

ÉTUDE D'INTÉRACTIONS POLYPEPTIDES-EAU-BLEU DE MÉTHYLÈNE

H. GHABI, M. DHAHBI

Laboratoire de physico-chimie des interfaces, INRST, BP 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

(Soumis en janvier 1997, accepté en octobre 1998)

RESUME: L'interaction d'un colorant, le bleu de méthylène (BM), avec trois polypeptides [polyasparagine (PAg), polyacide aspartique (PAsp) et polyalanine (PAla)] a été étudiée par spectrophotométrie UV-visible. Les résultats montrent la formation des complexes 1:1 dont les constantes ont été déterminées à 25°C. Différents types d'interactions sont probables selon la nature du polypeptide et la concentration du colorant. Le rôle de l'eau est mis en évidence.

Mots clés : Interaction, polypeptides, bleu de méthylène

ABSTRACT - The interaction of Methylene blue (M.B) dye with three different polypeptides [Polyasparagine (PAg), Polyaspartic acid (PAsp) and polyalanine (PAl)] was studied by UV- spectrophotometry. The results show that different types of interactions are possible depending on concentration and polypeptides natures and the formation of complex whose constants are determined. The role of water was pointed out.

Keywords : Interaction, polypeptides, Methylene blue

INTRODUCTION

En solution aqueuse, selon sa concentration, le bleu de méthylène peut exister sous forme de monomère, dimère ou polymère. En solution diluée, il existe sous forme de monomère mais sa structure peut être modifiée en présence d'un polyélectrolyte [1]. Ce comportement a été attribué au changement d'orientation de la structure de BM stabilisée par une interaction entre les électrons π des molécules adjacentes du colorant et les paires d'électrons des atomes d'oxygène des polyélectrolytes [2,3] ou des acides nucléiques [4]; ces caractéristiques sont utilisées pour étudier qualitativement et quantitativement certaines propriétés des acides nucléiques, phospholipides, argiles et la détermination de la concentration critique micellaire (CMC) de certains détergents [5,6,7]. Cependant, à notre connaissance, peu d'étude dans la littérature s'intéresse à la nature des interactions entre ce colorant et les polypeptides synthétiques considérés comme modèle pour entreprendre une étude sur les polypeptides naturels [8,9,10]. On se propose dans le présent travail d'étudier par spectrophotométrie UV-visible, le comportement du BM en présence de trois polypeptides de différents radicaux, polyalanine -CH₃, polyasparagine -CH₂-CO-NH₂ et

polyacide aspartique $-\text{CH}_2\text{-CO-OH}$ et examiner les types d'interactions. Les principaux résultats de cette étude sont présentés dans cet article.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les polypeptides utilisés sont des produits SIGMA; la polyalanine (PAI) de masse molaire $\text{MM}=3200$, et de degré de polymérisation $\text{DP}=31$, la polyasparagine (PAG) $\text{MM}=10400$ $\text{DP}=91$; le polyacide aspartique (PAsp) $\text{MM}=5600$ $\text{DP}=38$.

Le bleu de méthylène (BM) est un produit FLUKA.

Un spectrophotomètre UV-visible Beckman a permis de suivre l'absorption des colorants en absence et en présence des polypeptides à différentes concentrations dans une cuve de 1 cm de passage optique.

La reproductibilité est vérifiée par trois essais expérimentaux réalisés à 25°C .

RESULTATS ET DISCUSSION

La figure (1) représente les spectres d'absorption du bleu de méthylène ($3 \cdot 10^{-5}\text{M}$) en présence et en absence de polyalanine à différentes concentrations (10^{-5} à $7 \cdot 10^{-5}\text{M}$). On note un léger déplacement de λ_{max} de 665 à 669 nm, une augmentation de l'intensité d'absorption et l'absence d'un point isobestique, indiquant l'existence de faibles liaisons types van der Waals entre les molécules de colorant et de la polyalanine[11]; l'addition d'une solution de chlorure de sodium 0,5M, à différentes concentrations en PAI étudiées, élimine les modifications du spectre du BM déjà observées, ce qui permet d'attribuer la variation de l'intensité de l'absorption à un effet de couche diffuse, liée à un changement de la structure des molécules d'eau permettant l'établissement de liaisons de faible énergie. En effet la liaison peptidique, seul site actif de ce polypeptide, est capable d'entrer en compétition avec les molécules d'eau pour se rapprocher des ions [12,13].

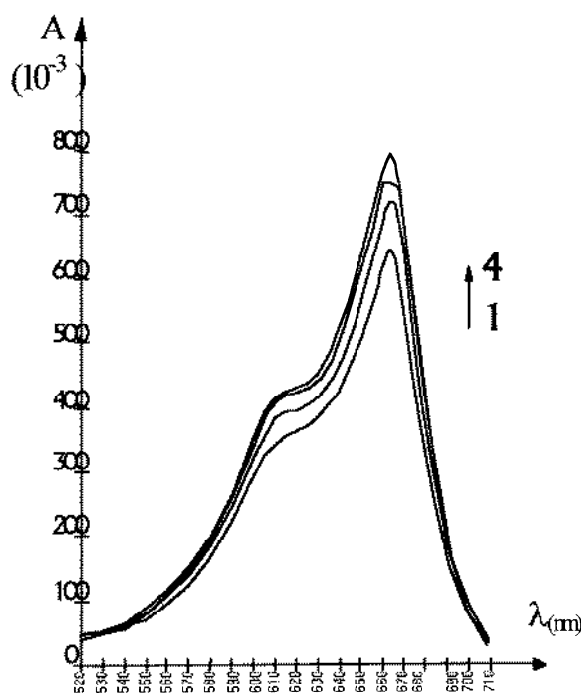


Fig.1. Spectre d'absorption de BM ($3 \cdot 10^{-5}\text{M}$) en présence de PAI : 1(0), 2(10^{-5}M), 3($2 \cdot 10^{-5}\text{M}$), 4($7 \cdot 10^{-5}\text{M}$)

Les spectres d'absorption du bleu de méthylène en absence et en présence de polyacide aspartique sont représentés sur les figures 2 et 3 à différentes concentrations.

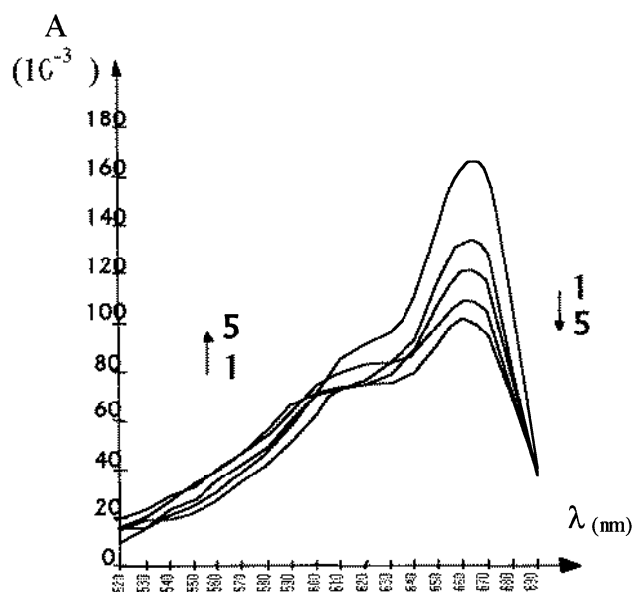


Fig. 2 Spectre d'absorption de BM ($10^{-5}M$) en présence de PAsp: 1(0,0), 2($10^{-5}M$), 3($2.5 \cdot 10^{-5}M$), 4($5 \cdot 10^{-5}M$), 5($7.5 \cdot 10^{-5}M$).

On note une diminution de l'intensité de l'adsorption indiquant une diminution de la forme libre du bleu de méthylène et l'apparition d'un point isobestique attribué à la présence d'une forte attraction entre le bleu de méthylène et la PAsp.

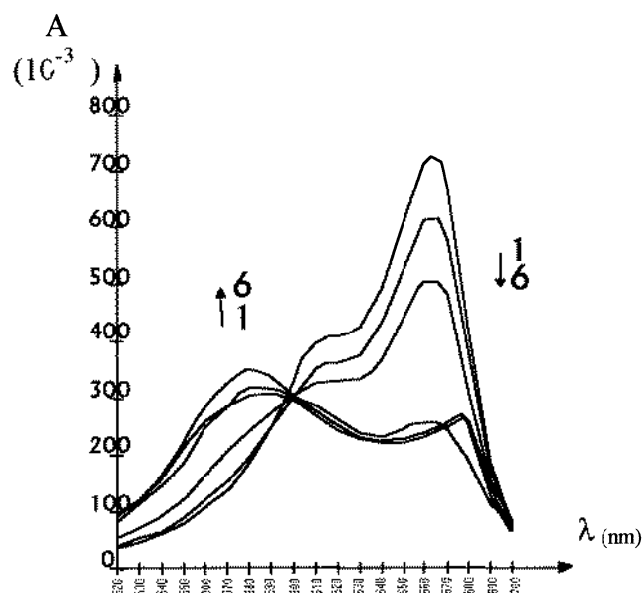
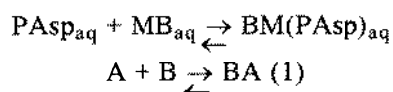


Fig. 3 Spectre d'absorption de BM ($3 \cdot 10^{-5}M$) en présence de PAsp: 1(0,0), 2($10^{-5}M$), 3($2.5 \cdot 10^{-5}M$), 4($5 \cdot 10^{-5}M$), 5($7.5 \cdot 10^{-5}M$), 6($10^{-4}M$).

L'équilibre de formation d'un complexe peut être représenté comme suit:



Si C_b est la concentration totale de BM et C_a : la concentration initiale de PAsp, C_{ct} : la concentration du complexe, alors la constante de formation du complexe est donnée par

$$K_{ct} = \frac{C_{ct}}{(C_a - C_{ct})(C_b - C_{ct})} \quad (2)$$

En supposant que la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée et D est l'absorbance du complexe seul, on peut écrire:

$$\frac{C_a \cdot C_b}{D} = \frac{1}{K_{ct} \cdot \epsilon_{ct}} + \frac{C_a + C_b}{\epsilon_{ct}} - \frac{C_{ct}}{\epsilon_{ct}} \quad (3)$$

où ϵ_{ct} est le coefficient molaire d'extinction du complexe. Quand C_a et C_b sont faibles, mais plus grand que C_{ct} , le dernier terme de l'équation (3) devient négligeable. La représentation de $C_a \cdot C_b / D$ en fonction de $C_a + C_b$ est une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent d'atteindre K_{ct} et ϵ_{ct} . L'équation (3) est la forme de SCOTT [14] de la relation originale de BENESI-HILDEBRAND [15].

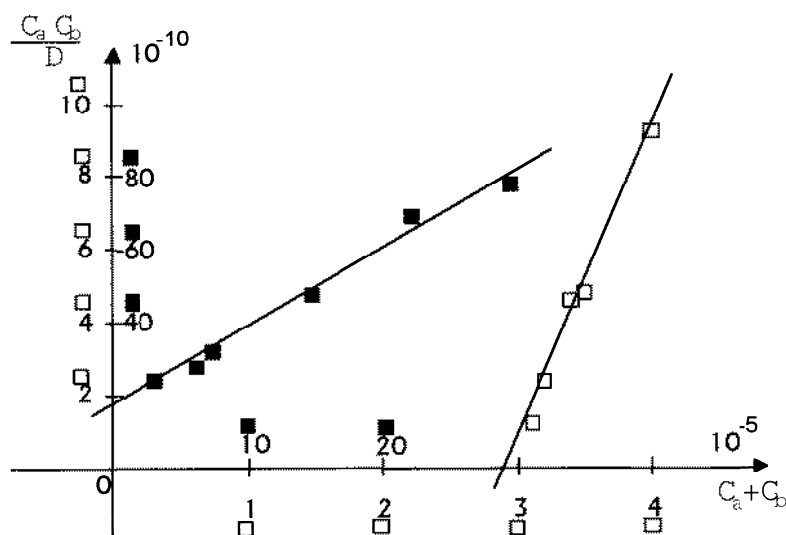


Fig. 4 Variation de $C_a \cdot C_b / D$ en fonction de $C_a + C_b$
 a) ■ en présence de PAsp
 b) □ en présence de PAg

La figure (4a) représente la variation de $C_a \cdot C_b / D$ en fonction de $C_a + C_b$ pour différentes valeurs de D correspondant à $\lambda = 580$ nm en présence de PAsp à différentes concentrations.

La droite obtenue justifie la formation d'un complexe stable de type 1:1 dont la constante de formation K_{ct} est égale à $0,115 \cdot 10^4$ par monomère et $\epsilon_{ct} = 0,58 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et l'approximation ($C_t \ll C_a$ et C_b) est vérifiée.

La formation du complexe peut être stabilisée par des interactions électrostatiques entre ce polymère et les homopolymères du colorant.

Bradly et Wolf [16] ont déjà suggéré la formation d'un homopolymère de B.M et l'établissement des forces électrostatiques entre cation et polyanion, la même idée a été

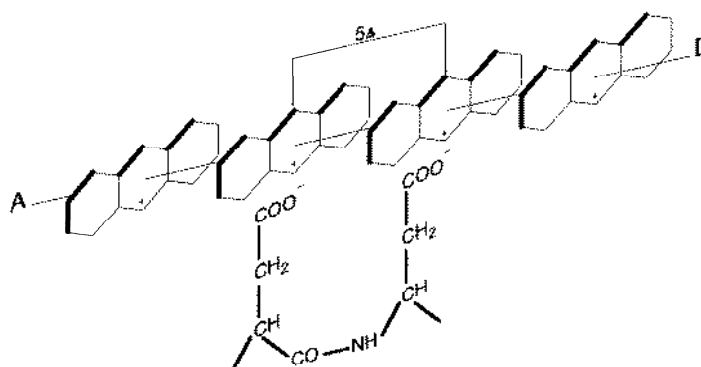
proposée par Pal et Schubert [17] pour interpréter l'interaction entre B.M et chandroïtine sulfate, un polyanion possédant des fonctions acide et groupements sulfatés. La stabilité de ce composé obtenu est due d'une part à l'établissement des forces électrostatiques relativement faible entre polyanion et cations et d'autre part à la formation des homopolymères de molécules adjacentes partageant des électrons π .

Ainsi la formation du complexe peut être justifiée par ce type d'interaction électrostatique proposée dans la littérature et représentée par le schéma suivant

Les figures (5) et (6) représentent les spectres d'absorption pour deux concentrations de bleu de méthylène respectivement 10^{-5} et $3 \cdot 10^{-5}$ M en présence et en absence de polyasparagine (PAG) à différentes concentrations (de 10^{-6} à 10^{-5} M).

On constate qu'il y a un léger déplacement de λ_{\max} et une augmentation de l'intensité d'absorption de bleu de méthylène sur la figure 5, tandis qu'il y a apparition d'un point isobestique ($\lambda = 600$ nm) qui ne varie pas avec la concentration de PAG. Figure (6) caractéristique d'une forte interaction entre le BM et le PAG.

Schéma 1



La droite figure (4b) représente la formation d'un complexe selon l'équilibre indiqué dans l'équation (3). Dans ce cas on ne peut déterminer K_{ct} et ϵ_{ct} , étant donné que la concentration du complexe n'est plus négligeable.

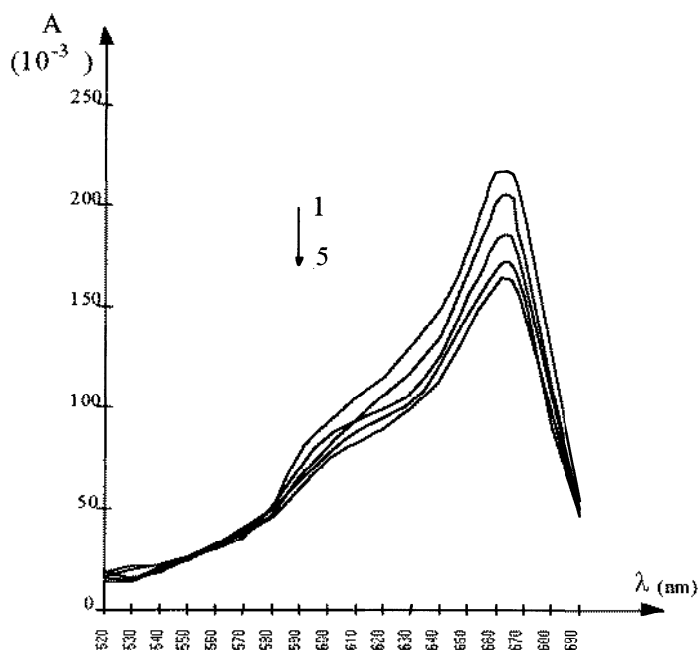


Fig. 5 . Spectre d'absorption de BM (10^{-5} M) en présence de PAG: 1(0,0), 2(10^{-6} M), 3($2,5 \cdot 10^{-6}$ M), 4($5 \cdot 10^{-6}$ M), 5($7,5 \cdot 10^{-6}$ M).

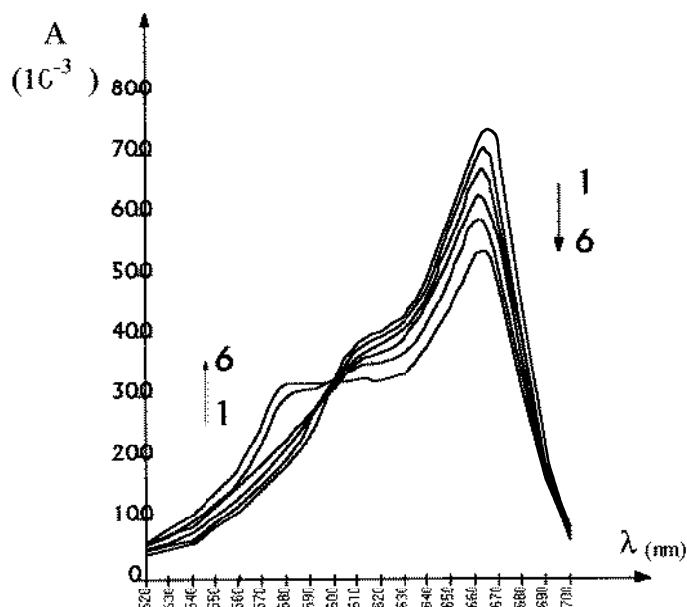


Fig. 6 . Spectre d'absorption de BM ($3 \cdot 10^{-5} \text{M}$) en présence

de PAG: 1(0,0), 2(10^{-6}M),
3($2 \cdot 10^{-6} \text{M}$), 4($4 \cdot 10^{-6} \text{M}$),
5($5 \cdot 10^{-6} \text{M}$), 6(10^{-5}M).

Il semble que suivant la concentration de BM on distingue deux types d'interaction:

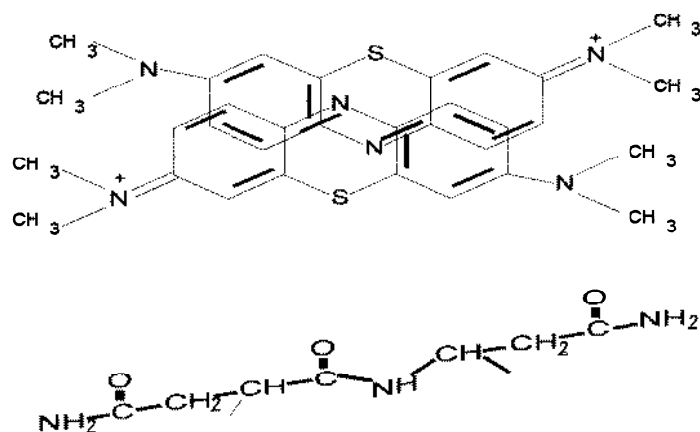
Comme dans le cas de la polyalanine, le premier type d'interaction est caractérisé par la présence de liaisons de van der Waals entre le colorant et le PAG et le changement de la structure des molécules d'eau; surtout que le groupement amide peut jouer le rôle de briseur de structure tout en solvatant les molécules d'eau les plus proches [18,19].

A concentration $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$, la forte interaction peut être attribuée à des transferts de charges, entre le colorant cationique accepteur d'électrons et la polyasparagine donneur, par les paires d'électrons des atomes d'oxygène, semblable à celle observée dans le cas de BM et le Triton X-100 [20].

L'apparition d'une bande autour de 600 Å a été attribuée à la présence de dimer[23] et l'établissement des interactions électroniques entre colorant et acide nucléique

La formation de dimer, structure en sandwich proposée par plusieurs auteurs [21,22], induit alors un nuage électronique favorable aux interactions de transfert de charge par la présence d'électrons délocalisés. La présence ou l'absence d'interaction est donc liée à la concentration de B.M comme on les a constatés d'après les figures (5) et (6). Un schéma peut être proposé à cette interaction.

Schéma 2



L'étude par spectrométrie UV-Visible du bleu de méthylène en solution aqueuse et en présence de trois polypeptides a permis de distinguer trois types d'interactions selon le radical du polypeptide et la concentration du BM. Une interaction de faible énergie dans le cas du PAI et la PAg à faible concentration une forte interaction et la formation du complexe de type 1:1 ont été mise en évidence en présence de PAg et PAsp et ont été attribuée respectivement à des interactions de transfert de charges et électrostatiques. La constante de formation d'un complexe entre PAsp et BM a été déterminée.

Les différents types d'interactions peuvent être liés à la structure de l'eau comme le montre une étude récente(24) sur le micro-environnement de micelle inverse de triton X-100/eau/BM indiquant une forte interaction entre le bleu de méthylène et T X-100 et sa sensibilité à la structure de l'eau. Trois types d'eau selon la couche d'hydratation ont été proposés de même l'influence d'ajout d'une quantité d'eau en milieu micellaire sur l'équilibre de formation d'un complexe BM-TX-100 a été mise en évidence. Elle se traduit par une augmentation de l'absorbance maximale du BM à $1,5 \cdot 10^{-5}M$ correspondant à la forme libre.

La diminution de A_{max} de BM, observée dans cette étude, en présence de polypeptides ayant un groupement polaire est liée au déplacement des molécules d'eau.

REFERENCES

- [1] E. Rabinowith. et L.F.Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**,63,69 .
- [3] J. Schubert, et A. Levine, *J.Am.Chem.soc.* **1955**,77,4197 .
- [4] D.F. Bradley et M.K., Wolff., *Proc. Natl. Acad. Sci . U.S.* **1959**, 45,944.
- [5] N. Q. Mutch et J. Pharm., *London.* **1946**,19, 400.
- [6] F. Koua, A. Gaid, H. Ait Amar, Tazairt, *Bul. Soc. Chim.Fran.* **1987**,4, 581.
- [7] D. M. Stevenson, D. G. Duffert et D. Kirkwood, *J.Soc. Dyers Colours.* **1981**, 91(1), 13.
- [8] H. Ghabi et M. Dhahbi, *J. Soc. Chim. Tun.* **1995**, 3, 727.
- [9] H. Ghabi, Thèse, *Université de Tunis II*, juin (1996).
- [10] H. Ghabi et M. Dhahbi, *J. Soc. Chim. Tun.* **1996**,3,803.
- [11] G. N. Sheth, *Spectrochim. Acta.* **1991**,47, 63.
- [12] W.Robinson et W. Jenks, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**,87, 2400.
- [13] J. Bello, D. Hors et H. R. Bello, *Biochemistry*, **1966**, 5, 2539.
- [14] R. L. Scott, *Rec. Trav. Chem.* **1956**, 75, 787.
- [15] H.A. Benesi et J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703.
- [16] D. F. Bradley et M. K. Wolf, *Proc. Acad. Sci US.* **1959**, 45,944.
- [17] M. K. Pal et M. Schubert, *J. Chim Physic.* **1963**, 67, 1821.
- [18] P. Assarson et F. R. Eireich, *J. Phys. Chem.* **1968**, 72, 2710.
- [19] F. Dzwizzumi, M. Ohm et Y.Miyabara, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1979**, 50, 2229.
- [20] D. Pramanick et D. Mukherjec, *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 157, 131.
- [21] G. Holst, *Z. Physik. Chem.* **1938**, A182, 381.
- [22] N.G.Miguel, S.C.Carla et G.Fergus, *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 177, 495.
- [23] F. W. Northland *cell Res.* **1954**, 7, 201.
- [24] L. Qi et J. Ma, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 197, 36.