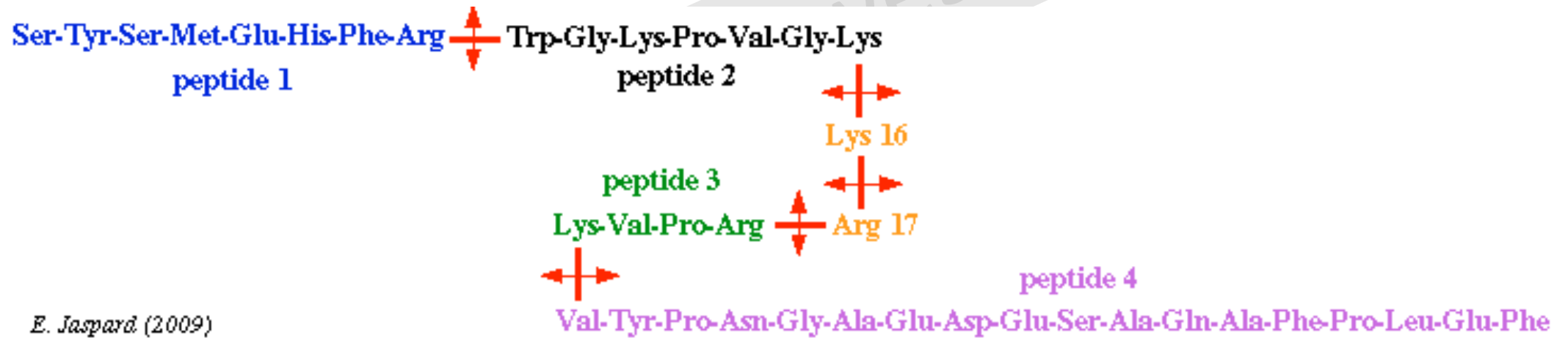


## Etude de l'adrénocorticotropine (ACTH)

La trypsine (EC 3.4.21.4) coupe la liaison peptidique après Arg et Lys sauf si ces acides aminés sont suivis par Pro. Cependant elle peut avoir une spécificité plus complexe.

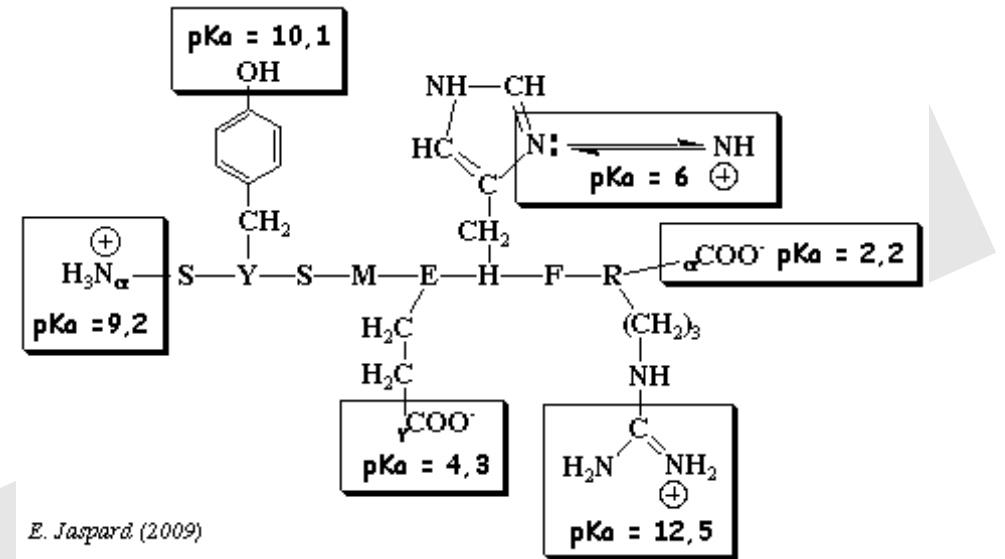


Le traitement de l'ACTH par la trypsine donne donc 4 peptides (1 à 4) et 2 acides aminés (Lys16 et Arg17).

## Ordre de migration dans un gradient de pH

Exemple du calcul du pI du peptide 1

NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-COO<sup>-</sup>



groupe	pK <sub>a</sub>	pH < pK <sub>a</sub> ( $\alpha\text{COOH}$ ) - 2	pH > pK <sub>a</sub> ( $\alpha\text{COOH}$ ) + 2	pH > pK <sub>a</sub> ( $\gamma\text{COOH}$ ) + 2	pH > pK <sub>a</sub> (- NH <sup>+</sup> ) + 2	pH > pK <sub>a</sub> ( $\alpha\text{NH}_3^+$ ) + 2	pH > pK <sub>a</sub> (- OH) + 2	pH > pK <sub>a</sub> (=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) + 2
$\alpha\text{COOH}$	2,2	$\alpha\text{COOH}$	$\alpha\text{COO}^-$	$\alpha\text{COO}^-$	$\alpha\text{COO}^-$	$\alpha\text{COO}^-$	$\alpha\text{COO}^-$	$\alpha\text{COO}^-$
$\gamma\text{COOH}$	4,3	$\gamma\text{COOH}$	$\gamma\text{COOH}$	$\gamma\text{COO}^-$	$\gamma\text{COO}^-$	$\gamma\text{COO}^-$	$\gamma\text{COO}^-$	$\gamma\text{COO}^-$
-NH <sup>+</sup>	6	-NH <sup>+</sup>	-NH <sup>+</sup>	-NH <sup>+</sup>	-N:	-N:	-N:	-N:
$\alpha\text{NH}_3^+$	9,2	$\alpha\text{NH}_3^+$	$\alpha\text{NH}_3^+$	$\alpha\text{NH}_3^+$	$\alpha\text{NH}_3^+$	$\alpha\text{NH}_2$	$\alpha\text{NH}_2$	$\alpha\text{NH}_2$
-OH	10,1	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-O <sup>-</sup>	-O <sup>-</sup>
=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	12,5	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	=NH
Charge		3 +	2 +	1 +	0 (zwitterion)	1 -	2 -	3 -

Calcul du pI du peptide 1 avec la formule la plus simple autour du zwitterion :

$$pI = 1/2 [pK_a \text{ His} + pK_a \alpha\text{NH}_3^+] \approx 7,6$$

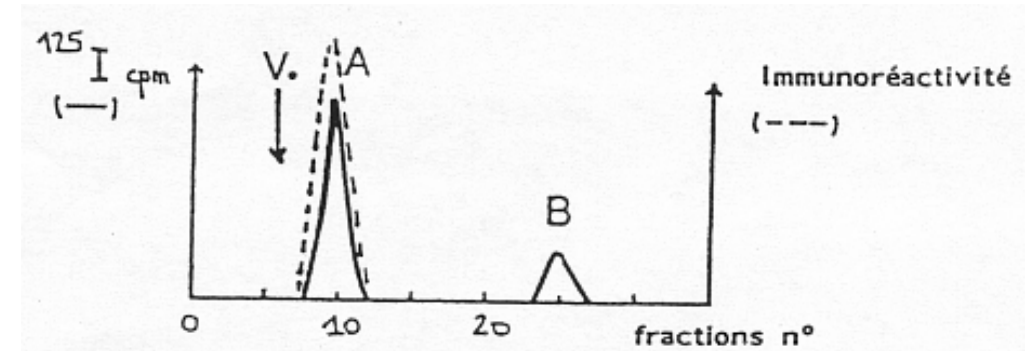
Peptide	Charges	pI	Migration
peptide 1 : NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-COO <sup>-</sup>	+3 à -3	1/2 [pK <sub>a</sub> His + pK <sub>a</sub> αNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] ≈ 7,6	<p style="text-align: center;">Acide</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p style="text-align: center;">pH 2</p> <p style="text-align: center;">↑</p> <p style="text-align: center;">pH 14</p> <p style="text-align: center;">peptide 4 peptide 1 peptide 2 peptide 3</p> <p style="text-align: center;">Basique</p> </div> <p style="text-align: right; font-size: small;"><i>E. Jaspard (2009)</i></p>
peptide 2 : NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-COO <sup>-</sup>	+3 à -1 (2 Lys donc charge initiale = +3)	1/2 [pK <sub>a</sub> Lys + pK <sub>a</sub> Lys] ≈ 10,5	
peptide 3 : NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Arg-Pro-Val-Lys-COO <sup>-</sup>	+3 à -0,8 (pH 13)	1/2 [pK <sub>a</sub> Lys + pK <sub>a</sub> Arg] ≈ 11,5	
peptide 4 : NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Gln-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-COO <sup>-</sup>	+1 à -6	1/2 [pK <sub>a</sub> αCOOH + pK <sub>a</sub> Asp (βCOOH)] ≈ 2,85	

Le contenu des fractions d'élution du pic A est **radioactif** et **immunoréactif**.

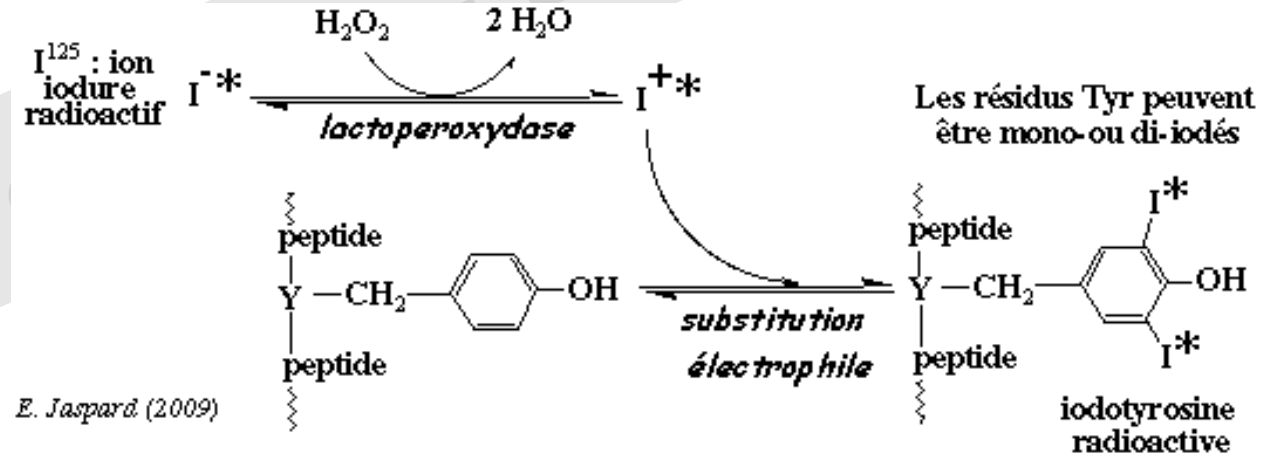
La masse molaire de l'ACTH (4541 Da) est de l'ordre de la limite d'exclusion du gel Séphadex G25.

=> pic **A** = ACTH radioactive

=> pic **B** = Na<sup>125</sup>I en excès (masse molaire NaI = 150)



En présence de peroxydase, d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de Tyr, les ions iodure sont transformés en iode positif (I<sup>+</sup>) qui substituent les hydrogènes en position ortho du noyau aromatique de Tyr.

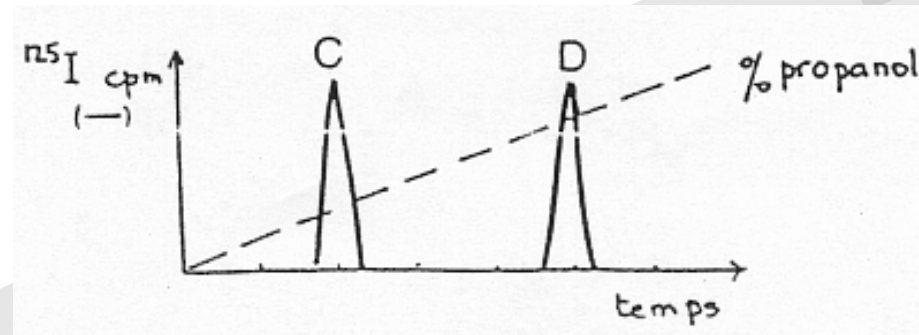


En conséquence, les peptides issus de la digestion trypsique et qui contiennent une ou plusieurs Tyr sont radioactifs :

**peptide 1** : NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Ser-Tyr\*-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-COO<sup>-</sup>

**peptide 4** : NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Val-Tyr\*-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Gln-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-COO<sup>-</sup>

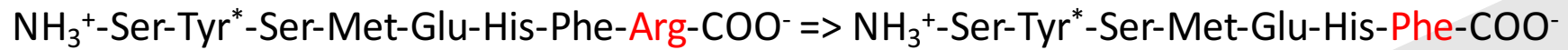
Par chromatographie en **phase réverse**, les peptides hydrophiles sont élués **avant** les peptides hydrophobes.



peptide	% acides aminés hydrophiles	Elution
peptide 1	$6 / 8 = 75\%$	élué en 1er => pic C
peptide 4	$8 / 18 = 44\%$	élué en 2ème => pic D

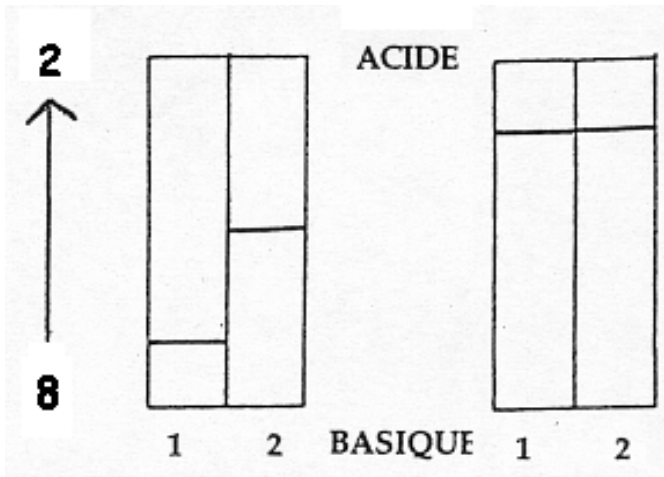
La **carboxypeptidase B** hydrolyse les acides aminés à caractère basique (Arg, Lys) en position C-terminale.

L'hydrolyse du **peptide 1** par la carboxypeptidase B modifie le pI puisque c'est **Arg** qui est éliminé



$$pI = 1/2 [pK_a \gamma\text{COO}^+ + pK_a \text{His}^+] \approx 5,15$$

En revanche, le pI du **peptide 4** n'est pas modifié puisque la carboxypeptidase B ne l'hydrolyse pas (ou alors c'est Phe qui est éliminé).



	piste 1	piste 2
gel gauche = pic <b>C</b>	<b>peptide 1</b> : pI = 7,6	<b>peptide 1</b> après carboxypeptidase B : pI = 5,15
gel droit = pic <b>D</b>	<b>peptide 4</b> : pI = 2,85	<b>peptide 4</b> après carboxypeptidase B : pI = 2,85

Isofocalisation : migration jusqu'à une valeur de pH = pI du peptide.

Autoradiographie : révélation des bandes électrophorétiques par impression d'un film photographique par la radioactivité portée par la iodoTyr.