

**L'usage d'une calculatrice est autorisé pour cette épreuve.**

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera son sujet.

Ce sujet comporte 12 pages numérotées de 1 à 12.

Les documents sont en pages 7 à 11 et l'annexe en page 12

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

**L'analyse proposée dans le sujet qui comporte trois parties indépendantes s'appuie sur sept documents scientifiques présentés à la suite des questions. Elle mobilise également les acquis personnels dans le cadre de la préparation au concours. Le candidat est invité à lire attentivement les documents avant de répondre aux questions. Des données complémentaires sont situées en annexe p 12 à la fin de l'énoncé.**

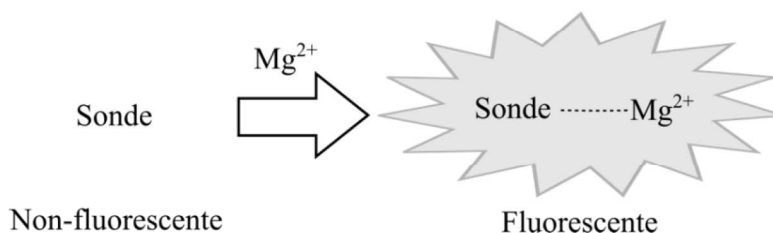
### Détection des ions $Mg^{2+}$ *in vivo* par fluorescence

Un composé fluorescent, appelé fluorophore ou fluorochrome, possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Ce phénomène est mis à profit en spectroscopie de fluorescence, une technique de détection qui s'avère être sensible à de très faibles concentrations de composé fluorescent. L'utilisation de la spectroscopie de fluorescence s'est accrue ces dernières années, en particulier dans les domaines de la chimie analytique et de la biologie. En chimie analytique, les espèces étudiées encore appelées analytes, ne possèdent pas nécessairement des propriétés de fluorescence de manière intrinsèque. Dans un tel cas, un autre fluorophore est utilisé pour aider à la détection de l'analyte, il porte alors le nom de **sonde fluorescente**.

Plusieurs types de sondes fluorescentes sont actuellement utilisés, parmi lesquels :

- les sondes de type *on-off* (marche-arrêt) qui présentent des propriétés fluorescentes en l'absence d'analyte, mais qui deviennent inactives lorsque l'analyte est présent ;
- les sondes de type *off-on* qui ne sont pas visibles par fluorescence en l'absence d'analyte, mais qui deviennent fluorescentes lorsque l'analyte est présent.

Ce problème étudie la synthèse d'une sonde de type *off-on* employée pour doser des ions magnésium  $Mg^{2+}$  et pour détecter ces ions au niveau cellulaire. Le fonctionnement de cette sonde se base sur sa complexation sélective avec l'ion magnésium pour former un complexe fluorescent, comme schématisé sur la figure 1.



**Figure 1 – Principe de la sonde *off-on* étudiée**

#### **A. Questions sur des notions du programme en lien avec les documents**

Le magnésium est un des éléments les plus utilisés à l'heure actuelle, notamment à cause de sa légèreté et de ses bonnes propriétés mécaniques. Au laboratoire de chimie il est bien connu pour son utilisation dans la synthèse de molécules organiques complexes. Le magnésium fait aussi partie des macroéléments indispensables au bon fonctionnement du corps humain, comme décrit dans le **document 1**. Il intervient dans de nombreux processus biologiques, en particulier enzymatiques.

Les questions 1 à 15 font référence au **document 1**.

#### Sels de magnésium liposolubles

- 1) Donner la configuration électronique de l'élément magnésium Mg à l'état fondamental.
- 2) En déduire l'(les) état(s) d'oxydation usuel(s) du magnésium Mg et justifier sa position dans la classification périodique des éléments.
- 3) Retrouver le nom utilisé dans le **document 1** pour désigner le composé obtenu en substituant un des groupes hydroxyles du propan-1,2,3-triol (glycérol) par un groupe phosphate. Écrire les structures de tous les composés pouvant être obtenus en effectuant cette substitution à pH biologique.
- 4) Indiquer parmi ces composés lesquels sont chiraux, et représenter, le cas échéant, l'isomère de stéréodescripteur (*R*).

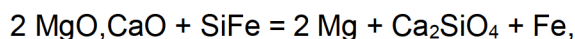
#### Production du magnésium métallique

- 5) Indiquer quelles sont les deux principales méthodes de production industrielle du magnésium métallique.

Dans un des procédés industriels cité pour la production du magnésium, le composé de départ est le chlorure de magnésium *anhydre*. Celui-ci est d'abord fondu vers 720 – 780 °C, puis deux électrodes sont plongées dans le bain obtenu. Une différence de potentiel de 6 à 7 V leur est ensuite appliquée, ce qui provoque un dégagement gazeux à l'électrode en carbone (pôle +).

- 6) Donner l'équation bilan de cette synthèse, en précisant bien l'état physique des produits.

Dans un deuxième procédé de production du magnésium, un mélange d'oxydes de magnésium et de calcium est chauffé à 1200 °C avec du ferrosilicium sous une pression d'environ 100 Pa. Le magnésium obtenu à l'état de vapeur est condensé dans une chambre refroidie par circulation extérieure d'eau. La réaction, dont l'équation est la suivante :



dure environ 6 h, et fournit un magnésium de grande pureté.

- 7) En se plaçant dans le cadre de l'approximation d'Ellingham, indiquer s'il est nécessaire de chauffer continûment le réacteur pour que la réaction se produise à la température souhaitée.
- 8) À l'aide des données présentes en annexe (p.12), des grandeurs thermodynamiques de réaction adéquates et/ou de l'évolution de la constante d'équilibre ou du quotient réactionnel, justifier les conditions opératoires adoptées lors de la synthèse industrielle du magnésium par ce procédé.

#### Utilisation du magnésium en chimie organique

Le magnésium est également très utilisé en synthèse organique. À l'état métallique, il réagit avec les dérivés halogénés pour former des organomagnésiens. La chimiosélectivité d'une telle réaction est étudiée en réalisant la séquence réactionnelle présentée sur le schéma 1. Cette synthèse est qualifiée de monotope séquentielle, car c'est une synthèse au cours de laquelle les réactifs sont ajoutés au fur et à mesure, un à la fois, et sans séparation intermédiaire.

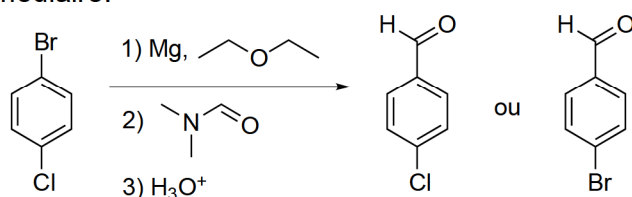


Schéma 1 – Préparation d'un aldéhyde en utilisant un magnésien

- 9) Identifier l'usage du magnésium mentionné dans le **document 1** qui est illustré dans cette synthèse. Rappeler brièvement les conditions opératoires à suivre pour mettre en œuvre l'étape 1 du schéma 1 (aucun schéma de montage n'est demandé).

Afin de savoir si la synthèse a bien conduit à la formation d'un aldéhyde, une chromatographie sur couche mince est réalisée en déposant sur une plaque de silice le composé dihalogéné de départ et le produit obtenu. Les rapports frontaux  $R_f$  calculés après élution sont rassemblés dans le tableau suivant :

Éluant : hexane/acétate d'éthyle (95/5)	4-Bromochlorobenzène	Produit de réaction
$R_f$	0,8	0,4

10) Expliquer la différence observée entre les deux rapports frontaux, et conclure sur le déroulé de la réaction.

Suivant l'organomagnésien formé lors de l'étape (1) du schéma 1, un seul des deux aldéhydes représentés est obtenu en fin de séquence. Pour savoir lequel des deux est majoritairement formé, le point de fusion du produit obtenu, noté **A**, est déterminé et son spectre IR est enregistré. Le spectre IR présente en particulier une bande importante à  $1080\text{ cm}^{-1}$ , et la température de fusion mesurée vaut  $48\text{ °C}$ .

11) À partir de ces informations et des données de l'annexe (p.12), déduire la structure du produit **A** obtenu. Expliquer pourquoi l'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  de **A** n'aurait pas permis *a priori* de trancher entre les deux aldéhydes attendus sans disposer au préalable du spectre RMN  $^1\text{H}$  expérimental de chacun.

L'aldéhyde **A** ( $X = \text{Br}$  ou  $\text{Cl}$ ) est ensuite mis en jeu dans la séquence réactionnelle du schéma 2.

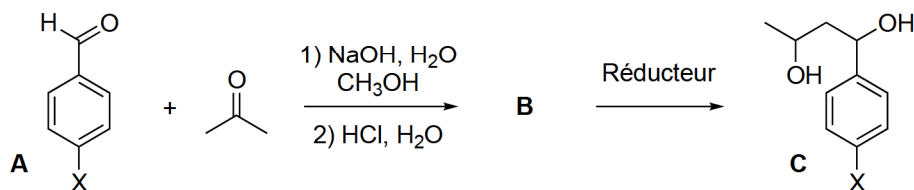


Schéma 2 – Formation du diol **C** à partir du composé **A**

12) Détailler le mécanisme de la première réaction du schéma 2, puis donner la structure du composé **B** majoritairement obtenu, ainsi que celle(s) du(des) produit(s) secondaire(s) qui est(sont) susceptible(s) de se former.

Des chercheurs allemands ont préparé sélectivement le stéréoisomère (1*R*,3*S*) du diol précédent en réalisant la séquence représentée sur le schéma 3 :

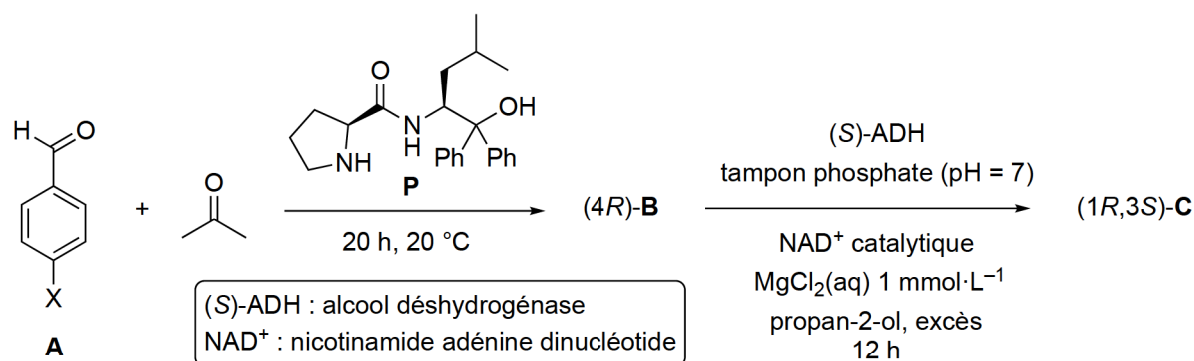


Schéma 3 – Préparation stéréosélective du diol **C**

13) Préciser pourquoi les auteurs utilisent le dérivé de la proline **P** pour préparer le composé (4*R*)-**B**.

14) La deuxième réaction fait intervenir une enzyme, l'alcool déshydrogénase notée (S)-ADH. En utilisant le **document 1**, indiquer le rôle des ions magnésium dans cette réaction. Attribuer également les rôles joués par le NAD<sup>+</sup> et par le propan-2-ol.

15) Donner la structure du diol (1*R*,3*S*)-**C**, puis proposer une réaction qui permettrait de savoir si la deuxième étape du schéma 3 est stéréospécifique en plus d'être stéréosélective.

## B. Analyse approfondie des documents

### Synthèse de la sonde fluorescente

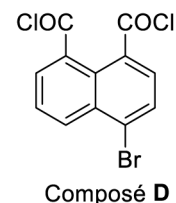
Le **document 2** décrit succinctement le processus qui explique le choix d'une base de Schiff comme sonde pour la détection des ions magnésium par fluorescence. Le **document 3** décrit la synthèse d'une molécule qui complexe sélectivement l'ion magnésium et qui présente des propriétés de fluorescence une fois complexée avec cet ion. Les numéros des molécules utilisés sont ceux du **document 3**.

- 1) Donner le descripteur stéréochimique de la sonde synthétisée dans le **document 3**.
- 2) Identifier les sites de coordination possibles de la sonde pour l'ion magnésium  $\text{Mg}^{2+}$ .
- 3) Nommer la fonction principale de la molécule **1**. Indiquer les précautions à prendre lorsque ce type de composé est utilisé en synthèse organique.



4) Donner la structure du composé qui permet de préparer la molécule **1** par chauffage en présence d'un agent déshydratant.

La molécule **2** peut aussi être obtenue par une double addition-élimination en utilisant à la place du dérivé bromé **1** du **document 3**, le composé **D** dont la structure est représentée ci-contre. Cette réaction s'effectue en présence d'un équivalent de butanamine (BuNH<sub>2</sub>) et d'un excès de pyridine (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, cycle aromatique à 6 chaînons).



5) Détailler le mécanisme de la réaction de la butanamine avec le composé **D** en justifiant le rôle joué par la pyridine (seule la première addition-élimination est demandée).

Le passage de la molécule **2** à la molécule **3** est une substitution nucléophile un peu particulière, car elle a lieu sur un *cycle aromatique*. Le mécanisme de la réaction n'est pas celui d'une S<sub>N</sub>1 ou d'une S<sub>N</sub>2 mais se déroule selon les deux étapes suivantes :

- Addition de l'ion méthanolate sur le carbone portant l'atome de brome, l'intermédiaire formé étant alors un carbanion ;
- Départ du nucléofuge chargé avec restauration concomitante de l'aromaticité.

6) Expliquer pourquoi la partie naphthalénique de la molécule **2** est aromatique (partie entourée en pointillés).

7) Écrire l'intermédiaire carbanionique formé par addition de l'ion méthanolate sur la molécule **2**, puis proposer des formes mésomères qui justifient sa stabilisation. Détailler le mécanisme correspondant à la deuxième étape (décrite ci-dessus) permettant d'obtenir la molécule **3**.

8) Proposer un mécanisme expliquant le passage de la molécule **3** au dérivé phénolique **4**. On précise que l'acide iodhydrique (HI) est un acide fort.

L'étape suivante qui aboutit à la formation de la molécule **5** est effectuée suivant les conditions décrites par H. C. Duff. Le mécanisme complexe de cette réaction est représenté sur le schéma 4 dans le cas où le phénol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) est le réactif.

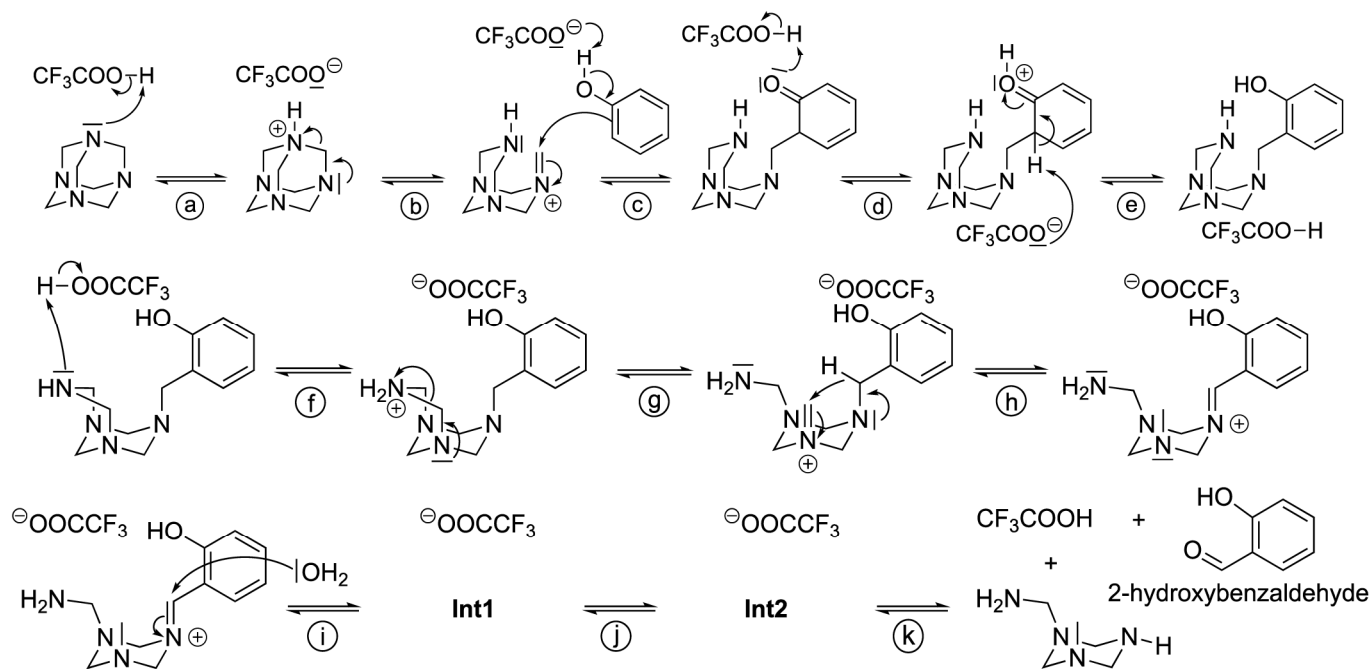


Schéma 4 – Mécanisme de la réaction de Duff

9) Identifier le rôle joué par l'acide trifluoroacétique (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) dans le mécanisme du schéma 4.

10) Compléter le mécanisme de la réaction de Duff, en proposant d'une part une structure pour les deux molécules appelées **Int1** et **Int2**, puis en dessinant d'autre part sur les structures **Int1** et **Int2** les flèches courbes qui symbolisent les mouvements des électrons se produisant respectivement au cours des étapes (j) et (k).

11) Spécifier l'étape du mécanisme dans laquelle la régiosélectivité de l'hydroxylation du phénol est déterminée (conduisant in fine au 2-hydroxybenzaldéhyde plutôt qu'au 4-hydroxybenzaldéhyde). Proposer une explication à la régiosélectivité de cette étape.

En faisant réagir les composés **5** et **7** au reflux de l'éthanol, la molécule sonde est obtenue sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 98 %. La sonde est alors caractérisée par spectroscopie RMN du proton (chloroforme deutéré, 600 MHz), et les déplacements chimiques relevés sont listés ci-après. Entre parenthèses figurent successivement (i) la multiplicité du signal (s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet) suivie éventuellement de la valeur de la constante de couplage  $J$  et (ii) le nombre d'atomes d'hydrogène de l'intégration.

Les déplacements chimiques sont les suivants : ( $\delta$ , ppm) 8,82 (s, 1H), 8,79 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 8,75 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,87 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,80 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,74 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,63 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,50 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 4,20 (t,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,72 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,00 (t,  $J = 7$  Hz, 3H).

**12)** Identifier parmi les signaux observés en RMN  $^1\text{H}$ , ceux qui correspondent aux protons appartenant à la chaîne butyle, puis en faire l'attribution détaillée. Montrer que les autres protons se situent bien dans les zones de déplacement chimique indiquées en annexe.

#### Dosage des ions magnésium $\text{Mg}^{2+}$ par la sonde et sélectivité de la sonde pour les ions $\text{Mg}^{2+}$

Les résultats des mesures effectuées par absorbance UV-visible et par fluorescence sont présentés dans le **document 4**, et ceux des mesures réalisées dans le cas de la fluorescence en présence d'autres ions dans le **document 5**.

- 13)** Expliquer qualitativement pourquoi le dosage des ions  $\text{Mg}^{2+}$  par la sonde n'aurait pas pu se faire avec la spectroscopie UV-visible.
- 14)** Justifier le choix de la longueur d'onde d'excitation de fluorescence en invoquant deux raisons différentes.
- 15)** Expliquer comment les ions magnésium  $\text{Mg}^{2+}$  peuvent être dosés en utilisant la courbe d'étalonnage du **document 4**, avec comme technique spectroscopique la fluorescence.
- 16)** Commenter le choix des différents cations sélectionnés dans le **document 5** pour tester la sélectivité de la sonde.
- 17)** Identifier les deux autres cations qui forment un complexe fluorescent avec la sonde, et indiquer pourquoi ce résultat était attendu.
- 18)** Reconnaître les cations ayant l'effet de *quenching* le plus important, et préciser leur point commun.

#### Analyse du complexe formé entre la sonde et l'ion magnésium $\text{Mg}^{2+}$

Afin de déterminer la stœchiométrie et la structure du complexe formé, la méthode de Job est utilisée comme décrit dans le **document 6**. La propriété physique choisie est l'intensité de fluorescence qui vérifie la condition de proportionnalité. Le graphique représenté sur la figure 2 est celui obtenu par la méthode de Job pour une concentration totale en sonde et en ions  $\text{Mg}^{2+}$  égale à  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

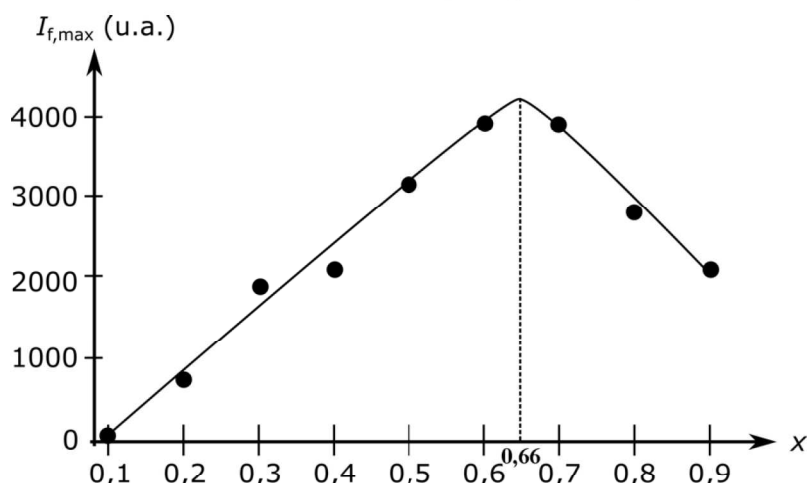


Figure 2 – Évolution de l'intensité de fluorescence à 523 nm en fonction de la fraction volumique en ions magnésium pour une concentration totale de  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

- 19)** À l'aide d'un tableau d'avancement retrouver les relations A et B de conservation de masse présentées dans le **document 6**.
- 20)** Démontrer la relation (III) qui donne l'expression de la dérivée  $\frac{dc_{\text{ML}_n}}{dx}$  en utilisant l'expression du quotient réactionnel associé à la constante d'équilibre  $\beta_n$ .

- 21) Retrouver l'expression donnant  $n$  en fonction de  $x_{max}$  puis en déduire la stœchiométrie du complexe formé entre l'ion magnésium  $Mg^{2+}$  et la sonde.
- 22) En utilisant le **document 3**, proposer une structure topologique pour ce complexe sachant qu'il n'est pas chargé. L'arrangement spatial (géométrie) autour du métal et la représentation de Cram ne sont pas demandés.
- 23) Décrire une méthode permettant de déterminer la constante de formation du complexe en exploitant les mesures effectuées pour la méthode de Job et la courbe d'étalonnage du **document 4**. Aucun calcul n'est demandé.

### C. Approche critique et prospective

#### *Incertitudes de mesure et limite de détection*

La limite de détection d'une méthode de mesure est définie comme la plus petite concentration fournissant un signal significativement différent du blanc. C'est donc la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée dans l'échantillon mais pas nécessairement quantifiée. Significativement différent veut dire qu'on choisit un certain niveau de probabilité : il est de 0,999 pour la limite de détection standard, ce qui correspond à un risque de première espèce exactement égal à 0,13 % d'affirmer à tort que l'échantillon est différent du blanc ou, dit autrement, qu'il contient l'analyte. Dans le cas d'un étalonnage par régression linéaire, cette limite de détection est donnée par la formule :

$$Y = 3 \frac{\sigma}{k}$$

où  $\sigma$  est l'écart-type pour des mesures répétées de fluorescence pour une solution de sonde seule et  $k$  est la pente de la régression linéaire.

- 1) Identifier le type d'incertitude qui est pris en compte dans ce calcul et indiquer les autres sources d'incertitude qui pourraient intervenir dans le cadre de cette étude. Dire comment serait modifié le calcul précédent dans ce cas.
- 2) Sachant que l'écart-type pour des mesures répétées de fluorescence pour une solution de la sonde seule (**document 3**) vaut  $\sigma = 40$  u.a., évaluer la limite de détection de cette sonde en utilisant les résultats du **document 4**, et indiquer si elle est suffisante pour une mesure *in-vivo* étant données les informations du **document 1**.

#### *Utilisation de la sonde in-vivo*

Le **document 7** présente le protocole utilisé pour utiliser la sonde *in-vivo*.

- 3) Expliquer pourquoi il est nécessaire d'utiliser un solvant organique comme le DMSO pour solubiliser la sonde, et indiquer quels sont les désavantages d'une telle utilisation *in-vivo*.
- 4) Commenter les résultats obtenus par microscopie confocale pour l'utilisation de la sonde *in-vivo*, et conclure.

Il est également possible d'utiliser des bases de Schiff pour créer des sondes de type *on-off*. C'est le cas de la sonde à cuivre (II) représentée sur la figure 3, qui est fluorescente non complexée, mais qui une fois complexée par l'ion  $Cu^{2+}$  devient non fluorescente.

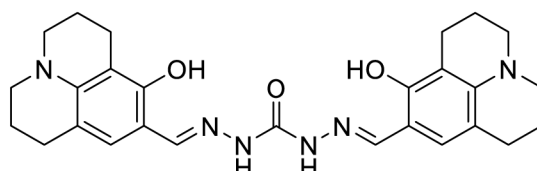


Figure 3 – Sonde pour l'ion cuivre

- 5) En utilisant les propriétés des bases de Schiff évoquées dans le **document 2**, proposer une explication au fait que la sonde de la figure 3 soit fluorescente lorsqu'elle n'est pas complexée.
- 6) Discuter de l'intérêt d'utiliser une sonde *on-off* plutôt qu'une sonde *off-on* suivant les domaines d'application de la sonde. On pourra notamment commenter les risques de faux-positif et de faux-négatif dans chacun des deux cas.



### DOCUMENT 1 – Propriétés du magnésium

Le **magnésium** est l'élément chimique de numéro atomique 12, de symbole Mg. [...]

Les atomes de magnésium existent dans la nature uniquement sous forme de combinaisons avec d'autres éléments, où ils présentent invariablement un état d'oxydation +2. L'élément pur est produit artificiellement par réduction thermique ou électrolyse. [...]

Le magnésium est le onzième élément le plus abondant en masse dans le corps humain. Il est essentiel à toutes les cellules et à quelque 300 enzymes, en tant que cofacteur notamment. Les ions magnésium interagissent avec des composés polyphosphates tels que l'ATP, l'ADN et l'ARN. Les composés de magnésium sont utilisés de manière médicale en tant que laxatifs, antiacides (par exemple, lait de magnésie) et pour stabiliser l'excitation anormale des nerfs ou le spasme des vaisseaux sanguins dans des conditions telles que l'éclampsie. Chez l'homme, le magnésium (Mg) est le cation intracellulaire le plus abondant, après le potassium. L'organisme en contient environ 1 mole, localisée principalement au niveau des os (65 %, sous forme de réserve aisément mobilisable), dans les cellules (34 %) et les liquides extracellulaires (1 % seulement).

#### Usage

C'est aussi un réactif important en chimie, surtout employé dans les procédés de désulfuration, lors de la fabrication des aciers, la purification des métaux (débismuthage), ou la réaction de Grignard. Il a servi de combustible sous forme de poudre dans les flashes photographiques à cause de sa grande inflammabilité et de l'éclair lumineux très brillant produit lors de sa combustion. C'est un agent chimique essentiel à la vie, il intervient dans une multitude de processus biologiques comme par exemple celui de la photosynthèse.

#### Médecine

Le corps ne produit pas de magnésium et doit le puiser dans l'alimentation. Le magnésium est mal assimilé par l'organisme, et ne peut être stocké. [...] Il existe trois grandes catégories de sels de magnésium :

- Les sels inorganiques (chlorure, oxyde) : ils sont laxatifs au-delà de 50 mg par prise ;
- Les sels organiques (citrate, lactate, pidolate, L-aspartate) : ils sont moins laxatifs ; ils contiennent des composés comme l'acide lactique ou l'acide aspartique ;
- Les sels solubles dans les graisses (glycérophosphate, formes chélatées du magnésium) : ils ne sont pas laxatifs car ils sont entièrement digérés.

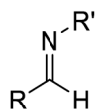
### DOCUMENT 2 – Propriétés fluorescentes des bases de Schiff

Le fluorophore synthétisé pour détecter le magnésium doit remplir certains critères ; il doit ainsi :

- Pouvoir complexer l'ion magnésium ;
- Être fluorescent lorsqu'il est complexé ;
- Ne pas présenter de fluorescence lorsqu'il n'est pas complexé.

Dans cet objectif, l'emploi d'une base de Schiff constitue un choix pertinent, certaines bases de Schiff ayant déjà donné des résultats intéressants pour la détection de l'ion  $Zn^{2+}$ .

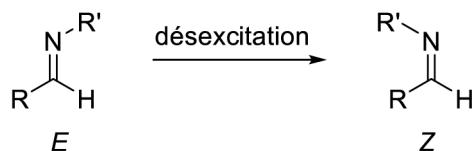
Le terme base de Schiff désigne les aldimines secondaires, c'est-à-dire les composés ayant pour structure générale (R et R' étant des groupes carbonés) :



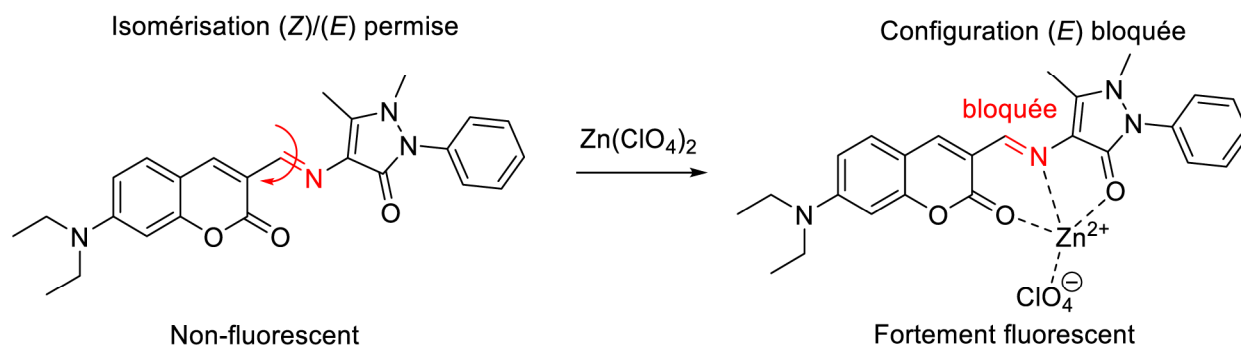
Ces composés ont pour avantage de répondre aux critères précédemment énoncés :

- Ils possèdent un atome d'azote pouvant complexer le magnésium ;

- Leur fluorescence est très faible ; en effet, leur désexcitation ne se fait pas par émission d'un photon mais par une isomérisation Z/E de leur double liaison C=N selon :

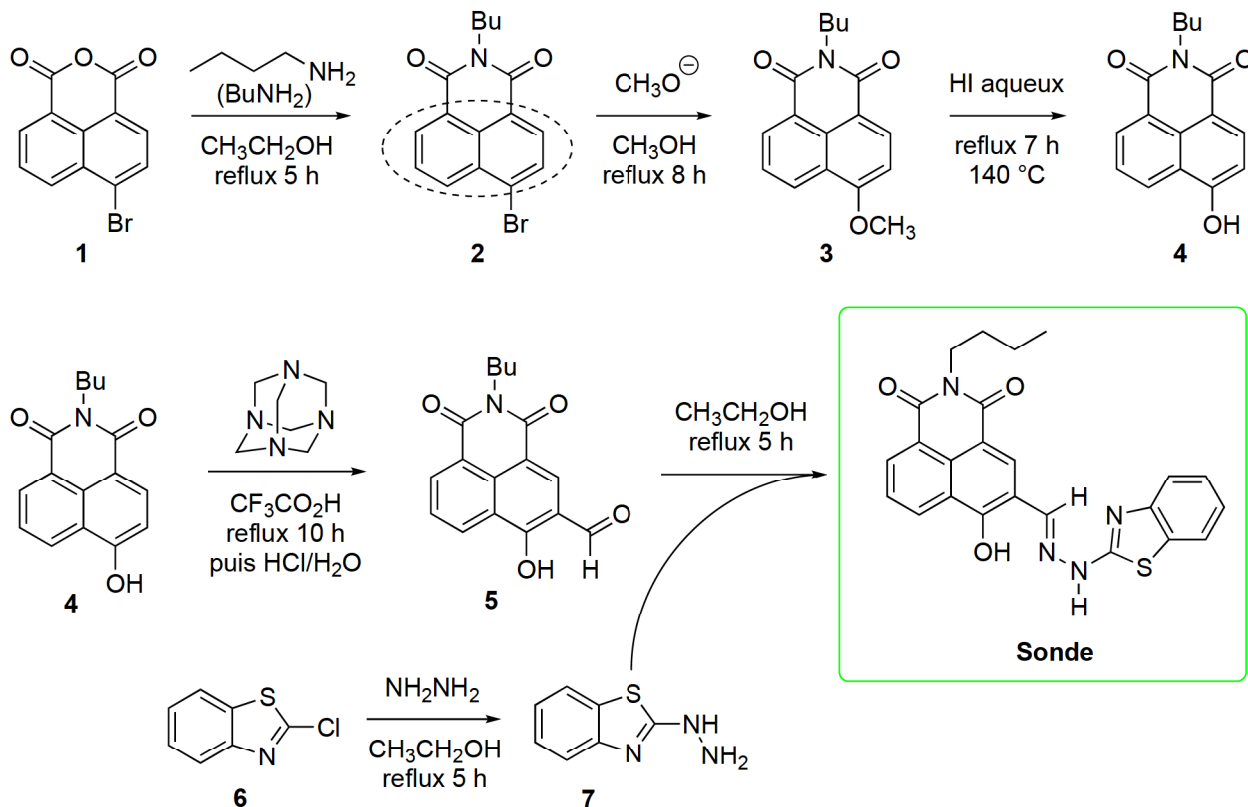


- La configuration de la double liaison C=N est bloquée lorsque la base de Schiff est complexée. La désexcitation de la forme complexée ne pouvant se faire par isomérisation, elle s'opère alors par fluorescence avec émission d'un photon.



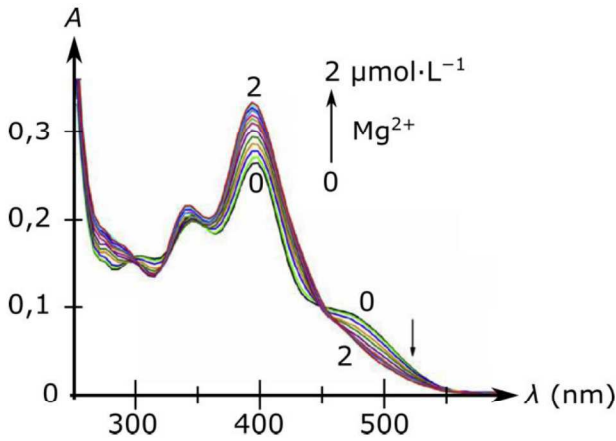
### DOCUMENT 3 – Synthèse d'une sonde spécifique au magnésium

L'ion magnésium  $Mg^{2+}$  est un petit ion fortement chargé. Il se coordonne donc de préférence avec des ligands alcoolates ou phénates ( $O^-$ ) et des ligands N-donneurs comme les imines. Afin de rendre la complexation de l'ion magnésium plus efficace, la base de Schiff qui constitue la cible de cette synthèse porte aussi une fonction phénol. Sa synthèse utilise comme composé de départ le tricyclic bromé **1**, et se déroule selon la séquence décrite dans le schéma suivant.



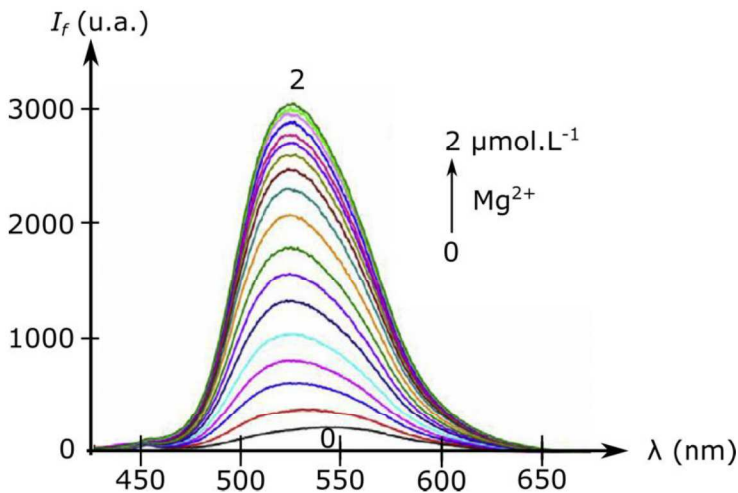


#### DOCUMENT 4 – Résultats des mesures effectuées par absorbance et par fluorescence.



Pour vérifier si la sonde permet effectivement de doser le magnésium, la mesure de l'absorbance UV-visible d'une solution de la sonde à 10 μmol·L<sup>-1</sup> dans l'éthanol en présence d'ion magnésium Mg<sup>2+</sup> en concentration variable est réalisée. La série de spectres ci-contre, pour lesquels la concentration en ion magnésium Mg<sup>2+</sup> passe progressivement de 0 à 2 μmol·L<sup>-1</sup>, est alors obtenue. La solution garde durant toute l'expérience une coloration jaune pâle.

La courbe légendée 0 (trait noir) correspond à la solution à 0 μmol·L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup> tandis que la courbe légendée 2 (trait ocre) correspond à la solution à 2 μmol·L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup>.

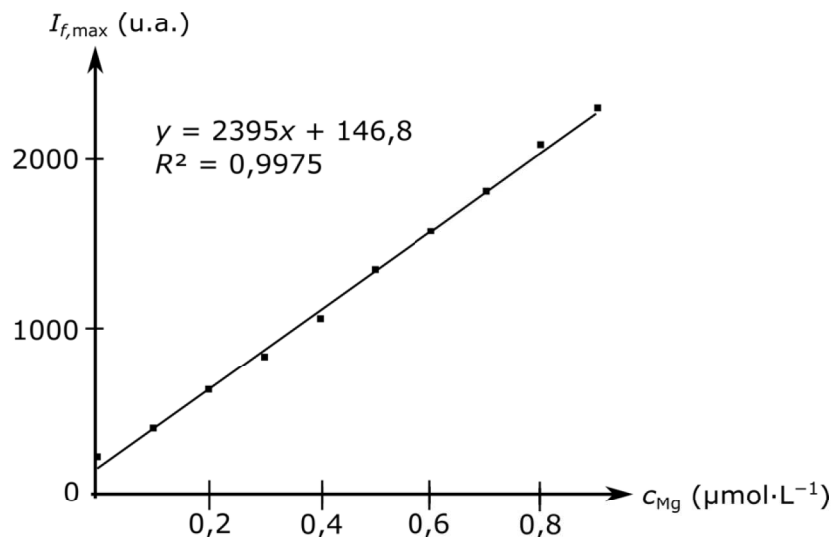


Le spectre d'émission de fluorescence est également enregistré pour les mêmes solutions pour une excitation à la longueur d'onde λ égale à 397 nm.

Contrairement aux spectres d'absorbance, le spectre de fluorescence représente l'intensité émise et non l'intensité absorbée. Cette intensité est notée I<sub>f</sub> et elle est exprimée en unité arbitraire (u.a.).

Dans la série de spectres représentés ci-contre, le maximum de fluorescence est obtenu pour la longueur d'onde λ égale à 523 nm. La fluorescence en présence d'ion magnésium Mg<sup>2+</sup> est de couleur verte.

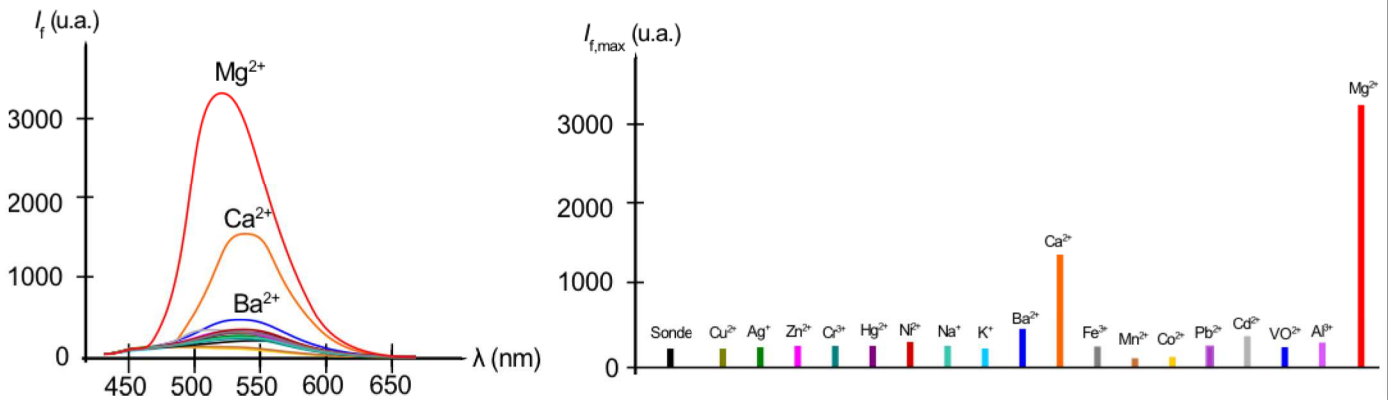
Pour s'assurer que la mesure de l'intensité de fluorescence permet bien de déterminer la concentration en ion magnésium Mg<sup>2+</sup>, la courbe d'étalonnage représentant l'intensité maximale de fluorescence en fonction de la concentration en ion magnésium Mg<sup>2+</sup> est tracée. L'équation de régression linéaire obtenue par ajustement affine est indiquée sur le graphe ( $y = ax + b$ ).



## DOCUMENT 5 – Sélectivité de la sonde pour les ions magnésium $Mg^{2+}$

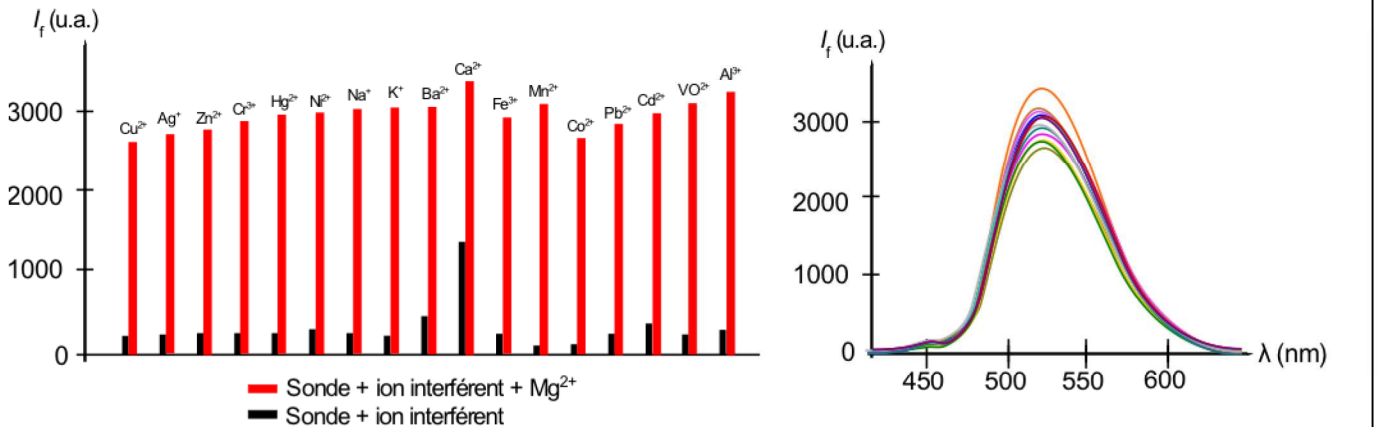
La caractéristique la plus importante pour une sonde fluorescente est sa capacité à être sélective d'un seul type d'ion. En effet, si la sonde forme simultanément un complexe avec un autre ion, les mesures sont faussées. Pour tester cette sélectivité, l'intensité de fluorescence après excitation préalable à 397 nm est mesurée pour une solution contenant la sonde et un des ions métalliques.

Les résultats obtenus pour une concentration de la sonde de  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et pour deux équivalents d'ion métallique sont les suivants :



À cause d'un fort recouvrement des spectres de fluorescence, les légendes des spectres ne sont pas toutes indiquées. L'intensité maximale de fluorescence de chaque spectre est indiquée à la place sous forme d'histogramme. Histogramme, de gauche à droite : sonde seule,  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $VO^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  et enfin  $Mg^{2+}$ .

Outre le fait que d'autres ions que  $Mg^{2+}$  puissent former un complexe avec la sonde et la rendre fluorescente, ces autres ions peuvent également interagir avec le complexe sonde- $Mg^{2+}$  et l'empêcher de fluorescer. On parle alors d'inhibition de fluorescence ou de *quenching*. Ce phénomène de quenching fausse le dosage en sous-estimant la quantité d'ions magnésium, ou même l'empêche s'il est trop important. Les résultats obtenus pour une concentration de la sonde de  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et pour deux équivalents d'ion métallique et deux équivalents d'ion magnésium  $Mg^{2+}$  sont les suivants :



À cause d'un fort recouvrement des spectres de fluorescence les légendes des spectres ne sont pas indiquées. L'intensité maximale de fluorescence de chaque spectre est indiquée à la place sous forme d'histogramme. De gauche à droite :  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $VO^{2+}$  et enfin  $Al^{3+}$ . Pour comparaison, les intensités de fluorescence maximale obtenues précédemment en absence d'ion  $Mg^{2+}$  sont rappelées à gauche de chaque barre de l'histogramme.

## DOCUMENT 6 – Analyse de la stœchiométrie d'un complexe par la méthode de Job

La méthode de variation continue ou méthode de Job est une méthode de choix pour déterminer la stœchiométrie d'un complexe. Sa mise en œuvre dans le cas d'un complexe métallique est détaillée dans les paragraphes suivants.

Soit une solution contenant un ligand L qui peut se lier à un ion métallique noté M pour former le complexe  $ML_n$ . Le but de cette méthode est de déterminer le nombre de ligands  $n$  portés par l'ion métallique M.

La méthode de Job nécessite de pouvoir mesurer une propriété physique  $P$  qui varie linéairement avec la concentration en complexe  $ML_n$ , c'est-à-dire qui peut s'exprimer selon l'équation :

$P = k \times c$ , où  $k$  est une constante et  $c$  la concentration du complexe.

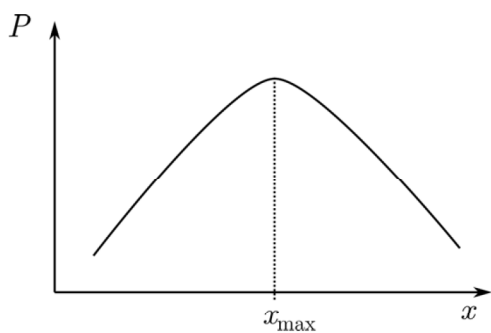
Dans la suite du document, les concentrations initiales avant formation du complexe sont notées  $c_{i,0}$ , et les concentrations à l'équilibre après formation du complexe  $c_i$ .

Le protocole expérimental mis en œuvre est alors le suivant :

- Préparer une solution du ligand et une solution du cation métallique de même concentration  $c_0$ .
- Mélanger un volume  $V_L$  de solution du ligand avec un volume  $V_M$  de solution du cation métallique ; le volume total de la solution est noté  $V_{tot}$ , et la fraction volumique en ligand  $x = \frac{V_L}{V_{tot}}$ .
- Préparer de même plusieurs solutions ayant le même volume total  $V_{tot}$  que précédemment, mais des fractions volumiques  $x$  en ligand différentes.
- Mesurer pour chacune de ces solutions la propriété physique  $P$ .
- Tracer le graphique  $P = f(x)$  qui présente un maximum en  $x = x_{max}$ .

La conservation de la matière permet d'écrire qu'après formation du complexe :

$$c_M = (1 - x)c_0 - c_{ML_n} \text{ (relation A) et } c_L = xc_0 - nc_{ML_n} \text{ (relation B).}$$



Donc au maximum de la courbe, où  $\frac{dc_{ML_n}}{dx} = 0$ , on a :

$$\frac{dc_M}{dx} = -c_0 \text{ (I) et } \frac{dc_L}{dx} = c_0 \text{ (II)}$$

En utilisant la constante globale de formation  $\beta_n$ , il vient :

$$\frac{dc_{ML_n}}{dx} = \beta_n \frac{c_L^{n-1}}{(c^\circ)^n} \left( c_L \frac{dc_M}{dx} + nc_M \frac{dc_L}{dx} \right) \text{ (III)}$$

où  $c^\circ$  désigne la concentration standard. En combinant les trois expressions des dérivées (I), (II) et (III), on trouve qu'à l'équilibre, au maximum de la courbe où  $\frac{dc_{ML_n}}{dx} = 0$ , on a :

$$c_L = nc_M \text{ (relation C).}$$

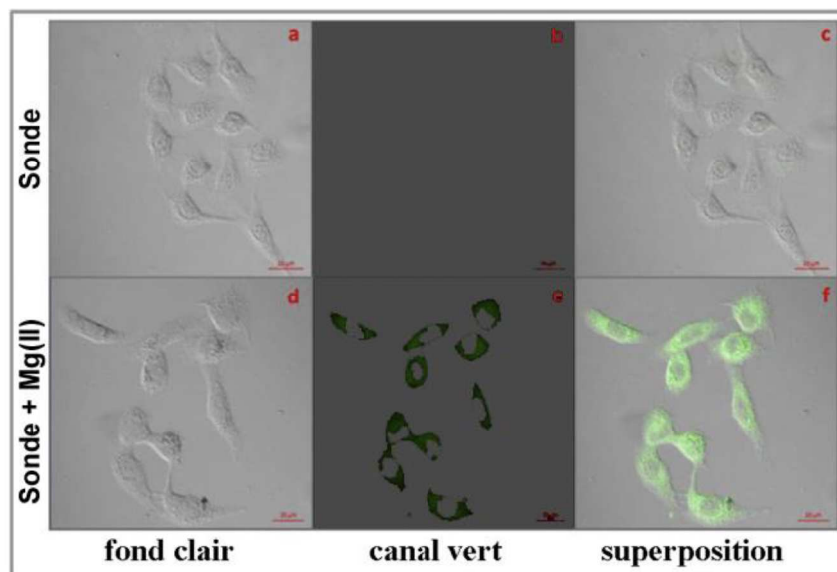
Enfin, en combinant les relations A, B et C, il vient pour  $x = x_{max}$  :

$$n = \frac{x_{max}}{1-x_{max}}$$

## DOCUMENT 7 – Utilisation de la sonde *in-vivo*

Pour étudier la sonde *in-vivo*, des cellules sont accrochées sur des plaques, puis une solution à  $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de la sonde dans le diméthylsulfoxyde [DMSO,  $\text{CH}_3\text{S}(=\text{O})\text{CH}_3$ ] est ajoutée au milieu cellulaire afin d'obtenir pour la sonde une concentration finale égale à  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Après incubation pendant 30 minutes, l'excès de solution est lavé trois fois avec une solution saline tamponnée. Les cellules sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal en utilisant le canal vert (images a-c ci-dessous).

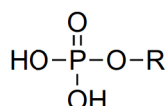
Les cellules prétraitées avec la sonde sont finalement incubées pendant 30 minutes avec une solution à  $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en ion magnésium  $\text{Mg}^{2+}$ , puis imagées comme illustré sur la figure suivante (images d-f).





## Annexe

- Structure et acidité du groupe phosphate lié à un radical organique R



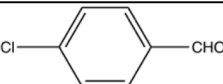
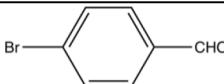
Dans le cas du glycérophosphate (R = 1-glycérile), ce diacide possède les  $pK_a$  suivants :

$$pK_{a1} = 1 \text{ et } pK_{a2} = 6,2$$

- Données thermodynamiques à 298 K

Espèce	Mg(g)	Fe(s)	MgO,CaO(s)	SiFe(s)	Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> (s)
$\Delta_f H^\circ$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	147,1	-	-1236,5	-73,89	-2307,1
$S^\circ_m$ (J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	148,6	27,3	65,1	45,6	129,8

- Températures de changements d'état

Espèce	Mg	Fe	SiFe	CaO	MgO	Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>		
$\theta_{\text{fus}}$ (°C)	650	1538	>1200	2570	2800	2130	45-50	55-58
$\theta_{\text{éb}}$ (°C)	1090	2861	-	-	-	-	213-214	-

- Classification périodique des éléments

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	H																	He
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts	Og

- Table IR

Liaison	O-H	C-H	C=O	C=C	Caromatique-Cl	Caromatique-Br
$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	3200-3650	2800-3100	1680-1820	1620-1680	1075-1100	1050-1075

- Table RMN <sup>1</sup>H

Proton	Haromatique	CH=N-	-O-CH-	-N-CH-	-C-CH <sub>2</sub> -C	-C-CH <sub>3</sub>	-OH	-NH
$\delta$ (ppm)	7 – 9	7 – 9	3,3 – 3,9	1,7 – 4,0	1,1 – 2,0	0,8 – 1,5	0,5 – 5,0*	0,5 – 5,0*

\* Signal généralement non visible dans des solvants deutérés à deutérium labile

**FIN DU SUJET**