

DM2 – à rendre le jeudi 26 novembre 2020

1. Autour de la L-arginine

Le monoxyde d'azote (NO), initialement réputé pour sa présence néfaste dans la fumée de cigarette et les gaz d'échappement, est aussi un messenger cellulaire de première importance chez les mammifères. Son implication dans de nombreux processus biologiques, tels que les systèmes cardiovasculaire, nerveux central et périphérique ou encore immunitaire a été démontrée depuis les années 1980. Le monoxyde d'azote peut agir comme neurotransmetteur, vasodilatateur, ou agent cytostatique et cytotoxique. La biosynthèse de NO est donc extrêmement régulée dans l'organisme afin de contrôler l'équilibre entre ses fonctions physiologiques et la toxicité des espèces qui en dérivent. In vivo, NO est produit par transformation de la L-arginine (Arg) en L-citrulline (Cit) par l'intermédiaire de la N-hydroxy-L-arginine (ArgOH) (figure 1).

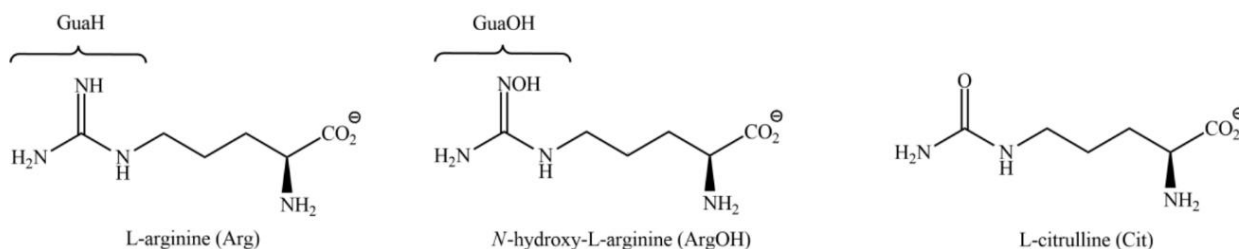


Figure 1 – Structure des entités intervenant dans la biosynthèse de NO, sous leurs formes les plus basiques

La transformation de la L-arginine est catalysée par les NOSynthases (NOS). Elle s'opère en deux étapes modélisées par les réactions suivantes. Ces deux étapes consomment du dioxygène et utilisent du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et de la tétrahydrobioptérine (notée H₄Bio) comme cofacteurs enzymatiques (figure 2).

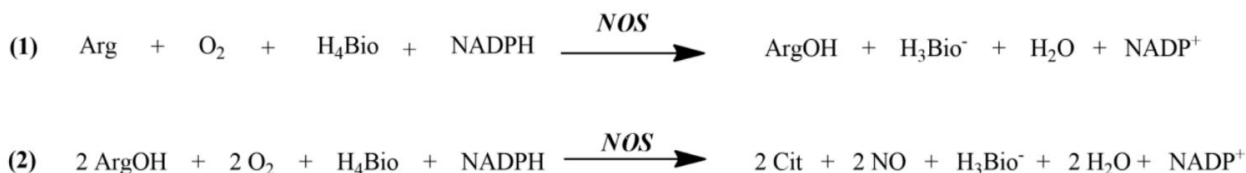
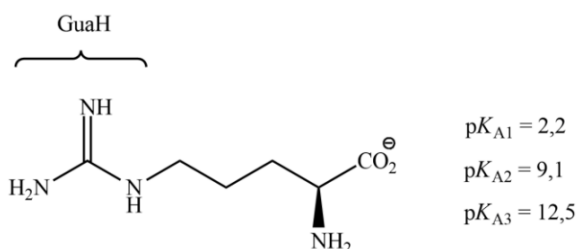


Figure 2 – Étapes de la biosynthèse de NO catalysée par les NOS

Données

Structure de la L-arginine (Arg) sous sa forme la plus basique et les pK_a associés :



Équilibre acido-basique du couple GuaH₂⁺/GuaH :



La forme GuaH₂⁺ est la forme la plus protonée de l'extrémité GuaH.

La valeur la plus élevée de pK_a est associée au couple GuaH₂⁺/GuaH.

1/ Activation de la NO-synthase

On s'intéresse tout d'abord à la première étape du mécanisme de formation de NO catalysée par la NOSynthase, qui consiste en la N-hydroxylation d'Arg en ArgOH dans le domaine catalytique de l'enzyme NOS en présence de deux cofacteurs : un hème et la tétrahydrobioptérine H₄Bio (réaction (1) de la figure 2). On représente la structure du site actif de l'enzyme avec les acides aminés impliqués (numérotés), en présence de la L-arginine et des cofacteurs hème (complexe de Fe(III) avec le ligand protoporphyrine) et H₄Bio (figure 3).

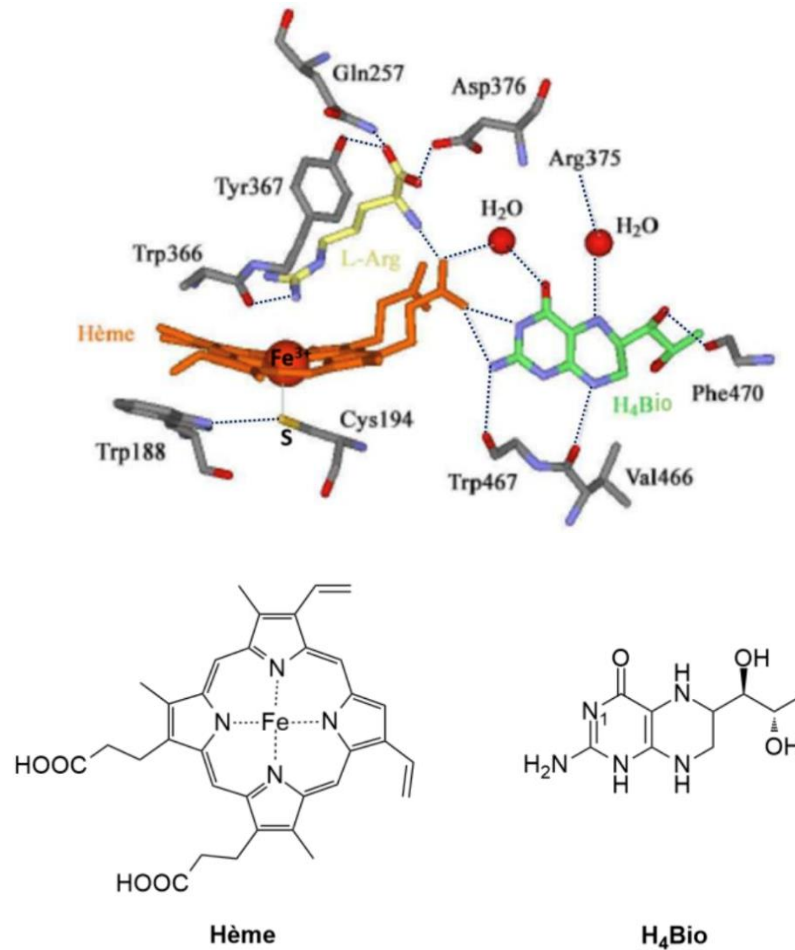


Figure 3 – En haut, site actif de NOS en présence de Arg et H₄Bio. Les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés, les atomes de soufre et de fer sont indiqués, les molécules d'eau sont représentées par des boules. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés, la liaison fer-soufre par un trait plein. En bas, structures chimiques des cofacteurs hème et H₄Bio.

1. Quelle est la denticité du ligand hème ? Que vaut l'indice de coordination du fer dans le site actif de la NOS ?
2. Rappeler les conditions nécessaires à l'établissement d'une liaison hydrogène. Donner l'ordre de grandeur de l'énergie mise en jeu pour une telle liaison.
3. L'hydroxylation du groupe azoté de la partie GuaH de la L-Arg s'opère par fixation de dioxygène sur le centre « fer » de l'hème (non représenté ci-dessus). Quel peut être l'intérêt de l'ensemble des liaisons hydrogène représentées quant à l'efficacité du processus d'hydroxylation ?
4. Initialement, le fer est au degré d'oxydation +III dans le site actif. Donner la configuration électronique de l'ion Fe³⁺ isolé à l'état fondamental.

La découverte des pathologies liées à un dérèglement de l'activité NO-synthase constitue le point de départ de nombreuses études dont le but est de trouver de nouveaux substrats efficaces et des inhibiteurs spécifiques des NOS. Il est donc important d'étudier précisément les interactions entre le substrat naturel L-Arg et des analogues de ce substrat au sein du site actif de NOS. Pour cela, on s'intéresse particulièrement à l'extrémité guanidinium (GuaH) de ces substrats et donc au pK_a de cette fonction afin de connaître précisément l'état de protonation des analogues en conditions physiologiques. Le pK_a de l'extrémité guanidinium varie en effet de manière significative avec la structure de l'analogue.

- Représenter le diagramme de prédominance des espèces de la L-arginine en fonction du pH, en précisant les structures chimiques des différentes espèces.
- Calculer la valeur du pH d'une solution aqueuse de L-arginine (sous sa forme zwitterionique neutre) dans une solution de concentration $c_0 = 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

Considérons maintenant l'un des analogues synthétiques de la L-arginine, que l'on notera A (figure 4) :

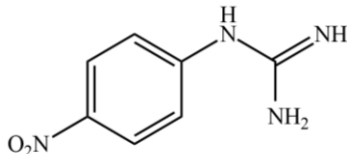


Figure 4 – Structure d'une analogue synthétique, noté A, de la L-Arginine

À l'issue de sa synthèse, A se présente sous la forme d'une solution de $AH^+ Cl^-$ dans l'acide chlorhydrique en excès. On procède au titrage de 10,0 mL de ce mélange par une soude à $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Une double suivi pH et conductimétrique est mis en œuvre afin de déterminer la valeur du pK_a du couple AH^+/A . Les résultats obtenus sont présentés à la figure 5 :

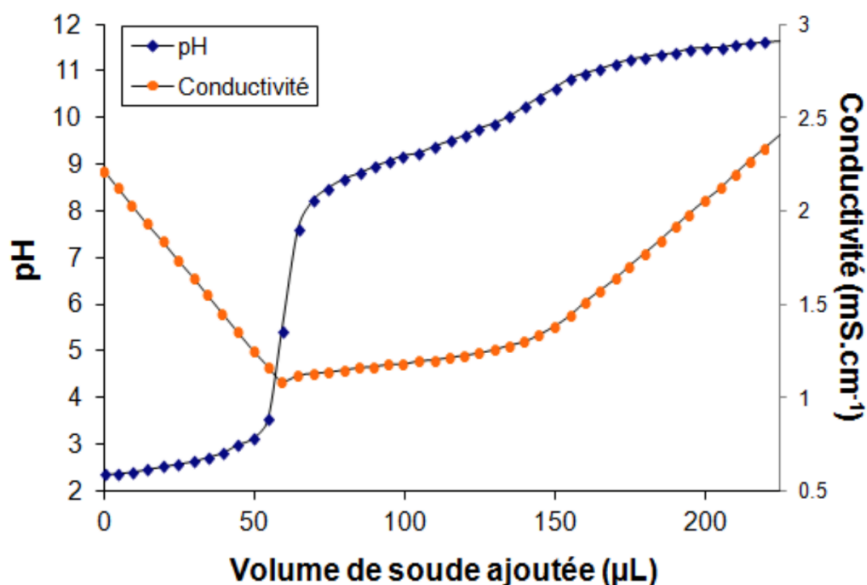


Figure 5 – Courbes de suivi pH-métrique et conductimétrique du titrage d'un mélange de AH^+, Cl^- et d'acide chlorhydrique par une soude molaire.

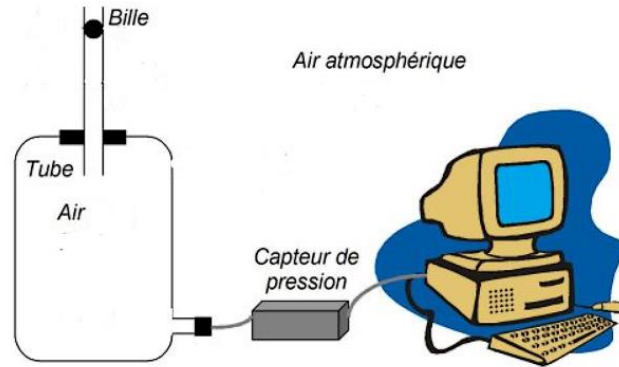
- Écrire les équations des réactions supports de ce titrage.
- Que contient la solution dans le bécher à la première équivalence ? Pourquoi le pH en ce point est-il acide ?
- Pourquoi le suivi pH-métrique n'est-il pas suffisant pour déterminer précisément le pK_a du couple AH^+/A ?
- Déterminer la valeur du pK_a du couple AH^+/A en utilisant les courbes de la figure 5. On justifiera soigneusement sa réponse.
- Pour chacune des trois portions de la courbe de suivi conductimétrique, justifier l'évolution de la conductivité. On précise que les valeurs des conductivités molaires ioniques limites sont telles que : $\lambda^0(AH^+) < \lambda^0(Na^+) < \lambda^0(OH^-) < \lambda^0(H_3O^+)$.

2. Mesure du coefficient γ

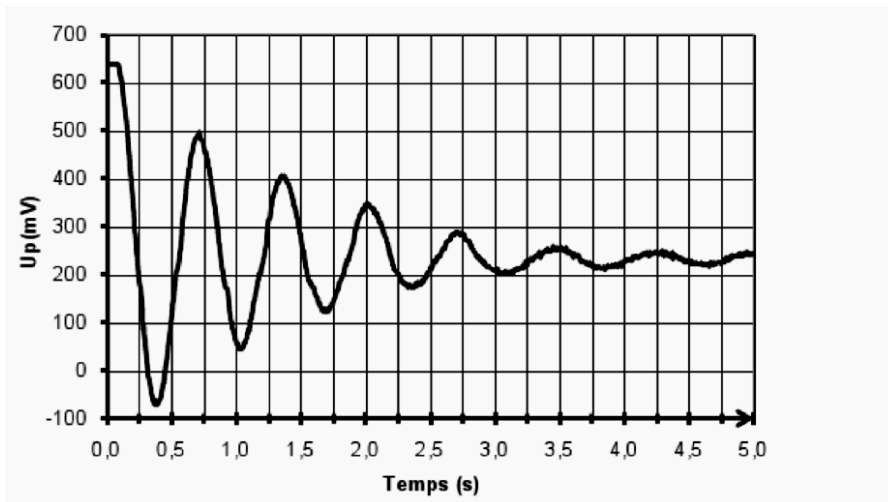
Un récipient de très grand volume, contenant de l'air, est surmonté d'un tube en verre, court et fin, de section $s = 2 \text{ cm}^2$. Une bille en acier, de masse $m = 20 \text{ g}$ et de diamètre très voisin de celui du tube, est lâchée depuis le haut du tube sans vitesse initiale. Le mouvement de la bille présente des oscillations verticales.

L'ensemble tube+bille peut être assimilé à un piston étanche du fait de la proximité des diamètres de la bille et du tube.

Un capteur de pression permet de suivre les oscillations de la bille grâce aux variations de la pression : ce capteur délivre une tension u_p reproduisant les variations de la pression P .



Proposer une modélisation de cette expérience et montrer que l'oscillogramme enregistré permet de déterminer la valeur du coefficient de Laplace γ de l'air contenu dans l'enceinte. Le volume du récipient à l'état d'équilibre final est $V_{eq} = 10 \text{ L}$.



Votre réponse pourra s'appuyer que les équations suivantes (qu'il est demandé d'établir et de justifier) :

$$mg + P_{atm} \cdot s - P \cdot (V_{eq} - sz) = m\ddot{z}$$

$$P \cdot (V_{eq} - sz)^\gamma = P_0 \cdot (V_{eq})^\gamma$$

$$mg + P_{atm} \cdot s - P_{eq} \cdot s = 0$$

$$P = P_0 \cdot \left(1 - \frac{sz}{V_0}\right)^{-\gamma} \approx P_0 \cdot \left(1 + \gamma \frac{sz}{V_0}\right)$$

$$mg + P_{atm} \cdot s - \alpha \cdot z - P \cdot (V_{eq} - sz) = m\ddot{z}$$