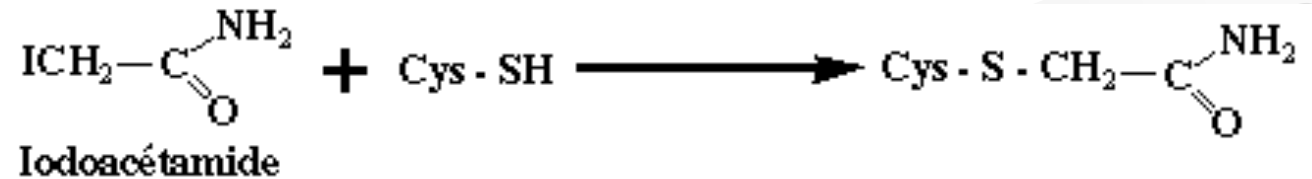


Étude d'un peptide hormonal

Estimation de la masse molaire du peptide

L'iodoacétamide est un réactif des groupements thiols (-SH). L'iodoacétamide ne change pas la charge du peptide.



E. Jaspard (2007)

0,079 μg de peptide est traitée par l'iodoacétamide marquée au ^{14}C :

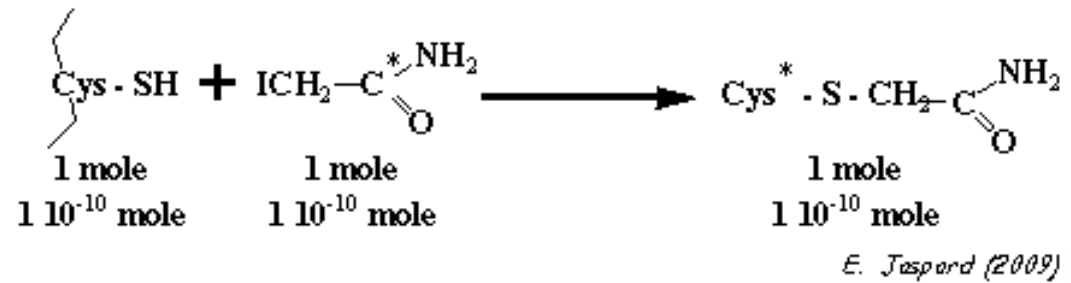
- activité spécifique : 2 Ci/mmole
- rendement de marquage : 100%
- peptide marqué : 0,2 μCi de radioactivité

La quantité de radioactivité incorporée dans le peptide est :

- 2 Ci \rightarrow 1 mmole d'iodoacétamide
- 0,2 μCi \rightarrow x mmole d'iodoacétamide

$\Rightarrow x = [0,2 \cdot 10^{-6} \text{ Ci} \cdot 1 \text{ mmole} / 2 \text{ Ci}] = 1 \cdot 10^{-10}$ moles d'iodoacétamide incorporée dans 0,079 μg de peptide

Hypothèse 1 : 1 cystéine dans le peptide

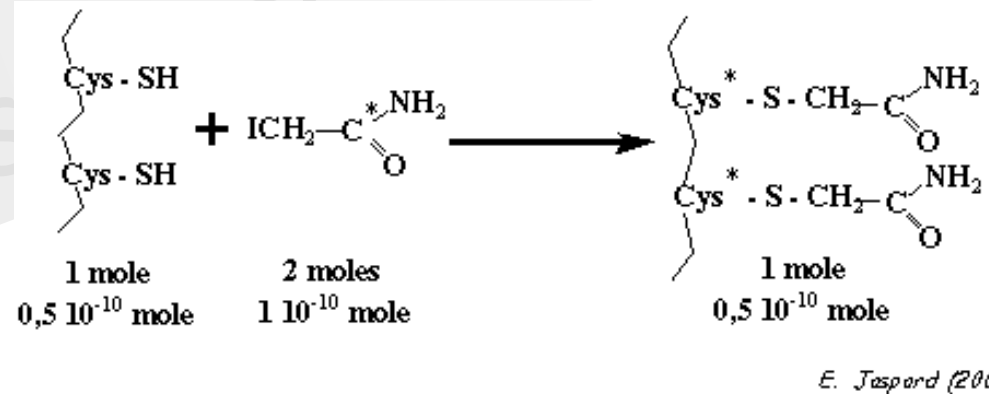


$1 \cdot 10^{-10}$ moles d'iodoacétamide incorporée correspond à $1 \cdot 10^{-10}$ moles de peptide, soit :

- $1 \cdot 10^{-10}$ moles de peptide $\rightarrow 0,079 \cdot 10^{-6}$ g
- 1 mole de peptide $\rightarrow x$ g

$\Rightarrow x = [0,079 \cdot 10^{-6} \text{ g} \times 1 \text{ mole} / 1 \cdot 10^{-10} \text{ moles}] = 790 \text{ g} \Rightarrow$ **masse molaire minimale peptide = 790 g/mole**

Hypothèse 2 : 2 cystéines dans le peptide



$1 \cdot 10^{-10}$ moles d'iodoacétamide incorporée correspond à $0,5 \cdot 10^{-10}$ moles de peptide, soit :

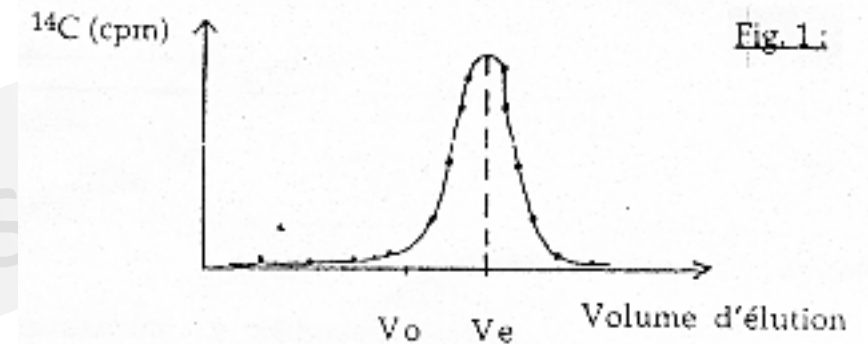
- $0,5 \cdot 10^{-10}$ moles de peptide $\rightarrow 0,079 \cdot 10^{-6}$ g de peptide
- 1 mole de peptide $\rightarrow x$ g de peptide

$\Rightarrow x = [0,079 \cdot 10^{-6} \text{ g} \times 1 \text{ mole} / 0,5 \cdot 10^{-10} \text{ moles}] = 1580 \text{ g} \Rightarrow$ **masse molaire maximale peptide = 1580 g/mole**

Estimation du nombre d'acides aminés du peptide

Le volume d'élution V_e du peptide indique que le peptide a une masse inférieure à la limite d'exclusion = 1000 g/mole.

En conséquence, le peptide a une masse molaire inférieure à 1000 g/mole. C'est donc l'hypothèse 1 qui est correcte => **1 cystéine dans le peptide.**



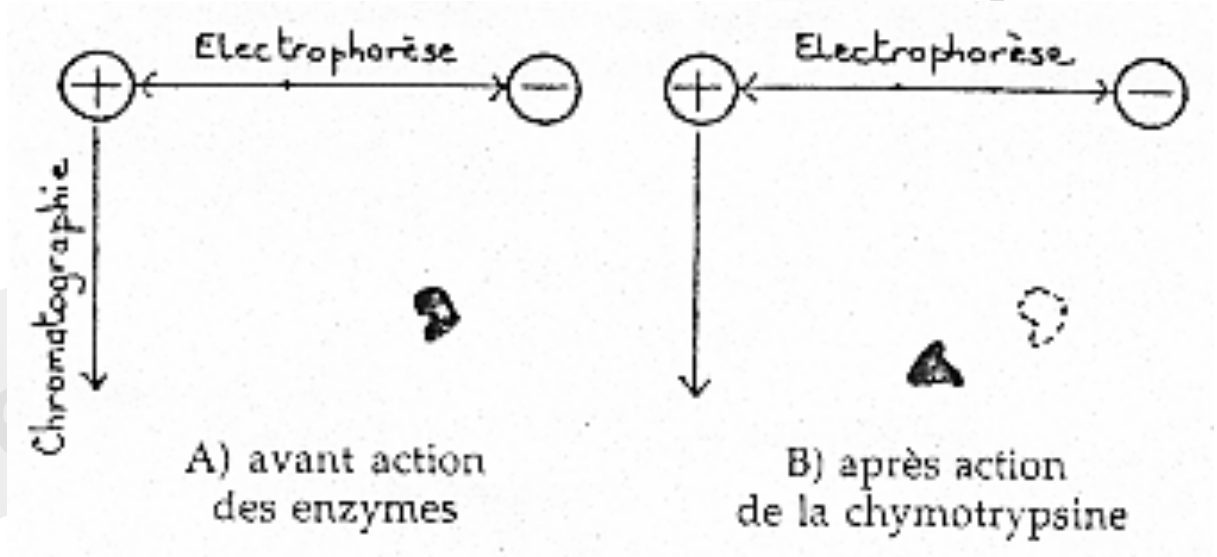
Si on considère une masse molaire moyenne de 110 g/mole pour un acide aminé, on peut estimer que le peptide contient : $[790 / 110] \#$ **7 acides aminés.**

Fingerprinting et autoradiographie

La technique actuelle de "*fingerprinting*" d'un peptide ou d'une protéine est l'électrophorèse bi-dimensionnelle suivie d'une empreinte peptidique massique ou d'un séquençage par spectrométrie de masse.

La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) hydrolyse la liaison peptidique après Tyr, Phe, Trp ou Leu.

Les figures A et B indiquent qu'il existe (au moins) **1 site d'hydrolyse dans le peptide intact**, puisque la tâche obtenue par autoradiographie change de position.



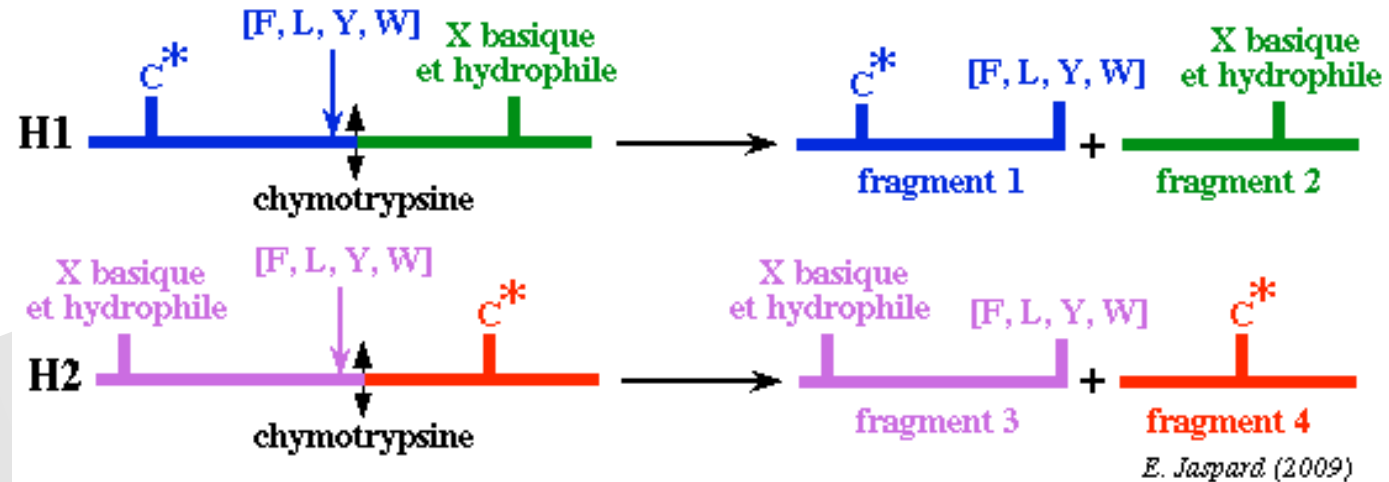
Ce changement de position indique que le fragment qui continue à porter la radioactivité (Cys-¹⁴C) :

- Est **plus acide ou a une charge négative plus élevée** (migration plus prononcée vers le pôle + lors de l'électrophorèse) que le peptide intact.
- Est **plus hydrophobe** (élué à une hydrophobicité plus forte lors de la chromatographie) que le peptide intact.

Suite de fingerprinting et autoradiographie

On peut supposer la perte d'un ou plusieurs acides aminés basique(s) et hydrophile(s).

Il y a 2 possibilités de localisation de la (Cys-¹⁴C) par rapport au site d'hydrolyse par la chymotrypsine.

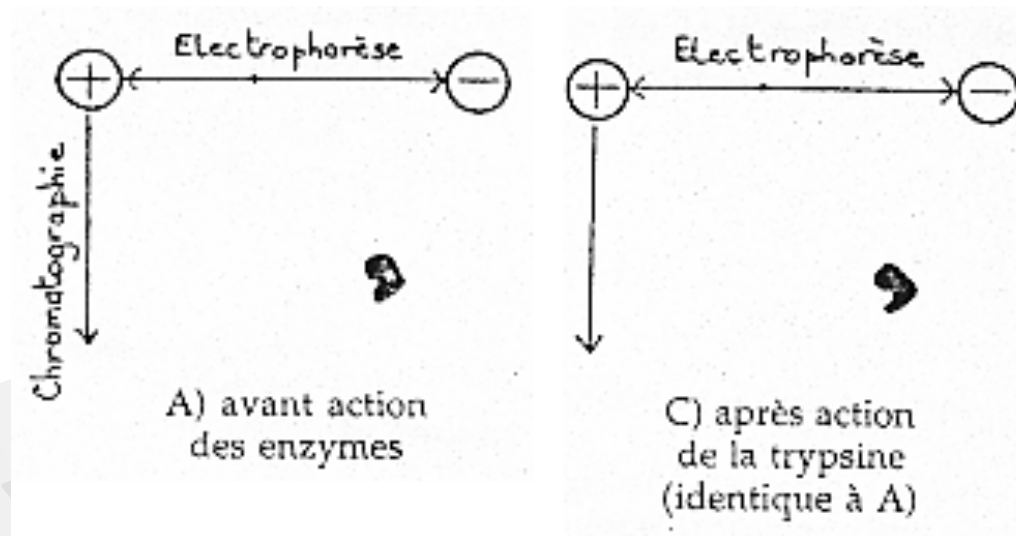


L'hypothèse 2 (H2) semble moins probable car le fragment 4 qui continuerait à porter la radioactivité (Cys-¹⁴C) serait difficilement plus hydrophobe que le peptide intact en ayant perdu Tyr, Phe, Trp ou Leu.

Suite de fingerprinting et autoradiographie

Action de la trypsine (EC 3.4.21.4)

Les figures A et C indiquent qu'il n'existe **pas de site d'hydrolyse par la trypsine** (Arg - X ou Lys - X) dans le peptide intact (les tâches sont à la même position).

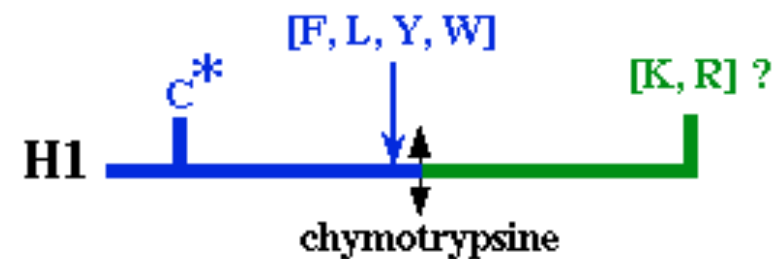


Donc :

- Soit ces 2 acides aminés sont absents.
- Soit l'un des deux se trouve en position C-terminale ce qui renforcerait l'hypothèse précédente.

On peut proposer la séquence pour le peptide intact :

(Cys-¹⁴C + n acides aminés) - [Y, F, W, L] - (m acides aminés) - [K, R]

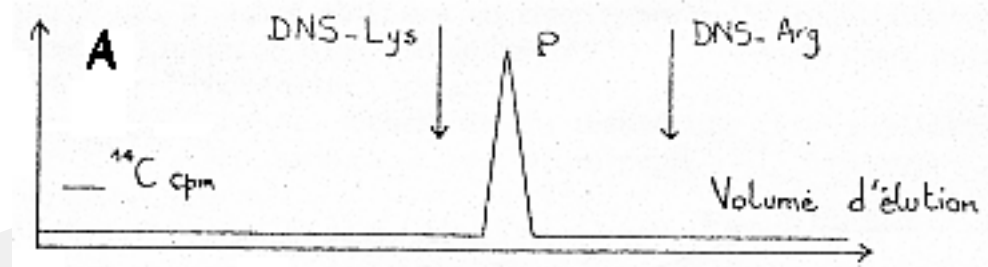


E. Jaspard (2009)

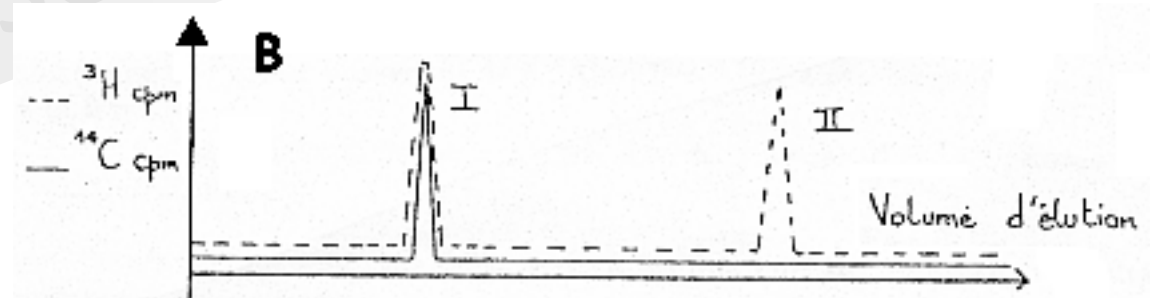
Chromatographie d'échange de cations, marquage au tritium et carboxypeptidase B

La **figure 3A** indique que le peptide intact est chargé :

- Plus positivement que Lys car il est élué après DNS-Lys.
- Moins positivement que Arg car il est élué avant DNS-Arg.



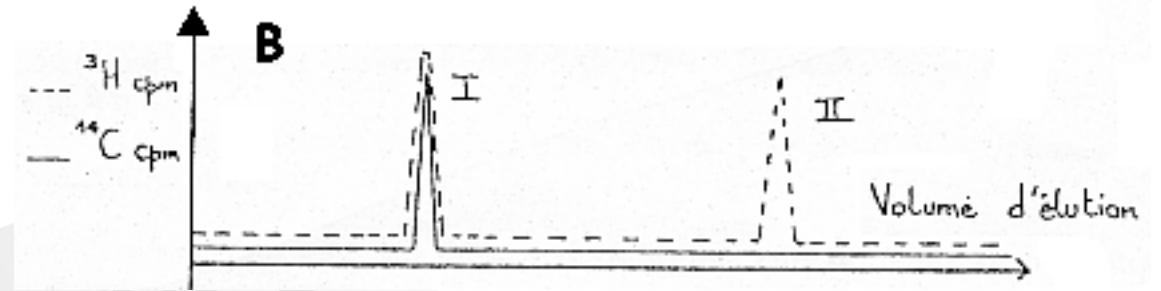
La **figure 3B** montre l'éluion des produits obtenus après action de la chymotrypsine et marquage par le chlorure de dansyle tritié (^3H -DNSCI) des extrémités N-terminales des fragments obtenus.



Suite - chromatographie d'échange de cations, marquage au tritium et carboxypeptidase B

La figure 3B indique que :

- Le **pic I** correspond au fragment qui contient la (Cys- ^{14}C) puisque les 2 types de radioactivité co-éluent avec ce pic.
- Ce fragment est élué avant le peptide intact (**pic P figure 3A**) : il est chargé moins positivement que le peptide intact.

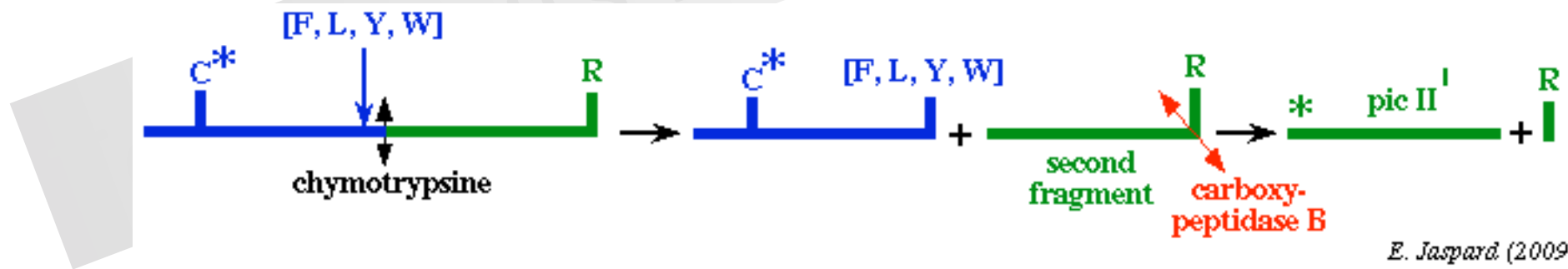
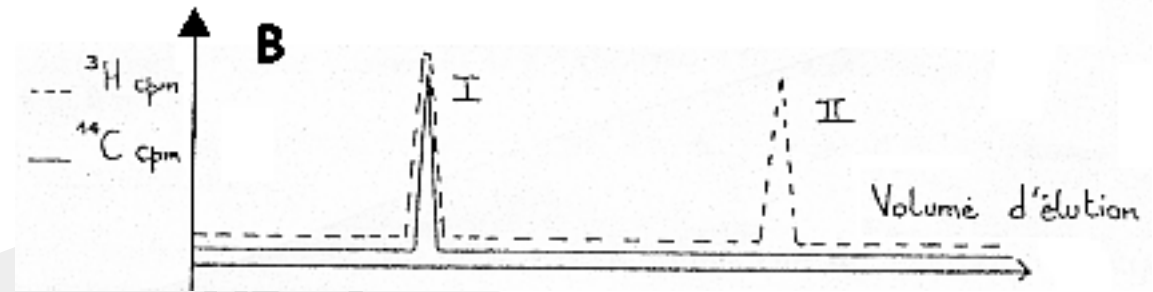


Le **pic II** correspond au second fragment issu de l'hydrolyse par la chymotrypsine. La radioactivité (^3H -DNSCI) est portée par l'acide aminé N-terminal.

Ce second fragment est élué quasiment comme l'Arg, ce qui est en faveur d'une extrémité N-terminale du second fragment = (m acides aminés) - Arg.

Suite - chromatographie d'échange de cations, marquage au tritium et carboxypeptidase B

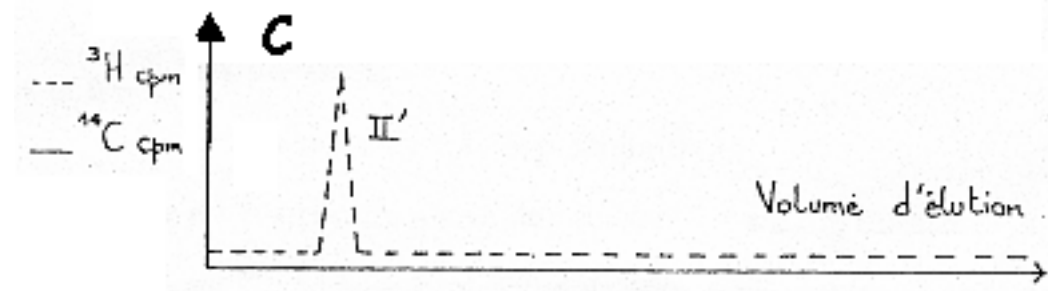
Le produit qui correspond au **pic II** de la **figure 3B** (c'est-à-dire le second fragment issu de l'hydrolyse par la chymotrypsine), est hydrolysé par la **carboxypeptidase B** qui coupe préférentiellement les peptides qui ont un acide aminé basique en position C-terminale.



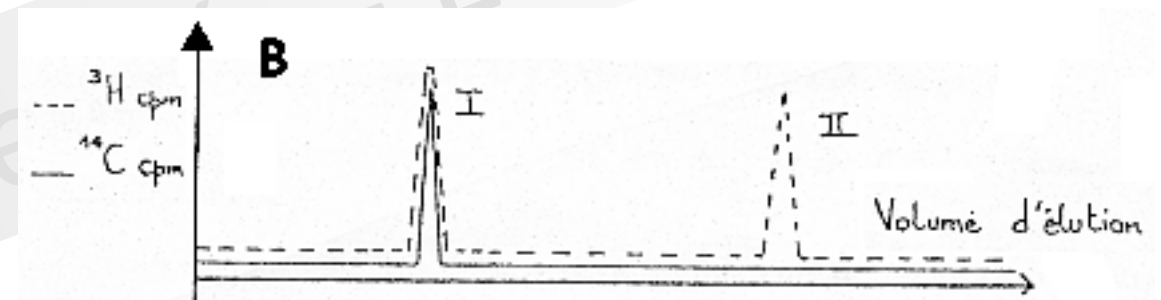
E. Jaspard (2009)

Suite - chromatographie d'échange de cations, marquage au tritium et carboxypeptidase B

La **figure 3C** décrit l'élution du fragment obtenu après hydrolyse par la carboxypeptidase B et qui porte la radioactivité (^3H -DNSCI).



La **figure 3C** indique que le pic II' apparaît bien avant le **pic II** (**figure 3B**) : le fragment issu de l'hydrolyse par la carboxypeptidase B est donc nettement moins cationique que le produit qui correspond au **pic II** : il porte une charge positive bien plus faible.



En d'autres termes, un acide aminé basique est éliminé par la carboxypeptidase B. Cet acide aminé est probablement **Arg**.

Données

- Le produit qui correspond au **pic II** fixe 2 μCi de ^3H avec du chlorure de dansyle à 20 Ci/mmole.
- Le produit qui correspond au **pic II'** est totalement hydrolysé : on obtient donc **tous** les acides aminés qui le constituent.
- Ces produits marqués au chlorure de dansyle à 20 Ci/mmole ne donne que la DNS-Ala avec une radioactivité de 6 μCi .

Conclusions

- Il n'y a qu'un **acide aminé** (Ala) en quantité 3 fois plus importante : **pic II'** = Ala-Ala-Ala.
- En conséquence, puisque le produit qui correspond au **pic II'** = produit qui correspond au **pic II** traité à la carboxypeptidase : **pic II** = Ala-Ala-Ala-Arg.
- Des 2 propositions qui précèdent, on en déduit que le peptide intact a la séquence :
(Cys- ^{14}C + 1 acide aminé) - [Y, F, W, L] - A - A - A - R

Données

Le peptide intact et le produit qui correspond au pic I sont titrables en suivant leur absorption à 295 nm : ils ont un pK apparent = 10. Ils possèdent donc une Tyr.

Conclusion : la séquence suivante du peptide intact est (Cys-¹⁴C + 1 acide aminé) - Y - A - A - A - R

Données

La courbe de titration du peptide intact révèle (entre autres) 3 valeurs de pK :

- pK apparent = 6 => His
- pK apparent = 10 => Tyr
- pK apparent = 12,5 => Arg C-terminale

Conclusion : on peut proposer 2 séquences pour le peptide hormonal :

His - Cys - Tyr - Ala - Ala - Ala - Arg

Cys - His - Tyr - Ala - Ala - Ala - Arg

Ces séquences confirment que le peptide intact est plus basique que Lys et moins basique que Arg (figure 3A) :

$$pI = 1/2 [pK_a \text{ Tyr} + pK_a \text{ Arg}] = 11,3$$