

Repliement des protéines : exemple de l' α -lactalbumine

N.A. Bushmarina^{1,2}, C. Blanchet¹, G. Vernier¹ et V. Forge¹

¹ *Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 5090, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France*

² *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 194064, Russia*

Résumé. Cette revue sur le repliement des protéines ne fait appel à aucune expérience propre de diffusion de neutrons. Elle décrit les aspects cinétiques et thermodynamiques de la structuration des protéines sur leur chemin de repliement, en faisant référence à des techniques biophysiques variées permettant d'échantillonner des changements conformationnels sur des échelles de temps longues (ms. à s.). Les neutrons constituent une sonde évidemment complémentaire des techniques usuellement employées pour l'étude du repliement des protéines. Nous avons choisi un modèle d'étude, l' α -lactalbumine, pour donner un état de l'art des connaissances acquises à ce jour dans le domaine, et pour ainsi inciter biophysiciens et spectroscopistes à développer des techniques en temps résolu sur des échelles plus rapides, afin de pouvoir détecter les étapes précoces du repliement. Les neutrons doivent trouver une place logique dans de tels développements.

1. LE REPLIEMENT DES PROTÉINES

1.1 Un code de repliement

Les protéines sont des constituants essentiels du vivant et représentent environ la moitié du poids sec des cellules. Elles peuvent avoir des rôles très différents dans l'organisme vivant: pour la structuration (kératine des poils et des ongles, collagène), le transport (hémoglobine pour le transport de l'oxygène), la régulation (enzymes), le stockage (ovalbumine de l'œuf), la défense (anticorps) ou la motricité (actine des muscles).

Une protéine est un polymère linéaire combinant 20 acides aminés différents. Le nombre et la séquence des acides aminés des protéines sont définis par les gènes et apparaissent comme le résultat de la réplication, de la transcription et de la traduction du génome. Les règles de traduction qui permettent de passer de l'ADN à la chaîne des acides aminés sont bien étudiées grâce aux travaux de Watson et Crick (Watson et Crick 1953). Dans la cellule, les protéines sont synthétisées sur les ribosomes. Ensuite la deuxième étape de la construction des protéines a lieu – les molécules de protéine acquièrent dans l'espace une structure tridimensionnelle. Le repliement est le passage d'une chaîne d'acides aminés vers une structure tridimensionnelle native bien définie et permettant à la protéine d'exercer sa fonction biologique. C'est la dernière étape de l'utilisation de l'information contenue dans l'ADN. La structure native est entièrement prédéfinie par l'ordre des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Le mécanisme exact qui conduit le repliement des protéines est toujours une énigme. La question -comment une chaîne d'acides aminés adopte-t-elle une structure fonctionnelle? - reste un des problèmes centraux de la biologie structurale et cellulaire. Le séquençage des génomes produit des dizaines de milliers de séquences d'acides aminés correspondant à des protéines différentes. La cristallisation de toutes ces protéines est impossible, donc, la connaissance du code de repliement pourrait être très utile pour la prédiction de structures tridimensionnelles des protéines à partir de leur séquence en acides aminés. La solution à ce problème se trouve à la frontière de la biologie avec la physique et la chimie, et concerne les expérimentateurs autant que les théoriciens.

1.2 Méthodes biophysiques pour l'étude du repliement *in vitro*

Dans les années 60, Anfinsen a découvert qu'une chaîne d'acides aminés complètement dénaturée avec de l'urée pouvait se replier seule dans un tube à essai en absence des facteurs cellulaires (Anfinsen et al. 1961). Cela veut dire que la machinerie cellulaire qui participe au repliement des protéines *in vivo* peut être remplacée par le choix de conditions particulières qui vont assurer la formation de la structure native et biologiquement fonctionnelle. A partir de là, une étude intensive du repliement des protéines *in vitro* a commencé. La stratégie de ces études consistait en l'utilisation de différentes méthodes biophysiques permettant d'enregistrer différents niveaux d'organisation de la molécule pour suivre les cinétiques de repliement et de dépliement des protéines ainsi que pour la caractérisation des différents états à l'équilibre. De grands progrès dans le développement de telles méthodes permettent de nos jours d'obtenir l'information jusqu'au niveau des atomes. Et le développement des méthodes de mélanges rapides permet de suivre les cinétiques de repliement à partir des premières microsecondes (Nolting 1999; Mayor et al. 2000). Pour atteindre l'état déplié plusieurs moyens de dénaturation ont été utilisés - les dénaturants chimiques comme l'urée et la guanidine, la température, le pH, les changements de concentration du sel, ainsi que les substitutions et les délétions d'acides aminés. Ces études ont porté sur de nombreuses protéines. D'après ces études plusieurs modèles de repliement ont été proposés, mais, actuellement, le mécanisme exact de repliement reste largement inconnu même pour les protéines les plus étudiées.

1.3 Hiérarchie structurale des protéines

Il est possible de définir différents niveaux de structuration des protéines. L'ordre des acides aminés dans la chaîne polypeptidique correspond à ce qu'on appelle la structure primaire. La chaîne d'acides aminés est capable d'adopter des structures spécifiques: des hélices α et des feuillets β - ce sont les structures secondaires d'une protéine. A part ces deux structures secondaires de base (majoritaires) il peut exister des hélices 3_{10} ou des coudes. Ces deux niveaux d'organisation ne sont pas suffisants pour assurer la fonction des protéines. La fonction de chaque protéine dépend de la structure tridimensionnelle adoptée par celle-ci, appelée structure tertiaire. Il existe aussi des protéines constituées de plusieurs monomères, identiques ou différents, autrement dit, elles possèdent une structure quaternaire.

La première structure primaire a été décryptée au début des années 50 (Sanger 1952). L'existence de différentes structures secondaires a été décrite à la même époque par Linus Pauling (Pauling & Corey 1951; Pauling et al. 1951). En utilisant la diffraction des rayons X et la spectroscopie infrarouge, Pauling a défini un modèle de chaîne peptidique dans deux structures appelées α et β . Dans la structure α , la chaîne est enroulée en hélice; dans la structure β , elle est dépliée en formant un zigzag régulier. La stabilité de ces structures est assurée par des liaisons hydrogènes s'établissant entre les fonctions les liaisons peptidiques. L'enroulement en feuillets β est maintenu par des liaisons hydrogène intramoléculaires ou intermoléculaires tandis que les liaisons hydrogènes qui stabilisent les hélices α ne peuvent être que intramoléculaires. Les premières structures tertiaires (notamment, celle de l'hémoglobine (travaux de Max Perutz) et de la myoglobine (John Kendrew)) n'ont été établies qu'à la fin des années 50 grâce à la technique de la cristallographie (Perutz 1960; Kendrew 1959).

1.4 Stabilité des protéines et cinétique de repliement

La question - Quelle conformation adopte une protéine suivant les conditions extérieures? - se décrit avec la notion de stabilité thermodynamique d'une protéine. Il existe un équilibre entre l'état dénaturé D et l'état natif N, et la stabilité est la différence d'énergie libre (ΔG) entre ces deux états. L'enregistrement d'un paramètre physique de la protéine en fonction de la température ou de la concentration d'un dénaturant chimique permet d'obtenir la différence des énergies libres de la molécule de la protéine

entre les états natifs et dénaturés: $\Delta G_{N-D} = \Delta H_{N-D} - T\Delta S_{N-D} = -RT \ln K_{N-D}$. Ici, ΔH et ΔS correspondent aux changements d'enthalpie et d'entropie pendant la réaction $D \leftrightarrow N$, et K_{N-D} est la constante de l'équilibre entre les deux états. Pour les petites protéines la stabilité est de l'ordre 5-10 kcal/mol ce qui est faible par rapport à la stabilité d'une liaison covalente qui est de 50-300 kcal/mol (Fersht 1999, p. 509).

Anfinsen a proposé l'hypothèse « thermodynamique » du repliement qui postulait que la conformation native d'une protéine correspondait à l'état dans lequel l'énergie libre était la plus basse et que, par conséquent, cette conformation ne dépendait que de l'ordre des acides aminés dans la chaîne (structure primaire) (Anfinsen 1973; Anfinsen & Scheraga 1975).

Au milieu des années 60, Cyrus Levinthal a posé le problème principal du repliement des protéines. Il a démontré que si une protéine devait essayer chacune des conformations géométriquement acceptables, cela prendrait un temps beaucoup trop grand par rapport aux temps de repliement observés. En effet, si nous considérons que chaque acide aminé ne peut adopter que deux conformations (ce qui est bien inférieur à la réalité), le nombre de conformations que peut adopter une protéine de 100 acides aminés devrait être égal à 2^{100} . Le temps minimum pour passer d'une conformation à l'autre étant 10^{-13} s, il faudrait un temps égal à 10^{17} secondes ou 10^{10} années pour essayer toutes ces conformations. Ce temps de repliement aléatoire correspond à un temps du même ordre de grandeur que l'âge de l'Univers. Il est connu qu'*in vitro* comme *in vivo* une protéine se replie en quelques secondes, voire même quelques millisecondes pour certaines protéines à température ambiante (Nölting B. 1999, p. 1). Cette énigme porte le nom de « Paradoxe de Levinthal » (Levinthal 1968). Pour résoudre le paradoxe, Levinthal a introduit l'idée du chemin de repliement – il a supposé que la protéine ne cherche pas sa structure native au hasard mais seulement parmi les structures qui mènent vers un minimum local d'énergie le plus rapidement possible. Donc, selon Levinthal la structure native de la protéine est définie par la cinétique et non par la thermodynamique.

Savoir si le repliement est déterminé par la cinétique ou par la thermodynamique n'a rien d'évident. Cette question se pose souvent pour la prédiction des structures tridimensionnelles à partir de la séquence en acides aminés ou pour la création de protéines qui n'existent pas dans la nature. Quelle structure faut-il choisir: la plus stable ou celle qui est accessible le plus rapidement? Donc, il a été accepté que le repliement des protéines soit contrôlé par les paramètres cinétiques et thermodynamiques. Cela veut dire qu'une protéine cherche sa structure native qui est la plus stable au niveau thermodynamique en suivant un chemin particulier de repliement.

1.5 Modèles pour la réaction de repliement

La réaction de repliement de nombreuses protéines a été étudiée à ce jour et il semble que d'un côté le processus de repliement pour une protéine peut être différent d'une autre, mais dans le même temps quelques caractéristiques communes peuvent être reconnues. Trouver un mécanisme du repliement cela signifie répondre aux questions suivantes: quelle force conduit le repliement, et quel est l'ordre d'apparition des différentes structures au cours de la réaction?

1.5.1 L'effondrement hydrophobe

Quelques modèles théoriques de repliement des protéines ont été proposés. Certains d'eux ont été confirmés par l'expérience. Ces modèles conviennent plus ou moins bien pour expliquer le repliement d'une protéine ou l'autre (Baldwin 1996a; Benhabiles et al. 2000). Le modèle d'effondrement (collapse) hydrophobe suppose que le premier évènement du repliement est la formation d'un cœur hydrophobe, ayant lieu avant la formation des structures secondaires (Dill 1990). Il a été prédit par Kauzmann dès 1959, qui a postulé que le « collapse hydrophobe » est la force conduisant le repliement des protéines (Kauzmann 1959). En effet, les interactions hydrophobes sont parmi les principaux facteurs de

la stabilité d'une protéine. Elles apparaissent parce que les groupes non polaires de la protéine ont une tendance à éviter les contacts avec les molécules d'eau, en formant un noyau hydrophobe. Cela mène à une diminution de l'énergie libre du système protéine-solvant grâce à l'augmentation de l'entropie du solvant (Fersht 1999).

1.5.2 Le modèle de nucléation-propagation

Le modèle de nucléation- propagation a été proposé pour expliquer les premiers résultats sur la cinétique du repliement de la ribonucléase A. Il postule que le repliement inclut une étape de nucléation suivie par une propagation rapide de la structure. L'étape limitante est le processus de nucléation. Après des études cinétiques plus récentes, il a été remplacé par le modèle de nucléation-condensation proposé par Fersht. Ce modèle propose la formation de noyaux locaux stabilisés par des interactions distales (Wetlaufer 1973; Fersht 1995a).

1.5.3 Le modèle de diffusion-collision

Le modèle de diffusion-collision a été développé par Karplus et Weaver en 1976 et a été réévalué en 1994 à la lumière de données plus récentes (Karplus & Weaver 1976 & 1994). Selon ce modèle, le repliement commence par la nucléation simultanée en plusieurs endroits de la chaîne polypeptidique. Cela mène à l'organisation de microstructures qui diffusent et s'associent dans la molécule pour former des sous-structures avec la conformation native. Ces microstructures ont une durée de vie contrôlée par la diffusion, donc, le repliement d'un polypeptide de 100-200 acides aminés peut se passer en un temps très court, moins d'une seconde. Selon ce modèle le repliement se passe à travers quelques étapes de diffusion-collision.

1.5.4 Le modèle « Framework »

Ptitsyn a proposé un modèle tout à fait différent qui porte le nom de « framework », c'est à dire, modèle de charpente. Il suggère que la protéine se replie à travers quelques intermédiaires, chacun ayant un nombre plus grand de structures natives (Ptitsyn & Rashin 1973; Ptitsyn et al. 1990). Ce modèle suppose l'existence d'au moins deux intermédiaires: un avec une structure secondaire fluctuante autour des hélices α et feuillets β déjà formés et l'autre plus stable avec la structure secondaire et la forme native (charpente) mais sans interactions tertiaires spécifiques. La « construction » de la protéine est finie quand les structures tertiaires natives sont formées.

1.5.5 Le modèle hiérarchique

Le repliement séquentiel et hiérarchique a été aussi proposé par Baldwin et il a été accepté pendant des années (Baldwin 1975; Kim & Baldwin 1982). Selon ce modèle plusieurs segments de structures sont formés et assemblés à différents niveaux suivant un chemin de repliement unique. Dans ce modèle la nucléation est suivie par la formation des structures secondaires, puis tertiaire et enfin quaternaire.

1.5.6 Le modèle « Jigsaw Puzzle »

Le modèle du "Jigsaw Puzzle" (Harrison & Durbin 1985) considère le repliement comme un assemblage en puzzle avec l'existence de plusieurs chemins menant à une solution unique. C'est une nouvelle approche car on a longtemps postulé que le repliement suit un chemin unique.

1.5.7 Le modèle de « l'entonnoir énergétique de repliement »

Les études théoriques récentes ont pu apporter un nouveau point de vue sur le repliement des protéines. Un autre concept a été élaboré pour résoudre le paradoxe de Levinthal, le modèle de paysages énergétiques (Bryngelson et al. 1995; Socci et al. 1998). Dans ce modèle, le paysage énergétique de la protéine est représenté sous la forme d'un entonnoir. La partie évasée correspond à l'ensemble des états dépliés de la protéine et l'extrémité étroite à l'état natif (replié). La différence entre l'état dénaturé et l'état natif correspond aux changements de l'enthalpie au cours du repliement. La largeur de l'entonnoir à une hauteur donnée correspond à l'entropie conformationnelle dans cet état. Tandis que le repliement de la structure progresse vers son état natif, le nombre de conformations à explorer diminue. La vitesse du repliement est diminuée par la présence de puits intermédiaires sur la surface énergétique. Chaque puits correspond à un minimum d'énergie locale. La descente vers l'état natif s'accompagne d'une diminution d'entropie conformationnelle. Le changement d'énergie libre au cours du repliement est illustré par la pente d'un chemin de l'entonnoir qui correspond aussi à la vitesse de la réaction. Plus la pente est raide, plus rapide est le repliement. (Wolynes et al. 1995; Onuchic et al. 1997; Dill & Chan 1997; Schultz 2000).

La complexité de l'entonnoir est déterminée par la nature, la taille et la structure des domaines de la protéine. Par ailleurs, l'existence de plusieurs chemins de repliement pour une protéine a été confirmée par des études expérimentales (Radford 2000). Dans le cas de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique du bœuf, la présence de plusieurs chemins de repliement est due à l'existence d'isomères avec des ponts disulfures différents de ceux de l'état natif (Creighton & Goldenberg 1984; Weissman & Kim 1991). Une autre raison majeure de l'existence de plusieurs chemins de repliement est l'isomérisation des prolines: c'est le cas pour la ribonucléase A, la ribonucléase T1, la nucléase du staphylocoque (Schmid 1993). Le chemin lent du repliement est dû à la présence des résidus de prolines dans la configuration incorrecte, la trans-cis isomérisation des prolines étant très lente. Dans ce cas l'ajout de prolylisomérase accélère le repliement.

1.5.8 Les modèles expérimentaux de repliement

Le schéma général de la réaction de repliement est le suivant: $D \rightarrow I_1 \rightarrow \dots \rightarrow I_n \rightarrow N$, où D est l'état complètement dénaturé, I_1, \dots, I_n sont les états intermédiaires, n peut être égal à zéro, N est l'état natif. Ainsi, le repliement d'une protéine peut se passer en une seule étape, ou en plusieurs étapes avec l'accumulation d'intermédiaires stables.

Le repliement à deux états. Longtemps, les expérimentateurs ont pensé que le repliement des protéines se passait selon le principe du « tout ou rien », sans formation d'intermédiaire stable. Après il a été découvert que sur le chemin de repliement il peut exister des intermédiaires stables qui réduisent le nombre de conformations accessibles et ainsi accélèrent le repliement. Les chercheurs ont alors essayé de trouver de tels états dans le repliement de toutes les protéines. Finalement, il a été accepté que le repliement des petites protéines de moins de 100 acides aminés se passe sans l'accumulation d'intermédiaire et qu'il est dans la plupart des cas beaucoup plus rapide que celui des plus grosses protéines. Dans ce cas seuls l'état initial (natif) et l'état final (dénaturé) sont observés.

Pour les petites protéines, les structures tertiaires et secondaires se forment simultanément, et le modèle de nucléation-propagation décrit bien leur repliement. La cinétique du repliement à deux états peut être décrite avec la théorie de l'état de transition utilisée en chimie-physique. Selon cette théorie la vitesse du repliement est limitée par l'état de transition qui est le moins stable de tous les états et pour cela ne peut pas être observé. La vitesse de repliement dépend donc de la barrière énergétique qui existe entre l'état dénaturé et l'état de transition. Récemment il a été démontré que la vitesse de repliement des petites protéines est corrélée avec leur topologie, particulièrement avec la distance moyenne entre les résidus en interaction (Plaxco et al. 1998; Baker 2000; Grantcharova et al. 2001). D'après les études expérimentales,

il est évident que les interactions locales se forment plus vite que les interactions non locales. Le rôle important de la topologie de l'état natif s'explique facilement si on prend en compte le grand coût entropique de la formation des interactions à plus longue distance. L'explication thermodynamique suivante a été proposée: « Quand les résidus qui interagissent sont proches dans une séquence, le coût entropique de l'organisation de la chaîne est partiellement compensée par la formation du contact plus tôt dans le repliement, ce qui mène à une barrière d'énergie plus petite » (Grantcharova et al. 2001).

Le repliement à plusieurs états. Le repliement de protéines qui contiennent plus de 100 acides aminés passe souvent par l'accumulation d'intermédiaires détectables. Ces intermédiaires peuvent apparaître pendant la phase précoce du repliement en quelques millisecondes. A cause de cette rapidité il est très difficile de suivre leur formation. En effet, les techniques classiques de mélange rapide ("stopped-flow", "continuous flow" et "quenched flow") permettent d'enregistrer les événements de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes. Les événements ultra-rapides sur des temps inférieurs à la milliseconde peuvent être suivis par des techniques récentes de sauts en température classiques ou associés à un laser infra-rouge, de transfert optique d'électron ou encore de flux continu (Nölting et al. 1995; Röder 1995; Plaxco & Dobson 1996). Malheureusement ces nouvelles techniques ne sont pas encore faciles d'accès et ont beaucoup de limitations. En conséquence, elles ne sont pas encore largement utilisées.

Le modèle du collapse hydrophobe et les modèles de repliement hiérarchique décrivent bien le repliement de ces protéines. En effet, le premier état intermédiaire qui est accumulé après les premières millisecondes de repliement, a une compacité proche de celle de l'état natif et les résidus hydrophobes sont alors partiellement protégés du solvant. Une autre caractéristique de cet état est la présence d'une quantité de structure secondaire comparable à celle observée dans l'état natif, et l'absence de la structure tertiaire. Ces caractéristiques définissent l'état molten globule (globule fondu) détecté dans les premières étapes de toutes les protéines de plus de 100 acides aminés.

D'autres intermédiaires peuvent être détectés au cours du repliement de ces protéines. Ces intermédiaires peuvent se trouver sur le chemin menant de l'état dénaturé vers l'état natif ou être en dehors de ce chemin. Si un intermédiaire se trouve sur le chemin principal du repliement, il peut contenir des structures natives partiellement formées, le taux de structures natives dépendant de la localisation de ces intermédiaires sur le chemin du repliement (Ptitsyn 1995). Plus l'intermédiaire est proche de l'état natif, plus il contient des structures natives. Si l'intermédiaire se trouve en dehors du chemin de repliement, il peut alors contenir des structures non natives qui devront être défaites avant de former les structures natives et atteindre l'état natif. Ces intermédiaires qui se trouvent en dehors du chemin de repliement sont souvent propices à l'agrégation de la protéine. Il peut donc exister une compétition cinétique entre un repliement correct et une agrégation (Yon 1996; Dobson & Ellis 1998).

La dernière étape du repliement de ces protéines consiste en la formation et l'organisation finale des structures tertiaires à partir des structures contenues dans les intermédiaires. Cette étape peut être lente et limitante pour la vitesse de toute la réaction. Cette phase contient aussi l'isomérisation des prolines, l'assemblage des domaines dans les protéines multi-domaines et des sous-unités dans les protéines multimériques. Il a été démontré que le repliement des protéines multimériques se passe selon des schémas différents qui dépendent de la protéine (Creighton 1997; Baldwin 1996b). Pour certaines protéines, les sous-unités se replient de façon autonome et coopérative, puis s'associent (Vita et al. 1989). Pour d'autres protéines, les domaines se replient simultanément puis s'associent (Oas & Kim 1988). En général les domaines isolés se replient plus vite que lorsqu'ils sont intégrés dans l'ensemble de la protéine (Missiakas et al. 1992).

1.6 Caractérisation des différents états impliqués dans la réaction de repliement

1.6.1 L'état natif

En biochimie, l'état natif de la protéine est sa forme fonctionnelle ou opérationnelle. Il peut être acquis par la formation de la structure tertiaire (dans le cas des protéines monomériques) ou de la structure

quaternaire de la protéine. De nombreuses enzymes et autres protéines non structurales ont plus d'un état natif et elles peuvent passer d'un état à l'autre. Mais généralement, le terme « état natif » est utilisé exclusivement pour distinguer les protéines correctement repliées des protéines dénaturées ou partiellement repliées. Dans d'autres contextes la forme repliée d'une protéine est souvent appelée « conformation » ou « structure » native.

Les forces qui stabilisent l'état natif de la protéine sont des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes intramoléculaires, des interactions de Van der Waals, l'entropie de déshydratation, des ponts salins et des interactions dipolaires. Par contre les liaisons hydrogènes avec l'eau ainsi que la perte d'entropie conformationnelle déstabilisent la structure native. Il est possible de distinguer les interactions locales (entre les résidus proches de la chaîne) et non locales (entre les résidus éloignés dans la séquence). Dans le cas des protéines solubles, la structure tertiaire de la protéine s'organise autour d'un ou plusieurs cœur(s) hydrophobe(s) laissant les résidus polaires exposés au solvant. La structure des protéines peut être déterminée par la cristallographie des rayons X, par la résonance magnétique nucléaire ou par la diffraction des neutrons. Les structures des protéines résolues grâce à ces méthodes sont disponibles sur Internet dans la Protein Data Bank à l'adresse <http://www.rcsb.org>. En Septembre 2004 environ 28 000 structures de protéines étaient répertoriées.

1.6.2 L'état dénaturé – La pelote statistique

Historiquement, l'état dénaturé (l'état initial de la réaction de repliement) est considéré comme l'état de la protéine dans lequel il n'y a pas d'éléments de structure secondaire ni tertiaire. Dans cet état les angles de torsion des liaisons de chaque acide aminé dans la chaîne principale peuvent adopter un nombre important de possibilités. Le nombre conformations que peut donc échantillonner une protéine est de ce fait gigantesque. La protéine est alors décrite sous forme de pelote statistique. C'est l'état initial de la plupart des expériences de repliement - la protéine peut être dénaturée par l'urée ou la guanidine à hautes concentrations, ou dans certains cas à pH extrêmes, par des hautes températures ou par la pression. La caractérisation des propriétés conformationnelles des états dénaturés de la protéine est la première étape importante pour la compréhension du repliement. Pendant longtemps ces états dénaturés ont été négligés, l'attention se portait plutôt sur les états natifs.

Les états dénaturés sont des ensembles dynamiques de conformations en interconversion rapide mais d'énergie similaire, avec quelques interactions non locales le long de la chaîne (Brockwell et al. 2000). L'information de basse résolution sur les propriétés conformationnelles des différents états dénaturés peut être obtenue par des mesures du volume hydrodynamique et du rayon de giration, par des méthodes spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge. Ces études ont montré que dans l'état dénaturé il peut rester des structures résiduelles dont la nature dépend du dénaturant utilisé (Shortle 1996). Mais ces techniques permettent d'obtenir une information moyennée sur tout l'ensemble des conformations que la protéine peut adopter. Pour obtenir une information plus détaillée (au niveau atomique), il faut utiliser la spectroscopie RMN. C'est sans doute la meilleure technique pour étudier les états dénaturés (Dyson & Wright 1998).

Les études récentes faites par spectroscopie RMN ont apporté un nouveau regard sur les propriétés de l'état dénaturé. Il ne semble plus être si désordonné et stochastique. Henning et ses collègues ont calculé les angles de torsion des chaînes latérales du lysozyme du blanc d'œuf dénaturé par l'urée en utilisant la spectroscopie RMN avec marquage ^{15}N et ^{13}C . Ils ont découvert que les résidus de la protéine dénaturée ont des préférences pour certains rotamères (Henning et al. 1999). De plus, les résidus aromatiques forment des clusters hydrophobes même en présence du dénaturant à haute concentration.

Toutes ces données confirment la persistance de quelques interactions locales et non locales dans certaines protéines dénaturées. La protéine dans cet état adopte un ensemble de conformations avec une distribution limitée et une topologie globale qui présente quelques similarités avec celle de l'état natif. Récemment il a été démontré que l'état dénaturé peut même avoir un rôle biologique (Plaxco & Gross 1997).

1.6.3 Les états intermédiaires du repliement – Le « molten globule »

Alan Fersht et ses collaborateurs ont proposé une méthode basée sur l'ingénierie des protéines pour l'étude des structures des intermédiaires dans le repliement des protéines (Matouschek et al. 1992; Matouschek & Fersht 1993). Cette approche est importante pour la caractérisation de l'état de transition qui correspond à la barrière d'énergie potentielle entre l'état dénaturé et l'état natif. En effet, ils ont appliqué au repliement des protéines la théorie qui a été développée auparavant pour étudier le rôle des énergies d'interactions entre des substrats et des enzymes pendant la catalyse enzymatique (Fersht et al. 1992; Fersht 1993; Fersht 1995b; Fersht 1999).

Pour vérifier si une interaction, qui est présente dans l'état natif de la protéine et connue grâce à la structure résolue par la cristallographie, est déjà présente dans l'état de transition il faut enlever cette interaction par mutagenèse dirigée et regarder comment cela influence les énergies libres de l'état de transition et de l'état natif. L'influence relative de ces mutations sur l'état de transition est caractérisée par le paramètre Φ : $\Phi_{\ddagger} = \Delta\Delta G_{\ddagger-D} / \Delta\Delta G_{N-D}$, où $\Delta\Delta G_{\ddagger-D}$ est la variation due à la mutation de la différence d'énergie libre entre l'état de transition et l'état dénaturé, et $\Delta\Delta G_{N-D}$ pour l'état natif. Ces énergies libres peuvent être déterminées par des méthodes biophysiques traditionnelles – par exemple, des mesures à l'équilibre et des cinétiques par fluorescence intrinsèque en utilisant un appareil de mélange rapide. Normalement le calcul des différences d'énergies libres se fait à partir des vitesses de repliement et de dénaturation pour $\Delta\Delta G_{\ddagger-D}$ et $\Delta\Delta G_{N-D}$, respectivement.

Lorsque la valeur de Φ est zéro, cela signifie que la mutation ne change pas la stabilité de l'état de transition contrairement à la protéine sauvage, et une valeur de Φ égale à 1 signifie que la mutation déstabilise (ou stabilise) l'état de transition exactement comme l'état natif. Donc, Φ indique à quel point l'état de transition ressemble à l'état natif dans le voisinage du résidu muté. Lorsque Φ est égale à 1, la structure autour du résidu muté est aussi stable dans l'état de transition que dans l'état natif. Lorsque Φ est égale à 0 alors la protéine dans l'état de transition n'est pas structurée autour du résidu muté. L'interprétation des Φ qui se trouvent entre 0 et 1 est plus difficile. Ces valeurs peuvent être interprétées soit par des interactions affaiblies dans l'état de transition soit par l'existence d'un mélange d'états de transition avec des interactions complètement formées ou cassées. Ce mélange peut correspondre à l'équilibre entre différentes conformations d'un intermédiaire ou à des voies parallèles de repliement menant à un mélange d'états de transition (Fersht 1999).

Les premières preuves de l'existence d'états partiellement repliés ont été obtenues en 1967 par les groupes de Tanford et Brandts qui ont démontré que la dénaturation de certaines protéines peut être non coopérative (Aune et al. 1967; Brandts & Hunt 1967). Par la suite, l'étude entreprise par Kuwajima et ses collègues sur la dénaturation des structures secondaires et tertiaires de l' α -lactalbumine a été particulièrement importante. En effet les dénaturations des deux niveaux de structure ne sont pas simultanées (Kuwajima et al. 1976; Nozaka et al. 1978). La dénaturation de cette protéine passe par un intermédiaire partiellement dénaturé avec des éléments de structures secondaires mais pas de structure tertiaire. Le même intermédiaire a été découvert pour cette protéine à pH acide. Cet intermédiaire a été défini comme un état partiellement replié stable et compact avec des structures secondaires natives, mais avec une structure tertiaire fluctuante. Il a été appelé « molten globule » (ou globule fondu) par Ohgushi et Wada (Ohgushi & Wada 1983). Ainsi, dans les années 80, le modèle de « framework » proposé par Ptitsyn a été confirmé par les expériences. Le deuxième intermédiaire prédit par le modèle correspondait bien à l'état « molten globule ». Il a été étudié en détail dans le laboratoire de Ptitsyn qui a découvert que cet état est identique à l'intermédiaire cinétique qui apparaît pendant le repliement des protéines in vitro (Dolgikh et al. 1984; Semisotnov et al. 1987). Plus tard l'état « molten globule » a été retrouvé au cours de repliement de plusieurs protéines, comme l' α -lactalbumine (Kuwajima 1996), l'anhydrase carbonique (Jagannadham & Balasubramanian 1985), l'actine (Kuznetsova et al. 1988; Turoverov et al. 1999), l'apomyoglobine (Vidugiris & Royer 1998). Suite à ces découvertes il a été proposé comme un intermédiaire général du chemin de repliement des protéines (Ptitsyn et al. 1991).

L'état « molten globule » est un état précoce du repliement dans les conditions physiologiques. Cet état apparaît pendant les premières millisecondes de la réaction du repliement tandis que la reconstitution totale des interactions natives d'une protéine de 100 à 300 acides aminés exige plusieurs secondes (pour certaines protéines) jusqu'à des dizaines de minutes (pour d'autres). Il est nécessaire de souligner que pour la plupart des protéines l'étape la plus lente du repliement n'est pas la formation du « molten globule » mais sa réorganisation dans l'état natif. A l'équilibre l'état « molten globule » peut être accumulé à pH extrême, en présence de concentration modérée de dénaturant, à température élevée ou encore après chélation de ligands de protéines (Ptitsyn 1995; Arai & Kuwajima 2000).

L'état de molten globule est caractérisé par la présence de structures secondaires natives, mais l'absence de compactage natif des structures tertiaires. Les chaînes latérales restent mobiles (Chaffotte et al. 1992). Le rayon de giration de la molécule dans l'état molten globule est légèrement plus grand que celui de l'état natif (Arai et al. 2002). Les résidus hydrophobes forment des clusters dans cet état qui sont accessibles au solvant, et peuvent lier très fortement des sondes hydrophobes (Semisotnov et al. 1987&1991a). Cette sonde se lie très peu sur les protéines natives ainsi que sur les protéines dénaturées, mais a une très grande affinité pour les surfaces hydrophobes présentes dans les états intermédiaires.

Depuis plus de 20 ans les états intermédiaires de nombreuses protéines ont été intensivement étudiés. Ces études ont produit beaucoup de données sur leurs propriétés structurales et énergétiques (Kim & Baldwin 1990; Ptitsyn 1995). Quant au rôle cinétique de ces intermédiaires dans le repliement *in vitro* et *in vivo*, la question reste ouverte pour le moment. Au début il a été supposé que les intermédiaires étaient nécessaires dans le repliement des protéines pour restreindre le nombre de conformations qui sont accessibles à la chaîne polypeptidique ce qui permettrait à la protéine de se replier plus vite (Ptitsyn 1990). Dans ce cas, les intermédiaires se trouvent sur le chemin de repliement direct de la protéine. Le repliement de petites protéines se passe pendant 10-50 millisecondes sans accumulation d'intermédiaires observables (pour revue voir: Sosnick et al. 1994). A la lumière des nouvelles données expérimentales, il est évident que le rôle de l'état « molten globule » n'est pas d'accélérer le repliement mais d'assurer un repliement correct dans le cas des grosses protéines. Cependant, certains auteurs ont démontré que l'état « molten globule » peut être un « piège » pour le repliement et se trouver sur un autre chemin de repliement que le chemin direct vers l'état natif (Mizuguchi et al. 2000). En effet il a été démontré que sur le chemin de repliement peuvent exister des intermédiaires qui ont des structures secondaires ou des contacts tertiaires non natifs. Le repliement de la protéine ne peut alors s'effectuer qu'après la dénaturation de telles structures (Creighton & Goldenberg 1984; Weissman & Kim 1991; Kiefhaber et al. 1992; Troullier et al. 2000).

Après la découverte de l'état « molten globule » sur le chemin de repliement de certaines protéines, des rôles possibles de cet intermédiaire dans la cellule ont été recherchés. Tout d'abord il était naturel de supposer que beaucoup de « protéines naissantes » se trouvent dans l'état « molten globule » juste après leur biosynthèse (Bychkova et al. 1988; Bychkova & Ptitsyn 1993). En effet, la biosynthèse d'une protéine de petite taille prend environ 10 secondes (Alberts et al. 1983), ce qui est beaucoup plus long que le temps de formation de l'état « molten globule » (moins d'une seconde), mais beaucoup plus court que le temps de repliement d'un grand nombre de protéines (plus de 100 secondes). Il a été démontré qu'une « protéine naissante » doit acquérir un état partiellement replié pour pouvoir interagir avec les chaperonnes moléculaires (pour revue: Ptitsyn 1995; Horwich et al. 1999). Le fait que cet état partiellement déplié est l'état « molten globule » a été confirmé par de nombreuses expériences (Martin et al. 1991 & 1992; van der Vies et al. 1992; Hayer-Hartl et al. 1994). Un autre rôle du « molten globule » dans la cellule concerne son interaction avec des membranes (Lala et al. 1995; Banuelos & Muga 1996 a & b; Chaudhuri et al. 2004). Il a été proposé que le passage de la protéine dans l'état « molten globule » favorise l'interaction de la protéine avec les membranes biologiques et est même nécessaire pour le transport des protéines à travers des membranes (Bychkova et al. 1988). De plus, la membrane est capable de déplier et même replier partiellement une protéine grâce à ses charges négatives pour la transporter (Eilers & Shatz 1988; Eilers et al. 1989; Bychkova & Ptitsyn 1993; Chenal et al. 2002).

2. UN CAS D'ÉTUDE: L' α -LACTALBUMINE

2.1 Fonctions de l' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine (α -LA) est une protéine qui se trouve dans les glandes mammaires et sous forme soluble dans le lait. Le sérum protéique isolé du lait de vache est composé d' α -lactalbumine, de β -lactoglobuline, d'albumine et de γ -globuline. L' α -lactalbumine représente à peu près 25% de la masse sèche du lait de vache. La fonction principale et la plus étudiée de l' α -LA est son rôle dans la régulation de la synthèse de lactose par capacité à former un complexe avec la galactosyltransférase (Hill & Brew 1975). La Galactosyltransférase (GT) seule catalyse le transfert de galactose de UDP- galactose vers des glycoprotéines et glycolipides (en particulier la N-acétyl-D-glucosamine). La GT peut également catalyser aussi le transfert de galactose vers le glucose libre pour former le lactose. Cependant, la GT seule est très peu active avec le D-glucose comme accepteur, car son K_m pour le D-glucose est très élevé. Par contre lorsque le complexe avec l' α -lactalbumine est formé, le K_m pour le glucose comme substrat diminue d'un facteur 1000 ce qui entraîne la synthèse de lactose.

L' α -lactalbumine est un exemple de protéine exerçant des fonctions biologiques différentes selon son état. En premier, il a été démontré *in vitro* qu'une forme adoptée par l' α -lactalbumine à pH acide peut induire l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans les cellules tumorales et immatures en laissant intactes les cellules normales (Hakansson et al. 1995; Svensson et al. 1999 & 2000; Kohler et al. 2001). Pour exercer cette fonction la protéine a besoin d'un acide gras, le C18:1, comme cofacteur. Cette forme de l' α -LA est partiellement dénaturée et possède des caractéristiques de type « molten globule ».

Une fonction supplémentaire de l' α -lactalbumine est liée à son effet protecteur contre les problèmes gastriques induits par l'alcool et le stress (Matsumoto et al. 2001). Il a ainsi été démontré que le lait et le calcium protègent les muqueuses gastro-intestinales contre les ulcères (Koo 1994). Matsumoto et collègues ont découvert récemment que l' α -lactalbumine était seule responsable de cet effet (Matsumoto et al. 2001). Ainsi, l' α -lactalbumine présente plusieurs fonctions biologiques qui dépendent des conformations qu'elle adopte et des cofacteurs qu'elle lie.

2.2 Structure de l' α -lactalbumine

La plupart des α -lactalbumines (de l'homme, du hamster, du bœuf, de la chèvre, du chameau, du cheval et du lapin) contiennent 123 acides aminés (Nitta & Sugai 1989; Desmet *et al.* 1989). Leur masse moléculaire est 14.5 kDa. Celle du rat contient 17 résidus supplémentaires à l'extrémité C-terminale.

La structure native de l' α -lactalbumine est composée de deux domaines: un domaine en hélices- α et un domaine en feuillet- β (Fig. 1). Le domaine en hélices α est formé par les sections N- et C-terminales de la chaîne polypeptidique (résidus 1-34 et 86-123). Il contient quatre hélices α : hélice A (résidus 5-11), B (23-34), C (86-99), et D (105-109), et 3 hélices 3_{10} (12-16, 101-104 et 115-119). Le domaine β est formé par la section centrale de la chaîne polypeptidique (des résidus 35-85) et contient un feuillet- β antiparallèle à trois brins, une petite hélice 3_{10} (76-82) et une grande boucle. Les domaines interagissent entre eux par des liaisons hydrogènes entre le groupe hydroxylique du phénol de Tyr103 (domaine α) et l'oxygène de l'amide de Gln54 et l'amide de la chaîne principale de Asn56 (domaine β). La structure de la protéine est aussi stabilisée par quatre ponts disulfures: deux dans le domaine α (Cys28- Cys11, Cys6- Cys120), un dans le domaine β , (Cys61- Cys77) et un pont qui connecte l'hélice C du domaine α avec l'hélice 3_{10} du le domaine β .

Un site de liaison du Ca^{2+} de haute affinité se trouve dans la boucle qui connecte les deux domaines (Fig. 1). Il est constitué par une partie de la chaîne assez longue (résidus 79-88). Le Ca^{2+} est coordonné selon une structure pentagonale bipyramidale tordue par les groupes carboxyliques des chaînes latérales de trois aspartates (Asp 82, Asp 87 et Asp 88), deux atomes oxygène du squelette (Lys79 et Asp84), et deux molécules ligands oxygène de molécules d'eau (Anderson et al. 1997). Ce site n'appartient pas à la famille des sites de liaison de calcium de type « EF hand » mais à un nouveau type de site « le coude »

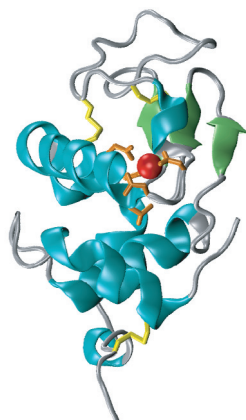


Figure 1. Structure de l' α -lactalbumine. Seule le squelette de la protéine est représenté. Les hélices a sont colorées en bleu et les brins b en vert. Les quatre ponts disulfures sont en jaune, l'ion calcium en rouge et les chaînes latérales impliquées dans la liaison du calcium en orange.

(Desmet & van Cauwelaert 1988). La constante de dissociation de Ca^{2+} est de l'ordre de 10^{-7} - 10^{-8} M (Permyakov et al. 1981; Murakami et al. 1982). Cette valeur dépend de la concentration d'autres cations monovalents et divalents présents dans la solution, du pH et de la température (Grico & Remeta 1999).

2.3 Rôle du calcium dans la structure et la stabilité de l' α -lactalbumine

Le calcium a un rôle structural très important pour la stabilité et le repliement de l' α -LA. La protéine native contient un ion de calcium par molécule mais le rôle physiologique de cette liaison n'est pas encore connu. A la température ambiante, la liaison du calcium entraîne des changements dans la structure tertiaire mais pas dans la structure secondaire de l' α -LA (Permyakov *et al.* 1981&1985; Anderson *et al.* 1997; Hendrix *et al.* 2000). La stabilité de la forme « apo » (en absence de calcium) dépend de la force ionique de la solution, qui peut être changée par l'addition de NaCl, KCl ou Tris-HCl (Desmet *et al.* 1987; Grico & Remeta 1999). La stabilité de la forme « holo » (en présence de calcium) dépend de la concentration du Ca^{2+} dans le milieu. En effet, bien que la constante de dissociation du Ca^{2+} pour l'état natif soit de l'ordre de 10^{-8} M, l'ajout de 10 mM de Ca^{2+} est nécessaire pour la stabilisation de la protéine. Dans ces conditions, la protéine « holo » passe en état « molten globule » vers 70 °C.

La déstabilisation de la forme « apo » est liée à la présence de charges négatives non compensées dans le site de liaison du Ca^{2+} . La compensation partielle de ces charges stabilise la protéine, ce qui explique l'effet de la force ionique sur la protéine, mais leur neutralisation complète n'est possible qu'en présence du Ca^{2+} avec les liaisons bien coordonnées (Grico & Remeta 1999; Wijesinha-Betoni et al. 2001). C'est pour cela que la protéine est déstabilisée à pH acide: la compétition entre les protons et le Ca^{2+} amène à une décalcification de la protéine.

2.4 Dénaturation de l' α -lactalbumine par le chlorure de guanidinium

Cette dénaturation à l'équilibre à température ambiante n'est pas coopérative et passe par l'accumulation d'un intermédiaire partiellement déplié qui possède les caractéristique du « molten globule » (Ku wajima 1996; Ikeguchi *et al.* 1986 a & b; Ku wajima *et al.* 1989). Ce processus dépend de la concentration de Ca^{2+} présent dans la solution: en présence de 1mM Ca^{2+} , le point de mi-transition se trouve à 3.2M GdmCl et à 2M GdmCl en absence du Ca^{2+} . Ces transitions suivies par l'absorbance UV ou par le dichroïsme circulaire dans l'UV proche correspondent à la dénaturation de la structure tertiaire de la protéine.

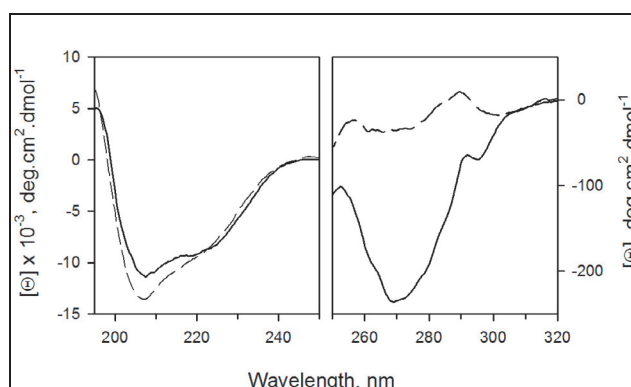


Figure 2. Spectres de dichroïsme circulaire de α -lactalbumine. (Lignes continues) spectres de l'état natif et (Lignes pointillées) spectres du « molten globule » e stabilisé à pH 2. Les spectres présentés à gauche sont ceux enregistrés dans l'UV lointain: leurs formes indiquent que dans les deux cas la structure secondaire de la protéine est principalement constituée d'hélices α . Les spectres à droite sont ceux obtenus dans l'UV proche. Dans cette gamme nous détectons les résidus aromatiques. La présence d'un signal indique que la mobilité des chaînes latérales aromatiques est réduite; ceci est une conséquence de la présence d'une structure tertiaire stable. Un signal est observé dans le cas de la protéine native et ce signal disparaît dans le cas du « molten globule » qui ne possède pas de structure tertiaire stable.

La structure secondaire de la protéine suivie par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain disparaît à des concentrations de guanidine plus élevées (Kuwajima *et al.* 1976; Kuwajima *et al.* 1989). A plus grandes concentrations de Ca^{2+} la dénaturation devient plus coopérative. En présence de 12 mM Ca^{2+} les dénaturations des structures secondaire et tertiaire de la protéine sont complètement coopératives (Ikegushi *et al.* 1986b). L'état « molten globule » n'est plus observé.

L'état intermédiaire observé à faible concentration de guanidine n'est jamais peuplé à 100%. Il est toujours en équilibre avec les états natif et complètement dénaturé. Ceci rend difficile son étude structurale. Par chance, en 1981 Dolgikh a démontré qu'à pH 2 l' α -LA adopte un état partiellement dénaturé, cet état compact et stable possède des structures secondaires natives mais n'a pas de structure tertiaire stable (Fig. 2) (Dolgikh *et al.* 1981). Cet intermédiaire présente donc les caractéristiques de l'état « molten globule » accumulé à des concentrations modérées de GdmCl. Grâce à cette découverte l' α -LA est devenue l'objet d'études intensives des propriétés structurales des états intermédiaires, et le « molten globule » formé par l' α -LA est parmi les modèles classiques pour l'étude de ces états (Alexandrescu *et al.* 1993; Kuwajima 1996; Permyakov *et al.* 2003).

2.5 Propriétés structurales du « molten globule » de l' α -lactalbumine, stabilisé à pH2

Des mesures de viscosité intrinsèque (Dolgikh *et al.* 1985), de diffusion quasi élastique de lumière (Gast *et al.* 1998) ainsi que des expériences de diffusion de rayons X aux petits angles (Damaschun *et al.* 1986) suggèrent que l'état « molten globule » est presque aussi compact que l'état natif. Le rayon de giration pour la protéine native en présence de calcium est de 15.7 Å, tandis que dans l'état « molten globule » il est de 17.2 Å (Kataoka *et al.* 1997). Par contre, cet état de l' α -LA est très hydraté: il contient à peu près 270 molécules d'eau liées à l'intérieur de la molécule. Dans l'état natif, les 210 molécules se trouvent à la surface de la protéine. De plus la densité à l'intérieur de l'état « molten globule » est à peu près 5% moins grande et la compressibilité intrinsèque deux fois plus grande que dans l'état natif (Kharakoz & Bychkova 1997).

Par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain il a été démontré que la protéine dans l'état molten globule contient presque autant de structures secondaires que dans l'état natif (Fig. 2). La spectroscopie infrarouge montre juste une petite diminution dans le contenu en feuillets- β , compensée par la présence

de coudes (Troullier et al. 2000). De plus, les pics du spectre sont plus larges, ce qui indique que les structures secondaires sont plus flexibles, et des conformations coexistent en grand nombre. Parmi ces structures secondaires détectées par dichroïsme circulaire et infrarouge, très peu sont suffisamment stables pour avoir une protection détectable contre les échanges hydrogène/deutérium. Seule la région du site de liaison du Ca^{2+} présente une protection observable; il s'agit de l'hélice C et de quelques résidus du domaine β (Forge et al. 1999). D'après des expériences de RMN une proportion importante des interactions natives entre les chaînes latérales persiste dans ces conditions (Balbach et al. 1997). Par conséquent la topologie moyenne du « molten globule » est proche de celle de l'état natif. Cependant les raies du spectre de RMN de l'état molten globule sont plus larges que pour l'état natif, ce qui témoigne de l'existence de nombreux états conformationnels qui s'échangent entre eux à l'échelle de la milliseconde (Alexandrescu et al. 1993).

Une des caractéristiques de l'état « molten globule » qui le rend différent de l'état natif et de l'état dénaturé, est l'existence de surfaces hydrophobes accessibles au solvant. En effet les clusters hydrophobes si importants pour la stabilisation de la structure sont partiellement formés. Dans la protéine native ces clusters aromatiques hydrophobes sont enfouis à l'intérieur de la protéine et, dans l'état dénaturé, les résidus hydrophobes ne sont plus assemblés en clusters mais sont accessibles au solvant. Ainsi, il a été démontré par RMN que les chaînes latérales de Tyr103, Trp104 et Hys107 forment toujours un cluster hydrophobe quand la protéine est dans l'état molten globule, mais la structure de cette région peut être différente de celle dans l'état natif (Alexandrescu et al. 1993). L'existence de ces clusters hydrophobes partiellement accessibles confère à l'état molten globule les propriétés de lier les sondes hydrophobes. Cette propriété est considérée comme un bon témoin de la présence de cet état intermédiaire (Kuwajima et al. 1989; Semisotnov et al. 1991; Vanderheeren & Hanssens 1994).

Il a été également démontré par mutagenèse dirigée que le noyau hydrophobe formé par les hélices A, B, et 3_{10} jouent un rôle prédominant dans la stabilisation du « molten globule » (Wu & Kim 1998). La mutation d'un des résidus hydrophobes L8, I27, M30 ou W118 mène à une déstabilisation significative de cet état. L'enlèvement du domaine β par protéolyse limitée ne change pas la capacité de l' α -LA à adopter l'état « molten globule » stable à pH 2. Cela suggère que dans l'état « molten globule » seulement le domaine α est structuré (Polverino de Laureto et al. 2001). En analysant toutes les données disponibles pour le moment nous pouvons supposer que dans l'état molten globule le domaine β peut être structuré différemment de l'état natif.

2.6 Cinétique de repliement de l' α -lactalbumine

La réaction de repliement de l' α -LA a été étudiée par de nombreuses méthodes de biophysique telles que l'absorbance UV, la fluorescence intrinsèque, le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la diffusion des rayons X (Kuwajima *et al.* 1989; Forge *et al.* 1999; Troullier *et al.* 2000; Arai *et al.* 2002). Par des mesures du dichroïsme circulaire, il a été démontré que la réaction de repliement de l' α -LA de l'état complètement déplié en 6M GdmCl vers l'état natif consiste en deux étapes (Kuwajima et al. 1985; Ikeguchi et al. 1986a).

La première étape est très rapide (quelques millisecondes) et se passe pendant le temps mort des appareils de mélange rapide communément utilisés pour les expériences de repliement. Il consiste en la formation d'un intermédiaire compact avec la structure secondaire native, mais sans la structure tertiaire. D'après le signal de dichroïsme circulaire, on montre que l'intermédiaire qui se forme au cours du repliement de la forme « apo » contient déjà 85% des structures secondaires (Fig. 3) (Forge et al. 1999). Selon ces caractéristiques cet intermédiaire cinétique ressemble à l'état « molten globule » observé à l'équilibre (Kuwajima et al. 1985; Arai & Kuwajima 1996). Par diffusion des rayons X aux petits angles, il a été démontré que cet état a le même rayon de giration et la même forme que le « molten globule » (Arai et al. 2002). En plus, les spectres de la RMN de cet état sont identiques à ceux de l'état « molten globule » à l'équilibre (Balbach et al. 1996; Arai & Kuwajima 1996; Forge et al. 1999). Les structures secondaires suffisamment stables pour être protégées contre les échanges H^1/H^2 sont les mêmes dans le

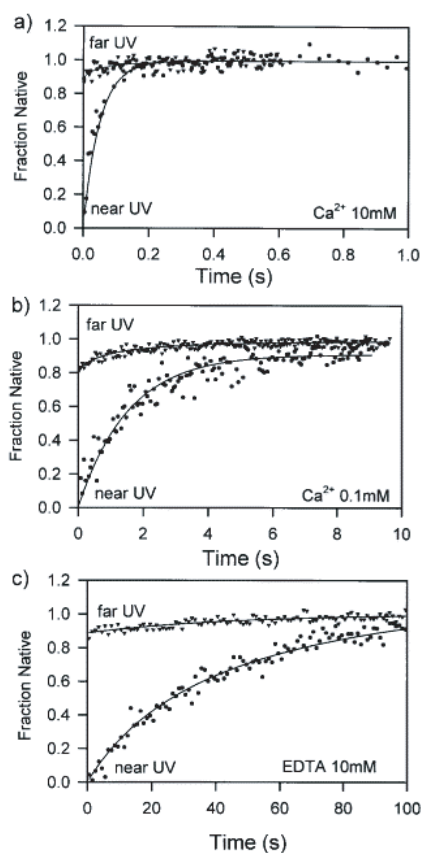


Figure 3. Cinétiques de repliement de l' α -lactalbumine suivies par dichroïsme circulaire. Les cinétiques observées dans l'UV lointain et l'UV proche sont normalisées pour faciliter leur comparaison. Pendant le temps mort de l'appareil de mélange rapide (1 msec) à peu près 85% du signal dans l'UV proche est observé, alors que le signal dans l'UV proche n'a pas encore évolué significativement. Ceci signifie que pendant la première milliseconde de réaction 85% des structures secondaires sont formées alors que la formation de la structure tertiaire n'a pas encore commencé. Ceci est la preuve de la formation de l'état molten globule dans les premières étapes du repliement. Ce schéma réactionnel n'est pas modifié par le calcium. Par contre la vitesse de formation de la structure tertiaire dépend fortement de la concentration de calcium. **a)** cinétiques obtenues en présence de 10 mM $CaCl_2$; **b)** 0.1 mM $CaCl_2$; **c)** en absence de calcium. (D'après Forge et al. 1999).

« molten globule » stabilisé à pH acide et dans celui accumulé pendant les premières millisecondes de la réaction de repliement (Fig. 3). Il s'agit surtout de l'hélice- α C qui est située dans le voisinage du site de liaison du calcium (Forge et al. 1999).

La deuxième étape du repliement de l' α -LA est lente et donc limitante pour la vitesse de la réaction. Elle consiste en la mise en place de l'organisation des structures tertiaires natives, y compris la formation du site de liaison de Ca^{2+} de haute affinité. Les vitesses de repliement et de dénaturation de l' α -LA dépendent de la concentration de Ca^{2+} présent dans la solution. Pour atteindre la vitesse maximale de repliement ($20 s^{-1}$) il est nécessaire d'ajouter 10 mM Ca^{2+} . Il est intéressant de préciser que la même quantité de Ca^{2+} est nécessaire pour la stabilisation maximale de la forme native et pour l'accélération de la liaison du Ca^{2+} sur la protéine native (Ikeguchi et al. 1986b; Noyelle & Van Dael 2002). En présence de 10 mM Ca^{2+} la vitesse de repliement est trois ordres de grandeur plus grande qu'en absence du métal: le repliement de la forme « apo » dure à peu près 200 s à 20 °C tandis que celui de la forme « holo » est fini au bout d'une seconde (Fig. 3) (Kuwajima 1989; Forge et al. 1999; Canet et al. 2001). La transition

de l'état « molten globule » vers l'état natif en présence de Ca^{2+} est très coopérative. Les contacts natifs dans la région du site de liaison de calcium sont importants pour l'accélération du repliement (Schulman et al. 1995; Wu et al. 1996; Forge et al. 1999; Troullier et al. 2000).

La mesure des cinétiques de repliement à plusieurs concentrations de Ca^{2+} a permis de déterminer les constantes de liaison de Ca^{2+} sur l'état molten globule et sur l'état de transition. Le Ca^{2+} se lie sur l'état de transition avec une haute affinité, comparable à celle de l'état natif ($3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). Cela suggère que l' α -LA dans l'état de transition possède déjà les structures nécessaires pour la liaison du Ca^{2+} . L'état « molten globule » accumulé au cours du repliement lie le Ca^{2+} avec une constante de dissociation de 10^{-3} M (Kuwajima et al. 1989) ce qui témoigne de la structuration partielle du site de liaison du métal de haute affinité à ce stade de réaction de repliement (Fig. 4).

2.7 Mise en évidence de structures non natives lors du repliement de l' α -lactalbumine

L'état « molten globule » est considéré comme un intermédiaire transitoire de repliement des protéines (Kuwajima et al. 1985; Elöve et al. 1992; Jennings & Wright 1993; Balbach et al. 1995). Cependant, son rôle éventuel dans la réaction de repliement est encore une question ouverte: aide-t-il ou retarde-

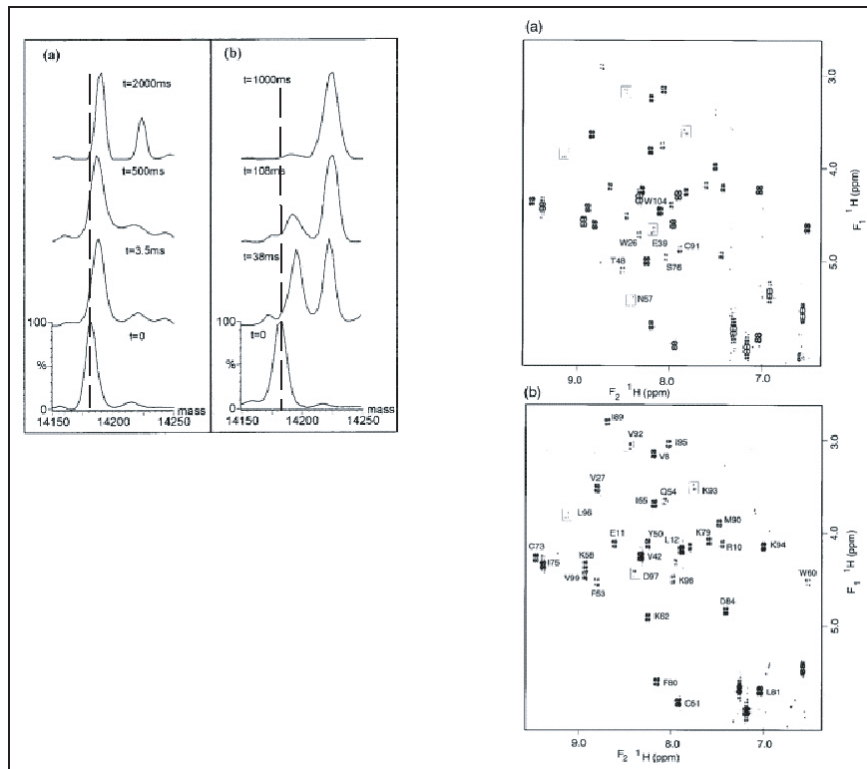


Figure 4. Caractérisation du « molten globule » détecté pendant le repliement de l' α -lactalbumine. A gauche les cinétiques de repliement des formes apo et holo sont suivies par des échanges hydrogène/deutérium associés à la spectrométrie de masse. Après les premières millisecondes de réaction une population avec une dizaine d'hydrogènes protégés contre l'échange est détectée dans les deux cas. Cette population correspond au « molten globule » cinétique. Pour des temps de réaction plus longs, cette population disparaît au profit d'une population avec une quarantaine d'hydrogènes protégés et correspondant à l'état natif. A droite les hydrogènes protégés dans le « molten globule » cinétique (haut) et dans celui stabilisé à pH acide (bas) sont détectés par RMN. Ces hydrogènes appartiennent aux mêmes acides aminés dans les deux cas. Ceci suggère que ces deux états sont fortement similaires. (D'après Forge et al. 1999).

la déstabilisation de l'état « molten globule » seule diminue la barrière d'énergie libre de repliement (Mizuguchi *et al.* 2000).

Des structures secondaires non-natives peuvent aussi être observées au cours de repliement de l' α -LA. Par spectroscopie infrarouge il a été démontré qu'au cours du repliement de la forme « apo » de l' α -LA des feuillettes β non-natifs apparaissent de manière transitoire à la place de coudes et d'hélices, puis disparaissent au cours d'une étape plus lente (Fig. 5) (Troullier *et al.* 2000). Ces structures secondaires non-natives ne sont pas détectées pendant le repliement de la forme « holo ». Ceci suggère que la liaison du Ca^{2+} stabilise localement la structure tertiaire autour du site de liaison. Ceci accélère la formation de la structure native par un effet de nucléation. De plus, les structures secondaires non-natives ne sont pas observées du fait qu'en présence de Ca^{2+} moins de conformations sont explorées (Troullier *et al.* 2000).

3. CONCLUSION

De nos jours, il est généralement accepté que pour la plupart des protéines il existe plus d'un chemin de repliement. Pour arriver à la structure native une protéine doit se diriger à travers de nombreuses routes sur une surface énergétique (entonnoir de repliement) (Dill & Chan 1997). Lorsqu'une protéine est dépliée, c'est-à-dire avec une énergie interne élevée, elle peut adopter un grand nombre de conformations très différentes, alors que dans l'état replié, c'est-à-dire avec une énergie interne basse, elle n'adopte plus qu'une conformation "unique". Il est évident que la vitesse de repliement dépend du nombre de conformations explorées pendant la réaction et de la vitesse d'échantillonnage de celles-ci. Ainsi, dans le cas de l' α -lactalbumine, la vitesse de repliement est plus lente en absence de calcium parce que plus de conformations sont explorées (comme suggéré par la formation de structures non-natives dans ces conditions). Ceci suggère que la dynamique interne de la protéine (nombre de conformations et vitesse d'échantillonnage) évolue au cours de la réaction, et que ses caractéristiques dans les intermédiaires de repliement sont importantes pour le contrôle de la vitesse de réaction. Les neutrons devraient être un outil de choix pour la caractérisation de la dynamique interne des protéines dans les différents états impliqués dans la réaction de repliement, ce qui serait une contribution importante à la compréhension de ce phénomène.

Références

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1983) "Molecular Biology of the Cell". Chapters 3,6,7. *Garland Publishing*, New York.
- Alexandrescu A.T., Evans P.A., Pitkethly M., Baum J., Dobson C.M. (1993) *Biochemistry* 32: 1707-1718.
- Anderson. P.J., Brooks C.L., Berlinger L.J. (1997) *Biochemistry*. 36: 11648-11654.
- Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1309-1314.
- Anfinsen C.B. (1973) *Science*. 181: 223-230.
- Anfinsen C.B., Scheraga H.A. (1975) *Adv. Prot. Chem.* 29: 205-300.
- Arai M., Kuwajima K. (1996) *Fold Des.* 1: 275-87.
- Arai M., Ito K., Inobe T., Nakao M., Maki K., Kamagata K., Kihara H., Amemiya Y., Kuwajima K. (2002) *J Mol Biol* 321: 121-32.
- Aune K.C., Salahuddin A., Zarlengo M.H., Tanford C. (1967) *J Biol Chem* 242: 4486-9.
- Baker D. (2000) *Nature* 405: 39-42.
- Balbach J., Forge V., van Nuland N.A., Winder S.L., Hore P.J., Dobson C.M. (1995) *Nat Struct Biol* 2: 865-70.
- Balbach J., Forge V., Lau W.S., van Nuland N.A., Brew K., Dobson C.M. (1996) *Science* 274: 1161-1163.
- Balbach J., Forge V., Lau W.S., Jones J.A., van Nuland N.A., Dobson C.M. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7182-5.
- Baldwin R.L. (1975) *Annu. Rev. Biochem* 44: 453-475.

- Baldwin R.L. (1996a) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2627-2628.
- Baldwin R.L. (1996b) *Fold Des* 1: R1-8.
- Banuelos S., Muga A. (1996a) *FEBS Lett* 386: 21-25.
- Banuelos S., Muga A. (1996b) *Biochemistry* 35: 3892-3898.
- Benhabiles N., Thomas A., Brasseur R. (2000) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 4: 71-81.
- Bychkova V.E., Pain R.H. and Ptitsyn O.B. (1988) *FEBS Lett* 238: 231-234.
- Bychkova V.E. and Ptitsyn O.B. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol* 4: 133-163.
- Brandts J.F., Hunt L. (1967) *J Am Chem Soc* 89: 4826-38.
- Brockwell D.J., Smith D.A., Radford S.E. (2000) *Curr Opin Struct Biol* 10: 16-25.
- Bryngelson J.D., Onuchic J.N., Succi N.D., Wolynes P.G. (1995) *Proteins* 21: 167-95.
- Canet D., Doering K., Dobson C.M., Dupont Y. (2001) *Biophys J* 80: 1996-2003.
- Chaffotte A.F., Cadieux C., Guillou Y., Goldberg M.E. (1992) *Biochemistry* 31: 4303-8.
- Chaudhuri D., Narayan M., Berliner L.J. (2004) *Protein J* 23: 95-101.
- Chenal A., Savarin P., Nizard P., Guillain F., Gillet D., Forge V. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 43425-43432.
- Creighton T.E. and Goldenberg D.P. (1984) *J Mol Biol* 179: 497-526.
- Creighton T.E. (1997) *Trends Biochem Sci.* 22: 6-10. Review.
- Damaschun G., Gernat Ch., Damaschun H., Bychkova V.E., and Ptitsyn O.B. (1986) *Int. J. Biol Macromol.* 8: 226-230.
- Demarest and Raleigh (2000) *Proteins* 38: 189-196.
- Demarest S.J., Hua Y., Raleigh D.P. (1999) *Biochemistry* 22: 7380-7387.
- Desmet J., Hanssens I., van Cauwelaert F. (1987) *Biochim Biophys Acta* 912: 211-9.
- Desmet J. and Van Cauwelaert F. (1988) *Biochim Biophys Acta* 957: 411-9.
- Desmet J., Van Dael H., Van Cauwelaert F., Nitta K., Sugai S. (1989) *J Inorg Biochem* 37: 185-91.
- Dill K.A. (1990) *Biochemistry* 29: 7113-7155.
- Dill K.A., Chan H.S. (1997) *Nat Struct Biol* 4: 10-19.
- Dobson C.M., Ellis R.J. (1998) *EMBO J* 17: 5251-5254.
- Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., V.E. Bychkova V.E., G.V. Semisotnov G.V., Venyaminov S.Yu., Ptitsyn O.B. (1981) *FEBS Letters* 136: 311-315.
- Dolgikh D.A., Kolomiets A.P., Bolotina I.A., Ptitsyn O.B. (1984) *FEBS Lett* 165: 88-92.
- Dolgikh D.A., Abaturon L.V., Bolotina I.A., Brazhnikov E.V., Bushuev V.N., Bychkova E.V., Gilmanshin R.I., Lebedev Y.O., Semisotnov G.V., Tiktopulo E.I., Ptitsyn O.B. (1985) *Eur. Biophys* 13: 109-121.
- Dyson H.J., Wright P.E. (1998) *Nat Struct Biol* 5: 499-503.
- Eilers M., Schatz G. (1988) *Cell* 52: 481-483.
- Eilers M., Endo T., Schatz G. (1989) *J Biol Chem* 264: 2945-50.
- Elove G.A., Chaffotte A.F., Roder H. and Goldberg M.E. (1992) *Biochemistry* 30: 6876-6883.
- Fersht A.R., Mautoushek A., Serrano L. (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 771-782.
- Fersht A.R. (1993) *FEBS Lett* 325: 5-16.
- Fersht A.R. (1995a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10869-10873.
- Fersht Alan (1999) Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, N.Y.
- Forge V., Wijesinha R.T., Balbach J., Brew K., Robinson C.V., Redfield C., Dobson C.M. (1999) *J. Mol. Biol.* 288: 673-688.
- Gast K., Muller-Frohne M., Damaschun G. (1998) *Protein Sci* 7: 2004-2011.
- Grantcharova V., Alm E.J., Baker D., Horwich A.L. (2001) *Curr. Opin. Struct Biol* 11: 70-82.
- Griko Y.V., Remeta D.P. (1999) *Protein Sci* 8: 554-561.
- Hakansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H., Svanborg C. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8064-8068.
- Harrison S., Durbin R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4028-4030.
- Hayer-Hartl M.K., Ewbank J.J., Creighton T.E., Hartl F.U. (1994) *EMBO J* 13: 3192-3202.
- Hendrix T., Griko Y.V., Privalov P.L. (2000) *Biophys Chem* 84: 27-34.

- Henning M., Bermel W., Spencer A., Dobson C.M., Smith L.J., Schwalbe H. (1999) *J Mol Biol* 288: 705-723.
- Hill R.L., Brew K. (1975) *Adv. Enzymol. Rel Areas Mol. Biol* 43: 411-489.
- Horwich A.L., Weber-Ban E.U., Finley D. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11033-11040.
- Ikeguchi M., Kuwajima K., Mitani M., Sugai S. (1986a) *Biochemistry* 25: 6965-6972.
- Ikeguchi M., Kuwajima K., Sugai S. (1986b) *J. Biochem* 99: 1191-1201.
- Jagannadham M.V., Balasubramanian D. (1985) *FEBS Lett* 188: 326-30.
- Jennings P.A., Wright P.E. (1993) *Science* 262: 892-896.
- Karplus M., Weaver D.L. (1976) *Nature* 260: 404-406.
- Karplus M., Weaver D.L. (1994) *Protein Sci* 3: 650-668.
- Kataoka M., Kuwajima K., Tokunaga F., Goto Y. (1997) *Protein. Sci* 6: 422-430.
- Kauzmann W. (1959) *Adv. Prot. Chem* 14: 1-64.
- Kendrew J.C. (1959) *Fed Proc* 18: 740-51.
- Kharakoz D.P., Bychkova V.E. (1997) *Biochemistry* 36: 1882-1890.
- Kiefhaber T., Schmid F.X., Willaert K., Engelborghs Y., Chaffotte A. (1992) *Protein Sci* 1: 1162-1172.
- Kiefhaber T. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97: 9029-9033.
- Kim P.S., Baldwin R.L. (1982) *Annu. Rev. Biochem* 51: 459-489.
- Kim P.S., Baldwin R.L. (1990) *Annu Rev Biochem* 59: 631-60.
- Kohler C., Gogvadze V., Hakansson A., Svanborg C., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2001) *Eur J Biochem* 268: 186-91.
- Koo M.W. (1994) *Pharmacol Res* 29: 217-224.
- Kuwajima K., Nitta K., Yoneyama M., Sugai S. (1976) *J. Mol. Biol* 106: 359-373.
- Kuwajima K., Hiraoka Y., Ikeguchi M., Sugai S. (1985) *Biochemistry* 24: 874-81.
- Kuwajima K., Mitani M., Sugai S. (1989) *J. Mol. Biol* 206: 547-561.
- Kuwajima K. (1996) *FASEB J.* 10: 102-109.
- Kuznetsova I.M., Khaitlina S.Yu., Konditerov S.N., Surin A.M., Turoverov K.K. (1988) *Biophys. Chem* 32: 73-78.
- Lala A.K., Kaul P., Ratnam P.B. (1995) *J Protein Chem* 14: 601-609.
- Levintal C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* 65: 44-45.
- Martin J., Horwich A.L., Hartl F.-U. (1992) *Science* 258: 995-998.
- Martin J., Langer T., Boteva R., Schramel A., Horwich A.L., Hartl F.-U. (1991) *Nature* 352: 36-42.
- Matouschek A., Serrano L., Fersht A.R. (1992) *J Mol Biol* 224: 819-835.
- Matouschek A., Fersht A.R. (1993) *PNAS* 90: 7814-7818.
- Matsumoto H., Shimokawa Y., Ushida Y., Toida T., Hayasawa H. (2001) *Biosci Biotech Biochem* 65:1104-11.
- Mayor U., Johnson C.M., Daggett V., Fersht A.R. (2000) *PNAS* 97: 13518-13522.
- Missiakas D., Betton J.M., Chaffotte A., Minard P., Yon J.M. (1992) *Protein Sci* 1: 1485-93.
- Mizuguchi M., Masaki K., Demura M., Nitta K. (2000) *J Mol Biol.* 298: 985-95.
- Morozova L.A., Haynie D.T., Arico-Muended C., Van Dael H., Dobson C.M. (1995) *Nat Struct Biol* 2: 871-875.
- Murakami K., Andree P.J., Berliner L.J. (1982) *Biochemistry* 21: 5488-94.
- Nitta K. and Sugai S. (1989) *Eur. J. Biochem* 182: 111-118.
- Nolting B., Golbik R., Fersht A.R. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10668-10672.
- Nölting B. (1999) Protein folding kinetics. Biophysical methods.
- Nozaka M., Kuwajima K., Nitta K., Sugai S. (1978) *Biochemistry* 17: 3753-3758.
- Oas T.G., Kim P.S. (1988) *Nature* 336: 42-48.
- Ohgushi M., Wada A. (1983) *FEBS Lett* 164: 21-24.
- Onuchic J.N., Luthey-Schulten Z., Wolynes P.G. (1997) *Annu Rev Phys Chem* 48: 545-600.
- Permyakov E.A., Kalinichenko L.P., Morozova L.A., Yarmolenko V.V., Burstein E.A. (1981) *Biochem Biophys Res Commun* 102: 1-7.

- Permyakov E.A., Morozova L.A., Burstein E.A. (1985) *Biophys Chem* 21: 21-31.
- Permyakov E.A., Permyakov S.E., Berliner L.J. (2003) *Protein structures: Kaleidoscope of Structural properties and Functions*. 475-497.
- Perutz M.F. (1960) *Brookhaven Symp Biol* 13: 165-83.
- Pauling L., Corey R.B. (1951) *Proc Natl Acad Sci USA* 37: 251-256.
- Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. (1951) *Proc Natl Acad Sci USA* 37: 205-211.
- Plaxco K.W., Dobson C.M. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol* 6: 630-636.
- Plaxco K.W., Gross M. (1997) *Nature* 386: 657-659.
- Plaxco K.W., Simons K.T., Baker D. (1998) *J Mol Biol* 277: 985-94.
- Polverino de Lauroto P., Vinante D., Scaramella E., Frare E., Fontana A. (2001) *Eur J Biochem* 268: 4324-33.
- Ptitsyn O.B., Rashin A.A. (1973) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 213: 473-475.
- Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E., Razgulyaev O.I. (1990) *FEBS Lett* 262: 20-24.
- Ptitsyn O.B. (1991) *FEBS Lett* 285: 176-81.
- Ptitsyn O.B. (1995) *Adv Protein Chem* 47: 83-229.
- Radford S.E. (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 611-8.
- Röder H., Shastry M.C.R. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 620-626.
- Sanger F. (1952) *Adv Protein Chem* 7: 1-67.
- Schmid F.X. (1993) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22: 123-42.
- Schulman B.A., Redfield C., Peng Z.Y., Dobson C.M., Kim P.S. (1995) *J Mol Biol* 253: 651-657.
- Schultz C.P. (2000) *Nat Struct Biol* 7: 7-10.
- Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Kutysenko V.P., Ebert B., Blanck J., Ptitsyn O.B. (1987) *FEBS Lett.* 224: 9-13.
- Semisotnov G.V., Vas M., Chemeris V.V., Kashparova N.J., Kotova N.V., Razgulyaev O.I., Sinev M.A. (1991) *Eur J Biochem* 202: 1083-1089.
- Shortle D. (1996) *FASEB J* 10: 27-34.
- Socci N.D., Onuchic J.N., Wolynes P.G. (1998) *Proteins* 32: 136-58.
- Sosnick T.R., Mayne L., Hiller R. and Englander S.W. (1994) *Nat. Struct. Biol* 1: 149-156.
- Svensson M., Hakansson A., Mossberg A.K., Linse S., Svanborg C. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4221-4226.
- Svensson M., Sabharwal H., Hakansson A., Mossberg A.K., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C., Linse S. (1999) *J. Biol. Chem* 274: 6388-6396.
- Troullier A., Reinstadler D., Dupont Y., Naumann D., Forge V. (2000) *Nat Struct Biol* 7: 78-86.
- Turoverov K.K., Biktashev A.G., Khaitlina S.Yu., Kuznetsova I.M. (1999) *Biochemistry* 38: 6261-6269.
- Vanderheeren G., Hanssens I. (1994) *J Biol Chem* 269: 7090-7094.
- Van der Vies S.M., Vitanen P.V., Gatenby A.A., Lorimer G.H., Jaenicke R. (1992) *Biochemistry* 31: 3635-3644.
- Vidugiris G.J., Royer C.A. (1998) *Biophys J* 75: 463-70.
- Vita C., Fontana A., Jaenicke R. (1989) *Eur J Biochem* 183: 513-8.
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953) *Nature* 171: 737-738.
- Weissman J.S., Kim P.S. (1991) *Science* 253: 1386-1393.
- Wetlaufer D. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 697-701.
- Wijesinha-Bettoni R., Dobson C.M., Redfield C. (2001) *J. Mol. Biol* 307: 885-898.
- Wolynes P.G., Onuchic J.N., Thirumalai D. (1995) *Science* 267:1619-20.
- Wu L.C., Schulman B.A., Peng Z.Y., Kim P.S. (1996) *Biochemistry* 35: 859-63.
- Wu L.C., Kim P.S. (1998) *J Mol Biol* 280:175-82.
- Yon J.M. (1996) Protein aggregation. In Meyers R.A. (ed). *Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine* V Weinheim VCH., Germany, 73-93.