

# Compréhension des mécanismes de coloration des liants protéiques picturaux à l'aide du Noir Amide 10B

Carole Mathe et Catherine Vieillescazes

## Summary

### Study of specific coloration between proteic binders and Naphtol Blue Black

Specific coloration of cross section, easily used today, allow to determine the nature of paint media, in addition to other analytical methods (chromatographic technics, infrared spectroscopy...). Naphtol Blue Black (also called Amido Black 10B) is a coloured molecule displaying specifically proteic binders. Moreover, according to the pH value of used coloured solution, it is possible to determine the corresponding protein identity. The difference of reactivity of these reagents can be rationalised mainly by the effect of the pH on the ionisation state of a given protein and its average amino acid composition.

## Mots-clés

**Noir Amide 10B, coloration de protéines, liant, modélisation moléculaire.**

## Key-words

**Naphtol Bue Black, specific coloration, proteins, binder, molecular modelisation.**

Il existe peu de méthodes d'analyse *in situ* permettant de connaître les différents types de liants utilisés par les artistes peintres. Aussi, dans les années 70, E. Martin et M.C. Gay du Laboratoire de recherche des musées de France, ont mis au point une méthode de coloration spécifique. Celle-ci permet de déterminer la nature du liant et dans certains cas favorables, son identité, mais également de caractériser une émulsion.

Les liants protéiques sont donc mis en évidence par les tests de coloration au Noir Amide 10B, molécule à partir de laquelle sont préparés trois réactifs de pH différents. Selon l'intensité de coloration obtenue à partir de solutions nommées NA<sub>1</sub>, NA<sub>2</sub> et NA<sub>3</sub>, la protéine peut être identifiée (colle animale, œuf, caséine).

Cet article apporte une contribution au niveau de la compréhension du mécanisme réactionnel, c'est-à-dire au niveau de la spécificité du colorant envers les protéines, mais aussi de sa sélectivité en fonction du pH.

## Principes et méthodes

La molécule colorante utilisée pour l'étude et la caractérisation des liants protéiques sur coupes minces est le Noir Amide 10B (Noir Bleu Naphtol) ou 4-amino-5-hydroxy-3-(*p*-nitrophénylazo)-6-(phénylazo)-2,7-naphtalènedisulfonate de sodium selon la nomenclature IUPAC (figure 1).

Trois solutions sont préparées à partir de ce colorant diazoïque acide (tableau 1) [1]. D'une manière générale, la coloration observée avec le réactif NA<sub>2</sub> est souvent

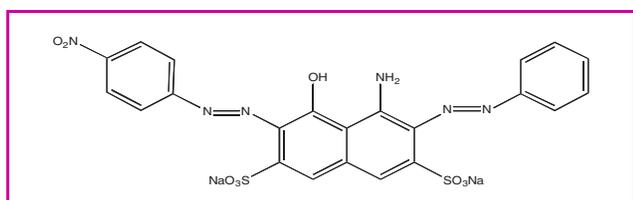


Figure 1 - Structure développée du Noir Amide 10B.

Tableau 1 - Réactifs préparés à partir du Noir Amide 10B.

Solution	pH	Réactifs utilisés
NA <sub>1</sub>	2,0	0,1 g Noir Amide 10B 450 mL AcOH glacial 450 mL AcONa 0,1 N 100 mL glycérol
NA <sub>2</sub>	3,6	0,1 g Noir Amide 10B 450 mL AcOH 1N 450 mL AcONa 0,1 N 30 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 70 mL glycérol
NA <sub>3</sub>	7,0	0,1 g Noir Amide 10B 900 mL eau distillée 100 mL glycérol

d'intensité supérieure ou égale à celle obtenue avec les autres réactifs. Le pH acide de NA<sub>1</sub> le destine particulièrement à la localisation des protéines de l'œuf qui sont bien mises en évidence (quel que soit l'âge de l'échantillon) [2]. Quant à NA<sub>3</sub>, il révèle essentiellement les protéines contenues dans la gélatine (collagène).

## Expérimentation

Plusieurs études ont été réalisées sur le sujet de la coloration spécifique du Noir Amide 10B [3-6]. Afin de déterminer le type de liaisons mises en jeu lors du processus de coloration, un plan expérimental a été élaboré. La mise en évidence de liaisons ioniques, la détermination de la stœchiométrie de réaction, ont été étudiées plus particulièrement avec l'ovalbumine et la caséine.

La première étape consiste à plonger la protéine, pendant 10 min, dans un excès de solution colorante, sous agitation magnétique : c'est la coloration. La seconde étape permet l'élimination de l'excès de colorant par filtration sous vide et

rinçage avec une solution d'AcOH à 5 %. Enfin, la matière protéique retenue sur le verre fritté est mise en milieu basique afin de transformer les groupements ammonium des acides aminés en groupes amine. Après une nouvelle filtration sous vide, le colorant recueilli dans le filtrat est dosé par spectroscopie UV-visible.

Dans un premier temps, nous observons qu'il y a formation de liaisons ioniques entre le colorant et la protéine : placée en milieu basique, elle se décolore. Ces dernières conditions entraînent une déprotonation des fonctions ammonium et la rupture des liaisons ioniques avec les groupements sulfonate du colorant.

L'étude de la stœchiométrie de la formation de liaisons ioniques indique un rapport de 0,5 pour l'ovalbumine et la caséine. Ce qui signifie qu'une molécule de Noir Amide peut se fixer sur deux aminoacides basiques, c'est-à-dire que les deux groupements sulfonate du colorant peuvent se fixer sur les sites cationiques de la fonction  $\epsilon$ -amine de la lysine, du groupement guanidine de l'arginine ou du cycle imidazole de l'histidine, ou encore sur la fonction amine terminale de la protéine. **Autrement dit, deux groupements amine protonée réagissent sur une molécule de Noir Amide.**

Les résultats obtenus au niveau des interactions ioniques ne permettent pas seuls d'expliquer l'intensité de coloration observée dans les divers réactifs. En effet, par rupture des liaisons ioniques entre la molécule colorante et l'ovalbumine en milieu basique, la protéine garde des traces de coloration, ce qui signifierait que d'autres types de liaisons peuvent intervenir au cours du mécanisme de coloration. De plus, il est connu que le Noir Amide n'interagit pas avec les acides aminés libres [7]. Par conséquent, la liaison peptidique est

susceptible de jouer un rôle essentiel dans l'interaction colorant-protéine (figure 2). A cela s'ajoutent les interactions hydrophobes mises en évidence en 1980 [8-10].

Nous avons complété ces résultats expérimentaux en utilisant la technique de la modélisation moléculaire.

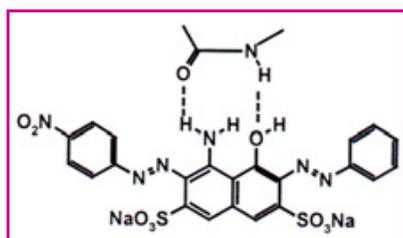


Figure 2 - Schéma de liaison hydrogène.

## Modélisation moléculaire

La modélisation fait partie des outils mis en œuvre pour étudier la conformation et les interactions des macromolécules. Les concepts issus de ces études contribuent à faire évoluer notre compréhension des systèmes moléculaires dans plusieurs domaines.

Pour nos travaux de modélisation, nous avons d'abord dessiné les molécules à l'aide du programme CS Chem Draw version 4.0, puis nous avons effectué les minimisations d'énergie sur CS Chem 3D Pro version 3.5. Pour cela, nous avons utilisé un ordinateur 450 MHz, 128 Mo de SDRAM, disque dur 8 Go, ainsi que la méthode de calcul MM2 (mécanique moléculaire).

Il ne s'agit que d'une première approche dont l'objectif est de donner un nouvel aperçu des phénomènes physico-chimiques, en utilisant une méthode théorique.

Nous avons initialement considéré le Noir Amide comme une molécule isolée, puis nous avons fait de même pour le collagène et l'ovalbumine. Nous avons ensuite traité les interactions colorant-protéine dans NA<sub>1</sub>, NA<sub>2</sub> et NA<sub>3</sub>. Dans

toutes ces étapes, nous avons tenu compte de la nature des fonctions chimiques de ces molécules en fonction du pH afin de se rapprocher des conditions expérimentales.

Dans le but de mettre en évidence les interactions se produisant lors du mécanisme de coloration, nous avons modélisé non pas la totalité de la molécule mais un tripeptide représentatif de la séquence protéique étudiée (figure 3).

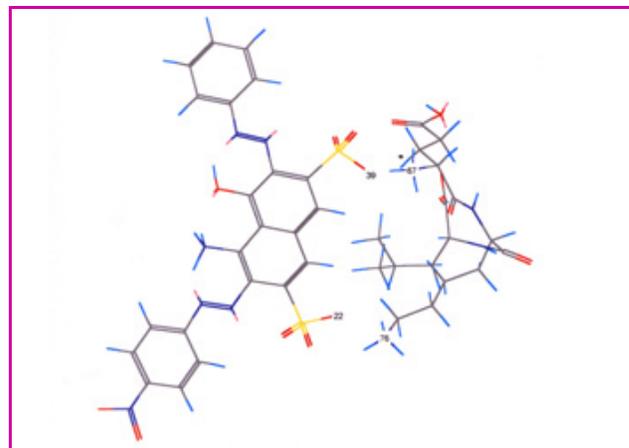


Figure 3 - Modélisation moléculaire de l'interaction colorant-tripeptide.

### Le collagène

Le collagène possède une séquence répétitive en acides aminés. Nous avons donc fait le choix de prendre la séquence la plus répétée dans cette protéine qui est GLY-PRO-HYP [11].

### L'ovalbumine

L'ovalbumine ne possède pas de séquence répétitive en aminoacides ; par conséquent, nous avons opté pour la séquence nous apparaissant la mieux adaptée à la mise en évidence du mécanisme de coloration, tout en tenant compte de sa composition relative en acides aminés. Le tripeptide choisi est GLU-LYS-LEU. Ce choix s'explique par le fait que l'acide glutamique apparaît comme l'acide aminé majoritaire dans l'ovalbumine ; la lysine est un acide aminé basique, la leucine se trouve également en quantité importante dans la protéine. Cet enchaînement peptidique résulte de la séquence primaire de l'ovalbumine.

### La liaison peptidique

La liaison peptidique peut exister sous deux configurations : *cis* et *trans*. Cependant, dans la forme *cis*, les chaînes latérales et les atomes de carbone- $\alpha$  de résidus adjacents se gênent mutuellement et, du fait de cette contrainte stérique, le rapport *cis/trans* est de l'ordre de 1:1000. Une exception notable de cette règle est la proline, pour laquelle la forme atypique du groupe latéral rend la configuration *cis* plus accessible.

La liaison peptidique est stabilisée par résonance ; les électrons de valence sont délocalisés le long de la liaison O-C-N. Cette délocalisation d'électrons implique que leur nuage électronique occupe davantage de place, ce qui abaisse d'autant leur énergie. Par conséquent, leur délocalisation contribue à hauteur de 120 kJ.mol<sup>-1</sup> (énergie de stabilisation par résonance) à stabiliser la liaison peptidique.

Tableau II - Récapitulatif des résultats dans l'interaction colorant-collagène.

\* : énergie stérique = énergie d'élongation + énergie de déformation + énergie de torsion + énergie de Van Der Waals en 1-4 des atomes liés et non liés + interaction charge/charge + interaction charge/dipôle + interaction dipôle/dipôle.

(a) : seule la fonction  $\alpha$ -naphtylamine est protonée pour le colorant. En ce qui concerne le tripeptide, l'extrémité N-terminale est toujours protonée, tandis que l'extrémité C-terminale existe sous deux formes (COOH (1) et COO<sup>-</sup> (2)).

Il existe essentiellement deux approches du tripeptide, soit du côté des sulfonates (b), soit du côté des fonctions  $\alpha$ -naphtylamine et  $\alpha$ -naphtol (c). Il s'agit de l'interaction favorisée par ces deux approches, cependant les autres forces interviennent également et simultanément.

(d) : à ce pH, le colorant possède à la fois la fonction  $\alpha$ -naphtylamine protonée (3) et non protonée (4). Quant au tripeptide, les extrémités N et C-terminales sont ionisées.

(e) : ici, aucune fonction du colorant n'est protonée et le tripeptide se trouve sous la même forme qu'à pH = 3,6.

Interactions Noir Amide-collagène	Énergie stérique* totale (kJ/mol)	Résultats des tests de coloration
<b>pH = 2 (a)</b>		
Interactions électrostatiques (b) (1)	-917,76	+ Faible intensité de la coloration
Liaisons hydrogène (c) (1)	-752,74	
Interactions électrostatiques (2)	-1168,17	
Liaisons hydrogène (2)	-1233,15	
<b>pH = 3,6 (d)</b>		
Interactions électrostatiques (3)	-1246,62	++ Moyenne intensité de la coloration
Liaisons hydrogène (3)	-1199,55	
Interactions électrostatiques (4)	-1245,70	
Liaisons hydrogène (4)	-1145,70	
<b>pH = 7 (e)</b>		
Interactions électrostatiques	-1356,37	+++ Forte intensité de la coloration
Liaisons hydrogène	-1152,90	

## Résultats

### Interactions Noir Amide-collagène

Les résultats issus de cette modélisation moléculaire sont notifiés dans le *tableau II*. D'après le tableau récapitulatif, nous constatons que globalement l'énergie stérique diminue lorsque le pH augmente. Autrement dit, les deux molécules adoptent, lors de l'interaction, des conformations de plus en plus stables lorsque le pH passe de 2 à 7.

Rappelons que le collagène est faiblement coloré dans NA<sub>1</sub> (pH = 2,0), la réponse étant meilleure dans NA<sub>2</sub> (pH = 3,6) et l'intensité de la coloration maximale dans NA<sub>3</sub> (pH = 7,0).

**D'après la modélisation moléculaire, nous observons que lors de l'interaction entre le colorant et le collagène, la stabilité conformationnelle obtenue est en accord avec les résultats des tests de coloration.**

### Interactions Noir Amide-ovalbumine

Le *tableau III* récapitule les principaux résultats. D'après ceux-ci, nous constatons que la stabilité conformationnelle de l'interaction entre le Noir Amide et l'ovalbumine est la plus importante à pH = 3,6 et la plus faible à pH = 2,0. A la vue des tests de coloration de l'ovalbumine, la

coloration apparaît également la plus intense dans NA<sub>2</sub>. Seule l'énergie stérique pour NA<sub>1</sub> et NA<sub>3</sub> ne suit pas l'intensité de la coloration observée sur les coupes minces.

Pour la modélisation de l'ovalbumine, nous avons choisi un tripeptide qui ne reflète probablement pas l'ensemble de la protéine, contrairement au collagène ; ceci pourrait expliquer le fait que les résultats théoriques ne sont pas vraiment en accord avec les tests de coloration.

## Discussion et conclusion

Nous avons mis en évidence par la modélisation moléculaire que les liaisons hydrogène et électrostatiques permettent de stabiliser la structure du complexe Noir Amide-protéine. Au cours du mécanisme de coloration, la stabilité conformationnelle de ces deux molécules va dans le même sens que les résultats des tests sur coupe mince. La modélisation est un outil de compréhension pour l'expérimentateur au niveau conformationnel. Toutefois, ces résultats théoriques nécessitent une interprétation appropriée. Dans certains cas favorables, une structure peut être rapidement et précisément déterminée par le calcul. Par conséquent, les méthodes théoriques fournissent une aide intéressante au chimiste en complément des méthodes expérimentales.

Tableau III - Récapitulatif des résultats dans l'interaction colorant-ovalbumine.

(a) : la fonction  $\varepsilon$ -amine de la lysine est protonée, ainsi que l'extrémité N-terminale du peptide ; par contre, l'extrémité C-terminale existe sous deux formes (COO<sup>-</sup> (1) et COOH (2)). Le groupement  $\alpha$ -naphtylamine du Noir Amide est protoné.

(b) : la fonction  $\alpha$ -naphtylamine du colorant existe sous deux formes protonée (NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (3)) et non protonée (NH<sub>2</sub> (4)). Les extrémités N et C-terminales sont ionisées, de même que la fonction  $\varepsilon$ -amine de la lysine. Par contre, le groupement acide de GLU existe sous deux formes (COO<sup>-</sup> (5) et COOH (6)).

(c) : toutes les fonctions acide et amine du tripeptide sont ionisées et la fonction  $\alpha$ -naphtylamine du Noir Amide n'est pas protonée.

Interactions Noir Amide-ovalbumine	Énergie stérique* totale (kJ/mol)	Résultats des tests de coloration
<b>pH = 2 (a)</b>		
Interactions électrostatiques (1)	-1322,60	++
Liaisons hydrogène (1)	-1109,85	
Interactions électrostatiques (2)	-913,83	
Liaisons hydrogène (2)	-584,55	
<b>pH = 3,6 (b)</b>		
Interactions électrostatiques (3) (5)	-1720,33	+++
Liaisons hydrogène (3) (5)	-1545,61	
Interactions électrostatiques (3) (6)	-1197,38	
Liaisons hydrogène (3) (6)	-1143,90	
Interactions électrostatiques (4) (5)	-1771,55	
Liaisons hydrogène (4) (5)	-1492,89	
Interactions électrostatiques (4) (6)	-1308,50	
Liaisons hydrogène (4) (6)	-1302,86	
<b>pH = 7 (c)</b>		
Interactions électrostatiques	-1397,25	+
Liaisons hydrogène	-1302,86	

La spécificité du Noir Amide envers les protéines s'explique par le type de liaisons qui interviennent lors du mécanisme de coloration. En effet, plusieurs sortes de liaisons faibles s'établissent entre les deux composés : des liaisons ioniques entre les groupements sulfonate du colorant et les fonctions ammonium des protéines, des liaisons hydrogène entre le naphtylamine et le naphtol de la molécule colorante et les liaisons peptidiques, ainsi que des liaisons hydrophobes entre le naphtalène du Noir Amide et les aminoacides hydrophobes.

Quant à la sélectivité du colorant vis-à-vis de ces macromolécules, elle réside dans le fait qu'entre pH = 2,0 et pH = 7,0, la nature des fonctions chimiques présentes au sein des protéines varie : elles sont plus ou moins protonées. L'intensité de la coloration obtenue s'en trouve ainsi modifiée. De plus, la composition relative de chaque protéine joue également un rôle essentiel, car chacune possède un comportement réactionnel différent selon la valeur du pH.

### Remerciements

Les auteurs tiennent à associer à ces travaux Mmes E. Martin (C2RMF, Paris), C. Cren (LCOM, Université de Lille) et M.P. Barthélémy (LCBSMV, Université d'Avignon) pour leur aide précieuse et efficace.

### Références

- [1] Martin E., *Annales du Laboratoire de recherche des musées de France*, **1977**, p. 20.  
 [2] Martin E., *Studies in Conservation*, **1977**, *22*, p. 62.

- [3] Keck S., Peters T., *Studies in Conservation*, **1969**, *14*, p. 75.  
 [4] Cren-Olivé C., Martin E., Vieillescazes C., Rolando C., *Art et Chimie*, CNRS éditions, **2000**, p. 111.  
 [5] Gettens R.J., Stout L., *Painting materials, a short encyclopedia*, Dover Publications, New York, **1966**, p. 21.  
 [6] Shoberg V.R., Hetzl H.F., *Milchwissenschaft*, **1956**, *11*, p. 123.  
 [7] Molnar-Perl I., Pinter-Szakacs M., Kralovansky U.P., Matyas J., *Food Chemistry*, **1986**, *20*, p. 21.  
 [8] Tal M., Silberstein A., Nusser E., *J. Biol. Chem.*, **1980**, *260*, p. 9976.  
 [9] Racusen D., *Analytical Biochem.*, **1973**, *52*, p. 96.  
 [10] Chen J.M., *J. Protein Chem.*, **1991**, *10*, p. 535.  
 [11] Smith C.A., Wood E.J., *Les Biomolécules*, Masson, Paris, **1996**, p. 83.



C. Mathe

**Carole Mathe** est doctorante et **Catherine Vieillescazes** maître de conférences au Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels de l'université d'Avignon\*.



C. Vieillescazes

\* Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels (directeur : Pr Bernard Pucci), Université d'Avignon, Faculté des sciences, 33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon.  
 Tél. : 04 90 14 44 31. Fax : 04 90 14 44 39.  
 E-mails : carole.mathe@univ-avignon.fr  
 cathy.vieillescazes@univ-avignon.fr



Cas d'étude : *Le baptême du Christ par Saint-Baptiste sur les rives du Jourdain.*  
 Panneau de bois sculpté en haut relief, doré et polychrome, attribué à Joseph Sunyer.  
 Espira de Conflent - Atelier de restauration AMOROSO-WALDEIS, Avignon.