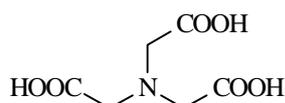


Problème 2 : complexation des ions calcium

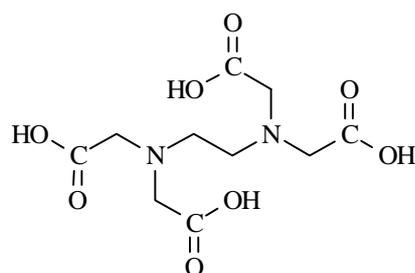
NOTE IMPORTANTE : Les différentes parties de ce problème sont totalement indépendantes. Au sein de chacune d'elles, de nombreuses questions sont indépendantes. Les indications de l'énoncé peuvent être utilisées sans démonstration pour avancer dans la résolution des questions.

L'importance des ions calcium Ca^{2+} est reconnue depuis des années par les biologistes dans le fonctionnement de nombreux systèmes comme la contraction musculaire. Les concentrations cytoplasmiques mises en jeu sont très faibles, de l'ordre de la micromole par litre. Pour réaliser leurs études, les scientifiques doivent disposer de méthodes de dosage des ions calcium dans le milieu cellulaire, ainsi que de systèmes chimiques permettant le maintien de concentrations constantes aussi faibles. La méthode doit être fiable, rapide et ne doit pas trop perturber le fonctionnement des systèmes biologiques. L'une des méthodes repose sur l'utilisation de complexants sélectifs des ions calcium, introduits en quantité telle que la concentration résiduelle en ions calcium soit celle requise et, en outre, facile à mesurer.

Le chimiste dispose de tels complexants : l'acide nitrilotriacétique (NTA) ou l'acide éthylènediaminetétraacétique, plus connu sous l'acronyme EDTA.



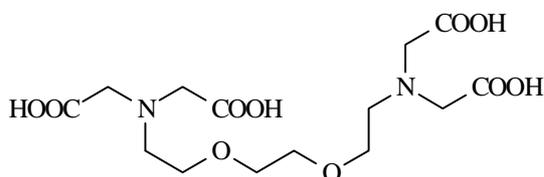
NTA



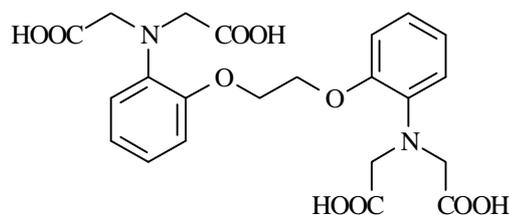
EDTA

Malheureusement, l'EDTA n'est pas sélectif des ions calcium (il complexe tous les cations métalliques, notamment les ions Mg^{2+} , ce qui est très gênant pour les biochimistes) et les propriétés acide-base sont telles qu'il peut difficilement être utilisé dans les milieux cellulaires, dont le pH est voisin de 7. Par ailleurs, les mesures directes ou indirectes des concentrations sont très délicates et ne peuvent être mises en œuvre dans les systèmes biologiques.

Les biochimistes ont donc mis au point des analogues structuraux de l'EDTA comme l'EGTA ou le BAPTA, dont les structures sont représentées ci-après.



EGTA



BAPTA

Ce problème envisage successivement :

l'étude de dosages des ions calcium en solution aqueuse,

la synthèse d'un dérivé du BAPTA,

l'étude spectroscopique du système calcium/BAPTA

l'étude cinétique de la réaction de complexation

la détermination de la valeur d'une constante de complexation.

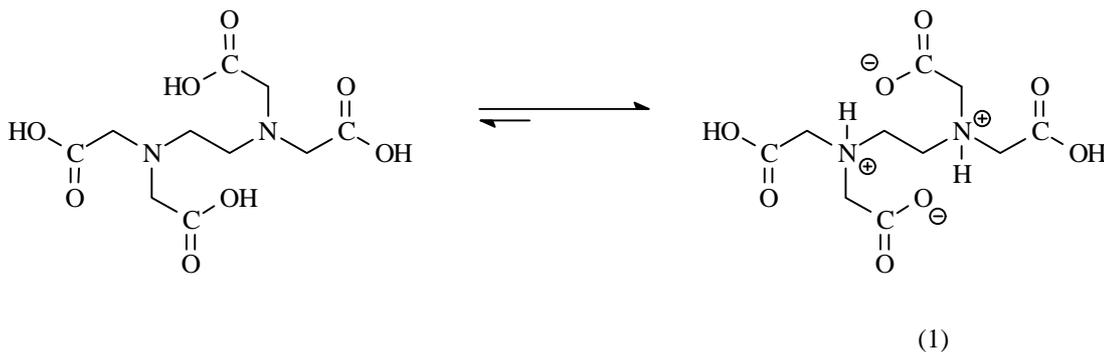
Ce problème utilise notamment les publications de R.Y. Tsien (*Biochemistry*, **1980**, *19*, 2396-2404) et de H. Harafuji et Y. Ogawa (*J. Biochem.* **87**, 1305-1312 (1980)). Les conditions expérimentales des dosages du calcium sont extraites de l'ouvrage « Vogel's Textbook of quantitative inorganic analysis ».

I. Dosages des ions calcium par l'EDTA ou l'EGTA

L'EDTA est représenté ci-dessous. C'est un tétraacide noté H_4Y dont les pK_A successifs ont pour valeurs respectives : 2,0 ; 2,7 ; 6,4 ; 10,2.

En milieu aqueux très fortement acide, l'EDTA est majoritairement sous la forme (1) représentée ci-après.

1. Connaissant les valeurs générales des pK_A des couples acide-base suivants, justifier cette observation.



2. L'espèce complexante est l'ion Y^{4-} . Il est observé que les ions métalliques donnent tous avec ce ligand hexadente (ou en français, hexadentate...) un complexe de stœchiométrie 1/1, les sites de coordination occupant les sommets d'un octaèdre. Identifier les sites de coordination et représenter dans l'espace l'ion complexe MY.
3. L'espèce H_4Y étant pratiquement insoluble dans l'eau, la solution titrante (S) (de concentration $c_T = 0,0200 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) est obtenue par dissolution dans l'eau du sel Na_2H_2Y , totalement dissocié en ions Na^+ et H_2Y^{2-} . Écrire la structure de l'ion H_2Y^{2-} et montrer que ce dernier est l'espèce majoritaire dans la solution ainsi préparée.

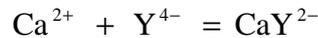
Le dosage des ions calcium par l'EDTA peut se réaliser dans diverses conditions plus ou moins acrobatiques, en fonction de la présence ou de l'absence d'ions magnésium. L'une des méthodes est la suivante : elle consiste à doser par la solution (S) une solution d'ions calcium dont le pH est maintenu à une valeur voisine de 12,5. L'équivalence est repérée par le changement de coloration de la solution, grâce à la présence d'un indicateur coloré (réactif de Patton et Reeder ou Calcon).

4. Considérons une solution d'ions calcium de concentration molaire $c_1 \approx 0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Un volume $V_1 = 25,0 \text{ mL}$ de cette solution est introduit dans un erlenmeyer. Le pH de la solution est amené à une valeur voisine de 12,5 par addition de *N*-éthyléthanamine. Le volume global de la solution est amené à $V_0 \approx 50 \text{ mL}$. Vérifier que l'hydroxyde de calcium ne précipite pas.

On donne la valeur du « produit de solubilité » de $\text{Ca}(\text{OH})_2$: $pK_s = 5,2$

5. Quelle est l'espèce majoritaire de l'EDTA non complexée dans ces conditions de pH ?

En considérant, ce qui est raisonnable au vu des quantités mises en jeu, que le pH de la solution ne varie pas au cours du titrage, on peut alors admettre, pour simplifier le raisonnement, que l'équation bilan de réaction est simplement :



6. La constante de formation du complexe CaY^{2-} est $\beta_{\text{Ca}}^{\text{Y}} = 10^{10,7}$. Qu'est-il possible d'en déduire ?

7. À la solution contenue dans l'erlenmeyer, 50 mg de dispersion solide de l'indicateur coloré sont ajoutés. La solution est de couleur rose. La solution d'EDTA est lentement ajoutée, jusqu'à virage net du rose au bleu. Le virage est observé pour un volume de titrant $V_E = 11,2$ mL. En déduire la valeur de la concentration c_1 .

L'indicateur noté J^- est lui-même un ligand des ions calcium. Le complexe CaJ^+ et l'ion libre J^- doivent avoir des couleurs suffisamment différentes dans la solution titrée, elles-mêmes différentes de celle du complexe CaY^{2-} (ce dernier est heureusement incolore).

8. À quelles espèces sont dues respectivement les colorations rose et bleue ?

9. La constante de formation de l'ion CaJ^+ doit-elle être supérieure ou inférieure à celle de l'ion CaY^{2-} ? Justifier la réponse en écrivant l'équation bilan qui traduit le changement de coloration de la solution.

10. Considérons maintenant une solution contenant des ions calcium et des ions magnésium, chacun — pour simplifier — à la concentration c_1 . Le protocole suivi à la question 4 est reproduit. Montrer que l'hydroxyde de magnésium précipite et calculer la concentration résiduelle en ions magnésium dans la solution. Le dosage sélectif des ions calcium est-il alors possible ?

On donne la valeur du « produit de solubilité » de l'hydroxyde de magnésium : $pK'_s = 10,8$

La constante de formation du complexe MgY^{2-} est $\beta_{\text{Mg}}^{\text{Y}} = 10^{8,6}$

11. Dans les dosages de ce type, il est souvent recommandé d'ajouter quelques mg de cyanure de potassium solide à la solution à titrer. Quel peut être le rôle de cette opération ?

La méthode précédente ne peut être réellement appliquée si les concentrations en ions calcium et magnésium sont voisines. Dès que la concentration en ions magnésium excède 10 % de celle en ions calcium, il y a en effet co-précipitation des deux hydroxydes. Il faut donc recourir à une autre méthode, utilisant un complexant plus sélectif comme l'EGTA. En effet, les constantes de formation des complexes Ca-EDTA et Mg-EDTA sont dans un rapport voisin de 10^2 alors que celles des complexes Ca-EGTA et Mg-EGTA sont dans un rapport de $10^{5,7}$! L'inconvénient est que l'EGTA est trois fois plus coûteux que l'EDTA...

L'indicateur de fin de titrage est le « zincon » ou, si vous préférez : 1-(2-hydroxy-5-sulfonylphényl)-3-phényl-(2-carboxyphényl)formazane... dont la formule ne sera pas demandée... et qui sera noté HIn^{3-} sous sa forme libre dans les conditions de pH utilisées ($\text{pH} \approx 10$). La forme complexante des ions métalliques est In^{4-} . Une solution de HIn^{3-} dans ces conditions de pH présente une couleur orange.

Se pose néanmoins une difficulté : le complexe CaIn^{2-} est incolore... Il faut donc travailler en présence d'un peu d'ions Zn^{2+} qui donnent un complexe ZnIn^{2-} de couleur bleue.

On donne (avec des notations évidentes) : $\beta_{\text{Zn}}^{\text{EGTA}} < \beta_{\text{Ca}}^{\text{EGTA}}$

Le protocole opératoire est alors le suivant :

- Dans un erlenmeyer de 250 mL, introduire un volume $V_1 = 25,0$ mL de solution d'ions calcium à titrer, contenant éventuellement des ions magnésium.
 - Ajouter un volume $V_1 = 25$ mL de solution tampon à $\text{pH} \approx 10$
 - Ajouter environ 2 mL d'une solution de complexe Zn-EGTA de concentration voisine de $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, puis 2 gouttes de solution de zincon.
 - Titrer lentement par une solution d'EGTA jusqu'à ce que la coloration passe du bleu à l'orange.
12. En écrivant une équation bilan, justifier la coloration bleue de la solution initiale.
 13. Écrire l'équation bilan traduisant le changement de coloration de la solution et justifier la méthode de détection de l'équivalence.
 14. Écrire la structure de la forme complexante de l'EGTA. Quels sont les sites de coordination ?
 15. Le numéro atomique du magnésium est $Z = 12$, celui du calcium $Z = 20$. Comment est-il possible de rendre compte simplement de la différence importante entre les constantes de complexation de l'EGTA pour les ions magnésium et les ions calcium ?

II. Synthèse d'un dérivé du BAPTA

L'EGTA noté H_4Z possède donc l'avantage sur l'EDTA de complexer sélectivement les ions calcium. Néanmoins, compte tenu des valeurs des deux $\text{p}K_{\text{A}}$ les plus élevées, l'EGTA existe majoritairement, aux pH des milieux physiologiques, sous forme H_2Z^{2-} , ce qui rend la complexation cinétiquement trop lente pour répondre aux impératifs des biologistes. Par ailleurs, ni l'espèce libre ni l'espèce complexée n'absorbent la lumière et aucune détection non destructive ne peut être envisagée.

C'est pourquoi de nouvelles espèces ont été mises au point, possédant à la fois des propriétés acide-base compatibles avec les exigences des biologistes et des caractéristiques spectrophotométriques intéressantes. Nous nous intéressons donc dans cette partie à la synthèse d'un dérivé dibromé du BAPTA, dont les propriétés seront envisagées dans les parties suivantes.

Dans un premier temps, une solution dans 50 mL de *N,N*-diméthylméthanamide (ou DMF, solvant polaire non protogène) de 0,22 mol de 2-nitrophénolate de sodium et 0,12 mol de 1,2-dibromoéthane est chauffée à reflux du solvant pendant 2 heures. Après refroidissement, un composé **A** précipite et il est isolé par filtration sous pression réduite (rendement 56 %). La formule brute de **A** est $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$.

16. Identifier **A** et proposer, en le justifiant, un mécanisme pour sa formation.
17. Quel est le rôle du DMF ?

Par hydrogénation catalytique, **A** est transformé en **B** de formule $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. Le spectre RMN ^1H de **B** fait apparaître un multiplet entre 7 et 8 ppm (intégration 8 H), un singulet vers 4,2 ppm (intégration 4 H) et un singulet élargi (intégration 4 H), disparaissant lorsque le spectre RMN est enregistré en présence d'une goutte de D_2O . Le spectre IR fait notamment apparaître deux bandes fines vers 3300 cm^{-1} .

18. En déduire la formule semi-développée de **B**.

En présence d'une amine tertiaire R_3N (120 mmol), 12,5 mmol de **B** sont mélangés avec 72 mmol de 2-bromoacétate d'éthyle $\text{Br}-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ et 3,5 mmol d'iodure de sodium. Le tout est dissous dans

15 mL d'acétonitrile (solvant polaire non protogène) et chauffé à reflux du solvant pendant 20 heures. Après refroidissement et dilution avec du toluène, les produits insolubles (sels de bromure et d'iodure) sont éliminés par filtration sous pression réduite. Après traitement de la phase organique résiduelle, le composé **C** (formule brute $C_{30}H_{40}N_2O_{10}$) est isolé avec un rendement de 71 %. Le spectre RMN de **C**, enregistré en solution dans $CDCl_3$ à une fréquence de 60 MHz, se présente de la façon suivante :

$\delta = 6,81$ ppm , singulet, 8 H

$\delta = 4,29$ ppm , singulet, 4 H

$\delta = 4,19$ ppm , singulet, 8 H

$\delta = 4,05$ ppm , quadruplet, 8 H, $J = 7$ Hz

$\delta = 1,16$ ppm , triplet, 12 H, $J = 7$ Hz

19. En déduire la structure de **C**. Attribuer les massifs aux différents atomes d'hydrogène de la molécule et justifier les multiplicités observées (sauf pour le signal le plus déblindé).
20. Proposer un mécanisme détaillé pour la formation de **C**, ne faisant pas intervenir dans un premier temps les ions iodure. Justifier la réponse.
21. Les ions iodure jouent un rôle catalytique. Justifier cette observation en précisant le mécanisme précédemment écrit.

Le composé **C** (0,52 mmol) est dissous dans 5 mL de trichlorométhane, en présence de 1,44 mmol de pyridine. Après refroidissement, 1,0 mmol de dibrome dissous dans du trichlorométhane sont ajoutés. Après retour à la température ambiante, la phase organique est traitée par une solution aqueuse de chlorure d'hydrogène (acide chlorhydrique) puis par une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, puis le solvant est évaporé. Après recristallisation, on isole 180 mg de **D**. La formule brute de **D** est $C_{30}H_{38}N_2O_{10}Br_2$. Le spectre RMN enregistré en solution dans CD_2Cl_2 à une fréquence de 100 MHz, se présente comme suit :

$\delta = 7,31 - 6,90$ ppm , multiplet, 4 H

$\delta = 6,68$ ppm , doublet, 2 H, $J = 9$ Hz

$\delta = 4,26$ ppm , singulet, 4 H

$\delta = 4,08$ ppm , singulet, 8 H

$\delta = 4,06$ ppm , quadruplet, 8 H, $J = 7$ Hz

$\delta = 1,21$ ppm , triplet, 12 H, $J = 7$ Hz

22. Montrer que ces données sont compatibles avec la fixation d'un atome de brome sur chaque cycle aromatique, en position 4 par rapport à l'atome d'azote.
23. Sur l'exemple de la *N,N*-diméthylaniline (ou *N,N*-diméthylbenzénamine), préciser le mécanisme de la réaction et justifier la régiosélectivité de la réaction.
24. Quel peut-être le rôle de la pyridine dans le protocole opératoire proposé ?

III. Étude spectroscopique du système calcium-bapta

Les spectres d'absorption UV-visible, correspondant aux transitions énergétiques entre niveaux électroniques, sont différents pour le BAPTA et pour le complexe Ca-BAPTA. Ainsi la détection spectroscopique indirecte de la concentration en ions calcium libres devient possible.

Par ailleurs, les deux pK_A les plus élevés du BAPTA (sous forme tétraacide) sont égaux à 6,4 et 5,5. Les deux premières valeurs, inférieures à 4, n'ont pu être mesurées par suite de l'insolubilité dans l'eau de la molécule sous forme tétraacide.

Le spectre du BAPTA libre, enregistré en milieu tamponné de $pH = 7,29$ présente deux maxima d'absorption aux longueurs d'onde $\lambda_1 = 254$ nm (absorption maximale) et $\lambda_2 = 287$ nm. Le spectre de

l'ion complexe Ca-BAPTA présente un maximum d'absorption pour $\lambda_3 = 274 \text{ nm}$ et $\lambda_4 = 203 \text{ nm}$ (absorption maximale). Le premier spectre ressemble tout à fait à celui de la 2-méthoxy-*N,N*-diméthylaniline alors que le second ressemble à celui du méthoxybenzène.

On rappelle que dans une molécule, plus la délocalisation électronique est étendue, plus l'absorption des radiations électromagnétiques est décalée vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome).

De même, on observe sur le spectre du BAPTA enregistré en milieu acide ($\text{pH} < 5$) les mêmes effets que ceux observés en présence d'ions calcium.

25. Comment peut-on rendre compte simplement de l'effet bathochrome quand on passe du méthoxybenzène à la 2-méthoxy-*N,N*-diméthylaniline ?
26. Expliquer de même l'effet observé sur le spectre du BAPTA en milieu acide (effet hypsochrome, décalage vers les faibles longueurs d'onde).
27. Qu'est-il possible d'en conclure sur la nature des sites de coordination du BAPTA ? Comment est-il possible de rendre compte de l'effet hypsochrome en présence d'ions calcium ?
28. On constate sur différents spectres d'absorption, enregistrés avec une concentration totale en BAPTA constante, mais des concentrations en ions calcium libres variables, que toutes les courbes passent par un point commun. Comment s'appelle ce point ? Qu'est-il possible de déduire de l'existence de ce point ?

IV. Détermination de la constante de formation d'un complexe

Pour déterminer la constante de formation (ou de dissociation) d'un complexe, les biochimistes utilisent la méthode de Scatchard.

Considérons le dosage d'une solution d'EGTA, tamponnée à $\text{pH} = 6,8$, par une solution d'ions calcium suffisamment concentrée pour que la dilution de la solution titrée puisse être négligée au cours du titrage. On définit la constante apparente de complexation

$$K_{app} = \frac{c(\text{Ca} - \text{EGTA}) \cdot c^\circ}{c(\text{Ca}) \cdot c(\text{EGTA})}$$

où $c(\text{Ca} - \text{EGTA})$ représente la concentration de l'ion complexe, $c(\text{Ca})$ la concentration de l'ion calcium libre et $c(\text{EGTA})$ la somme des concentrations de toutes les formes non complexées de l'EGTA (à cette valeur de pH , l'EGTA n'est pas majoritairement sous sa forme complexante tétraionisée. Des corrections permettent de déterminer par la suite la valeur de la constante réelle de formation du complexe étudié).

NB : c° représente la concentration standard, dont la valeur est exactement égale à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Elle est introduite pour des raisons d'homogénéité liées à l'expression des activités en solution aqueuse.

On ne cherchera donc pas à préciser sous quelle(s) forme(s) se trouve l'EGTA dans le milieu.

29. Montrer que la courbe $\frac{c(\text{Ca} - \text{EGTA})}{c(\text{Ca})} = f(c(\text{Ca} - \text{EGTA}))$ est une droite dont le coefficient directeur permet d'accéder à la valeur de la constante K_{app} .
30. Les courbes suivantes sont obtenues lors du titrage de deux solutions d'EGTA de concentrations molaires respectives $c_1 = 0,100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $c_2 = 0,200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. En déduire la valeur de la constante K_{app} de formation du complexe dans les conditions données.

V. Cinétique de formation du complexe Ca-EGTA

La vitesse de formation de ces complexes est très élevée et doit être étudiée par des méthodes de cinétique rapide, permettant des mélanges quasi instantanés (méthode de flux stoppé). L'étude est réalisée par spectrophotométrie, en présence de tétraméthylmurexide TM. La formation du complexe CaTM est instantanée et l'étude de l'absorbance du milieu permet d'accéder à la concentration instantanée des ions calcium par une méthode que nous n'étudions pas ici.

Deux solutions sont mélangées dans le dispositif, de façon à obtenir en une durée très courte un mélange homogène, tamponné, d'ions calcium, d'indicateur coloré TM et d'EGTA. Ce dernier est introduit en excès.

31. En supposant que la réaction de formation du complexe $Ca-EGTA$ est un acte élémentaire de constante de vitesse k_1 , exprimer la vitesse de disparition des ions calcium en fonction des concentrations en EGTA et en ions Ca^{2+} .
32. La concentration initiale en EGTA notée c_G dans le mélange est environ 10 fois plus grande que la concentration initiale en ions calcium. En déduire l'expression de la concentration en ions calcium en fonction du temps.
33. La concentration en ions calcium est mesurée au bout du temps de demi-réaction noté τ . Écrire la relation liant τ , la concentration c_G et la constante de vitesse de la réaction.
34. En réalité, il faut tenir compte du « temps mort » noté t_d nécessaire au mélange des réactifs. Le temps de demi-réaction est en fait augmenté de cette valeur et la mesure réelle est $\tau' = \tau - t_d$. La courbe $\ln 2/c_G = f(\tau')$ est représentée ci-après. En déduire la valeur de la constante k_1 , ainsi que la valeur de t_d .
35. On a en fait négligé la vitesse de destruction du complexe en ses éléments constitutifs. Compte tenu de la valeur de K_{app} déterminée dans la partie précédente, et en supposant que la décomplexation est aussi une étape élémentaire, donner une estimation de la constante de vitesse de décomplexation k_{-1} . L'approximation faite était-elle raisonnable ?