

Le sujet comprend 21 pages numérotées de 1 à 21.

* * *

Début du sujet

Les parties 1 et 2 sont totalement indépendantes. Si au cours de l'épreuve un-e candidat-e repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il-elle le signale dans sa copie et poursuit sa composition en indiquant les raisons des initiatives qu'il-elle est amené-e 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 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 : Le cofacteur flavine dans tous ses états

Cette partie représente environ 65% du total des points.

Les flavines sont des cofacteurs très communs en biologie. On les retrouve dans de très nombreux processus (respiration, nombreuses réactions catalytiques), dans lesquels elles sont impliquées dans des réactions de transfert d'électron et de proton. Les flavines peuvent en effet échanger 2 électrons et 2 protons. La flavine possède trois degrés d'oxydation : la forme quinone, la plus oxydée ; la forme semi-réduite dite semiquinone ; et la forme totalement réduite hydroquinone.

La formule semi-développée générique des flavines dans la forme quinone totalement déprotonée est reproduite sur la Figure 1. Cette forme sera notée par la suite Φ . Les flavines possèdent toutes le même noyau isoalloxazine, constitué de trois cycles à 6, et diffèrent par la nature du groupement R. Certains atomes du cycle isoalloxazine ont été numérotés selon une numérotation standard qui sera utilisée dans la suite du problème.

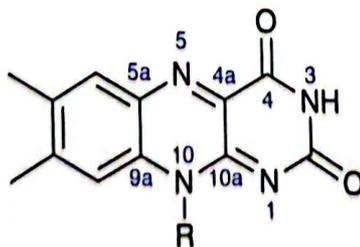


FIGURE 1: Formule semi-développée générique des flavines dans la forme quinone totalement déprotonée. Le noyau isoalloxazine, commun à toutes les flavines, est lié à un groupement R qui distingue les différentes flavines.

1.1 Réactivité rédox de la flavine mononucléotide

Dans cette partie on va s'intéresser aux différentes formes rédox et acido-basiques de la flavine mononucléotide (FMN). On utilisera la notation générique Φ pour décrire la forme la plus oxydée et totalement déprotonée, telle que représentée sur la Figure 1. La forme hydroquinone doublement protonée est une forme neutre qui sera donc notée ΦH_2 . Différentes données thermodynamiques relatives aux couples rédox et acidobasiques de la FMN sont données en annexe. Dans cette partie, on travaille en phase aqueuse à 298 K et on précise que toutes les espèces sont solubles.

- Q. 1.** Quels sont les deux sites de protonation envisageables sur le groupement isoalloxazine ? Justifier.
- Q. 2.** Ces deux sites ne sont pas équivalents. En raisonnant sur la proximité avec les groupes CO, quel est celui qui est protoné le plus facilement ? Justifier.
- Q. 3.** Quelles sont les 9 formes rédox et acido-basiques qu'on peut potentiellement imaginer entre les formes Φ et ΦH_2 ? Les classer par état d'oxydation croissant. On ne demande pas d'écrire les formes semi-développées de ces espèces.
- Q. 4.** En utilisant les données fournies en annexe, indiquer les espèces à considérer pour tracer le diagramme potentiel-pH pour un pH compris entre 0 et 11 (au-delà de pH = 11, l'atome N₃ peut se déprotoner).
- Q. 5.** Écrire les demi-équations électroniques des différents couples rédox possibles en considérant ces espèces, en indiquant le domaine de pH dans lequel elles sont à considérer.
- Q. 6.** Exprimer le potentiel rédox standard des couples $\Phi/\Phi\text{H}$, $\Phi/\Phi\text{H}_2^+$, $\Phi\text{H}/\Phi\text{H}_2$ et $\Phi\text{H}_2^+/\Phi\text{H}_2$ en fonction des constantes thermodynamiques (potentiels rédox standards et $\text{p}K_{\text{a}}$) fournies. On donne les résultats numériques suivants : $0,06 \times 8,6 = 0,516$; $0,06 \times 6,6 = 0,396$; $0,06 \times 2,3 = 0,138$. Faire les applications numériques.
- Q. 7.** Exprimer les équations des frontières du diagramme potentiel-pH pour les couples $\Phi\text{H}_2^+/\Phi\text{H}_2$ et $\Phi/\Phi\text{H}_2^+$ en fonction des données du problème. On considère qu'à la frontière la concentration des 2 espèces rédox en solution est égale.

On donne dans la Figure 2 (page suivante) les diagrammes potentiel-pH obtenus pour la FMN. Dans les Figures 2a et 2b sont représentées les frontières pour les couples des formes quinone/semiquinone et semiquinone/hydroquinone. La Figure 2c correspond à la superposition de ces 2 diagrammes potentiel-pH. On considère qu'à la frontière entre 2 espèces rédox en solution leur concentration est égale.

- Q. 8.** Attribuer, en justifiant, les figures (a) et (b) aux couples quinone/semiquinone et semiquinone/hydroquinone. Attribuer ensuite les différents domaines de prédominance aux espèces déterminées à la question 4 pour chacune des figures.
- Q. 9.** En déduire qu'en solution la forme semiquinone de FMN n'est stable thermodynamiquement qu'à pH acide. Exprimer le pH limite en-dessous duquel la forme semiquinone de FMN peut être majoritaire. Déterminer (en indiquant votre raisonnement) graphiquement sa valeur (à 0,1 près en unité de pH). Vérifier cette valeur en faisant l'application numérique. On donne pour cela le résultat numérique suivants : $0,161 / 0,12 = 1,34$.

- Q. 10.** Écrire l'équilibre de dismutation de la forme semiquinone de la FMN à pH = 6, en considérant les espèces acido-basiques les plus stables à ce pH. On note K_{dis} la constante de cet équilibre. Exprimer $\log(K_{\text{dis}})$ en fonction des données du problème.
- Q. 11.** Quel est ainsi le couple rédox à plutôt considérer pour la FMN en solution aqueuse à pH = 6 ? Écrire la demi-équation rédox correspondante. On donne les résultats numériques

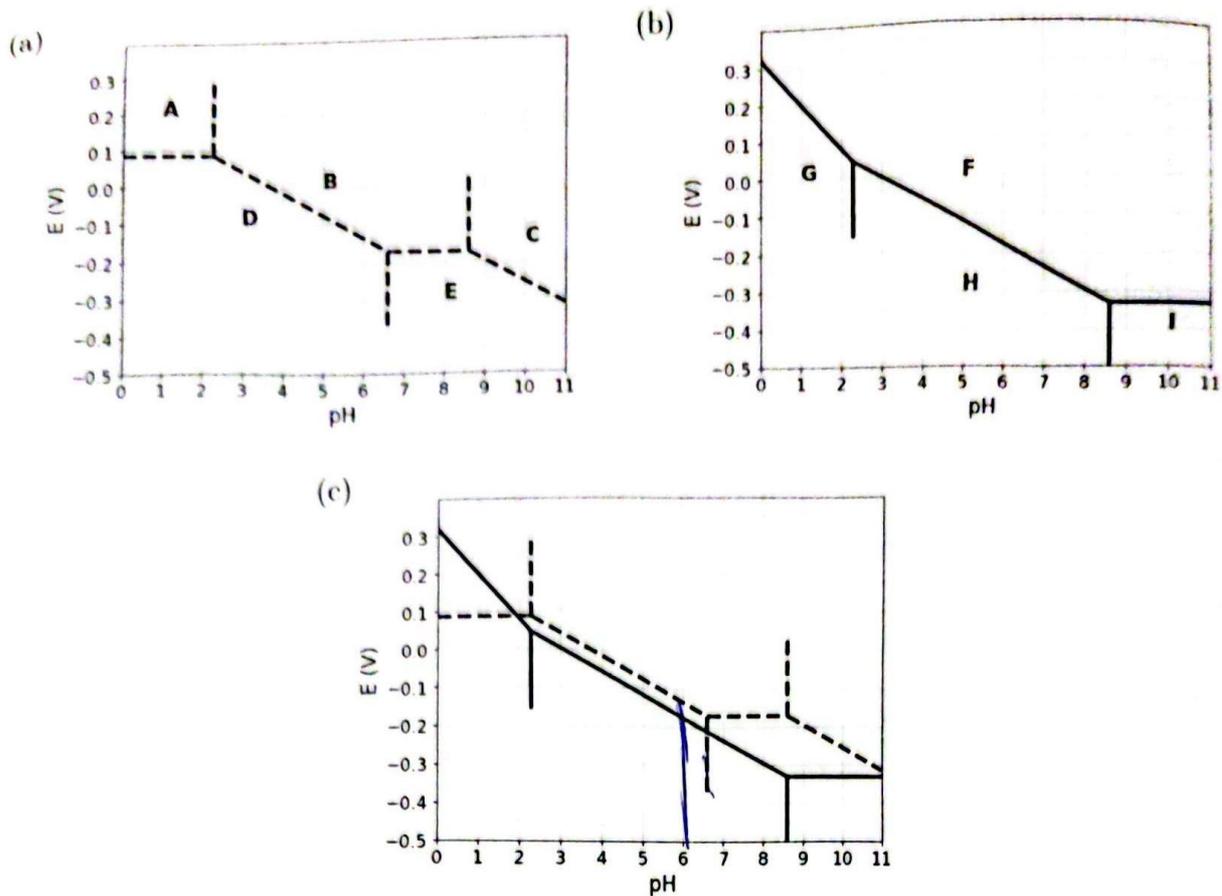


FIGURE 2: Diagrammes potentiel-pH de la FMN.

suivants : $0,06 \times 8,6 = 0,516$; $0,06 \times 6,6 = 0,396$. Que vaut le potentiel rédox standard de ce couple ?

1.2 Dosage des flavines dans les flavoprotéines

En solution, les flavines sont des composés colorés dans leurs formes quinone (jaunes) et semiquinone (rouges dans leur forme anionique, ou bleues à l'état neutre). Par ailleurs, elles présentent dans ces 2 mêmes états rédox des propriétés de fluorescence.

Les flavoprotéines sont des protéines qui se lient à des flavines de façon non covalente. En notant P la protéine et Φ la flavine, la réaction de complexation peut s'écrire de façon générale, de constante d'équilibre K_f :



Lorsque les flavines se lient à une flavoprotéine, leurs spectres d'absorption et de fluorescence sont modifiés (intensité et/ou longueurs d'ondes d'absorption ou de fluorescence). Nous allons voir dans cette section comment il est possible de tirer parti de ces propriétés pour déterminer la stœchiométrie du complexe flavine/protéine $P\Phi_n$ et sa constante de formation K_f .

Dosage utilisant la fluorescence

On donne ci-dessous le protocole de dosage de la riboflavine en interaction avec une flavoprotéine du blanc d'œuf, adapté de Nishikimi et Kyogoku, *Journal of Biochemistry*, 1973, 73, 1233-1242 :

On dispose d'une solution contenant la flavoprotéine du blanc d'œuf à une concentration de 520 nmol.L^{-1} . On ajoute à cette solution une quantité croissante de riboflavine. On mesure à chaque ajout la fluorescence de la solution à 520 nm (longueur d'onde d'excitation : 370 nm).
 On réalise la même expérience en parallèle mais en ajoutant cette fois la riboflavine à une solution tampon non fluorescente de phosphate de sodium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.
 Dans les 2 cas, on peut négliger la dilution due à l'ajout de riboflavine.

La Figure 3 présente les courbes d'intensité de fluorescence (normalisée) obtenue pour les 2 expériences. La courbe I est la mesure de l'intensité de fluorescence (normalisée) pour la solution de protéine et la courbe II la mesure pour la solution tampon. La quantité de riboflavine en abscisse a été convertie en concentration.

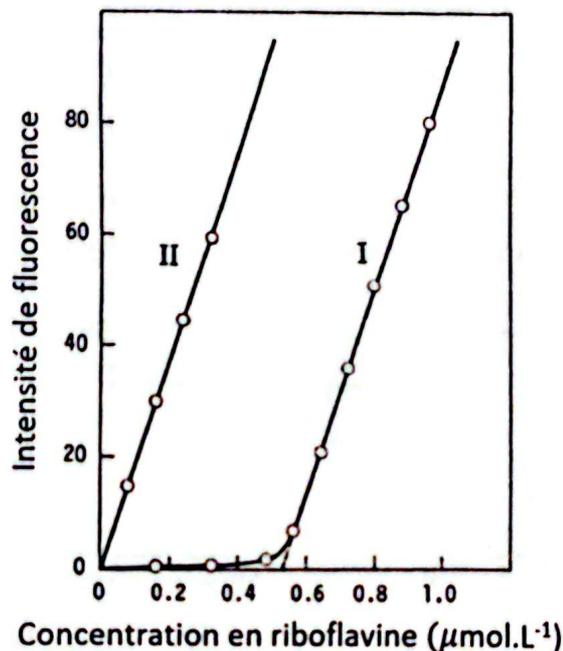


FIGURE 3: Intensité de fluorescence lors de l'ajout de riboflavine à une solution de flavoprotéine du blanc d'œuf (courbe I) ou à une solution tampon de phosphate de sodium (courbe II).

- Q. 12. En vous aidant des résultats expérimentaux présentés sur la Figure 3, donner la relation mathématique qui lie l'intensité de fluorescence et la concentration en espèce fluorescente.
- Q. 13. Au vu des résultats expérimentaux, indiquer quelles espèces sont fluorescentes parmi la protéine P, le complexe $P\Phi_n$ et la riboflavine Φ ?
- Q. 14. Définir la constante d'équilibre K_f de la réaction de formation du complexe $P\Phi_n$. On notera C^0 la concentration standard de référence, prise égale à 1 mol.L^{-1} .
- Q. 15. En faisant l'hypothèse que $K_f \gg 1$, expliquer l'allure de la courbe I.
- Q. 16. Montrer que $n = 1$, en précisant votre raisonnement.

On va maintenant montrer comment à partir des courbes I et II on peut obtenir la valeur de K_f . Dans la suite on note $[\Phi]_0$ la concentration correspondant à la quantité de flavine ajoutée. $[P]$, $[\Phi]$ et $[P\Phi]$ sont les concentrations à l'équilibre de la protéine, de la flavine libre et du complexe flavine/protéine. Pour un ajout de flavine $[\Phi]_0$, on note I l'intensité de fluorescence de la solution de protéine et I_0 l'intensité de fluorescence de la solution tampon.

Q. 17. En notant α le rapport entre la concentration de complexe à l'équilibre $[P\Phi]$ et de protéine initiale $[P]_0$, montrer qu'on peut écrire :

$$\frac{\alpha C^0}{[\Phi]} = K_f(1 - \alpha)$$

Q. 18. Exprimer $[\Phi]$ en fonction des intensités de fluorescence I et I_0 , ainsi que de $[\Phi]_0$.

Q. 19. En utilisant la loi de conservation de la matière de la flavine, exprimer α en fonction de I , I_0 , $[P]_0$ et $[\Phi]_0$.

Q. 20. Expliquer alors comment on peut obtenir K_f à partir de l'expérience réalisée.

On donne dans la Figure 4 ci-dessous le résultat obtenu pour trois types de flavines : la riboflavine (I, ronds vides), la 3-méthylriboflavine (II, ronds pleins) et la lumiflavine (III, carrés vides). L'axe des ordonnées de gauche correspond aux données pour la riboflavine et la 3-méthylriboflavine. L'axe des ordonnées de droite correspond aux données pour la lumiflavine.

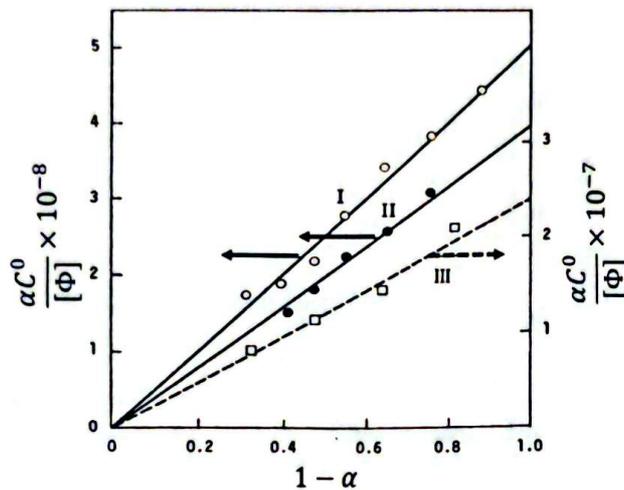


FIGURE 4: Représentation de $\alpha C^0 / [\Phi]$ en fonction de $(1 - \alpha)$ pour 3 types de flavines. (I) ronds vides : riboflavine; (II) ronds pleins : 3-méthylriboflavine; (III) carrés vides : lumiflavine. La lecture des valeurs de $\alpha C^0 / [\Phi]$ pour les courbes (I) et (II) se fait sur l'axe de gauche, tandis que celles pour la courbe (III) se fait sur l'axe de droite.

Q. 21. Estimer à l'aide de ces courbes les valeurs des constantes de complexation pour les 3 types de flavines. Laquelle se lie le plus à la flavoprotéine de blanc d'œuf? Est-ce que l'hypothèse faite à la question 15 est vérifiée?

Dosage utilisant la spectrophotométrie

Une autre méthode pour déterminer la constante d'équilibre est la méthode de Benesi-Hildebrand, qui a été développée initialement sur la base de données de spectrophotométrie UV-visible (une variante de cette méthode est également envisageable sur des données de fluorescence). Dans cette méthode, on fait l'hypothèse d'une stœchiométrie 1:1 pour le complexe entre la protéine et la flavine (on a donc le complexe $P\Phi$) dont l'équilibre de formation s'écrit alors :



On suppose par ailleurs qu'à une longueur d'onde bien choisie les espèces Φ et $P\Phi$ absorbent, avec des coefficients d'absorption ϵ_Φ et $\epsilon_{P\Phi}$, mais que la protéine P n'absorbe pas.

Enfin, on considère des mesures d'absorbance pour des solutions contenant :

- un mélange de protéine et de flavine de concentrations totales en protéine et flavine égales respectivement à $[P]_0$ et $[\Phi]_0$, dans des conditions de large excès de protéine.
- uniquement de la flavine en concentration $[\Phi]_0$.

On notera A et A_0 , respectivement, les absorbances de ces deux solutions, mesurées dans une cuve de chemin optique l .

Q. 22. Dans les conditions expérimentales indiquées ici, exprimer $[P\Phi]$ en fonction de $[\Phi]_0$, $[P]_0$, C^0 et K_f .

Q. 23. Exprimer alors A en fonction de $[\Phi]_0$, $[P]_0$, C^0 , K_f , l , ϵ_Φ et $\epsilon_{P\Phi}$.

Q. 24. En déduire l'expression suivante :

$$\Delta A = A - A_0 = \Delta A_\infty \times \frac{K_f[P]_0}{C^0 + K_f[P]_0}$$

On donnera l'expression de ΔA_∞ et on en proposera une interprétation physique.

Q. 25. Proposer un protocole permettant de déterminer la valeur de K_f (mesures expérimentales à effectuer et traitement des mesures collectées).

1.3 Structure électronique des flavines et réactivité

On donne ci-dessous la représentation schématique de 4 orbitales moléculaires de la lumiflavine ($R = \text{CH}_3$), prise comme modèle de flavine, et calculées par un logiciel de chimie quantique dans la forme hydroquinone totalement réduite ΦH^- , en supposant une géométrie plane de la molécule. Il s'agit des 2 OM les plus hautes occupées et des 2 plus basses vacantes, données dans la Figure 5.

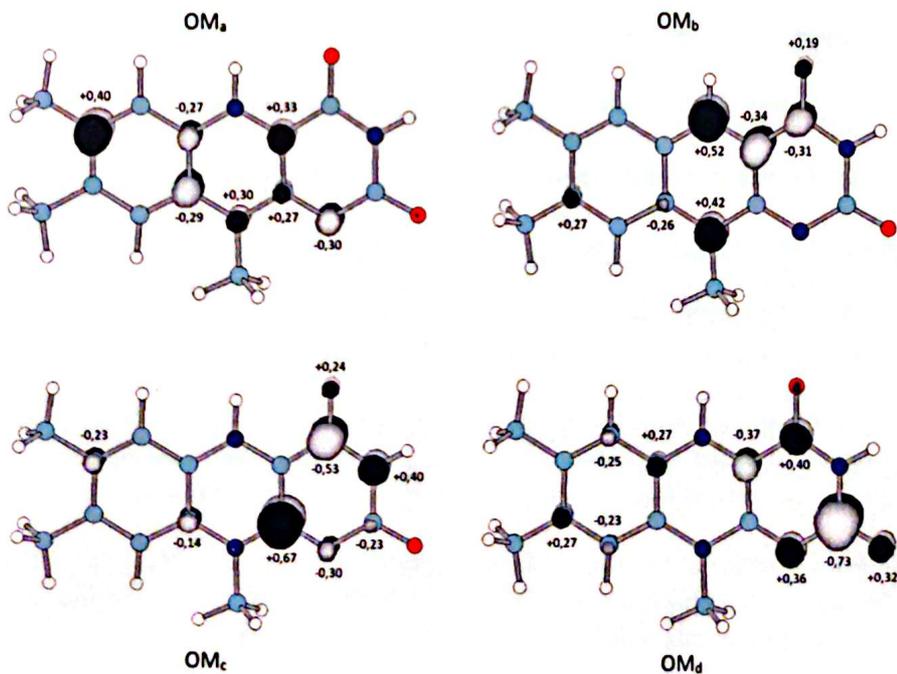


FIGURE 5: Représentation des 2 OM les plus hautes occupées et des 2 OM les plus basses vacantes de la lumiflavine dans sa forme ΦH^- . Les coefficients des orbitales atomiques $2p_z$ impliquées significativement dans ces OM sont indiqués.

Q. 26. Identifier le type (σ ou π) de ces orbitales moléculaires.

Q. 27. Justifier l'ordre énergétique suivant de ces orbitales : $E(\text{OM}_a) < E(\text{OM}_b) < E(\text{OM}_c) < E(\text{OM}_d)$. En déduire les orbitales frontières HO et BV.

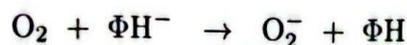
On donne les valeurs suivantes pour les longueurs de liaison $C_{4a}-N_5$ et $C_{4a}-C_4$ (selon la numérotation des atomes donnée dans la Figure 1) dans les formes réduite ΦH^- et semi-réduite ΦH de la lumiflavine, obtenues par un calcul de chimie théorique :

Forme de la lumiflavine	ΦH^-	ΦH
distance $C_{4a}-N_5$	1,43 Å	1,36 Å
distance $C_{4a}-C_4$	1,45 Å	1,49 Å

Q. 28. En utilisant les représentations des OM de ΦH^- fournies, justifier qualitativement l'évolution de ces longueurs de liaison entre les formes ΦH^- et ΦH .

Les mono-oxygénases sont des protéines qui permettent de catalyser l'oxydation de substrats organiques par addition d'un groupement hydroxyle, dont l'atome d'oxygène provient d'une molécule de dioxygène. Parmi ces protéines, certaines (notées par la suite FMO pour *flavin monooxygenase*) possèdent en leur sein un cofacteur flavine qui réagit intermédiairement avec la molécule de dioxygène pour former l'intermédiaire $\Phi H-OOH$. La réaction se déroule en 3 étapes élémentaires :

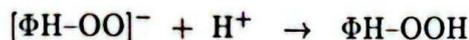
- Étape 1 : réaction d'oxydoréduction entre O_2 et ΦH^-



- Étape 2 : addition de l'anion superoxyde sur ΦH



- Étape 3 : protonation de $[\Phi H-OO]^-$



Le diagramme d'orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène est donné en annexe.

Q. 29. Rappeler les 3 règles de remplissage d'un diagramme d'OM.

Q. 30. Donner la configuration électronique fondamentale de O_2 et de O_2^- . Justifier qu'on symbolise parfois l'anion superoxyde par la notation $O_2^{\bullet -}$.

On s'intéresse à l'étape 2 d'addition de O_2^- sur ΦH , qu'on étudiera dans le cadre du modèle des orbitales frontières. On admettra que dans le cas de réaction entre deux radicaux, l'interaction orbitale à considérer est celle entre les orbitales moléculaires des réactifs à moitié remplis.

Q. 31. Quelle est l'orbitale moléculaire de ΦH impliquée (parmi OM_a , OM_b , OM_c , et OM_d présentées précédemment) ? Sachant que l'addition de O_2^- se fait sur un atome de carbone du cycle central, donner la formule topologique de $\Phi H-OOH$ attendue.

Q. 32. Justifier que la molécule de O_2^- doit approcher en dehors du plan pour que la réaction soit efficace.

Faisons l'hypothèse qu'on puisse stabiliser la flavine sous la forme radicalaire ΦH et la faire réagir avec le radical NO au lieu de l'anion superoxyde O_2^- . On donne dans le tableau ci-dessous les énergies (en eV) des OM de NO et de O_2^- .

OM	O_2^-	NO
$1\sigma^l$	-37,91	-35,78
$2\sigma^{al}$	-25,52	-21,88
$3\sigma^l$	-16,34	-16,10
$1\pi_x^l$ et $1\pi_y^l$	-15,59	-14,60
$2\pi_x^{al}$ et $2\pi_y^{al}$	-12,67	-11,05
$4\sigma^{al}$	8,96	26,71

Q. 33. Justifier qualitativement l'évolution énergétique des OM entre O_2^- et NO.

Q. 34. En supposant une réactivité de ΦH avec NO similaire à celle entre ΦH et O_2^- , qu'obtiendrait-on comme produit d'addition : $\Phi H-NO$ (addition par l'atome d'azote) ou $\Phi H-ON$ (addition par l'atome d'oxygène) ? Détailler toutes les étapes du raisonnement. On ne demande pas de dessiner la formule topologique de la molécule obtenue.

Q. 35. Sachant que l'énergie de l'orbitale réactive de ΦH vaut $-10,69$ eV, pourrait-on prévoir une réaction moins ou plus rapide avec NO qu'avec O_2^- ?

1.4 Mécanisme catalytique d'une FMO

FbSI est une monooxygénase flavine-dépendante qui s'associe de manière non-covalente à une molécule de flavine et qui catalyse l'hydroxylation d'amines primaires telles que la putrescine (1,4-diaminobutane) ou la cadavérine (1,5-diaminopentane) selon la réaction globale présentée sur la Figure 6 ci-dessous dans l'exemple de la putrescine :

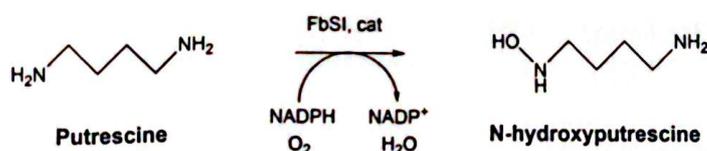


FIGURE 6: Réaction globale d'hydroxylation de la putrescine catalysée par la FbsI.

Le NADPH est un cofacteur rédox (couple NADPH/NADP⁺) qui va dans un premier temps réduire la flavine contenue dans FbSI de sa forme totalement oxydée Φ à sa forme totalement réduite ΦH^- . ΦH^- va ensuite réagir avec O_2 pour donner $[\Phi H-OO]^-$ qui se protone pour donner $\Phi H-OOH$ (voir partie précédente). Le proton impliqué dans la dernière réaction provient d'un acide aminé de la protéine situé à proximité de la flavine, ce qui rend cette réaction de protonation quasi-instantanée. En présence de putrescine, celle-ci est hydroxylée pour donner la N-hydroxyputrescine et une hydroxyflavine $\Phi H-OH$. Le cycle catalytique se termine par la dégradation de $\Phi H-OH$ pour donner une molécule d'eau et redonner la flavine oxydée Φ .

Q. 36. Écrire les équations-bilan de l'ensemble des réactions impliquées dans le cycle catalytique ainsi que le bilan global (l'enzyme FbSI sera représentée dans ces équations uniquement au travers du cofacteur flavine Φ).

Étude de la vitesse globale de la réaction

Dans un premier temps, on s'intéresse à la vitesse globale de la réaction, définie par la vitesse de formation du produit.

On réalise des mesures de la vitesse de la réaction dans une série d'expériences dont les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous :

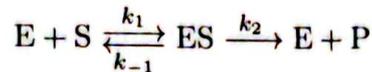
[NADPH] (mol.L ⁻¹)	[diamine] (mol.L ⁻¹)	[FbSI] (mol.L ⁻¹)
$0,5 \cdot 10^{-3}$	10^{-5} à $500 \cdot 10^{-6}$	10^{-6}

On précise par ailleurs que la solubilité du dioxygène dans l'eau vaut environ 8 mg.L^{-1} dans les conditions expérimentales utilisées et que la solution est saturée en dioxygène.

Q. 37. Quelle est la concentration molaire du dioxygène en solution dans les conditions expérimentales ?

Q. 38. Justifier qu'on puisse considérer la réaction dans le cadre d'un mécanisme catalytique de type Michaelis-Menten impliquant l'enzyme FbSI, notée par la suite E, avec pour seul substrat la diamine notée S.

Le mécanisme catalytique de type Michaelis-Menten est le suivant :



La loi de vitesse de Michaelis-Menten donne la vitesse initiale de formation du produit P en fonction de deux paramètres v_{\max} et K_M et de la concentration initiale en substrat $[S]_0$:

$$v_0 = \frac{v_{\max}[S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Elle est obtenue à l'aide des hypothèses suivantes :

- Le substrat est en excès par rapport à l'enzyme.
- On peut appliquer l'approximation de l'état quasi-stationnaire (AEQS) au complexe enzyme-substrat ES.

Q. 39. En appliquant l'AEQS à ES et en utilisant la conservation de matière de l'enzyme, exprimer [ES] en fonction de $[E]_0$, [S] et des constantes de vitesse des actes élémentaires (k_{-1} , k_1 et k_2).

Q. 40. Retrouver la formule de Michaelis-Menten en donnant l'expression de v_{\max} et de K_M en fonction des constantes de vitesse des actes élémentaires (k_{-1} , k_1 et k_2) et de $[E]_0$.

Lorsque le substrat est en large excès, il peut arriver que deux molécules de substrat se lient à la protéine, formant une espèce ESS, inhibant alors l'activité catalytique de l'enzyme (on parle d'inhibition par le substrat). On note K_i la constante de dissociation du complexe ESS formé à partir de ES et S et on suppose que cet équilibre est établi instantanément.

Q. 41. Écrire l'équilibre de dissociation de ESS et définir K_i . Par souci de simplification, on ne fera pas apparaître la concentration standard C^0 dans l'expression de K_i .

Q. 42. Déterminer la vitesse initiale de formation du produit dans ce cas d'inhibition par le substrat en fonction de v_{\max} , K_M , $[S]_0$ et K_i .

On donne dans la Figure 7 le résultat de la série d'expériences en utilisant comme substrat soit la putrescine, soit la cadavérine.

Q. 43. En utilisant un raisonnement qualitatif de comportement aux limites des expressions de v_0 dans le cas d'un mécanisme avec ou sans inhibition par le substrat, indiquer pour lequel des deux substrats on a une inhibition par le substrat.

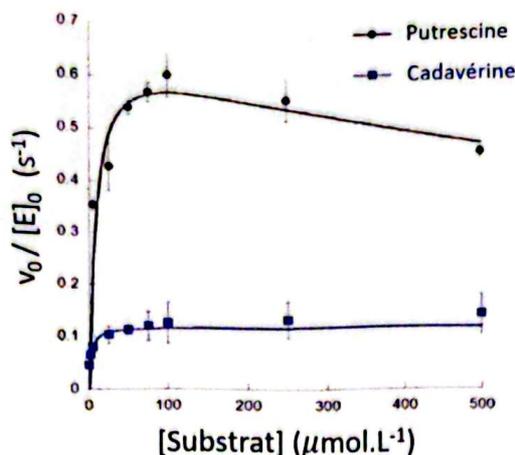


FIGURE 7: Vitesse initiale de formation de la réaction d'hydroxylation du substrat par FbSI en fonction de la concentration en substrat pour la putrescine (points noirs) et pour la cadavérine (carrés bleus).

Étude des étapes de réoxydation de la flavine dans une FMO

On s'intéresse maintenant spécifiquement aux étapes de réoxydation de la flavine ΦH^- par le dioxygène. Pour cela, on peut réaliser des expériences en l'absence de substrat. Dans ce cas, le produit d'addition de O_2 sur Φ ($\Phi\text{H}-\text{OOH}$) se dégrade pour donner du peroxyde d'hydrogène et redonner la flavine oxydée Φ .

On souhaite plus précisément suivre les 2 étapes suivantes :

- Étape A. Formation de $\Phi\text{H}-\text{OOH}$: $\text{O}_2 + \Phi\text{H}^- + \text{H}^+ \rightarrow \Phi\text{H}-\text{OOH}$
- Étape B. Dégradation de $\Phi\text{H}-\text{OOH}$: $\Phi\text{H}-\text{OOH} \rightarrow \Phi + \text{H}_2\text{O}_2$

On réalise pour cela des mesures de cinétique dites « *stopped-flow* » qui permettent de suivre des cinétiques de réaction rapides. L'instant $t = 0$ correspond au mélange très rapide d'une quantité égale de solution de FMO avec la flavine préalablement réduite ΦH^- de concentration $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et d'une solution contenant une concentration en dioxygène comprise entre $130 \cdot 10^{-6}$ et $1030 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. La méthode de détection suivie est l'absorption UV-visible. On donne dans la Figure 8a les spectres d'absorption typiques de ΦH^- (ligne pointillée), $\Phi\text{H}-\text{OOH}$ (cercles noirs) et Φ (ligne continue) dans une flavoprotéine et dans la Figure 8b le suivi de l'absorbance à 370 et 450 nm.

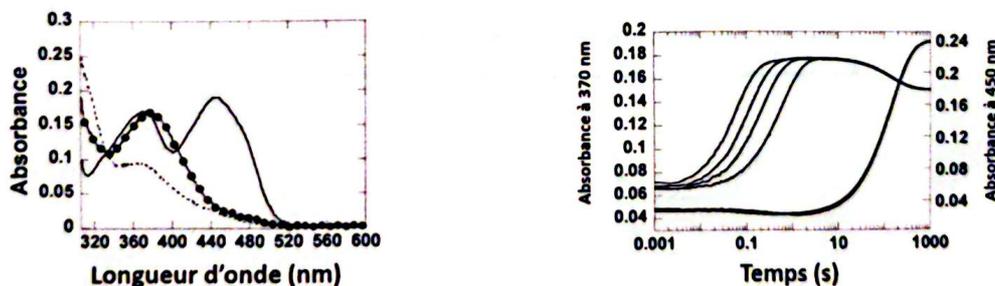


FIGURE 8: (a) Spectres d'absorption des espèces ΦH^- (ligne pointillée), $\Phi\text{H}-\text{OOH}$ (cercles noirs) et Φ (ligne continue) dans une flavoprotéine. (b) Évolution de l'absorbance pour 4 concentrations en dioxygène différentes. Les courbes avec une absorbance initiale aux alentours de 0,07 (axe des ordonnées de gauche) correspondent à l'absorbance à 370 nm et les courbes démarrant autour de 0,05 (axe des ordonnées de gauche) correspondent à l'absorbance à 450 nm.

Q. 44. Justifier le choix des longueurs d'onde utilisées pour suivre la réaction.

Q. 45. Commenter l'évolution de l'absorption à 370 nm et à 450 nm en fonction du temps, en vous servant des spectres présentés sur la Figure 8a.

Au vu des données expérimentales, on peut considérer que les étapes A et B sont bien dissociées dans le temps : toute la flavine ΦH^- est consommée pour donner $\Phi\text{H}-\text{OOH}$ avant que celui-ci ne se dégrade. On s'intéresse ici uniquement à l'étape A de formation de $\Phi\text{H}-\text{OOH}$ à partir de ΦH^- . Celle-ci se décompose en réalité en 3 actes élémentaires (voir partie précédente). En considérant que l'étape de protonation finale est quasi-instantanée, la loi cinétique régissant la disparition de ΦH^- peut-être modélisée par une loi cinétique de pseudo-ordre 1 par rapport à la concentration en flavine réduite $[\Phi\text{H}^-]$, de constante de vitesse k_{obs} .

Q. 46. Dans cette hypothèse, quelle est la loi attendue suivie par l'absorbance A de la solution à 370 nm, en supposant que seules les espèces ΦH^- et $\Phi\text{H}-\text{OOH}$ absorbent à cette longueur d'onde. On notera A_0 l'absorbance initiale et A_∞ l'absorbance finale (à la fin de l'étape A et avant le début de l'étape B).

On souhaite modéliser les données expérimentales par l'équation :

$$A = D + E \times (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$$

où D , E , et k_{obs} sont des paramètres inconnus à optimiser pour reproduire au mieux les données expérimentales. L'optimisation de ces paramètres se fait à l'aide d'un code python en utilisant la fonction `curve_fit` de la librairie `scipy.optimize`. On donne dans la Figure 9a ci-dessous le code utilisé avec une partie à compléter, de façon à obtenir la Figure 9b.

```
(a)
1 # Chargement des librairies utiles
2 import numpy as np
3 import matplotlib.pyplot as plt
4 from scipy import optimize
5
6 # Données expérimentales
7 texp = np.array((0.01,0.1,1.,10.,50.,100.,1000.))
8 aexp = np.array((0.05,0.051,0.06,0.09,0.125,0.135,0.14))
9
10 # Définition de la fonction à modéliser
11 def funtofit(t, D, E, k):
12     f = D + E * (1-np.exp(-k*t))
13     return f
14
15 # Optimisation des paramètres de la fonction
16 popt, cov = optimize.curve_fit(funtofit, texp, aexp)
17 # Récupération des paramètres optimisés
18 D_opt, E_opt, k_opt = popt
19 print("Valeur estimée de k : " + str(k_opt))
20
21 # Tracer des données expérimentales (par des points)
22 # Tracer la courbe modèle avec les paramètres optimisés (par une ligne)
```

Partie à compléter

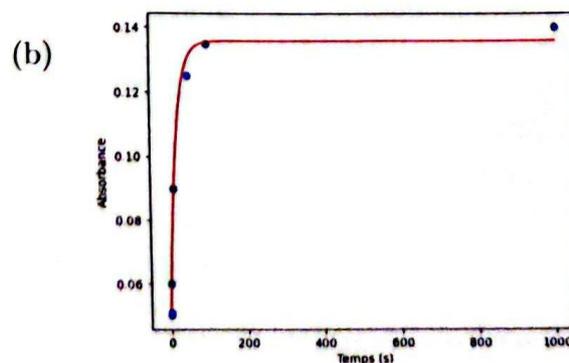


FIGURE 9: Script python (a) permettant de modéliser les résultats expérimentaux par l'équation $A = D + E \times (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$ pour tracer la figure (b).

Q. 47. Compléter le code ci-dessus en écrivant une série d'instructions permettant de tracer les données expérimentales avec des symboles ainsi que la courbe modèle avec une ligne continue, pour un temps t variant de 0 à 1000 s, de façon à obtenir la Figure 9b. On donne en annexe un exemple d'utilisation de la librairie matplotlib pour tracer une fonction.

On donne ci-dessous les valeurs obtenues pour k_{obs} pour 4 concentrations différentes en dioxygène :

$[\text{O}_2]$ (mmol.L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)
0,15	2,00
0,30	3,99
0,60	8,02
0,90	11,98

Q. 48. En déduire la valeur approchée de la constante de vitesse bimoléculaire de la réaction de formation de $\Phi\text{H-OOH}$.

Dans certains cas, on peut obtenir des courbes qui présentent un caractère biexponentiel. Ceci peut provenir de la coexistence de 2 conformations différentes de la protéine qui impactent la cinétique de la réoxydation. On cherche alors à modéliser les courbes d'absorbance par l'équation :

$$A = a_0 + a_1 (1 - e^{-k_{\text{obs},1} t}) + a_2 (1 - e^{-k_{\text{obs},2} t})$$

où A est l'absorbance, a_1 et a_2 les amplitudes de variation de l'absorbance dans les deux phases, $k_{\text{obs},1}$ et $k_{\text{obs},2}$ les constantes de vitesse observées de ces deux phases et a_0 la valeur initiale de l'absorbance.

Q. 49. Modifier la fonction `funtofit` du programme précédent pour correspondre à une fonction biexponentielle.

Q. 50. Comment peut-on modifier les lignes 18 et 19 du code de la Figure 9a pour récupérer et afficher les valeurs des deux constantes de vitesse $k_{\text{obs},1}$ et $k_{\text{obs},2}$?

2 Deuxième partie : Synthèse de l'alliacol A

Cette partie représente environ 35% du total des points.

Le (+)-alliacol A (1), un sesquiterpène polycyclique, a été isolé en 1977 à partir du champignon *Marasmius Alliaceus*. Ce composé présente des propriétés cytotoxiques à faible concentration. En raison du faible rendement obtenu par extraction et de sa structure originale, cette molécule a suscité un intérêt particulier en synthèse totale et diverses approches synthétiques ont été développées. Nous nous pencherons sur une voie de synthèse assez originale, impliquant une étape clé de cyclisation électrochimique du composé (2).

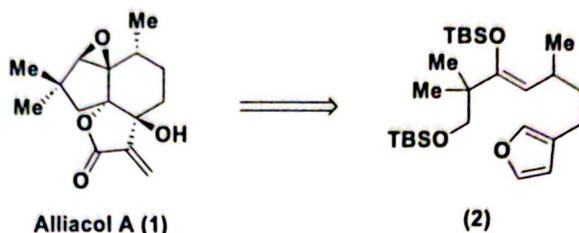


FIGURE 10: Structure du (+)-alliacol A et approche rétrosynthétique.

2.1 La structure de l'Alliacol A

Q. 51. Identifier tous les centres stéréogènes de cette molécule et indiquer le nombre maximal de stéréoisomères possibles.

Q. 52. Donner le descripteur stéréochimique du ou des centre(s) stéréogène(s) quaternaire(s) en nommant la règle utilisée.

2.2 Synthèse du dérivé furanique (2)

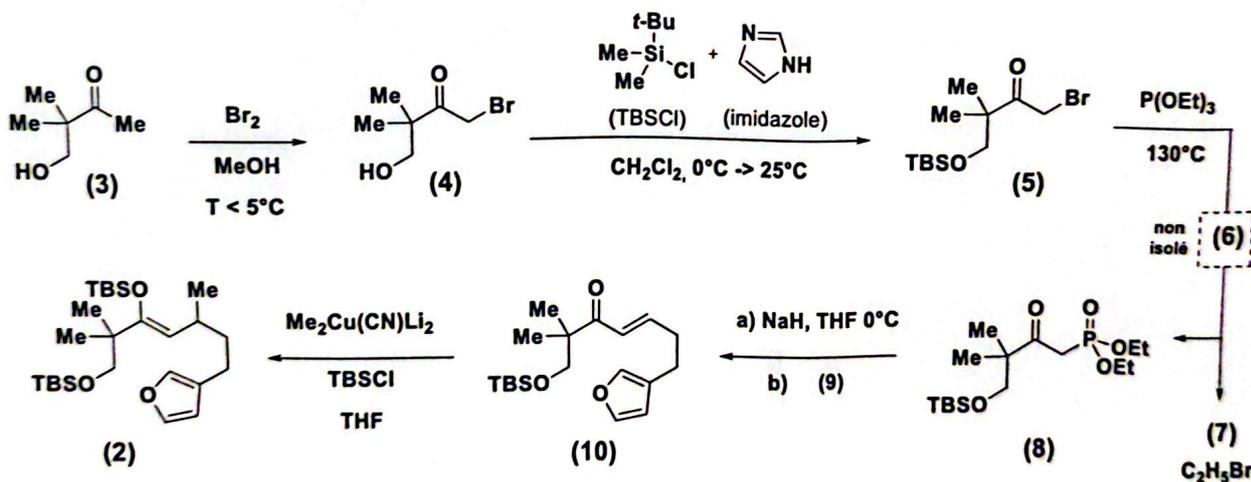


FIGURE 11: Schéma de la synthèse du dérivé furanique (2).

Q. 53. En utilisant la nomenclature IUPAC, donner le nom chimique du composé (3).

Q. 54. Sachant que c'est la forme énol du composé (3) qui réagit avec le dibrome, proposer un mécanisme pour la première étape (3) \rightarrow (4).

Q. 55. Quel autre produit est formé au cours de cette réaction ?

Q. 56. Discuter de l'importance de contrôler la température du milieu réactionnel.

Q. 57. Dans la réaction (4) → (5), l'imidazole permet à la fois d'activer le chlorosilane de départ (TBSCl) et de servir de base pour déprotoner l'alcool. Justifier le site préférentiel de protonation de l'imidazole et proposer un mode d'activation du TBSCl par l'imidazole.

Q. 58. Donner la structure de Lewis de la triéthylphosphite, $P(OEt)_3$, et en déduire le caractère électrophile ou nucléophile de cette espèce.

La réaction (5) → (8) met en jeu un mécanisme comprenant deux étapes élémentaires. À l'issue de la première étape un intermédiaire réactionnel transitoire (6) est généré et, lors de la seconde étape, la formation du β -céto-phosphonate (8) s'accompagne de la génération d'un deuxième produit (7) qui est un composé chimique volatil de formule brute C_2H_5Br .

Q. 59. Proposer une structure du composé (6) sachant qu'il s'agit d'une espèce ionique dans laquelle le degré d'oxydation de l'atome de phosphore est égal à (+V).

Q. 60. Proposer un mécanisme pour la transformation (5) → (8). Pourquoi la volatilité du produit (7) s'avère-t-elle bénéfique à cette réaction ?

Q. 61. Soit la description suivante du spectre RMN 1H du composé (10). Identifier les groupes de protons magnétiquement équivalents sur cette molécule et attribuer chacun des signaux observés.

1H NMR (250 MHz, Chloroform-*d*) : $\delta = 7,35 - 7,27$ (m, 1H) ; $7,25 - 7,17$ (m, 1H) ; $6,74$ (dt, $J = 14,7, 5,3$ Hz, 1H) ; $6,30 - 6,21$ (m, 1H) ; $6,14$ (d, $J = 14,7$ Hz, 1H) ; $3,79$ (s, 2H) ; $2,65$ (t, $J = 7,4$ Hz, 2H) ; $2,56 - 2,40$ (m, 2H) ; $1,18$ (s, 6H) ; $0,90$ (s, 9H) ; $0,12$ (s, 6H)

Q. 62. Comment expliquer la différence entre le déplacement chimique des groupements méthyles à coté du motif cétone et celui des groupements méthyles portés par le silicium ?

Q. 63. L'addition du diméthylcuprate $Me_2Cu(CN)Li$ sur l'énone (10) s'effectue régiosélectivement pour conduire au composé (2). Cette réaction d'addition s'effectue-t-elle sous contrôle orbitalaire ou sous contrôle de charge ? Justifier votre réponse.

2.3 Cyclisation électrochimique

L'étape clé de cette synthèse implique l'électrolyse du composé (2) dans une cellule indivisée avec une anode en carbone vitreux réticulé (RVC) et une cathode en carbone graphite (Cg) dans les conditions réactionnelles décrites ci-dessous :

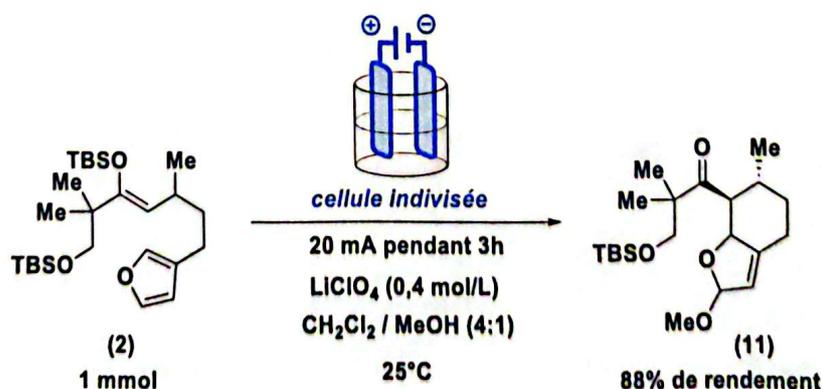


FIGURE 12: Conditions réactionnelles de l'électrolyse du composé (2).

Q. 64. En recopiant le schéma simplifié de la cellule indivisée ci-dessus, identifier l'anode et la cathode et le sens du courant. Quel est le rôle du perchlorate de lithium dans cette réaction ?

Dans cette réaction électrochimique, le composé (2) cède deux de ses électrons à l'une des deux électrodes pour conduire au composé bicyclique (11).

Q. 65. À quelle électrode (RVC ou Cg) s'effectue la réaction désirée ? Donner la demi-équation électronique de cette réaction rédox.

Q. 66. La formation de bulles de gaz est constatée à l'électrode opposée. Quelle réaction redox pourrait se produire à cet endroit ?

Q. 67. Estimer le rendement faradique de cette cyclisation électrochimique en précisant le mode de calcul.

2.4 Fin de la synthèse

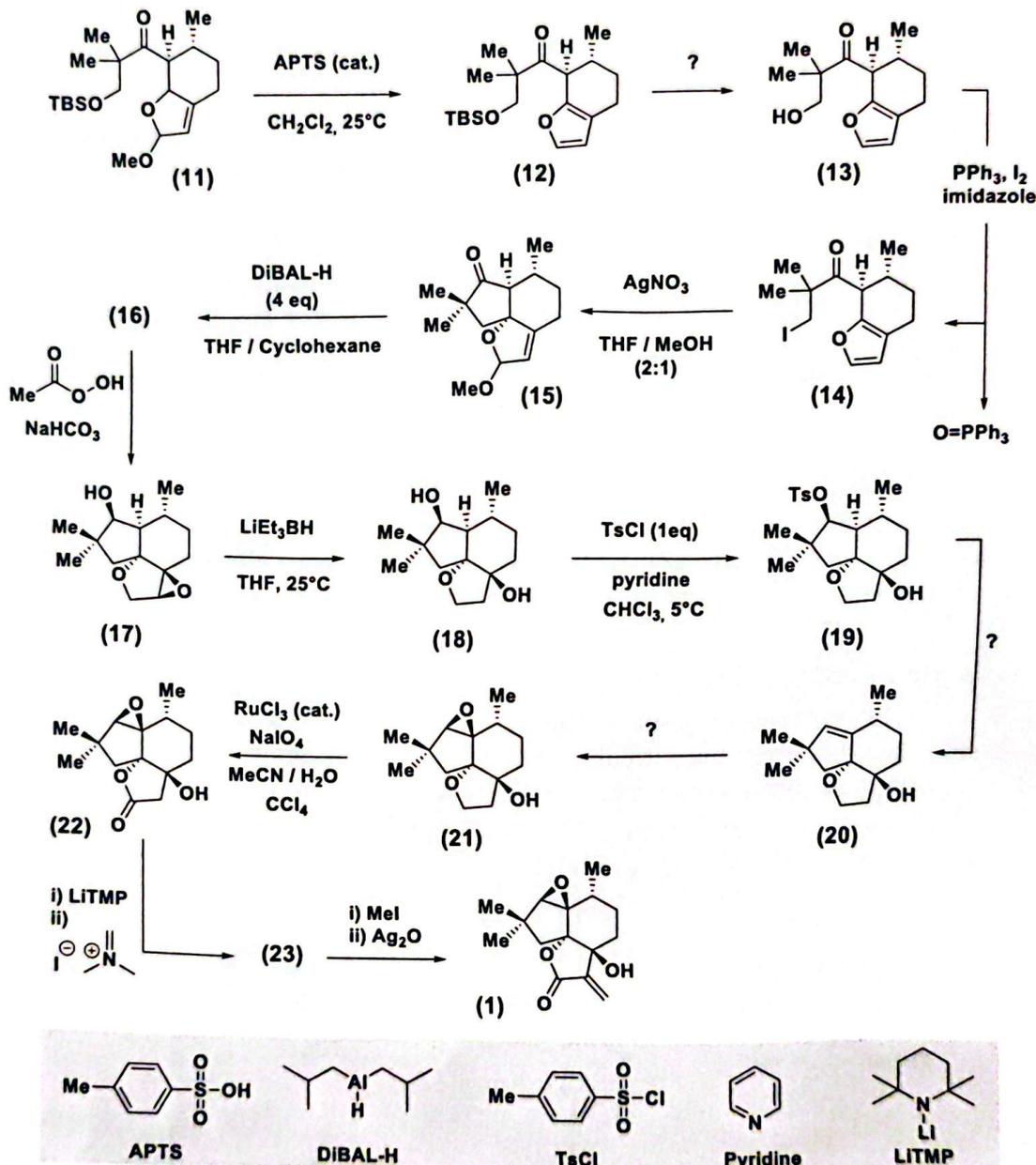


FIGURE 13: Schéma de la fin de la synthèse de (1).

Q. 68. En vous inspirant du mécanisme d'hydrolyse d'un acétal, proposer un mécanisme permettant d'expliquer la formation de (12) à partir de (11).

Q. 69. Proposer des conditions réactionnelles pour promouvoir la transformation (12) → (13).

Q. 70. Lorsque de la triphénylphosphine (PPh₃) est mise en présence d'iode, cela conduit à la formation de [I-PPh₃]⁺ I⁻ (iodure d'iodotriphénylphosphonium). À partir de cet intermédiaire, proposer un mécanisme permettant la transformation de l'alcool (13) en le dérivé iodé (14) sachant que l'imidazole sert de base et que de l'oxyde de triphénylphosphine (O=PPh₃) est également généré au cours de cette réaction.

Q. 71. Lors de la transformation (14) → (15), un précipité blanc photosensible de faible constante de solubilité est formé. Identifier ce précipité et en déduire le rôle du nitrate d'argent dans cette réaction

Q. 72. En raisonnant à partir de la structure du composé (17), proposer une structure pour le composé (16).

Q. 73. Proposer un mécanisme pour la transformation (17) → (18).

Q. 74. En s'inspirant du mécanisme d'estérification entre un alcool et un chlorure d'acyle, proposer un mécanisme pour la réaction (18) → (19).

Q. 75. Expliquer le contrôle total de régiosélectivité dans cette réaction.

Q. 76. Proposer un ou plusieurs réactif(s) pour promouvoir la transformation (19) → (20).

Q. 77. Proposer un ou plusieurs réactif(s) pour promouvoir la transformation (20) → (21).

Soit le cycle catalytique suivant pour la transformation (21) → (22) :

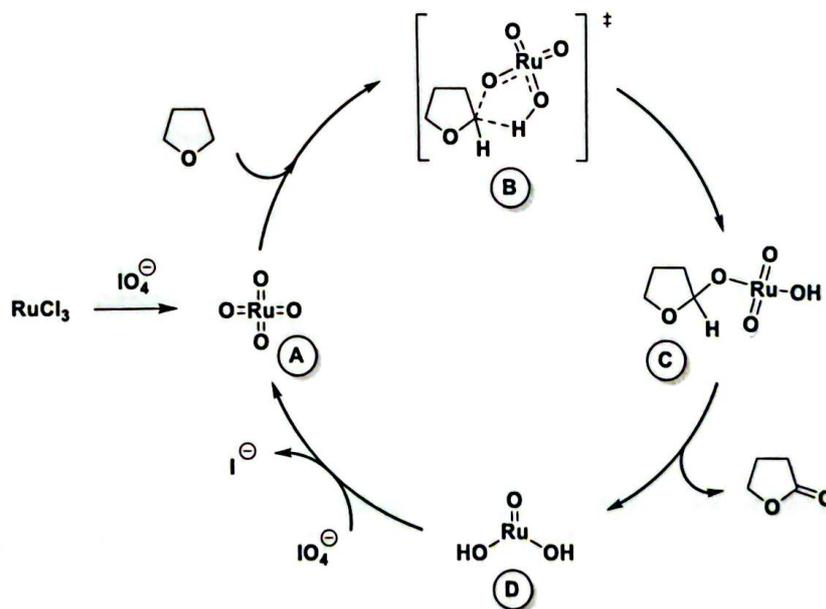


FIGURE 14: Cycle catalytique pour la transformation (21) → (22).

Q. 78. De quel type de réaction s'agit-il? Identifier le pré-catalyseur et le catalyseur.

Q. 79. Donner le degré d'oxydation du métal dans RuCl₃, les espèces « A », « C » et « D ».

Q. 80. À quoi correspond « B » ?

Q. 81. Proposer des flèches de mécanisme pour expliquer le passage de « C » à « D ».

Q. 82. Donner l'équation bilan de la réaction « D » → « A ».

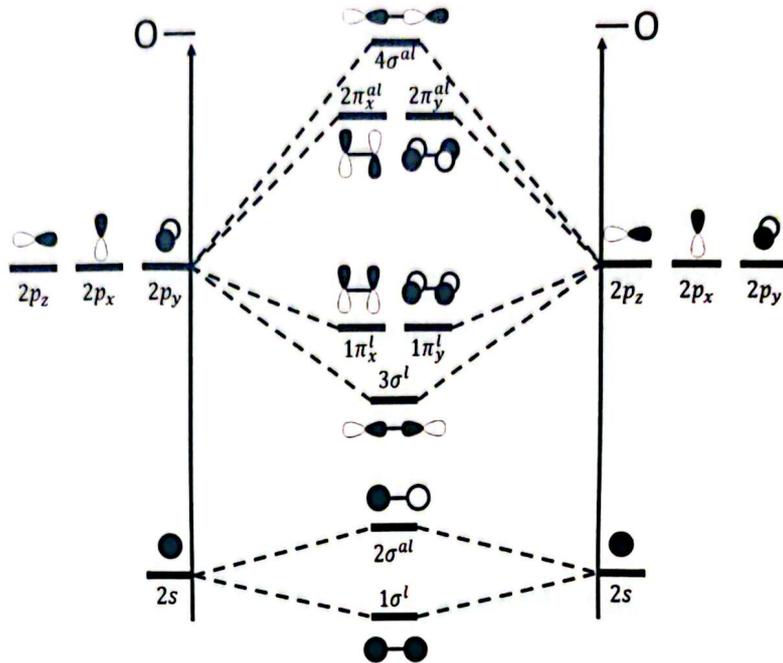
Q. 83. Proposer une structure pour le composé (23) et le mécanisme associé à sa formation.

Q. 84. Pour cette étape, combien d'équivalent de LiTMP est-il nécessaire d'utiliser ?

Q. 85. Pour la transformation (23) \rightarrow (1), quel produit est intermédiairement formé après réaction de (23) avec l'iodure de méthyle. Pourquoi cette étape est-elle essentielle pour obtenir le composé (1) ?

Diagramme d'orbitales moléculaires de O_2 :

Dans le nom des OM, le caractère liant ou antiliant de l'OM est indiqué en exposant (« l » pour liant et « al » pour antiliant)

**Éléments de documentation sur la programmation python :**

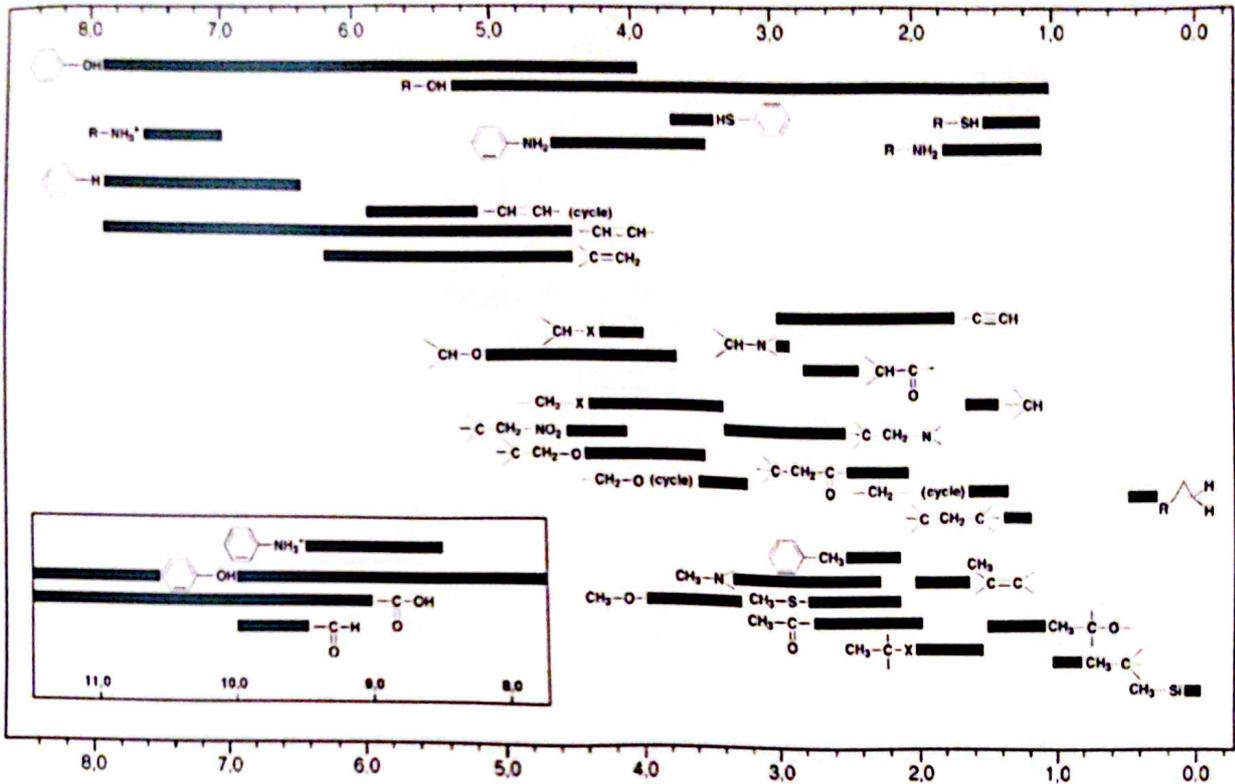
Représentation de la courbe $y(x) = \sin(x)$ avec la librairie matplotlib

```

1 # chargement des librairies utiles
2 import numpy as np
3 import matplotlib.pyplot as plt
4
5 x=np.linspace(0,10*np.pi,200); # création d'un tableau de valeurs pour lesquelles calculer la fonction
6 y=np.sin(x); # calcul de la fonction pour toutes les valeurs de x
7 plt.plot(x,y,linestyle='-'); # trace d'une courbe
8 plt.scatter(x,y,marker='o') # affichage avec des symboles
9 plt.xlabel("x") # titre de l'axe des abscisses
10 plt.ylabel("y") # titre de l'axe des ordonnées

```

Table de valeurs de déplacements chimiques en RMN ¹H :



Échelle de Pauling représentant l'électronégativité de quelques éléments du tableau périodique

ÉLECTRONÉGATIVITÉ

H																
2.2																
Li	Be											B	C	N	O	F
1.0	1.6											2.0	2.5	3.0	3.4	4.0
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl
0.9	1.3											1.6	1.9	2.2	2.6	3.2
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br
0.8	1.0	1.4	1.5	1.6	1.7	1.5	1.8	1.9	1.9	1.9	1.6	1.8	2.0	2.2	2.6	3.0

Basse
Moyenne
Élevée

