

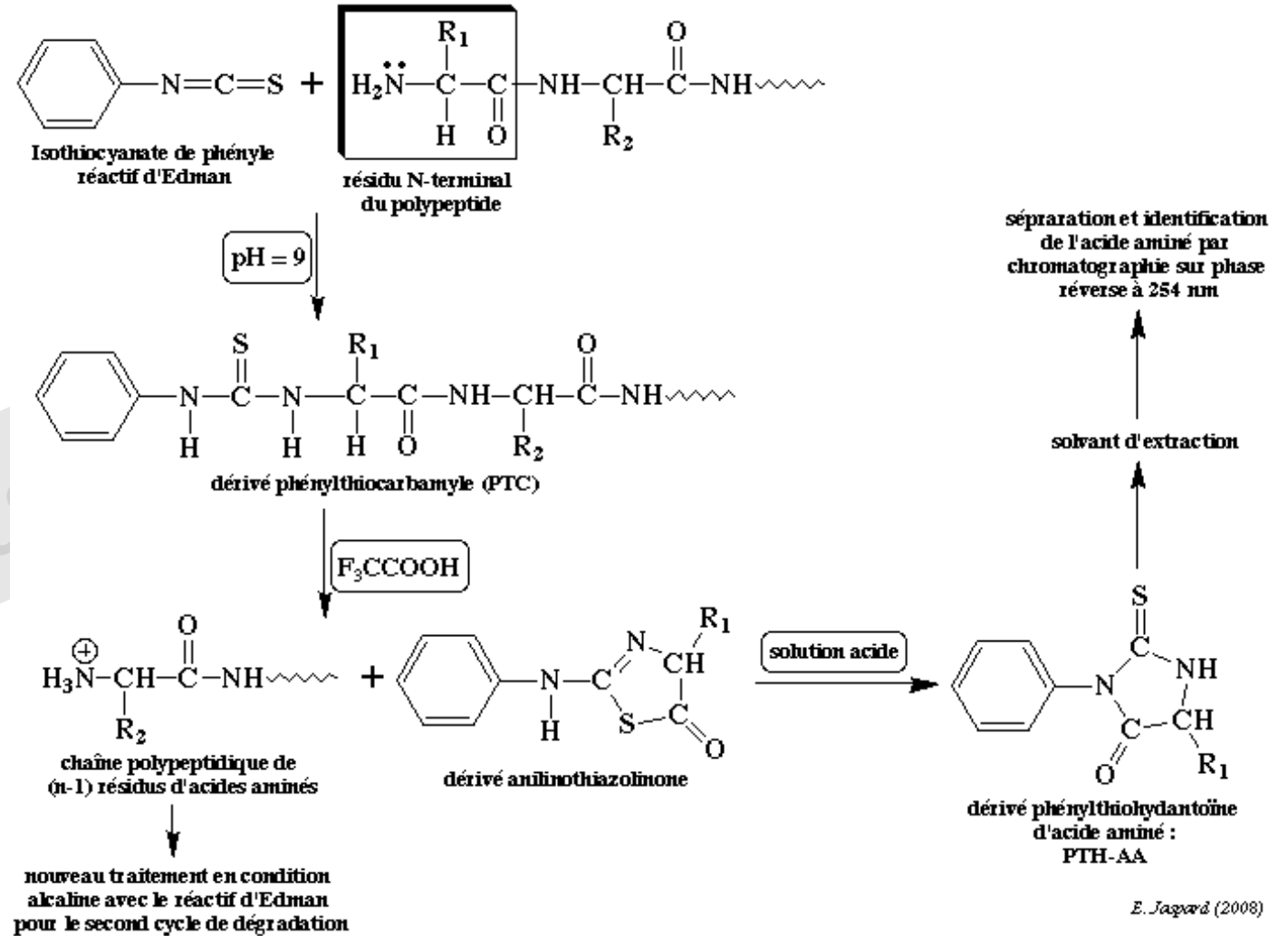
Le phénylisothiocyanate (PITC) - réactif de la méthode de dégradation d'Edman

Le PITC est utilisé pour l'**identification** et la **quantification** des acides aminés (par HPLC) pour le séquençage des protéines.

Le PITC n'agit que sur une fonction **aminée libre** (primaire ou secondaire comme la proline).

S'il n'y a pas de réaction avec le PITC, c'est que l'acide aminé N-terminal est **bloqué**.

Autre possibilité : le peptide est **circulaire** (ni acide aminé N-terminal, ni acide aminé C-terminal).

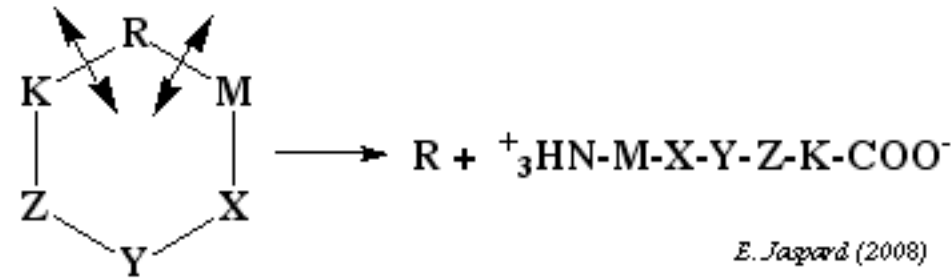


Action de la trypsine (EC 3.4.21.4) - protéase à sérine

La trypsine **hydrolyse la liaison peptidique** après **Arg et Lys** sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline.

Cependant elle peut avoir une spécificité **plus complexe**.

coupures par la trypsine



E. Jaspard (2008)

1. On n'obtient que 2 fragments bien que l'hexapeptide contienne 1 Arg et 1 Lys et qu'il n'y ait pas de Pro.
2. Si l'hexapeptide est **linéaire**, Arg ou Lys doit se trouver en position C-terminale => 2 séquences possibles :
 - [Arg - Met - X - Y - Z - Lys]
 - [Met - X - Y - Z - Lys - Arg] qui génère un acide aminé (Arg) plus PTH-Met libérée du peptide restant
3. Cependant, puisque l'acide aminé N-terminal est bloqué, cela confirme que l'hexapeptide est **circulaire**.

Hydrolyse totale acide

Hydrolyse totale alcaline

L'hydrolyse totale acide est plus utilisée car elle détruit moins d'acides aminés.

- HCl 6 M - 110°C - 24h environ
- Trp est détruit
- Les fonctions amides de la **glutamine** et de l'**asparagine** donnent 1 molécule de NH_3^+ et respectivement Glu et Asp

- NaOH 4 M - 110°C - 24h environ
- Ser, Thr Cys et Arg sont détruites
- Désamination partielle et racémisation des autres acides aminés

Ces techniques sont progressivement délaissées au profit du séquençage direct par spectrométrie de masse ou indirect par séquençage du génome puis traduction *in silico*.

1 équivalent OH => pKa = 3,9

1 équivalent OH
=> pKa = 10,5

1 équivalent OH
=> pKa = 12,5

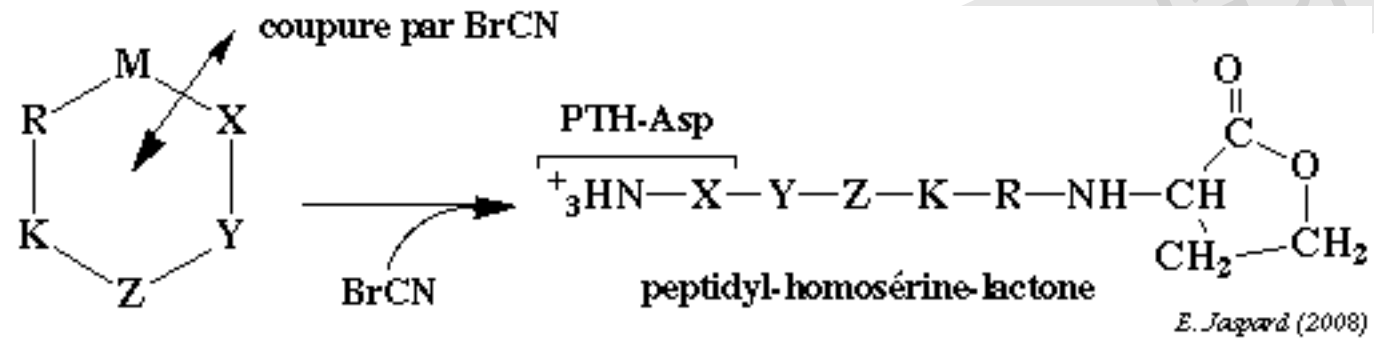
=> 1 **Asp**

Or la composition en acides aminés indique qu'il y a 2 Asp et 1 NH_3^+ .
Donc, l'un des 2 Asp provient de la transformation d'une Asn en $[\text{Asp} + \text{NH}_3^+]$ lors de l'hydrolyse acide.

=> 1 **Lys**

=> 1 **Arg**

Le **bromure de cyanogène** ("cyanogen bromide" - BrCN) réagit spécifiquement avec la **méthionine** et produit des peptides portant un résidu homosérine lactone à l'extrémité C-terminale



On n'obtient qu'un peptide, ce qui confirme que l'hexapeptide est **circulaire**.

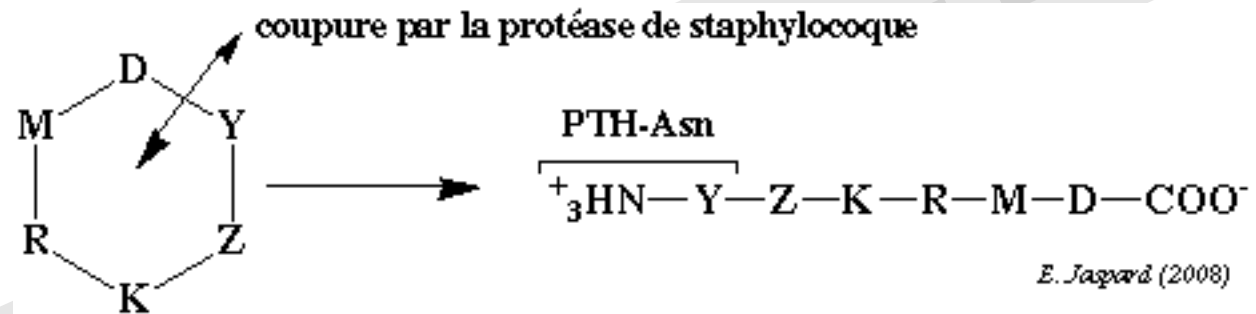
La libération du PTH-Asp (nouveau résidu en position N-terminale après action de BrCN) indique que X = Asp.

=> Soit la séquence partielle de l'hexapeptide : [Arg - Met - Asp - Y - Z - Lys]

La protéase de staphylocoque hydrolyse les peptides du côté C-terminal des résidus Glu et Asp.

D'après la composition en acides aminés, il y a 1 Asp et pas de Glu.

L'hexapeptidique étant circulaire, on obtient donc qu'un fragment.



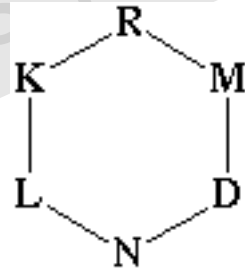
La libération du PTH-Asn (nouveau N-terminal après action de la protéase) indique que Y = Asn.

=> Soit la séquence partielle de l'hexapeptide : [Arg - Met - Asp - Asn - Z - Lys]

Conclusion

D'après la composition en acides aminés, il reste 1 Leu.

La séquence circulaire de l'hexapeptide est donc [Arg - Met - Asp - Asn - Leu - Lys]



séquence de
l'hexapeptide
circulaire

E. Jaspard (2008)