

## Autour de l'héparine

L'héparine est un polysaccharide sulfaté qui possède des propriétés antithrombiques et anticoagulantes. Cette molécule fait partie de la famille des glycosaminoglycanes.

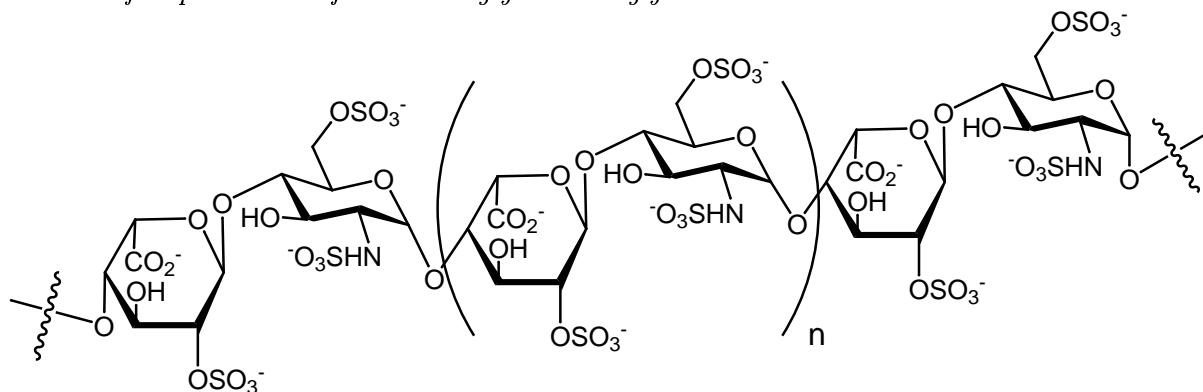


Figure 1 : structure de l'héparine

Depuis plusieurs années, les traitements anticoagulants sont utilisés dans de nombreuses affections cardiovasculaires. Les limites du traitement conventionnel par l'héparine extraite de la muqueuse intestinale de porc (et purifiée bien entendu...) ont motivé la recherche sur les héparines de faible masse moléculaire.

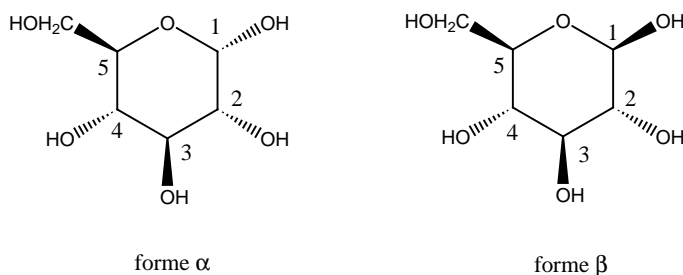
Nous allons nous intéresser dans ce sujet à l'étude de l'héparine et à la synthèse d'analogue d'héparine de faible masse moléculaire. Nous étudierons successivement les fragments qui constituent l'héparine, les phénomènes de reconnaissance enzyme-substrat, d'inhibition et de catalyse.

De nombreuses questions sont totalement indépendantes. Les différentes parties peuvent être traitées dans n'importe quel ordre, une fois admis certains résultats des questions précédentes.

## 1 Reconnaissance de l'héparine par l'antithrombine III

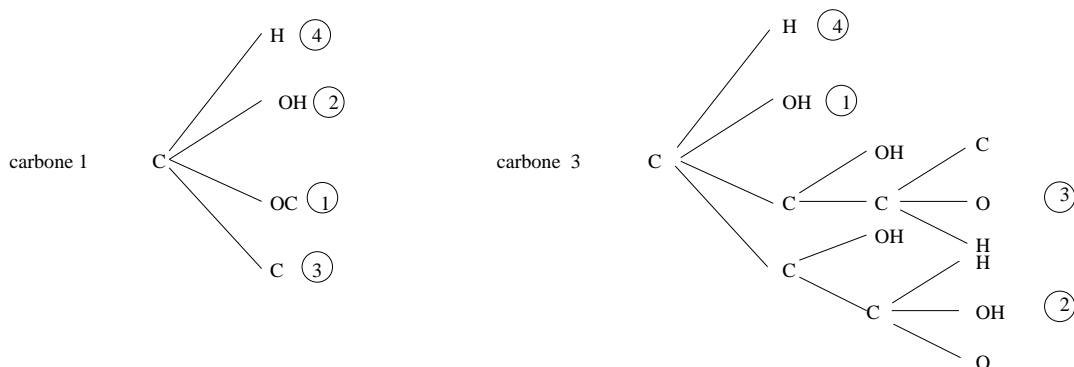
### 1.1 Préliminaires

Nous allons dans un premier temps étudier le glucose qui est l'élément constitutif de l'héparine. Le D-glucose peut exister sous deux formes (anomères), la forme  $\alpha$  et la forme  $\beta$  :



1. Indiquer en les justifiant les configurations absolues des carbones asymétriques 1 et 3 de la forme  $\alpha$ .

On utilise pour déterminer la configuration absolue des atomes de carbones 1 et 3 les règles de Cahn Ingold et Prelog.

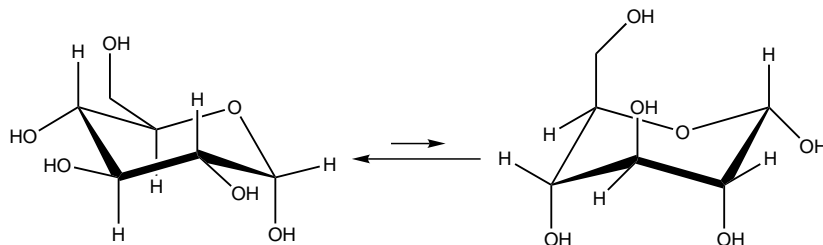


Pour l'atome de carbone 1, on peut, grâce aux atomes de rang 1, identifier les substituants numéro **3** et **4**. Pour identifier **1** et **2**, il faut aller aux atomes de rang 2 portés par les atomes d'oxygènes. On peut alors attribuer sans aucun problème le substituant **1** qui est l'atome d'oxygène qui porte l'atome de carbone, celui qui porte l'atome hydrogène est donc le numéro **2**. Pour l'atome de carbone 3 on peut aussi identifier grâce aux atomes de rang 1 les substituants **4** et **1**. Pour le numéro **2** et **3**, il faut aller jusqu'aux atomes de rang 3, où un atome de carbone porte deux atomes d'oxygènes tandis que l'autre porte un seul atome d'oxygène.

On déduit que la configuration de l'atome de carbone 1 est (*S*) et que celle de l'atome de carbone 3 est (*S*).

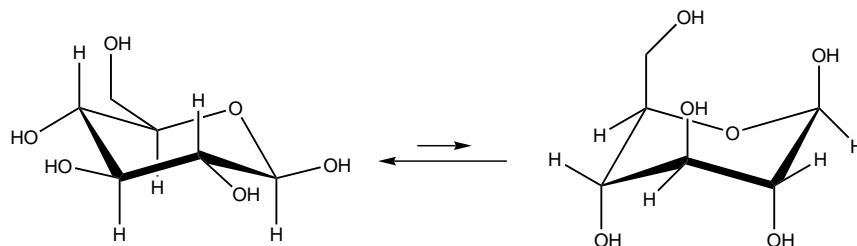
2. En étudiant les différents conformères possibles pour les deux formes, déduire quelle forme  $\alpha$  ou  $\beta$  est la plus stable.

Pour la forme  $\alpha$ , on a l'équilibre suivant :



Dans les cycles à 6 atomes les interactions (la répulsion stérique) les plus défavorables sont les interactions 1,3-diaxiales. Les conformères les plus stables seront ceux dans lesquels les substituants sont en majorité (selon la "taille" des groupes) en position équatoriale. Dans la forme  $\alpha$ , on peut conclure que la forme majoritaire est celle de gauche, car c'est le conformère dans lequel il y a le moins d'interactions 1,3-diaxiales.

Pour la forme  $\beta$ , on a :



Comme pour le cas précédent, on peut déduire que la forme chaise de gauche est la plus stable.

Pour savoir quelle forme,  $\alpha$  ou  $\beta$ , est la plus stable, il faut donc comparer la stabilité relative des conformères les plus stables pour les deux formes.

Dans le glucose  $\alpha$ , le groupe hydroxyle porté par le carbone 1 est en position axiale, alors qu'il est en position équatoriale dans la forme  $\beta$ . C'est donc la forme  $\beta$  qui est la plus stable.

3. On dissout de l' $\alpha$ -D-glucose dans de l'eau **acidifiée**. Après un certain temps s'établit un équilibre entre les formes  $\alpha$  et  $\beta$ . Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]$  de ce mélange est  $[\alpha] = 52,5^\circ \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

- (a) Quelles espèces sont optiquement actives ?

Les espèces optiquement actives sont celles qui ne possèdent pas d'axe de symétrie inverse d'ordre  $n$ . En pratique, cela se traduit souvent par l'absence de plan ou de centre de symétrie.

- (b) Comment a-t-on mesuré  $[\alpha]_\alpha$  ? De quoi dépend-il ?

On a mesuré  $[\alpha]_\alpha$  à l'aide d'un polarimètre.  $[\alpha]_\alpha$  dépend principalement de l'espèce optiquement active, de la concentration, de la température, du solvant ainsi que de la source lumineuse utilisée (ie de la longueur d'onde incidente).

- (c) Pourquoi n'a-t-on pas  $[\alpha]_\alpha = -[\alpha]_\beta$  ?

Seuls les énantiomères possèdent des pouvoirs rotatoires spécifiques égaux en valeur absolue et de signes opposés. Or ici  $\alpha$  et  $\beta$  sont des diastéréoisomères, leurs pouvoirs rotatoires spécifiques ne sont pas opposés.

- (d) Calculer les valeurs des proportions à l'équilibre des formes  $\alpha$  et  $\beta$ .

On utilise la loi de Biot :  
 $\alpha_{\text{obs}} = l([\alpha] + [\beta])[\alpha]_{\text{mél}} = l([\alpha]_\alpha[\alpha] + [\alpha]_\beta[\beta])$  où  $l$  correspond à la longueur de la cuve (en cm).

On en déduit si on pose  $x_\alpha = \frac{[\alpha]}{[\alpha] + [\beta]}$  et  $x_\beta = \frac{[\beta]}{[\alpha] + [\beta]}$  :

$$\begin{cases} [\alpha]_\alpha x_\alpha + [\alpha]_\beta x_\beta = [\alpha]_{\text{mél}} \\ x_\alpha + x_\beta = 1 \end{cases}$$

Donc  $x_\alpha = \frac{[\alpha]_{\text{mél}} - [\alpha]_\beta}{[\alpha]_\alpha - [\alpha]_\beta}$  et  $x_\beta = \frac{[\alpha]_\alpha - [\alpha]_{\text{mél}}}{[\alpha]_\alpha - [\alpha]_\beta}$ .

A.N :  $x_\alpha = 0,36$  et  $x_\beta = 0,64$ .

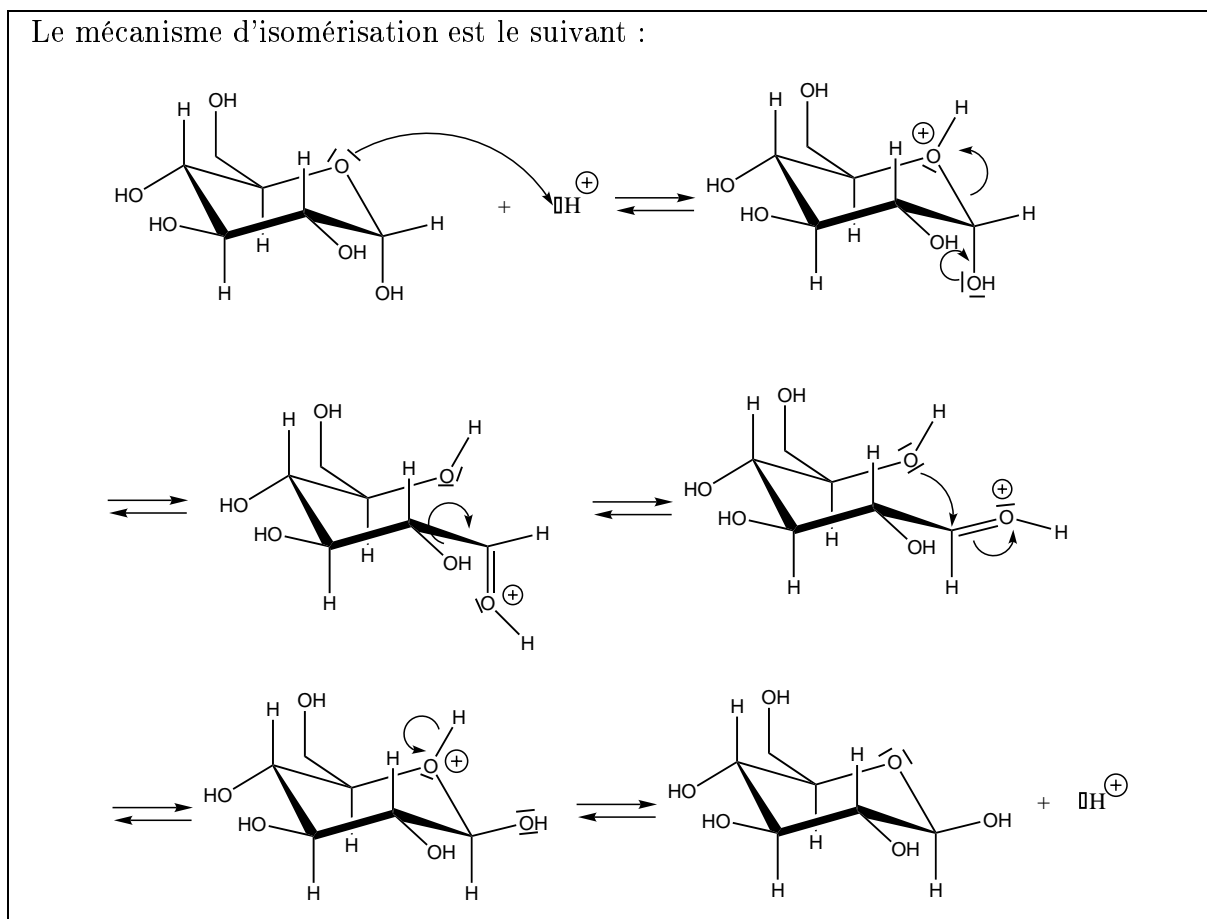
Données :  $[\alpha]_\beta = 18,7^\circ \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  et  $[\alpha]_\alpha = 112^\circ \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

- (e) Proposer un mécanisme permettant d'expliquer la formation de la forme  $\beta$  à partir de la forme  $\alpha$ . (on observera que les deux molécules sont des héli-acétals)

Le mécanisme de l'isomérisation fait intervenir plusieurs étapes successives :

- On a dans un premier temps une réaction acide-base qui permet d'activer la formation du carbonyle en augmentant le caractère nucléofuge du groupe hydroxy ;
- On a ensuite rotation de la liaison simple C-C qui permet de faire passer le groupe carbonyle d'une position axiale à une position équatoriale ;
- La dernière étape correspond à la cyclisation par addition de l'atome d'oxygène du groupe hydroxy sur le carbonyle, suivie de la régénération du catalyseur acide.

Le mécanisme d'isomérisation est le suivant :



## 1.2 Étude conformationnelle

Le polysaccharide possède, en plus de cette zone régulière (figure 1), des régions irrégulières (figure 2) provenant de l'action incomplète d'enzymes lors de la biosynthèse. Ces régions qui se découpent en 5 unités D, E, F, G et H sont responsables des activités biologiques comme l'activité anticoagulante.

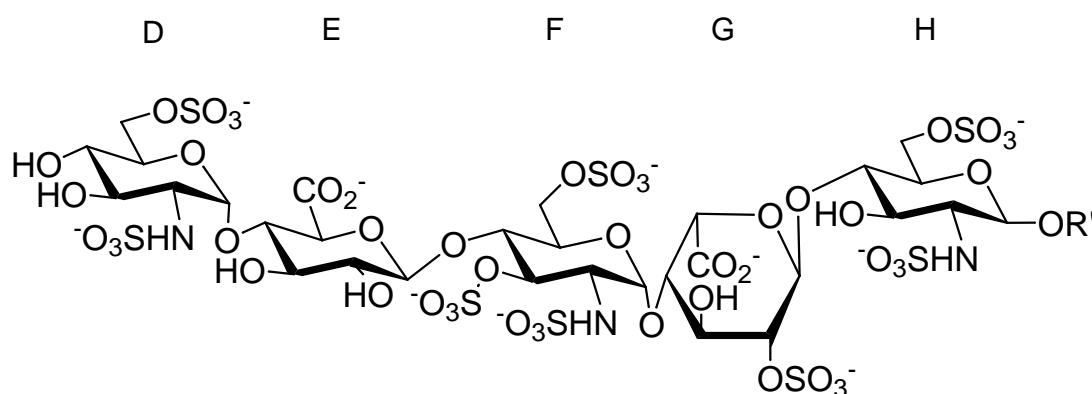
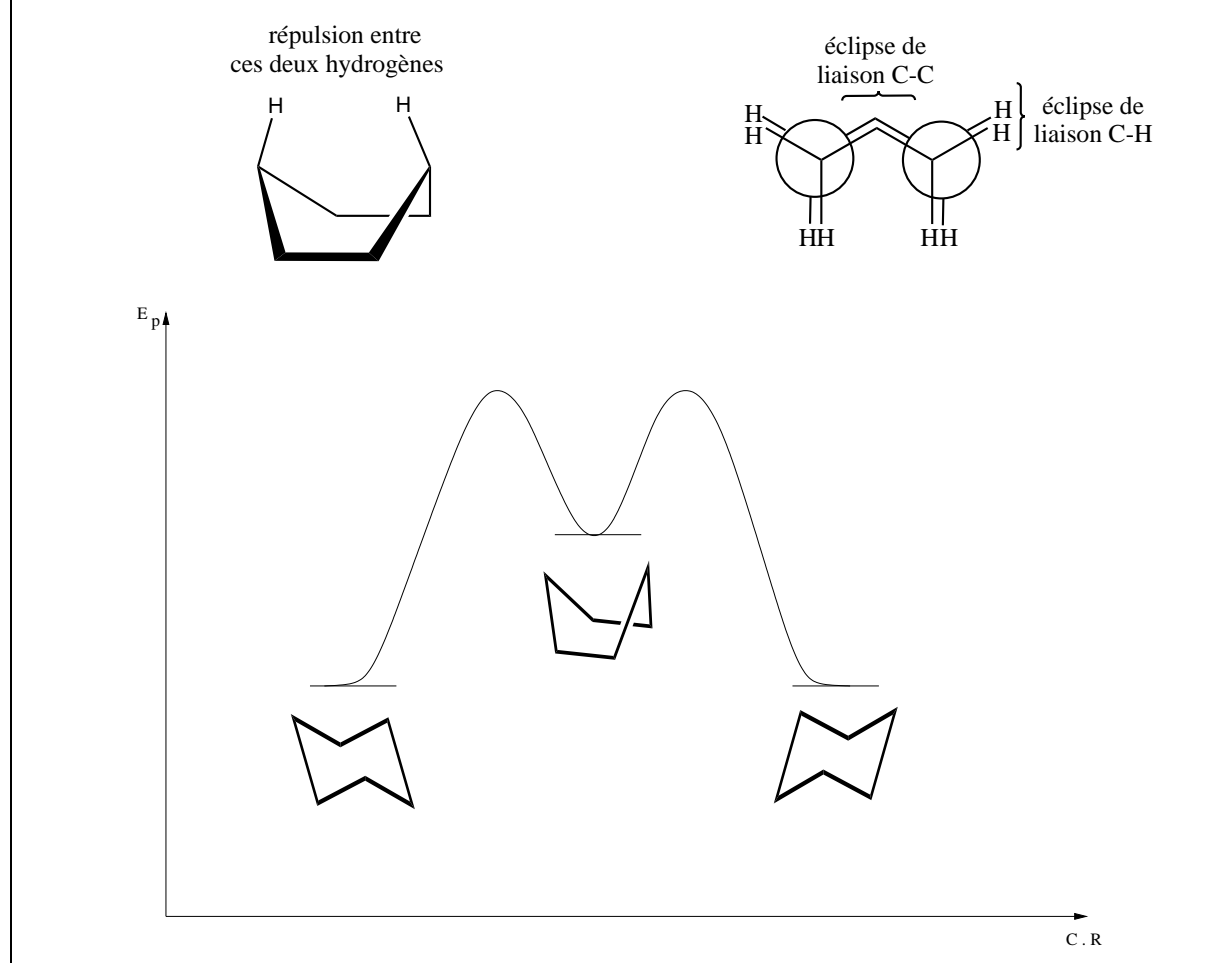


figure 2 : zone irrégulière de l'héparine

### 1.2.1 Étude énergétique

1. Représenter les deux conformères classiques du cyclohexane. Les placer dans un diagramme d'énergie en fonction de la coordonnée réactionnelle, en justifiant votre réponse.

Dans ce diagramme, apparaît le cyclohexane sous forme chaise et sous forme bateau. Le conformère sous forme bateau est moins stable que la forme chaise parce qu'il y a une déstabilisation importante due à gêne stérique entre les atomes d'hydrogène de la proue et celui de la poupe, ainsi qu'à la tension d'éclipse des liaisons C-C et C-H qui n'apparaît pas dans la forme chaise.



2. En fait, on peut montrer qu'il existe d'autres conformations. Ces conformations sont les suivantes :

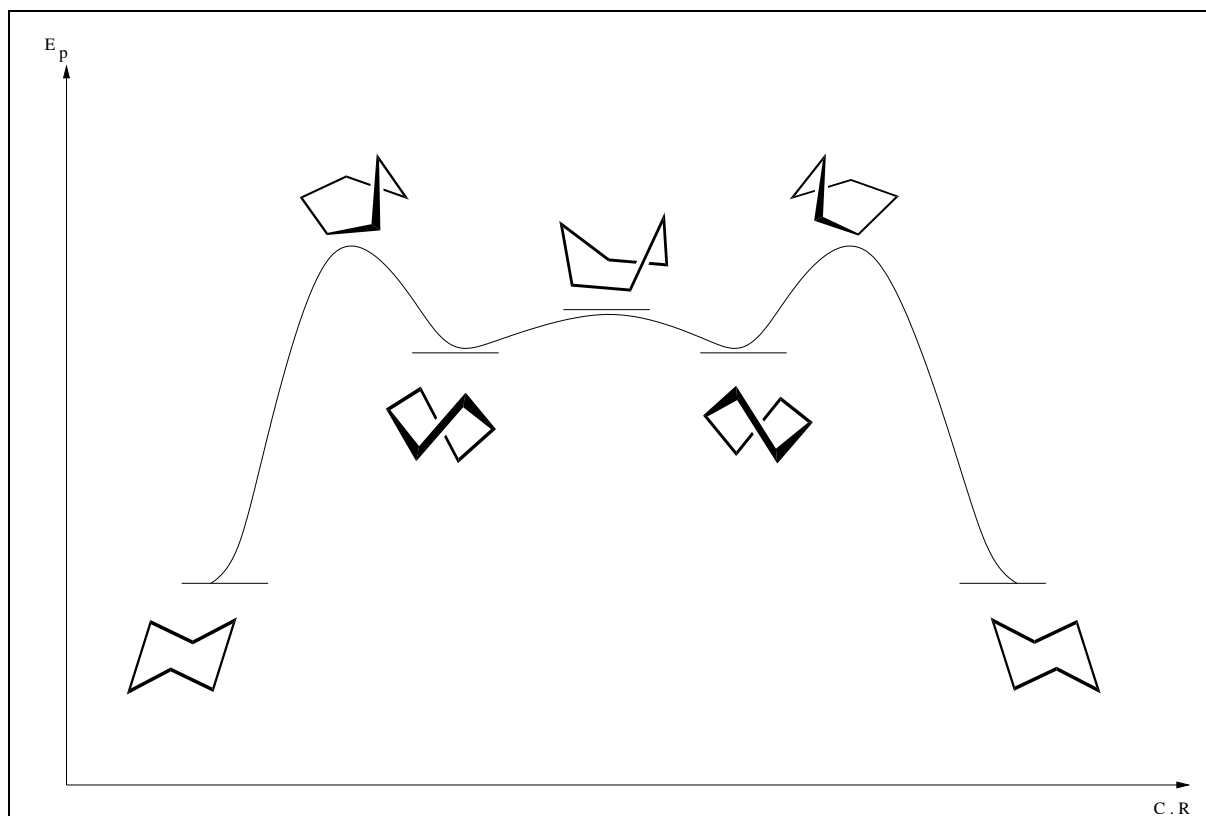


enveloppe



bateau croisé

Comment le diagramme précédent doit-il être modifié pour introduire ces deux nouvelles formes ? Justifier votre réponse.



Pour classer en énergie les différentes conformations possibles du cyclohexane, il va falloir prendre en compte le fait que les éclipses de liaisons sont énergétiquement défavorables.

La chaise est la plus stable car elle ne fait intervenir aucune éclipse de liaison. Il va donc maintenant falloir comparer la stabilité relative du bateau, du bateau croisé et de l'enveloppe.

- Comparaison bateau/bateau croisé : dans le bateau les liaisons C-C et C-H établies par les atomes de carbone qui appartiennent au même plan sont éclipsées, on a de plus une interaction entre les atomes d'hydrogène de la proue et celui de la poupe. Comme dans le bateau croisé, on a pas l'interaction entre ces atomes d'hydrogènes, et que les éclipses de liaisons C-C et C-H sont moins nombreuses, on peut donc conclure que le bateau croisé est plus stable.
- Comparaison bateau/enveloppe : la forme enveloppe est moins stable que le bateau, parce qu'elle possède 5 carbones dans un même plan, ce qui fait que l'on a un plus grand nombre de liaisons qui s'éclipsent, ainsi que des contraintes angulaires importantes.

### 1.2.2 Étude à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire

La structure cristalline du complexe héparine-antithrombine III, a permis de montrer que pour que l'interaction entre l'héparine et l'antithrombine ait lieu, l'unité G (figure 2) devait être dans une conformation spéciale.

Les différentes conformations possibles de l'unité G de l'héparine (représentées sur la figure 3) peuvent être identifiées à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN) via la mesure des constantes de couplage  $^3J_{HH}$ .

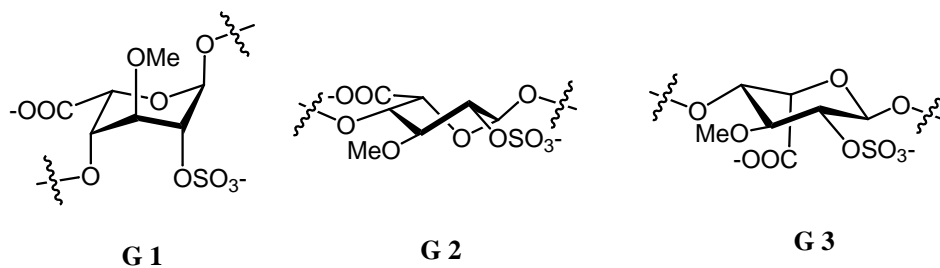
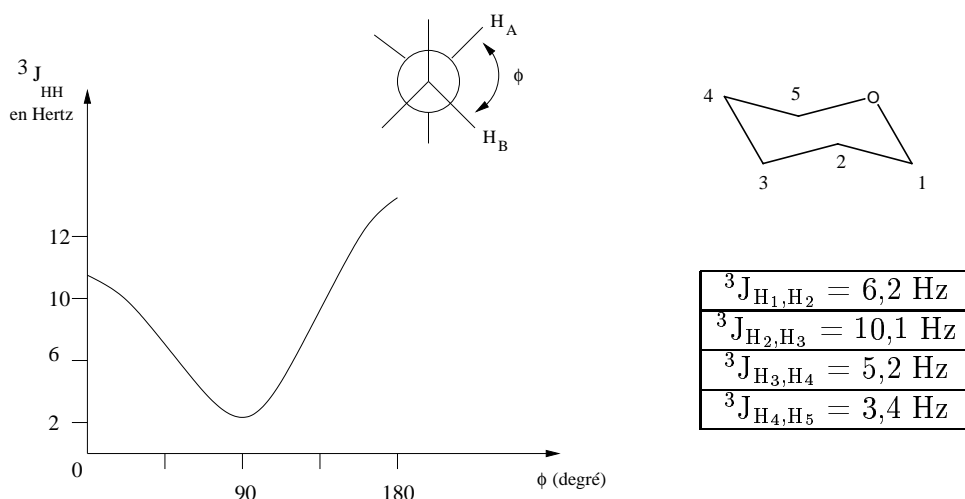


figure 3 : conformations possibles de l'unité G



On précise que  $H_i$  correspond au noyau d'hydrogène (proton) lié au carbone  $i$ , que les constantes de couplage (tableau précédent) sont obtenues de manière expérimentale, tandis que la construction de la courbe repose sur un modèle théorique simplifié.

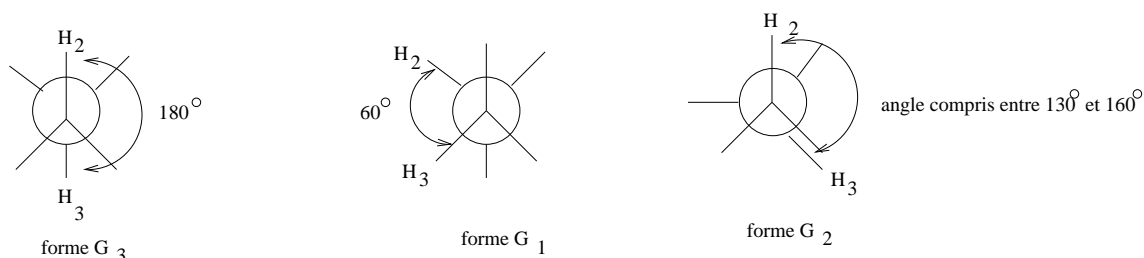
1. Expliquer à quoi correspond  ${}^3J_{HH}$ .

${}^3J_{HH}$  correspond à l'intensité du couplage scalaire entre les moments magnétiques de deux noyaux d'hydrogène séparés dans la molécule par 3 liaisons.  ${}^3J_{HH}$  s'exprime en hertz.

2. Confronter les résultats de la RMN avec les différentes conformations possibles. Identifier la conformation correspondante .

Pour identifier la conformation de l'unité G à l'aide de la mesure des constantes de couplage on va étudier principalement  ${}^3J_{H_2,H_3}$ .

Dans la forme  $G_1$  les protons 2 et 3 sont en position décalée (angle de  $60^\circ$ ), donc si on se réfère à la courbe de Karplus, on devrait avoir une constante de couplage  ${}^3J_{H_2,H_3}$  de l'ordre de 3 Hz. Pour la forme  $G_3$  les protons 2 et 3 sont quant à eux en position anti (angle de  $180^\circ$ ), on devrait donc avoir une constante de couplage de l'ordre de 14 Hz. Expérimentalement on mesure une constante de couplage  ${}^3J_{H_2,H_3}$  égale à 10.1 Hz. On peut donc en déduire que l'unité G n'est ni sous la forme  $G_1$ , ni sous la forme  $G_3$ . L'unité G est donc sous la forme  $G_2$ .



## 3. Le résultat précédent était-il prévisible ?

Le résultat suivant était prévisible, puisque, dans la forme  $G_1$ , 5 substituants se trouvent en position axiale, ce qui est très défavorable.

Pour la  $G_3$ , il n'y en a qu'un seul, mais le carboxylate possède une sphère de Van Der Waals suffisamment importante pour que les interactions 1,3-diaxiales soient grandes.

Pour minimiser son énergie, le cycle à 6 atomes va alors adopter une conformation intermédiaire, dans laquelle les substituants du cycle vont se trouver dans des positions pseudo-équatoriales.

## 4. Pourquoi utilise-t-on la RMN pour étudier les différentes conformations présentes dans l'héparine alors que l'on a accès à la structure cristallographique ?

La structure cristallographique ne donne de renseignements que sur la phase solide. Il est possible que dans le cas de l'héparine, la conformation de l'unité G soit différente en solution et en phase solide.

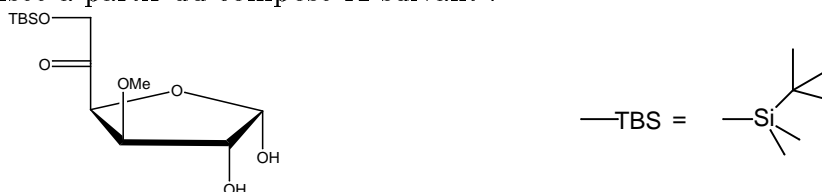
## 2 Applications

Nous avons vu quelle était la conformation des saccharides qui permettait la fixation de l'héparine sur l'antithrombine III. Nous allons maintenant nous intéresser aux applications de l'étude précédente.

### 2.1 Synthèse d'un analogue de l'héparine

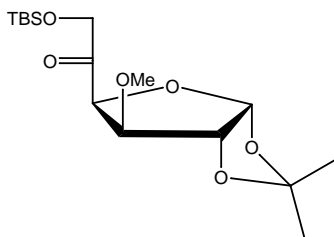
Afin de montrer que l'une des unités de l'héparine change de conformation pour faciliter sa fixation à l'antithrombine III, on réalise la synthèse d'un analogue de l'héparine dans lequel on a bloqué l'unité G dans la conformation précédemment déterminée.

La synthèse est réalisée à partir du composé **A** suivant :



Le groupe TBS représente le groupe  $-\text{Si}(\text{Me})_2^t\text{Bu}$ . C'est un groupe protecteur des alcools dont la déprotection a lieu notamment en milieu **acide aqueux**.

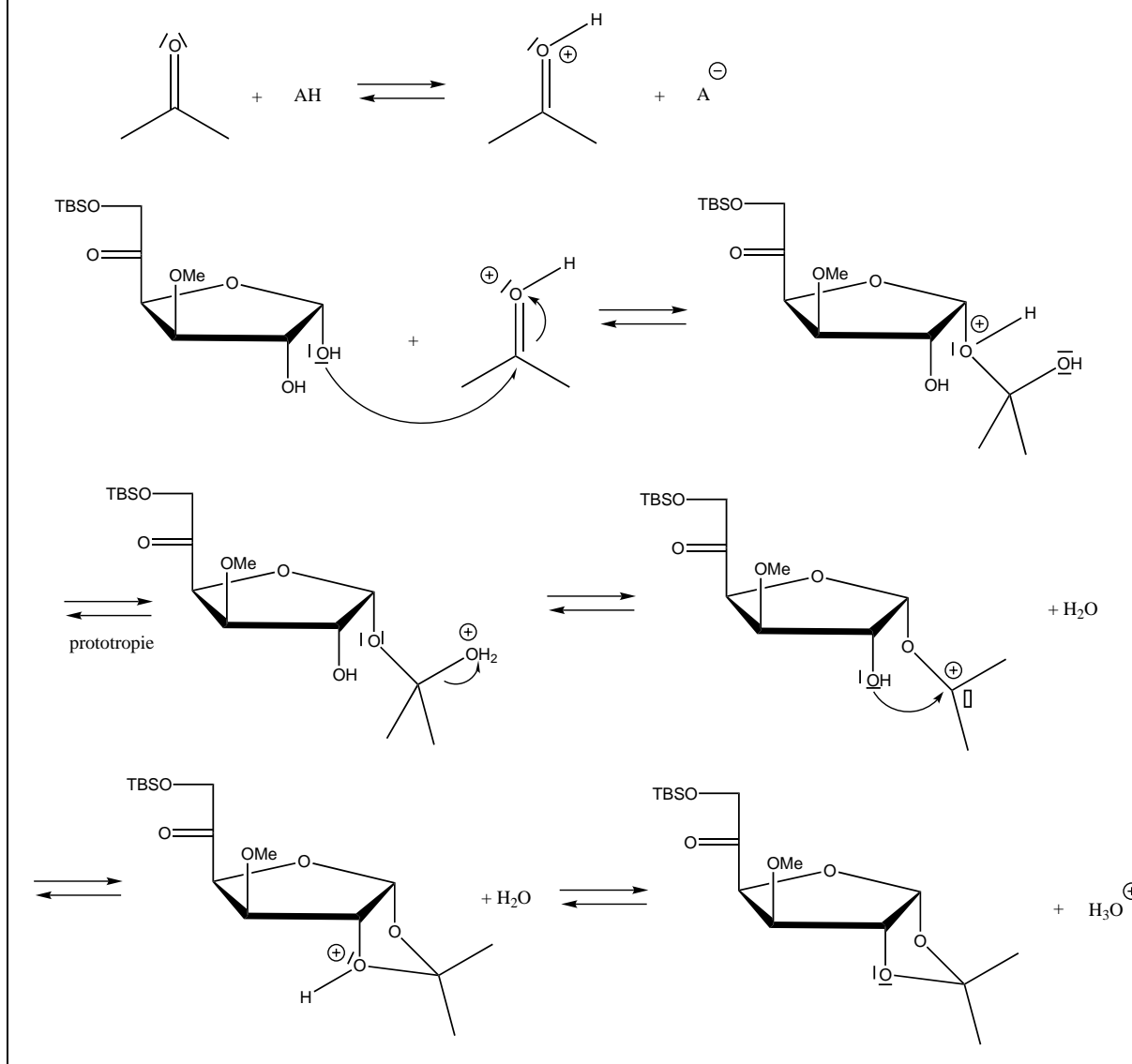
Le composé **A** est mis en présence de propanone et d'acide paratoluène sulfonique dans le toluène, à une température de 25 °C. On obtient après purification le composé **B** de formule :

1. (a) Donner le mécanisme de formation de **B**.



La réaction observée est une acétalisation qui se déroule en plusieurs étapes successives.

- On a dans un premier temps, activation en présence d'acide de l'électrophilie du groupe carbonyle de la propanone.
- On observe alors la réaction d'addition de l'alcool sur la propanone activée, suivie d'une prototropie.
- La dernière étape correspond à la formation de l'acétal cyclique, cette cyclisation se déroule en deux étapes, car la réaction de substitution nucléophile bimoléculaire étant défavorisée du fait du fort encombrement de l'atome de carbone.



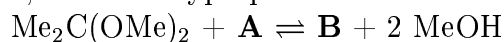
- (b) Souvent, pour réaliser la transformation **A** → **B**, on utilise un montage de DEAN-STARK. Quels en sont le principe et l'intérêt ?

La réaction de formation de l'acétal est thermodynamiquement défavorable et il faut donc déplacer l'équilibre en distillant l'eau (produit de la réaction) au fur et à mesure de sa formation. Pour cela, on utilise un montage de DEAN-STARK et, par entraînement hétéroazéotropique à l'aide du toluène, on arrive à distiller l'eau à une température plus faible que la température d'ébullition de l'eau.

- (c) Dans la pratique, on utilise du 2,2-diméthoxypropane à la place de l'acétone. Expliquer pourquoi.

L'avantage de l'utilisation du 2,2-diméthoxypropane plutôt que l'acétone est que l'on favorise la réaction d'acétalisation d'un point de vue thermodynamique, en rendant le terme entropique plus favorable.

En effet, si on écrit l'équation chimique de la réaction d'acétalisation d'un diol avec du 2,2-diméthoxypropane on a :



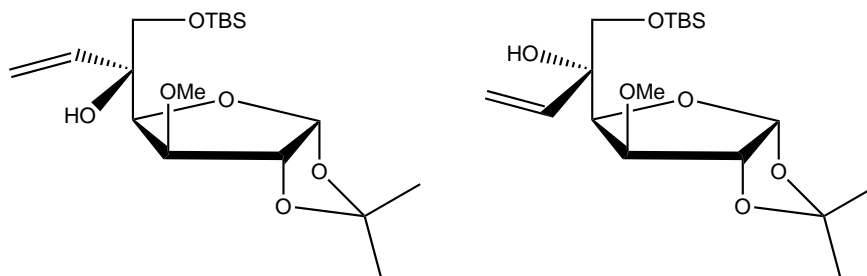
Pour cette réaction,  $\Delta_r S^\circ > 0$  (puisque l'on a une augmentation du nombre de molécules) alors que pour la réaction avec la propanone  $\Delta_r S^\circ \simeq 0$ .

Si on considère que le terme enthalpique pour la réaction avec le 2,2-diméthoxypropane est quasi nul (le bilan des formations et ruptures de liaison est nul), et que pour la propanone il est positif, alors  $\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T\Delta_r S^\circ (>0)$  sera à une température donnée plus petit pour le 2,2-diméthoxypropane que pour l'acétone. De ce fait,  $K^\circ$  sera plus grand pour le 2,2-diméthoxypropane que pour la propanone.

Le composé **B** est alors traité par le bromure d'éthénylmagnésium ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CHMgBr}$ ) dans le THF à 0 °C. Après hydrolyse contrôlée, on obtient un mélange de deux composés **C**<sub>1</sub> et **C**<sub>2</sub> de formule brute  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Si}$ , **C**<sub>1</sub> étant majoritaire.

2. (a) Donner la structure de ces deux composés. Justifier la formation d'un mélange de deux produits.

Les produits **C**<sub>1</sub> et **C**<sub>2</sub> sont (on ne peut pas encore les différencier) :



On obtient un mélange de produits parce que le groupe carbonyle est plan. L'addition de l'organomagnésien sur le groupe carbonyle peut donc se faire de part et d'autre du plan.

- (b) Quel relation stéréochimique lie les composés **C**<sub>1</sub> et **C**<sub>2</sub> ?

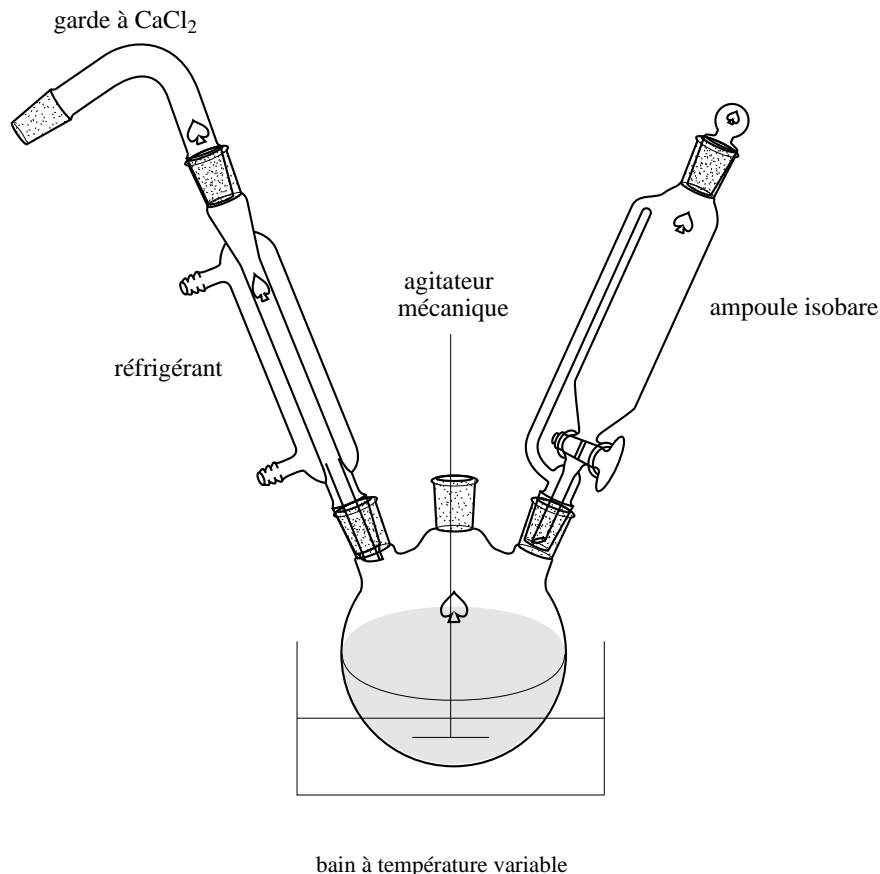
Les composés **C**<sub>1</sub> et **C**<sub>2</sub> sont des stéréoisomères non énantiomères (puisque'ils ne sont pas superposables à leur image dans un miroir plan), ils sont donc diastéréoisomères.

- (c) Expliquer l'intérêt de l'étape **A** → **B**.

L'étape **A** → **B** a permis de réaliser l'addition de l'organomagnésien sans qu'il y ait de réaction acido-basique parasite entre l'organomagnésien et les groupes hydroxy, possédant un atome d'hydrogène acide. On a donc protégé les fonctions alcools.

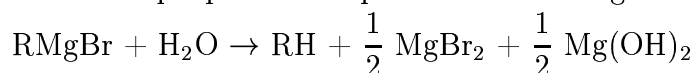
- (d) Préciser les conditions de préparation d'un organomagnésien (montage, solvant utilisé...).

Pour réaliser la synthèse d'un organomagnésien, on utilise le montage suivant :



Les conditions opératoires à employer sont :

- Travailler en milieu rigoureusement anhydre sinon des réactions parasites de type acido-basique peuvent se produire entre l'organomagnésien formé et l'eau ;



Rq : tous les composés avec des H labiles sont donc à proscrire pour réaliser la synthèse magnésienne (c'est pour cela que les solvants utilisés sont aprotiques).

- Il faut ajouter l'halogénoalcane goutte à goutte pour éviter les réactions de couplage de type Wurtz entre l'halogénoalcane et l'organomagnésien.

Il faudra donc travailler avec un excès de Grignard par rapport au dérivé halogéné.

- Le choix du solvant est primordial puisqu'il faut qu'il puisse stabiliser l'atome de magnésium du Grignard. Les solvants à utiliser sont donc ceux qui pourront solvater au mieux le Grignard (mais pas trop sinon on stabilise trop le magnésien) ie les bases de Lewis (comme le tétrahydrofurane par exemple).

(e) Quelles nouvelles bandes apparaissent en infra-rouge ?

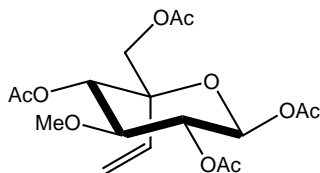
On va observer l'apparition de la bande (large) de vibration d'élongation de la liaison O-H vers  $3500 \text{ cm}^{-1}$  et celle de vibration d'élongation de la double liaison C=C vers  $1650 \text{ cm}^{-1}$ .

Le composé **C**<sub>1</sub> est dissous dans 100 mL de dioxane. La solution obtenue est diluée avec de l'eau. On additionne une résine échangeuse d'ions, sous forme acide (solide) et la suspension est maintenue sous agitation magnétique à 85 °C pendant 16 heures. Le mélange est filtré et le solvant évaporé. On isole le composé **D** de formule brute C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> (cycle à 6 atomes).

Remarque : lors de la synthèse de **D**, il se forme intermédiairement un composé **D**<sub>1</sub> (cycle à 5 atomes) qui, par un mécanisme analogue à celui de la question 1.1.4 (e), conduit à la formation

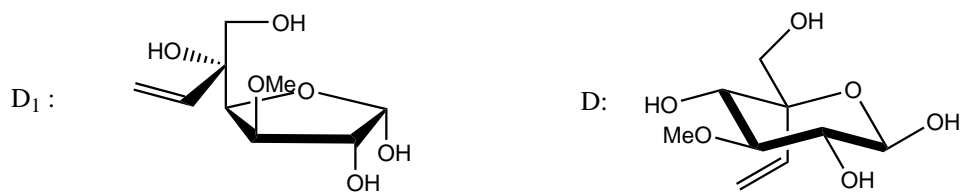
du composé **D**.

On dissout le composé obtenu dans de la pyridine anhydre, à laquelle est ajouté de l'anhydride éthanoïque. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Après traitement et purification on obtient le produit **E** suivant (le groupe acétate -OAc correspond au groupe -OCOCH<sub>3</sub>) :

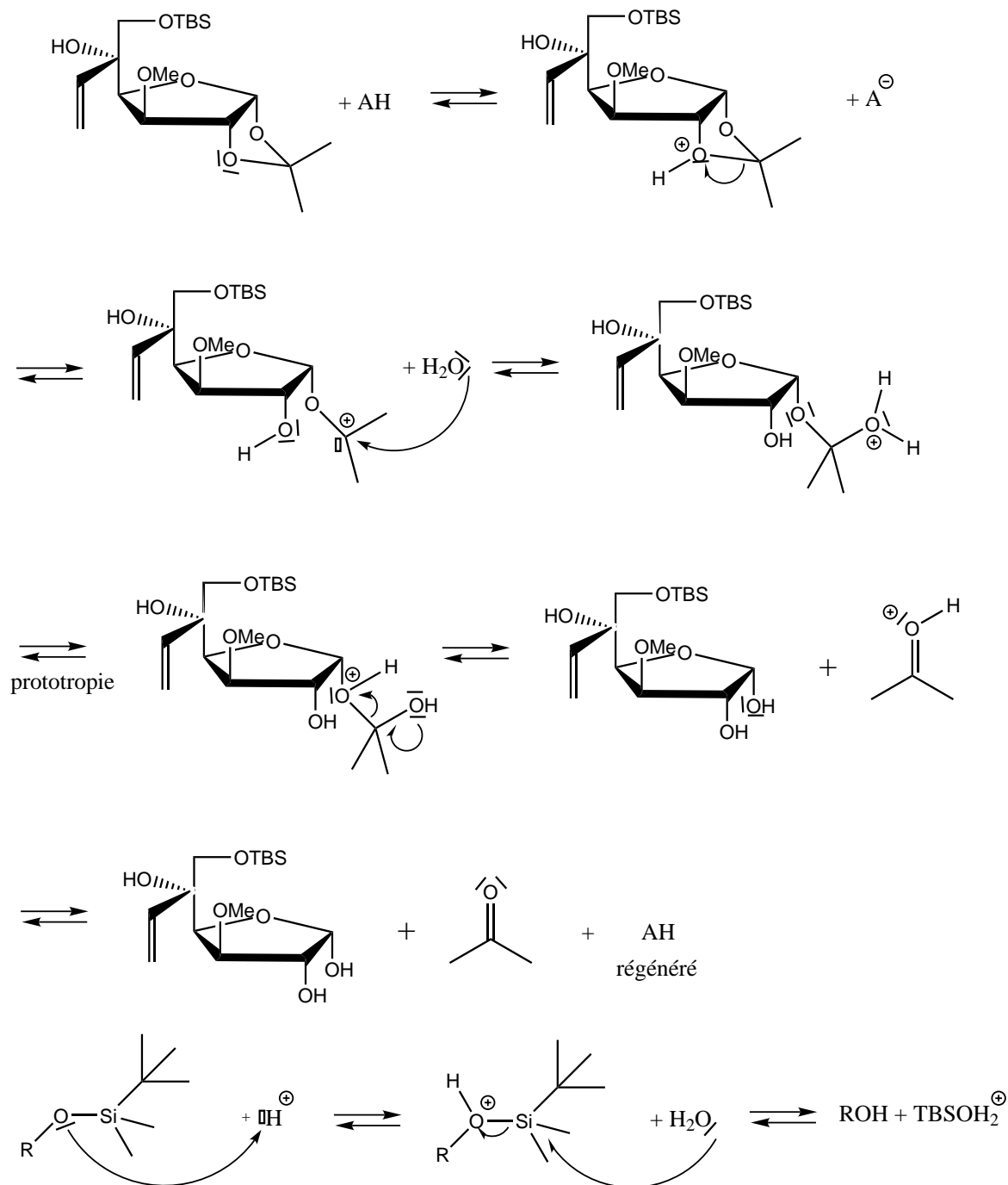


3. (a) Donner la structure de **D**<sub>1</sub> et de **D** en précisant le mécanisme de leur formation.

La structure des composés **D**<sub>1</sub> et **D** est la suivante :



Le mécanisme de formation de D<sub>1</sub> est le suivant :

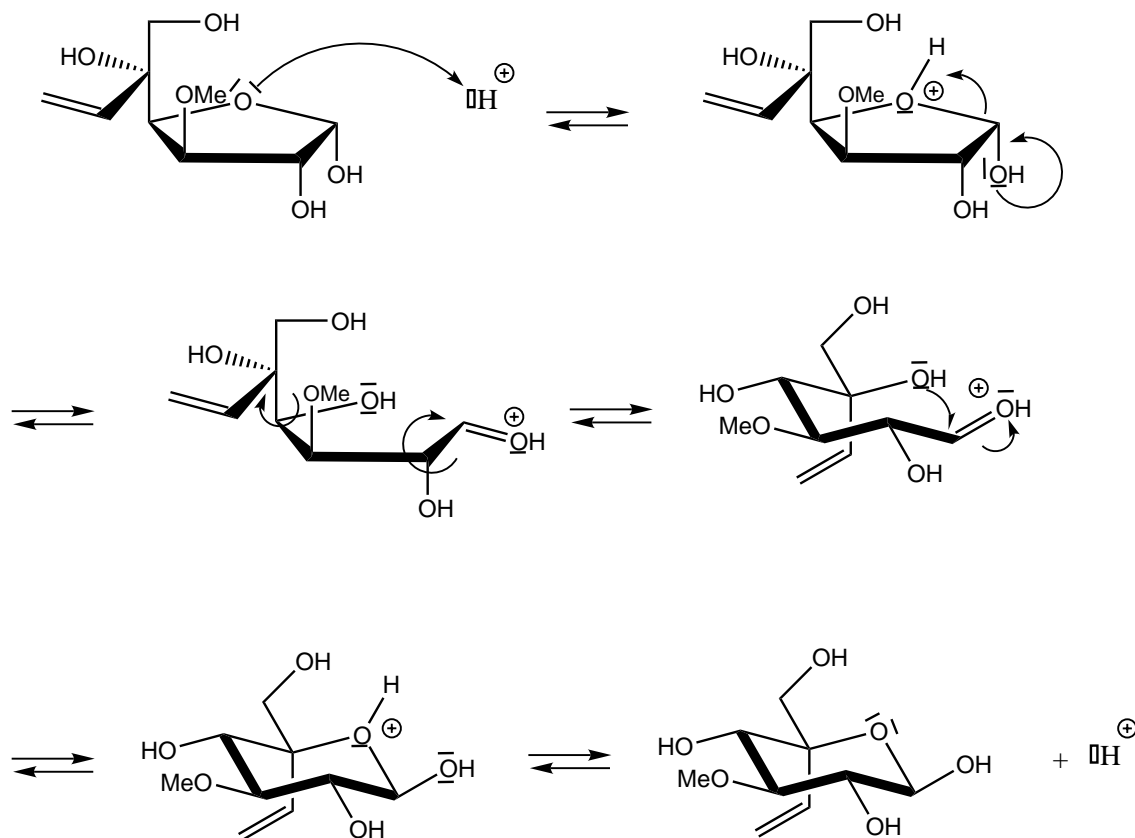


On assiste à la réaction de déprotection du diol et à celle de l'alcool silylé en milieu acide.

La réaction de déprotection de l'alcool silylé peut avoir lieu soit par une réaction de type substitution nucléophile (cf schéma) soit par une réaction d'addition de l'eau sur le silicium (passage par un silicium pentavalent) suivi d'une élimination.

La réaction de déprotection du diol se déroule en sens inverse de la réaction de protection, et ce, d'après le principe de microréversibilité.

Le passage de  $D_1$  à  $D$  s'effectue selon la réaction suivante :



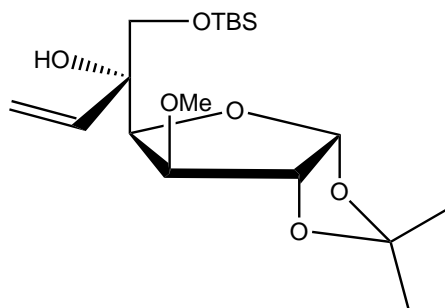
La catalyse acide permet de régénérer le carbonyle qui va ensuite réagir selon une réaction d'hémi-acétalisation.

(b) Quel est l'intérêt de la filtration ?

La filtration permet de récupérer la résine acide qui va ensuite pouvoir être régénérée (par traitement en milieu acide) et réutilisée dans d'autres expériences. C'est une des particularités très intéressantes de la catalyse hétérogène que de permettre la séparation facile du catalyseur du mélange réactionnel.

(c) À partir de la formule de **E**, identifier  $C_1$  et préciser la configuration absolue du carbone asymétrique formé à la question 2.1.2.

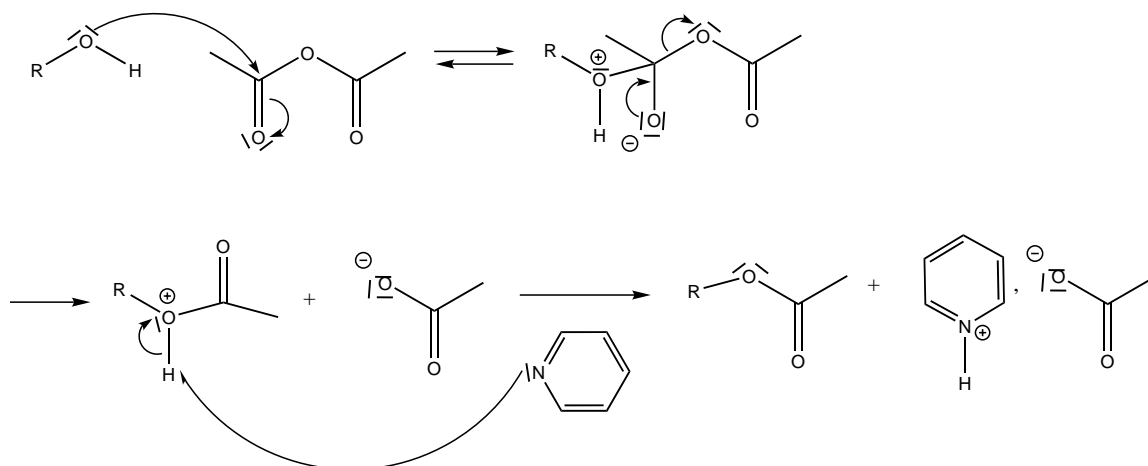
On peut à partir des étapes précédentes identifier  $C_1$ . C'est le composé suivant :



En utilisant les règles de Cahn, Ingold et Prelog, on détermine que la configuration absolue du carbone asymétrique formé est (*R*).

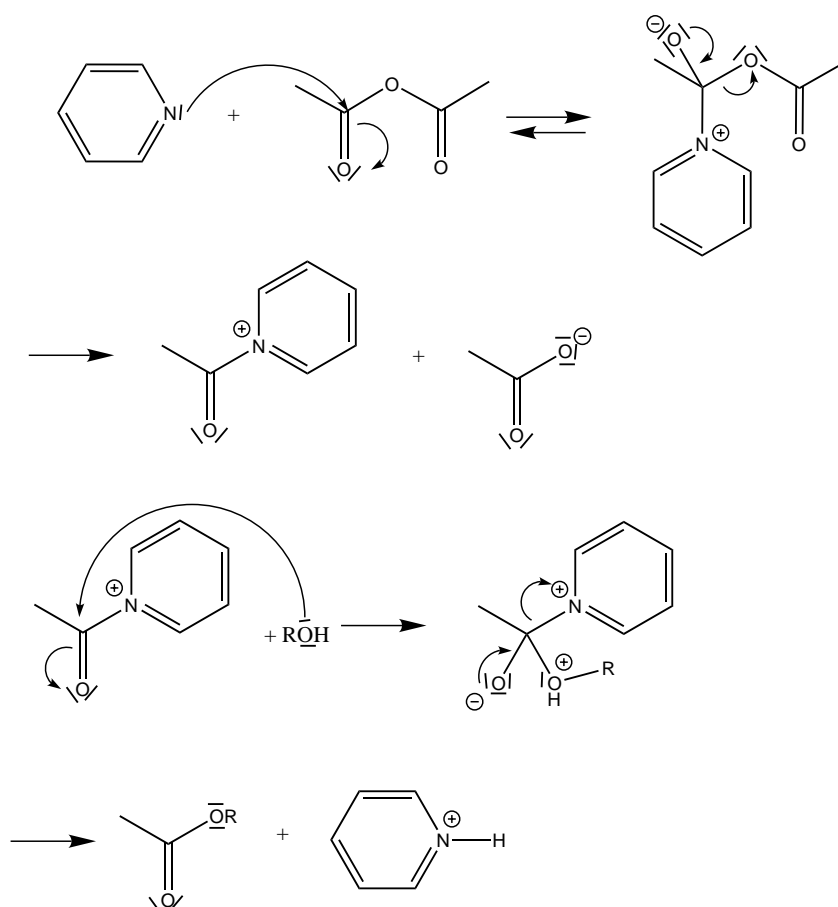
(d) Préciser le mécanisme de formation de **E** (on ne détaillera qu'une des réactions). Quel est le rôle de la pyridine ?

La réaction d'estérification à l'aide de l'anhydride acétique est :

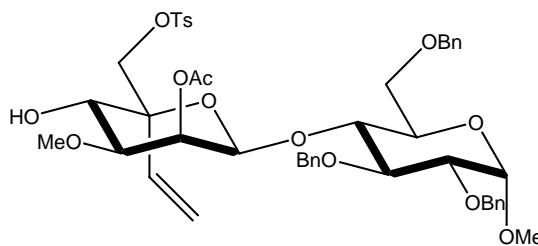


On assiste à une réaction d'addition de l'alcool sur la double liaison carbone oxygène suivie d'une réaction d'élimination de l'acétate.

Le rôle de la pyridine est double, elle joue le rôle de base (cf schéma réactionnel précédent) mais elle catalyse aussi la réaction de l'estérification en transformant une étape d'estérification lente en deux étapes plus rapides. C'est ce que l'on appelle la catalyse nucléophile.



**E** subit ensuite une succession de transformations pour donner le composé **F** suivant :



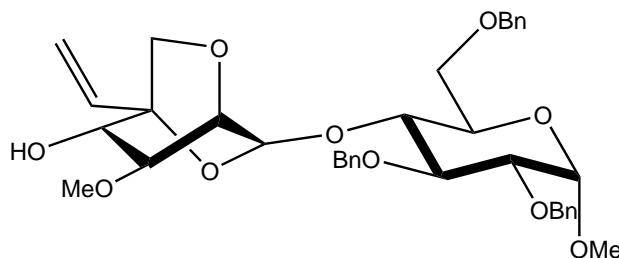
Le groupe benzyle -Bn correspond au groupe  $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ , c'est un groupe protecteur des alcools dont la déprotection a lieu en présence de dihydrogène et d'un catalyseur métallique tel que le palladium (il n'intervient pas dans la synthèse). Le groupe tosylo -Ts correspond quant à lui au groupe  $-\text{O}_2\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ .

**F** est mis en présence d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol. Le mélange est chauffé à  $80^\circ\text{C}$  pendant 3 heures. On obtient après traitement et purification le composé **G**.

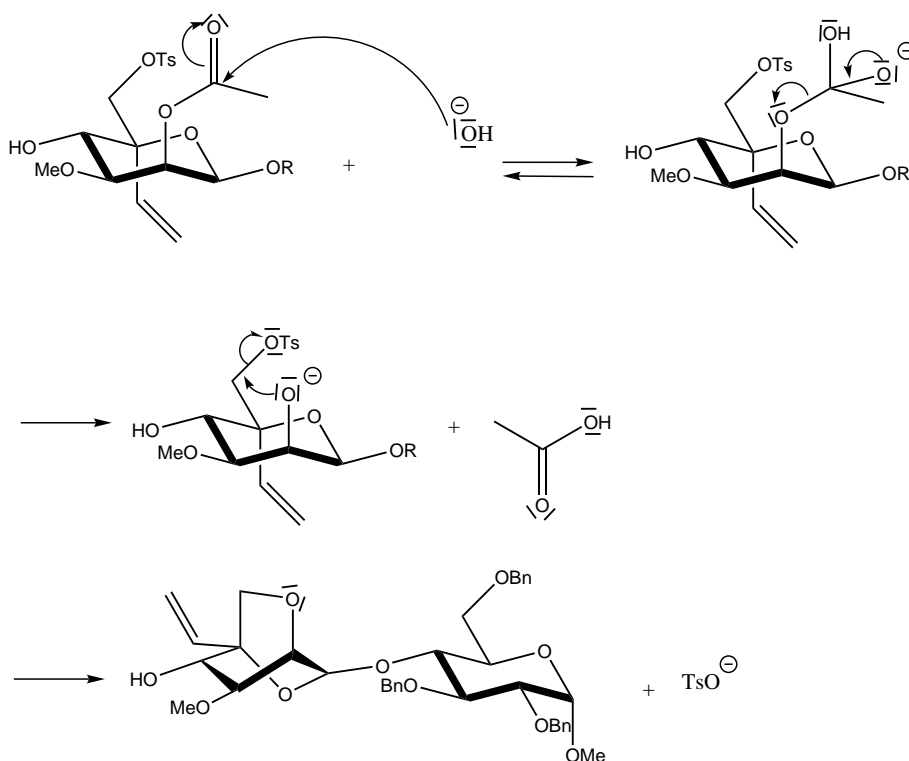
Spectre IR de **G** : disparition d'une bande à  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

4. (a) Donner la structure de **G** et le mécanisme de sa formation.

La structure de **G** est :



Son mécanisme de formation est :



La première étape correspond à une réaction de saponification d'un ester. L'alcoolate formé lors de cette étape réalise ensuite une réaction  $\text{S}_{\text{N}}2$  intramoléculaire pour permettre la formation de **G** dans lequel la conformation de l'unité **G** est fixée sous forme de bateau croisé.



(b) Comment s'appelle le groupe caractéristique formé dans **G** ?

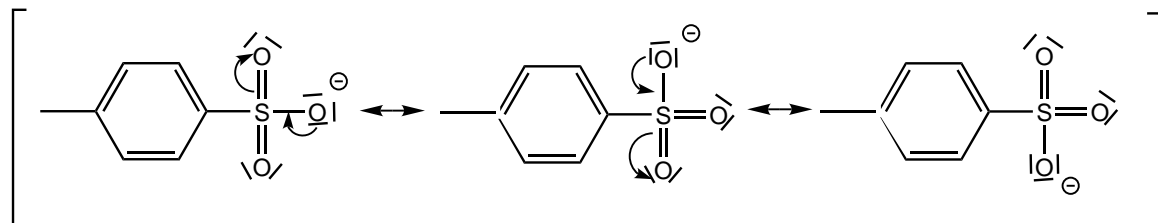
Le groupe caractéristique formé dans **G** est un groupe alkyloxy.

(c) Indiquer à quel groupe caractéristique est due la bande à  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

La bande à  $1700\text{ cm}^{-1}$  est due à la vibration d'élongation de la liaison C=O de l'ester.

(d) Expliquer l'intérêt du groupe tosylo(-Ts).

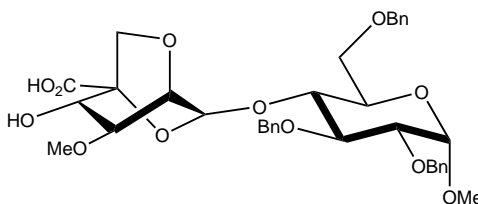
Le groupe tosylo permet d'augmenter le caractère nucléofuge du groupe hydroxyle. En effet, le produit formé est fortement délocalisé (cf formule mésomère), de ce fait il est peu nucléophile et donc ne réalisera pas une substitution qui donnera le produit de départ.



**G** est traité par l'ozone à  $-78^\circ\text{C}$  pour donner après traitement oxydant et purification **H**.  
Spectre IR de **H** : bande très large entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  et  $2500\text{ cm}^{-1}$ .

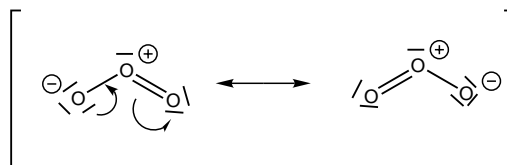
5. (a) Quelle est la structure de **H** ?

La structure de **H** est :



(b) Donner la structure de Lewis de l'ozone.

La structure de l'ozone est :



(c) Quel groupe caractéristique a réagi par traitement avec l'ozone ? Quel test permettrait de le prouver ?

Le groupe caractéristique qui a réagi avec l'ozone est la double liaison C=C. Le test qui permettrait de le prouver serait de mettre le composé **H** en présence de dibrome et de voir si une décoloration se produit.

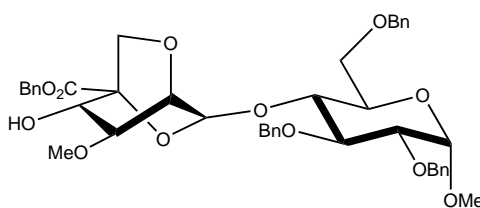
(d) Quel groupe caractéristique est responsable de la bande large d'absorption entre  $2500\text{ cm}^{-1}$  et  $3500\text{ cm}^{-1}$  ?

La bande large entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  et  $2500\text{ cm}^{-1}$  est due à la vibration d'élongation de la liaison O-H de l'acide carboxylique.

On ajoute ensuite **H** à une solution qui contient BnBr,  $\text{KHCO}_3$  et  $\text{Bu}_4\text{NI}$  dans le *N,N*-diméthylformamide, solvant polaire non protogène. On isole le composé **I**.

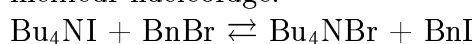
6. (a) Représenter le composé I.

Le composé I est :



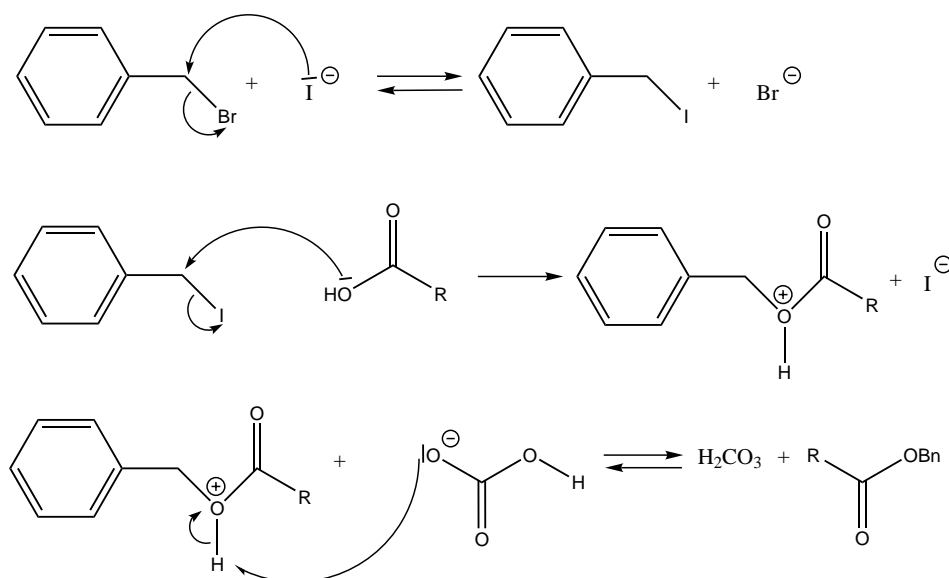
(b) Quel est le rôle de  $\text{KHCO}_3$  ? le rôle de  $\text{Bu}_4\text{NI}$  ?

$\text{KHCO}_3$  va jouer le rôle de base (cf mécanisme de la question suivante), le rôle de  $\text{Bu}_4\text{NI}$  va être de former à partir du dérivé bromé le dérivé iodé plus réactif vis-à-vis de la substitution nucléophile car la liaison carbone-iodo est plus polarisable.  $\text{I}^-$  est donc un meilleur nucléofuge.



(c) Préciser le mécanisme de formation de I.

Le mécanisme de formation de I est :



(d) Expliquer la chimiosélectivité de cette réaction.

Dans la réaction de benzylation, on avait a priori deux groupe hydroxyle susceptibles de réagir : celle de l'acide carboxylique et celle de l'alcool libre. Le caractère nucléophile du groupe hydroxyle de l'acide carboxylique est exalté en présence de  $\text{KHCO}_3$  (cf réaction acido-basique). L'hydrogénocarbonate de potassium n'est pas assez basique pour déprotonner l'atome d'hydrogène de l'alcool, de ce fait c'est plutôt l'hydroxyle de l'acide carboxylique qui réagira.

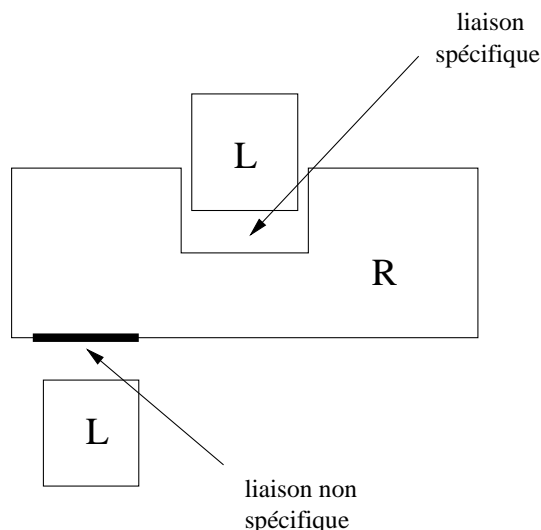
Le composé final I sera finalement mis en jeu dans une successions d'étapes pour permettre la formation d'un analogue structural de l'héparine pour lequel la conformation de l'unité G est fixée.

## 2.2 Étude de la fixation de l'héparine sur l'antithrombine III

Nous souhaitons étudier l'affinité de l'héparine pour l'antithrombine III. Pour cela nous nous proposons de calculer la constante d'affinité de l'héparine (noté L comme Ligand) sur le récepteur de l'antithrombine III (noté R comme Récepteur).

La méthode générale pour réaliser ce calcul est la suivante :

- On mélange l'héparine (portant un substituant radioactif comme le tritium  $^3\text{H}$ ) et l'antithrombine III. Après équilibre, il faut séparer l'héparine libre (qui sera appelée radioligand<sup>1</sup>) du complexe héparine-antithrombine III (noté RL). Ceci est réalisé, soit par centrifugation, soit par filtration. Le filtre qui retient RL est rincé et placé pour comptage dans une fiole.
- Le problème est que dans ce type d'expérience, la liaison mesurée correspond à la liaison spécifique (ie le ligand se fixe sur son récepteur) mais aussi à des liaisons non spécifiques (ie le ligand se fixe sur des récepteurs autres pour lesquels il ne présente que très peu d'affinité, et présents en quantité **illimitée**).



Donc, si dans des tubes d'incubation, on a le radioligand fixé sur son récepteur, du radioligand fixé sur des récepteurs non spécifiques et le radioligand libre, la filtration sur filtre va permettre l'élimination du ligand libre et, durant les deux lavages rapides du filtre, ce sont les liaisons les moins fortes énergétiquement qui vont se dissocier en premier et on observera majoritairement la liaison spécifique.

Pour déterminer le rapport liaison spécifique RL / liaison non spécifique qui reste, malgré les problèmes liés à la technique décrite ci dessus, on opère comme suit :

- On place dans deux tubes une même quantité de récepteurs. Dans le premier tube, on ajoute une quantité donnée de radioligands et dans le second on ajoute la même quantité de radioligands mais on ajoute en plus du ligand non radioactif (de concentration 1000 fois supérieure à celle du ligand radioactif).
1. Comment à partir de ces expériences peut-on en déduire la quantité de liaisons RL spécifiques ? (on supposera qu'après les différents lavages on a, pour les deux expériences la même quantité de ligands qui reste fixée sur les sites non spécifiques)

Pour avoir accès à la quantité de liaisons spécifiques, il suffit de faire la différence de radioactivité entre l'expérience où l'on n'a que de l'héparine radioactive (pour laquelle l'héparine radioactive est fixée sur les sites spécifiques et non spécifiques), et celle où l'on a de l'héparine non radioactive (pour laquelle l'héparine radioactive ne se trouve que sur les sites non spécifiques présents en plus grande quantité).

2. On définit pour le site spécifique l'équilibre  $\text{RL} \rightleftharpoons \text{R} + \text{L}$  de constante  $K_d$  (inverse de la constante d'affinité).
  - (a) Traduire la condition d'équilibre par une relation entre les concentrations en récepteur total  $[\text{R}]_t$ , en  $[\text{L}]$  et  $[\text{RL}]$  et la constante d'équilibre de l'équation de réaction précédente. (pour les solutés on assimilera l'activité  $a_i$  du soluté (i) au rapport de sa concentration molaire à la concentration de référence  $c^\circ = 1 \text{ mol/L}$ )

<sup>1</sup>un radioligand est une molécule radioactive capable de se fixer à un site (ex : récepteur, enzyme). On mesure la radioactivité de ces ligands par comptage (désintégrations par minute).

$$\text{On a } K_d = \frac{[R][L]}{[RL]c^\circ}$$

Si on écrit la conservation de la matière pour le récepteur, on a :

$$[R]_t = [RL] + [R] \text{ ce qui nous permet d'écrire } [R] = [R]_t - [RL]$$

$$\text{On en déduit que } K_d = \frac{([R]_t - [RL])[L]}{[RL]c^\circ}$$

- (b) En déduire une représentation graphique qui permet de déterminer la constante de dissociation  $K_d$  ainsi que  $[R]_t$ .

À partir de l'expression de  $K_d$  trouvée précédemment, on obtient que :

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R]_t}{K_d c^\circ} - \frac{[RL]}{K_d c^\circ}$$

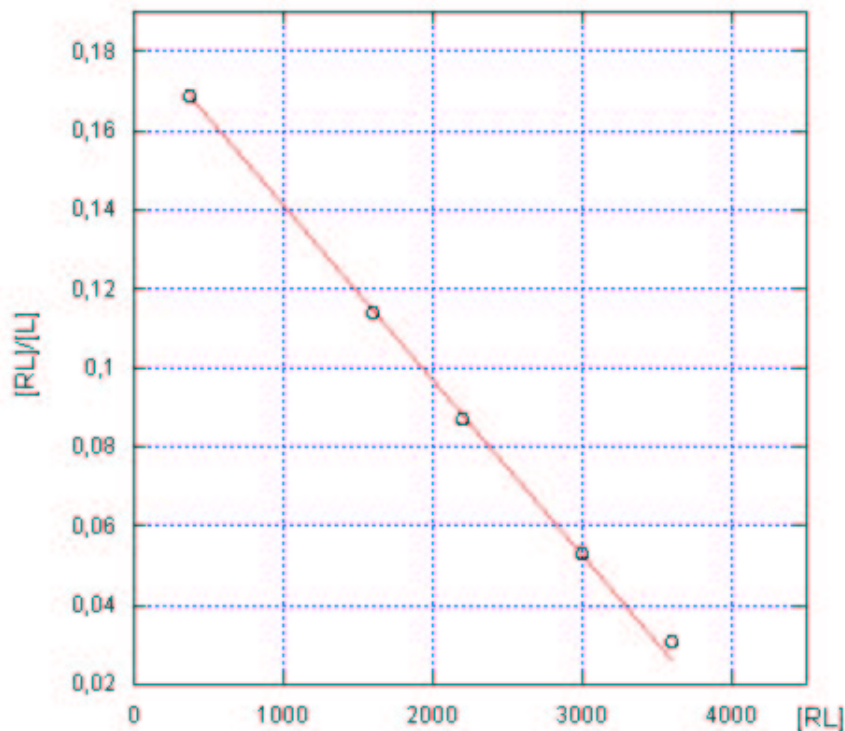
Donc si l'on trace  $\frac{[RL]}{[L]} = f([RL])$  on doit obtenir une droite de pente  $-\frac{1}{K_d c^\circ}$  et d'ordonnée

à l'origine  $\frac{[R]_t}{K_d c^\circ}$ .

- (c) *Application* : Calculer dans le cas de l'héparine  $K_d c^\circ$  en dpm (désintégrations par minute).

En traçant  $\frac{[RL]}{[L]} = f([RL])$  on a bien obtenu une droite d'ordonnée à l'origine 0.182 et qui coupe l'axe des ordonnées pour  $[RL] = [R]_t = 4200$  dpm.

On en déduit que  $K_d c^\circ$  est égal à 23000 dpm.



nombre total de dpm associé à la quantité de L libre	nombre total de dpm associé à la liaison RL spécifique
2195	373
5230	802
13960	1600
25187	2200
56736	3000
83450	3200
114860	3600

Données : L'activité spécifique de l'héparine tritiée est 65 Ci/mmol avec 1 Ci = 2,2.10<sup>12</sup> dpm.

### 2.3 Étude des caractéristiques (IC<sub>50</sub>, K<sub>I</sub>) du déplacement de l'héparine à l'aide d'analogues structuraux

L'affinité de ligands non radioactifs pour le récepteur de l'héparine, peut être appréciée en quantifiant leur pouvoir de déplacement de l'héparine radioactive (figure 4).

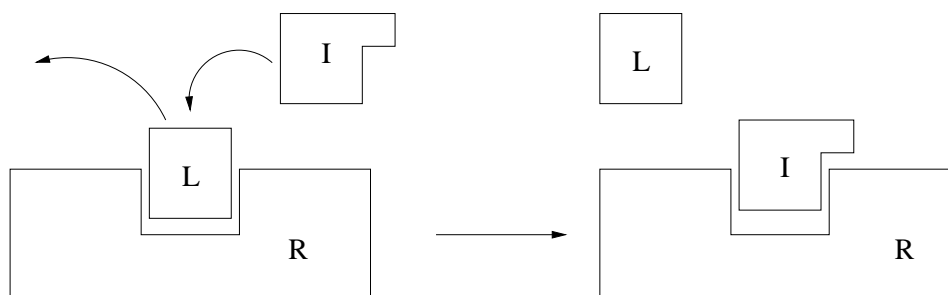
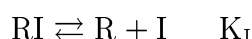
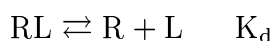


figure 4

Les ligands que nous allons étudier ici sont des analogues structuraux de l'héparine (noté I). Nous allons donc prendre en considération les deux réactions suivantes :



On définit IC<sub>50</sub> comme étant la concentration de I pour laquelle la valeur de la liaison spécifique [RL] est réduite de moitié par rapport à la valeur de la liaison spécifique [RL] en l'absence de ligand I.

1. Exprimer la concentration en récepteur en fonction des constantes d'équilibre, des concentrations en ligand, en analogue et de la concentration totale en récepteur.

Si on écrit la conservation de la matière pour le récepteur, on a :

$$[R]_t = [RL] + [RI] + [R] \text{ de cette expression on tire } [R] = \frac{[R]_t}{1 + \frac{[RL]}{[R]} + \frac{[RI]}{[R]}}$$

Or  $\frac{[RL]}{[R]} = \frac{[L]}{K_d}$  et  $\frac{[RI]}{[R]} = \frac{[I]}{K_I}$

On en déduit donc que  $[R] = \frac{[R]_t}{1 + \frac{[L]}{K_d} + \frac{[I]}{K_I}}$

2. En déduire la relation qui lie  $K_I$  à  $IC_{50}$ .

$$\text{on a } [RL] = \frac{[L]}{K_d} \frac{[R]_t}{1 + \frac{[L]}{K_d} + \frac{[I]}{K_I}}$$

$$\text{Par définition on a } [RL](I=IC_{50}) = \frac{[RL](I=0)}{2}$$

$$\text{On en déduit } \frac{[L]}{K_d} \frac{[R]_t}{1 + \frac{[L]}{K_d} + \frac{[IC]_{50}}{K_I}} = \frac{[L]}{2K_d} \frac{[R]_t}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

$$\text{D'où } K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

3. Relier qualitativement l'affinité et l' $IC_{50}$ .

On peut voir que plus  $IC_{50}$  est grand, plus l'affinité de l'analogue pour le récepteur est faible. En effet l' $IC_{50}$  est proportionnel à  $K_I$  qui traduit l'inverse de l'affinité de l'analogue pour le récepteur (cf définition donnée au début de la partie 2.3).

4. À partir de la figure 5, calculer la valeur de l' $IC_{50}$  pour chaque I, conclure.

Pour l'analogue 1 on lit  $IC_{50} = 10^{-8,9} \text{ molL}^{-1}$  et pour l'analogue 2 on a  $IC_{50} = 10^{-7,8} \text{ molL}^{-1}$ .

On peut donc dire que l'analogue 1 a une plus grande affinité pour le récepteur que l'analogue 2.

5. En déduire la valeur de  $K_I$  (on prendra  $K_d C^{\circ} = 7,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol/L}$ ).

On déduit de la question précédente :

$K_I = 6,5 \cdot 10^{-10} \text{ molL}^{-1}$  pour l'analogue 1 et  $K_I = 8,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$  pour l'analogue 2.

6. Quel problème peut poser cet analogue, ignoré jusqu'ici ?

Le problème posé par cet analogue est qu'il peut interagir avec les récepteurs d'autres enzymes, s'il a pour ces derniers une affinité plus importante que le substrat habituel de l'enzyme cela peut provoquer de graves nuisances.

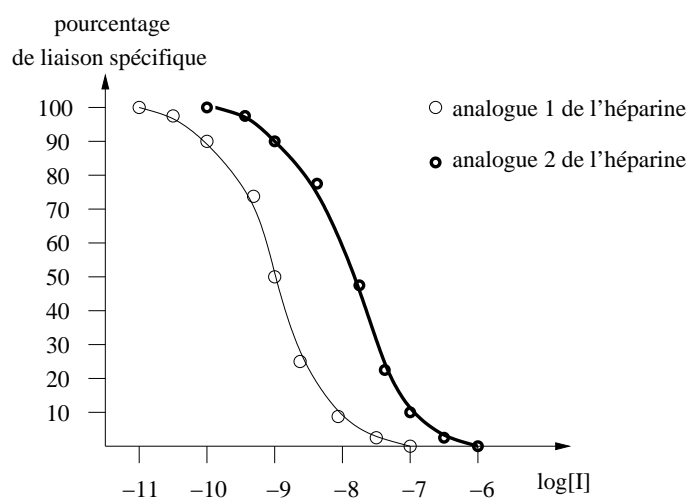


figure 5 : pourcentage de liaison spécifique pour  $[L] = 0,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$

### 3 Étude de l'inhibition des enzymes

#### 3.1 Généralités

Les enzymes sont des substances protéiques qui agissent comme catalyseur dans la régulation de la vitesse de nombreuses réactions impliquées dans le métabolisme des organismes vivants. L'anti-thrombine III complexée par l'héparine inhibe l'enzyme responsable de la coagulation sanguine.

Dans le cas général, les réactions enzymatiques sont modélisées de la manière suivante :



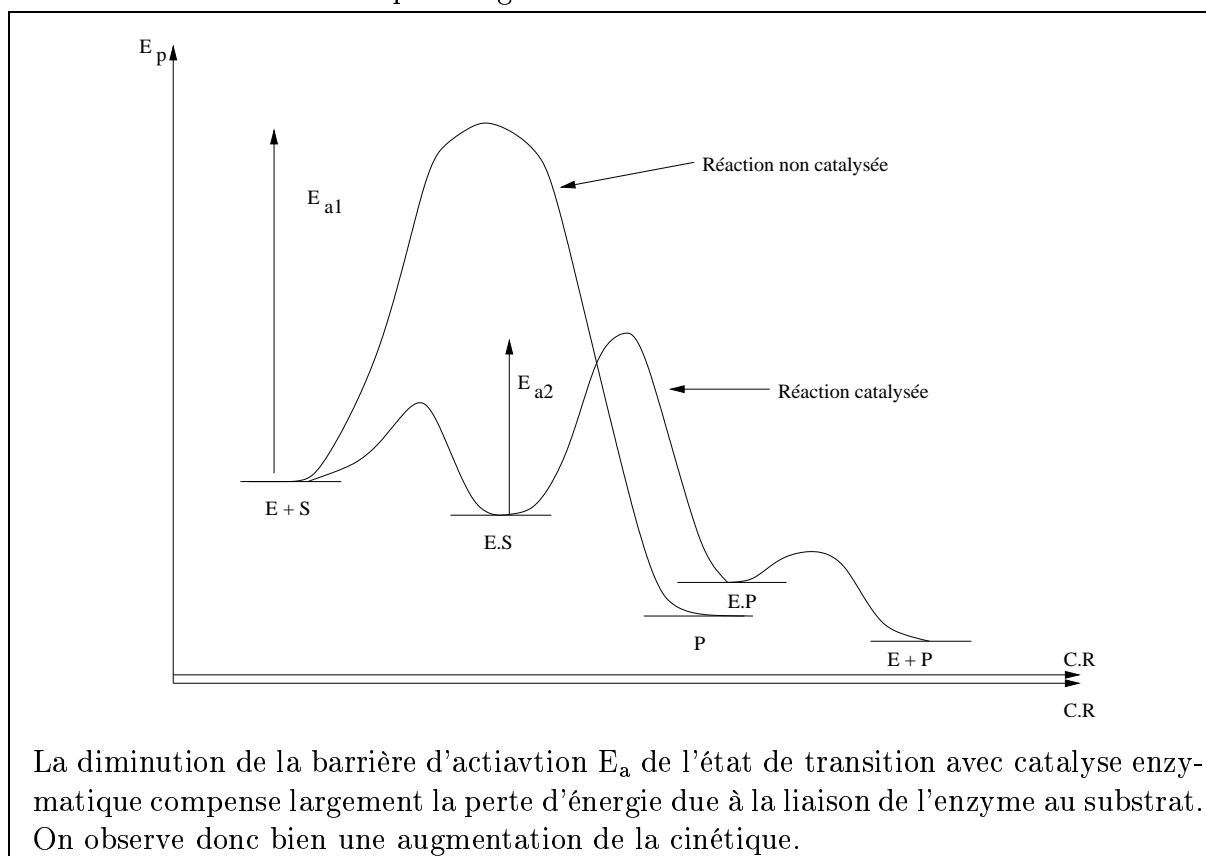
dans laquelle E correspond à l'enzyme, S au substrat et P aux produits de la réaction.

1. Donner les principales caractéristiques d'un catalyseur.

Les principales caractéristiques d'un catalyseur sont :

- Le catalyseur accélère la réaction et est régénéré en fin de réaction ;
- Un catalyseur n'apparaît pas dans l'équation chimique d'une réaction.

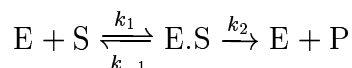
2. Représenter sur un même schéma, le profil réactionnel de la réaction non catalysée et le profil de celle dont on a donné l'équation générale.



#### 3.2 Étude cinétique

On va ici s'intéresser aux différents types d'inhibitions qui existent.

- Cas classique



1. En appliquant le principe de l'état stationnaire au complexe ES, exprimer la vitesse  $v$  de formation de P en fonction de la concentration en S et de la concentration initiale en E.

On pourra poser  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

En appliquant l'AEQS au complexe ES on obtient la relation suivante :

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1)$$

Ce qui nous permet de montrer que  $v = k_2 [ES] = \frac{k_2}{K_M} [E][S]$

Si on exprime la conservation de la matière pour l'enzyme, on obtient :

$$[E]_0 = [ES] + [E] \quad \text{ce qui nous donne } [E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{[ES]}{[E]}}$$

Or d'après la relation (1) on a  $\frac{[ES]}{[E]} = \frac{[S]}{K_M}$

On en déduit donc que  $v = \frac{k_2[E]_0[S]}{[S] + K_M}$

2. Montrer que, lorsque la concentration initiale en substrat est très élevée ( $[S] \gg K_M$ ), la vitesse de formation de P tend vers une valeur limite notée  $v_M$  que l'on exprimera en fonction de la concentration totale en enzyme.

Pour  $[S] \gg K_M$  l'expression de la vitesse s'écrit alors :

$$v = v_M = k_2[E]_0$$

3. Montrer que la vitesse  $v$  de formation de P est, dans le cas sans inhibiteur :  $v = \frac{v_M [S]}{[S] + K_M}$ .

Des questions précédentes on déduit :

$$v = \frac{v_M [S]}{[S] + K_M}$$

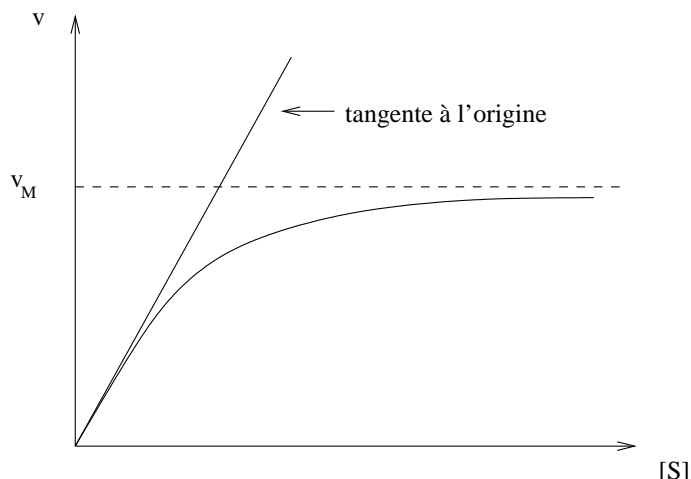
4. Donner la signification physique de  $K_M$  et de  $v_M$  ?

$v_M$  correspond à la saturation de l'enzyme par le substrat.

$K_M$  représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse  $v$  de formation de P est égale à la moitié de  $v_M$

5. Représenter l'allure de la courbe  $v = f([S])$ .

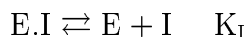
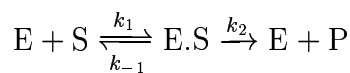
Une étude asymptotique donne pour  $[S]$  grand  $v \rightarrow v_M$  et pour  $[S]$  faible une droite de pente  $\frac{v_M}{K_M}$ .



– Cas d'un inhibiteur compétitif <sup>2</sup> :

<sup>2</sup>Un inhibiteur compétitif se fixe sur l'enzyme dans le même site actif que le substrat.





6. Exprimer la vitesse  $v$  de formation de  $P$ , on donnera à  $v$  une expression analogue à celle trouvée au 3.2.3 en introduisant  $K_{Mapp}$ , que l'on exprimera en fonction de  $K_M$ ,  $[I]$  et  $K_I$ .

Si on applique l'AEQS au complexe enzyme-substrat  $ES$  (cf cas sans inhibiteur) on obtient  $k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$  (1)

Ce qui nous permet de montrer que  $v = k_2 [ES] = \frac{k_2}{K_M} [E][S]$

Si on exprime la conservation de la matière pour l'enzyme, on obtient :

$$[E]_0 = [ES] + [E] + [EI] \quad \text{ce qui nous donne } [E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{[ES]}{[E]} + \frac{[EI]}{[E]}}$$

Or d'après la relation (1) on a  $\frac{[ES]}{[E]} = \frac{[S]}{K_M}$  et par hypothèse  $\frac{[EI]}{[E]} = \frac{[I]}{K_I}$

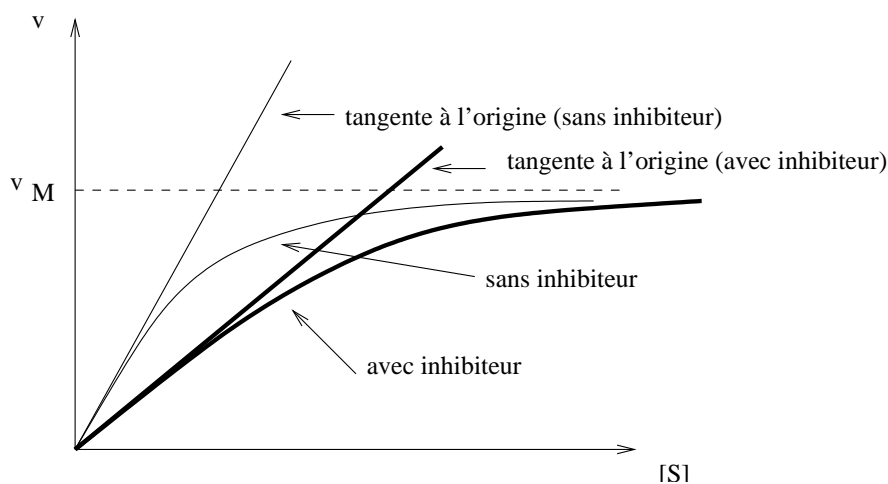
On en déduit donc que

$$v = \frac{[S]k_2}{K_M} \frac{[E]_0}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I}}$$

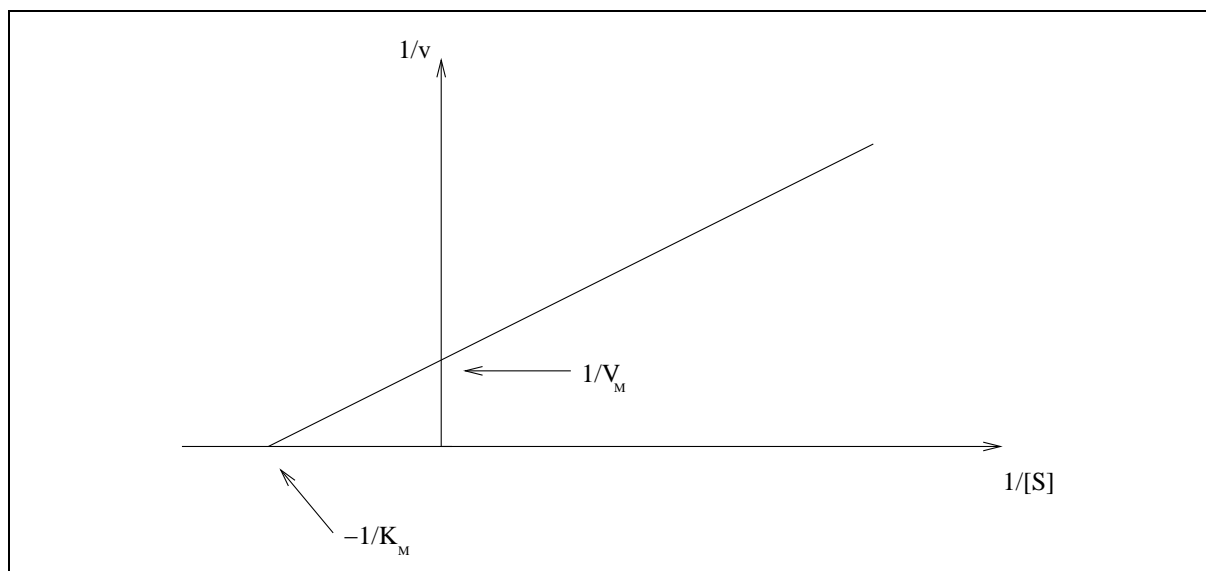
Ce qui nous permet d'obtenir  $K_{Mapp} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

7. Donner finalement l'allure de la courbe  $v = f([S])$  et la comparer à la précédente.

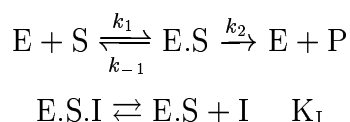
Une étude asymptotique montre que pour  $[S]$  grand on a toujours  $v \rightarrow v_M$ , la différence apparaît sur la valeur de la pente de la tangente à l'origine, laquelle est maintenant égale à  $\frac{v_M}{K_{Mapp}}$  qui est donc plus petite que celle obtenue sans inhibiteur.



8. En traçant l'allure des courbes  $1/v$  en fonction de  $1/[S]$ , montrer qu'il est possible de déterminer précisément les valeurs de  $K_M$  et  $v_M$ .



– Cas d'un inhibiteur incompétitif <sup>3</sup> :



9. En utilisant les questions précédentes, donner l'expression de la vitesse  $v$  de formation de  $P$ . Donner les nouvelles expressions de  $K_{Mapp}$  et de  $v_{Mapp}$  en fonction de  $K_M$ ,  $[I]$  et  $K_I$  afin d'obtenir une expression de la vitesse  $v$  analogue à celle obtenue pour la réaction sans inhibiteur.

Si on applique l'AEQS à  $ES$  on obtient  $k_1[E][S] + k_3[ESI] = (k_{-1} + k_2 + k_{-3}[I])[ES]$ , si on considère que l'on a équilibre entre  $ES$  et  $ESI$  alors  $k_3[ESI] = k_{-3}[I][ES]$ . On obtient donc que l'expression de l'AEQS est la même que dans les deux cas précédents.

En exprimant la conservation de la matière pour l'enzyme  $[E]_0 = [ES] + [E] + [ESI]$  et en utilisant le fait que

$$\frac{[ESI]}{[E]} = \frac{[ESI][ES]}{[ES][E]} = \frac{[S][I]}{K_M K_I}$$

$$\text{On déduit : } v = \frac{v_M[S]}{K_M + [S](1 + \frac{[I]}{K_I})}$$

$$\text{Ce qui nous permet de trouver } K_{Mapp} = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \text{ et } v_{Mapp} = \frac{v_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

10. Proposer une méthode permettant de déduire  $K_M$ ,  $K_I$  et  $v_M$  à partir de  $K_{Mapp}$  et/ou de  $v_{Mapp}$ .

Il suffit de tracer  $\frac{1}{v}$  en fonction de  $\frac{1}{[S]}$  pour différentes concentrations en inhibiteur.

On obtient pour chaque valeur de  $[I]$  une valeur de  $K_{Mapp}$  et une de  $v_{Mapp}$ .

Si, ensuite on trace  $\frac{1}{v_{Mapp}}$  et  $\frac{1}{K_{Mapp}}$  en fonction de  $[I]$  on peut déduire de la pente des droites obtenues et des ordonnées à l'origine  $K_M$ ,  $K_I$  et  $v_M$ .

En effet, l'équation de ces droites est :

$$\frac{1}{v_{Mapp}} = \frac{1}{v_M} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \text{ et } \frac{1}{K_{Mapp}} = \frac{1}{K_M} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

<sup>3</sup>un inhibiteur incompétitif se fixe sur le complexe enzyme-substrat et inhibe la formation du produit.

### 3.3 Applications : inhibition du facteur Xa

Lorsque le complexe héparine-antithrombine III est formé, il inhibe le facteur Xa (responsable de l'anticoagulation).

La méthode pour étudier l'inhibition du facteur Xa est la spectroscopie UV : on détecte la formation de produits qui absorbent en UV.

1. Rappeler la loi de Beer-Lambert et son domaine de validité.

La loi de Beer-Lambert est :  $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda).l.C$  où  $A$  représente l'absorbance (sans unité),  $\varepsilon(\lambda)$  le coefficient d'absorption molaire (en  $\text{cm}^{-1}.\text{L}.\text{mol}^{-1}$ ),  $l$  la longueur de la cuve (en cm) et  $C$  la concentration de l'espèce qui absorbe (en  $\text{molL}^{-1}$ ).

La loi de Beer-Lambert n'est valable que pour des concentrations faibles et une source de faible intensité (effet de non linéarité).

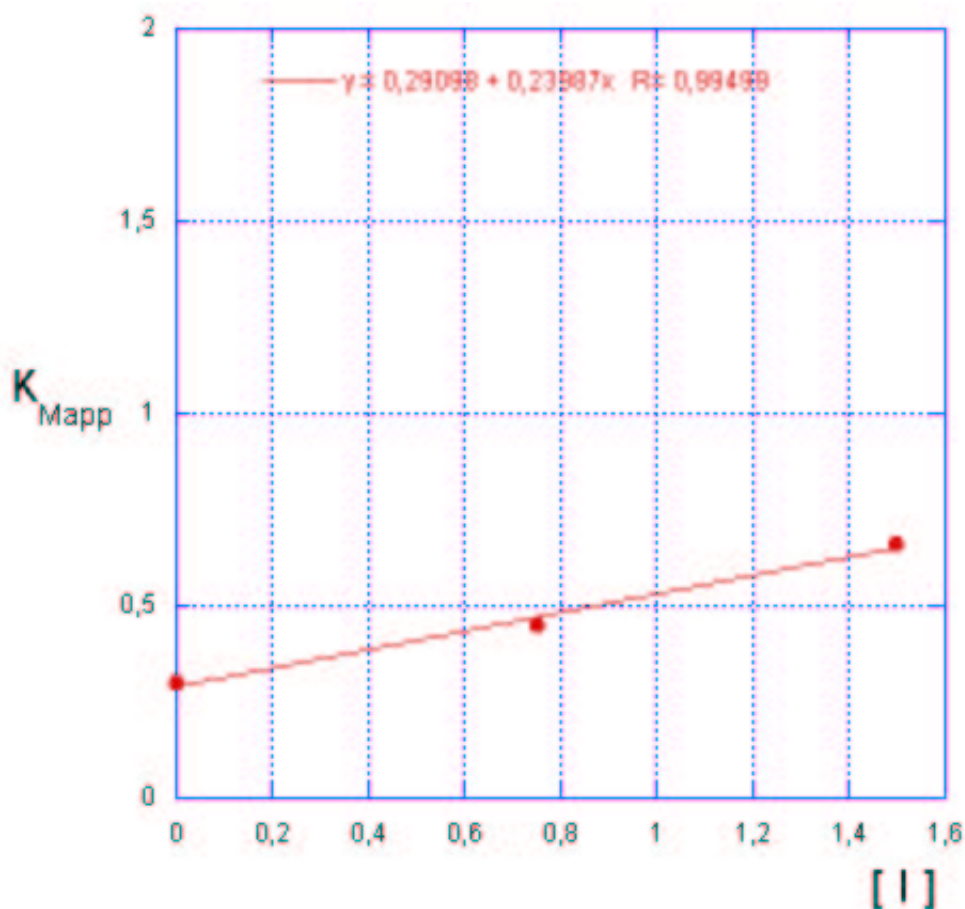
Le complexe héparine-antithrombine III inhibiteur du facteur Xa sera noté I et le substrat du facteur Xa sera noté L (cf notation précédente).

2. À partir des résultats obtenus précédemment et de la figure 6, en déduire quel est le type d'inhibiteur dans le cas qui nous intéresse. Calculer la constante d'inhibition  $K_I$  du complexe héparine-antithrombine III.

On peut aisément voir que l'ordonnée à l'origine des trois droites est commune, on en déduit donc que l'on a une inhibition de type compétitive.

Pour ce type d'inhibition on a obtenu précédemment que  $K_{Mapp} = K_M(1 + \frac{[I]}{K_I})$ .

Donc, si on trace  $K_{Mapp} = f([I])$  on obtient une droite de pente  $\frac{K_M}{K_I}$  et d'ordonnée à l'origine  $K_M$ .



On obtient finalement après calcul  $K_I = 1.21 \text{ mM}$  et  $K_M = 0.29 \text{ mM}$

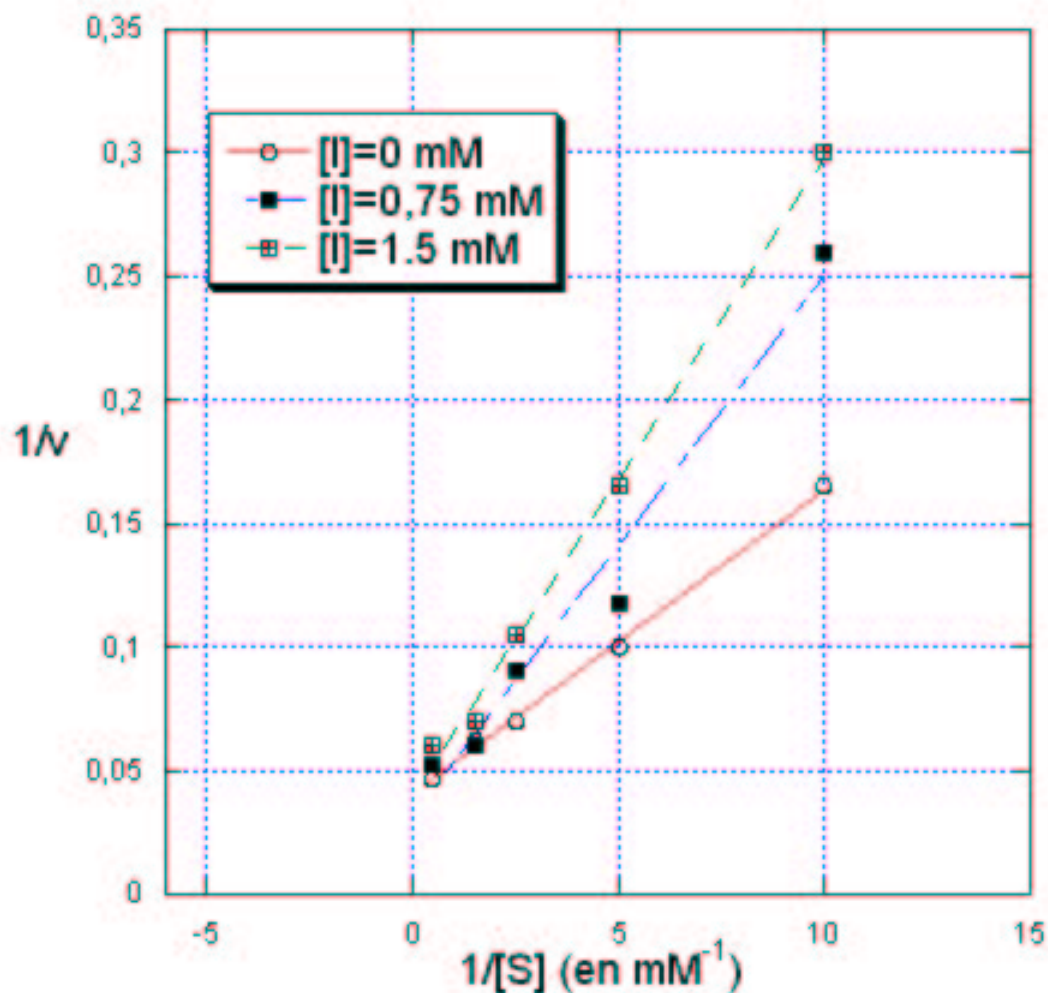


figure 6

## Fin de l'épreuve

**Remerciements** : Je voudrais remercier Laurence Grimaud et Julien Lalande pour m'avoir permis de participer aux olympiades, Guillaume et Olivier pour leur aide et leur soutien ainsi que Josselin Noirel, le T<sub>E</sub>Xnicien de l'équipe, qui m'a permis de rendre ce sujet en temps et en heure.