

Aperçu des techniques d'analyse conformationnelle des macromolécules biologiques

Magali Deleu ⁽¹⁾, Bernard Wathelet ⁽¹⁾, Robert Brasseur ⁽²⁾, Michel Paquot ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unité de Chimie biologique industrielle. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. E-mail: deleu.m@fsagx.ac.be

⁽²⁾ Centre de Biophysique moléculaire numérique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 7 août 1998, accepté le 8 septembre 1998.

Cet article présente une synthèse des différentes méthodes d'analyse conformationnelle des macromolécules biologiques couramment citées dans la littérature. Le principe général ainsi que les limitations et les avantages de différentes techniques expérimentales sont exposés. Ces techniques ne doivent pas être considérées comme concurrentes mais bien comme complémentaires. Pour terminer, un chapitre est consacré à la présentation d'un outil théorique, la modélisation moléculaire. **Mots-clés.** Article de synthèse, conformation, macromolécules, techniques d'analyse.

Outline of conformational analysis techniques of the biological macromolecules. This paper presents a synthesis of the various methods of conformational analysis of biological macromolecules usually quoted in the literature. The general principles as well as the limitations and advantages of various experimental techniques are exposed. These techniques should not be regarded as competitors but as complementary. To finish, a chapter is devoted to the presentation of a theoretical tool, the molecular modeling.

Keywords. Review article, conformation, macromolecules, techniques of analysis.

INTRODUCTION

Les organismes vivants sont constitués essentiellement de macromolécules formées de longues chaînes d'atomes qui adoptent, en se repliant, une structure spatiale bien définie. La fonction biologique de chaque macromolécule est étroitement liée à sa structure, d'où l'intérêt de déterminer celle-ci. Depuis les années 50, l'importance des relations structure-fonction a largement encouragé le développement de méthodes de détermination de structures moléculaires (Fourme, Janin, 1990).

Il existe trois grandes familles de biopolymères : les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides.

Cet article consiste en un aperçu général des différentes méthodes d'analyse conformationnelle citées couramment dans la littérature et qui ont essentiellement été appliquées aux protéines. Le but, ici, n'est pas d'entrer dans les détails des fondements des différentes méthodes mais d'en esquisser les principes généraux afin de mieux comprendre ce qui fait leurs limitations et avantages respectifs.

LACRISTALLOGRAPHIE PAR RAYONS X (RX)

L'étude de monocristaux par diffraction des rayons X est à l'heure actuelle l'une des techniques principales de détermination expérimentale de la structure tridi-

mensionnelle (3D) de macromolécules biologiques. Elle fournit une information à haute résolution, détaillée au niveau atomique.

Les RX sont utilisés parce que leur longueur d'onde est de l'ordre de la distance entre les atomes, c'est-à-dire environ 0,1 nm. Mais il existe deux obstacles à la réalisation d'un microscope à RX. D'une part, comme la réémission du rayonnement X par une seule molécule est très faible, les temps d'exposition seraient extrêmement longs et la molécule serait détruite par l'irradiation bien avant de donner une image de qualité acceptable. D'autre part, l'équivalent des lentilles d'un microscope, c'est-à-dire un dispositif produisant une image de l'objet étudié, commence seulement à se développer (Bloomer, 1994). Pour contourner la première difficulté, on travaille sur un ensemble de quelque 10^{15} molécules identiques arrangées de manière périodique selon trois directions de l'espace : un tel objet est un cristal. L'intensité diffusée est ainsi bien plus facile à détecter que pour une molécule unique et les effets de dégradation se partageant entre toutes les molécules du cristal sont donc réduits (Fourme, Janin, 1990).

En diffraction des RX, l'expérience de base consiste à placer un monocristal dans un faisceau de RX et à enregistrer les intensités des ondes diffractées par les électrons entourant les atomes (**Figure 1**). L'ensemble de ces mesures constitue les données brutes

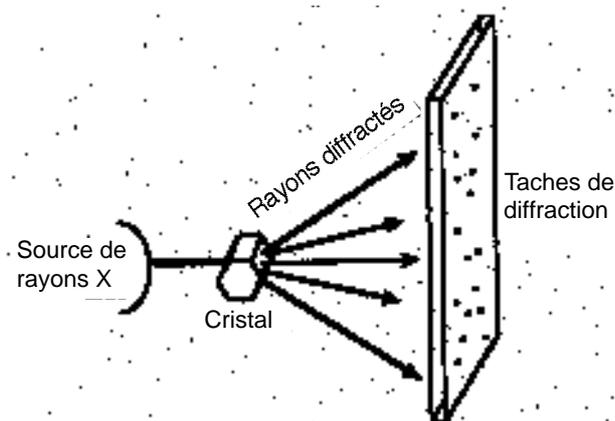


Figure 1. Schéma du principe de la cristallographie par rayons X — *Diagram of the principle of crystallography by X-rays.*

à partir desquelles le cristallographe peut déterminer la structure de la macromolécule (Ducruix *et al.*, 1994).

La première étape de la diffraction par RX est donc la cristallogenèse, c'est-à-dire la production de cristaux de bonne qualité et de taille suffisante. Les trois étapes essentielles de la cristallisation d'une molécule sont : la solubilisation, la nucléation et la croissance cristalline. Chacune des étapes est primordiale et doit être réalisée avec soin.

Une fois qu'un cristal adéquat est obtenu, il est placé dans un faisceau de RX. Certaines ondes diffractées par toutes les molécules vont s'additionner, et former ce qu'on appelle des "interférences constructives" ; sinon, il y a annihilation mutuelle de ces ondes ou "interférence destructive". L'impact de chaque faisceau diffracté sur un détecteur, par exemple un film radiographique, produit une "tache de diffraction" ou "tache de Bragg" dont l'ensemble forme un diagramme de diffraction. C'est à partir de ces taches que la structure du cristal et celle de ses molécules sont déduites.

L'information contenue dans chaque faisceau diffracté peut se caractériser par l'amplitude et la phase de l'onde diffractée. L'amplitude de l'onde diffusée par chaque point d'un objet est proportionnelle à la densité électronique au voisinage de ce point. La phase de l'onde, elle, dépend de la position du point dans l'objet. La relation existant entre la répartition des électrons dans l'objet et l'amplitude et la phase de l'onde diffusée est appelée "transformation de Fourier". La relation inverse, "la synthèse de Fourier", permet de calculer la densité électronique du cristal à partir des caractéristiques de la lumière diffusée. Les coefficients de cette relation sont appelés "facteurs de structure". Ils se calculent à partir de l'amplitude des rayons diffractés, déduites des mesures d'intensité, mais également de leur phase, qui n'est expérimentalement pas mesurable (Bloomer, 1994 ; Duée, Dideberg, 1997).

Pour résoudre le problème des phases, il existe plusieurs méthodes souvent utilisées en parallèle. La plus utilisée, due à Max Perutz, consiste à "marquer" chaque molécule de protéine dans le cristal par des atomes lourds. Les phases peuvent être estimées en comparant les intensités des taches de diffraction du cristal "natif" et d'au moins deux cristaux "dérivés". Une variante de cette méthode n'exige qu'un seul cristal dont la diffraction est mesurée à trois longueurs d'onde différentes mais nécessite généralement d'utiliser un rayonnement synchrotron dont la longueur d'onde est parfaitement ajustable (Fourme, Janin, 1990 ; Duée, Dideberg, 1997). Le remplacement moléculaire, impliquant de connaître la structure d'une molécule homologue à celle que l'on étudie (ou un modèle précis de celle-ci), est une autre alternative au problème de résolution des phases. Enfin, il existe les méthodes dites directes de détermination des phases qui sont d'application courante en cristallographie des petites molécules (Bloomer, 1994 ; Duée, Dideberg, 1997).

La première ébauche de la structure, tracée à partir de la carte de densité électronique, contient inévitablement des erreurs et doit être affinée (Callebaut, 1993). L'affinement est une procédure de calcul qui optimise l'accord entre les intensités des taches mesurées, qui sont des données expérimentales, et les valeurs qu'on peut recalculer à partir du modèle. Le processus, qui est toujours répété plusieurs fois, est très exigeant en temps de calcul, puisqu'à chaque cycle, on minimise une fonction de plusieurs milliers de variables.

Au total, l'étude d'une protéine nouvelle demande un an de travail, et souvent bien plus, à une équipe de spécialistes ... et elle n'aboutit pas toujours. L'augmentation rapide de la puissance de calcul des ordinateurs, l'avènement des sources de rayonnement synchrotron permettant de réduire le temps d'exposition à quelques secondes au lieu de plusieurs heures ou quelques jours, et la mise au point de détecteurs plus sensibles ont considérablement réduit ce temps de travail et rendent la méthode moins rébarbative (Fourme, Janin, 1990 ; Duée, Dideberg, 1997).

Actuellement, les banques de données RX recueillent près de 7000 structures (Anonyme, 1998).

Depuis quelques années, la cristallogenèse s'est penchée sur la cristallisation des protéines membranaires (Garavito, Rosenbusch, 1980). La difficulté majeure de la cristallisation de celles-ci provient de leur propriété particulière de solubilité (assurée *in vivo* par les lipides de la membrane), ce qui nécessite le remplacement des lipides par un détergent pour leur cristallisation. L'étude de la structure de ces protéines particulières par cristallographie RX reste donc délicate à ce jour.

L'étude structurale par radiocristallographie de polysaccharides est encore très peu répandue à cause de la cristallisation délicate de ces molécules. De plus, les quelques exemples cités dans la littérature soulignent la nécessité d'utiliser des techniques de modélisation moléculaire pour déterminer la structure complète (Chandrasekaran *et al.*, 1994 ; Yui *et al.*, 1995).

Les progrès dans la synthèse, la purification et la cristallisation de l'ARN rendent possible depuis peu la détermination de la structure de ces molécules par diffraction de RX (Lietzke *et al.*, 1995).

La cristallographie par RX ne permet pas encore d'accéder à des informations de dynamique moléculaire précises bien qu'elle commence à y parvenir avec la percée des techniques de "cristallographie à résolution temporelle" (*time-resolved crystallography*) qui ont pu se développer grâce à l'emploi de rayonnements synchrotrons particulièrement intenses et de détecteurs très sensibles, et à l'utilisation des méthodes de Laue (Wouters, 1995).

Il faut savoir également que les RX sont adaptés aux études en solution mais ne permettent pas d'atteindre la résolution obtenue par la cristallographie par RX (Zaccai, 1991). La diffraction de RX synchrotrons a également été appliquée à l'étude de films amphiphiles, directement à l'interface air/eau (Kjaer *et al.*, 1987).

LA SPECTROSCOPIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)

La RMN est, aujourd'hui, l'une des deux principales méthodes, avec la radiocristallographie, permettant de déterminer des structures 3D de protéines à une résolution atomique.

Les noyaux d'atomes comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P possèdent un moment magnétique nucléaire caractérisé par une grandeur quantique : le spin. La RMN étudie les propriétés de ces noyaux, propriétés qui sont directement influencées par leur environnement. Elle procure essentiellement des informations sur les distances interatomiques dans une molécule. Ces informations peuvent être utilisées pour en déduire un modèle de structure 3D.

En pratique, quand les molécules sont placées dans un champ magnétique puissant (B_0), les spins s'alignent parallèlement ou anti-parallèlement à la direction du champ (**Figure 2**). L'excès de spins orientés parallèlement au champ magnétique entraîne l'apparition d'une aimantation macroscopique alignée sur B_0 . Cet alignement peut être perturbé en appliquant une impulsion de radiofréquence (RF). À la fin de l'impulsion, les noyaux reviennent à leur état d'équilibre sous l'effet d'un mécanisme de relaxation, en effectuant un mouvement de précession autour de l'axe du champ magnétique à la fréquence de résonance.

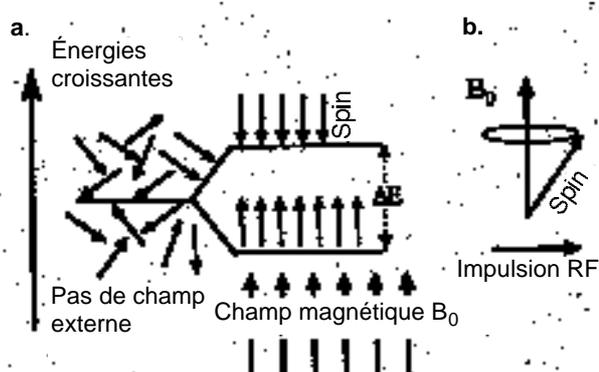


Figure 2. Principe de la résonance magnétique nucléaire. **a.** Orientation des spins dans la direction du champ magnétique (B_0). **b.** Perturbation due à une impulsion de radiofréquence (RF) — *Principle of the nuclear magnetic resonance. a.* Orientation of spins in the direction of the magnetic field (B_0). **b.** Perturbation due to the radio-frequency impulse (RF).

Dans une molécule, les nuages électroniques situés au voisinage de chaque noyau contribuent à modifier son environnement magnétique et donc la fréquence de résonance de son aimantation. Un signal de précession libre (FID pour *Free Induction Decay*), détecté immédiatement après impulsion durant le temps d'acquisition t_2 , est constitué d'une superposition de sinusoïdes amorties dont la transformée de Fourier fournit le spectre de la molécule. Les fréquences de résonance observées dépendent donc de l'environnement des noyaux et sont différentes pour chacun des atomes (à moins que les atomes ne soient chimiquement équivalents et aient le même environnement). Elles sont exprimées par rapport à un signal de référence et appelées déplacements chimiques (en parties par million, ppm) (Girault, 1990 ; Martin, Waltho, 1994).

Le développement de la RMN à deux dimensions (RMN 2D), permettant d'augmenter la résolution spectrale mais également de détecter et d'interpréter des effets non traitables en une dimension, a élargi le champ d'investigation de la RMN à l'étude de la structure de macromolécules. Les deux "dimensions" de la RMN 2D proviennent de deux intervalles de temps t_1 et t_2 . Une expérience de RMN 2D consiste en une série d'expériences de RMN à une dimension dans lesquelles le temps d'"évolution" t_1 est incrémenté et le FID de chaque expérience enregistré durant l'intervalle de temps t_2 (temps de détection). Un intervalle de temps supplémentaire, (temps de "mélange"), est souvent ajouté entre t_1 et t_2 afin de permettre les transferts d'information entre spins couplés. Le spectre bidimensionnel est alors obtenu *via* une double transformée de Fourier. Les pics diagonaux de tels spectres représentent les déplacements chimiques du spectre à une dimension. Les pics en dehors de cette

diagonale (pics croisés) résultent d'interactions entre atomes (Marion, 1990) (**Figure 3**). En variant la nature des pulsations RF, ces pics révèlent différents types d'interactions. Ainsi, l'expérience de type COSY (*CORrelation SpectroscopY*) permet de mettre en évidence l'existence de couplages scalaires (à travers la structure covalente) et donc d'établir le voisinage chimique (la plupart du temps, jusqu'à trois liaisons chimiques et à l'intérieur d'un même acide aminé). L'expérience de type NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY*) permet de révéler les interactions dipolaires entre deux spins isolés et ainsi d'établir le voisinage dans l'espace (jusqu'à 0,5 nm). Ce type d'interaction peut s'effectuer entre atomes distants dans la structure primaire. L'interprétation des données fournies par le spectre NOESY conduit à l'identification de la structure secondaire (Wüthrich, 1989). Pour déterminer la structure tertiaire complète de la protéine, les contraintes de distance NOE et de torsion doivent être converties en coordonnées atomiques au moyen, classiquement, de la méthode de géométrie des distances (*distance geometry*) (Bonmatin *et al.*, 1994). Ensuite, une étape d'affinement est appliquée

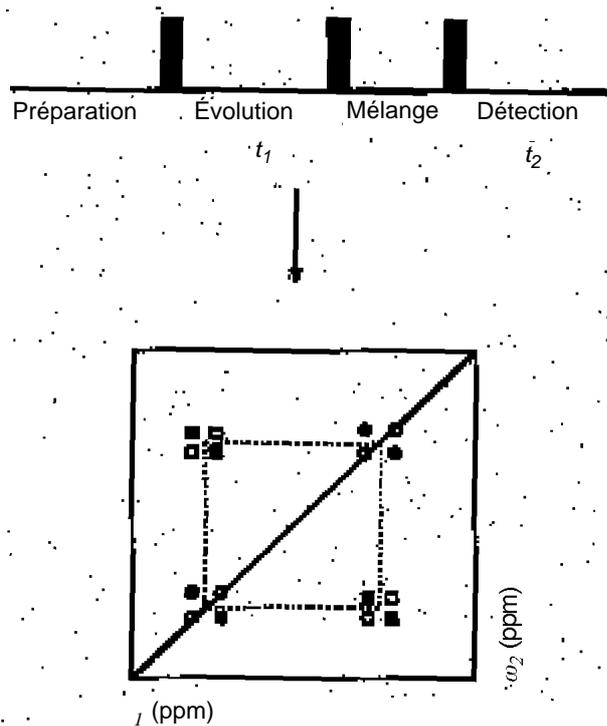


Figure 3. Schéma général d'une expérience de RMN 2D.

ω_1, ω_2 : déplacement chimique (en parties par million).
Formule générale : $\nu = (\nu_{\text{éch}} - \nu_{\text{réf}}) / \nu_{\text{réf}}$ avec $\nu_{\text{éch}}$: fréquence d'un signal de l'échantillon, $\nu_{\text{réf}}$: fréquence d'un signal de référence — *General diagram of a 2D-NMR experiment.*

ω_1, ω_2 : chemical displacement (in part by million) *General formula :* $\nu = (\nu_{\text{éch}} - \nu_{\text{réf}}) / \nu_{\text{réf}}$, with $\nu_{\text{éch}}$: frequency of sample signal, $\nu_{\text{réf}}$: frequency of reference signal.

en procédant à une minimisation énergétique puis à une optimisation basée sur une simulation de la dynamique interne de la molécule compatible avec les contraintes expérimentales (Ptak, Vovelle, 1994). D'autres méthodes sont également appliquées (Clare, Gronenborn, 1987 ; Nilges, 1996). La structure tertiaire obtenue à cette étape est encore raffinée par une procédure de va-et-vient permanent entre expériences et calculs (Ptak, Vovelle, 1994). À l'issue de la modélisation, on obtient non pas une seule structure mais une famille de structures, toutes compatibles avec les données expérimentales.

La RMN 2D est applicable à des molécules dont la taille ne dépasse pas 15–20 kDa.

La RMN vient utilement compléter les données structurales jusqu'à présent fournies par les techniques de diffraction de RX mais ouvre également la voie à de nouvelles études. En effet, elle permet de rendre compte, dans certains cas, des mouvements intramoléculaires dans une molécule, des interactions de ces biomolécules avec leur environnement biologique (milieu aqueux, ions, micelles, etc.) ou avec d'autres molécules (Kay *et al.*, 1989 ; Lepre *et al.*, 1993). La RMN est également une technique utilisée pour tenter de suivre le repliement des protéines (Yon-Khan, 1993).

Si la RMN ne présente pas de problème de cristallisation, étape limitante pour la cristallographie par RX, elle impose des conditions très sévères de solubilité et de stabilité des molécules à étudier. En effet, la mobilité des molécules est un élément déterminant de la qualité des spectres RMN puisque la précision sur les NOE (largeur des pics) est d'autant meilleure que la molécule "tourne" vite. Ce facteur de mobilité est une des causes de la limitation de la RMN quant à la taille des molécules étudiées (Martin, Waltho, 1994). Ces limitations de taille de molécule sont repoussées par l'avènement de la RMN à trois et quatre dimensions (Clare, Gronenborn, 1991), l'utilisation d'autres isotopes et le développement d'appareillages plus performants (Ptak, Vovelle, 1994).

La RMN comme la cristallographie RX requièrent une quantité appréciable d'échantillon à analyser (dizaine de mg/ml de protéine très pure). En effet, compte tenu de la faible sensibilité de la méthode, la RMN nécessite des solutions très concentrées (Ptak, Vovelle, 1994).

À ce jour, la RMN classique, de même que la radiocristallographie, ne permet pas d'étudier des protéines incluses dans des membranes, par suite d'un élargissement prohibitif¹ des raies de résonance (Ptak, Vovelle, 1994). Toutefois, s'est développée très récemment une nouvelle technique RMN, la "high-speed

¹ En effet, le poids moléculaire élevé de l'ensemble limite la mobilité de la molécule et par conséquent la précision (qui se traduit par la largeur des pics de résonance) de la mesure.

magic angle spinning multidimensional ^1H NMR”, qui permet de détourner ce problème et ainsi, d’étudier la structure des protéines transmembranaires *in situ* (Davis *et al.*, 1995 ; Le Guernevé, Seigneuret, 1996).

La RMN, comme la diffraction des RX, est performante pour l’étude de diverses macromolécules comme les protéines, les ADN, les ARN (Pappalardo *et al.*, 1998), bien que lorsqu’il s’agit d’ADN, la RMN ne permet pas d’accéder à une structure suffisamment résolue pour expliquer les variations locales de structure (Marion, 1990).

En ce qui concerne l’étude des propriétés structurales et dynamiques des oligosaccharides, la RMN est d’une plus grande utilité que la cristallographie RX vu la difficulté à cristalliser ces molécules. Mais la RMN, à elle seule, ne suffit pas pour définir sans ambiguïté les propriétés structurales et dynamiques des oligosaccharides à cause de la nature flexible de ces molécules et la difficulté à obtenir des oligosaccharides marqués isotopiquement. Elle requiert l’aide de méthodes computationnelles (méthode Monte Carlo ou simulation de dynamique moléculaire) (Peters, Pinto, 1996 ; Woods, 1995).

Récemment, une autre technique apparentée à la RMN, la RMN ^{19}F , s’est montrée intéressante pour l’étude de la dynamique et de la structure de protéines trop grosses ou instables pour une détermination structurale complète par RMN classique (Danielson, Falke, 1996).

LA SPECTROMÉTRIE NEUTRONIQUE

Moins connue que la diffraction des rayons X, la spectrométrie neutronique est une technique qui a permis de résoudre de nombreux problèmes biologiques, allant de la structure du ribosome ou de la bactériorhodopsine (Popot *et al.*, 1989) aux mouvements de la myoglobine (Cusack, Doster, 1990). Les faisceaux de neutrons permettent, en principe, les mêmes types d’expériences que les RX et les électrons. La spectrométrie neutronique est d’ailleurs basée sur le même principe que la diffraction des RX et, comme elle, ne dispose pas encore de lentille pour obtenir directement l’image de l’objet (Baldwin *et al.*, 1994).

Elle présente de nombreux avantages vis-à-vis de la diffraction des RX. Les faisceaux de neutrons forment un rayonnement doux tout à fait adapté à l’étude de la matière vivante alors que les RX détruisent rapidement les molécules biologiques. Les neutrons sont diffusés par les noyaux des atomes tandis que les RX sont diffusés par les électrons. Ils permettent donc de différencier les isotopes d’un même élément. Un autre avantage important de la spectrométrie neutronique est la possibilité d’études expérimentales de la dynamique moléculaire de systèmes biologiques. Les neutrons peuvent apporter

des informations utiles au niveau de la picoseconde, période des mouvements thermiques des molécules.

Actuellement, l’étude structurale de cristaux de protéine se pratique plus couramment par diffraction de RX que par spectrométrie neutronique. Cette dernière présente toutefois l’avantage de permettre l’analyse des atomes d’hydrogène à condition de disposer de cristaux de taille linéaire environ dix fois plus gros que pour les RX. Cela permet par exemple de déceler la protonation du site actif d’une enzyme et d’ainsi mieux comprendre son mécanisme d’action. La spectrométrie neutronique est également utilisée pour étudier la structure de l’eau autour des molécules. Elle a permis notamment de localiser les molécules d’eau qui stabilisent les différentes formes d’hélices de l’ADN (Forsyth, 1989). Elle est aussi adaptée aux études en solution mais est souvent mise en cause car la résolution est plus faible que celle obtenue avec des cristaux. Dans ce cas, elle pourrait, dès lors, être utilisée comme outil complémentaire à la RMN en solution ou à la cristallographie RX ; l’une des deux dernières permettrait de déterminer la structure interne de domaines protéiques et leur arrangement mutuel serait ensuite obtenu par l’expérience de diffusion de neutrons en solution. Les études aux neutrons sont également très performantes pour caractériser les interactions ADN-protéine ou ARNt-protéine en solution (Timmins, Zaccai, 1988). Il est aussi utile de signaler que des protéines membranaires cristallisées en présence d’un détergent ont déjà fait l’objet d’études par spectrométrie neutronique (Roth *et al.*, 1989).

Comme la RMN et la diffraction des RX, elle nécessite des quantités de matériel biochimique pur importantes.

La spectrométrie neutronique doit disposer de gros équipements et, notamment, d’un réacteur nucléaire, ce qui peut expliquer son utilisation peu répandue.

De cette technique, il faut retenir qu’elle fait partie des rares méthodes qui permettent la confrontation entre l’expérience et les différentes approches du calcul théorique de la dynamique moléculaire.

LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE À RÉOLUTION TEMPORELLE

La spectroscopie de fluorescence à résolution temporelle est une technique prometteuse pour l’élucidation de la structure et de la cinétique de macromolécules biologiques, et spécialement des protéines et acides nucléiques.

La technique permet de suivre les changements dynamiques se produisant dans l’environnement d’un fluorophore par mesure de ses propriétés d’émission et peut également être exploitée pour caractériser les

mouvements de segments moléculaires ou d'ensemble de la molécule. Elle présente une sensibilité de détection élevée et les conditions d'analyse en solution peuvent être modifiées au gré de l'utilisateur.

Cette technique est utile et avantageuse lorsque la molécule comporte un fluorophore intrinsèque (un résidu tryptophane ou tyrosyl dans la plupart des cas) et que les concentrations à étudier sont trop faibles pour donner des spectres RMN ou de dichroïsme circulaire valables.

Les progrès techniques au niveau des sources lumineuses et des systèmes de détection rendent possible des mesures dans la région de la picoseconde. De plus, grâce à l'essor considérable des techniques de biologie moléculaire, il est possible de limiter le nombre de fluorophores intrinsèques et, ainsi, simplifier l'interprétation des résultats ou, au contraire, d'introduire des fluorophores à des sites spécifiques de la molécule.

Il existe deux types de mesures qui peuvent être effectuées par des techniques spectroscopiques de fluorescence à résolution temporelle.

Le premier consiste en la mesure de la réduction de l'intensité de la fluorescence totale suite à une excitation pulsée (ou modulée). Il est utilisé pour déterminer le temps de vie de la fluorescence d'un fluorophore qui est fortement influencé par de nombreux événements dynamiques comme les fluctuations dans la conformation macromoléculaire, la rotation des chaînes latérales, l'interaction avec des résidus voisins. Le temps de vie de la fluorescence d'un fluorophore est donc fortement dépendant de son environnement local et peut varier de quelques picosecondes à des dizaines de nanosecondes (Millar, 1996a).

Le second type d'expérience consiste en la mesure de la réduction de l'anisotropie de polarisation² et est utilisé pour caractériser les mouvements moléculaires. La réduction de l'anisotropie permet de contrôler la réorientation du dipôle d'émission pendant le temps de vie de l'état excité et peut être attribuée au mouvement d'un fluorophore local, à la mobilité d'un segment ou à la rotation de la macromolécule entière. La réduction de l'anisotropie peut donc fournir des données hydrodynamiques qui décrivent la diffusion rotationnelle d'une protéine ou d'un acide nucléique. Une application plus exaltante de la technique est son utilisation dans le contrôle en temps réel de la dynamique interne de macromolécules biologiques (Millar, 1996a).

La spectroscopie de fluorescence à résolution temporelle a déjà été appliquée à l'étude structurale et dynamique de plusieurs protéines (Buckler *et al.*, 1995 ; Jones *et al.*, 1995 ; Rischel *et al.*, 1996 ; Lam *et al.*, 1998) et à celle de l'ADN et de l'ARN (Millar, 1996b ;

Georghiou *et al.*, 1996). Elle a un avenir prometteur dans l'étude des interactions ADN-protéine (Millar, 1996b). Elle a déjà été utilisée dans l'étude de l'interaction protéine-phospholipide (Hammen *et al.*, 1994).

LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN RÉFLEXION TOTALE ATTÉNUÉE (IR-ATR)

Alors que la spectroscopie infrarouge est largement utilisée en chimie, son application à la détermination de la structure des molécules biologiques en est encore à ses débuts. C'est en 1986 que cette approche a été proposée pour la première fois comme alternative avantageuse à la détermination classique (dichroïsme circulaire) des structures secondaires des protéines (Byler, Susi, 1986).

Le rayonnement infrarouge, totalement réfléchi dans un élément optique à indice de réfraction élevé, appelé cristal de réflexion interne (un monocristal de germanium par exemple), pénètre dans une faible profondeur de l'échantillon qui est placé de part et d'autre de l'élément optique. Si l'échantillon absorbe l'énergie infrarouge du faisceau réfléchi à des longueurs d'ondes spécifiques, de l'énergie sera perdue à ces longueurs d'ondes (**Figure 4**). La perte d'énergie, ou l'atténuation, dépend d'un ensemble de facteurs : le coefficient d'absorption et la concentration de l'échantillon et celui du cristal, l'angle d'incidence, le nombre de réflexions et l'état de polarisation du faisceau (Marchand-Brynaert, 1996). L'atténuation du faisceau est généralement exprimée comme une absorbance.

La bande d'absorption amide I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) est sensible à la force des liaisons hydrogène et, par conséquent, représente un bon moyen pour caractériser la structure secondaire des protéines (Sarver, Krueger, 1991). Par exemple, l'absorption vers 1630 cm^{-1} est caractéristique de la structure en hélice. Cette bande est constituée de plusieurs composants qui, de par leur largeur importante, ne peuvent être distingués. Le Dr Goormaghtigh du laboratoire du professeur

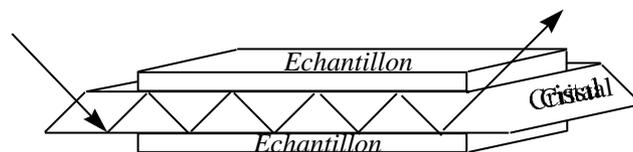


Figure 4. Schéma du principe de la technique de spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée — *Diagram of the principle of the attenuated total reflection infrared spectroscopy.*

² c'est-à-dire une diminution de la différence de fluorescence suivant la direction de polarisation considérée.

Ruysschaert a mis au point une méthode de déconvolution de cette bande par transformée de Fourier pour faire apparaître ses différents composants. Une procédure d'ajustement est alors appliquée sur les spectres déconvolués, puis sur le spectre original, afin de quantifier la proportion de chacune des structures secondaires (Goormaghtigh *et al.*, 1994c).

La technique de spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée à transformée de Fourier permet également de déterminer l'orientation des structures secondaires au sein d'une membrane biologique par exemple (Lins *et al.*, 1993). La mesure des vitesses d'échange du proton amide par le deutérium au moyen de la IR-ATR renseigne sur la stabilité des structures secondaires ainsi que sur leur accessibilité au solvant lorsque les protéines sont placées dans différentes situations expérimentales et, par là, de reconnaître différents types de repliement tertiaire. Il est également possible de récolter des informations sur l'ionisation des chaînes latérales des acides aminés susceptibles de prendre une charge dans la protéine. Ces informations ont une importance considérable puisqu'elles permettent de décrire l'association d'ions, dont les protons, avec la protéine et permettent donc de caractériser les changements survenant dans une protéine au cours de son activité enzymatique par exemple. Ce type d'information, essentiel pour la compréhension de l'activité des protéines, n'est accessible que par cette méthode pour les protéines membranaires (Goormaghtigh, 1996).

La IR-ATR présente de nombreux avantages pour l'étude des surfaces : elle permet d'obtenir des spectres de haute qualité pour des molécules insolubles, d'échantillonner la surface d'un composé épais (peau, polymère, etc.) avec différentes profondeurs de pénétration du rayon IR, et présente un avantage majeur si l'échantillon peut être orienté sur un support comme c'est le cas des membranes biologiques, de l'ADN et de nombreux polymères synthétiques. Elle permet l'étude simultanée de la structure des lipides et des protéines dans les membranes biologiques intactes sans introduction d'éléments étrangers, atout par rapport à la cristallographie par RX qui, elle, requiert le remplacement de la bicouche lipidique par un détergent (Goormaghtigh *et al.*, 1987). Des matériaux fortement agrégés ou des fragments de membranes de grande taille peuvent être étudiés, ce qui n'est pas le cas en RMN. La méthode IR-ATR est moins affectée par la présence de groupes aromatiques que le dichroïsme circulaire (Sarver, Krueger, 1991). D'autres avantages de la méthode sont la possibilité de travailler avec de faibles quantités de matériel (fraction de mg, couche monomoléculaire) et une grande souplesse d'utilisation permettant de modifier l'environnement de l'échantillon (pH, température, pression) au gré de l'utilisateur (Goormaghtigh *et al.* 1994a ; Goormaghtigh, 1996).

Cependant, à l'heure actuelle, il faut rester prudent lors de l'interprétation des résultats. En effet, l'attribution des données au type structural n'est pas univoque. Ce problème ainsi que la diversité méthodologique peuvent conduire à des conclusions erronées si l'utilisateur n'en est pas correctement averti (Goormaghtigh *et al.*, 1994b).

Cette méthode a été appliquée à l'étude structurale de différents peptides, protéines et phospholipides (Fringeli *et al.*, 1986 ; Goormaghtigh *et al.*, 1987 ; Brasseur, 1991 ; Lamthanh *et al.*, 1993 ; Lins *et al.*, 1993 ; Walther *et al.*, 1996 ; Ferré *et al.*, 1997 ; Ruysschaert *et al.*, 1998).

Une variante de la IR-ATR, la spectrométrie infrarouge à réflexion externe, peut être utilisée en combinaison avec la balance à film pour étudier, directement à l'interface air/eau, la structure de films à un niveau moléculaire (Dluhy *et al.*, 1988).

LE DICHOÏSME CIRCULAIRE (DC)

Une molécule est optiquement active si elle interagit différemment avec la lumière polarisée circulairement à gauche et à droite³. Les chromophores fondamentalement asymétriques comme les acides aminés présentent donc une activité optique. Les chromophores symétriques, par contre, ne développent aucune activité optique intrinsèque mais peuvent en acquérir par leur interaction avec des groupes voisins. Le signe et l'amplitude de l'activité optique d'un chromophore dépendent de l'environnement local (Suzuki, 1994).

L'activité optique peut être détectée soit par la variation différentielle de la vitesse de deux faisceaux (l'un polarisé circulairement à gauche, l'autre circulairement à droite) traversant l'échantillon, correspondant à la dispersion rotatoire optique (ORD pour *Optical Rotatory Dispersion*), soit par l'absorption différentielle de ces deux faisceaux, correspondant au dichroïsme circulaire (DC). Ces deux techniques sont utilisées depuis de nombreuses années dans le domaine de l'analyse structurale.

Le DC est plus fréquemment utilisé que l'ORD pour deux raisons : les courbes DC présentent une résolution supérieure et l'appareillage actuellement disponible pour les expériences de DC est plus performant.

Les spectres DC sont caractérisés par les paramètres E , l'absorption différentielle molaire des deux faisceaux (= le dichroïsme circulaire), et par m , l'ellipticité molaire.

³ signifie que le vecteur champ électrique du rayon lumineux tourne autour de la direction de propagation suivant une hélice gauche ou droite.

Un spectrophotomètre DC se compose d'un polariseur linéaire et d'une lame quart-d'onde qui permet de convertir la lumière polarisée linéairement en lumière polarisée circulairement. La différence d'absorbance des deux lumières polarisées circulairement à gauche et à droite est amplifiée par un amplificateur "lock-in". Cette différence est très faible et peut limiter la précision de la méthode (Suzuki, 1994).

Le DC permet d'obtenir une caractérisation optique de la molécule qui reflète les traits asymétriques de la structure moléculaire. Dans le cas des structures macromoléculaires, il renseigne sur l'agencement local des unités monomériques ; les modifications de conformation globale se reflèteront très peu dans les spectres de dichroïsme circulaire. C'est une technique intéressante pour caractériser rapidement la structure moléculaire avec une faible quantité de matériel (1–2 ml d'une solution à 0,05–0,5 mg/ml). Les spectres DC permettent de distinguer les structures secondaires des protéines (Greenfield, Fasman, 1969 ; Hammen *et al.*, 1994), des peptides (Jois *et al.*, 1992 ; Lamthanh *et al.*, 1993 ; Arttamangkul *et al.*, 1995 ; Burgess *et al.*, 1996 ; Dong *et al.*, 1998) et les différentes formes structurales des acides nucléiques (Moore, Wagner, 1974). Ils sont également utiles pour suivre les phénomènes tels que le repliement protéique (Yon-Kahn, 1993), la liaison protéine-ligand, la liaison acide nucléique-ligand et les interactions protéine-acide nucléique.

Dans le cas des protéines et des peptides, les spectres DC permettent de distinguer les différents types de structures secondaires à partir de courbes DC standards et de déterminer le pourcentage de chacune d'elles (Greenfield, Fasman, 1969). Mais il existe certaines limitations. Par exemple, le spectre DC du coude n'a pas encore été établi avec certitude. Même dans les régions de structure bien définie, l'interprétation des spectres DC doit se faire avec précaution. En effet, les amplitudes des bandes DC des structures en feuillet dépendent de la séquence, de la longueur de la structure et du solvant. Similairement, les amplitudes des spectres d'hélices dépendent du nombre d'acides aminés impliqués dans l'hélice. Il faut particulièrement être prudent dans l'interprétation des spectres DC des protéines contenant les résidus tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Leurs chaînes latérales aromatiques induisent de faibles bandes DC à longueurs d'ondes non définies. Il en est de même pour les liaisons disulfures (Greenfield, Fasman, 1969).

Il faudra donc faire preuve d'esprit critique lors de l'analyse. Toutefois, la méthode reste de toute première valeur pour tester l'état de la protéine dans différents milieux et pour suivre la cinétique des changements conformationnels subis.

LES MÉTHODES MICROSCOPIQUES

La microscopie et la cryo-microscopie électroniques

La (cryo-)microscopie électronique est basée sur le même principe que la diffraction des RX et la spectrométrie neutronique mais se différencie de ces deux techniques par l'existence, dans son dispositif, de lentilles qui permettent d'obtenir directement l'image de l'objet (Zaccai, 1991) (**Figure 5**).

Les microscopes électroniques modernes permettent d'imager les composés minéraux à une résolution proche de 0,2 nm (Weirich *et al.*, 1996). Cette résolution n'est pas obtenue avec les composés organiques pour deux raisons. Premièrement, les composés organiques sont endommagés par l'irradiation électronique et deuxièmement, ont une structure très sensible aux paramètres physico-chimiques de leur environnement. Le grand pouvoir de diffusion des électrons par les atomes oblige de placer sous vide le trajet électronique et par suite l'échantillon. De ce fait, les phases organiques formées de composés à valeurs élevées de pression de vapeur ne peuvent pas être étudiées par microscopie électronique. Pour remédier à ces deux limitations dans le cas des objets biologiques, la cryo-microscopie a été développée (Dubochet *et al.*, 1982 ; Lepault *et al.*, 1983). En abaissant la température, la sensibilité des composés organiques aux dommages d'irradiation et la pression de vapeur des constituants des échantillons étudiés sont diminuées. La cryo-microscopie électronique ne présente pas le problème de détermination de phases rencontré en cristallographie RX. Les phases peuvent, en effet, être déterminées directement à partir des images. Il faut néanmoins remarquer que la résolution obtenue par cette technique n'est pas aussi élevée que celle atteinte par cristallographie RX.

Les résultats obtenus par cryo-microscopie sur des objets biologiques, dont la fonctionnalité s'exerce en milieu aqueux liquide, ne peuvent être interprétés que si les changements structuraux liés à leur congélation

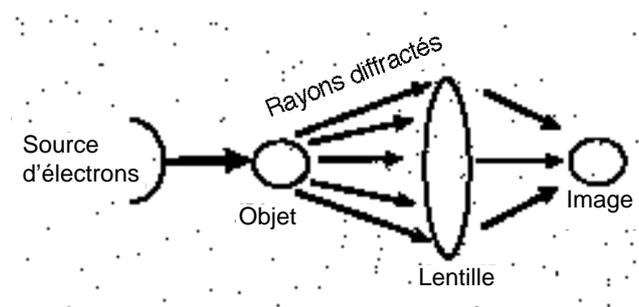


Figure 5. Schéma du principe de la (cryo-)microscopie électronique — *Diagram of the principle of the electronic (cryo-)microscopy.*

sont connus. Deux types de changements structuraux induits par congélation doivent être distingués : les changements de distribution spatiale et les réarrangements structuraux spécifiques de la macromolécule. Si les premiers peuvent être minimisés sinon supprimés en congelant suffisamment rapidement pour éviter la formation de grands cristaux de glace, les changements structuraux de la macromolécule sont inévitables. À partir d'expériences réalisées par diffraction de RX, il peut être conclu que les états liquide et congelé sont semblables si la congélation ne conduit pas à la formation de cristaux de glace en réseau hexagonal.

La cryo-microscopie a permis ainsi de déterminer la structure de complexes biologiques dans leur milieu aqueux naturel. Dans le cas d'échantillons de mélange de lécithine et d'eau, la bonne résolution (< 2 nm), équivalente à celle du cliché de diffraction des RX, a permis de localiser la position de l'eau, des têtes polaires et des chaînes aliphatiques des molécules de lipides (Lepault *et al.*, 1994). Par cryo-microscopie électronique, Henderson *et al.* (1990) ont proposé un modèle ayant une résolution de 0,35 nm pour la structure de la bactériorhodopsine, une protéine membranaire. Rayment *et al.* (1993) ont également utilisé cette technique pour déterminer la structure du complexe actine-myosine.

En contrôlant le temps entre un changement des conditions physico-chimiques subies par la phase et le refroidissement, la structure dynamique des phases aqueuses peut être étudiée par cryo-microscopie électronique avec une résolution temporelle égale à quelques millisecondes (Heuser *et al.*, 1979).

En permettant d'étudier la structure des phases aqueuses à une résolution inférieure à 2 nm et une résolution spatiale de quelques millisecondes, la cryo-microscopie devrait jouer un rôle croissant dans l'étude de nombreux systèmes macromoléculaires organisés.

Autres techniques récentes

La microscopie STM (pour *Scanning Tunelling Microscopy* c-à-d la microscopie à effet tunnel) et la microscopie AFM (pour *Atomic Force Microscopy* c-à-d la microscopie à force atomique) livrent des images topologiques de surface avec une résolution à l'échelle atomique (Marchand-Brynaert, 1996).

En STM, on mesure le courant généré lorsqu'un échantillon, maintenu à un potentiel donné, est balayé par une pointe métallique extrêmement fine, qui trace la distance d'équilibre entre la pointe et l'échantillon (**Figure 6**). Le courant tunnel résultant peut être relié à la topographie atomique de la surface. Les premières études STM ont été réalisées sous ultra-haut vide ; actuellement, il se développe des techniques adaptées à l'étude des matériaux sous air et sous liquide

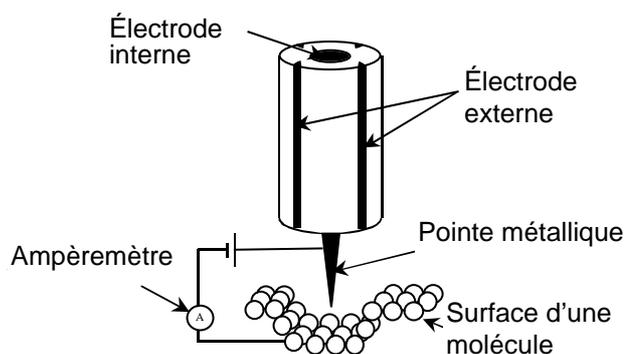


Figure 6. Schéma de la technique “Scanning Tunelling Microscopy” — *Diagram of the Scanning Tunelling Microscopy.*

(Hansma, 1986 ; Sonnenfield, Hansma, 1986). Cependant, la technique STM est limitée aux échantillons conducteurs (Marchand-Brynaert, 1996). De nombreux articles traitent de l'utilisation de la technique STM dans l'étude de la structure de surface de semi-conducteurs et métaux, et certains ont également montré son utilité dans l'élucidation de structures de protéines sur surface solide (Baro *et al.*, 1985, Dubreuil *et al.*, 1998).

La technique AFM, quant à elle, ouvre l'imagerie de surface à tous les matériaux, qu'ils soient conducteurs ou non. Si la pointe est placée à quelques dixièmes de nanomètres au-dessus de la surface, la surface et la pointe interagissent par des forces répulsives (analyse en “contact mode”). Lorsque la pointe est placée à quelques nanomètres au-dessus de la surface, et qu'on la fait osciller à une fréquence de résonance naturelle, l'interaction entre la pointe et la surface est attractive (analyse en “non-contact mode”). Cette technique est particulièrement bien adaptée pour l'étude de matériaux mous, comme certains polymères, et des échantillons biologiques (Marchand-Brynaert, 1996)

LA MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

Aujourd'hui, l'information concernant les séquences en monomères constitutifs et les structures des macromolécules biologiques est en pleine explosion. Cette information est diffusée rapidement et facilement à travers des réseaux informatiques. Le développement de ces réseaux associé à la démocratisation de l'accès aux moyens informatiques et graphiques font que la modélisation a déjà pénétré dans la plupart des laboratoires qui étudient les macromolécules biologiques.

Au sein de l'ordinateur, la représentation d'une macromolécule consiste en un ensemble de coordonnées atomiques, une liste des liaisons chimiques et un jeu de fonctions et de paramètres constituant le potentiel d'interaction (“champ de force”). Le potentiel

d'interaction qui détermine l'énergie conformationnelle de la macromolécule est constitué de deux types de termes qui représentent respectivement les interactions entre atomes liés et entre les atomes non liés. Il faut souligner que la précision de la modélisation est directement liée à la qualité du potentiel utilisé (Cornell *et al.*, 1995). Récemment d'ailleurs, il a été proposé que l'énergie hydrophobe jouait un rôle primordial dans la structuration des molécules (Lins, Brasseur, 1995). Néanmoins, à cause des limitations computationnelles, le choix du potentiel est toujours un compromis entre sa qualité et le coût des calculs qu'il engendre. Au fur et à mesure que la puissance des ordinateurs augmente, il sera possible d'améliorer les potentiels et d'arriver à un jeu de fonctions et de paramètres optimaux pour chaque type de simulation (Lavery, 1994).

Une fois le potentiel défini, chaque simulation nécessite une conformation moléculaire servant de point de départ. En général, celle-ci provient soit d'informations expérimentales, soit par homologie avec une autre molécule de structure connue.

Pour trouver les conformations les plus stables, la complexité de l'espace conformationnel des macromolécules rend l'emploi de la minimisation d'énergie délicate. En effet, dans la plupart des cas, c'est un minimum local et non un minimum global qui est déterminé. Pour tenter de s'affranchir de ces problèmes, il existe différentes méthodes dont la dynamique moléculaire et la méthode de Monte Carlo.

La modélisation moléculaire est un outil complémentaire à l'expérimentation. De plus, elle permet d'obtenir des grandeurs qui sont au-delà des possibilités expérimentales et ceci dans des conditions parfaitement contrôlées de pureté, de pression, de température, etc. Dans plusieurs domaines biologiques, la modélisation a déjà contribué à comprendre les facteurs énergétiques qui contrôlent les structures et les interactions des molécules. Elle a permis de mettre en évidence le rôle de la dynamique dans les systèmes biologiques. Ainsi, il est possible de suivre en détail l'accès des substrats à des sites enzymatiques, de voir des transitions conformationnelles s'accomplir, d'étudier l'influence de l'eau sur le comportement des structures macromoléculaires et de comprendre les couplages entre différents mouvements (Lavery, 1994).

Un domaine où la modélisation joue un rôle indispensable est l'affinement des structures macromoléculaires obtenue par diffraction des RX et par spectroscopie RMN (Ptak, Vovelle, 1994).

En ce qui concerne la prédiction *ab initio* de la structure de biopolymères, c'est-à-dire en partant uniquement de la séquence des unités monomériques, la modélisation apporte des informations mais ne permet pas d'élucider actuellement l'entièreté du problème.

Dans le cas des protéines, la modélisation avance à grands pas (Brasseur, 1995 ; Sun *et al.*, 1995 ; Finkelstein, 1997).

La modélisation a également aidé à comprendre les interactions entre l'ADN et les médicaments, études en plein développement dans le secteur pharmaceutique.

Une autre grande famille de biopolymères, les polysaccharides, pose des problèmes majeurs à cause de la taille et de la diversité des structures qu'ils forment. De surcroît, ces molécules sont difficiles à étudier expérimentalement et relativement peu de structures ont été établies par la diffraction des RX ou par spectroscopie RMN. En conséquence, la modélisation a un rôle important à jouer. Des logiciels et des champs de forces spécialement adaptés à l'étude des polysaccharides existent déjà et le nombre de tentatives de prédictions structurales est en évolution rapide (Perez, 1991 ; Woods, 1995).

La modélisation peut également servir à étudier le comportement de bicouches lipidiques pures et tenter de simuler des molécules amphiphiles au sein des bicouches. De nombreux travaux ont été entrepris par le professeur Brasseur et son équipe dans ce domaine (Brasseur, 1990 ; Brasseur *et al.*, 1990 ; Ducarme *et al.*, 1996).

La modélisation est encore loin de pouvoir prédire le repliement des protéines ou la géométrie fine des complexes protéine-acide nucléique. Beaucoup de processus biologiques sont trop lents pour être simulés par la dynamique moléculaire telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui et la majorité des complexes macromoléculaires sont trop vastes pour être modélisés en détail. Mais les résultats déjà obtenus ainsi que les progrès techniques et algorithmiques grandissants nous encouragent à penser que la modélisation continuera à faire progresser notre compréhension dans ces domaines.

CONCLUSIONS

De nombreuses techniques expérimentales s'offrent à l'étude de la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques. Deux grandes catégories peuvent être distinguées :

- celles permettant une détermination absolue et précise de la structure tridimensionnelle, comme la diffraction par RX, la résonance magnétique nucléaire en combinaison avec la modélisation moléculaire et la spectrométrie neutronique ;
- celles fournissant des informations structurales non complètes mais permettant soit de recueillir des renseignements sur la structure secondaire des macromolécules, comme le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée, soit de définir l'agencement global des différentes

unités des macromolécules, comme la spectroscopie de fluorescence, la cryo-microscopie électronique et la microscopie à effet tunnel.

Il faut donc considérer les techniques comme complémentaires et non comme concurrentes et, souvent, recourir à plusieurs d'entre elles plutôt qu'à une seule.

Le choix de celles-ci se fera selon de nombreux critères parmi lesquels la précision (résolution) souhaitée, le temps disponible ainsi que l'appareillage et l'expérience scientifique du laboratoire.

Parmi les techniques les plus utilisées actuellement, il ne faut pas oublier la modélisation moléculaire qui représente un outil théorique précieux et complémentaire à l'expérimentation.

D'autres techniques moins courantes contribuent également à l'avancement des recherches sur la conformation des macromolécules biologiques. La biréfringence électrique transitoire (Hagerman, 1996), l'ultracentrifugation analytique (Wright, Smith, 1996), la résonance paramagnétique électronique (Cammack, 1994) et la balance à film (Alsina *et al.*, 1993) en font partie.

L'intérêt porté actuellement aux études des relations structure-fonction des macromolécules biologiques ne fait d'ailleurs qu'accroître leur nombre. Par ailleurs, les techniques déjà existantes sont en progrès constant. De ce fait, les prochaines années vont nous permettre d'avancer à grands pas dans l'analyse de conformations et de répondre aux nombreuses questions apparentées.

Remerciements

Robert Brasseur et Magali Deleu remercient le Fonds National de la Recherche Scientifique pour leur poste en tant que directeur de Recherche et aspirant FNRS respectivement.

Bibliographie

Alsina MA., Rabanal F., Mestres C., Busquets MA., Reig F. (1993). Phospholipid interactions of synthetic peptides containing the antigenic HBV pre S (120–145) sequence. *J. Colloid Interface Sci.* **161**, p. 310–315.

Anonyme (1998). The Protein Data Bank/Brookhaven National Laboratory, Upton/USA, <http://www.pdb.bnl.gov>.

Arttamangkul S., Murray TF., DeLander GE., Aldrich JV. (1995). Synthesis and opioid activity of conformationally constrained dynorphin A analogues. 1 Conformational constraint in the "message" sequence. *J. Med. Chem.* **38** (13), p. 2410–2417.

Baldwin JP., Reynolds CD., Lambert SJ. (1994). Neutron scattering and diffraction. In Kendrew J., Lawrence E., eds. *The Encyclopedia of Molecular Biology B*. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 717–724.

Baro AM., Miranda R., Alaman J., Garcia N., Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Carrascosa JL. (1985). Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy. *Nature*, **315**, p. 253–254.

Bloomer AC. (1994). X-ray crystallography. In Kendrew J., Lawrence E., eds. *The Encyclopedia of Molecular Biology B*. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 1138–1147.

Bonmatin JM., Genest M., Labbé H., Ptak M. (1994). Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by ¹H-NMR, distance geometry and molecular dynamics. *Biopolymers* **34**, p. 975–986.

Brasseur R., ed. (1990). *Molecular Description of Biological Membranes by Computer Aided Conformational Analysis. Volumes I & II*. Boca Raton, FL: CRC Press, 285 p.

Brasseur R. (1991). Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculation. *J. Biol. Chem.* **266** (4), p. 1620–1627.

Brasseur R. (1995). Simulating the folding of small proteins by use of the local minimum energy and the free solvation energy yields native-like structures. *J. Mol. Graphics* **13**, p. 312–322.

Brasseur R., De Meutter J., Vanloo B., Goormaghtigh E., Ruyschaert JM., Rosseneu M. (1990). Mode of assembly of amphipathic helical segments in model high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1043**, p. 245–252.

Buckler DR., Haas E., Scheraga HA. (1995). Analysis of the structure of ribonuclease A in native and partially denatured states by time-resolved nonradiative dynamic excitation energy transfer between site-specific extrinsic probes. *Biochemistry* **34**, p. 15965–15978.

Burgess K., Lim D., Mousa SA. (1996). Synthesis and solution conformation of cyclo (RGDRGD): a cyclic peptide with selectivity for the alpha V beta 3 receptor. *J. Med. Chem.* **39** (22), p. 4520–4526.

Byler DM., Susi H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, p. 469–487.

Callebaut I. (1993). *La cristallographie et la résonance magnétique nucléaire sont des techniques complémentaires pour l'étude de la structure des macromolécules biologiques*. Thèse annexe, Fac. univ. Sci. agron., Gembloux, Belgique.

Cammack R. (1994). ESR/EPR spectroscopy. In Kendrew J., Lawrence E., eds. *The Encyclopedia of Molecular Biology B*. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 338–342.

Chandrasekaran R., Lee EJ., Thailambal VG., Zevenhuizen LPTM. (1994). Molecular architecture of a galactoglucan from *Rhizobium meliloti*. *Carbohydr. Res.* **261**, p. 279–295.

- Clore GM., Gronenborn AM. (1987). Review: determination of three-dimensional structures of proteins in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Eng.* **1** (4), p. 275–288.
- Clore GM., Gronenborn AM. (1991). Structure of larger proteins in solutions; the three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* **252**, p. 1390–1399.
- Cornell WD., Cieplak P., Bayly CI., Gould IR., Merz KM., Fergusson DM., Spellmeyer DC., Caldwell JW., Kollman P. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, p. 5179–5197.
- Cusack S., Doster W. (1990). Temperature dependence of the low-frequency dynamics of myoglobin: measurement of the vibrational-frequency distribution by inelastic neutron scattering. *Biophys. J.* **58**, p. 243–251.
- Danielson MA., Falke JJ. (1996). Use of ^{19}F NMR to probe protein structure and conformational changes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, p. 163–195.
- Davis JH., Auger M., Hodges RS. (1995). High-resolution ^1H nuclear magnetic resonance of a transmembrane peptide. *Biophys. J.* **69**, p. 1917–1932.
- Dluhy RA., Mitchell ML., Pettenski T., Beers J. (1988). Design and interfacing of an automated Langmuir-type film balance to an FT-IR spectrometer. *Appl. Spectrosc.* **42** (7), p. 1289–1293.
- Dong M., Ladavière L., Penin F., Deleage G., Baggetto LG. (1998). Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1371**, p. 317–334.
- Dubochet J., Lepault J., Freeman R., Berriman JA., Homo JC. (1982). Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *J. Microsc.* **128**, p. 219–237.
- Dubreuil N., Alexandre S., Lair D., Sommer F., Duc TM., Valleton JM. (1998). Scanning force microscopy of mixed fatty acid/protein Langmuir-Blodgett films transferred on muscovite, a model of their organization. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **11**, p. 95–102.
- Ducarme P., Rahman M., Lins L., Brasseur R. (1996). The erythrocyte/brain glucose transporter (Glu T1) may adopt a two-channel transmembrane / structure. *J. Mol. Model.* **2**, p. 27–45.
- Ducruix A., Reiss-Husson F., Tardieu A. (1994). Cristallogénèse des macromolécules biologiques. In *Images de la recherche. De la matière au vivant : les systèmes moléculaires organisés*. Paris : CNRS-Images de la Recherche, p. 139–142.
- Duée E., Dideberg O. (1997). La cristallographie macromoléculaire en mouvement. *Biofutur* **173**, p. 3–11.
- Ferré G., Besson F., Buchet R. (1997). Conformational studies of the cyclic L,D-lipopeptide surfactin by Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrochim. Acta part A* **53**, p. 623–635.
- Finkelstein AV. (1997). Protein structure: what is it possible to predict now? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, p. 60–71.
- Forsyth VT. (1989). Neutron fibre diffraction study of DNA hydration. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, p. 236–240.
- Fourme R., Janin R. (1990). La cristallographie biologique. *La Recherche* **226** (21), p. 1358–1367.
- Fringeli UP., Leutert P., Thurnhofer H., Fringeli M., Burger MN. (1986). Structure-activity relationship in vinculin: an IR/attenuated total reflection spectroscopic and film balance study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, p. 1315–1319.
- Garavito RM., Rosenbusch JP. (1980). Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial X-ray analysis. *J. Cell Biol.* **86**, p. 327–329.
- Georghiou S., Bradrick TD., Philippidis A., Beechem JM. (1996). Large-amplitude picosecond anisotropy decay of the intrinsic fluorescence of double-stranded DNA. *Biophys. J.* **70**, p. 1909–1922.
- Girault JP. (1990). Résonance magnétique nucléaire : évolution instrumentale et analyse de structure. *Biofutur* **38**, p. 7–11.
- Goormaghtigh E. (1996). La spectroscopie infra-rouge en réflexion totale atténuée. Application aux membranes biologiques et à la chimie des surfaces. *Chim. Nouv.* **14** (53), p. 1553–1559.
- Goormaghtigh E., Brasseur R., Huart P., Ruyschaert JM. (1987). Study of the adriamycin-cardiolipin complex structure using attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Biochemistry* **26**, p. 1789–1794.
- Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert JM. (1994a). Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. In Hilderson HJ., Ralston GB., eds. *Subcellular Biochemistry. Volume 23 Physicochemical methods in the study of biomembranes*. New York: Plenum Press, p. 329–362.
- Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert JM. (1994b). Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. In Hilderson HJ., Ralston GB., eds. *Subcellular Biochemistry Volume 23: Physicochemical methods in the study of biomembranes*. New York: Plenum Press, p. 363–403.
- Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert JM. (1994c). Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structure. In Hilderson HJ., Ralston GB., eds. *Subcellular Biochemistry. Volume 23 Physicochemical methods in the study of biomembranes*. New York: Plenum Press, p. 406–450.
- Greenfield N., Fasman GD. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8** (10), p. 4108–4116.
- Hagerman PJ. (1996). Sometimes a great motion: the application of transient electric birefringence to the

- study of macromolecular structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 643–649.
- Hammen PK., Gorenstein DG., Weiner H. (1994). Structure of the signal sequences for the two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import. *Biochemistry* **33**, p. 8610–8617.
- Hansma PK. (1986). Squeezable tunneling functions. *IBM J. Res. Dev.* **30**, p. 370–373.
- Henderson R., Baldwin JM., Ceska TA. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, p. 899–929.
- Heuser JE., Reese TS., Dennis MJ., Jan Y., Jan L., Evans L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell. Biol.* **81**, p. 275–300.
- Jois DS., Easwaran KR., Bednarek M., Blout ER. (1992). Conformational and ion binding properties of a cyclic octapeptide, cyclo (Ala-Leu-Pro-Gly)₂. *Biopolymers* **32** (8), p. 993–1001.
- Jones BE., Beechem JM., Matthews CR. (1995). Local and global dynamics during the folding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, p. 1868–1877.
- Kay LE., Torcha DA., Bax A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to Staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**, p. 8972–8979.
- Kjaer K., Als-Nielsen J., Helm CA., Laxhuber LA., Mohwald H. (1987). Ordering in lipid monolayers studied by synchrotron X-ray diffraction and fluorescence microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **58**, p. 2224–2227.
- Lam WC., Seifert JM., Amberger F., Graf C., Auer M., Millar DP. (1998). Structural dynamics of HIV-1 Rev and its complexes with RRE and 5S RNA. *Biochemistry* **37**, p. 1800–1809.
- Lamthanh H., Leonetti M., Nabdryk E., Menez A. (1993). CD and FTIR studies of an immunogenic disulphide cyclized octadecapeptide, a fragment of a snake curaremimetic toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1203** (2), p. 191–198.
- Lavery R. (1994). La modélisation moléculaire : un outil pour étudier les macromolécules biologiques et leurs interactions. In *De la matière au vivant : les systèmes moléculaires organisés*. Paris : CNRS-Images de la Recherche, p. 199–204.
- Le Guernevé C., Seigneuret M. (1996). High-resolution mono- and multidimensional magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance of membrane peptides in nondeuterated lipid membranes and H₂O. *Biophys. J.* **71**, p. 2633–2644.
- Lepault J., Booy FP, Dubochet J. (1983). Electron microscopy of frozen biological suspensions. *J. Microsc.* **129**, p. 89–102.
- Lepault J., Erk I., Ranck JL. (1994). Étude statique et dynamique de la structure des phases aqueuses par cryo-microscopie électronique. In *De la matière au vivant : les systèmes moléculaires organisés*. Paris : CNRS-Images de la Recherche, p. 75–78.
- Lepre CA., Cheng JW., Moore JM. (1993). Dynamics of a receptor-bound ligand by heteronuclear NMR: FK506 bound to FKBP-12. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, p. 4929–4930.
- Lietzke SE., Barnes CL., Kundrot CE. (1995). Crystallisation and structure determination of RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, p. 645–649.
- Lins L., Brasseur R. (1995). The hydrophobic effect in protein folding. *FASEB J.* **9**, p. 535–540.
- Lins L., Brasseur R., Rosseneu M., Vanloo B., Ruyschaert JM. (1993). Structure of the apolipoprotein A-IV/lipid discoidal complexes: an attenuated total reflection polarized Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, p. 267–277.
- Marchand-Brynaert J. (1996). L'analyse des surfaces des polymères. *Chim. Nouv.* **14** (55), p. 1613–1620.
- Marion D. (1990). Résonance magnétique nucléaire et modélisation : les macromolécules biologiques. *Biofutur* **38**, p. 12–16.
- Martin J., Waltho J. (1994). NMR spectroscopy. In Kendrew J., Lawrence E., eds. *The Encyclopedia of Molecular Biology B*. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 734–741.
- Millar DP. (1996a). Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 637–642.
- Millar DP. (1996b). Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 322–326.
- Moore DS., Wagner TE. (1974). Double-helical DNA and RNA circular dichroism. Calculations on base-sugar-phosphate helix interactions. *Biopolymers* **13**, p. 977–986.
- Nilges M. (1996). Structure calculation from NMR data. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 617–623.
- Pappalardo L., Kerwood DJ., Pelczer I., Borer PN. (1998). Three-dimensional folding of an RNA hairpin required for packaging HIV-1. *J. Mol. Biol.* **282**, p. 801–818.
- Perez S. (1991). Molecular modelling and electron diffraction of polysaccharides. *Meth. Enzymol.* **203**, p. 510–556.
- Peters T., Pinto BM. (1996). Structure and dynamics of oligosaccharides: NMR and modeling studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 710–720.
- Popot JL., Engelmann DM., Gurel O., Zaccari G. (1989). Tertiary structure of bacteriorhodopsin positions and orientation of helices A and B in the structural map determined by neutron diffraction. *J. Mol. Biol.* **210**, p. 829–847.
- Ptak M., Vovelle F. (1994). RMN multidimensionnelle et modélisation de la structure tridimensionnelle de

- protéines amphiphiles. *In De la matière au vivant : les systèmes moléculaires organisés*. Paris : CNRS-Images de la Recherche, p. 183–186.
- Rayment I., Holden HM., Whittaker M., Yohn CB., Lorenz M., Holmes KC., Milligan RA. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, p. 58–65.
- Rischel C., Thyberg P., Rigler R., Poulsen FM. (1996). Time-resolved fluorescence studies of the molten globule state of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **257**, p. 877–885.
- Roth M., Lewit-Bentley A., Michel H., Deisenhofer J., Huber R., Oesterhelt D. (1989). Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction centre. *Nature* **340**, p. 659–662.
- Ruyschaert JM., Goormaghtigh E., Homble F., Andersson M., Liepinsh E., Otting G. (1998). Lipid membrane binding of NK-lysin. *FEBS Lett.* **425**, p. 341–344.
- Sarver RW., Krueger WC. (1991). Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: a data base analysis. *Anal. Biochem.* **194**, p. 89–100.
- Sonnenfeld R., Hansma PK. (1986). Atomic-resolution microscopy in water. *Science* **232**, p. 211–213.
- Sun S., Thomas PD., Dill KA. (1995). A simple protein folding algorithm using a binary code and secondary constraints. *Protein Eng.* **8** (5), p. 769–778.
- Suzuki M. (1994). Circular dichroism. *In* Kendrew J., Lawrence E., eds. *The Encyclopedia of Molecular Biology B*. Oxford, UK: Blackwell Science, p. 206–209.
- Timmins PA., Zaccai G. (1988). Low resolution structure of biological complexes studied by neutron scattering. *Eur. Biophys. J.* **15**, p. 257–268.
- Walther FJ., David-Cu R., Leung C., Bruni R., Hernandez-Juviel J., Gordon LM., Waring AJ. (1996). A synthetic segment of surfactant protein A: structure, *in vitro* surface activity, and *in vivo* efficacy. *Pediatr. Res.* **39** (6), p. 938–946.
- Weirich TE., Ramlau R., Simon A., Hovmöller S., Z. ou X. (1996). A crystal structure determined with 0.02 Å accuracy by electron microscopy. *Nature* **382**, p. 144–146.
- Woods RJ. (1995). Three-dimensional structures of oligosaccharides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, p. 591–598.
- Wouters J. (1995). Cristallographie à résolution temporelle (time-resolved crystallography). *Chim. Nouv.* **13** (50), p. 1461–1468.
- Wright P., Smith JL. (1996). Biophysical methods: faster and bigger. Editorial overview. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 583–584.
- Wüthrich K. (1989). Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* **243**, p. 45–50.
- Yon-Khan J. (1993). Évolution des concepts sur le repliement des protéines. *École IMABIO. Structure Fonction des Protéines. Règles et Prédications* **8**, p. 35–47.
- Yui T., Ogawa K., Kakuta M., Misaki A. (1995). Chain conformation of glucurono-xylo-mannan isolated from fruit body of *Tremella fuciformis* Berk. *J. Carbohydr. Chem.* **14**, p. 255–263.
- Zaccai J. (1991). Les molécules passées au crible des neutrons. *Biofutur* **102**, p. 37–42.

(93 réf.)