Quelques aspects du cycle de l'azote

L'azote est un élément fondamental pour toute **la biosphère** puisqu'il entre dans la composition des acides aminés, des acides nucléiques et des protéines ; son cycle implique divers processus au cours desquels cet élément est assimilé par les êtres vivants.

Le plus grand réservoir terrestre d'azote est **l'atmosphère** où il est majoritairement présent sous forme de diazote. Cette molécule n'est pas assimilable directement par les plantes, qui ne peuvent utiliser que l'ammoniac, les ions ammonium et les ions nitrate. La transformation du diazote en ammoniac ou en ion ammonium est appelée « fixation » et s'effectue grâce à des bactéries dites fixatrices, bactéries libres ou bactéries en symbiose avec des légumineuses. Ces molécules sont en partie oxydées en ions nitrate, lors de la phase de « nitrification » qui nécessite une catalyse enzymatique. Lors de la phase « d'assimilation », les végétaux (plantes et algues supérieures) ou microorganismes (bactéries, champignons) assimilent ces différentes formes d'espèces azotées pour synthétiser la matière organique.

Le recyclage de cet azote organique s'effectue en plusieurs étapes dans **la lithosphère** grâce à des organismes spécialisés : « ammonification » (retour de l'azote organique à l'état d'ammoniac, d'ions ammonium, d'urée), « nitrification », puis « dénitrification » lors du retour sous forme de diazote atmosphérique par des microorganismes (bactéries *Pseudomonas* et champignons).

Le cycle biogéochimique de l'azote est complexe car il faut tenir compte de la présence d'oxydes d'azote dans l'atmosphère et de l'interaction avec les océans. Par ailleurs, la très grande solubilité dans l'eau des ions nitrate, de l'ammoniac et des ions ammonium amène à des échanges d'espèces azotées entre biosphère, lithosphère et **hydrosphère**.

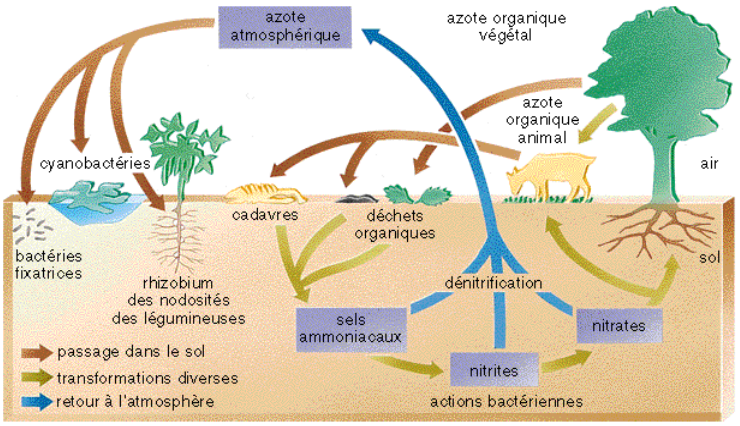


Schéma du cycle de l'azote

Ce sujet propose l'étude de quelques espèces chimiques azotées et de quelques transformations chimiques intervenant dans le cycle de l'azote. Il comporte trois parties indépendantes :

Partie A : l'azote dans l'atmosphère

Partie B : l'azote dans la biosphère et la lithosphère

Partie C : l'azote dans l'hydrosphère

Données numériques

pK_A de couples acide-base, à 298 K

Couple	CO_2, H_2O (aq) / HCO_3^- (aq)	HCO_3^- (aq) / CO_3^{2-} (aq)	NH_4^+ (aq) / NH_3 (aq)
pK_A	6,4	10,2	9,2

Potentiels standard $E°$, à 298 K

Couple	Fe^{3+} (aq) / Fe^{2+} (aq)	NO_3^- (aq)/ NO (g)
$E°$ / V	0,77	0,96

On prendra $RT/F \times \ln 10 = 0{,}06$ V à 298 K.

Enthalpies standard de formation ($\Delta_f H°$) et entropies molaires standard ($S°$) à 298 K, supposées indépendantes de la température

	Cu (s)	O_2 (g)	CuO (s)
$\Delta_f H°$ / kJ.mol^{-1}	0	0	– 157,3
$S°$ / J.K^{-1}.mol^{-1}	33,2	205,2	42,6

Constante des gaz parfaits : $R = 8{,}314$ J.K^{-1}.mol^{-1}.

Masses molaires atomiques, M

Élément	H	C	N	O	K
M / g.mol^{-1}	1,01	12,01	14,01	16,00	39,10

Données spectroscopiques

RMN ^{1}H : déplacements chimiques δ (en ppm) de quelques protons

Type de proton	C**H$_3$**–C–	–C**H$_2$**–C–	–C**H$_2$**–CO–	–C**H$_2$**–O–
δ / ppm	0,6-1,4	1,2-2,4	2,0-3,0	3,5-4,5

Infrarouge : nombres d'onde $\overline{\nu}$ (en cm^{-1}) de vibration d'élongation de liaisons dans des groupes caractéristiques

Groupe caractéristique	C=O cétone non conjuguée	C=O cétone conjuguée	C=O ester non conjugué	C=O ester conjugué	OH alcool
$\overline{\nu}$ / cm^{-1}	1705-1725	1665-1685	1735-1750	1700-1730	3200-3600

Partie A : l'azote dans l'atmosphère

A.I. Historique : la théorie du phlogistique

Le principe de la théorie de la combustion qui prévaut au XVIII^{e} siècle est qu'un corps qui brûle perd une substance combustible appelée « phlogistique » : c'est en quelque sorte du feu répandu dans la matière qui s'en échappe au moment de la combustion, jusqu'à éventuellement en saturer l'air en fin de combustion (par exemple à la fin de la combustion d'une bougie sous une cloche). Les résidus de la combustion d'un métal, les « chaux métalliques », sont donc dépourvus de cette substance. Seul le carbone, riche en phlogistique, peut le restituer pour régénérer le métal.

À cette époque, les gaz sont de l'« air » chargé de diverses « impuretés ». Par exemple Joseph Black en 1754 identifie l'« air fixe » en chauffant du calcaire (carbonate de calcium), Henry Cavendish isole en 1766 l'« air inflammable » obtenu lors de la réaction d'un acide sur un métal et Joseph Priestley isole en 1774 l'« air déphlogistiqué » (gaz qu'il obtient par chauffage de l'oxyde rouge de mercure, HgO) et le distingue de l'« air phlogistiqué » (gaz saturé en phlogistique, constituant de l'air ordinaire). En 1781, Cavendish constate que deux volumes d'air inflammable se combinent à un volume d'air déphlogistiqué pour donner de l'eau.

A.I.1. Donner, en nomenclature officielle, les noms des gaz cités dans ce texte et appelés au XVIII^{e} siècle « air fixe », « air inflammable », « air phlogistiqué » et « air déphlogistiqué ».

A.I.2. Comment nomme-t-on actuellement les « chaux métalliques » ?

A.I.3. Comment interprète-t-on aujourd'hui le fait que le carbone puisse régénérer un métal à partir de ses chaux métalliques ?

Bien que des composés contenant l'élément azote, tels que le salpêtre par exemple, soient connus depuis l'antiquité, la mise en évidence du gaz diazote est attribuée à Daniel Rutherford en 1772 même si Henry Cavendish et Carl Wilhelm Scheele ont fait la même découverte à la même époque. Pour isoler le diazote de l'air, Rutherford fit brûler du carbone dans l'air et piégea le dioxyde de carbone obtenu dans une solution aqueuse basique.

A.I.4. Écrire l'équation de la réaction de piégeage du dioxyde de carbone mise en œuvre par Rutherford.

En 1776, Antoine Laurent Lavoisier écarte la théorie du phlogistique en prouvant que le dioxygène de l'air se combine aux métaux quand on les brûle. Ce gaz qu'il appelle d'abord « air vital » est nommé ensuite oxygène, du grec oxus (οξυζ, acide) et gennao (γενναω, engendrer). C'est encore Lavoisier qui donne son nom au diazote, à partir du grec zôê (ζωη, vie) et a (préfixe privatif), puisque ce gaz n'entretient pas la vie des animaux.

En 1783, Henry Cavendish fait une analyse de l'air plus précise que Lavoisier et conclut à un pourcentage de 20,83 % en volume de dioxygène et 79,17 % de diazote (nomenclature actuellement en vigueur), et c'est en 1892 seulement que John William Rayleigh détermine la masse volumique du diazote, mais il ne comprend pas alors pourquoi le

diazote « atmosphérique » (obtenu par passage d'un échantillon d'air sur du cuivre chauffé au rouge puis élimination des traces d'eau et de dioxyde de carbone) a une masse volumique différente de celle du diazote « chimique » obtenu par décomposition d'ammoniac sur l'oxyde de cuivre (II).

A.I.5. En quelle classe du collège ou du lycée les élèves mesurent-ils la masse d'un volume de gaz ?

A.I.6. Décrire succinctement une expérience permettant de mesurer la masse d'un litre d'air.

A.I.7. Obtention du « diazote atmosphérique » par passage d'air sur le cuivre incandescent

On considère une enceinte fermée, contenant initialement de l'air, dans laquelle du cuivre chauffé au rouge, à une température T = 1 200 K, est transformé en oxyde de cuivre CuO par le dioxygène selon l'équation de réaction (1) :

$$2\ Cu\ (s) + O_2\ (g) = 2\ CuO\ (s) \qquad (1)$$

A.I.7.1. Calculer la constante d'équilibre de la réaction (1) à la température 1 200 K, notée $K_1°$ (1 200 K).

A.I.7.2. En déduire, dans l'hypothèse où le cuivre est en excès sur le dioxygène, la pression partielle en dioxygène à l'équilibre à 1 200 K.

A.I.7.3. Proposer une méthode pour éliminer les éventuelles traces d'eau résiduelle dans le gaz ainsi obtenu après passage de l'air sur le cuivre chauffé au rouge.

A.I.8. Obtention du « diazote chimique » par oxydation de l'ammoniac

A.I.8.1. Écrire l'équation de la réaction d'oxydation de l'ammoniac en diazote par le dioxygène.

A.I.8.2. Quel(s) autre(s) gaz azoté(s) est (sont) *a priori* envisageable(s) comme produit(s) de cette oxydation ?

A.I.8.3. Proposer une méthode permettant l'élimination de l'ammoniac en excès dans le gaz ainsi obtenu.

On admet que les conditions opératoires utilisées par Rayleigh lui ont permis d'oxyder l'ammoniac exclusivement en diazote et d'éliminer totalement les sous-produits et les réactifs résiduels.

A.I.9. Quel est le volume molaire V*(gp, $p°$, 298 K) d'un gaz parfait à 298 K sous pression $p° = 1{,}00\times10^5$ Pa ?

A.I.10. Rayleigh a mesuré les masses volumiques ρ des gaz (supposés parfaits) dans des conditions où leur volume molaire est $V^* = 22{,}42\ L.mol^{-1}$, il a obtenu :

ρ (« diazote atmosphérique ») = 1,256 $g.L^{-1}$ et ρ (« diazote chimique ») = 1,249 $g.L^{-1}$.

A.I.10.1. En déduire la masse molaire M_1 du « diazote atmosphérique » et la masse molaire M_2 du « diazote chimique ».

A.I.10.2. Calculer la proportion de dioxygène dans le « diazote atmosphérique » qui justifierait l'écart entre ces deux masses molaires. Cette composition est-elle crédible au vu des résultats précédents ?

A.I.10.3. Comment peut-on interpréter l'écart entre ces mesures de masses volumiques du « diazote atmosphérique » et du « diazote chimique » avec les connaissances scientifiques actuelles ?

A.II. L'atome d'azote

Dans l'écorce terrestre d'environ 30 km d'épaisseur (océans et atmosphère compris), l'élément azote est très peu abondant par rapport aux deux éléments les plus abondants.

A.II.1. Citer (par ordre décroissant) ces deux éléments les plus abondants en pourcentage massique dans l'écorce terrestre.

A.II.2. Citer (par ordre décroissant) les deux éléments les plus abondants en pourcentage massique dans l'Univers entier.

A.II.3. Atomistique

A.II.3.1. Quelle est la configuration électronique de l'atome d'azote dans son état fondamental ?

A.II.3.2. Expliciter très clairement la stratégie adoptée pour déterminer les numéros atomiques de tous les éléments situés sous l'azote dans la classification périodique et donner ces numéros.

A.II.3.3. Citer deux éléments situés dans la même colonne de la classification périodique que l'azote.

A.III. La molécule de diazote

A.III.1. Écrire la formule de Lewis de la molécule de diazote.

A.III.2. Évaluer l'ordre de grandeur de la masse de diazote contenue dans l'atmosphère terrestre. On expliquera les différentes étapes du calcul, les données choisies et les approximations faites *(Remarque : cette question très ouverte fait appel à l'élaboration d'une démarche de résolution au cours de laquelle des données non fournies peuvent être utilisées ; ces dernières sont considérées comme devant faire partie de la culture générale scientifique attendue d'un futur enseignant).*

Partie B : l'azote dans la biosphère et la lithosphère

B.I. Acides aminés et peptides

L'azote représente environ 3 % de la masse du corps humain, ce qui en fait le quatrième élément en masse par ordre d'abondance après l'oxygène, le carbone et l'hydrogène. On le retrouve dans des molécules biologiques fondamentales pour les êtres vivants : acides aminés, bases azotées, protéines, acides nucléiques, ADN, ARN…

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux acides aminés et aux protéines.

- **Les acides α-aminés**

Les acides α-aminés sont des composés comportant un groupe caractéristique (ou « fonctionnel ») acide carboxylique et un groupe amine en position α par rapport au premier.

Parmi l'ensemble des acides aminés, la glutamine, représentée figure 1, joue un rôle majeur dans l'assimilation de l'azote en permettant sa métabolisation : les ions ammonium (toxiques pour l'organisme), formés lors la fixation du diazote atmosphérique par certaines plantes, sont assimilés en composé organique par la conversion du glutamate en glutamine (figure 1). Cette conversion est permise par l'enzyme *glutamine synthétase* avec consommation d'énergie, sous forme d'une liaison phosphate riche en énergie de l'ATP (adénosine triphosphate) alors transformé en ADP (adénosine diphosphate). À l'inverse, la glutamine joue également le rôle de donneur d'azote nécessaire à la biosynthèse de nombreux composés : d'autres acides aminés, les purines et les pyrimidines. La glutamine devient un transporteur du groupe amine à partir du foie *via* le plasma sanguin vers les autres tissus.

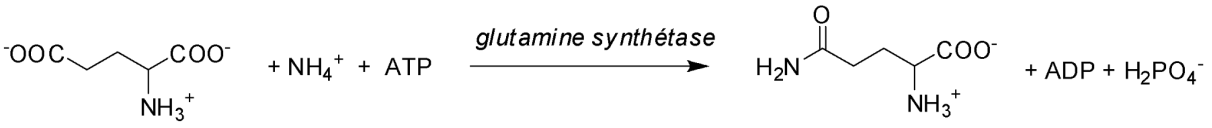


Figure 1

B.I.1. À partir de combien d'acides α-aminés différents sont formées les protéines humaines ?

B.I.2. Pourquoi certains acides α-aminés sont-ils qualifiés d'essentiels ?

La glutamine existe essentiellement sous forme d'amphion (ou zwittérion). On donne, à 25 °C, les pK_A des couples de la glutamine : 2,2 et 9,1.

B.I.3. Tracer un diagramme de prédominance des différentes formes acido-basiques de la glutamine en fonction du pH.

B.I.4. On rappelle que le point isoélectrique est le pH pour lequel la proportion de la forme zwittérionique est maximale. Déterminer le point isoélectrique de la glutamine.

- **Liaison peptidique**

Les protéines sont formées d'un enchaînement bien défini d'acides α-aminés. Ces derniers sont associés par une liaison peptidique, qui est une liaison covalente créée par la réaction entre la fonction amine d'un premier acide aminé et la fonction acide carboxylique d'un deuxième. Par exemple, la formation d'un dipeptide par la réaction entre les deux acides aminés, alanine et glutamine, peut être modélisée par l'équation de la figure 2.

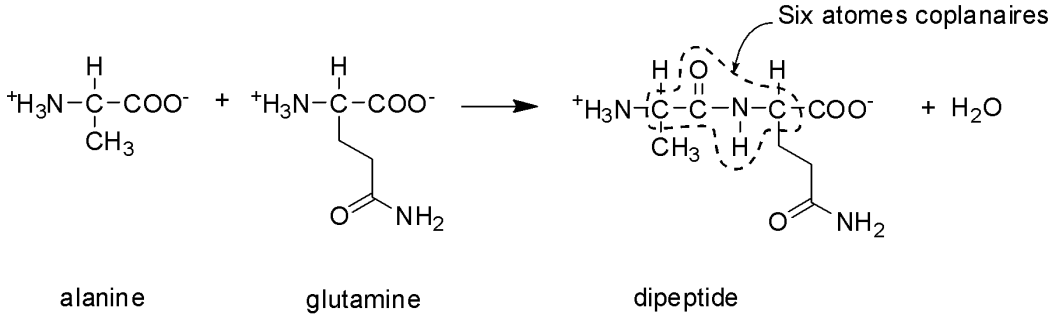


Figure 2

La liaison peptidique possède une géométrie fixe, il n'y a pas de rotation autour de la liaison C–N créée. Les atomes C, O, N, H de la liaison peptidique et les deux atomes C voisins (voir figure 2) sont situés dans un même plan et les angles de liaison autour des atomes de carbone (de C=O) et d'azote sont d'environ 120°. De plus, on trouve dans la littérature qu'un dipeptide peut adopter deux configurations : *cis* ou *trans*.

B.I.5. Proposer une justification permettant d'interpréter la rigidité de la liaison peptidique et le fait que les six atomes mentionnés plus haut soient coplanaires.

B.I.6. Dessiner la structure de chacune de deux configurations *cis* et *trans* du dipeptide (en se limitant aux six atomes sus-nommés).

La synthèse du dipeptide de la figure 2 ne peut pas être effectuée directement avec un bon rendement. Une méthode de synthèse automatisée, sur support solide, permet de synthétiser efficacement des polypeptides depuis le début des années 1960. Ce procédé, développé par R. B. Merrifield lui valut le prix Nobel de chimie en 1984.

B.I.7. Expliquer pourquoi la synthèse directe du dipeptide telle qu'elle est écrite dans l'équation de réaction de la figure 2 ne peut pas être effectuée avec un bon rendement.

B.I.8. Sans expliciter chacune des étapes, proposer une stratégie de synthèse plus efficace du dipeptide de la figure 2 à partir d'alanine et de glutamine.

B.I.9. Donner des avantages de la synthèse sur matrice solide.

B.I.10. La myoglobine est une protéine constituée d'un enchaînement ordonné de 153 acides aminés. Combien de protéines différentes comportant 153 acides aminés peut-on obtenir à partir d'un mélange constitué d'acides aminés en nombre indiqué en réponse à la question **B.I.1** ?

B.I.11. Indiquer très succinctement (en cinq lignes maximum) comment la synthèse d'une protéine telle que la myoglobine s'opère dans un organisme vivant pour n'obtenir que cette seule protéine plutôt qu'un mélange.

B.II. L'azote dans les sols : dosage de l'azote organique par la méthode de Kjeldahl

Le sol est la région la plus superficielle de la croûte terrestre constamment remaniée par les pluies, les variations de température et les agents biologiques qui s'y trouvent. Les plantes plongent leurs racines dans le sol, y puisent les matériaux nécessaires à leur subsistance, y secrètent certaines substances et le recouvrent de débris organiques lors de leur décomposition.

La plupart des plantes se procurent l'azote dans l'eau ou dans le sol essentiellement sous forme d'ions nitrate.

Les animaux utilisent l'azote contenu sous forme organique dans leurs proies animales ou végétales. Excréments et cadavres rendent cet azote organique au sol où une série d'actions microbiennes (ammonisation, nitrification) le fait passer sous la forme d'ions nitrate assimilable par les plantes.

La teneur d'un sol en azote total ne renseigne pas sur l'azote minéral disponible pour les végétaux, mais s'avère une donnée très importante pour l'utilisation raisonnée des engrais.

La méthode de Kjeldahl met en œuvre une minéralisation des substances organiques par de l'acide sulfurique concentré et chaud. Les atomes de carbone de la substance se retrouvent sous forme de CO_2 et les atomes d'azote sous forme d'ions ammonium : on appelle « masse d'azote Kjeldahl » la somme des masses d'azote sous forme ammoniac, ammonium et organique dans un échantillon.

Étape 1. Un prélèvement de terre est séché, broyé et tamisé, puis on introduit 2,556 g de cette terre dans un tube à minéraliser (tube à essais épais). On ajoute environ 10 mL d'acide sulfurique concentré (à 18 $mol.L^{-1}$), une pointe de spatule de catalyseur à base de sélénium (0,5 g) et on place le tube dans le digesteur (chauffe-tubes) **installé sous la hotte** avec **un entonnoir de verre** sur le tube. On chauffe à ébullition pendant au moins une heure et le tube est sorti du digesteur puis refroidi. On ajoute alors **très lentement, en refroidissant dans un bain d'eau froide et en portant des lunettes de protection**, environ 30 mL d'eau puis on transvase (le long d'un agitateur de verre) le contenu de ce tube dans l'ampoule de coulée située en haut à droite du montage représenté figure 3, le robinet inférieur étant ouvert. Le tube à minéraliser et l'ampoule de coulée sont rincés et les eaux de rinçage récupérées.

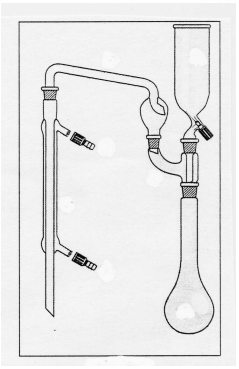


Figure 3

Étape 2. Distillation (voir figure 3)

– Ajouter trois ou quatre grains de pierre ponce et deux gouttes de solution de phénolphtaléine (indicateur coloré dont la zone de virage se situe dans l'intervalle de pH : 8,0 – 9,9 et dont la forme basique est rose) dans le matras (ballon à long col) contenant le

mélange précédent et plonger le tube inférieur du réfrigérant droit dans un bécher contenant 20,00 mL de solution d'acide sulfurique à 0,0500 mol.L^{-1} et environ 60 mL d'eau.

– Verser dans l'ampoule de la soude très concentrée et faire couler jusqu'au virage au rose de la phénolphtaléine en agitant légèrement.

– Distiller pendant une vingtaine de minutes, vérifier que le distillat est neutre (papier pH) sinon distiller encore quelques minutes.

Étape 3. Titrer la solution du bécher qui a reçu le distillat par une solution de soude de concentration molaire 0,1220 mol.L^{-1} en présence de l'indicateur rouge de méthyle (zone de virage dans l'intervalle de pH : 4,2 – 6,2).

B.II.1. Justifier les mesures de précaution prises lors de l'ajout d'eau dans le tube à minéraliser refroidi.

B.II.2. Calculer le volume approximatif de soude (solution de concentration 10 mol.L^{-1}) qu'il faudra verser avant la distillation pour neutraliser l'acide sulfurique concentré introduit dans le tube à minéraliser.

B.II.3. Écrire l'équation de la réaction de l'espèce azotée avec la soude lorsque l'on verse la solution de soude dans le matras et préciser le rôle de la phénolphtaléine.

B.II.4. Écrire l'équation de la réaction mise en œuvre dans le bécher qui reçoit le distillat.

B.II.5. Sachant qu'au virage de l'indicateur, le volume versé de solution de soude est de 12,45 mL, calculer la « masse d'azote Kjeldahl » contenue dans l'échantillon et déduire la masse (en grammes) d'azote Kjeldahl par kg de sol étudié.

B.II.6. Dessiner une allure de la courbe qu'on aurait obtenue si le titrage de *l'étape 3* avait été suivi par pH-métrie (La valeur pH = 7 devra apparaître sur l'axe des ordonnées, ainsi que toutes les données disponibles).

B.III. Cinétique de la dénitrification

Des chercheurs de l'université du Manitoba au Canada ont élaboré une modélisation des phénomènes de dénitrification bactérienne dans les sols à partir de la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten (*Can. J. Soil Sci.* **1997**, *77*, 253-260).

La population microbienne impliquée et son activité respiratoire sont supposées constantes, ce qui conduit à un nombre constant d'électrons produits par unité de temps par les bactéries réductrices des composés azotés. La réduction du dioxygène s'appuyant sur des populations plus diverses, elle met en jeu un nombre d'électrons disponibles par unité de temps plus grand que celui qui concerne la réduction des espèces azotées.

La concurrence entre les accepteurs d'électrons est caractérisée par leur concentration respective, ainsi que par leur affinité pour les électrons. L'effet inhibiteur du dioxygène sur le processus de dénitrification s'explique par sa très grande affinité pour la réduction enzymatique : tant que le dioxygène est présent, les réductions des composés azotés sont trop lentes pour être observées.

Les équations des réactions de réduction successivement mises en œuvre sont écrites ci-après, les électrons étant fournis à vitesse constante par l'activité bactérienne :

$O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^- = 2\ H_2O$

$NO_3^- + 2\ H^+ + 2\ e^- = NO_2^- + H_2O$

$2\ NO_2^- + 6\ H^+ + 4\ e^- = N_2O + 3\ H_2O$

$N_2O + 2\ H^+ + 2\ e^- = N_2 + H_2O$

Ces réductions se font en présence d'enzymes spécifiques à chaque espèce chimique et on admet les mécanismes suivants pour ces catalyses enzymatiques :

$$O_2 + E_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C_1 \xrightarrow{k'_1} 2\ H_2O \qquad \text{Étape (1)}$$

$$NO_3^- + E_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} C_2 \xrightarrow{k'_2} NO_2^- \qquad \text{Étape (2)}$$

$$2\ NO_2^- + E_3 \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} C_3 \xrightarrow{k'_3} N_2O \qquad \text{Étape (3)}$$

$$N_2O + E_4 \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} C_4 \xrightarrow{k'_4} N_2 \qquad \text{Étape (4)}$$

Dans ces réactions, les E_i (avec $i = 1, 2, 3$ ou 4) sont les enzymes spécifiques à chaque espèce chimique et C_i (avec $i = 1, 2, 3$ ou 4) sont les complexes enzyme-substrat formés respectivement à partir de O_2, NO_3^-, NO_2^- et N_2O. Les k_i, k_{-i} et k'_i sont les constantes de vitesse.

Chaque espèce chimique X intervient dans le mécanisme par sa concentration molaire notée $[X]$.

B.III.1. Écrire les formules de Lewis des ions NO_3^-, NO_2^- et de la molécule N_2O (l'atome central étant un atome d'azote).

B.III.2. Exprimer $v_{disp}(O_2)$, vitesse totale de disparition du dioxygène en fonction des concentrations et constantes de vitesse nécessaires.

B.III.3. On admet que l'on peut appliquer l'approximation des états quasi-stationnaires aux complexes enzyme-substrat. Exprimer la concentration du complexe C_1 entre l'enzyme E_1 et le dioxygène en fonction des concentrations en E_1 et en O_2 et des constantes de vitesse adéquates.

B.III.4. En utilisant l'équation de conservation de l'enzyme, montrer que la concentration en C_1 peut s'exprimer :

$$[C_1] = \frac{[O_2] \cdot [E_1]_0}{K_{M1} + [O_2]}$$

où $[E_1]_0$ désigne la concentration totale en enzyme sous toutes ses formes (libre et complexant O_2) et K_{M1} une constante qu'on exprimera en fonction des constantes de vitesse adéquates.

B.III.5. En déduire l'expression de $v_{disp}(O_2)$ en fonction de $[O_2]$, $[E_1]_0$ et des constantes adéquates.

B.III.6. De la même façon, exprimer les vitesses $v_{disp}(NO_3^-)$, $v_{disp}(NO_2^-)$ et $v_{disp}(N_2O)$, respectivement vitesses de disparition de NO_3^-, de NO_2^- et de N_2O en fonction des concentrations, des constantes de vitesse adéquates et des constantes respectives K_{M2}, K_{M3} et K_{M4}, analogues à K_{M1}. On remarquera que des espèces sont formées par une étape et consommées par une autre.

B.III.7. On constate expérimentalement que les courbes représentant l'évolution des concentrations des différentes espèces réduites (O_2 et espèces azotées) dans le processus de dénitrification en fonction du temps sont assimilables à des segments de droite.

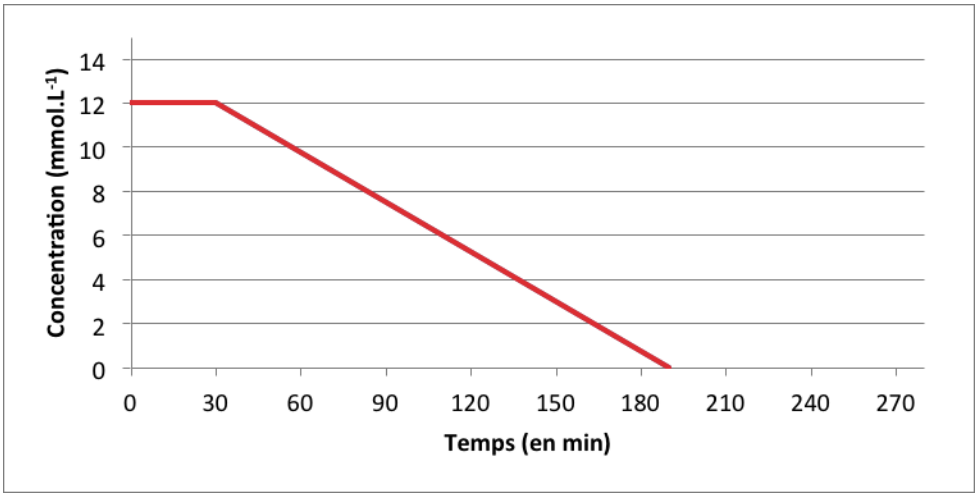
B.III.7.1. Quelle approximation peut-on effectuer dans l'expression de la vitesse $v_{disp}(O_2)$ pour rendre compte de ces résultats expérimentaux ?

B.III.7.2. Dans le cadre de cette approximation, l'enzyme est dite saturée. Que signifie cette affirmation ?

B.III.8. Il a été constaté expérimentalement que le dioxygène inhibe la réduction des ions nitrate et que les ions nitrate et nitrite inhibent celle de l'oxyde nitreux. En d'autres termes, la réduction des ions nitrate ne commence que lorsque le dioxygène a disparu presque totalement et la réduction de N_2O ne commence que lorsqu'il n'y a pratiquement plus d'ions nitrate ni d'ions nitrite. Par ailleurs la concentration en ions nitrite reste très faible et très inférieure aux autres concentrations pendant tout le processus de dénitrification.

Les conditions sont telles que la production d'électrons par les bactéries est le facteur limitant des réductions des composés azotés.

Pour des concentrations initiales de $[O_2]_0 = 8{,}0$ mmol.L^{-1} et $[NO_3^-]_0 = 12{,}0$ mmol.L^{-1} on donne ci-dessous la courbe représentative de l'évolution de la concentration en ions nitrate en fonction du temps.



B.III.8.1. Tracer sur le graphe du document réponse figurant en annexe **(à rendre avec la copie)** la courbe donnant l'évolution de la concentration en dioxygène en fonction du temps dans les conditions mentionnées ci-dessus.

B.III.8.2. Dans l'hypothèse d'un débit constant en électrons produits par les bactéries réductrices des espèces azotées, en tenant compte du nombre d'électrons échangés lors des réductions successives des composés azotés et des informations fournies ci-dessus,

tracer sur le même graphe les autres courbes représentatives des évolutions temporelles des concentrations $[NO_2^-]$, $[N_2O]$ et $[N_2]$.

B.IV. Utilisation des acides α-aminés en organocatalyse asymétrique, application à la synthèse de l'acide (–)-acanthoïque

Dans toute cette partie **B.IV**, les symboles *Me*, *Et* et *Ph* désignent respectivement les groupes méthyle, éthyle et phényle.

- **Étude de la réaction de Hajos-Parrish**

Les acides α-aminés chiraux peuvent être utilisés comme inducteurs asymétriques pour accélérer des transformations chimiques : ce procédé est qualifié « d'organocatalyse asymétrique ». Les avantages de ce procédé sont nombreux : les conditions réactionnelles ne sont généralement pas sensibles à l'humidité et à l'oxygène, les acides aminés sont facilement accessibles, de faible coût et non toxiques. L'ensemble de ces avantages peut conférer à ce type de réaction un bénéfice immense par rapport à la catalyse avec les complexes de métaux de transition pour la synthèse de composés d'intérêt médical.

Nous allons traiter dans cette partie un exemple de réaction de ce type utilisant la proline (figure 4) comme catalyseur asymétrique : il s'agit de la réaction dite de Hajos-Parrish.

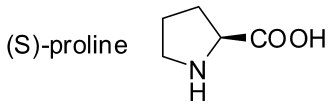


Figure 4

Au début des années 70, les chercheurs Z.G. Hajos et D.R. Parrish du groupe industriel Hoffmann-LaRoche ont mis au point une méthode de synthèse asymétrique d'intermédiaires bicycliques qui seront utilisés dans de nombreuses synthèses de composés naturels comme celle de Danishefski du Taxol® (Taxotère), un agent anticancéreux ou celle de Corey du (+)-désogestrel, le contraceptif oral de troisième génération le plus prescrit actuellement (figure 5).

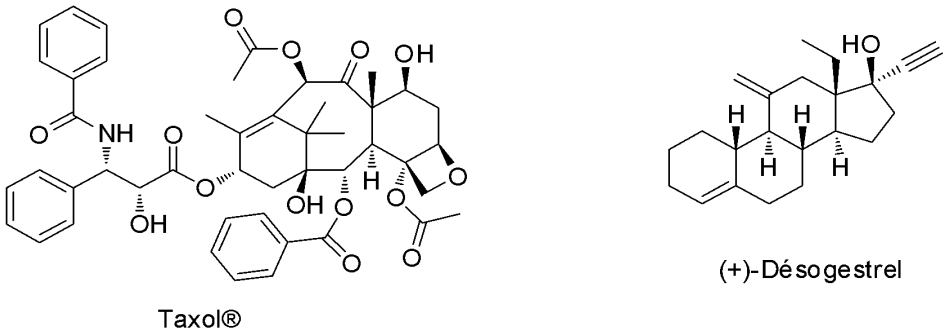


Figure 5

La réaction de Hajos-Parrish, décrite dans la figure 6, est une réaction énantiosélective de cyclisation d'une trione telle que **3**, catalysée par la proline. Le substrat trione **3** est lui-même obtenu par addition d'une énone **1** et d'une 1,3-dione **2**. Dans les conditions réactionnelles utilisées, le composé **4** formé n'est pas stable et donne le composé **5**.

On ne cherche pas à interpréter la stéréochimie de cette réaction.

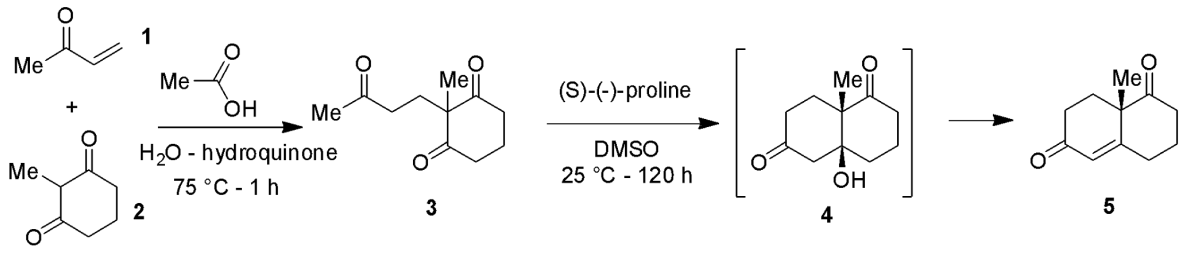


Figure 6

B.IV.1. Proposer un mécanisme en milieu basique pour la deuxième étape (passage de **3** à **4**). Comment cette réaction est-elle communément appelée ?

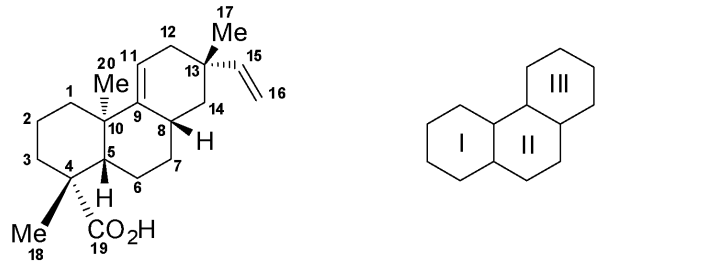
B.IV.2. Proposer un mécanisme, également en milieu basique, pour la troisième étape (passage de **4** à **5).** Comment appelle-t-on communément cette réaction ?

B.IV.3. Qu'obtiendrait-on à l'issue de la séquence réactionnelle de la figure 6 si la (*S*)-proline était remplacée par la diéthylamine ?

- **Application à la synthèse de l'acide (–)-acanthoïque**

L'acide acanthoïque représenté figure 7 est un diterpène qui a été isolé à partir de l'arbuste *Acanthopanax koreanum*, endémique de l'ile coréenne de Jeju. Le vin fabriqué à partir de l'écorce des racines de cet arbuste était utilisé par les populations locales pour ses effets analgésiques et anti-inflammatoires. Des études biologiques *in vitro* puis *in vivo* chez le rat ont permis de confirmer sans ambiguïté le potentiel anti-inflammatoire de l'acide acanthoïque, associé à une très faible toxicité et une bonne tolérance par administration orale.

- **Structure de l'acide (–)-acanthoïque**



acide (–)-acanthoïque nomenclature des trois cycles

Figure 7

Une synthèse énantiosélective de l'acide (–)-acanthoïque a été effectuée par le groupe Californien de E. A. Theodorakis en 2001 (*J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8843-8853). L'étape clé de cette synthèse est l'utilisation de la réaction de Hajos-Parrish pour former les cycles **I** et **II** (figure 7). La proline utilisée lors de cette réaction est le seul inducteur chiral de la synthèse.

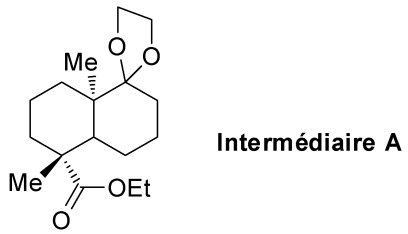
B.IV.4. Que signifie le (–) dans l'écriture acide (–)-acanthoïque ? Préciser la propriété physique associée.

B.IV.5. Combien de stéréoisomères de configuration existe-t-il de l'acide (–)-acanthoïque ?

B.IV.6. Expliciter clairement, mais succinctement, la méthode adoptée pour déterminer le descripteur stéréochimique (ou « configuration absolue ») d'un atome asymétrique. Appliquer cette méthode au cas de l'atome C_4 de l'acide (–)-acanthoïque (figure 7).

- **Synthèse de l'intermédiaire A par deux voies différentes**

Nous allons étudier une voie de synthèse effectuée par le groupe de E. A. Theodorakis et débutant par l'obtention de l'intermédiaire **A** représenté figure 8.



Intermédiaire A

Figure 8

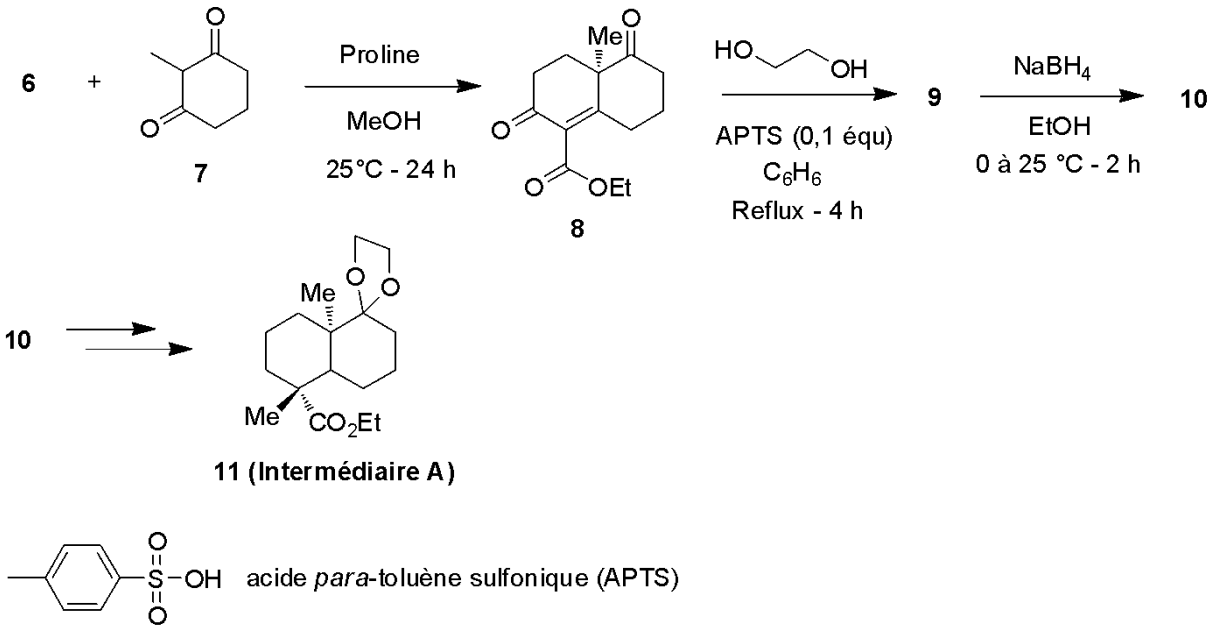


Figure 9

L'obtention de l'intermédiaire **A** (figure 9) débute par la synthèse du composé **8** à partir d'une énone **6** et de la dicétone **7** par une réaction de Hajos-Parrish (décrite figure 6).

B.IV.7. Donner la structure de l'énone **6** qui doit être utilisée pour effectuer cette synthèse.

Dans une deuxième étape, une solution du composé **8**, d'éthane-1,2-diol en excès et de 0,1 équivalent d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) dans le benzène est chauffée au reflux pendant 4 h dans un ballon équipé d'un appareil de Dean-Stark pour conduire au composé **9** de formule brute $C_{16}H_{22}O_5$.

Le produit **9** présente les caractéristiques spectroscopiques suivantes :

Nombres d'onde de deux des bandes d'absorption en spectroscopie infrarouge :

1728 et 1674 cm^{-1}

Caractéristiques des signaux obtenus en RMN du proton :

Signal	Déplacement / ppm	Multiplicité	Couplage	Intégration
S_a	4,23	quadruplet	J = 6,9 Hz	2 H
S_b	3,98-3,89	multiplet		4 H
S_c	2,46-2,41	multiplet		2 H
S_d	2,33-1,61	deux multiplets		8 H
S_e	1,34	singulet		3 H
S_f	1,25	triplet	J = 6,9 Hz	3 H

B.IV.8. Représenter le composé **9** et justifier la régiosélectivité de la réaction du passage de **8** à **9**.

B.IV.9. Attribuer les deux bandes extraites du spectre infrarouge du composé **9**.

B.IV.10. Attribuer les signaux S_a à S_f obtenus pour le composé **9** en RMN du proton, sachant que certains signaux peuvent correspondre à plusieurs groupes de protons (utiliser, entre autres, la numérotation de la figure 7 pour désigner les protons correspondants).

B.IV.11. Donner le mécanisme du passage de **8** à **9** en utilisant des notations simplifiées.

B.IV.12. Dessiner le montage utilisé lors du passage de **8** à **9** et préciser comment l'utilisation d'un appareil de Dean-Stark permet d'améliorer le rendement de la réaction.

B.IV.13. Quel est le but de cette étape par rapport à la suite de la synthèse ?

Le composé **9** est ensuite traité par le tétrahydroborate (ou borohydrure) de sodium ($NaBH_4$) dans l'éthanol absolu à 0 °C pendant deux heures ; après retour à température ambiante, le composé **10** de formule brute $C_{16}H_{24}O_5$ est obtenu. Deux autres réactions, non décrites ici, permettent d'obtenir l'intermédiaire **A** à partir du composé **10**.

B.IV.14. Donner la structure du composé **10** sans préciser la stéréochimie.

B.IV.15. Quels changements significatifs doivent apparaître sur le spectre infrarouge du composé **10** par rapport à celui du composé **9** ?

B.IV.16. Pourrait-on remplacer $NaBH_4$ par $LiAlH_4$ pour effectuer cette transformation ? Justifier.

Une autre voie de synthèse qui a permis d'obtenir l'intermédiaire **A'**, représenté sur la figure 10, (**A'** est un analogue de **A** : noter le changement au niveau de la fonction ester) débute directement de la cétone **12** similaire à la cétone **5** (figure 6). L'intermédiaire **A'** (**13**) est alors obtenu en cinq étapes non décrites ici.

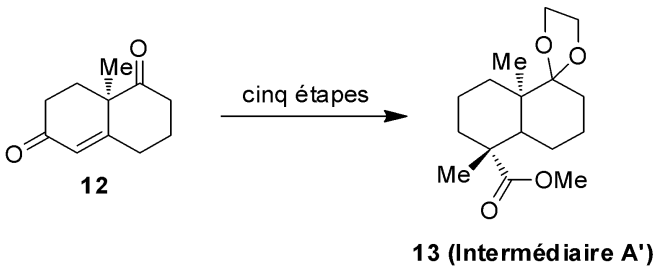


Figure 10

B.IV.17. La cétone **12** étant obtenue par une réaction de Hajos-Parrish étudiée figure 6, quelle unique modification faut-il apporter à la synthèse décrite dans la figure 6 pour obtenir le composé **12** au lieu du composé **5** ?

- **Deuxième partie de la synthèse**

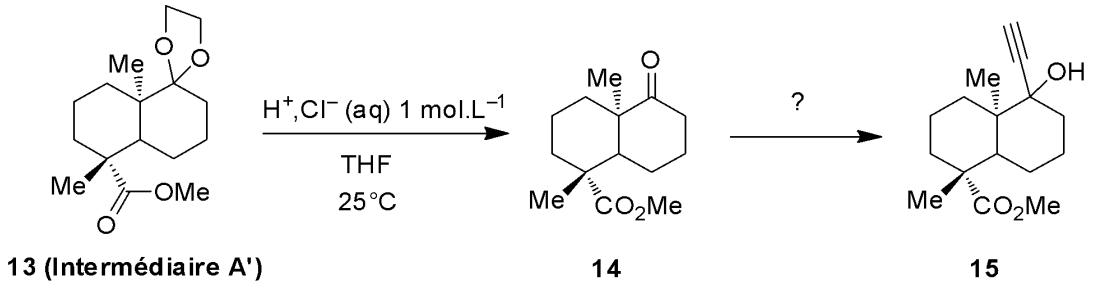


Figure 11

À une solution d'intermédiaire **A'** (**13**) dans le tétrahydrofurane (THF), une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 mol.L^{-1} est ajoutée goutte-à-goutte à 25 °C sous agitation. L'évolution de la transformation est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) ce qui permet de l'arrêter dès que le substrat **13** a entièrement disparu. Après traitement, le composé **14** est obtenu. Ce dernier est ensuite transformé en composé **15** (figure 11).

B.IV.18. Pourquoi est-il préférable d'ajouter l'acide au goutte-à-goutte et de stopper la transformation dès que le composé **13** a entièrement disparu ? Quel élément de verrerie permet cet ajout progressif ?

B.IV.19. Sur cet exemple, décrire succinctement le principe du suivi d'une transformation chimique par CCM.

B.IV.20. Comment obtenir le composé **15** à partir du composé **14** ? Proposer un (ou des) réactif(s) permettant cette transformation et indiquer les précautions expérimentales requises.

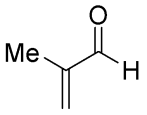
Le composé **15** est alors hydrogéné à l'aide du catalyseur empoisonné de Lindlar (palladium précipité sur du carbonate de calcium et traité par l'acétate de plomb et la quinoléine) pour conduire au composé **16**. Une solution du composé **16** est ensuite traitée successivement par le trichlorure de phosphore PCl_3 puis par la pyridine pour conduire au diène conjugué **17** de formule brute $C_{16}H_{24}O_2$.

B.IV.21. Donner la structure du composé **16**.

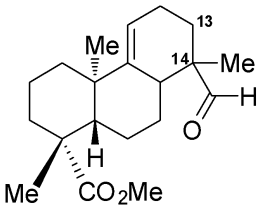
B.IV.22. Le passage du composé **16** au diène conjugué **17** est globalement une déshydratation. Montrer comment les conditions expérimentales permettent effectivement de réaliser cette transformation.

B.IV.23. Quelles sont les conditions usuelles de déshydratation d'un alcool ? Pourquoi ces conditions ne sont-elles pas applicables ici ?

L'action de la méthacroléine **18** sur le diène **17** conduit alors quantitativement au composé **19**, représenté sur la figure 12, permettant ainsi la formation du cycle **III** de l'acide (–)-acanthoïque.



18



19

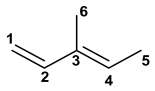
Figure 12

B.IV.24. Quel est le nom de la réaction du passage de **17** à **19** ?

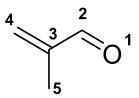
La régiosélectivité de cette réaction n'est pas satisfaisante puisque les substituants du cycle **III** sont positionnés sur l'atome de carbone 14 au lieu du 13 (figure 12). On cherche à interpréter cette régiosélectivité : on donne ci-dessous les énergies et les formes des orbitales moléculaires (OM) frontières du composé **17** modélisé par le (*E*)-3-méthylpenta-1,3-diène et de la méthacroléine (composé **18**) calculées par la méthode de Hückel simple.

HO : orbitale la plus haute occupée ; **BV** : orbitale la plus basse vacante ; C_i ou O_1 : coefficient de l'orbitale atomique relative à l'atome C_i ou O_1

- (*E*)-3-méthylpenta-1,3-diène

	OM	**Énergie**	**C_1**	**C_2**	**C_3**	**C_4**	**C_5**	**C_6**
	**HO**	$\alpha + 0{,}45\,\beta$	0,55	0,24	–0,44	–0,58	0,26	0,20
	BV	$\alpha - 0{,}70\,\beta$	0,60	–0,42	–0,30	0,58	–0,15	0,08

- Méthacroléine **18**

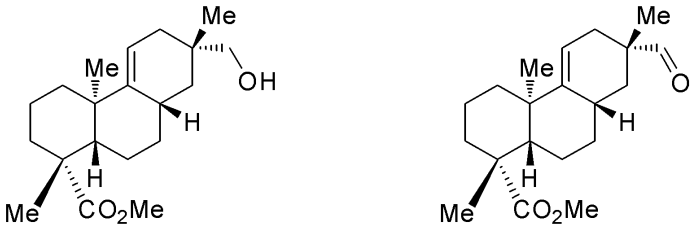
	OM	**Énergie**	**O_1**	**C_2**	**C_3**	**C_4**	**C_5**
	**HO**	$\alpha + 0{,}86\,\beta$	0,47	–0,07	–0,53	–0,62	0,33
	BV	$\alpha - 0{,}36\,\beta$	0,44	–0,60	–0,23	0,63	0,07

B.IV.25. Identifier les orbitales moléculaires permettant l'interaction orbitalaire la plus favorable entre les deux réactifs. Justifier.

B.IV.26. Prévoir le produit majoritaire obtenu par réaction entre le (*E*)-3-méthylpenta-1,3-diène et de la méthacroléine dans l'hypothèse d'un contrôle orbitalaire (contrôle frontalier). Justifier la démarche adoptée.

B.IV.27. En déduire si cette modélisation permet de rendre compte de la régiosélectivité observée lors de la réaction de passage de **17** à **19**.

Le groupe de E.A.Theodorakis a alors dû modifier sa stratégie de synthèse afin d'obtenir la régiosélectivité requise pour obtenir ultérieurement l'acide acanthoïque. Le début de cette nouvelle voie, non décrite ici, a permis d'obtenir l'alcool **20,** représenté sur la figure 13, en sept étapes à partir du composé **15** obtenu précédemment. L'alcool **20** est ensuite transformé en l'aldéhyde **21** (figure 13). Ce dernier est alors traité par l'ylure de phosphore $H_2C{=}PPh_3$ dans le THF pour donner le composé **22** de formule brute $C_{21}H_{32}O_2$. Le composé **22** est enfin transformé en acide acanthoïque dans une dernière étape.



20 **21**

Figure 13

B.IV.28. Proposer un réactif permettant le passage de l'alcool **20** à l'aldéhyde **21**. De quel type de réaction s'agit-t-il ?

B.IV.29. Donner la structure du composé **22**. Quel est le nom de la réaction du passage de **21** à **22** ?

B.IV.30. Proposer une synthèse en plusieurs étapes de l'ylure de phosphore $H_2C{=}PPh_3$ à partir de d'iodométhane et de composés de votre choix.

B.IV.31. Proposer une méthode pour passer du composé **22** à l'acide (–)-acanthoïque.

Partie C : l'azote dans l'hydrosphère

Les concentrations en ions nitrate dans les eaux deviennent préoccupantes dans certaines régions du fait d'une mauvaise gestion dans l'utilisation des engrais et l'épandage des lisiers. À haute dose, les ions nitrate peuvent causer hypertension artérielle, hypothyroïdie…

Le principal danger provient de leur réduction en ions nitrite dans notre tube digestif par action enzymatique. Les ions nitrite sont en effet doublement dangereux :

– ils peuvent transformer l'hémoglobine en méthémoglobine, ce qui empêche les globules rouges de transporter l'oxygène : c'est une sorte d'asphyxie à laquelle les nourrissons sont plus sensibles que les adultes ;

– ils peuvent se combiner à des amines dans l'estomac (milieu acide) pour former des nitrosamines reconnues comme cancérogènes.

L'OMS recommande de ne pas ingérer plus de 3,6 mg de nitrates par kg et par jour. Compte tenu des autres apports, les teneurs en nitrates dans l'eau de consommation courante ont donc été limitées par une directive européenne à 15 $mg.L^{-1}$ dans la préparation des aliments pour nourrissons et à 50 $mg.L^{-1}$ pour une eau déclarée potable.

On propose d'abord de doser les ions nitrate dans une eau de consommation par une méthode spectrophotométrique, puis dans une solution aqueuse plus concentrée par une méthode électrochimique.

C.I. Dosage des ions nitrate par spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Principe du dosage

Les ions nitrate sont d'abord réduits en ions nitrite par passage de la solution dans une colonne de chromatographie contenant des grains de cadmium recouverts de cuivre. Les ions nitrite obtenus réagissent en milieu acide (sous forme d'acide nitreux) avec le sulfanilamide ou 4-aminobenzène sulfonamide pour former un sel de diazonium qui subit un couplage avec le NED ou N-(1-Naphtyl)ÉthylèneDiamine. On obtient enfin un composé diazoïque de couleur rose susceptible d'être dosé par spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

Mode opératoire

Un échantillon d'eau de ville est traité sur la colonne Cu/Cd, puis est recueilli dans un bécher. On prélève alors 5,00 mL de cette solution qu'on introduit dans une fiole jaugée de 100,0 mL notée *X*. On y ajoute 1 mL de réactif de diazotation, en excès, qui permet la transformation totale des ions nitrite en composé diazoïque et on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Une solution étalon à 20,00 $mg.L^{-1}$ d'ions nitrate subit la même réduction sur la colonne Cu/Cd et la solution réduite permet de préparer une série de fioles jaugées de 100,0 mL notées 0, 1, 2, 3 et 4 selon les mélanges indiqués dans le tableau 1 :

Fiole	0	1	2	3	4		*X*
Volume de solution réduite / mL	0,00	2,00	4,00	6,00	8,00		5,00
Réactif de diazotation / mL	1	1	1	1	1		1
Eau distillée	Q s p 100,0 mL						
Absorbance	0,000	0,251	0,524	0,782	1,031		0,657

Tableau 1

Après quinze minutes d'attente, une partie de la solution contenue dans chaque fiole est transférée dans une cuve de longueur l =1,00 cm qui est placée dans le spectrophotomètre. Les absorbances sont mesurées à la longueur d'onde λ = 540 nm, et les résultats de mesure pour chaque solution sont indiqués dans le tableau 1.

C.I.1. Comment la longueur d'onde λ = 540 nm a-t-elle été choisie pour cette mesure ?

C.I.2. La solution étalon d'ions nitrate à 20,00 mg.L^{-1} a été préparée à partir de nitrate de potassium pur. Proposer un mode opératoire pour préparer 200,0 mL de cette solution.

C.I.3. Absorbance de l'échantillon

C.I.3.1. Donner la définition de l'absorbance d'un échantillon.

C.I.3.2. La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée pour les solutions contenues dans les fioles 0 à 4 ? Justifier.

C.I.4. Déterminer la concentration massique en ions nitrate de l'eau de ville. Cette eau est-elle potable (du point de vue des nitrates) ?

C.II. Titrage des ions nitrate par potentiométrie à courant imposé

On envisage le titrage des ions nitrate (dans le bécher) par les ions fer (II) (dans la burette) en milieu acide sulfurique.

La solution d'ions fer (II) est une solution de sel de Mohr (composé de formule $FeSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, 6 H_2O, de masse molaire M = 392,13 g.mol^{-1}, totalement soluble dans le milieu utilisé pour le titrage) préparée en dissolvant 5,4702 g de ce sel dans une fiole jaugée de 200,0 mL dans une solution d'acide sulfurique à 6 mol.L^{-1}.

À la prise d'essai de volume V_0 = 5,00 mL de la solution contenant les ions nitrate à doser, on ajoute 10 mL d'acide sulfurique concentré.

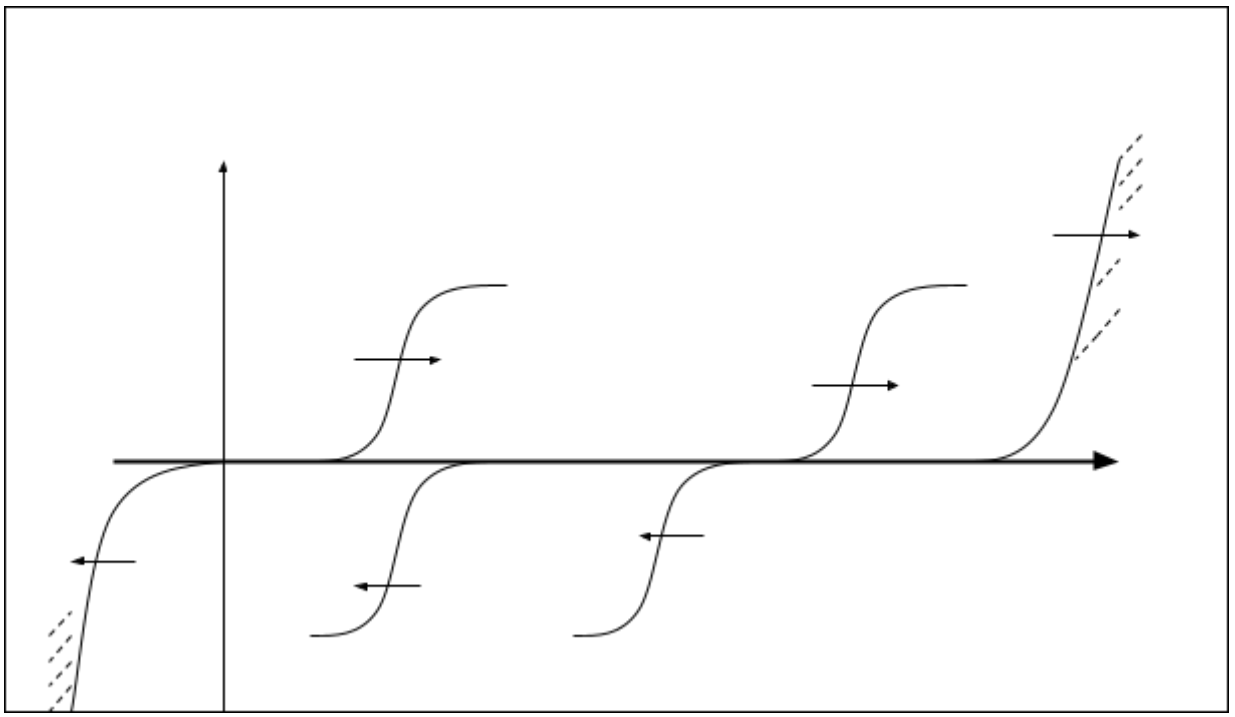
C.II.1. Exploitation du titrage

C.II.1.1. Écrire l'équation de la réaction de titrage et calculer sa constante d'équilibre à 298 K.

C.II.1.2. Déterminer la concentration molaire en ions nitrate de la solution à doser sachant que le volume de la solution de sel de Mohr versé à l'équivalence est $V_{éq}$ = 4,95 mL.

C.II.2. Détermination expérimentale du volume $V_{éq}$ versé à l'équivalence

La position relative de chacune des courbes intensité-potentiel sur électrode de platine est représentée sur le graphe ci-dessous :



C.II.2.1. Que peut-on dire du système Fe^{3+} / Fe^{2+} et du système NO_3^- / NO sur électrode de platine ?

C.II.2.2. Donner l'allure de la courbe intensité-potentiel sur électrode de platine du mélange dans le bécher pour des volumes versés de la solution d'ions Fe^{2+} suivants :

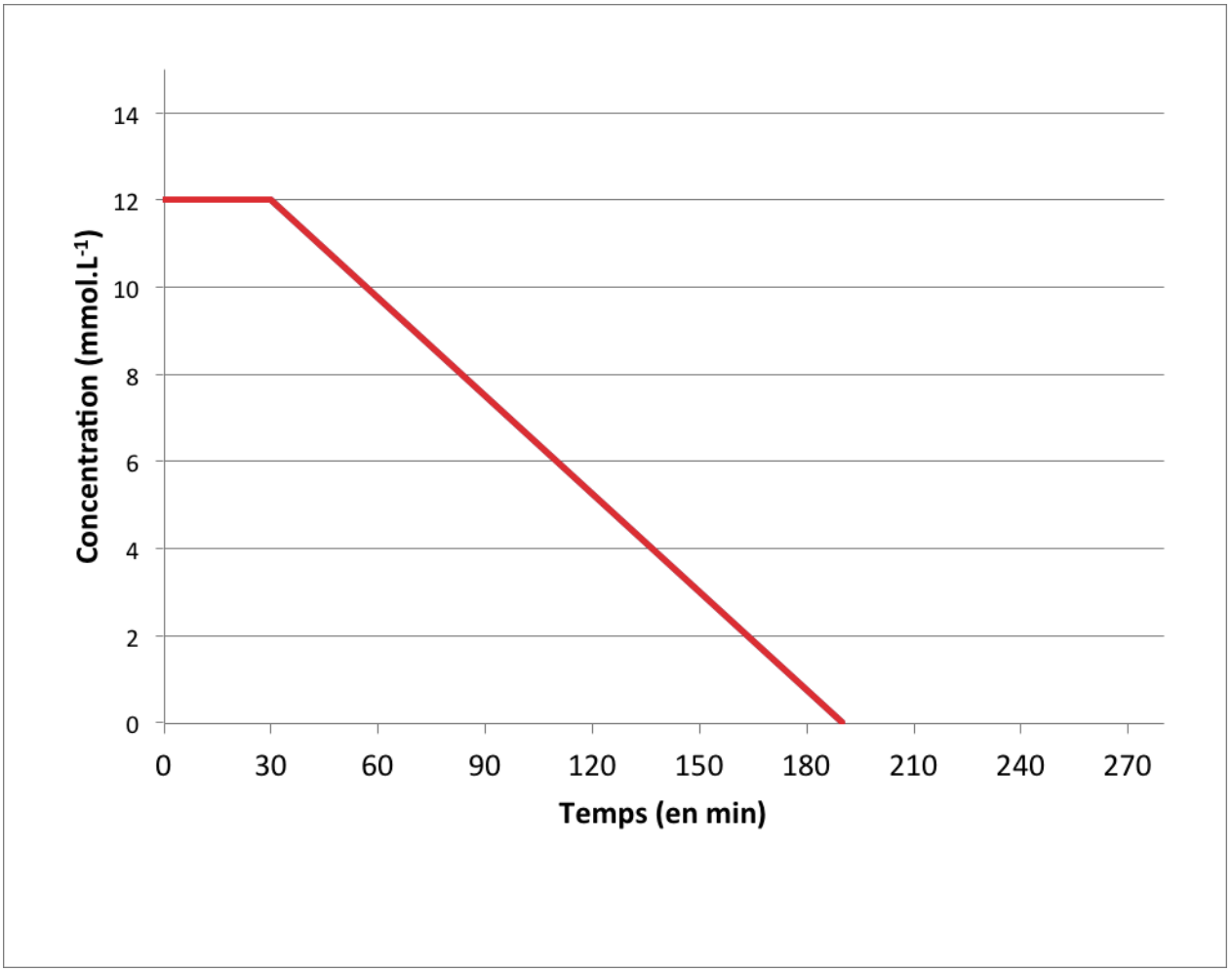
$V = 0$; $0 < V < V_{éq}$; $V = V_{éq}$ et $V > V_{éq}$.

Préciser sur chaque vague les espèces qui sont réduites ou oxydées à l'électrode de platine.

C.II.3. On introduit deux électrodes de platine dans la solution d'ions nitrate à doser contenue dans le bécher, puis on fait passer entre elles un courant fixe, non nul mais de très faible intensité. La différence de potentiel ΔE entre ces électrodes est mesurée lors de l'ajout de la solution titrante. Donner l'allure de la courbe représentant l'évolution de ΔE en fonction du volume V versé, en précisant la position du volume équivalent $V_{éq}$.

Annexe

A rendre avec la copie



Courbe représentant l'évolution de la concentration en ions nitrate en fonction du temps