par recouvrement des O.M. de l'alcène participant à l'interaction avec les orbitales atomiques (O.A.) de valence de l'oxygène, positionnées comme indiqué sur la figure.

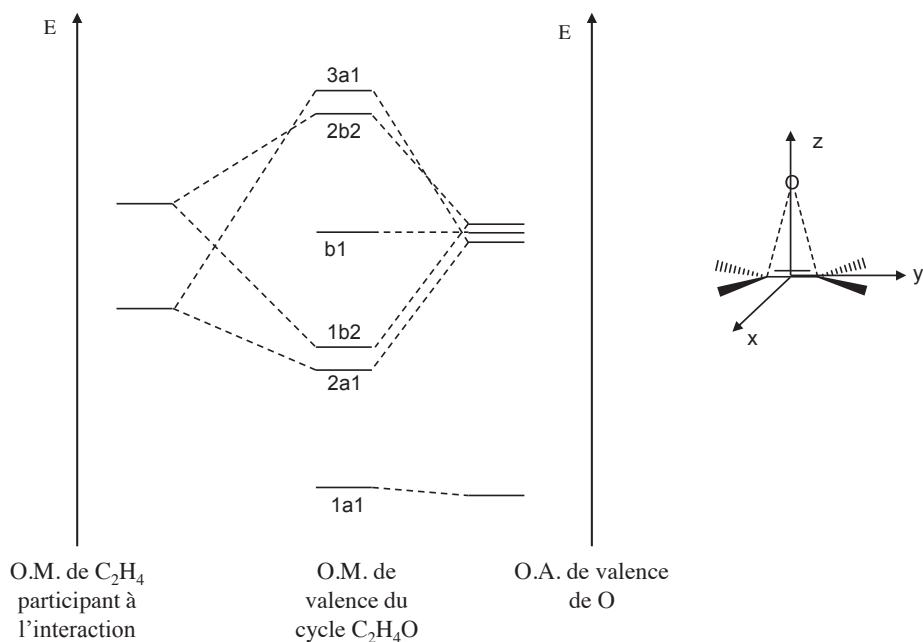
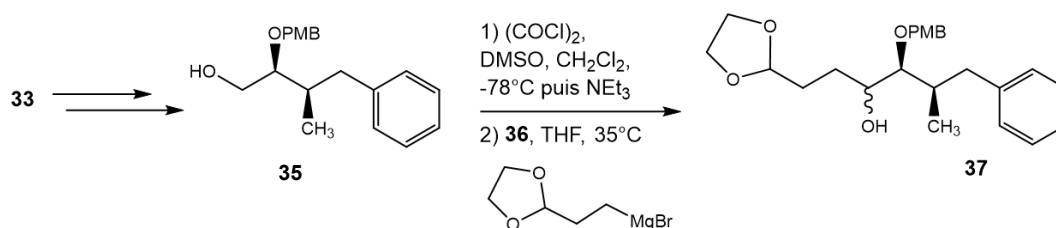


FIGURE 23 – Diagramme des orbitales moléculaires de valence du cycle de l'oxirane.

Q. 66. En considérant la symétrie et les niveaux d'énergie des O.M. de C_2H_4 , justifier que seules deux O.M. soient à prendre en compte dans ce diagramme. Effectuer le remplissage électronique du diagramme d'O.M., identifier les orbitales frontalières et les représenter. Préciser pour les orbitales H.O. (plus haute occupée) et B.V. (plus basse vacante) sur quel fragment l'O.M. est la plus développée.

Q. 67. À partir de l'analyse des orbitales, expliquer quel site du cycle présentera une réactivité nucléophile, et lequel présentera une réactivité électrophile. Indiquer alors l'angle d'approche optimal vers le cycle.

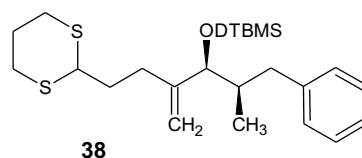
Des étapes supplémentaires permettent de passer de **33** à **35**.



Q. 68. Préciser la structure du produit formé après la première étape de transformation de **35**.

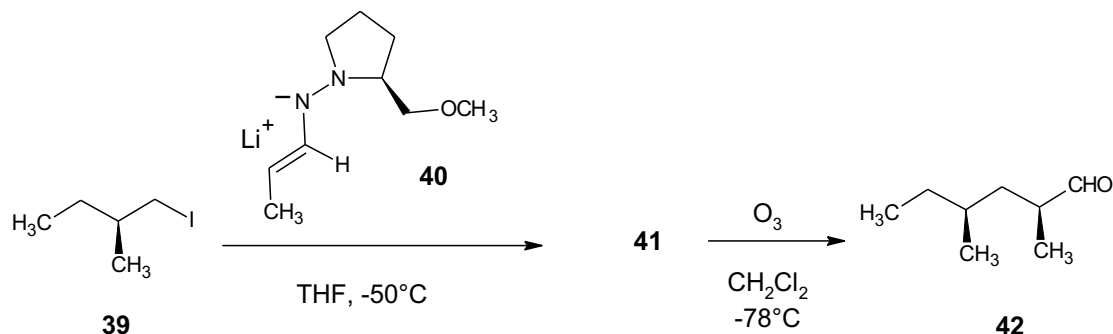
Q. 69. La seconde étape fait réagir le composé organométallique **36**. Préciser le mécanisme réactionnel et les précautions opératoires importantes à suivre. Justifier la représentation de la liaison C-O en zigzag, dans le produit **37** formé.

Les derniers aménagements fonctionnels conduisent à la chaîne latérale aliphatique C_1 **38**.



3.3 Troisième cible : chaîne latérale ester C_6 **43**

Le réactif **39** (voir schéma réactionnel ci-dessous) est disponible commercialement sous forme énantiomériquement pure. Le réactif **40** est obtenu par déprotonation de l'hydrazone SAMP, énantiomériquement pure, en employant le diisopropylamide de lithium.

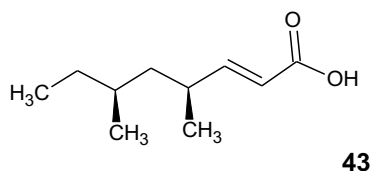


Q. 70. Par analogie avec la réactivité des cétones, indiquer quel type de réaction conduit au produit intermédiaire **41**. Représenter la structure de **41**.

Q. 71. Cette réaction produit **41** avec un excès diastéréoisomérique de 92%. Montrer que la double coordination de l'ion lithium par l'anion hydrazone **40**, permet de former un cycle à 6 membres incluant l'atome d'oxygène. Représenter les conformations possibles du cycle. À partir de la conformation la plus stable, représenter la face favorable pour l'approche de l'iodure **39** sachant que les atomes Li-N-C=C sont dans un même plan, vérifier l'obtention du diastéréoisomère majoritaire. Quelle est la proportion de cet isomère ?

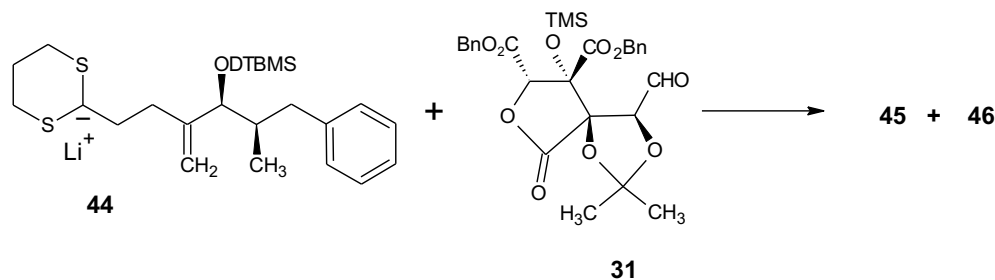
Q. 72. Représenter la structure de Lewis de l'ozone O_3 et expliquer la première étape du mécanisme conduisant à l'aldéhyde **42**. Quelle a été l'utilité de l'hydrazone **40** dans cette séquence de la synthèse ?

L'extension de la chaîne de ce produit est ensuite réalisée, par réaction de Wittig, puis l'hydrolyse de la fonction ester introduite, pour générer la chaîne latérale C_6 **43**.



3.4 Couplages, réarrangement, finalisation de la synthèse

Le traitement de **38** par un équivalent de butyllithium dans le THF, à -25°C , conduit à la formation de l'organolithié **44**. Il réagit ensuite à -78°C sur le produit **31**, afin de générer le mélange de stéréoisomères **45** et **46**, après hydrolyse.



Q. 73. Expliquer quelle réaction s'établit, en justifiant sa chimiosélectivité. Préciser quel centre stéréogène distingue les isomères formés. L'isomère **46** est séparé par chromatographie et utilisé pour la suite de la synthèse. Le représenter, avec la configuration R sur le centre distinctif.

Q. 74. La fonction éther silylé la moins encombrée, R-OTMS, du produit **46** est déprotégée. Proposer un mode opératoire adéquat.

Q. 75. Ensuite, la fonction dithiane (figure 24) est hydrolysée. En raisonnant par analogie avec la réactivité des acétals déduire la fonction alors libérée dans le produit **47**? Représenter la structure de **47**.

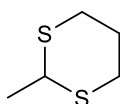
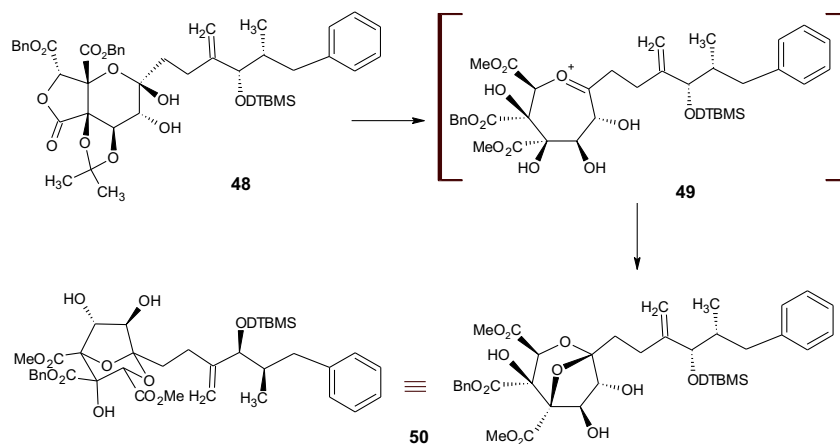


FIGURE 24 – Exemple de dithiane.

Le produit **47** se cyclise spontanément dans le milieu acide, par hémicétalisation intramoléculaire, générant le tricyclic **48** (représenté dans le schéma réactionnel ci-dessous).

Q. 76. Proposer le mécanisme de cyclisation.

Le produit **48** se réarrange en milieu acide, à reflux dans le méthanol durant 21 h, formant le produit **50** qui présente la structure du cœur de l'acide zaragozique. L'étude cinétique et les essais de piégeage mettent en évidence l'apparition de nombreux produits intermédiaires; en particulier l'intermédiaire **49** qui apparaît en fin du processus de réarrangement.

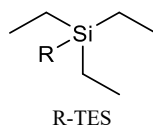


Q. 77. Proposer un mécanisme pour la cyclisation de l'intermédiaire **49** vers le produit **50**. Justifier la régiosélectivité de cette réaction.

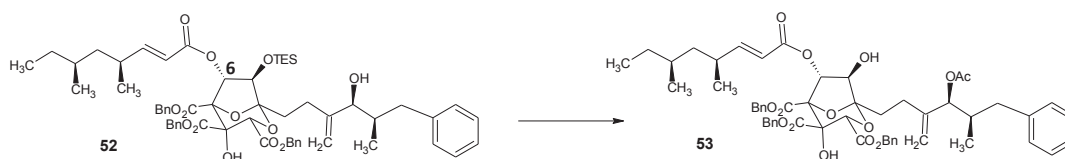
L'étape suivante consiste en une déprotection/reprotection du produit **50**, avec conversion de toutes les fonctions esters en esters benzyliques RCO_2Bn dans le produit **51**.

Q. 78. Expliquer pourquoi des fonctions esters méthyliques sont apparues dans le produit **50**. Pour quelle raison est-il nécessaire de modifier la nature des esters ?

Les deux étapes suivantes procèdent à des ajustements de groupes protecteurs ainsi qu'au couplage de la chaîne latérale **43** estérifiant l'alcool en C_6 , générant le produit **52**. Le groupement TES correspond à l'éther de triéthylsilyle.



Q. 79. Proposer une méthode efficace et adaptée pour cette estérification.



Q. 80. L'étape suivante comprend deux réactions, proposer les conditions opératoires pour les réaliser et expliquer dans quel ordre les effectuer, afin d'obtenir le produit **53**.

Q. 81. L'étape finale conduit à l'acide zaragozique **1**. Proposer les conditions opératoires pour la réaliser, de manière analogue au traitement des éthers benzyliques.

