

1 Synthèse totale du derhodinosylurdamycine A

Les angucyclines sont une classe d'antibiotiques d'origine naturelle. Elles possèdent un squelette tétracyclique présentant des centres stéréogènes. Depuis la découverte des urdamycines en 1986, isolées à partir des *Streptomyces fradia*, de nombreuses recherches ont permis de découvrir de nouveaux antibiotiques. On s'intéressera dans ce problème plus particulièrement à la derhodinosylurdamycine A (figure 1), un antibiotique antitumoral de la classe des angucyclines découvert en 1989.

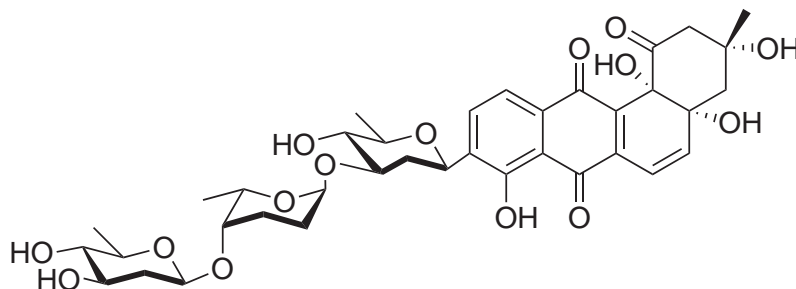


FIGURE 1 – Structure de la molécule de derhodinosylurdamycine A

Dans ce problème, on se propose d'en étudier la synthèse totale parue récemment (octobre 2015) dans *Chemistry - A European Journal* et proposée par l'équipe de H. R. KHATRI et coll. de l'université de TOLEDO, États-Unis. Une analyse rétrosynthétique est présentée figure 2 ; elle permet de décomposer la synthèse et d'en montrer les grandes étapes qui seront développées dans le sujet.

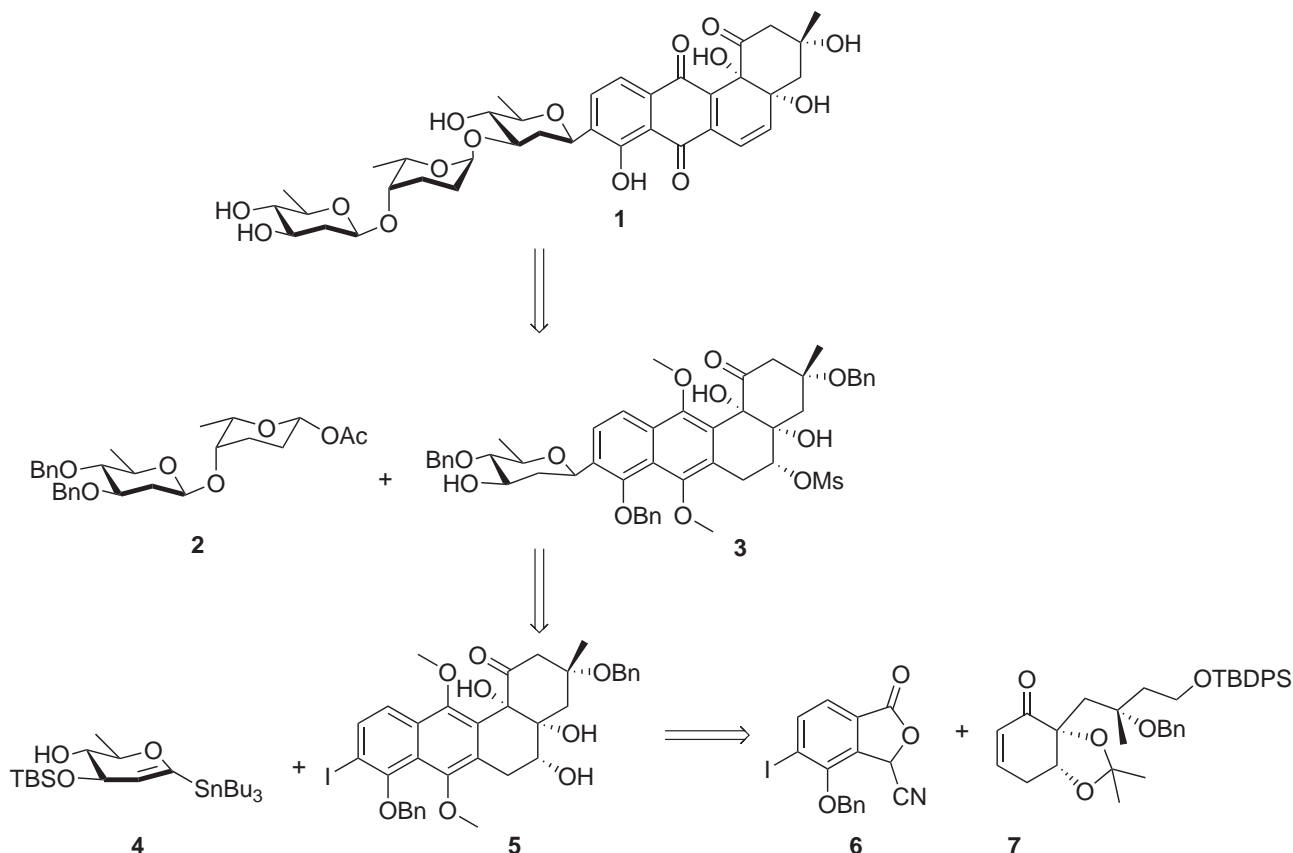


FIGURE 2 – Analyse rétrosynthétique du derhodinosylurdamycine A

Vous trouverez en annexes les structures des groupes protecteurs utilisés dans cette synthèse ainsi que d'autres données utiles. Il vous appartient de vous y référer quand nécessaire.

Annexes

Annexe 1 - Groupes protecteurs (GP)

GP	RO-Bn	RO-Ac	RO-PMP	RO-TBS	RO-TBDPS	RO-MOM	RO-Ms
Structure							

Annexe 2 - Electronégativités (échelle de Pauling)

Atome	H	C	N	O	Cl	I
χ_P	2,2	2,6	3,0	3,4	3,2	2,7

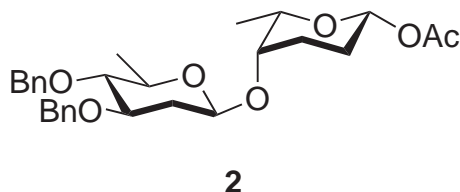
Annexe 3 - ordre de grandeur des pK_a de quelques couples acide-base

Acide	pyridinium	NH_4^+	Ph-OH	Et_3NH^+	H_2O	R-OH	$\text{HCR}_2-\text{C}=\text{O}$	HCR_2-CN
Base	pyridine	NH_3	Ph-O ⁻	Et_3N	HO ⁻	R-O ⁻	$^-\text{CR}_2-\text{C}=\text{O}$	$^-\text{CR}_2-\text{CN}$
pK_a	5	9	10	11	14	15	20	25

1.1 Étude des précurseurs

1.1.1 Disaccharide **2**

Le composé **2** est synthétisé en utilisant le fonds chiral (*chiral pool*). Nous ne détaillerons pas les étapes de sa synthèse dans cette partie.

FIGURE 3 – Précurseur **2**

1. ☞ Donner la définition du fonds chiral. Quel est son intérêt ?

2. Dessiner la molécule **2** en représentation de CRAM en plaçant les deux cycles dans le plan de la feuille. Combien de stéréo-isomères cette molécule possède-t-elle ?

Parmi les caractéristiques physico-chimiques de **2**, on trouve : $\alpha_D^{23} = -5,3^\circ$ ($c = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CHCl_3).

3. Que représente cette grandeur ? Dans quelle loi, que l'on énoncera, intervient-elle ? Quelle information nous apporte la valeur de α_D^{23} ?

1.1.2 Synthèse de **6**

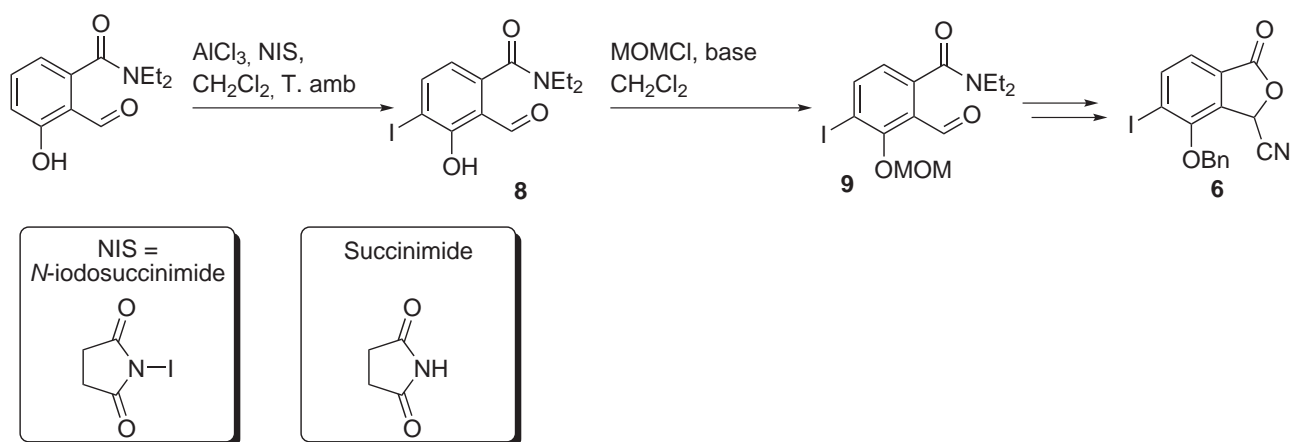


FIGURE 4 – Élaboration du composé **6**

Nous allons nous intéresser aux premières étapes de la synthèse du composé **6**. Le cycle aromatique trisubstitué est mis en présence de N-iodosuccinimide (NIS) et de chlorure d'aluminium dans le dichlorométhane à température ambiante pour mener au composé **8**. Cette réaction de substitution électrophile aromatique correspond à la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome d'iode sur le cycle aromatique et mène à la formation du succinimide.

4. Justifier le caractère électrophile de l'atome d'iode dans la molécule de N-iodosuccinimide.

La caractérisation par spectroscopie Infra-Rouge (IR) de **8** donne, entre autres, les bandes caractéristiques suivantes : 3069, 2976, 2944 et 1651 cm^{-1} . Le spectre de RMN ^1H de **8** est décrit dans le tableau 1 : déplacement chimique des protons, multiplicité et intégration des signaux correspondants.

TABLEAU 1 – Spectre de RMN ^1H du composé **8** enregistré en solution dans CDCl_3 et à la fréquence de 600 MHz

Déplacement chimique (ppm)	Multiplicité	Intégration
1,09	triplet	3 H
1,27	triplet	3 H
3,19	quadruplet	2 H
3,59	multiplet	2 H
6,65	multiplet	1 H
8,00	multiplet	1 H
9,80	singulet	1 H
12,42	singulet	1 H

5. Attribuer les signaux de RMN et d'IR pour le composé **8** en justifiant votre réponse. La justification de la différence de déplacements chimiques pour les substituants éthyle n'est pas attendue.

Le composé **9** est obtenu en faisant réagir **8** avec du chlorométhoxyméthane (MOMCl , Annexe 1) et une base organique dans du dichlorométhane à température ambiante pendant 12 heures. Les valeurs des polarisabilités du méthanol, du chlorométhane et du méthane sont données dans le tableau 2.

TABLEAU 2 – Polarisabilités
 α ($10^{-40} \text{ J}^{-1} \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}^2$)

CH ₃ OH	3,59
CH ₃ Cl	5,04
CH ₄	0,00

6. Identifier le nucléofuge dans le chlorométhoxyméthane. Détailler avec soin le raisonnement.

1.1.3 Synthèse de 7

Dans cette partie, nous étudions la synthèse du précurseur **7** à partir du composé **10**. La séquence réactionnelle correspondante est présentée figure 5.

Le (*R*)-2-bromocyclohex-2-én-1-ol **10** est mis en présence d'une base dans le dichlorométhane. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à 0 °C et on y ajoute une solution de chlorométhoxyméthane. Le composé **11** est obtenu après 24 heures de réaction à température ambiante.

7. Proposer une base pour réaliser cette transformation en justifiant la réponse.

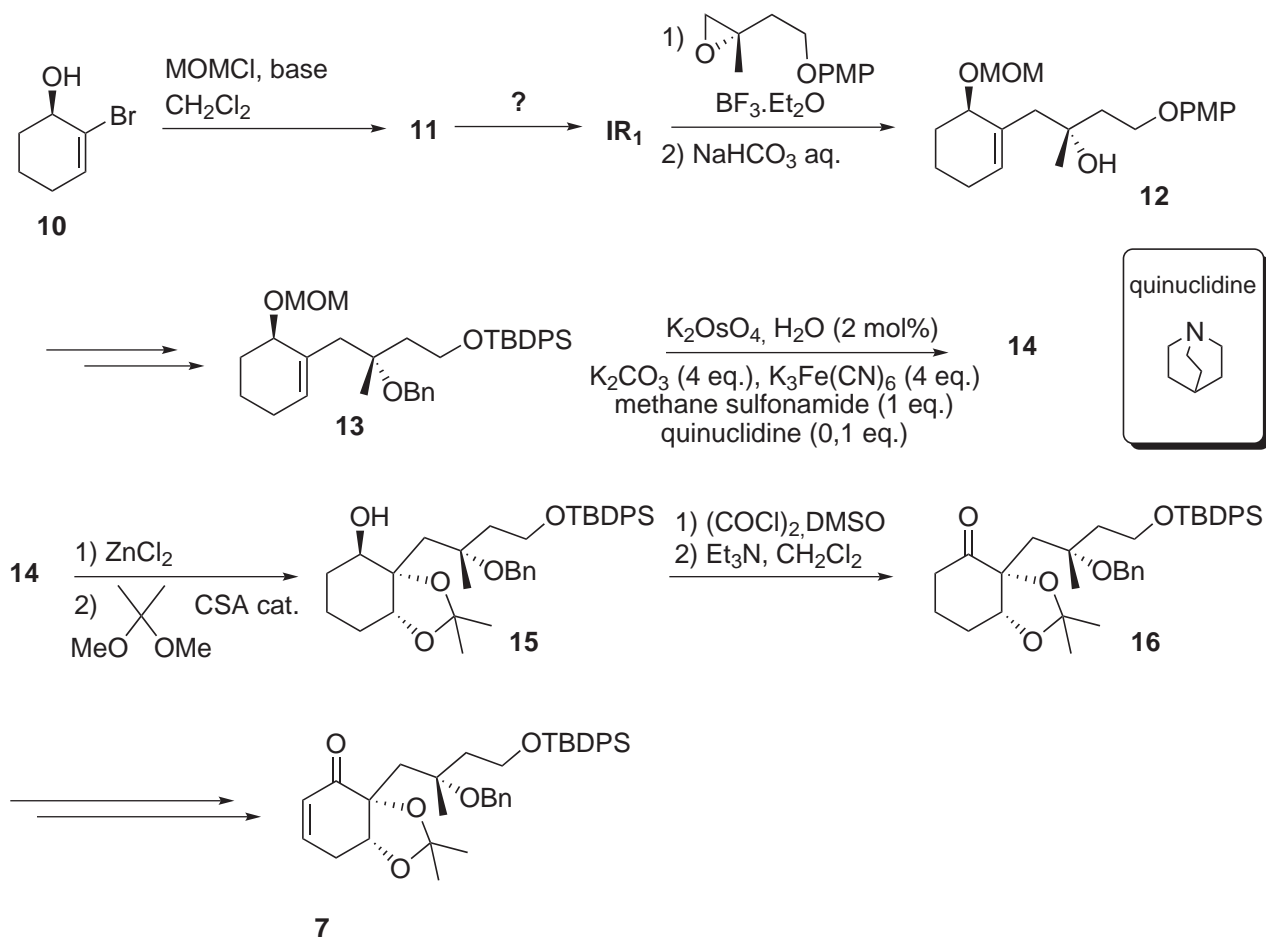
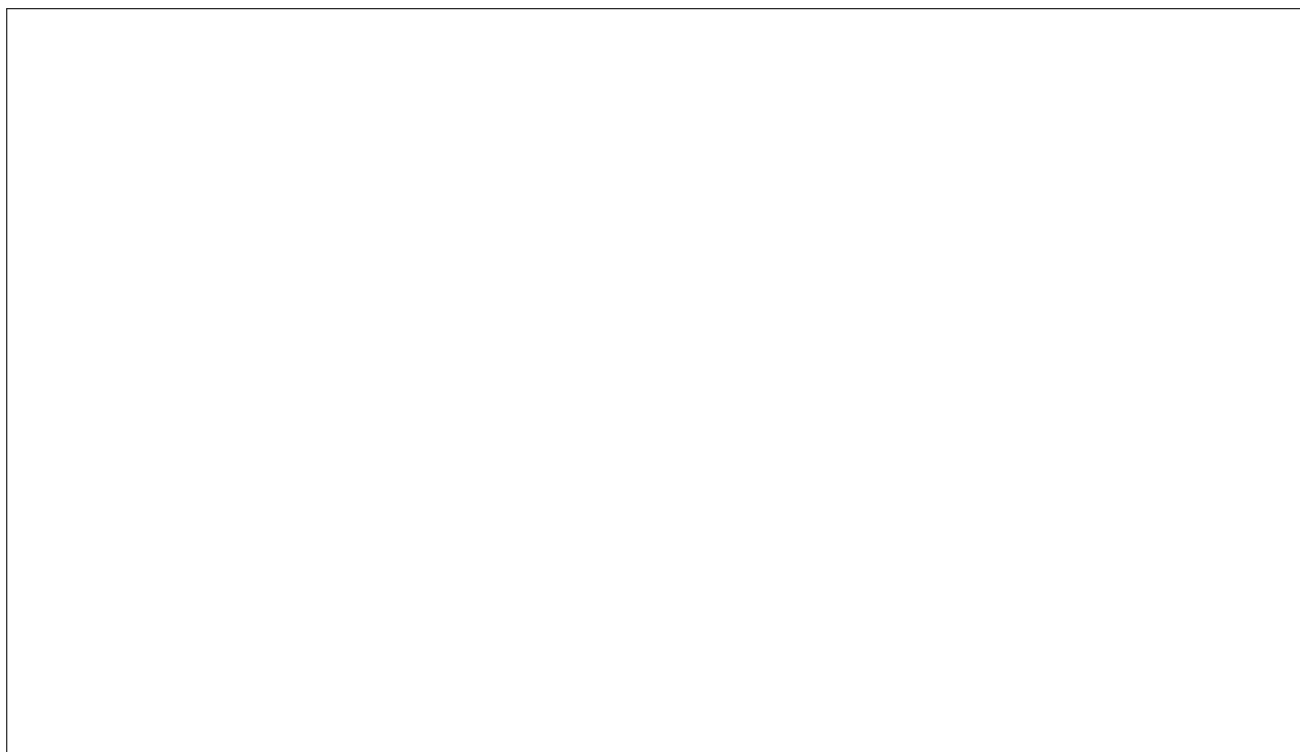


FIGURE 5 – Synthèse du précurseur 7

8. Donner le mécanisme de la réaction et la structure du composé **11**.

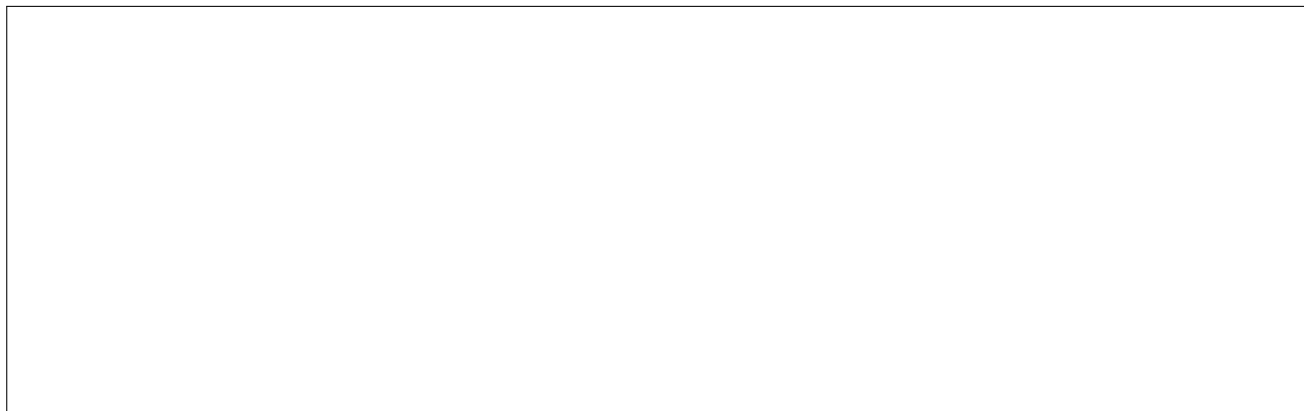


La formation du composé **12** à partir de **11** se fait en deux étapes et permet d'allonger le squelette carboné de la molécule. On obtient lors d'une première étape l'intermédiaire **IR1**. Lors de la deuxième étape, **IR1** est mis en présence d'un époxyde et de trifluorure de bore. Après 2h à -78°C , la réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse de NaHCO_3 .

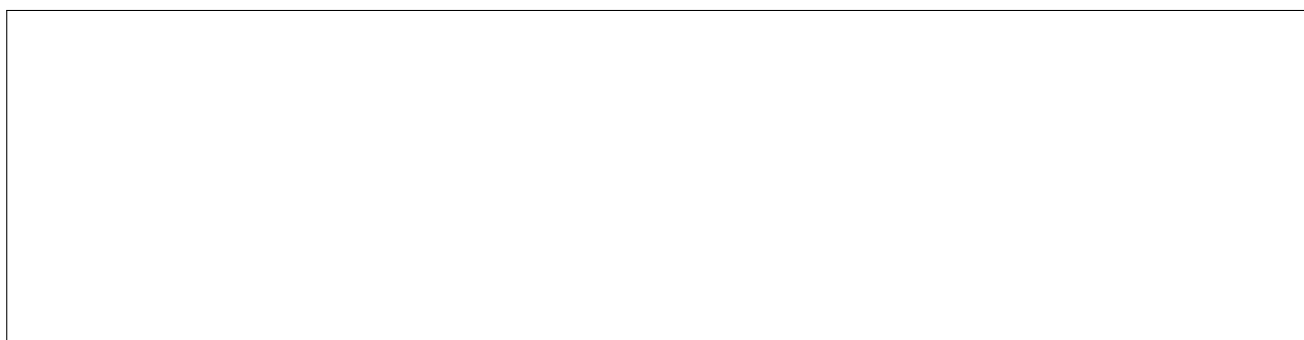
9. Donner le descripteur stéréochimique de l'atome de carbone stéréogène de l'époxyde en justifiant votre raisonnement.

10. Effectuer une analyse rétrosynthétique de **12** et en déduire la structure de l'intermédiaire réactionnel **IR1**. Comment appelle-t-on ce type de réactif?

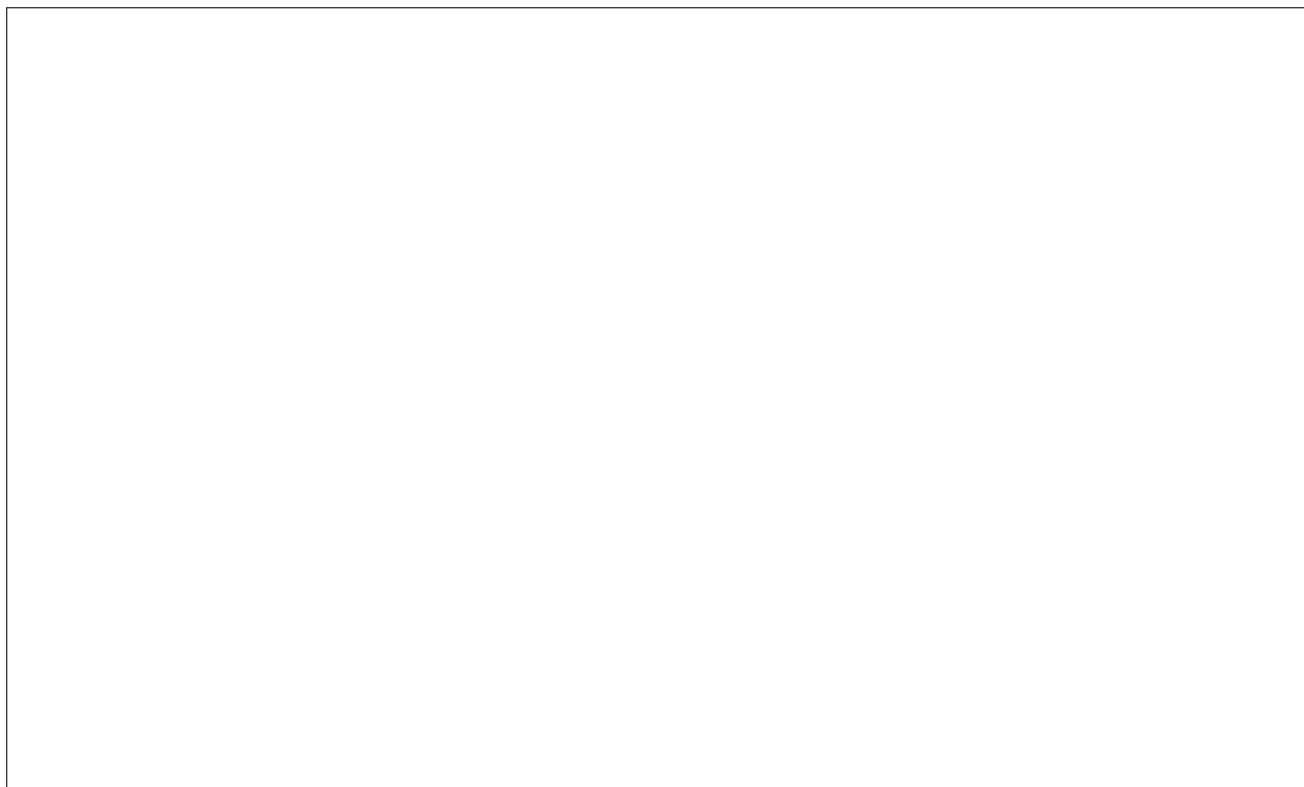
11. Rappeler les conditions expérimentales permettant la préparation de ce type de composé (**IR1**) avec un bon rendement. On présentera un schéma annoté du montage mis en œuvre.



12. Donner le schéma de LEWIS de BF_3 . Quelle est sa nature acido-basique selon LEWIS? Justifier. En déduire son rôle dans la transformation.



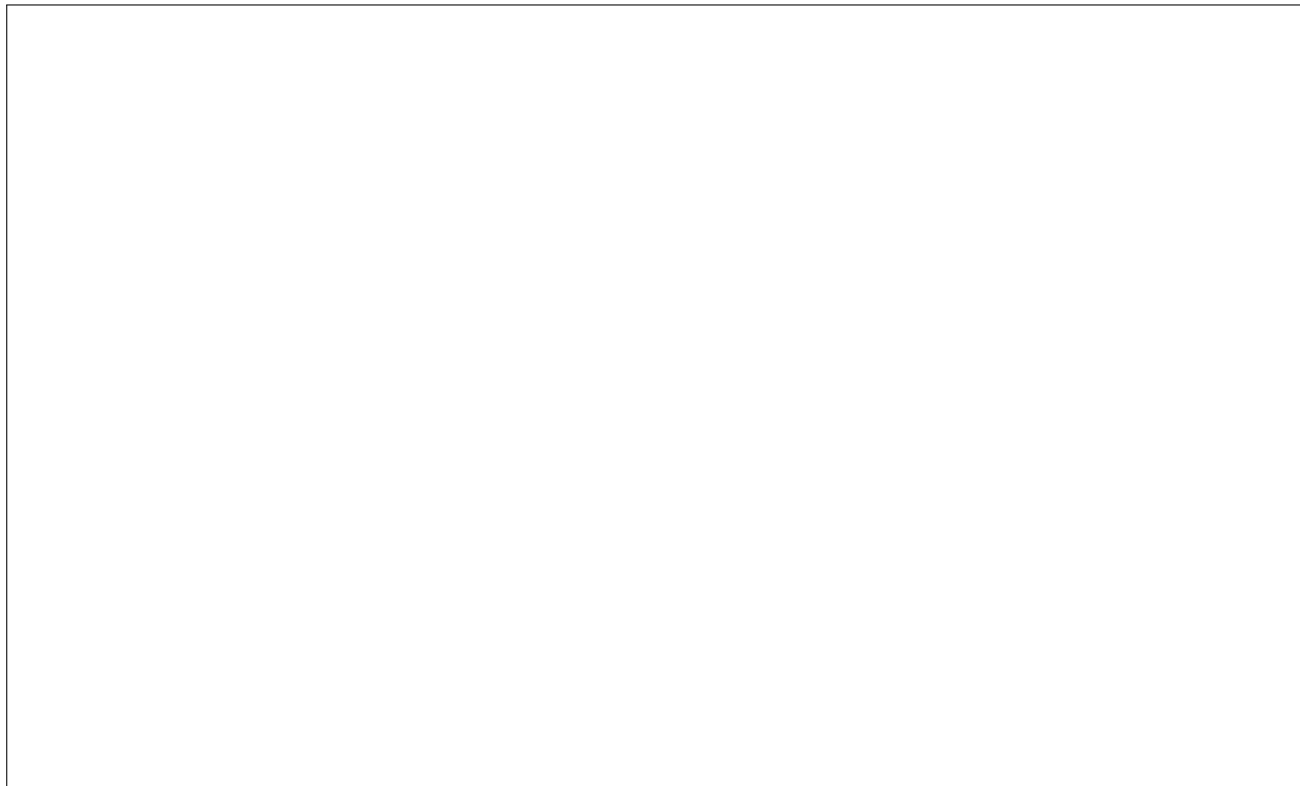
13. Proposer un mécanisme réactionnel pour la formation de **12** à partir de **IR1**.



On ne détaille pas les différentes étapes menant au composé **13** (TBDPS est un groupe protecteur de la fonction alcool). À une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, K_2CO_3 , quinuclidine et méthanesulfonamide dans l'eau est ajouté le composé **13** en solution dans le *tert*-butanol ainsi qu'une quantité substœchiométrique de

K_2OsO_4 , pour former le composé **14**. Dans cette réaction, les couples redox en jeu sont OsO_4/OsO_4^{2-} et $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$. L'agent oxydant est le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) et $Fe(CN)_6^{3-}$ est un réoxydant permettant de le synthétiser par oxydation de K_2OsO_4 .

14. Proposer un cycle catalytique simplifié expliquant la formation du composé **14** et donner sa structure.

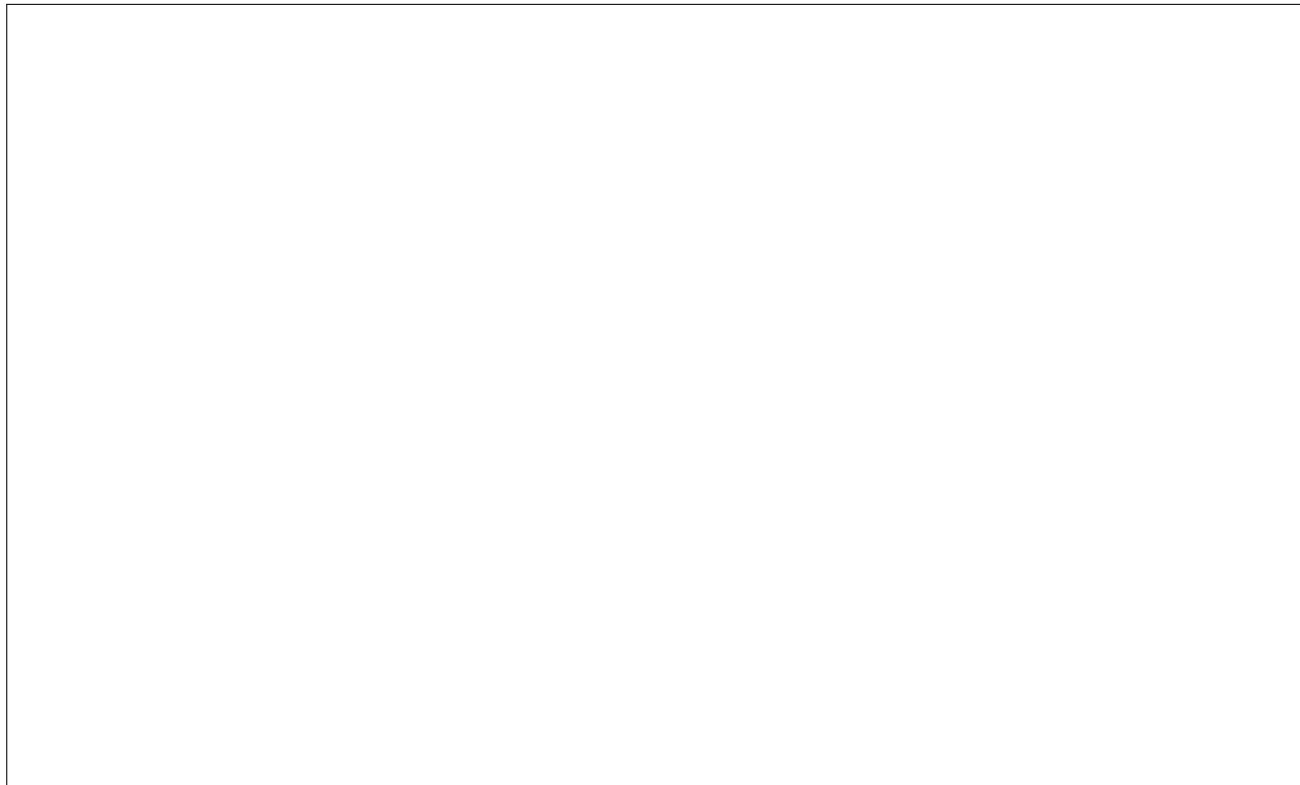


15. Combien de stéréo-isomères peuvent *a priori* être obtenus lors de cette réaction ?



Le composé **15** est obtenu en deux étapes. L'ajout de chlorure de zinc anhydre dans le dichlorométhane permet de déprotéger la fonction alcool. La réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$. Après extraction et purification sur gel de silice, le produit obtenu est mis en présence de 2,2-diméthoxypropane et d'une quantité substœchiométrique d'acide camphresulfonique (CSA) à température ambiante pendant 12 heures pour mener au produit **15**.

16. Identifier la nature de la fonction formée dans la molécule **15**. Proposer un mécanisme permettant de l'obtenir.



17. On forme ensuite **16** à partir de **15**. À quel type de transformation correspond cette étape ?



Enfin, on forme le précurseur **7** en deux étapes *via* une réaction catalysée par du palladium que l'on ne détaillera pas ici.

1.2 Réactions d'annélation

Dans cette partie, nous allons étudier la formation de l'angucycline **5** à partir des précurseurs **6** et **7**. Cette séquence réactionnelle passe par la formation de cycles : ce sont des réactions d'annélation.

1.2.1 Annélation d'Hauser

L'anion **17** (non isolé) est obtenu par traitement du précurseur **6** par *t*BuOLi dans le tétrahydrofurane (THF). Après 30 minutes d'agitation à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, le composé **7** est additionné goutte à goutte puis le mélange est laissé sous agitation pendant 1 h 30 pour mener à la formation intermédiaire de **18**. Enfin, le milieu réactionnel est chauffé à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h et la réaction est stoppée par ajout d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, ce qui permet d'obtenir après extraction et purification le composé **19**.

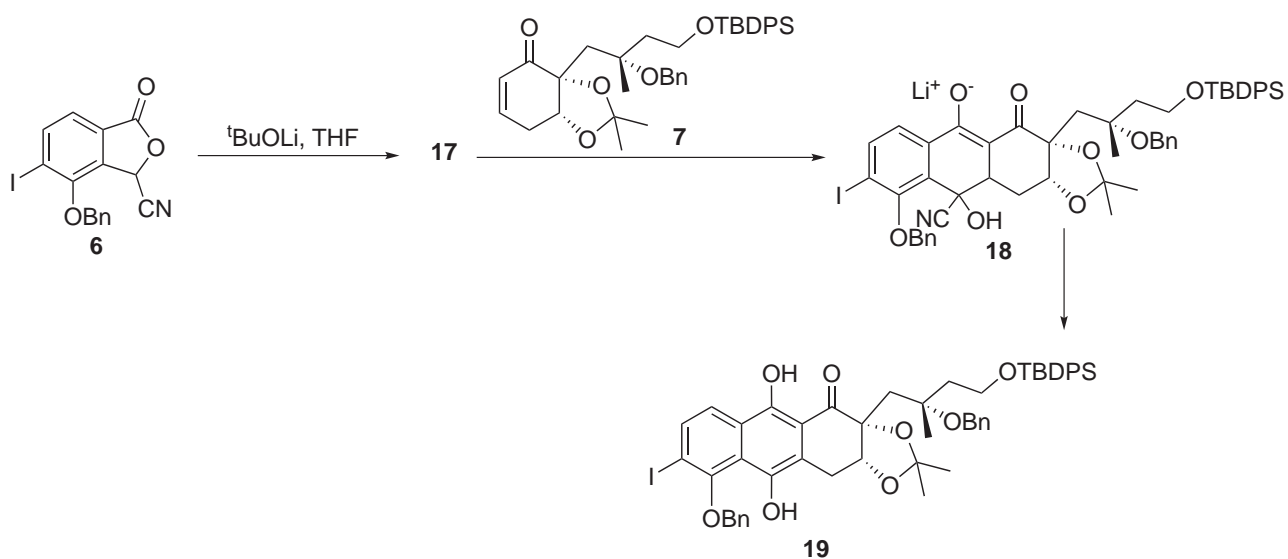
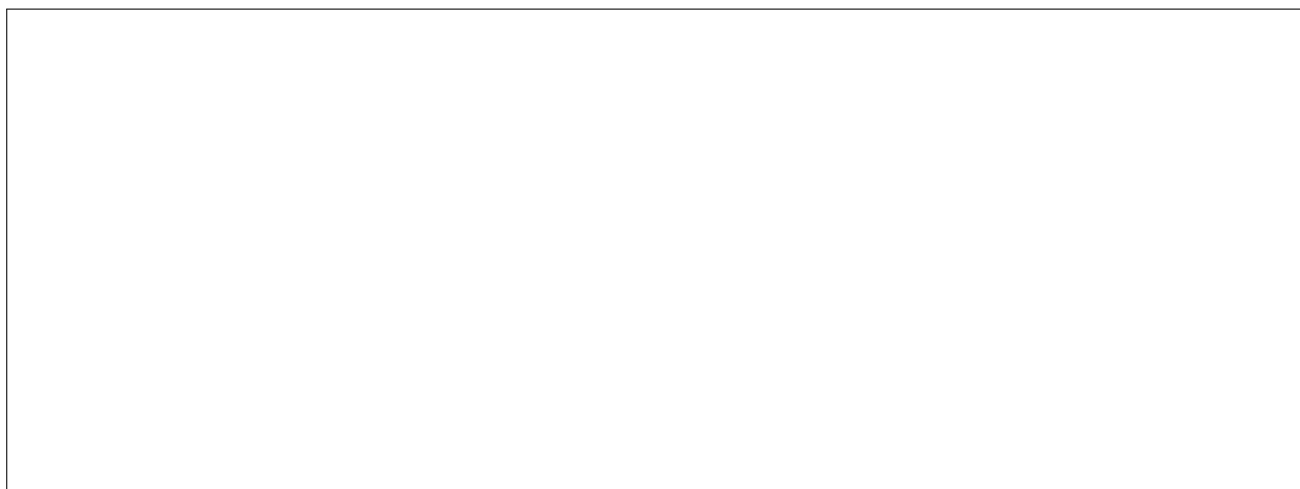


FIGURE 6 – Annélation d'HAUSER

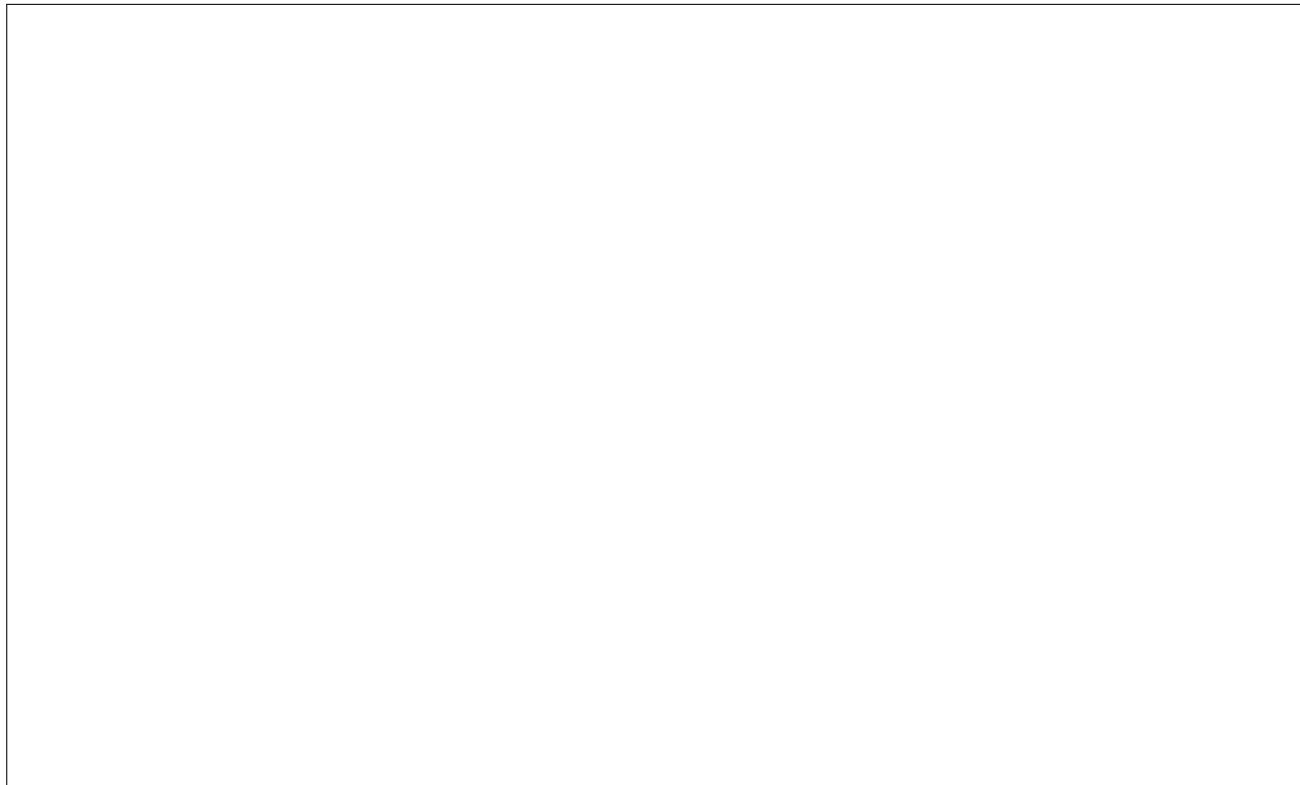
18. Proposer une structure pour l'anion **17**. Justifier la stabilité de ce composé.



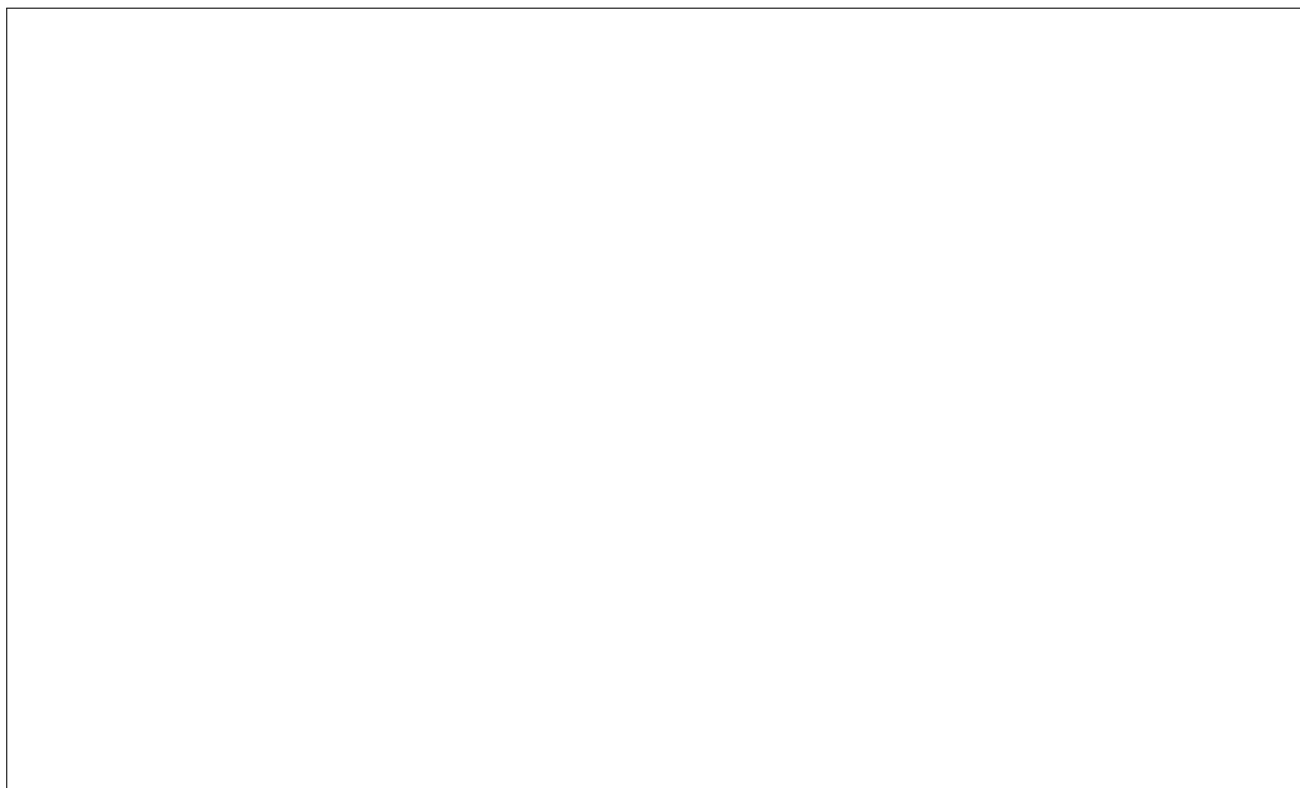
19. Quels sont les sites électrophiles du composé **7**? Justifier votre réponse.



20. Proposer un mécanisme réactionnel permettant de parvenir à l'anion **18** à partir des composés **17** et **7**.



21. Proposer un mécanisme réactionnel conduisant de l'intermédiaire **18** au produit **19**. Quelles précautions expérimentales doit-on prendre lors de cette réaction ?



1.2.2 Formation du composé 5

Le couplage pinacolique est une réaction permettant la formation d'une liaison C-C à partir d'un aldéhyde et d'un autre composé carbonyle en présence d'un réducteur.

Cette réaction tient son nom du pinacol (2,3-diméthylbutane-2,3-diol) qui s'obtient par dimérisation de la propanone (Figure 7). La formation du pinacol a été décrite pour la première fois par Rudolph FITTIG en 1859.



FIGURE 7 – Couplage pinacolique de la propanone menant à la formation du pinacol

Après une étape de déprotection de la fonction alcool de **19** suivie d'une oxydation, on obtient le composé **21**.

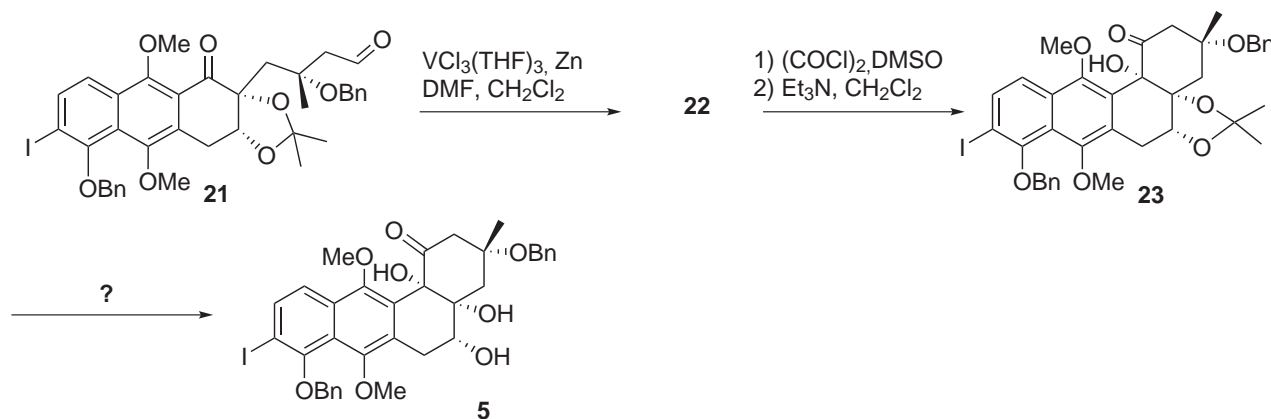
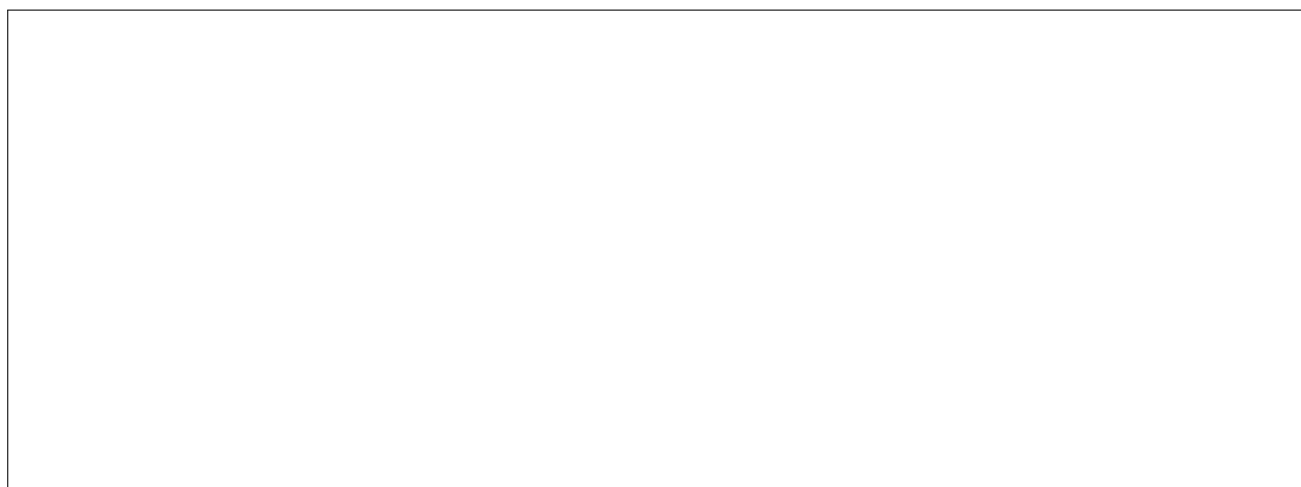


FIGURE 8 – Schéma mécanistique de la synthèse du composé 5

Le composé **21**, traité par du zinc et $VCl_3(THF)_3$ en quantité substoechiométrique dans le diméthylformamide (DMF) et le dichlorométhane, subit une réaction de couplage pinacolique intramoléculaire pour mener à la formation de **22**.

22. Donner la structure du composé **22** sans tenir compte de la stéréochimie des centres stéréogènes formés.



23. Proposer des réactifs permettant la formation du composé **5** à partir de **23** et indiquer la nature du sous-produit.



1.3 Obtention du derhodinosylurdamycine A

1.3.1 Couplage de Stille

La réaction de couplage développée par STILLE permet la création d'une liaison carbone-carbone entre un composé organostannique (R_2-SnBu_3) et un dérivé halogéné (R_1-X) *via* une catalyse au palladium. Le mécanisme simplifié de cette réaction est donné dans la figure 9.

La première étape (**A**) est une réaction d'addition oxydante du dérivé halogéné sur le palladium. Elle est suivie d'une réaction de transmétallation (**B**) où le substituant R_2 est échangé avec l'halogénure X. Enfin, une réaction d'élimination réductrice (**C**) permet de former la liaison carbone-carbone entre R_1 et R_2 et de régénérer le catalyseur.

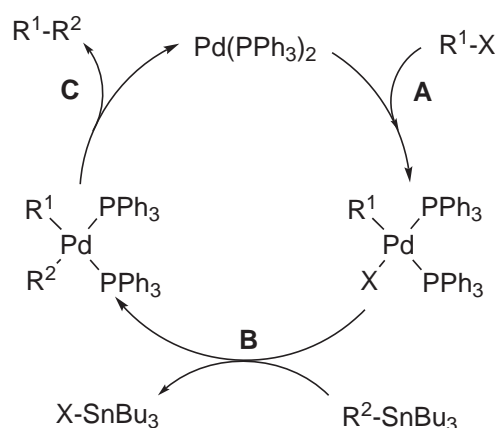


FIGURE 9 – Cycle catalytique de la réaction de couplage de STILLE. R_1, R_2 = aryle, alkenyle, allyle; X = I, Br, OTf

Dans la synthèse étudiée ici, les composés **4** et **5** réagissent selon la réaction de STILLE pour mener au composé **24**.

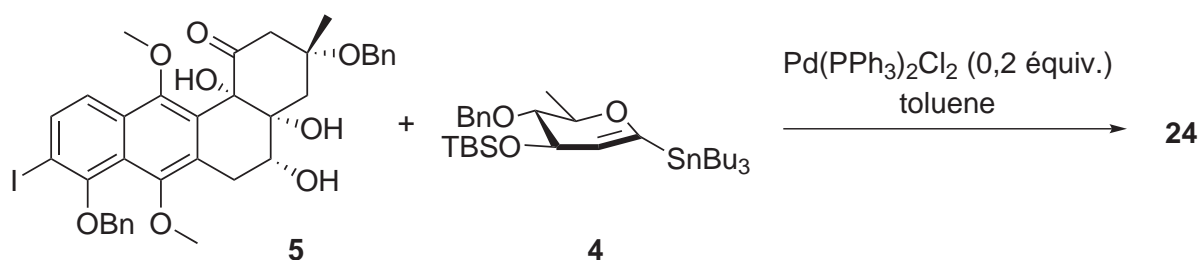


FIGURE 10 – Couplage de STILLE.

24. Retrouver l'équation de la réaction de couplage de STILLE à partir du cycle catalytique fourni et donner la structure du composé **24**.

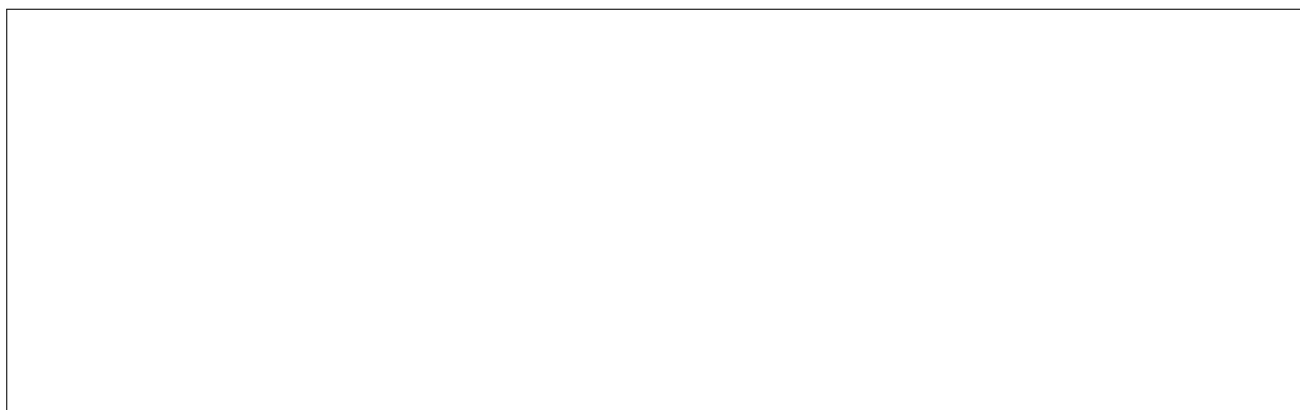


1.3.2 Fin de la synthèse

La suite de la synthèse menant à la derhodinosylurdamycine A est donnée dans la figure 11.

Le composé **25** est mis en réaction avec NaBH_3CN qui a une réactivité analogue à NaBH_4 (donneur d'hydrure). L'ajout d'acide chlorhydrique en solution dans le méthanol permet de contrôler le pH du milieu réactionnel. Le vert de bromocresol est un indicateur coloré de pH.

25. Proposer un mécanisme pour cette étape, sans tenir compte de la déprotection du groupe -OTBS.



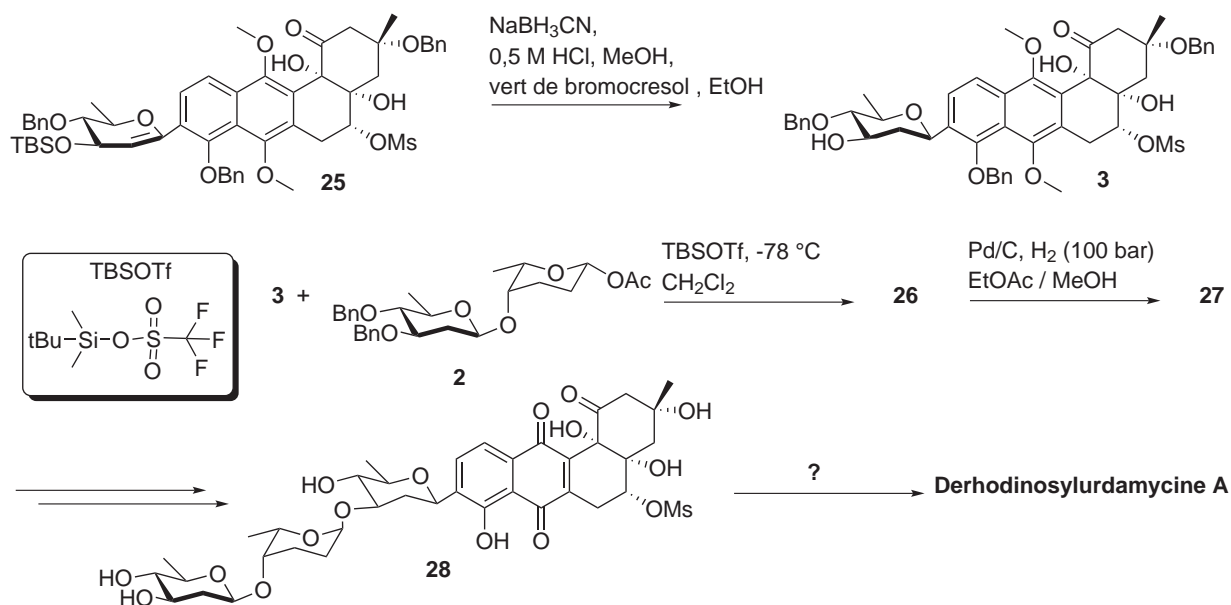


FIGURE 11 – Synthèse de la derhodinosylurdamycine A.

Le disaccharide **2** est ensuite greffé à **3** en présence de TBSOTf en quantité catalytique dans du dichlorométhane à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ pour mener à la formation de **26**. Cette réaction se fait *via* un mécanisme de type S_N1 avec formation intermédiaire d'un ion oxonium (figure 12). Le TBSOTf joue le rôle d'acide de LEWIS lors de la réaction de formation de l'ion oxonium.

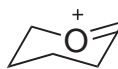
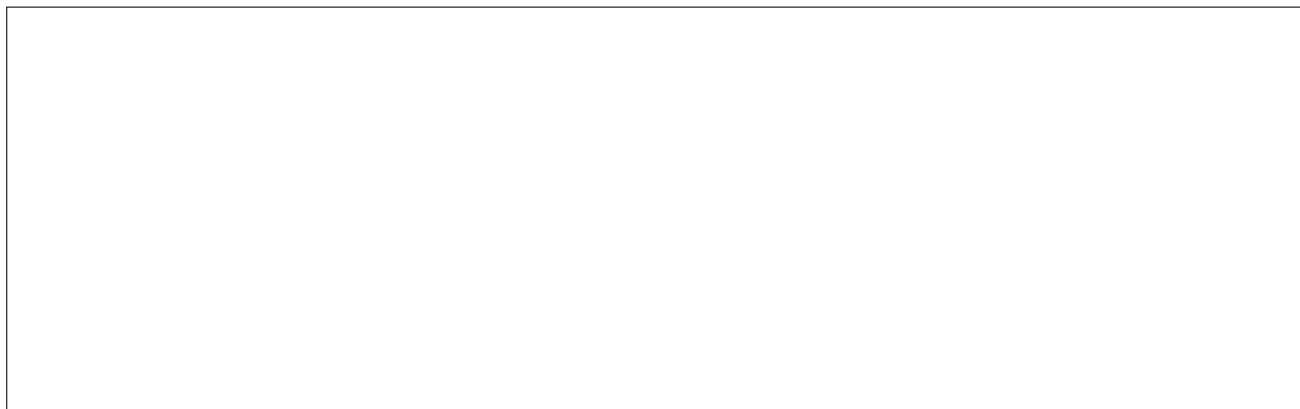


FIGURE 12 – Oxonium.

26. Donner la structure du composé **26**.

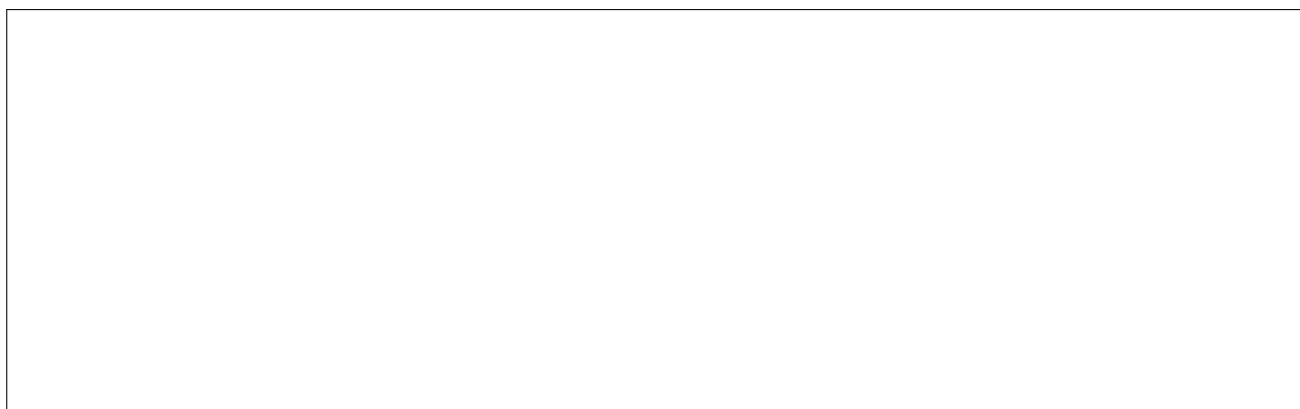


27. Proposer un mécanisme pour la formation du composé **26**.

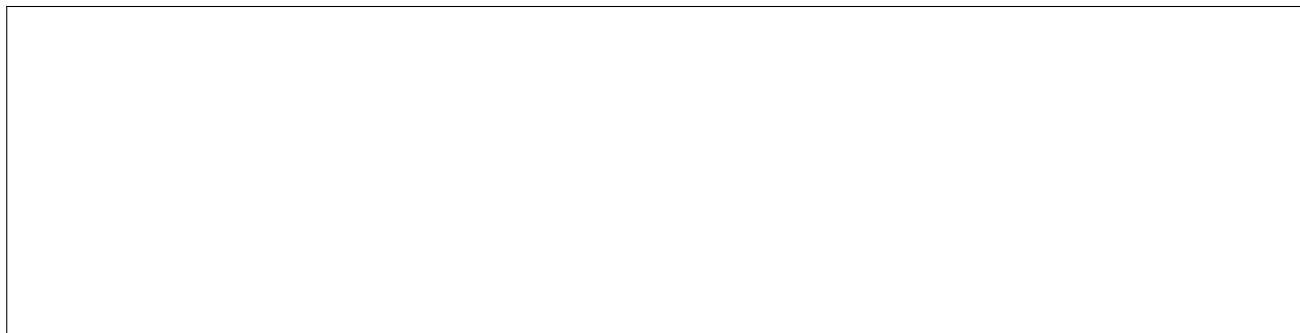


En présence de Pd/C et de dihydrogène, le composé **26** est transformé en composé **27**.

28. Donner la structure du composé **27**.

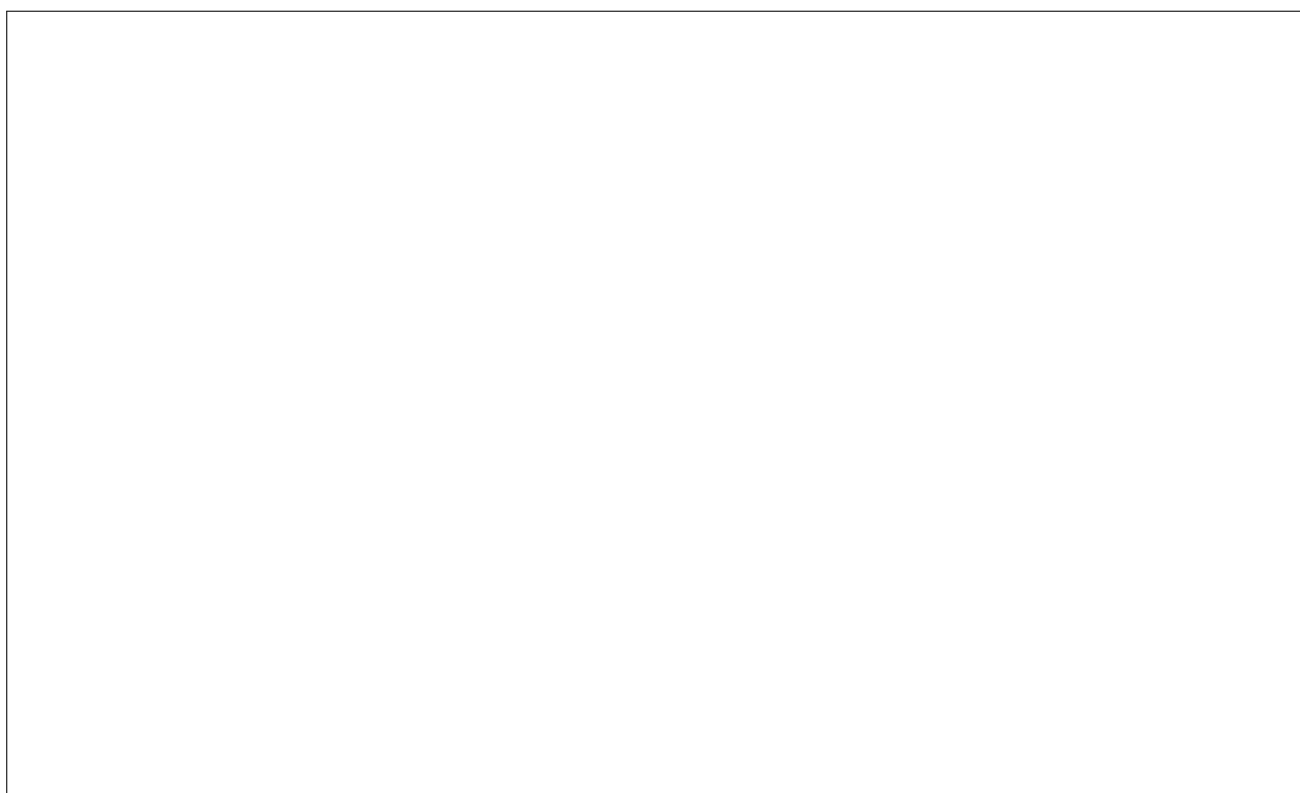


29. Commenter cette étape (rôle dans la synthèse, caractéristiques de la transformation, etc.).



Le composé **28** est ensuite obtenu en 3 étapes. La derhodinosylurdamycine A est finalement obtenue en une étape à partir du composé **28**.

30. Proposer un réactif pour l'étape de formation de la derhodinosylurdamycine A à partir de **28** ainsi que le mécanisme de la réaction.



2 Dégradation d'un polluant en milieu aquatique

Il est important pour les industries chimiques de limiter au mieux leur impact sur l'environnement au sein duquel elles sont implantées. À cet égard, la connaissance de la toxicité des substances pouvant être rejetées accidentellement dans la nature est bien évidemment cruciale, mais il est également primordial de pouvoir prévoir le devenir de ces molécules au cours du temps.

2.1 Système modèle

Dans le cadre de ce problème, nous nous intéresserons à un polluant modèle, l'ADNP (acétate de 2,4-dinitrophényle, figure 13a). En effet, ce produit est toxique pour les organismes aquatiques ($CL_{50} = 1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les truites arc-en-ciel), mais il peut être dégradé en DNP (2,4-dinitrophénol, figure 13b), dont la toxicité est moindre. Le temps de demi-vie de l'ADNP dépend cependant grandement des conditions environnementales (température, pH...). Le but de ce problème est d'exploiter des résultats expérimentaux pour déterminer quelques caractéristiques de la dégradation de l'ADNP.

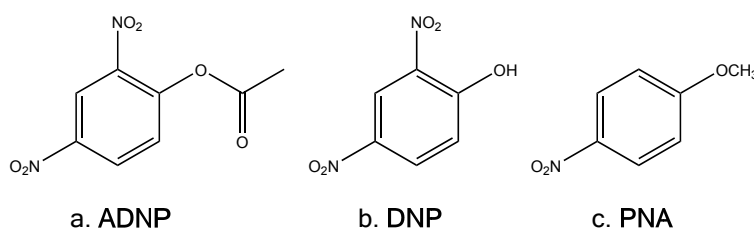


FIGURE 13 – Représentation topologique des molécules étudiées.

1. Comment nomme-t-on la transformation de l'ADNP en DNP, dans l'eau ? Quel autre produit est formé lors de la transformation ? Présente-t-il une toxicité particulière ?

2. Ψ Que représente la valeur de la CL_{50} (LC_{50} en anglais) ?

Dans l'eau, trois réactions peuvent être envisagées pour rendre compte de la dégradation de l'ADNP, selon qu'elle fait intervenir un ion oxonium, H_3O^+ , une molécule d'eau, H_2O , ou un ion hydroxyde, HO^- . Ainsi, on écrira la constante de vitesse apparente de la réaction k telle que :

$$k = k_{\text{H}}[\text{H}_3\text{O}^+] + k_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{OH}}[\text{HO}^-] \quad (1)$$

où k_{H} est la constante de la réaction impliquant un ion oxonium, $k_{\text{H}_2\text{O}}$ la constante de la réaction impliquant une molécule d'eau et k_{OH} la constante de la réaction impliquant un ion hydroxyde. k_{H} , $k_{\text{H}_2\text{O}}$

et k_{OH} sont indépendantes du pH, cependant la constante de vitesse apparente de la réaction k en dépend explicitement.

On peut alors écrire :

$$-\frac{d[\text{ADNP}]}{dt} = k(T, \text{pH}) [\text{ADNP}] \quad (2)$$

3. Proposer un mécanisme pour la transformation faisant intervenir un ion hydroxyde. Comment nomme-t-on cette réaction ?

En réalité, la cinétique de dégradation de l'ADNP en DNP en milieu acide est liée principalement au mécanisme impliquant une molécule d'eau.

4. En déduire une simplification de l'équation (1).

La partie suivante présente le suivi cinétique de la dégradation de l'ADNP. Il s'agit de déterminer les valeurs de la constante de vitesse k dans différentes conditions de température et de pH.

2.2 Suivi de réaction par Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

Les valeurs numériques des grandeurs nécessaires aux calculs demandés sont rassemblées à la fin de cette partie.

Dans un bécher placé dans un bain thermostaté, on verse 50,0 mL de solution aqueuse de citrate de sodium à $20 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ajustée à $\text{pH} = 5,0$. On ajoute 1,0 mL de PNA (*para*-nitroanisole, voir figure 13c) en solution dans le méthanol à $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, servant d'étalon interne pour la mesure en CLHP. La réaction est amorcée lors de l'ajout de 50,0 mL d'une solution d'ADNP à $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans le méthanol.

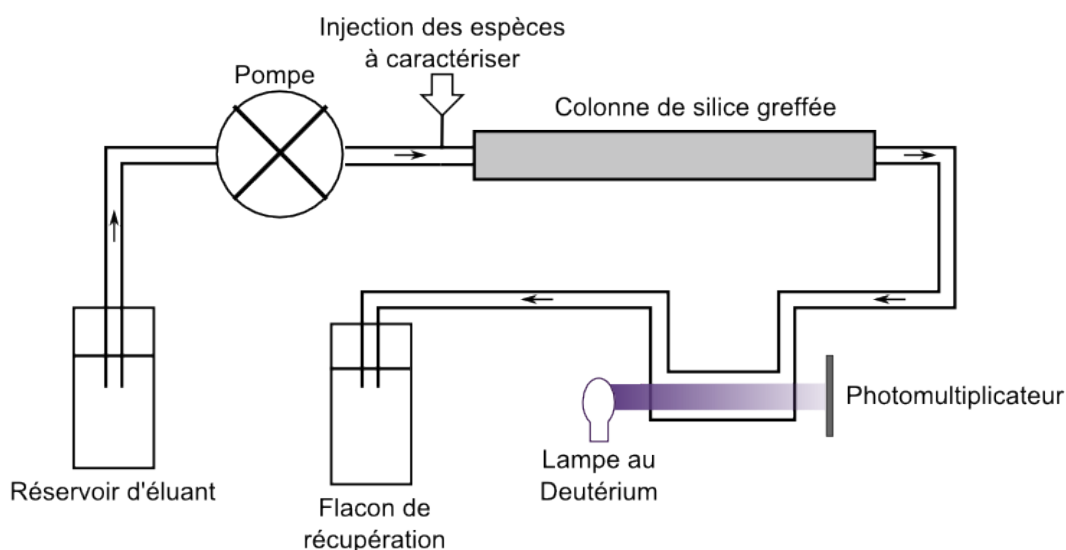


FIGURE 14 – Schéma de principe de la CLHP.

Le suivi de la transformation est réalisé par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP, l'acronyme anglais HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography* est généralement rencontré), dont le principe est illustré sur la figure 14. Quelques microlitres du mélange réactionnel sont prélevés à l'aide d'une seringue et injectés rapidement dans l'appareil de mesure. Les solutés sont élués avec un mélange méthanol-eau (60 : 40) ajusté à $\text{pH} = 3$, injecté à haute pression et dont le débit est maintenu constant grâce à un système de pompage. La phase stationnaire est constituée d'une colonne de gel de silice greffée par de longues chaînes alkyle (généralement à 8 ou 18 atomes de carbone). En sortie de colonne, l'arrivée d'une espèce se manifeste par un pic d'absorption du rayonnement émis par une lampe à deutérium, dont le spectre d'émission est donné en figure 15.

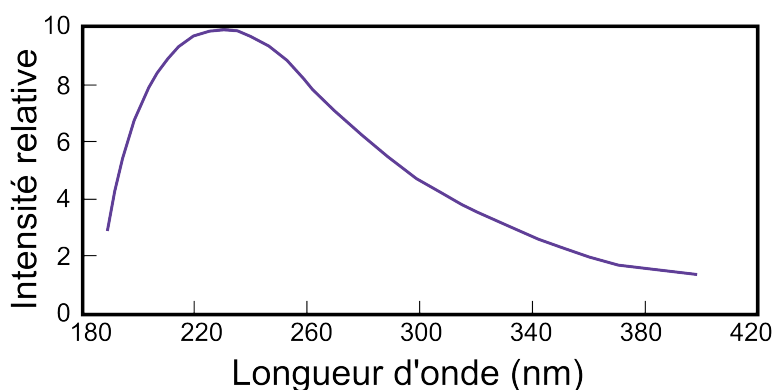


FIGURE 15 – Spectre d'émission d'une lampe à deutérium.

Dans les conditions exposées ici, les différents constituants du mélange réactionnel apparaissent à des temps de rétention différents sur le chromatogramme. L'aire d'un pic est proportionnelle à la concentration de l'espèce correspondante. Cette mesure est réalisée après différentes durées de réaction afin de suivre l'évolution des concentrations au cours du temps. La concentration en PNA étant constante, l'aire du pic observé sur le chromatogramme peut servir de référence. L'aire du pic correspondant à l'espèce d'intérêt est normalisée par l'aire du pic correspondant à l'étalon interne, et est notée $[]_{\text{norm}}$. On s'affranchit ainsi des éventuelles variations de volume injecté lors de chaque mesure.

5. Rappeler brièvement le principe de la chromatographie. ☞ Quelle est l'étymologie du mot *chromatographie* ?

6. 6.1 Pourquoi, selon vous, l'injection du mélange réactionnel dans la colonne doit-elle être effectuée *rapidement* ?

- 6.2 Qu'est-ce que le deutérium ? Dans quelle gamme spectrale se situe l'émission d'une lampe à deutérium ? Commenter le choix de la méthode de détection des espèces.

- 6.3 ☞ Donner la formule chimique de la silice. Quel est le rôle des chaînes alkyle greffées ?

6.4 Le P de CLHP signifiait à l'origine « pression » mais a été remplacé par « performance » lors de l'amélioration de la méthode, en particulier la réduction de la taille des grains de silice utilisés. En quoi la réduction de la taille des grains de silice a-t-elle permis l'augmentation des *performances* de la technique ?

6.5 Justifier le choix du PNA comme étalon.

7. Pour obtenir une solution tampon de $\text{pH} = 5,0$, un mélange tampon d'acide éthanoïque et d'ion éthanoate de $\text{p}K_a(\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-) = 4,8$ est généralement utilisé. En supposant que la concentration totale en base et en acide est égale à $20 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, quelles seraient les concentrations en acide éthanoïque et en ion éthanoate de ce mélange ? Selon vous, pourquoi cette solution tampon n'est-elle pas utilisée ici ?

La figure 16 présente deux chromatogrammes obtenus juste après amorçage de la réaction ($t = 0$, à gauche) et après 100 minutes de réaction (à droite). Les temps de rétention dans la colonne de CLHP des différentes espèces DNP, ADNP et l'étalon interne PNA sont indiqués au-dessous des chromatogrammes. Le premier pic, de plus faible intensité et indiqué par une astérisque, est un artefact lié à l'injection et ne sera donc pas pris en compte.

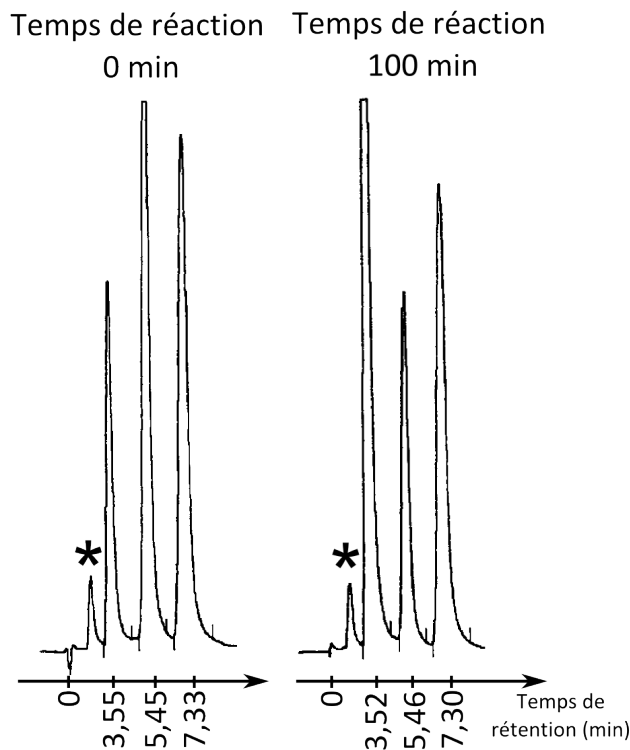


FIGURE 16 – Analyse par CLHP du mélange réactionnel après amorçage de la réaction ($t = 0$ min, à gauche) et après $t = 100$ min de réaction (à droite) à $\text{pH} = 5$ et $T = 25^\circ\text{C}$.

8. Proposer une méthode ou un raisonnement permettant d'associer chaque pic observé en CLHP à l'espèce mise en évidence. Que dire de la remarque formulée à la question 6.1 ?

9. Proposer une expression faisant intervenir les aires de certains pics et permettant de mesurer l'évolution de la concentration en ADNP au cours du temps. Placer le point correspondant aux données expérimentales pour un temps de réaction de 100 minutes sur la figure 17. Pour ce calcul, on pourra pour simplifier n'utiliser que les hauteurs des pics à la place de leurs aires.

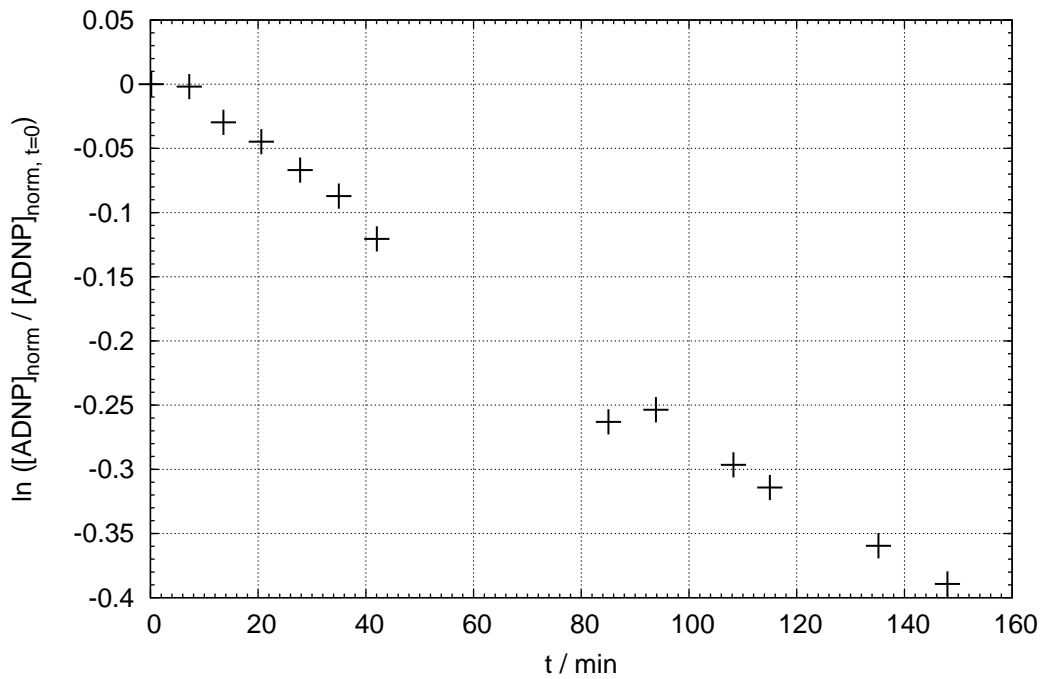


FIGURE 17 – $\ln \left(\frac{[\text{ADNP}]_{\text{norm}}}{[\text{ADNP}]_{\text{norm}, t=0}} \right)$ en fonction du temps de réaction, à $\text{pH} = 5$ et $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

10. Sur la figure 17 a été tracée l'évolution de $\ln \left(\frac{[\text{ADNP}]_{\text{norm}}}{[\text{ADNP}]_{\text{norm}, t=0}} \right)$ en fonction du temps. Que peut-on en déduire? Calculer la grandeur cinétique que vous pouvez déterminer à partir de ces résultats expérimentaux. Placer le point correspondant sur la figure 18.

À température constante et égale à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, l'expérience de dégradation de l'ADNP est conduite à différents pH. Les variations du logarithme de la constante de vitesse de la réaction en fonction du pH sont mesurées et représentées sur la figure 18.

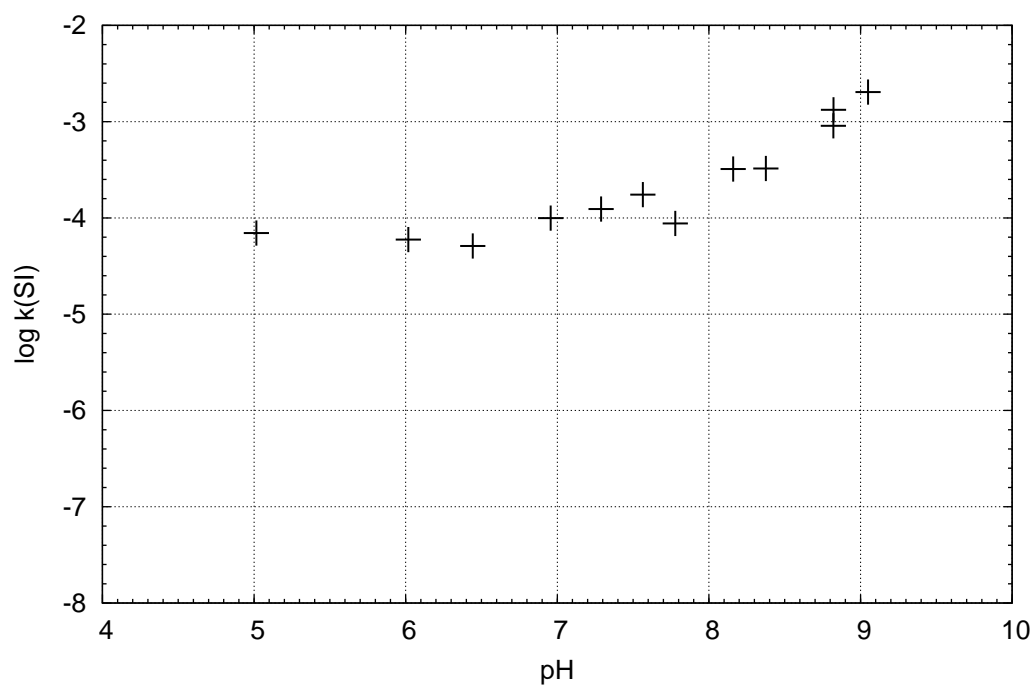
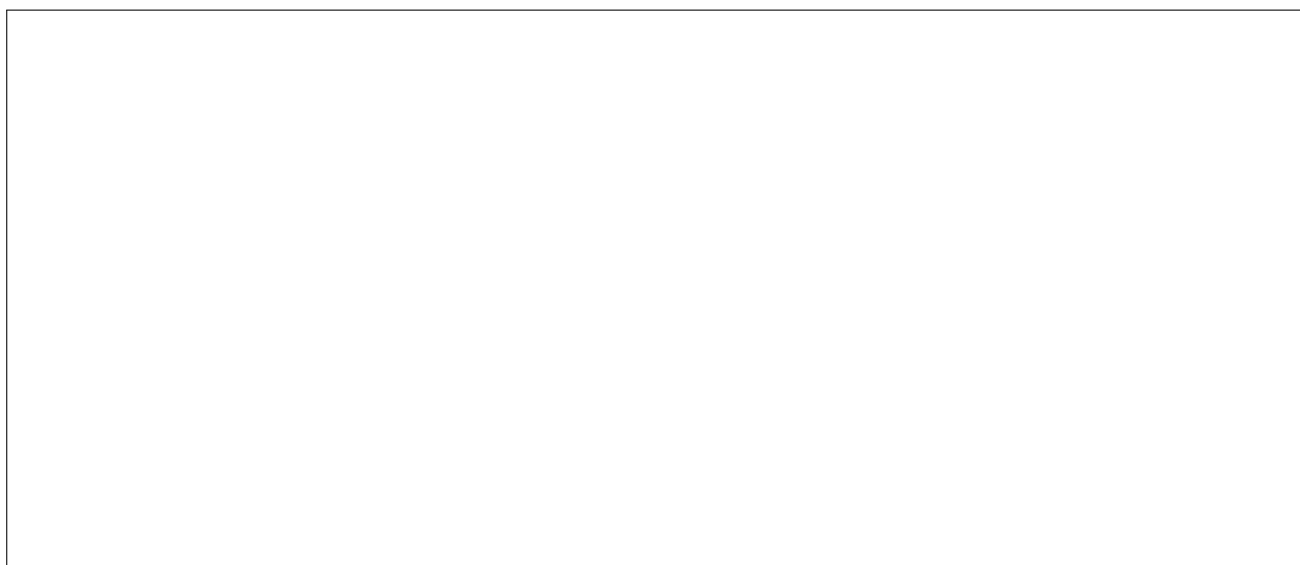


FIGURE 18 – Logarithme de la constante de vitesse de la transformation en fonction du pH, à $\theta = 25\text{ °C}$.

11. Pour un pH supérieur à 8,0, on peut considérer que $k_{\text{H}_2\text{O}} \ll k_{\text{HO}^-} \cdot [\text{HO}^-]$. Déduire de la figure 18 la valeur de k_{HO^-} à 25 °C. Commenter la précision de la valeur obtenue. Selon vous, pourquoi aucune valeur n'est-elle fournie pour un pH supérieur à 9 ?



Les mesures précédentes sont effectuées à différentes températures entre 15 °C et 47 °C. Les données correspondantes sont rassemblées dans le tableau 3.

TABLEAU 3 – Constante de vitesse k_{HO} mesurée à différentes températures.

$\theta / ^\circ\text{C}$	14,9	19,3	28,9	38,0	45,9
$k_{HO} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$	67	94	169	213	324

12. Quelle est la loi qui régit les variations de la constante de vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température ? \square Au cours de quel siècle a-t-elle été énoncée ? Calculer la ou les grandeurs cinétiques que vous pouvez déterminer à partir des données du tableau 3 en expliquant votre démarche. Les lignes vides du tableau peuvent être complétées par des calculs intermédiaires de votre choix ; vous pouvez également utiliser le tableur de votre calculatrice.

Données à 25 °C :

- Constante d'autoprotolyse de l'eau $K_e = 1,0 \times 10^{-14}$
- Constante des gaz parfaits $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
- $T(\text{K}) = \theta(^{\circ}\text{C}) + 273,15$

2.3 Pollution aquatique

Les valeurs numériques des grandeurs nécessaires aux calculs demandés sont rassemblées à la fin de cette partie.

Nous venons de voir qu'il était possible de mesurer en laboratoire l'influence de la température et du pH sur la cinétique de dégradation de l'ADNP. Dans cette partie, nous allons nous intéresser dans cette partie à la modélisation d'un étang, situé en aval de l'usine relarguant accidentellement de l'ADNP, afin d'évaluer la pollution du milieu aquatique naturel.

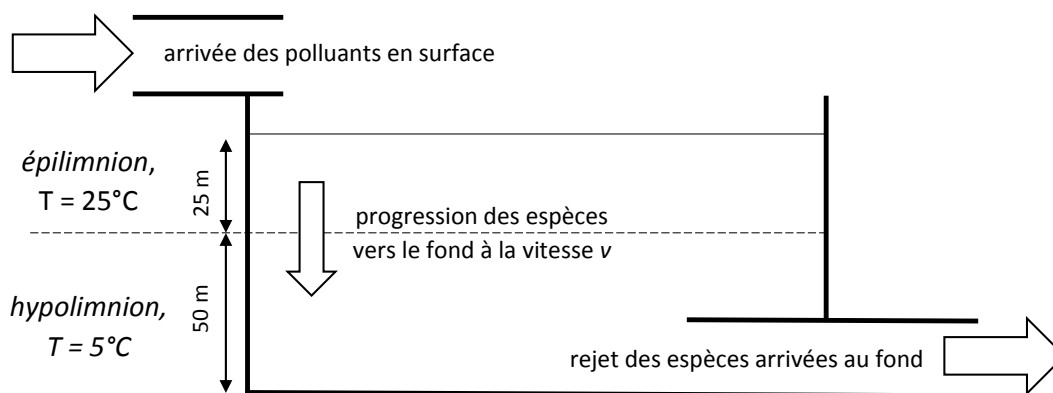


FIGURE 19 – Schéma de l'étang, modèle à deux couches.

Pour ce faire, le schéma de principe exposé en figure 19 est utilisé. On considérera ainsi que les polluants arrivent à la surface de l'étang et progressent lentement vers le fond d'icelui, à une vitesse $v = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce n'est qu'arrivées au fond de l'étang que les espèces chimiques en présence sont finalement libérées dans la nappe phréatique.

Comme représenté en figure 19, le profil de température au sein de l'étang peut être modélisé en première approximation sous la forme de deux couches d'eau de températures différentes. Dans la première, l'épilimnion, profonde ici de 25 mètres, on considérera la température homogène et égale à 25°C. Dans l'hypolimnion, seconde couche s'étalant jusqu'au fond, sur 50 mètres, la température sera également modélisée comme étant homogène, mais cette fois-ci égale à 5°C.

Le pH, quant à lui, est considéré comme uniforme dans tout l'étang et déterminé par la formation naturelle d'une solution tampon par dissolution du dioxyde de carbone de l'air dans l'eau. En effet, on observe alors la formation d'acide carbonique, H_2CO_3 , qui, en proportions équimolaires avec sa base conjuguée, l'ion hydrogénocarbonate HCO_3^- , constitue une solution tampon dont on peut caractériser les propriétés.

Afin de quantifier le pouvoir tampon d'une telle solution, l'expérience suivante a été réalisée. 300,0 mL d'eau distillée où l'on a dissous 130 mg de carbonate de sodium, Na_2CO_3 , ont été dosés par une solution d'acide sulfurique, H_2SO_4 , à $0,030 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. La figure 20 présente l'évolution du pH en fonction du volume d'acide versé. Dans les conditions du dosage, on considérera que l'acide sulfurique se comporte comme un diacide fort.

Le pouvoir tampon des couples en présence pourra être calculé comme étant le nombre de millimoles d'ions hydrogène nécessaires pour changer d'une unité le pH d'un litre de la solution tampon.

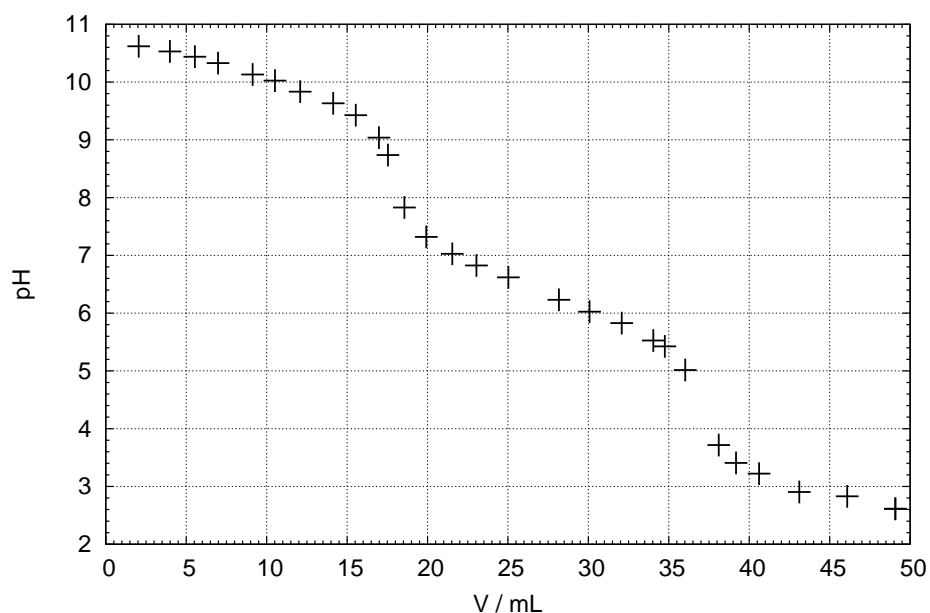


FIGURE 20 – Titration de 300,0 mL d'une solution de carbonate de sodium, Na_2CO_3 (0,130 g dans 300,0 mL), par une solution d'acide sulfurique, H_2SO_4 , à $0,030 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: évolution du pH en fonction du volume d'acide versé.

13. À l'aide de la figure 20, proposer un diagramme de prédominance de l'acide carbonique et de ses bases conjuguées en précisant les valeurs des limites et la façon dont vous les avez déterminées. Quel est le pH de cette solution lorsqu'elle est composée d'un mélange équimolaire $\text{CO}_2(\text{aq})/\text{HCO}_3^-$? Calculer le pouvoir tampon de cette solution selon l'approche proposée plus haut, en détaillant votre démarche.

14. On considérera qu'une espèce est dégradée avant d'atteindre l'hypolimnion si elle reste au sein de l'épilimnion durant une durée supérieure ou égale à cinq fois son temps de demi-vie. En supposant que l'ADNP suit une cinétique de dégradation d'ordre 1 durant la durée correspondant au temps passé dans l'épilimnion, à quel taux d'ADNP dégradé cette condition correspond-elle ?

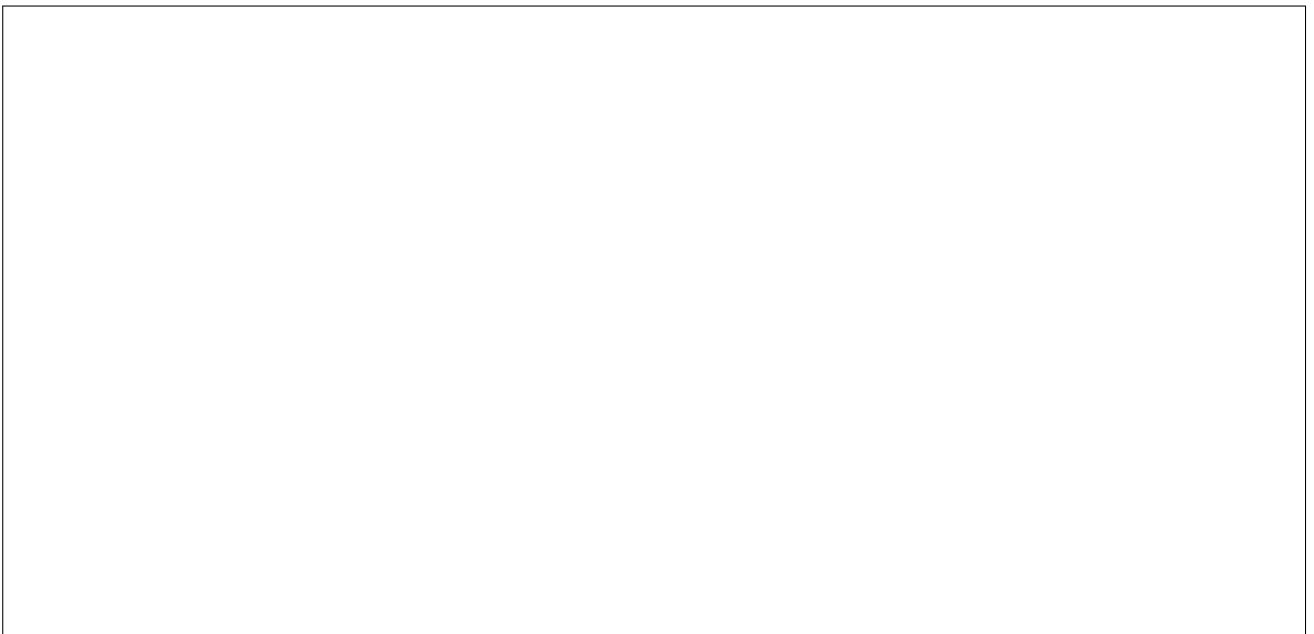


Dans les conditions de ce modèle, on pourra utiliser l'expression suivante pour calculer la valeur de la constante de vitesse k de dégradation de l'ADNP à une température T donnée :

$$k(T) = Ae^{-\frac{B}{T}} \quad (3)$$

où $A = 10 \text{ s}^{-1}$, $B = 3600 \text{ K}$ et T est la température du milieu réactionnel exprimée en KELVIN.

15. En calculant le temps passé par le polluant dans chacune des couches d'eau avant d'être rejeté dans la nappe phréatique, déterminer le taux d'ADNP encore présent au fond de l'étang.



En réalité, le modèle présenté ici pour rendre compte de l'évolution de la température en fonction de la profondeur est très grossier et il est souvent complété par une troisième couche d'eau, la thermocline, située entre l'épilimnion et l'hypolimnion et où la température varie linéairement de celle de la couche supérieure à celle de la couche inférieure, sur une courte distance.

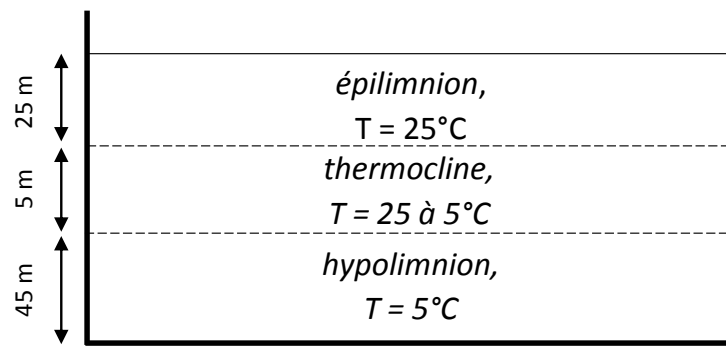


FIGURE 21 – Schéma de l'étang, modèle à trois couches.

16. En considérant que les cinq mètres supérieurs de l'hypolimnion envisagé sont en fait occupés par la thermocline (voir figure 21), les autres paramètres étant maintenus constants par ailleurs, le taux d'ADNP rejeté dans la nappe phréatique sera-t-il, selon vous, supérieur, inférieur ou égal à celui calculé à la question précédente ? Justifier.

Données : $T(\text{K}) = \theta(^{\circ}\text{C}) + 273,15$

3 La colchicine : transport et vectorisation dans l'organisme

La colchicine est un poison puissant. Cet alcaloïde (molécule organique à base azotée) était à l'origine extrait de plantes de la famille des colchiques (principalement *Colchicum autumnale*). La toxicité de la colchicine vient de sa capacité à se lier à la tubuline, protéine dont la polymérisation dans le cytoplasme participe au maintien de la morphologie cellulaire ainsi qu'à l'organisation des chromosomes lors de la division cellulaire. Malgré sa forte toxicité cette molécule est couramment utilisée en médecine vétérinaire et humaine.

Ce sujet est composé de trois parties totalement indépendantes.

3.1 Structure de la colchicine

La colchicine est une molécule tricyclique de formule $C_{22}H_{25}NO_6$. Sa structure est présentée figure 22. Si les cycles tropolone et triméthoxybenzène sont essentiels à son activité, le cycle les reliant tolère certaines modifications.

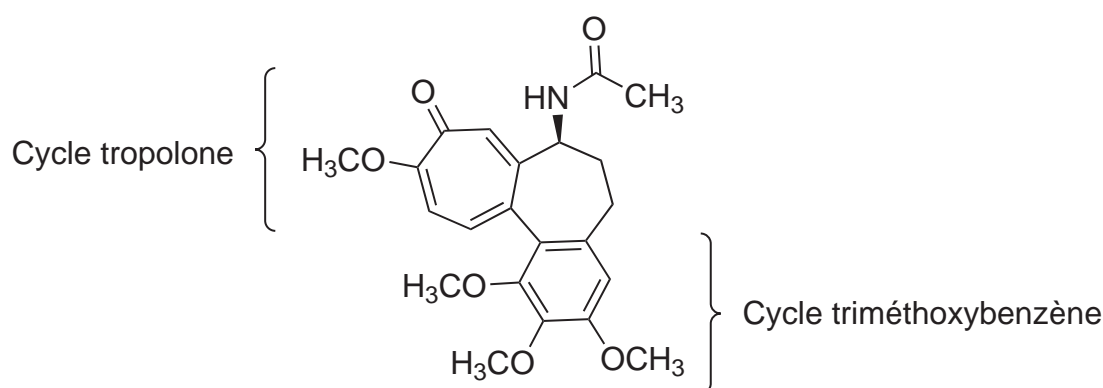


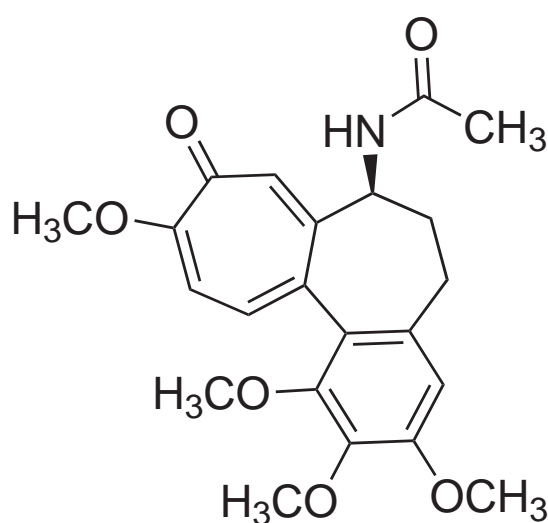
FIGURE 22 – Structure de la colchicine.

Un spectre de RMN 1H de la colchicine a été enregistré à 360 MHz dans du chloroforme deutéré (*J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 88-93). La référence est le tétraméthylsilane (0 ppm). Les grandeurs extraites sont reportées dans le tableau 4.

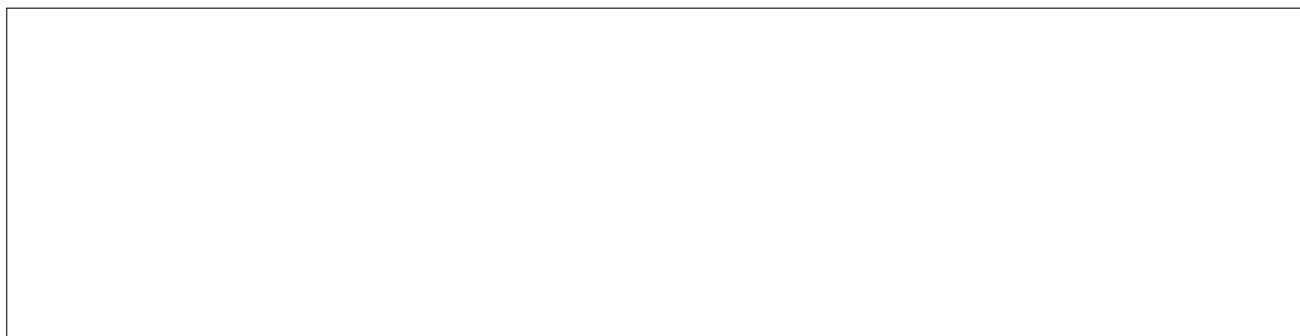
TABLEAU 4 – Spectre de RMN ^1H de la colchicine en solution dans CDCl_3 et à la fréquence de 360 MHz.

Index	δ/ppm	multiplicité	intégration	constantes de couplage J/Hz
1	1,96	singulet	3	
2	2,01	multiplet	1	
3	2,38	multiplet	1	
4	2,54	multiplet	2	
5	3,67	singulet	3	
6	3,92	singulet	3	
7	3,95	singulet	3	
8	4,03	singulet	3	
9	4,66	doulet de doublets de doublet	1	11,8 ; 6,0 ; 5,8
10	6,55	singulet	1	
11	6,93	doulet	1	11,0
12	7,39	doulet	1	11,0
13	7,69	singulet	1	
14	8,64	doulet	1	6,0

1. Analyser le spectre de RMN en attribuant (*dans la mesure du possible*) chaque signal au(x) atome(s) d'hydrogène qui en est (sont) responsable(s). Pour cela, faire figurer tous les atomes d'hydrogène sur la formule de la colchicine. Attribuer ensuite chaque signal en reportant les indices 1 à 14 à côté de chaque atome d'hydrogène ainsi mis en évidence (voir les indices dans le Tableau 4). Il est rappelé que la présence d'un centre stéréogène peut rendre non-équivalents des noyaux qui le seraient en son absence.



2. Le spectre infra-rouge de la colchicine présente de nombreuses bandes d'absorption (*J. Comput. Chem. Jpn.*, **2009**, 8, 59-72). Attribuer (dans la mesure du possible) les bandes localisées aux nombres d'onde suivants : 1610 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} et la bande large comprise entre $3000\text{ et }3500\text{ cm}^{-1}$.



3.2 Des liposomes comme vecteurs de pro-drogues de la colchicine

Aucune connaissance particulière concernant la structure ou l'utilisation des liposomes n'est requise pour traiter ce sujet.

Le développement des tumeurs solides s'accompagne de la formation rapide de nouveaux vaisseaux sanguins (phénomène appelé angiogenèse) qui apportent les nutriments et le dioxygène nécessaire à leur croissance. L'organisation cellulaire de ces nouveaux vaisseaux sanguins est souvent imparfaite ce qui en fait un des talons d'Achille de la progression tumorale. En se liant à la tubuline, la colchicine induit un arrondissement des cellules de la fragile paroi des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs, et entraîne une perte de leur intégrité. Par ailleurs, elle inhibe la division cellulaire, réduisant ainsi l'angiogenèse.

Cependant, la colchicine a un « index thérapeutique » restreint, c'est à dire que la différence entre la dose de colchicine nécessaire pour observer son activité anti-tumorale et la dose à laquelle elle est toxique pour le patient est très faible. Afin d'augmenter l'index thérapeutique de la colchicine, l'équipe de Gert STORM a proposé d'encapsuler la colchicine sous forme de « pro-drogue » dans des liposomes (voir la définition de « liposome » et « pro-drogue » dans le paragraphe suivant) (*Eur. J. Pharm. Sci.*, **2012**, 45, 429-435).

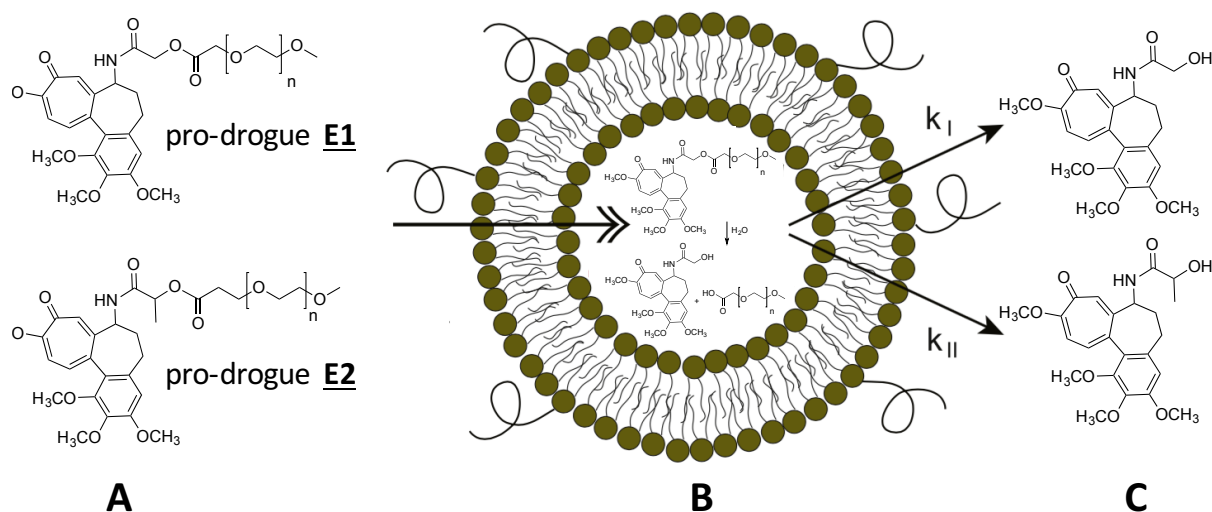


FIGURE 23 – Vue schématique de la stratégie d'encapsulation des pro-drogues de la colchicine. (A) Ces deux pro-drogues de la colchicine sont encapsulées dans des liposomes. (B) Vue schématique d'un liposome. Au sein du liposome, la pro-drogue est spontanément hydrolysée, libérant des analogues de la colchicine qui sont susceptibles de diffuser à travers la membrane du liposome. (C) Les deux dérivés de la colchicine libérés par hydrolyse des pro-drogues diffusent à travers la membrane du liposome.

L'utilisation des liposomes (figure 23), sphères de phospholipides dont l'intérieur peut contenir des molécules telles que la colchicine ou un de ses dérivés, permet d'améliorer le ciblage de la colchicine vers les vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs. Toutefois, la colchicine diffuse trop rapidement à travers les phospholipides des liposomes en raison de sa lipophilie. Il a donc été nécessaire d'encapsuler une pro-drogue de la colchicine et non la colchicine elle-même dans les liposomes. Une pro-drogue est une molécule qui est administrée au patient sous une forme pharmacologiquement inactive (ou faiblement active). Une fois dans l'organisme du patient, cette pro-drogue est convertie en un composé pharmacologiquement actif.

3.2.1 Synthèse de deux pro-drogues de la colchicine

Afin de diminuer la cinétique de diffusion de la colchicine à travers la membrane des liposomes, l'équipe de Gert STORM a proposé de lui attacher de façon covalente une chaîne poly(éthylène glycol) (PEG). La chaîne PEG diminue la lipophilie de la colchicine, évitant sa trop rapide diffusion hors du liposome.

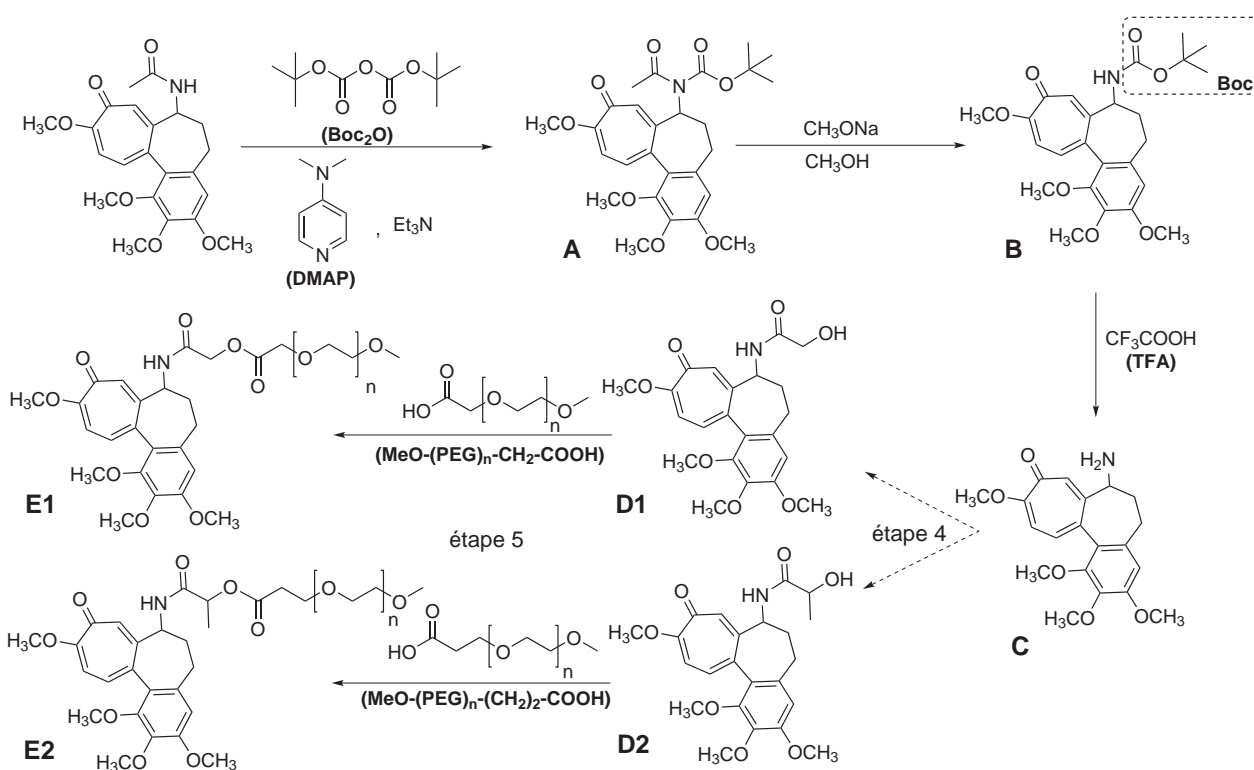


FIGURE 24 – Schéma de synthèse des pro-drogues **E1** et **E2** de la colchicine.

Dans la partie qui suit, nous proposons de décrire la synthèse de deux pro-drogues de la colchicine (figure 24).

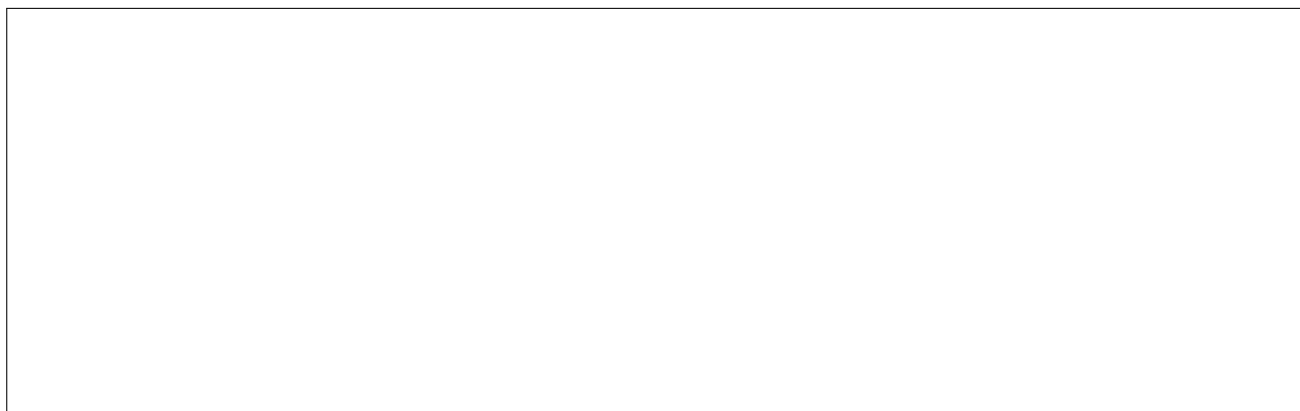
Dans une première étape, la colchicine (12,3 mmol) est traitée par le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O ; 79,7 mmol) en présence de diméthylaminopyridine (DMAP ; 12,5 mmol) et de triéthylamine (Et_3N ; 21,5 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 1,5 h.

- Écrire l'équation de réaction sachant que la DMAP a un rôle de catalyseur et que la réaction libère du dioxyde de carbone et du *tert*-butanol (2-méthylpropan-2-ol). Quel est le rôle de la triéthylamine ?

4. Écrire le mécanisme de la transformation conduisant au produit **B**. Pourquoi les auteurs n'ont-ils pas utilisé de la soude pour réaliser cette transformation ?

5. Proposez une synthèse du composé $\text{MeO}-(\text{PEG})_n-\text{CH}_2-\text{COOH}$ pour $n = 1$ (figure 24) à partir de tout composé minéral et de tout composé organique contenant deux atomes de carbone au maximum.

6. Comment s'appellent les nouvelles fonctions formées lors des étapes 4 et 5 ? Ces fonctions sont-elles « facilement » hydrolysables ? (Autrement dit, sont-elles susceptibles d'être hydrolysées en quelques heures dans de l'eau à température ambiante ?) Conclure quant à l'intérêt de cette synthèse par rapport à l'objectif annoncé dans l'introduction de la partie 3.2.



7. Proposez brièvement des conditions pour passer de **D1** à **E1** ou de **D2** à **E2**. Comment augmenter le rendement de cette synthèse ?



3.2.2 Libération contrôlée des dérivés **D1** et **D2** de la colchicine

Nous proposons maintenant d'étudier la cinétique d'hydrolyse des deux pro-drogues **E1** et **E2** de la colchicine. Nous analyserons aussi son influence sur la libération à travers la membrane des liposomes des dérivés **D1** et **D2** de la colchicine.

L'hydrolyse en solution aqueuse des pro-drogues **E1** et **E2** libère les dérivés de la colchicine **D1** et **D2**, respectivement. La cinétique de l'hydrolyse a été étudiée dans des solutions tamponnées à pH 7,4 ou 9,0 et à 4 ou 37 °C (figure 25).

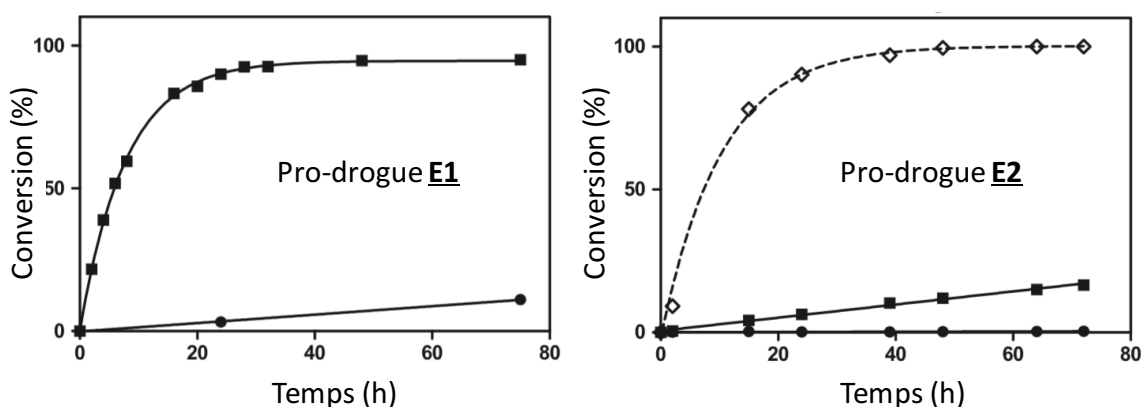
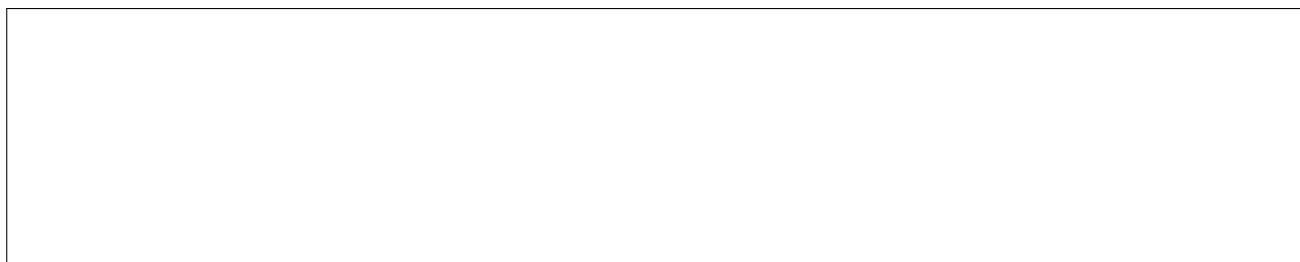


FIGURE 25 – Hydrolyse des pro-drogues **E1** et **E2** en solution aqueuse tamponnée. Ronds pleins : hydrolyse à 4 °C dans un tampon phosphate, pH 7,4. Carrés pleins : hydrolyse à 37 °C dans un tampon phosphate, pH 7,4. Diamants vides (uniquement pour la pro-drogue **E2**) : hydrolyse à 37 °C dans un tampon carbonate, pH 9,0.

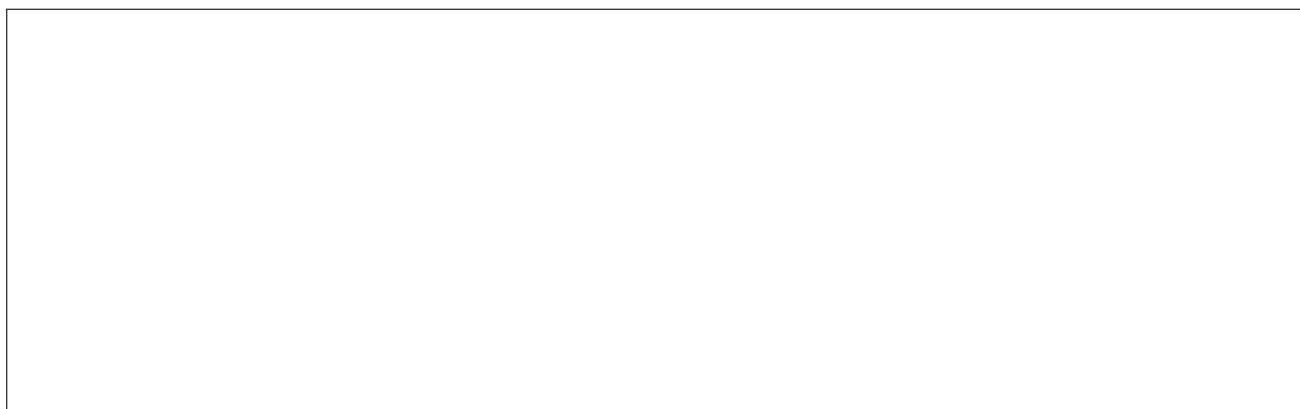
8. Interprétez l'influence de la température sur la cinétique d'hydrolyse des pro-drogues **E1** et **E2**.



9. Interprétez l'influence du pH sur la cinétique d'hydrolyse de la pro-drogue **E2**.



10. Commenter la différence de cinétique d'hydrolyse entre les pro-drogues **E2** et **E1**.



Par un procédé qui ne sera pas étudié ici, il est possible d'encapsuler la colchicine ainsi que les pro-drogues **E1** ou **E2** dans des liposomes (figure 23).

La cinétique de libération de la colchicine et des dérivés **D1** et **D2** a été étudiée (figure 26).

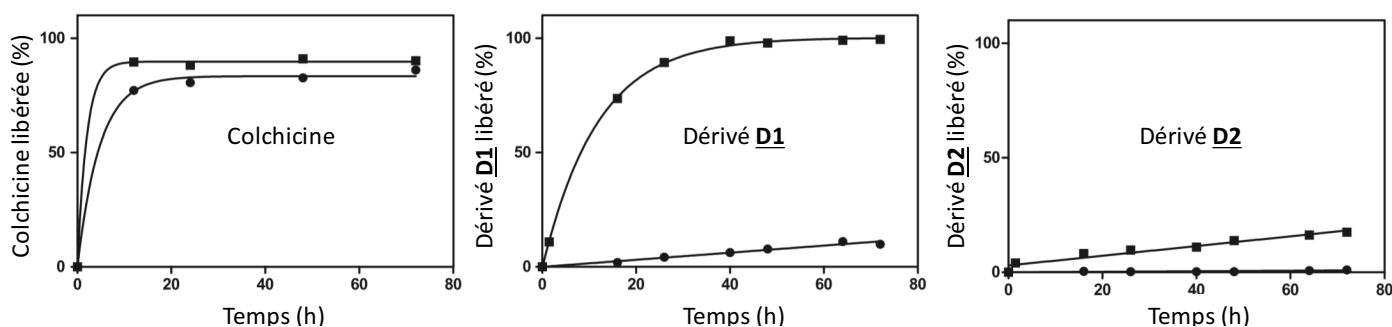


FIGURE 26 – Libération de la colchicine et des dérivés **D1** et **D2** en solution aqueuse tamponnée (pH 7,4). Ronds pleins : libération à 4 °C. Carrés pleins : libération à 37 °C.

11. D'après la figure 26, la modification la colchicine par une chaîne PEG permet-elle de ralentir efficacement sa diffusion à travers la membrane des liposomes ?



12. La libération de la colchicine peut être décrite par deux étapes successives : hydrolyse des pro-drogues **E1** et **E2** en dérivés **D1** et **D2** puis diffusion à travers la membrane des liposomes. D'après les figures 25 et 26, peut-on dire qu'une étape est cinétiquement déterminante ? Si oui, laquelle ?



3.3 Étude de l'interaction entre la colchicine et l'albumine, un transporteur sanguin potentiel de la colchicine

Aucune connaissance préalable sur la fluorescence n'est requise pour traiter cette partie.

L'albumine de sérum est la protéine la plus abondante dans le plasma. Elle participe au maintien de la pression osmotique et joue un rôle important dans la régulation du pH sanguin. De nombreuses petites molécules, telles que la colchicine, ont une affinité élevée pour l'albumine. Cette protéine peut alors jouer le rôle de transporteur sanguin. En conséquence, il est fondamental d'étudier leur interaction pour rationaliser la disponibilité de la colchicine dans l'organisme.

Cette partie est fondée sur des travaux publiés par Hu et ses collaborateurs en 2005 (*J. Mol. Struct.*, **2005**, 750, 174-178). Ces auteurs ont utilisé l'albumine de sérum bovin (BSA de l'anglais « Bovin Serum Albumin ») et non celle de sérum humain étant donné son prix et sa disponibilité. L'albumine de sérum humain et celle de sérum bovin sont suffisamment proches pour permettre une transposition de ces résultats à l'albumine de sérum humain.

L'objet de cette partie est de déterminer l'affinité de la BSA pour la colchicine.

La BSA étant fluorescente, les auteurs ont utilisé la modulation de la fluorescence de la BSA en présence de colchicine pour déterminer cette affinité. La fluorescence d'une molécule correspond à l'émission de photons suite à l'absorption de photons de plus haute énergie par cette même molécule. Excitation et émission de fluorescence ont donc lieu à des longueurs d'onde différentes.

L'interaction entre la colchicine et la BSA entraîne une inhibition de la fluorescence de la BSA ($\lambda_{\text{excitation}} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 340 \text{ nm}$; figure 27). L'inhibition de fluorescence correspond à tout phénomène physico-chimique qui induit une diminution de la fluorescence d'une molécule.

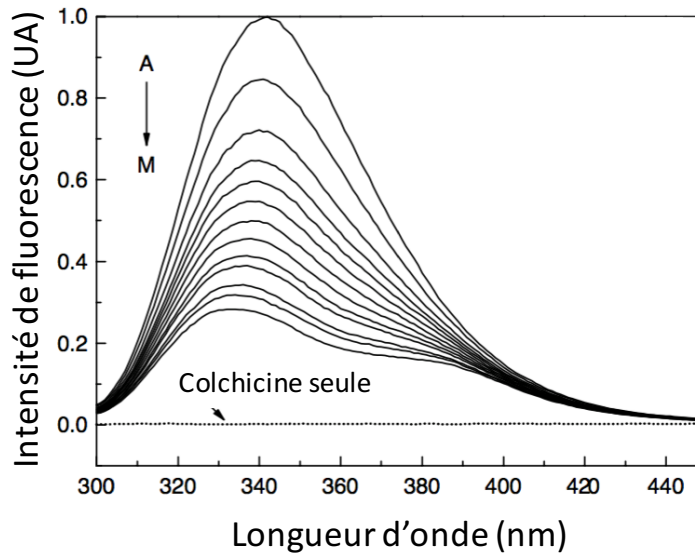


FIGURE 27 – Effet de la colchicine sur l'intensité de fluorescence de la BSA ($\lambda_{excitation} = 295 \text{ nm}$; $C_{BSA} = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Les courbes A à M (trait plein) correspondent à des concentrations croissantes de colchicine. De A à M : $10^5 \cdot C_{colchicine} = 0; 0,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 0,8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 1,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 1,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 2,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 2,8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 3,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 3,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 4,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 4,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; 4,8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. La courbe en pointillé correspond à la fluorescence de la colchicine seule ($C_{colchicine} = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Sous irradiation ultraviolette (295 nm), la BSA peut être excitée (notée BSA* ; figure 28).

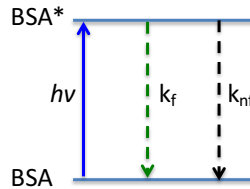


FIGURE 28 – Paramètres caractérisant la fluorescence de la BSA. « BSA » correspond à la molécule de BSA dans son état fondamental. La BSA dans son premier état d'excitation est notée « BSA* ».

Nous pouvons alors paramétrer le système comme présenté sur la figure 28 : après irradiation, la BSA* peut se désexciter en émettant un photon. Cette désexcitation suit une loi du premier ordre de constante de vitesse k_f . De façon concurrente, des processus intramoléculaires non-radiatifs peuvent conduire à la désexcitation de la BSA*. Cette désexcitation non-radiative suit aussi une loi de vitesse du premier ordre de constante de vitesse k_{nf} .

13. Le rendement quantique de fluorescence (noté Φ_0) est ainsi défini :

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_{nf}}$$

Commenter l'expression du rendement quantique de fluorescence.



En présence d'un inhibiteur de fluorescence comme la colchicine (notée C), des interactions transitoires avec BSA* peuvent induire une inhibition de la fluorescence. Cette inhibition est alors qualifiée de « dynamique ». Il s'agit d'un acte élémentaire bimoléculaire qui suit une loi de vitesse du second ordre de constante k_q (figure 29).

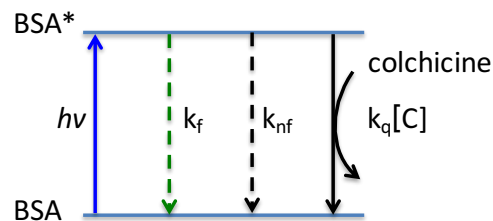


FIGURE 29 – Paramètres caractérisant l'inhibition dynamique de la fluorescence de la BSA par la colchicine.

14. Écrire l'équation différentielle décrivant l'évolution de la concentration de l'état excité BSA* suite à une impulsion de lumière à 295 nm, en fonction des constantes de vitesse k_f , k_{nf} , k_q et de la concentration en colchicine. En déduire l'évolution de concentration en BSA* au cours du temps. On notera $[BSA^*]_0$ la concentration en BSA* après l'impulsion lumineuse.



15. L'intensité de l'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration en BSA* :

$$i(t) = k_f [BSA^*]$$

En déduire que, suite à une impulsion lumineuse, l'intensité de fluorescence suit une décroissance exponentielle. Quel est le temps caractéristique du déclin de fluorescence en fonction des constantes k_f , k_{nf} , k_q et de la concentration en colchicine ?

16. Par analogie avec l'expression du rendement quantique de fluorescence Φ_0 , exprimer $\Phi([C])$, le rendement quantique de fluorescence en présence de la colchicine, inhibiteur de fluorescence de la BSA.

17. Établir alors que :

$$\frac{\Phi_0}{\Phi([C])} = 1 + K_{SV} [C]$$

où K_{SV} est la constante d'inhibition de fluorescence de STERN-VOLMER. Elle est caractéristique du système fluorophore ; inhibiteur de fluorescence considéré. On donnera l'expression de K_{SV} en fonction de k_f , k_{nf} et k_q .

18. En régime stationnaire, $\Phi_0/\Phi([C]) = I_0/I([C])$ où I_0 et $I([C])$ sont les intensités de fluorescence d'un même échantillon respectivement en absence et en présence de colchicine. Déduire de la figure 30 la valeur de K_{SV} du système BSA ; colchicine. On ne discutera pas la perte de linéarité de l'inhibition de fluorescence à forte concentration en colchicine.

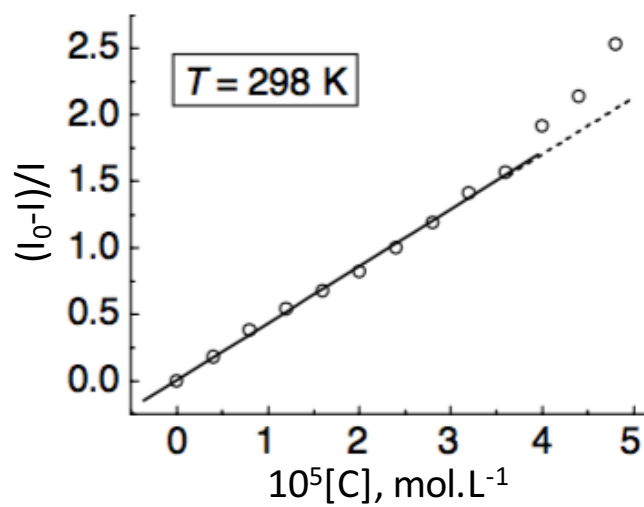


FIGURE 30 – Graphe de STERN et VOLMER de la fluorescence de la BSA en présence d'une quantité croissante de colchicine.

19. Le graphe de STERN et VOLMER de la fluorescence de la BSA en présence de colchicine a été tracé pour plusieurs températures (figure 31). Commenter la variation observée expérimentalement.

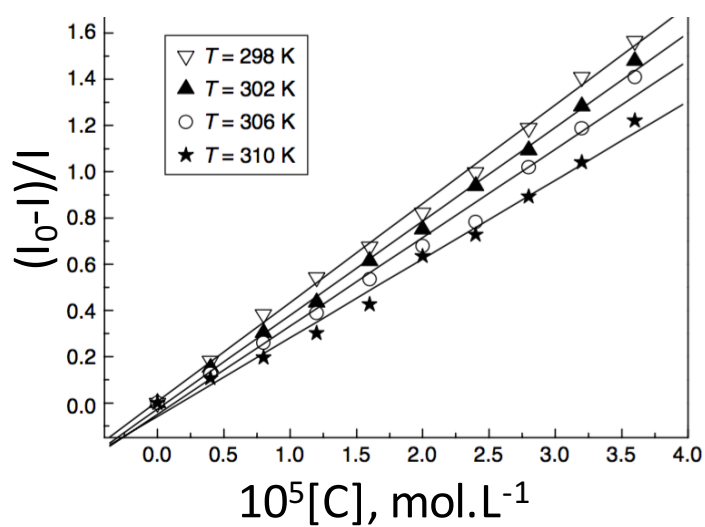
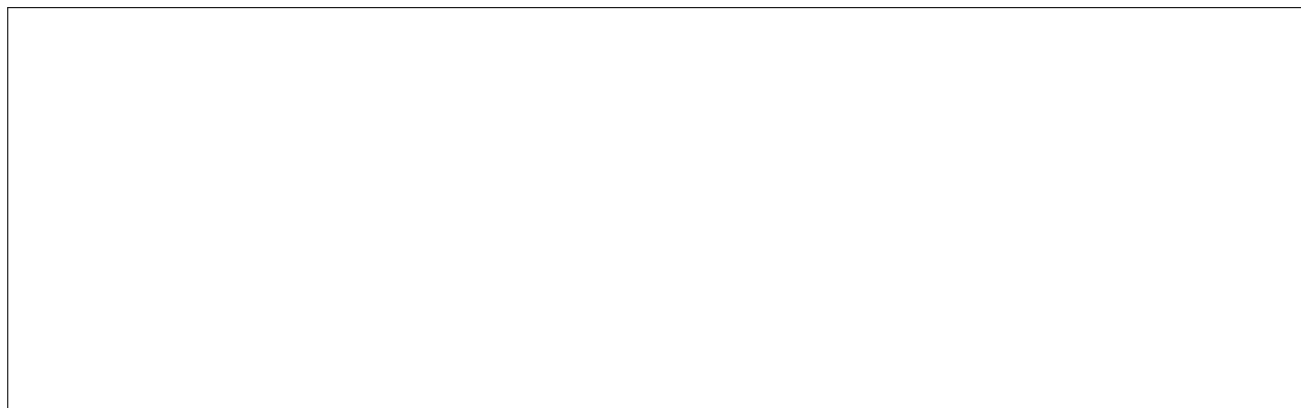


FIGURE 31 – Graphe de STERN et VOLMER de la fluorescence de la BSA en présence d'une quantité croissante de colchicine obtenu à plusieurs températures.