

SESSION 2006

Filière : 2^{ème} concours

CHIMIE

(Epreuve commune aux ENS Ulm et Lyon)

Durée : 3 heures

L'usage des calculatrices électroniques de poche à alimentation autonome, sans imprimante et sans document d'accompagnement est autorisé. Cependant, une seule calculatrice à la fois est admise sur la table ou le poste de travail. Aucun échange n'est permis entre les candidats.

Autour de la cystéine

La cystéine est l'un des vingt acides aminés naturels, dont la formule est donnée Figure 1. Elle est utilisée par le corps humain pour la synthèse de la glutathione qui est un antioxydant puissant protégeant notamment l'organisme contre les radicaux libres. On s'intéresse à ses propriétés et à sa caractérisation.

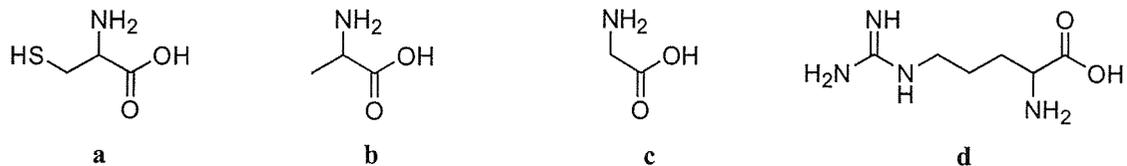


Figure 1. Structures des acides aminés étudiés dans ce sujet : a) cystéine, b) alanine, c) glycine et d) arginine.

Les différentes parties sont très largement indépendantes et peuvent être traitées séparément.

1 Stéréochimie de la Cystéine

1.1 On étudie dans cette partie la cystéine sous la forme représentée figure 1.

1.1.1 Identifier le ou les carbone(s) asymétrique(s). Définir la notion de stéréoisomérisation. Quelle relation de stéréoisomérisation apparaît dans le cas de la cystéine ? Combien de stéréoisomères comporte cette molécule ?

1.1.2 Le stéréoisomère naturel est la (*L*)-cystéine, le dessiner en représentation de Fischer. La (*L*)-cystéine a-t-elle le caractère lévogyre ? Définir ce terme avec soin.

1.1.3 Dessiner le même stéréoisomère en représentation de Cram. Déterminer la configuration absolue du carbone asymétrique, en la justifiant.

1.2 On étudie maintenant un autre acide aminé naturel, l'alanine, représentée figure 1.

1.2.1 Dessiner la (*L*)-alanine en représentation de Fischer, et déterminer sa configuration absolue.

1.2.2 Conclure sur la correspondance entre les nomenclatures (*D,L*) et (*R,S*).

2 Quelle est la Forme Globalement Neutre de la Cystéine la plus Stable en Solution ?

2.1 La cystéine est habituellement représentée par une structure neutre, comme figure 1. Cependant, une autre forme, appelée zwitterionique et elle aussi globalement neutre, est également possible, où l'acide carboxylique est déprotoné et l'amine protonée (Figure 2). On cherche à déterminer laquelle de ces deux formes est la plus stable en solution aqueuse. (Les stabilités en solution des différentes formes de la cystéine en fonction du pH seront abordées à la partie 3). Comme le

groupe HS-CH₂- reste inchangé entre les formes neutre et zwitterionique de la cystéine, on considère pour simplifier les formes de la glycine (figure 1).



Figure 2. Formes neutre et zwitterionique de la cystéine.

- 2.1.1 Ecrire les formules semi-développées des formes neutre et zwitterionique de la glycine.
 2.1.2 Justifier qualitativement quelle forme est la plus stable dans le vide.
 2.2 La figure 3 propose un cycle thermodynamique permettant de déterminer la différence d'enthalpie libre entre les deux formes de la glycine. Les données correspondantes sont fournies dans la table 1.

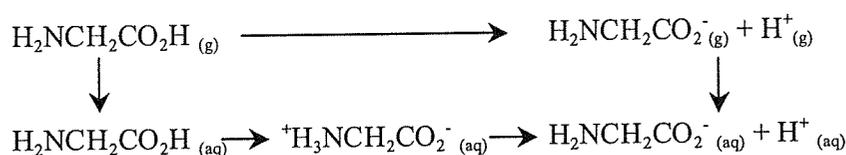


Figure 3. Cycle thermodynamique.

	Réaction	$\Delta_r H$	$\Delta_r S$
1	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-_{(g)} + \text{H}^+_{(g)}$	1435 kJ/mol	112 J/mol/K
2	$\text{HCO}_2\text{H}_{(g)} \rightarrow \text{HCO}_2^-_{(g)} + \text{H}^+_{(g)}$	1432 kJ/mol	108 J/mol/K
3	$\text{HCO}_2\text{H}_{(aq)} \rightarrow \text{HCO}_2^-_{(g)} + \text{H}^+_{(aq)}$	40 J/mol	-72 J/mol/K
4	${}^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CO}_2^-_{(aq)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-_{(aq)} + \text{H}^+_{(aq)}$	44 kJ/mol	-39 J/mol/K

Table 1. Données thermodynamiques.

- 2.2.1 Comparer et justifier les signes des enthalpies et des entropies de réaction de la dissociation $\text{HCO}_2\text{H} \rightarrow \text{HCO}_2^- + \text{H}^+$ en phase gazeuse et en solution, données dans la table 1.
 2.2.2 Calculer la différence d'enthalpie entre les formes neutre et zwitterionique de la glycine en solution aqueuse, à partir du cycle de la figure 3 et des données de la table 1. On supposera que les enthalpies d'hydratation des molécules suivantes peuvent être approximées comme la somme des enthalpies d'hydratation des fragments : $\Delta_r H [\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^-_{(aq)}] \approx \Delta_r H [\text{H}_2\text{NCH}_3_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_3_{(aq)}] + \Delta_r H [\text{HCO}_2^-_{(g)} \rightarrow \text{HCO}_2^-_{(aq)}]$ et $\Delta_r H [\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}_{(aq)}] \approx \Delta_r H [\text{HCO}_2\text{H}_{(g)} \rightarrow \text{HCO}_2\text{H}_{(aq)}] + \Delta_r H [\text{H}_2\text{NCH}_3_{(g)} \rightarrow \text{H}_2\text{NCH}_3_{(aq)}]$
 2.2.3 Calculer la différence d'enthalpie libre à 25°C pour la même transformation. On utilisera la même approximation que précédemment pour les entropies de réaction. Indiquer quelle forme de la glycine est la plus stable en solution aqueuse. Conclure quant à la forme globalement neutre de la cystéine la plus stable en solution aqueuse.
 2.2.4 Justifier qualitativement la réponse précédente.

3 Étude des Acidités de la Cystéine

La cystéine est un polyacide et le but de cette partie est de déterminer sous quelle forme se trouve la cystéine dans des conditions de pH physiologique (pH = 7,4).

3.1 La cystéine comporte trois fonctions acido-basiques susceptibles de libérer ou de capter un proton en solution aqueuse.

3.1.1 Les identifier et les nommer. Ecrire les équilibres acido-basiques correspondants.

3.1.2 Par analogie avec les molécules dont les pK_A sont indiqués dans la Table 2, estimer les pK_A associés à chaque fonction en indiquant un intervalle de valeurs.

Molécule	pK_1	pK_2
Ester éthylique de cystéine	6,7	9,2
S-éthyl-cystéine	1,9	8,7
N,N,N-triméthyl-cystéine	1,9	8,6
N-acétyl-cystéine	1,9	9,5
Méthanethiol CH_3SH/CH_3S^-	10,3	—
Méthylamine $CH_3NH_3^+/CH_3NH_2$	10,6	—

Table 2. pK_A de composés voisins de la cystéine.

3.1.3 Peut-on déterminer les pK_A des trois fonctions de la cystéine par dosage acido-basique ? Justifier.

3.2 Lors du titrage acido-basique d'une solution aqueuse de cystéine, on mesure trois sauts de pH correspondant à trois pK_A apparents : $pK_{A1} = 1,71$, $pK_{A2} = 8,33$, $pK_{A3} = 10,78$.

3.2.1 Etablir un diagramme de prédominance et montrer que dans la gamme de pH où la cystéine est sous forme de monoanion, deux espèces sont simultanément prédominantes.

3.3 Dans la suite, les différentes espèces présentes dans chaque région du diagramme seront notées collectivement AH_3^+ , AH_2 , AH^- , A^{2-} . Les deux formes du monoanion seront notées $HCys^-$ et $CysH^-$ où $HCys^-$ désigne la forme où la fonction $-SH$ est déprotonée en $-S^-$. On cherche à déterminer par spectrophotométrie les constantes d'équilibre entre AH_2 et chacune des deux formes $HCys^-$ et $CysH^-$. A la longueur d'onde $\lambda_0 = 240$ nm, seules les formes de la cystéine avec un groupe $-S^-$ non protoné absorbent de façon significative. On mesure l'absorbance A d'une solution de cystéine à la longueur d'onde λ_0 et pour différentes valeurs du pH.

3.3.1 Rappeler la loi de Beer-Lambert en définissant les différentes grandeurs utilisées ainsi que leurs unités usuelles. Quelles sont les limites de validité de cette loi ?

3.3.2 Donner en quelques lignes un protocole permettant de déterminer expérimentalement le coefficient d'absorption molaire d'une solution.

3.4 On définit le coefficient d'absorption molaire effectif ϵ_{eff} d'une solution aqueuse de cystéine de concentration totale T comme $\epsilon_{eff} = A / (T l)$ où A est l'absorbance et l est la longueur de solution parcourue par la lumière.

- 3.4.1 Ecrire ϵ_{eff} en fonction de la concentration totale T , des concentrations des espèces absorbantes et de leurs coefficients d'absorption molaire respectifs, que l'on notera par exemple ϵ_{HCys} . On suppose que l'eau n'absorbe pas à la longueur d'onde λ_0 .
- 3.4.2 On note ρ la fraction de cystéine sous forme A^{2-} . On trace le rapport $\epsilon_{\text{eff}}/\rho$ en fonction de $[\text{H}_3\text{O}^+]/K_{\text{A}3}$. Montrer que l'on obtient une droite dont on précisera la pente α et l'ordonnée à l'origine β , que l'on exprimera toutes deux à partir des constantes d'acidité $K_{\text{A}1}$, $K_{\text{A}2}$, $K_{\text{A}3}$ et de la constante d'équilibre notée K de la réaction $\text{CysH}^- \rightleftharpoons \text{HCys}^-$.
- 3.4.3 Donner l'expression de ρ en fonction de $[\text{H}_3\text{O}^+]$ et des constantes d'acidité $K_{\text{A}1}$, $K_{\text{A}2}$, $K_{\text{A}3}$.
- 3.5 Les mesures obtenues expérimentalement pour différentes valeurs du pH sont données dans la Table 3.

pH	10,0	10,5	11,0	11,5
ϵ_{eff} [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	2959	3429	4057	4296

Table 3.

- 3.5.1 Calculer $\epsilon_{\text{eff}}/\rho$ et $[\text{H}_3\text{O}^+]/K_{\text{A}3}$ pour chaque valeur de pH dans la table 3.
- 3.5.2 Déterminer α et β .
- 3.6 Par analogie avec un composé voisin, on peut déterminer que $\epsilon_{\text{A}2-} \approx \epsilon_{\text{HCys}}$ à la longueur d'onde λ_0 .
- 3.6.1 Déterminer alors la constante d'équilibre K .
- 3.6.2 Entre les deux formes HCys^- et CysH^- , laquelle est formée majoritairement à partir de AH_2 ?
- 3.6.3 Au pH physiologique de 7,4, déterminer les proportions de chaque forme de la cystéine.
- 3.6.4 À la lumière de cette étude, attribuer les valeurs des $\text{p}K_{\text{A}}$ associés aux couples $\text{AH}_2/\text{HCys}^-$ et $\text{AH}_2/\text{CysH}^-$.
- 3.6.5 Une telle détermination des acidités de chaque fonction d'un polyacide à partir des acidités macroscopiques mesurées est-elle nécessaire pour l'acide phosphorique H_3PO_4 ? Justifier.

4 Spectroscopie RMN de Quelques Acides Aminés

- 4.1 On s'intéresse dans cette partie à la caractérisation d'un acide aminé par RMN du proton. On étudie l'alanine (cf fig. 1), dont le spectre est présenté figure 4. La table en annexe donne quelques valeurs de déplacements chimiques.
- 4.1.1 Attribuer les déplacements chimiques. Justifier.
- 4.1.2 Expliquer les multiplicités.
- 4.1.3 Expliquer l'allure du pic situé à environ 4,9 ppm. Que se passe-t-il si on enregistre le spectre à plus haute fréquence ?
- 4.2 On étudie maintenant le spectre RMN de la cystéine, présenté figure 5.
- 4.2.1 Rappeler les définitions respectives de protons chimiquement équivalents et magnétiquement équivalents.

- 4.2.2 Grâce aux constantes de couplage fournies à la table 4, attribuer les déplacements chimiques et expliquer les multiplicités des signaux.

Molécule					
J_{AB}	12–15 Hz	2–10 Hz	5–7 Hz (M= O, S, N)	0 Hz	0 Hz (M= O, S, N)

Table 4. Quelques constantes de couplage entre protons.

5 La Cystéine au sein des Peptides

- 5.1 Les acides aminés sont liés entre eux par liaison peptidique pour former des peptides.
- 5.1.1 Représenter un dipeptide alanine / alanine (voir figure 1).
- 5.1.2 Comparer les longueurs de liaison C=O et C-N dans la liaison peptidique par rapport à celles dans une cétone et une amine respectivement. Indiquer sur un schéma clair la géométrie de la molécule autour de la liaison peptidique.
- 5.2 Pour analyser la nature des constituants d'un peptide, on commence par hydrolyser les liaisons peptidiques afin d'obtenir les acides aminés constitutifs.
- 5.2.1 Ecrire le mécanisme d'hydrolyse acide de la liaison peptidique.
- 5.3 On observe expérimentalement que la fonction –SH de la cystéine est dégradée par hydrolyse en milieu acide, empêchant son identification lors de l'analyse ultérieure. On la protège donc, avant d'effectuer l'hydrolyse du peptide, par réaction sur le bromure de benzyle $Ph-CH_2-Br$ en présence d'une base dans un solvant aprotique polaire.
- 5.3.1 Ecrire le mécanisme de la réaction de protection.
- 5.3.2 Justifier le choix des conditions expérimentales.
- 5.4 Après hydrolyse du peptide, on sépare les différents acides aminés par électrophorèse. Grâce à cette technique, on cherche à extraire la cystéine d'un mélange d'acides aminés comprenant de la cystéine et de l'arginine (figure 1), dont les pK_A sont indiqués dans la table 5.

Molécule	pK_1	pK_2	pK_3
Cystéine	1,71	8,33	10,78
Arginine	2,17	9,04	12,48

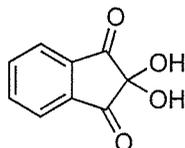
Table 5. pK_A de la cystéine et de l'arginine.

- 5.4.1 Expliquer le principe de l'électrophorèse. Définir le point isoélectrique.
- 5.4.2 A quel pH optimal faut-il opérer ?

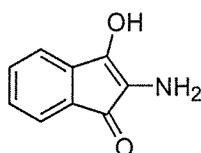
6 Test des Acides Aminés

Un réactif révélateur des acides aminés très utilisé en chromatographie est la ninhydrine. La réaction se déroule en plusieurs étapes, que l'on étudie dans le cas de l'alanine (représentée figure 1).

- 6.1 La ninhydrine représentée ci-dessous est déshydratée en milieu acide pour donner un composé **A**.



- 6.1.1 Ecrire le mécanisme de déshydratation de la ninhydrine.
- 6.2 La fonction cétone centrale de **A** réagit avec l'acide aminé par un mécanisme d'addition nucléophile pour former un composé **B** (qui ne sera pas isolé du milieu réactionnel).
- 6.2.1 Identifier le nucléophile et l'électrophile.
- 6.2.2 Ecrire le mécanisme d'addition.
- 6.3 La molécule **B** se déshydrate pour former **C**.
- 6.3.1 Ecrire le mécanisme de la formation de **C**. Comment s'appelle la fonction formée ?
- 6.3.2 Comment appelle-t-on une telle réaction d'addition de deux molécules avec élimination d'eau ?
- 6.4 Lorsque l'on chauffe le milieu réactionnel, **C** subit alors une décarboxylation, conduisant à un composé **D**. Le mécanisme est analogue à celui de la décarboxylation de l'acide malonique $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ par chauffage.
- 6.4.1 Ecrire le mécanisme de la décarboxylation de l'acide malonique en milieu acide.
- 6.4.2 En déduire le mécanisme de la décarboxylation de **C**.
- 6.5 La molécule **D** est hydrolysée, conduisant à l'amine **E**, représentée ci-dessous.



- 6.5.1 Ecrire le mécanisme de la réaction d'hydrolyse.
- 6.5.2 Quel est l'autre produit libéré ? A quelle famille appartient-il ?
- 6.5.3 Le produit **E** dépend-il de l'acide aminé initial ? Justifier.
- 6.6 L'amine **E** réagit sur la tricétone de départ et conduit à **F** de couleur bleue.
- 6.6.1 Donner la formule de **F**.
- 6.6.2 Justifier la coloration de **F**.

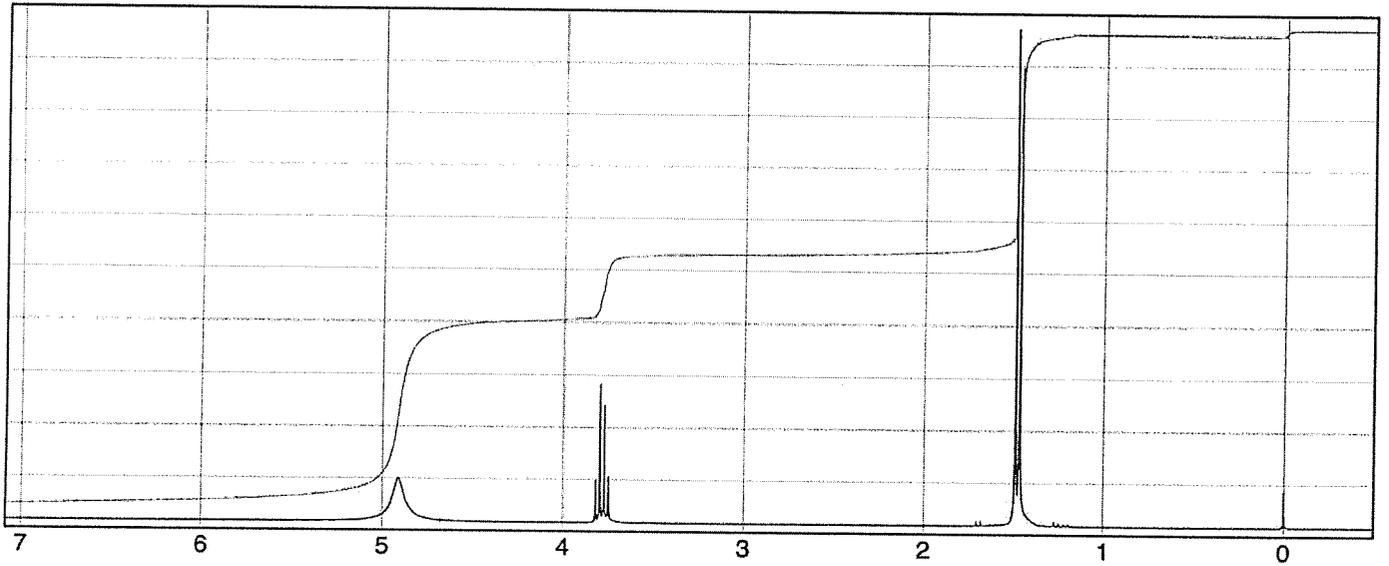


Figure 4. Spectre RMN de l'alanine dans D_2O .

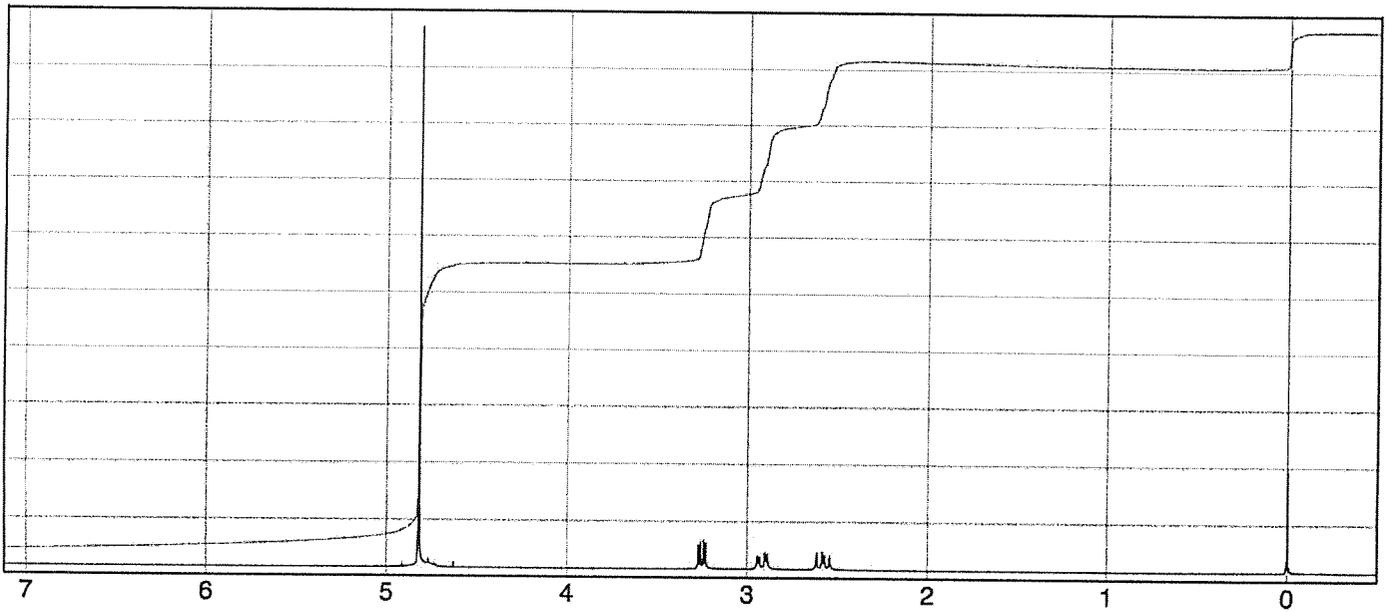


Figure 5. Spectre RMN de la cystéine dans D_2O .

Type d'hydrogène	Déplacement chimique en ppm
RCH_3	0,8 – 1,0
$\text{RCH}_2\text{R}'$	1,2 – 1,4
R_3CH	1,4 – 1,7
$\text{R}_2\text{C}=\text{CRCH}_3$	1,6 – 1,9
ArCH_2R	2,2 – 2,5
RCOCH_3	2,1 – 2,6
$\text{RC}\equiv\text{CH}$	1,7 – 3,1
$\text{RCH}_2\text{OR}'$	3,3 – 3,9
RCH_2OH	3,3 – 4,0
ArH	6,0 – 9,5
RCHO	9,5 – 9,9
ROH	0,5 – 5,0
RSH	0,5 – 5,0
RNH_2	0,5 – 5,0

Table. *Quelques déplacements chimiques.*