

Les ultramicroélectrodes, de dimension au moins micrométrique ou encore plus petite, constituent une classe à part et permettent en particulier d'étudier certains processus fondamentaux de la biologie. Cet aspect est développé dans le problème à partir de deux exemples :

- la caractérisation d'une réponse d'un stress oxydatif au niveau d'une seule cellule vivante
- l'exocytose vésiculaire d'adrénaline par les cellules chromaffines surrénales.

La procédure la plus commode pour la réalisation d'une ultramicroélectrode disque-plan, de rayon r , consiste à introduire dans la partie effilée d'un tube de verre (matière inerte) un fil de platine mince. On scelle ensuite l'ensemble en ramollissant le verre par léger chauffage. On fait ensuite apparaître le disque en coupant la pointe du capillaire, la surface plane étant ensuite obtenue par polissage. Ce type d'électrode est ensuite utilisé par exemple pour des mesures in vitro tel qu'en I-3-c) (voir figure 3).

Données à 298 K :

Constantes :

$$\text{Faraday : } F = 96500 \text{ C.mol}^{-1} \quad RT/F \ln 10 = 0,06 \text{ V}$$

$$\text{Constante d'Avogadro : } N_A = 6,02.10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Potentiel standard à pH = 0

$$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2 : E^\circ = 0,69 \text{ V} \quad \text{Ag}^+/\text{Ag} : E^\circ = 0,80 \text{ V} \quad \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} : E^\circ = 1,23 \text{ V}$$

Surtension anodique sur Pt :

$$\eta(\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2) = + 0,4 \text{ V} \quad \eta(\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2) = + 0,7 \text{ V}$$

Surtension cathodique sur Pt :

$$\eta(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2) = - 0,4 \text{ V} \quad \eta(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = - 0,7 \text{ V}$$

Constantes d'équilibre en solution aqueuse :

$$\text{Solubilité du chlorure d'argent : } \text{AgCl} = \text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \quad K_{s1} = 10^{-10,2}$$

$$\text{Solubilité de l'hydroxyde de nickel(II) : } \text{Ni(OH)}_2 = \text{Ni}^{2+} + 2 \text{ OH}^- \quad K_{s2} = 10^{-15,8}$$

$$\text{Complexation de l'ion Ni}^{2+} : \text{Ni}^{2+} + \text{HA}^- = \text{Ni(HA)}^+ \quad \beta = 10^{+7,0}$$

On négligera toute autre réaction faisant intervenir l'ion Ni^{2+} dans l'eau.

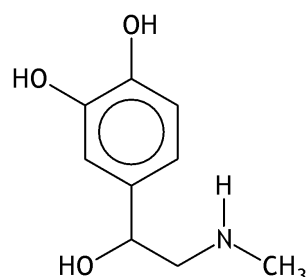
Constante d'acidité de l'adrénaline, notée H_2A :

$$K_3 = [\text{H}_2\text{A}].[H^+]/[\text{H}_3\text{A}^+] = 10^{-8,7}$$

$$K_2 = [\text{HA}^-].[H^+]/[\text{H}_2\text{A}] = 10^{-10,2}$$

$$K_1 = [\text{A}^{2-}].[H^+]/[\text{HA}^-] = 10^{-14,2}$$

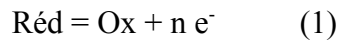
Formule de l'adrénaline :



Adrénaline H_2A

I – 1 - Généralités sur les courbes intensité – potentiel

Le montage expérimental permettant d'établir les courbes intensité-potentiel comporte en général trois électrodes dont une électrode indicatrice inattaquable (également appelée électrode de travail), d'aire suffisamment petite pour que les quantités d'espèces consommées soient négligeables, plongée dans une solution contenant un couple Ox/Réd échangeant n Faraday par mole, aux concentrations respectives $[\text{Ox}]$ et $[\text{Réd}]$, représenté par le processus électrochimique (1), de potentiel standard $E^\circ_{\text{Ox/Réd}}$:



Le schéma d'un tel montage à trois électrodes (voir figure 1) (comportant un potentiostat, milliampèremètre, noté mA, un millivoltmètre, noté mV) est le suivant :

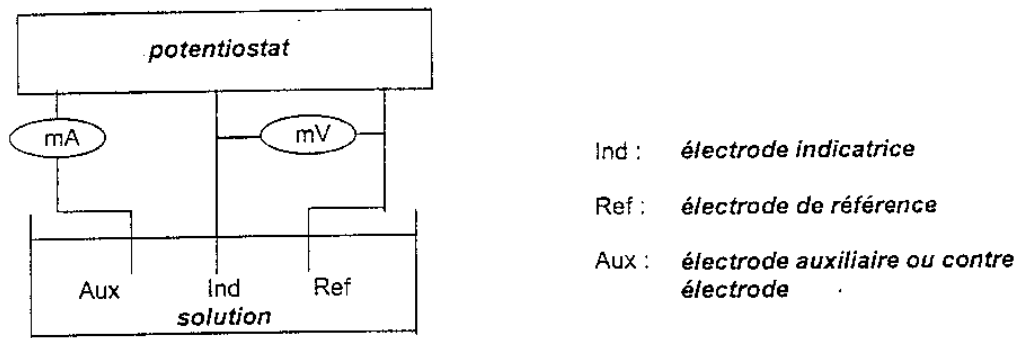


Figure 1 : Montage à trois électrodes

- Justifier que l'électrode $\text{Ag(s)}/\text{AgCl(s)}/\text{KCl(aq)}(1 \text{ mol.L}^{-1})$ est une électrode de référence. Déterminer son potentiel par rapport à l'électrode standard à hydrogène.
- Pourquoi ne doit-il pas passer de courant au travers de l'électrode de référence ? indiquer les branches où l'intensité du courant est nulle ou quasi nulle. Préciser la nature du métal constituant l'électrode indicatrice inattaquable.
- Qu'appelle-t-on un système rapide ? Un système lent ? Donner l'allure des courbes $i = f(E)$ correspondantes en rappelant la convention habituellement choisie pour le signe de l'intensité du courant qui traverse. Indiquer clairement la réaction se produisant à l'électrode indicatrice ayant lieu pour chacune des portions de courbes.
- Qu'observe-t-on en imposant à l'électrode indicatrices des potentiels positifs très élevés et négatifs très faibles en absence d'espèces autres que le solvant ?

I - 2 - Modélisation

On se propose d'étudier dans cette question la relation existant entre l'intensité i et la concentration en réducteur Réd, introduit seul en solution et appartenant au système électrochimique (1) considéré comme rapide. On applique à l'électrode indicatrice un potentiel supérieur au potentiel standard $E^\circ_{\text{Ox/Réd}}$. Il s'établit alors un flux de matière, $J_{\text{Réd}}$, qui s'accompagne d'un courant d'intensité i proportionnel à ce flux. On adopte en première approximation un profil de concentration linéaire dans une couche de solution, dite *couche de diffusion*, d'épaisseur δ_{dif} (voir figure 2). On note $[\text{Réd}]_{\text{solution}}$ et $[\text{Réd}]_{\text{électrode}}$ les concentrations en réducteur, respectivement en solution et à proximité immédiate de la surface de l'électrode. On supposera dans cette question que la couche de diffusion est de très faible épaisseur et indépendante du temps (solution agitée ou électrode tournante).

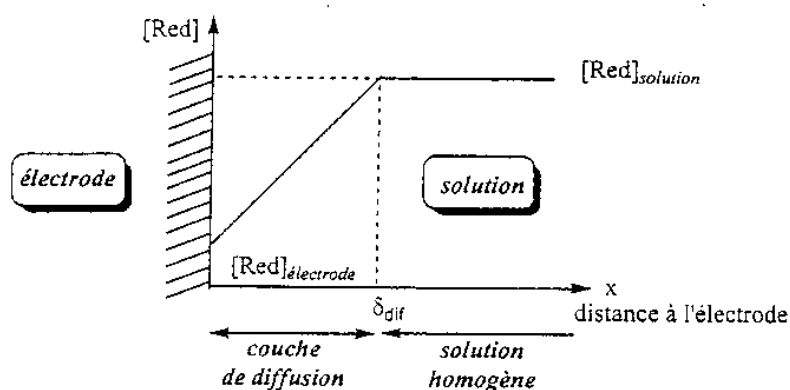


Figure 2 : Profil de concentration

Dans ces conditions et pour le système électrochimique (1), la relation entre l'intensité i et le flux $J_{\text{Réd}}$ est :

$$I = -n.F.A.J_{\text{Réd}} \text{ avec } A \text{ l'aire de l'électrode indicatrice}$$

a) En appliquant la première loi de Fick ($j = -D_{\text{Réd}} \cdot \text{grad}[\text{Réd}]$), donner l'expression de l'intensité i en fonction de $[\text{Réd}]_{\text{solution}}$ et $[\text{Réd}]_{\text{électrode}}$, $D_{\text{Réd}}$ le coefficient de diffusion de l'espèce Réd, A la surface de l'électrode et δ_{dif} .

b) Lorsque le potentiel auquel est porté l'électrode indicatrice est nettement supérieur au potentiel standard $E^\circ_{\text{Ox/Réd}}$, l'intensité tend vers une valeur limite, noté i_{lim} , ce qui se traduit par l'existence d'un palier sur la courbe intensité-potentiel. Quelle est alors la valeur de la concentration à proximité immédiate de la surface de l'électrode, $[\text{Réd}]_{\text{électrode}}$? En déduire l'expression de i_{lim} pour une ultramicroélectrode disque-plan, de rayon r .

I – 3 – Etude des ultramicroélectrodes disque-plan, de rayon r

En régime de diffusion convective stationnaire (solution agitée ou électrode tournante), la couche de diffusion est maintenue constante au cours du temps. Au contraire, en régime de diffusion pure (pas de convection mécanique en solution, ce qui est le cas lors de mesure in vitro), l'épaisseur de la couche de diffusion δ_{dif} , des espèces électroactives, ici Réd, seul en solution, dépend de la distance parcourue par diffusion pour une molécule. Pour une expérience de durée t , cette distance est donnée par :

$$\delta_{\text{dif}} = \sqrt{2 D_{\text{Réd}} \cdot t}$$

On admet que :

- si $\delta_{\text{dif}} \ll$ à la dimension du rayon r , la couche de diffusion est approximativement plane ou linéaire
- si $\delta_{\text{dif}} \gg$ à la dimension du rayon r , la taille de la couche de diffusion ne pouvant pas physiquement dépasser la dimension de l'électrode, la diffusion devient alors sphérique et son épaisseur δ_{dif} est constante et approximativement égale à deux fois le rayon r de l'électrode. La courbe intensité-potentiel présente alors un palier comme dans le cas I – 2 – b). On peut alors considérer dans ce cas que le volume de solution affecté par le processus électrochimique, nommé *volume de solution sondée*, est une demi-sphère partant de la surface de l'électrode et de rayon δ_{dif} .

- a) Avec une ultramicroélectrode de rayon $5 \mu\text{m}$ (et un coefficient de diffusion de l'espèce considérés $D_{\text{Réd}} = 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), quel est le temps de mesure au-delà duquel le volume sondé (couche de diffusion) est constant ?
- b) Evaluer pour cette électrode le volume de solution sondée. Conclusion.
- c) On considère une ultramicroélectrode disque-plan de rayon $5 \mu\text{m}$ distante de $1 \mu\text{m}$ d'une plaque de verre sur laquelle a été déposée une cellule vivante en solution aqueuse (voir figure 3) :

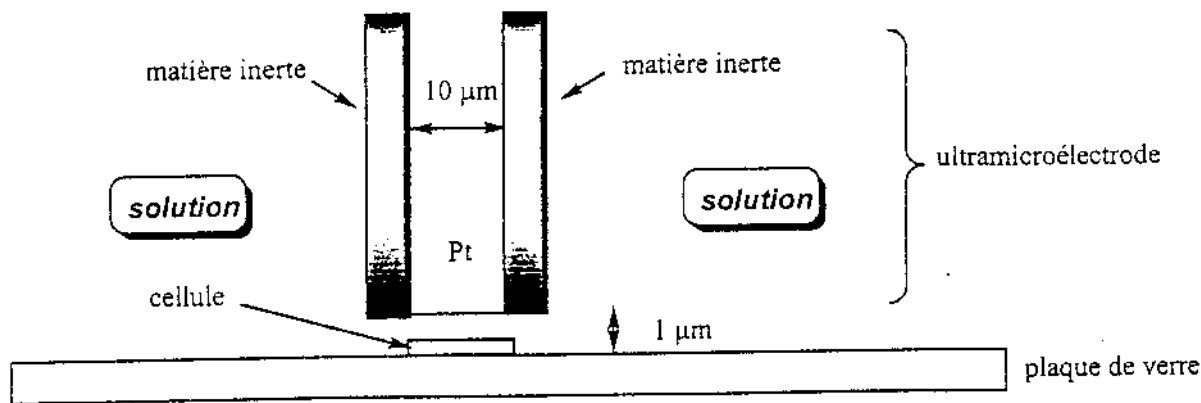
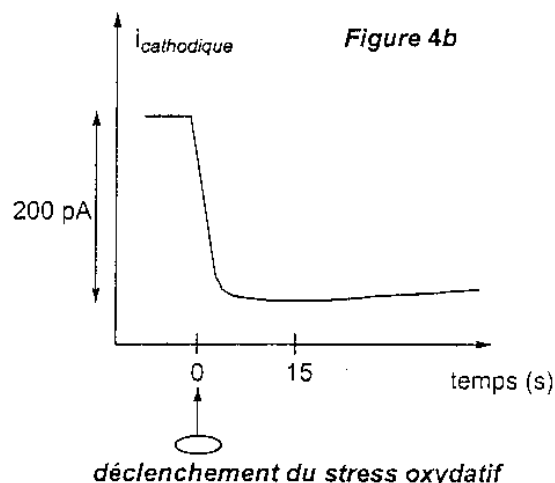
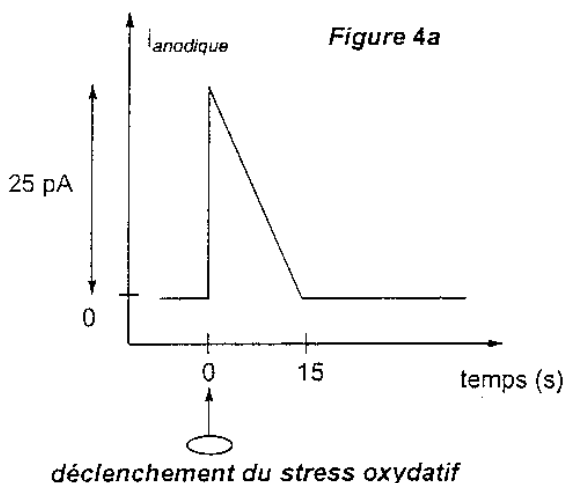


Figure 3 : Montage de mesure in vitro (l'échelle n'est pas respectée)

Quel est approximativement le volume de solution sondée dans ce cas précis ? Une cellule subissant par exemple un stress oxydatif (voir partie II) libère jusqu'à 10 millions de molécules électroactives. Estimer alors la concentration à proximité immédiate de l'électrode.

II – Etude du stress oxydatif d'une cellule

Une cellule vivante, placée en solution aqueuse de pH = 7 et saturée en dioxygène est soumise à un stress oxydatif. On suit la concentration en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , produit par la cellule à la suite de ce stress à partir de mesures électrochimiques où les coefficients de diffusion de toutes les espèces sont du même ordre de grandeur. Ces dernières sont obtenues suite à la mise en œuvre du montage présenté à la question I – 3 – c). La réponse de la cellule au stress oxydatif est enregistrée à l'aide d'une ultramicroélectrode polarisée soit à + 0,6 V, soit à - 0,2 V, potentiels mesurés par rapport à une électrode $Ag(s)/AgCl(s)/KCl(aq)(1 \text{ mol.L}^{-1})$. Le courant est mesuré en picoampère, pA, et ses variations en fonction du temps sont représentées sur les figures 4a et 4b.



Figures 4a et 4b : Mesures électrochimiques suite à un stress oxydatif (les échelles ne sont pas respectées)

II – 1 – Réactions aux électrodes

- Quelles sont les demi-équations électroniques concernées par l'expérience ?
- Evaluer à 298 K le potentiel standard apparent en fonction du pH, $E^\circ_{app}(pH)$ pour chacune des espèces en solution. Placer les courbes intensité-potential correspondantes sur un axe de potentiel dont l'origine est le potentiel de l'électrode de référence utilisée.
- Vérifier que les potentiels appliqués à l'électrode indicatrice sont bien choisis.

II – 2 – Réponse biologique de la cellule

- Que représente l'aire du pic de la figure 4a ?
- Que dire qualitativement de la quantité de dioxygène consommé (figure 4b) ? Conclure.

III - Etude de l'exocytose d'adrénaline

L'exocytose correspond à une éjection de neurotransmetteurs par suite d'une stimulation de la cellule. Ici nous allons nous intéresser à l'éjection de l'adrénaline H_2A , aisément détectable par une technique électrochimique, après stimulation de la cellule par des ions Ni^{2+} .

Cette partie, indépendante des deux premières, porte sur l'étude des solutions aqueuses d'adrénaline en présence de sels de nickel Ni^{2+} .

III – 1 – Acidobasicité de l'adrénaline

- D'après la formule de l'adrénaline, quels sont les sites présentant en solution aqueuse des propriétés acides ou basiques ?
- Sachant que la valeur de pK_2 égale à 10,2 est associée à l'une des fonctions phénol, établir le diagramme de prédominance des espèces en fonction du pH.
- Expliquer la différence d'acidité observée entre les deuxième et troisième acidités.

III – 2 – Titrage d'une solution d'adrénaline par l'hydroxyde de sodium

- Calculer le pH d'une solution aqueuse d'adrénaline à la concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ introduite sous la forme du sel H_3A^+ , Cl^- .
- Peut-on titrer séparément par le soude les différentes acidités de l'adrénaline ?

III – 3 – Titrage d'une solution d'adrénaline en présence de sels de nickel (II)

- Soit une solution S de H_3A^+ , Cl^- à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et de Ni^{2+} , $2 Cl^-$ à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. En faisant l'hypothèse que le complexe $NiHA^+$ se forme à partir de cette solution, quelle serait la valeur de pH de cette solution ?

A l'aide d'un logiciel approprié la courbe de titrage de 10 mL de la solution S par la soude NaOH à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ a été simulée ainsi que le diagramme de distribution des variations des pourcentages de toutes les espèces solubles en quantité non négligeable (pourcentages rapportés à A total ou Ni total).

- En exploitant la figure 5 (nature des espèces présentes, échelle des abscisses, rythme de variation des pourcentages) :
 - indiquer si l'hypothèse émise en III – 3 – a) est à retenir. Justifier votre réponse.
 - Ecrire la réaction de titrage par la soude de H_3A^+ en présence de Ni^{2+} jusqu'au point P.
- Quelle est la réaction au-delà du point P ?

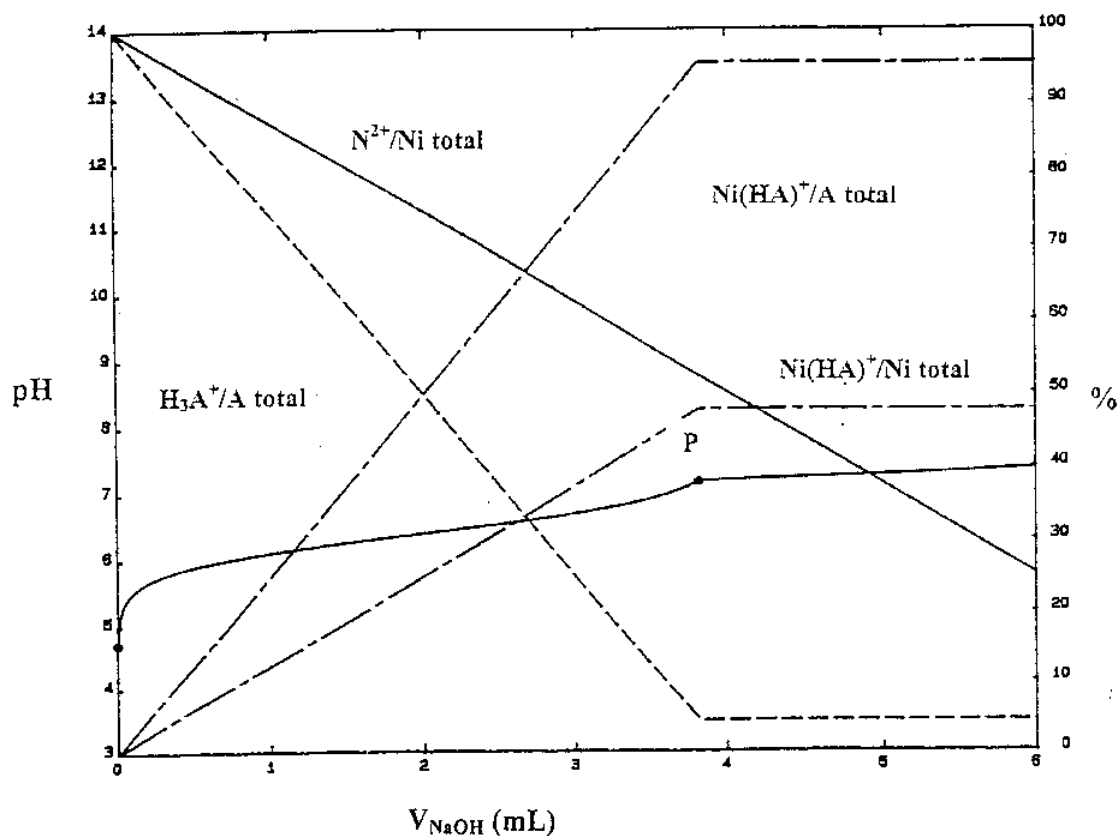
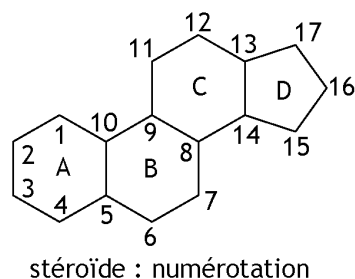
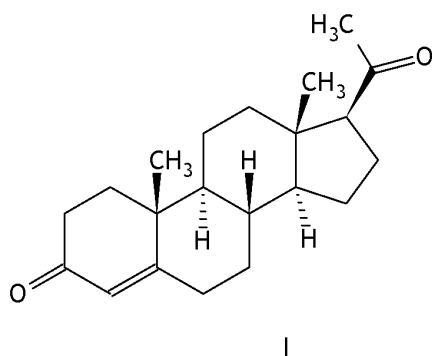


Figure 5 : Dosage de H_3A^+ , Cl^- à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et de Ni^{2+} , $2Cl^-$ à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ par la soude à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

La progestérone I est une hormone stéroïde sécrétée au cours des cycles ovariens qui permet l'implantation de l'œuf sur la paroi utérine. W. S. Johnson a proposé une synthèse de cette hormone, obtenue sous forme racémique, qui met en jeu une cyclisation biomimétique (*J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4274).



I – STEREOCHIMIE, SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

La numérotation des carbones d'un stéroïde est rappelée ci-dessus.

1- Indiquer les carbones asymétriques de la progestérone I à l'aide d'un astérisque.

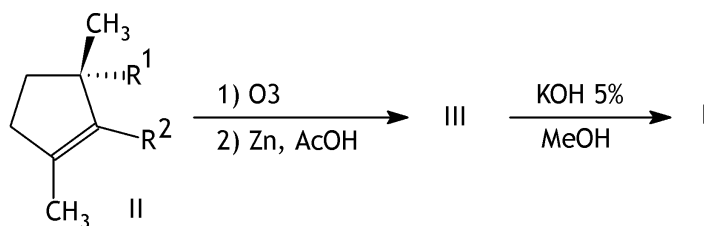
2 – Donner la configuration absolue des carbones 10 et 13 en la justifiant.

3 – Les cycles B et C présentent une jonction trans. Représenter en conformation chaise dans l'espace deux cycles à 6 carbones accolés par une liaison C-C en présentant cette même stéréochimie. On figurera les liaisons C-H d'un des deux cycles en précisant lesquelles sont axiales (a) et lesquelles sont équatoriales (e).

4 – La progestérone présente deux fonctions cétone, dont les vibrations de valence sont observées à 1670 et 1700 cm^{-1} en spectroscopie IR. Attribuer ces absorptions en justifiant votre raisonnement.

II – FORMATION DU CYCLE A

Le cycle A est formé par un processus « d'ouverture-fermeture » qui met en jeu des réactions très classiques. Le schéma ci-dessous résume ce processus. La structure des molécules a été simplifiée en remplaçant les cycles B, C et D par des groupements R^1 et R^2 .



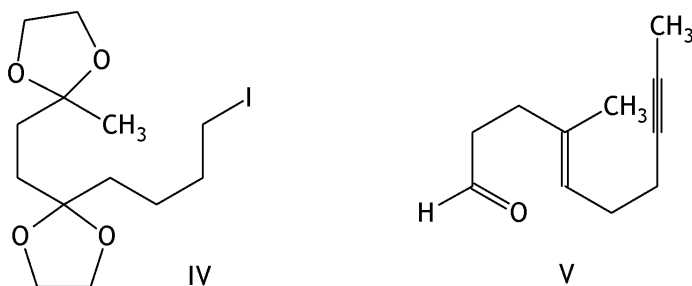
1 – Représenter la structure du composé III.

2 – Comment appelle-t-on la réaction de cyclisation de ce composé III en composé I ?

3 – Proposer un mécanisme pour cette cyclisation.

III SYNTHÈSE DU PRECURSEUR DE LA PROGESTERONE, SPECTROSCOPIE RMN ^1H

Une des étapes-clé de la synthèse est une réaction de Wittig, qui permet d'obtenir un composé VI de configuration E. Les matières premières sont le dérivé iodé IV et l'aldéhyde insaturé V.



1 – L'aldéhyde V présente en particulier les signaux donnés dans le tableau ci-dessous en RMN ^1H (spectre enregistré dans le chloroforme deutérié CDCl_3 à 60 MHz).

Attribuer ces signaux à l'aide des tables et justifier la multiplicité observée.

(ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)
1,58	3 H	Singulet	-
1,71	3 H	Triplet	2,5
5,21	1 H	Triplet	6
9,8	1 H	singulet	-

2 – Rappeler comment préparer un alcène, à l'aide d'une réaction de Wittig, à partir d'un halogénure $\text{R}_3\text{-CH}_2\text{-I}$, de triphénylphosphine, d'un aldéhyde $\text{R}_4\text{-CHO}$ et de tout autre réactif nécessaire.

3 – En déduire la structure du composé VI.

4 – Le composé IV présente des fonctions cétone qui ont été protégées en vue de la réaction de Wittig. Expliquer pourquoi ces protections sont nécessaires.

5 – Comment effectue-t-on la protection de la fonction cétone ? On précisera le réactif et le catalyseur nécessaire.

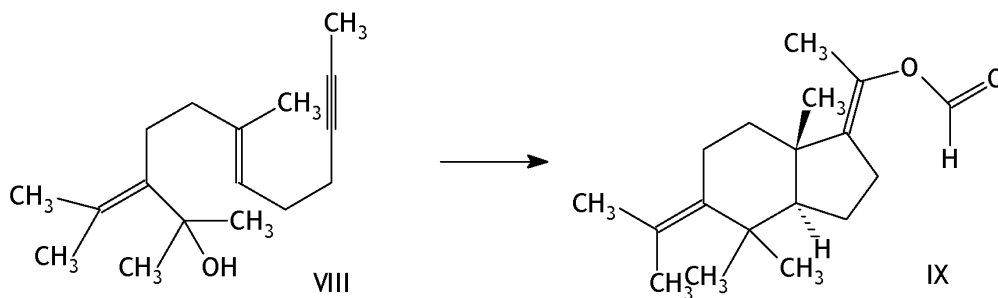
6 – Le composé VI est traité en milieu hydroorganique acide afin de déprotéger les fonctions cétone. Donner le mécanisme de déprotection d'une fonction cétone.

7 – Donner la structure du produit VII ainsi obtenu à partir de VI.

IV – CYCLISATION BIOMIMETIQUE SUR UN MODELE

Johnson a tout d'abord étudié la cyclisation sur le diénynol VIII qui conduit par traitement dans le pentane avec un excès d'acide méthanoïque (système biphasique eau/solvant, agitation 15 minutes à température ambiante) au bicyclic IX (*J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4330).

1 – L'alcool tertiaire VIII fournit aisément un carbocation dans le milieu acide considéré. Ecrire ce carbocation et justifier sa stabilité.

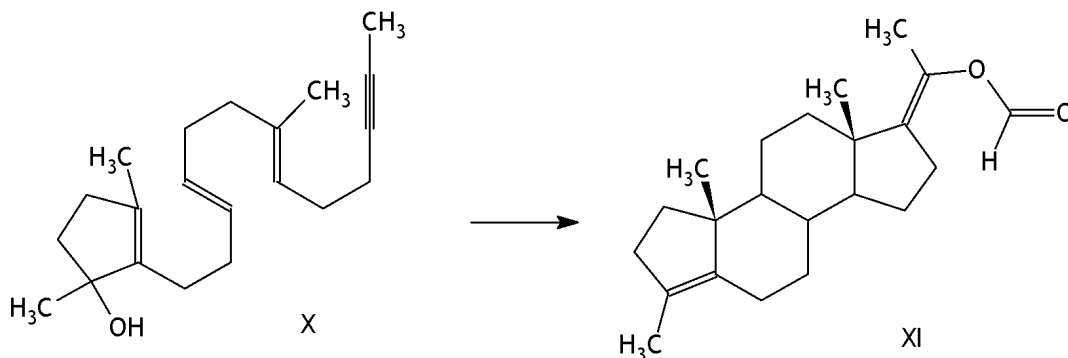


2 – Ce premier carbocation est un électrophile qui peut conduire à la formation de deux nouveaux carbocations en s'additionnant sur la double liaison « centrale ». Représenter ces deux cations et discuter leur stabilité relative.

3 – Le carbocation le plus stable s'additionne ensuite sur la triple liaison. Proposer en conséquence un mécanisme pour la formation de IX.

V – FORMATION DE LA PROGESTERONE

Le processus précédent, d'additions électrophiles « en cascade », a été appliqué au composé X selon le schéma suivant :



1 – Proposer un mécanisme de cyclisation de X en précurseur XI de la progestérone.

2 – Comment peut-on transformer le groupement porté par le carbone 17 en groupement acétyle ?

3 – Proposer en conséquence un schéma de synthèse de la progestérone à partir de XI.