

# Les mécanismes de repliement des protéines solubles

Nora Benhabilès <sup>(1)</sup>, Annick Thomas <sup>(1)</sup>, Robert Brasseur <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> U410. INSERM. Institut fédératif de Recherche Xavier Bichat. Paris. France.

<sup>(2)</sup> Centre de Biophysique moléculaire numérique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux. Belgique. E-mail : brasseur.r@fsagx.ac.be

Reçu le 19 janvier 2000, accepté le 20 mars 2000.

La fonction d'une protéine est portée par sa structure tridimensionnelle. Les règles de traduction de l'information encodée dans l'ADN en une séquence d'acides aminés sont connues. Par contre les règles qui permettent à une séquence d'acides aminés de se replier en une structure tridimensionnelle univoque sont actuellement inconnues. La rapidité des phénomènes mis en jeu rend l'étude expérimentale difficile par les méthodes biophysiques. Différentes approches théoriques ont été élaborées avec plus ou moins de succès. Aucune actuellement ne décrit de façon correcte les mécanismes mis en jeu. Nous présentons ici les différentes hypothèses émises dans la littérature concernant les étapes précoces du repliement des protéines solubles.

**Mots-clés.** Repliement des protéines, structure primaire, structure secondaire, structure tertiaire, hydrophobicité, relations structure-fonction.

**Mechanisms of folding of soluble proteins.** The function of a protein is carried out by its three-dimensional structure. The rules for translation of the information encoded by DNA into an amino acid sequence are well known. On the other hand, the rules governing the folding of an amino acid sequence into an univocal three-dimensional structure are still unknown. The speed at which this phenomenon takes place makes the experimental investigations difficult using biophysical methods. Various theoretical approaches have been set up with more or less success. None, nowadays, describes in a right way, the mechanisms involved. We present here the various hypotheses found in the literature about the early steps of the folding of soluble proteins.

**Keywords.** Protein folding, primary structure, secondary structure, tertiary structure, hydrophobicity, structure-function relationships.

## 1. INTRODUCTION

Les cellules sont en grande partie constituées de protéines qui représentent environ la moitié de leur poids sec. Une protéine est un polymère linéaire combinant 20 acides aminés naturels, aux propriétés chimiques différentes. Ces polymères complexes ont la charge d'assurer des rôles variés et vitaux dans tous les organismes :

- un rôle structural (comme l'actine, le collagène, l'élastine, etc.) ;
- un rôle de reconnaissance moléculaire et de catalyse (systèmes antigène-anticorps, hormones, récepteurs membranaires, enzymes, etc.).

La fonction de chaque protéine est portée par sa structure tridimensionnelle qui résulte de l'enchaînement des acides aminés et de la nature de chaque acide aminé. Schématiquement, la séquence puis la structure 3-D d'une protéine sont l'aboutissement de la réplication, la transcription et la traduction du génome. Dans la cellule, les chaînes polypeptidiques naissantes sont synthétisées de façon séquentielle par le ribosome (Moore, 1997) de l'extrémité N vers l'extrémité C.

C'est l'étape de traduction de l'information génétique contenue dans l'ADN. Ensuite, en un temps qui varie de quelques microsecondes à quelques secondes, la protéine se replie (seule ou grâce à l'aide de protéines chaperonnes) en une structure tridimensionnelle.

Si les règles de traduction qui permettent de passer de l'ADN à la structure primaire de la protéine sont connues, les mécanismes expliquant le repliement des protéines divergent et décrivent de façon imprécise différentes étapes qui mènent à la structure native. En effet, la rapidité des phénomènes de repliement (Karplus *et al.*, 1995 ; Baldwin, 1996a) rend leur étude expérimentale difficile par des méthodes de biophysique (Kataoka, Goto, 1996 ; Plaxco, Dobson, 1996). D'autre part, le fait que les travaux expérimentaux soient menés essentiellement *in vitro* (Deleu *et al.*, 1998), pose le problème de définir en quoi le repliement généré *in vitro* ressemble ou diffère du repliement *in vivo*. Par exemple, que la ribonucléase se renature spontanément dans un tube à essai (Anfinsen *et al.*, 1961) ne signifie pas pour autant que les gradients ioniques et la machinerie cellulaire ne soient pas impliqués dans son repliement *in vivo*.

Le repliement des protéines peut être analysé de deux façons distinctes (Freedman, 1992) : l'une informative, contenue dans le code de la séquence et l'autre mécanique, avec la description de la cinétique et de la thermodynamique des processus qui décrivent l'évolution de la protéine au cours du repliement. Nous insisterons sur la partie "mécanique" du repliement.

De nombreuses informations ont pu être déduites des expériences menées *in vitro* sur les protéines. Elles sont d'une importance considérable pour comprendre les règles principales du repliement.

Selon Anfinsen (1973) "toute l'information nécessaire pour obtenir la conformation native d'une protéine dans un environnement donné est contenue dans l'enchaînement des acides aminés". Ceci suggère que le repliement soit sous contrôle thermodynamique (Anfinsen, Scheraga, 1975). Tanford (1970) a analysé les constantes apparentes de vitesse et montre que le repliement des petites protéines constituées de monodomaine est sous contrôle thermodynamique.

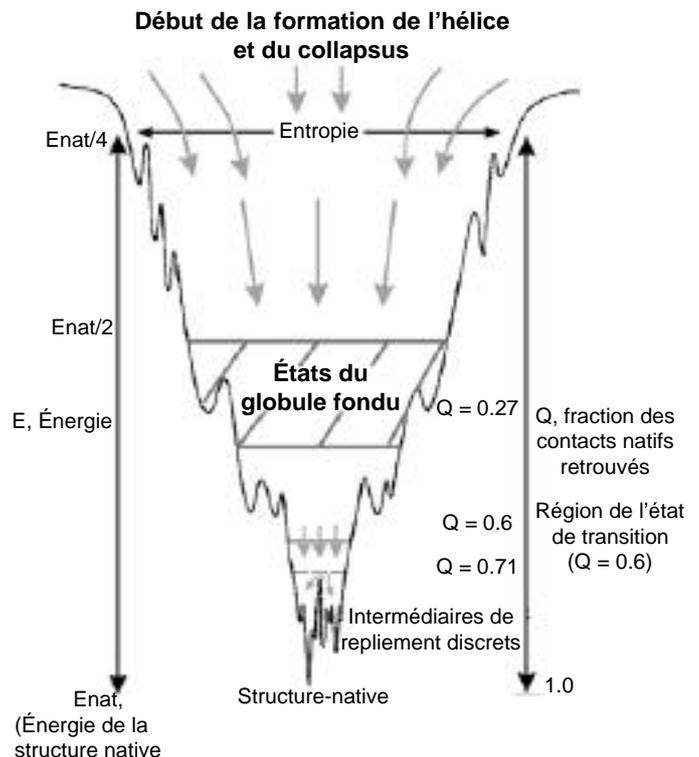
Le nombre de conformations qu'une chaîne polypeptidique peut adopter devrait être égal à  $m^n$ , avec  $n$  le nombre d'acides aminés contenus dans la séquence et  $m$  le nombre de structures possibles pour chaque acide aminé (13 structures secondaires différentes au minimum). Une recherche aléatoire de la structure d'énergie la plus basse à travers toutes les structures possibles nécessiterait un temps gigantesque non compatible avec celui mesuré *in vivo* ou *in vitro* pour que la protéine se replie. C'est le paradoxe de Levinthal (Levinthal, 1968). Wetlaufer (1973) a calculé qu'une chaîne polypeptidique de 100 acides aminés prendrait  $10^{85}$  secondes (soit  $3,17 \cdot 10^{75}$  siècles) pour explorer toutes les configurations possibles. On en déduit qu'une recherche simplement aléatoire est impossible. En suggérant l'existence d'un contrôle cinétique, Levinthal propose la formation simultanée de petits noyaux structurés dans plusieurs régions d'une même chaîne polypeptidique qui initieraient et accéléreraient le repliement.

Les deux hypothèses, thermodynamique et cinétique, ont longtemps été sujettes à controverses (Finkelstein, Ptitsyn, 1987 ; Camacho, Thirumalai, 1993), certains auteurs comme Anfinsen affirmaient que le repliement ne pouvait être que thermodynamique alors que d'autres, comme Levinthal (1968) ou Wetlaufer (1973), proposaient un contrôle cinétique. Dans les deux cas, les interactions à moyennes et longues distances peuvent initier les processus de repliement, en réduisant le nombre de conformations possibles. Les contraintes stéréochimiques, en limitant le nombre de voies de repliement pour chaque séquence, semblent jouer le même rôle. Ces événements resteraient compatibles avec le paradoxe de Levinthal (Ptitsyn, Finkelstein, 1980 ; Chothia, 1992 ; Finkelstein, Ptitsyn, 1987 ; Blundell, Johnson, 1993 ; Alexandrov, Go, 1994 ; Orengo *et al.*, 1994 ; Wang, 1996).

Il semble que l'on puisse poser l'hypothèse que les mécanismes qui dirigent le repliement des protéines globulaires sont sous contrôle mixte : cinétique et thermodynamique (Camacho, Thirumalai 1993 ; Guo, Thirumalai, 1996).

Le postulat de Levinthal peut aussi être illustré en termes de paysages énergétiques (*Energy Landscape*) par le concept de repliement en entonnoir (*Folding Funnel*) proposé par le groupe de Wolynes (Bryngelson *et al.*, 1995 ; Socci *et al.*, 1998) et repris plus récemment par Chan et Dill (1998). Dans ce concept, les auteurs décrivent le comportement thermodynamique et cinétique de la transformation d'un ensemble de structures correspondant à l'état dénaturé d'une protéine vers son état natif unique (**Figure 1**). Tandis que le repliement de la structure progresse vers l'état natif, le nombre de conformations à explorer diminue. Le processus qui conduit la structure de l'état initial (structure aléatoire) vers l'état final de la protéine (état natif) est exergonique.

Une grande variété de comportements de repliement émerge de ce paysage énergétique (**Figure 1**), elle dépend des paramètres énergétiques et des conditions expérimentales (Wolynes *et al.*, 1995) : Wolynes *et al.* ont suggéré que la vitesse du repliement est diminuée



**Figure 1.** Repliement en entonnoir schématique d'une protéine. La largeur de l'entonnoir représente l'entropie, la profondeur, l'énergie — "Folding funnel" of a protein. Width and depth respectively represent entropy and energy.

par la présence de puits intermédiaires sur la surface énergétique. Chaque puits correspond à un minimum énergétique local peuplé par une population d'intermédiaires "stables". Les auteurs décrivent que la descente vers le fond de l'entonnoir s'accompagne d'une diminution de l'entropie de la chaîne polypeptidique. Plus la pente est raide, plus le repliement sera rapide.

On admet à l'heure actuelle que le repliement de la structure 3-D de la plupart des protéines est sous contrôle thermodynamique et que l'état natif est atteint grâce à la formation d'intermédiaires partiellement structurés dont la formation est sous contrôle cinétique (Sali *et al.*, 1994a ; Ballew *et al.*, 1996a).

## 2. QUELS SONT LES DIFFÉRENTS MODÈLES DE CHEMINS DE REPLIEMENT ?

On distingue schématiquement :

- Les modèles construits à partir de considérations théoriques (Karplus, Weaver, 1976; Bryngelson, Wolynes, 1987; Karplus, Weaver, 1994; Dill *et al.*, 1995; Karplus, Sali, 1995). Avec les nouvelles approches théoriques sur les mécanismes du repliement, expérimentateurs et théoriciens ont mis en commun leurs informations pour proposer des modèles. Les théoriciens travaillent sur des modèles avec des fonctions de potentiels simples (Levitt, Warshel, 1975 ; Taketomi *et al.*, 1988 ; Skolnick, Kolinski, 1990 ; Godzik *et al.*, 1992 ; Dagget, Levitt, 1993 ; Kolinski, Skolnick, 1994 ; Sali *et al.*, 1994b). Les résultats obtenus sont prometteurs (pour une revue voir Pande *et al.* (1998)).
- Les modèles fondés sur des observations expérimentales (Baldwin, 1975 ; Kim, Baldwin, 1982 ; Guo, Thirumalai, 1995 ; Daggett *et al.*, 1996 ; Viguera *et al.*, 1996 ; Fersht, 1997; Matagne, Dobson, 1998) sont proposés sur base d'études menées en enzymologie, biochimie, biologie moléculaire et biophysique.

### 2.1. Quels sont les modèles de repliement proposés dans la littérature ?

Un certain nombre de modèles seront présentés brièvement afin de faire le point sur les différents mécanismes qui sont proposés :

**Le modèle de nucléation-condensation** (Zimm, Bragg, 1959 ; Lifson, Roig, 1961 ; Wetlaufer, 1973 ; Matheson, Scheraga, 1978 ; Fersht, 1995a ; Guo, Thirumalai, 1997). Il inclut une étape de nucléation suivie par une propagation rapide de la structure. L'étape limitante est le processus de nucléation. Ce modèle, sensé représenter les premiers résultats cinétiques, prend en compte la coopérativité du repliement.

**Le modèle de diffusion-collision**, proposé par Karplus et Weaver (1976). La nucléation intervient simultanément en plusieurs points de la chaîne polypeptidique et génère des structures qui diffusent puis coalescent jusqu'à former des microstructures ayant une conformation native. Ces microstructures ont une durée de vie contrôlée par la diffusion, et le repliement d'une chaîne de 100 ou 200 acides aminés peut avoir lieu en moins d'une seconde. Selon ce modèle, le repliement intervient en passant par plusieurs étapes de diffusion-collision. Le statut du modèle de diffusion-collision a été réévalué à la lumière de données expérimentales récentes (Karplus, Weaver, 1994).

**Le repliement séquentiel et hiérarchique.** Plusieurs segments de structures sont formés et assemblés à différents niveaux suivant un chemin de repliement unique (Baldwin, 1975 ; Kim, Baldwin, 1982). Schulz (1977) a proposé une hiérarchie dans le repliement des protéines correspondant aux structures primaire – secondaire – tertiaire – et éventuellement quaternaire. Dans ce modèle, le premier évènement, la nucléation, est suivi par la formation des structures secondaires qui s'associent pour former des superstructures secondaires, puis des domaines et éventuellement un monomère actif. L'association entre les sous-unités des protéines oligomériques se ferait à l'étape finale du processus de repliement.

**Un modèle modulable de repliement** a été proposé en considérant la structure 3-D des protéines. Wetlaufer (1981) considère les domaines comme des unités de repliement (*Folding Units*) ; il suggère que les sous-domaines pourraient se replier de façon indépendante en formant, comme intermédiaires de repliement, des modules structuraux qui s'assemblent pour donner la structure native (Chothia, 1984).

**Le modèle *Framework*** (Ptitsyn, 1991) pose comme hypothèse que la structure secondaire est formée à une étape précoce du repliement (avant la structure 3-D).

**Le modèle d'effondrement** (collapse) hydrophobe implique que le premier évènement du repliement des protéines est un collapse hydrophobe ayant lieu avant la formation des structures secondaires (Levitt, Warshel, 1975 ; Dill 1990). Ce collapse (Kauzmann, 1959) conduirait au repliement des protéines et à la stabilisation de la structure 3-D. L'enfouissement des résidus hydrophobes peut avoir lieu dans les étapes précoces du repliement.

**Le modèle de la fermeture éclair hydrophobe (*Hydrophobic Zipper*)**, proposé par Dill *et al.* (1993) suggère que la formation de segments de structures secondaires est simultanée à la formation du collapse hydrophobe.

**Le modèle du Jigsaw Puzzle** (Harrison, Durbin, 1985) : le repliement est considéré comme un assemblage en puzzle avec existence de plusieurs chemins menant à une solution unique. Les intermédiaires du lysozyme se réarrangeraient pour générer un globule fondu à partir duquel la protéine native se formerait en une ou plusieurs étapes séquentielles, en suivant le *Jigsaw Puzzle*. Ce modèle présente des similarités avec celui de Karplus et Weaver (1994). L'identification d'intermédiaires représente une description cinétique plutôt qu'une description structurale, chaque intermédiaire étant constitué d'espèces hétérogènes. Le modèle du *Jigsaw Puzzle* apporte un éclairage nouveau car on a longtemps postulé (Baldwin, 1975 ; Kim, Baldwin, 1982 ; Jaenicke 1987) que le repliement des protéines suivait un chemin unique en passant par la création séquentielle d'intermédiaires instables le long de ce chemin.

Ces différents modèles ont été construits à partir de résultats expérimentaux. Comme on peut le constater, il n'y a pas de consensus sur les modèles de repliement proposés dans la littérature. On peut simplement dire qu'à la lumière de telle ou telle expérience, un modèle paraît plus crédible qu'un autre pour illustrer le ou les chemins de repliement.

## 2.2. Que se passe-t-il pendant le repliement ?

Les études cinétiques ont permis de montrer l'existence de structures intermédiaires instables (Wetlaufer, Ristow, 1973 ; Creighton, 1984 ; Sancho, Fersht, 1992 ; Weissman, Kim, 1992 ; Pecorari *et al.*, 1993 ; Fersht, 1995c). Néanmoins, il faut se repérer dans un schéma à un ou plusieurs chemins de repliement et puis, comme ces espèces transitoires forment des états très peu peuplés en équilibre rapide avec d'autres populations structurales, il faut pouvoir obtenir des informations sur la structure 3-D de ces intermédiaires.

On a pu, pour quelques protéines, accumuler des états transitoires du repliement, à bas pH ou par ingénierie génétique. Ces études ont permis de proposer l'existence de plusieurs étapes pour le repliement. Une étape précoce de cinétique rapide et une étape tardive de cinétique lente, responsable des réarrangements structuraux.

**Les évènements précoces.** Les méthodes expérimentales (Ballew *et al.*, 1996a ; Williams *et al.*, 1996) ont permis de poser des hypothèses sur la façon dont pourraient se former les intermédiaires de repliement.

De nombreuses méthodes de biophysique permettent d'obtenir des informations sur les intermédiaires de repliement (**Tableau 1**). On peut citer successivement les méthodes de cinétiques rapides (Nöthling *et al.*,

1995 ; Ballew *et al.*, 1996b) (*Stopped Flow* et *T-jump*), le dichroïsme circulaire, la RMN (Bai *et al.*, 1995 ; Shortle, 1996 ; Chamberlain, Marqusee, 1997 ; Clarke *et al.*, 1997) (associée à des échanges rapides hydrogène-deutérium, par exemple).

La formation d'intermédiaires repliés et flexibles a été proposée par Ptitsyn et Rashin (1973). Puis Ohgushi et Wada (1983) ont proposé le terme de "*Molten Globule*" ou globule fondu, pour introduire une structure ayant la majorité des structures secondaires natives formées mais possédant un mauvais compactage, ou une structure 3-D fluctuante (Chaffotte *et al.*, 1992). Le globule fondu contiendrait des surfaces accessibles hydrophobes non natives. Ptitsyn *et al.* (1990) ont suggéré que le globule fondu puisse être un intermédiaire général du chemin de repliement des protéines.

Cet intermédiaire particulier du repliement (Ptitsyn, 1995 ; Roder, 1995 ; Vidugiris *et al.*, 1995 ; Ptitsyn, 1996) a été retrouvé dans le chemin de repliement de plusieurs protéines, comme l'apomyoglobine (Vidugiris, Royer, 1998), l' $\gamma$ -lactalbumine (Kuwajima, 1989 ; 1996), l'anhydrase carbonique (Jagannadham, Balasubramanian, 1985), ou l'hormone de croissance bovine (Kuwajima, 1996).

Certains auteurs proposent que les intermédiaires de repliement, globule fondu compris, soient en fait des espèces piégées de façon cinétique et mal repliées. Cette théorie suggère que le repliement des petites protéines intervient en continu, très rapidement et sans intermédiaires stables (Sosnick *et al.*, 1994 ; Fersht, 1995a ; Schindler *et al.*, 1995).

Le globule fondu est-il une espèce transitoire résultant d'une cinétique lente comme le suggèrent certains auteurs (Govindarajan, Goldstein, 1995) ou alors une espèce mal repliée résultant d'un mauvais chemin lors de la "phase cinétique" du repliement, comme le suggère Fersht (1995b) ?

D'autres intermédiaires, comme le pré-globule fondu, ont été décrits (Jeng, Englander, 1991). Cette espèce contient un taux significatif de structures secondaires fluctuantes, elle est moins compacte que le globule fondu et exhibe aussi des régions hydrophobes accessibles au solvant. Elle a été observée pendant la renaturation au froid de la  $\beta$ -lactamase (Uversky, Ptitsyn, 1994) et de l'anhydrase carbonique (Uversky, Ptitsyn, 1996). D'autre part, Fink *et al.* ont rapporté la présence de cet intermédiaire pour d'autres protéines (Fink, 1995).

En plus du globule fondu et du pré-globule fondu, des résultats expérimentaux montrent que la protéine se replie en donnant une population hétérogène d'intermédiaires partiellement repliés, en équilibre fluctuant (Plaxco, Dobson, 1996).

Des espèces hétérogènes, comme des populations multimériques (dimères, trimères), peuvent être observées pendant le repliement de certaines protéines [par exemple, la phosphoglycérate kinase (Pecorari *et al.*,

**Tableau 1.** Techniques biophysiques utilisées pour étudier le repliement des protéines — *Biophysical methods used in the study of the folding of proteins.*

Propriétés	Techniques	Résolution	Mesures
Compactage du cœur de la protéine	Fluorescence intrinsèque	< 1 ms	Orientation et environnement de la chaîne latérale du tryptophane (Engelhard, Evans, 1996a)
	Absorption aux UV	1 ms	Orientation et environnement de la chaîne latérale de la tyrosine (Udgaonkar, Baldwin, 1995)
	Fluorescence extrinsèque (ANS)	1 ms	Formation et interruption de segments hydrophobes (Engelhard, Evans, 1996b)
	Extinction de fluorescence	1 ms	Localisation de la chaîne latérale du tryptophane (Engelhard, Evans, 1996a)
	“Quenching CysteinyI”	10 s	Protection des chaînes latérales des cystéines (Ballery <i>et al.</i> , 1993)
Dimensions moléculaires	Anisotropie de fluorescence	1 ms	Mobilité de la chaîne du tryptophane et dimensions moléculaires globales (Jones <i>et al.</i> , 1995)
	Transfert d'énergie de fluorescence	1 ms	Distance scalaire entre un tryptophane et un fluorophore attachés covalamment (Rischel, Poulsen, 1995)
	Diffusion des rayons X aux petits angles	< 100 ms	Rayon de giration moyen (Eliezer <i>et al.</i> , 1995)
	Diffusion de la lumière quasi élastique	1 s	Rayon de giration moyen (Feng, Widom, 1994)
Structures secondaires et liaisons hydrogènes persistantes	Dichroïsme circulaire dans l'UV lointain	1 ms	Conformation du squelette, moyennée sur la séquence et la population étudiée (Evans, Radford, 1994)
	RMN en marquage pulsé	5–10 ms	Formation de liaisons hydrogènes stables du squelette peptidique (Baldwin, 1993)
	Spectroscopie de masse en marquage pulsé	5–10 ms	Formation de liaisons hydrogènes persistantes pour les intermédiaires du repliement (Miranker <i>et al.</i> , 1996)
Contacts tertiaires et structure native	Activité biologique	1 ms–1 s	Formation de la structure tertiaire native et du site actif (Evans, Radford, 1994)
	Repliement interrompu	10 ms	Vitesse de dépliement des intermédiaires discrets (Schreiber, Fersht, 1993)
	Dichroïsme circulaire en proche UV	1 ms	Formation de contacts tertiaires stables (entre aromatiques, pont disulfures) (Evans, Radford, 1994)
	RMN en temps réel	1 s	Formation de contacts tertiaires entre chaînes latérales spécifiques (Balbach <i>et al.</i> , 1995)
	Ingénierie des protéines		Contribution énergétique des chaînes latérales aux intermédiaires (Fersht, 1995c)

1996)]. Ces populations, observées transitoirement, mènent la protéine monomérique native à l'étape lente du repliement.

Il semble qu'au vu de ces nombreuses observations, on peut suggérer que l'étape précoce passe par la formation rapide d'intermédiaires (transitoires) qui possèdent un pourcentage élevé de structures secondaires et un faible taux de structures tertiaires (Dobson, 1991). Le ou les chemins de repliement empruntés semblent dépendre des protéines étudiées et des conditions expérimentales. Néanmoins, il semble que le premier événement du repliement soit un collapsus

hydrophobe ayant lieu avant la formation des structures secondaires (Dill, 1985). Le repliement serait initié par la condensation de la chaîne polypeptidique grâce aux interactions hydrophobes, puis cette étape serait suivie d'un réarrangement d'un petit nombre d'états condensés (Dill *et al.*, 1993). De nombreuses données expérimentales montrent que le collapsus hydrophobe serait le mécanisme précurseur du repliement (Shortle, Abeygunawarda, 1993). Ensuite, les chemins de repliement suivis pourraient être ceux du *Jigsaw Puzzle*, de la diffusion-collision, de la nucléation, ou de la nucléation-condensation, etc.

**Les évènements tardifs du repliement.** Ils se situent après la formation du globule fondu et avant la formation de la protéine native et fonctionnelle. Dans cette phase, on voit apparaître les sites de liaisons au substrat ou au ligand (sites de liaisons au  $\text{Ca}^{2+}$  de l' $\gamma$ -lactalbumine (Kuwajima *et al.*, 1989) par exemple), ou des épitopes réactifs dans la sous-unité de la tryptophane synthase (Blond-Elguindi, Goldberg, 1990). C'est dans cette étape limitante qu'apparaissent également l'activité enzymatique [structures II<sup>es</sup> et III<sup>es</sup> bien agencées (Matousek *et al.*, 1990), compaction hydrophobe correcte (Lecomte, Matthews, 1993)], l'assemblage des sous-unités dans les protéines oligomériques (Ptitsyn, 1991) ou des domaines dans les protéines multidomaines (Jaenicke, 1987), et le remaniement des ponts disulfures (Levitt, Chothia, 1976). Il faut noter que les ponts disulfures ne semblent jouer qu'un rôle stabilisateur de la structure 3-D, le repliement étant dirigé majoritairement par des interactions non covalentes.

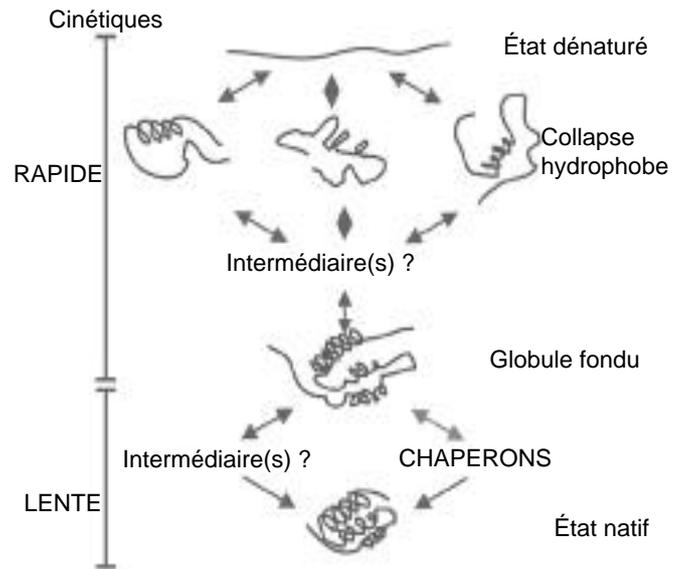
La proline jouerait des rôles particuliers au cours des évènements tardifs du repliement (Brandts *et al.*, 1975). Par exemple, certaines mutations de la proline ne semblent pas modifier le repliement, d'autres diminueraient la vitesse, enfin, certaines pourraient le bloquer (Levitt, 1981).

#### Que se passe-t-il pour les protéines multimériques ?

Les domaines protéiques sont généralement considérés comme des unités de repliement autonomes, de même que les sous-unités des protéines oligomériques. Pour les protéines oligomériques, l'association entre sous-unités a lieu lors de l'étape finale du repliement, induisant des réajustements conformationnels pour générer les propriétés fonctionnelles de la protéine. Mais des scénarios différents sont décrits selon les protéines (Baldwin, 1996b ; Creighton, 1994). Par exemple, les fragments C-terminaux de la thermolysine semblent se replier de façon autonome et coopérative pour un nombre d'hélices supérieur ou égal à trois (Vita *et al.*, 1989), alors que les expériences menées sur les fragments du BPTI montrent que les sous-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).

Les résultats théoriques et expérimentaux permettent de poser quelques principes de base sur le repliement (**Figure 2**) qui peuvent être schématisés comme suit.

1. Le repliement d'une chaîne polypeptidique paraît être largement déterminé par sa séquence, cela est en accord avec le postulat d'Anfinsen. Pour la plupart des protéines, la structure native est sous contrôle thermodynamique (la structure native serait une structure dont l'énergie appartiendrait au bassin d'énergie



**Figure 2.** Scénario probable pour le repliement des protéines — *Probable scenario of the folding of proteins.*

minimum). L'existence de chemins de repliement paraît être compatible avec le fait que les intermédiaires partiellement repliés sont sous contrôle cinétique. La chaîne polypeptidique semble explorer ses routes de repliement vers la structure native, en passant par des intermédiaires formant des populations hétérogènes d'espèces partiellement repliées dont le nombre diminue au fur et à mesure que la protéine évolue vers la conformation présentant le minimum énergétique (**Figure 1**). Certaines espèces pourraient être piégées de façon transitoire dans des minima locaux, ceci ralentissant le processus de repliement.

2. Initialement, le collapsus hydrophobe semble générer une population hétérogène avec des noyaux de structures natives et non natives en équilibre fluctuant, avec par exemple, des réarrangements internes comme le proposent les modèles du *Jigsaw Puzzle* (Harrison, Durbin, 1985) ou de diffusion-collision (Karplus, Weaver, 1976). Puis, les noyaux repliés correctement peuvent ensuite s'associer pour générer des microdomaines qui diffusent et s'associent. Un globule fondu peut se former.

Ces trois évènements précoces ont lieu très rapidement. À partir du globule fondu démarre l'étape de cinétique lente. Le processus de repliement suit des voies plus contraintes : il y a formation des structures tertiaires, appariement des domaines, et les derniers arrangements conformationnels se mettent en place. Remarquons que lors du repliement, il y a compétition cinétique (Yon, 1996) entre un repliement correct et une agrégation.

De telles situations peuvent avoir lieu aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Mitraki *et al.*, 1991). Par exemple, des protéines étrangères surexprimées dans les cellules bactériennes peuvent former des corps d'inclusions insolubles. Ou bien, le repliement anormal de certaines protéines peut donner des plaques amyloïdes, responsables de maladies sévères (Perutz, 1996 ; Perutz, 1997 ; Kelly, 1998).

### 2.3. Chaperons et repliement des protéines *in vivo*

Certaines protéines, même celles dont les ponts disulfures ont été rompus par des agents dénaturants, sont capables de se replier spontanément. Il a longtemps été postulé que le repliement d'une chaîne se faisait *in vivo* par les mêmes mécanismes que ceux démontrés *in vitro*. Cette vue a été modifiée par la découverte des chaperons moléculaires (Ellis, 1992 ; Jaenicke, 1993 ; Buchner, 1996 ; Clarke, 1996 ; Ellis, 1996).

Les chaperons, par leur association transitoire avec des protéines naissantes ou déstabilisées par un stress, sont capables d'empêcher un mauvais repliement ou une agrégation (association au chaperon par des interactions hydrophobes). Par contre, elles ne semblent pas pouvoir interagir avec les protéines natives ou se lier à une chaîne totalement dépliée. Elles régulent la vitesse de repliement en agissant comme des catalyseurs mais ne paraissent pas remettre en question le postulat d'Anfinsen selon lequel l'information nécessaire au repliement est contenue dans la séquence primaire. Il semble qu'*in vivo* peu de protéines nécessitent la présence de chaperons pour se replier correctement (Yon, 1997).

D'autres molécules accessoires peuvent jouer un rôle dans le repliement, comme la protéine disulfide isomérase, la peptidyl proline cis-trans isomérase. Ces enzymes accélèrent ledit processus (Schmid, 1990 ; Lorimer, 1992) (qui peut aussi avoir lieu en leur absence *in vitro* sous des conditions précises). D'autres modifications, comme les glycosylations, ne semblent pas changer le chemin de repliement, ni *in vivo*, ni *in vitro*, par contre elles augmentent la stabilité de la protéine (DeKoster, Robertson, 1997) et modifient son adressage.

Enfin, notons que l'étude du comportement particulier des protéines thermophiles pourrait apporter beaucoup à la compréhension des mécanismes de repliement et de stabilisation des protéines (Petukhov *et al.*, 1997 ; Vogt, Argos, 1997).

Les informations tant expérimentales que théoriques sur le mécanisme de repliement des protéines sont abondantes dans la littérature. Néanmoins aucun schéma consensus et prédictif n'existe en cette fin du 20<sup>e</sup> siècle. La compréhension de ce mécanisme fondamental sera certainement le centre d'évolution de la biotechnologie des protéines au 21<sup>e</sup> siècle.

### Remerciements

Robert Brasseur est directeur de recherche au FNRS. Ce travail a été supporté par le "Interuniversity Poles of Attraction Programme – Belgian State, Prime Minister's Office – Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs" PAI contract n° P4/03. Le travail de Nora Benhabiles a été supporté par un grant FNRS Télévie.

### Bibliography

- Alexandrov NN., Go N. (1994). Biological meaning, statistical significance, and classification of local spatial similarities in nonhomologous proteins. *Protein Sci.* **3**, p. 866–875.
- Anfinsen CB. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, p. 223–230.
- Anfinsen CB., Scheraga HA. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* **29**, p. 205–300.
- Anfinsen CB., Haber E., Sela M., White FH. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **47**, p. 1309–1314.
- Bai Y., Sosnick TR., Mayne L., Englander SW. (1995). Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science* **259**, p. 192–197.
- Balbach J., Forge V., VanNuland NAJ., Winder SL., Hore PJ., Dobson CM. (1995). Following protein-folding in real time using NMR-spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* **2**, p. 865–870.
- Baldwin RL. (1975). Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, p. 453–475.
- Baldwin RL. (1993). Pulsed H/D exchange studies intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, p. 84–91.
- Baldwin RL. (1996a). Why is protein folding so fast ? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, p. 2627–2628.
- Baldwin RL. (1996b). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding Des.* **1** (1), R1–8.
- Ballery N., Desmadril M., Minard P., Yon JM. (1993). Characterisation of an intermediate in the folding pathway of phosphoglycerate kinase: chemical reactivity of genetically introduced cysteinyl residues during the folding process. *Biochemistry* **33**, p. 708–714.
- Ballew RM., Sabelko J., Gruebele M. (1996a). Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events. *Nat. Struct. Biol.* **3**, p. 923–926.
- Ballew RM., Sabelko J., Guebele M. (1996b). Direct observation of fast protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, p. 5759–5764.
- Blond-Elguindi S., Goldberg ME. (1990). Kinetic characterization of early immunoreactive intermediates during the refolding of guanidine-unfolded *Escherichia coli* tryptophan synthase  $\alpha$  subunits. *Biochemistry* **29**, p. 2409–2417.

- Blundell TL., Johnson MS. (1993). Catching a common fold. *Protein Sci.* **2**, p. 877–883.
- Brandts JF., Halvorson HR., Brennan M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein folding is due to cis-trans isomerism of proline residue. *Biochemistry* **14**, p. 4953–4963.
- Bryngelson JD., Wolynes PG. (1987). Spin-glass and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, p. 7524–7528.
- Bryngelson JD., Onuchic JN., Socci ND., Wolynes PG. (1995). Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **21**, p. 167–195.
- Buchner J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**, p. 10–19.
- Camacho CJ., Thirumalai D. (1993). Kinetics and thermodynamics of folding in model proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, p. 6369–6372.
- Chaffotte AF., Cadieux C., Guillou Y., Goldberg ME. (1992). A possible folding initial intermediate: the C-terminal proteolytic domain of tryptophan synthase chain folds in less than 4 milliseconds into a condensed state with non-native-like secondary structure. *Biochemistry* **31**, p. 4303–4308.
- Chamberlain AK., Marqusee S. (1997). Touring the landscapes: Partially folded proteins examined by hydrogen exchange. *Structures* **5**, p. 859–863.
- Chan HS., Dill KA. (1998). Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **30**, p. 2–33.
- Chothia C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, p. 537–572.
- Chothia C. (1992). One thousand families for the molecular biologist. *Nature* **357**, p. 543–544.
- Clarke AR. (1996). Molecular chaperones in protein folding and translocation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 43–50.
- Clarke J., Itzhaki LS., Fersht AR. (1997). Hydrogen exchange at equilibrium: a short cut for analysing protein-folding pathways? *Trends Biochem. Sci.* **22**, p. 284–287.
- Creighton TE. (1984). Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol.* **107**, p. 305–329.
- Creighton TE. (1994). The energetic ups and downs of protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **1**, p. 135–138.
- Dagget V., Levitt M. (1993). A model of the molten globule state from molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **232**, p. 600–619.
- Daggett V., Li AJ., Itzhaki LS., Otzen DE., Fersht AR. (1996). Structure of the transition-state for folding of a protein-derived from experiment and simulation. *J. Mol. Biol.* **257**, p. 430–440.
- DeKoster GT., Robertson AD. (1997). Thermodynamics of unfolding for Kazal-type serine protease inhibitors: entropic stabilization of ovomucoid first domain by glycosylation. *Biochemistry* **36**, p. 2323–2331.
- Deleu M., Wathélet B., Brasseur R., Paquot M. (1998). Aperçu des techniques d'analyse conformationnelle des macromolécules biologiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2** (4), p. 234–247.
- Dill KA. (1985). Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* **24**, p. 1501–1509.
- Dill KA. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, p. 7113–7155.
- Dill KA., Fiebig KM., Chan HS. (1993). Cooperativity of protein folding kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, p. 1942–1946.
- Dill KA., Bromberg S., Yue K., Fiebig KM., Yee DP., Thomas PD., Chan HS. (1995). Principles of protein folding: a perspective from simple extract models. *Protein Sci.* **4**, p. 561–602.
- Dobson CM. (1991). Characterization of protein folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, p. 22–27.
- Eliezer D., Jennings PA., Wright PE., Doniach S., Hodgson SK., Tsuruta H. (1995). The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate. *Science* **270**, p. 487–488.
- Ellis J. (1992). Protein folding. Cytosolic chaperonin confirmed. *Nature* **358**, p. 191.
- Ellis RJ. (1996). The “bio” in biochemistry: protein folding inside and outside the cell. *Science* **272**, p. 1448–1449.
- Engelhard M., Evans PA. (1996a). Experimental investigation of side chain interactions in early folding intermediates. *Folding Des.* **1**, p. 31–37.
- Engelhard M., Evans PA. (1996b). Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci.* **4**, p. 1553–1562.
- Evans PA., Radford SE. (1994). Probing the structure of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, p. 100–106.
- Feng HP., Widom J. (1994). Kinetics of compaction during lysozyme refolding studied by continuous-flow quasielastic light scattering. *Biochemistry* **33**, p. 13382–13390.
- Fersht AR. (1995a). Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, p. 10869–10873.
- Fersht AR. (1995b). Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, p. 79–84.
- Fersht AR. (1995c). Mapping the structure of transition states and intermediates in folding: delineation of pathways at high resolution. *Philos. Trans. R. Soc. London* **438**, p. 11–15.
- Fersht AR. (1997). Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, p. 3–9.
- Fink AL. (1995). Compact intermediate states in protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, p. 495–522.
- Finkelstein AV., Ptitsyn OB. (1987). Why do globular

- proteins fit the limited set of folding patterns? *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **50**, p. 171–190.
- Freedman RB. (1992). Protein folding in the cell. In T. Creighton (ed). *Protein folding* New York: WH Freeman p. 455–538.
- Godzik A., Skolnick J., Kolinski A. (1992). Simulations of the folding pathway of triose phosphate isomerase-type / barrel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, p. 2629–2633.
- Govindarajan S., Goldstein RA. (1995). Optimal local propensities for model proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **22**, p. 413–418.
- Guo ZY., Thirumalai D. (1995). Kinetics of protein folding: nucleation mechanism, time scale, and pathways. *Biopolymers* **36**, p. 83–102.
- Guo Z., Thirumalai D. (1996). Kinetics and thermodynamics of folding of a de-novo designed 4-helix bundle protein. *J. Mol. Biol.* **263**, p. 323–343.
- Guo Z., Thirumalai D. (1997). The nucleation-collapse mechanism in protein folding: evidence for the uniqueness of the folding nucleus. *Folding Des.* **2**, p. 377–391.
- Harrison S., Durbin R. (1985). Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, p. 4028–4030.
- Jaenicke R. (1987). Folding and association of proteins. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **49**, p. 117–237.
- Jaenicke R. (1993). Role of accessory proteins in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, p. 104–112.
- Jagannadham MV., Balasubramanian D. (1985). The molten globule intermediate form in the folding pathway of human carbonic anhydrase. *FEBS Lett.* **188**, p. 326–330.
- Jeng MF., Englander SW. (1991). Stable submolecular folding units in a non compact form of cytochrome c. *J. Mol. Biol.* **221**, p. 215–228.
- Jones E., Beechem JM., Matthews CR. (1995). Local and global dynamics during the folding of E. coli dihydrofolate reductase by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **34**, p. 1867–1877.
- Karplus M., Sali A. (1995). Theoretical studies of protein folding and unfolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, p. 58–73.
- Karplus M., Weaver DL. (1976). Protein folding dynamics. *Nature* **260**, p. 404–406.
- Karplus M., Weaver DL. (1994). Protein folding dynamics: the collision–diffusion model and experimental data. *Protein Sci.* **3**, p. 650–668.
- Karplus M., Sali A., Shakhnovich EI. (1995). Kinetics of protein folding. *Nature* **373**, p. 664–665.
- Kataoka M., Goto Y. (1996). X-ray solution scattering studies of protein folding. *Folding Des.* **1**, p. R107–R114.
- Kauzmann W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Prot. Chem.* **14**, p. 1–64.
- Kim PS., Baldwin RL. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, p. 459–489.
- Kelly JW. (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, p. 101–106.
- Kolinski A., Skolnick J. (1994). Monte Carlo simulations of protein folding, I – Lattice model and interaction scheme. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **18**, p. 338–352.
- Kuwajima K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular protein structure. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **6**, p. 87–103.
- Kuwajima K. (1996). The molten state of  $\alpha$ -lactalbumin. *FASEB J.* **10**, p. 102–109.
- Kuwajima K., Mitani M., Sugai S. (1989). Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific calcium binding on the folding kinetics of  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Mol. Biol.* **206**, p. 547–561.
- Lecomte JT, Matthews CR. (1993). Unravelling the mechanism of protein folding: new tricks for an old problem. *Prot. Eng.* **6**, p. 1–10.
- Levinthal C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* **65**, p. 44–45.
- Levitt M. (1981). Effect of proline residues in protein folding. *J. Mol. Biol.* **145**, p. 251–263.
- Levitt M., Chothia C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature* **261**, p. 552–558.
- Levitt M., Warshel A. (1975). Computer simulation of protein folding. *Nature* **253**, p. 693–698.
- Lifson S., Roig A. (1961). On the theory of helix-coil transition in polypeptides. *J. Chem. Phys.* **34**, p. 1963–1974.
- Lorimer GH. (1992). Role of accessory proteins in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, p. 26–34.
- Matagne A., Dobson CM. (1998). The folding process of hen lysozyme: a perspective from the “new view”. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, p. 363–371.
- Matheson RR., Scheraga HA. (1978). A method for predicting nucleation sites for protein folding based on hydrophobic contacts. *Macromolecules* **11**, p. 814–829.
- Matousek A., Kellis JT., Serrano L., Bycroft M., Fersht AR. (1990). Transient folding intermediates characterized by proteins engineering. *Nature* **346**, p. 440–445.
- Miranker A., Robinson CV., Radford SE., Dobson CM. (1996). Investigation of protein folding by mass spectroscopy. *FASEB J.* **10**, p. 93–101.
- Missiakas D., Betton JM., Chaffotte A., Yon JM. (1992). Kinetic studies of the refolding of yeast phosphoglycerate kinase: comparison with the isolated engineered domains. *Protein Sci.* **1**, p. 1485–1493.
- Mitraki A., Fane B., Haase-Pettinger C., Sturtevant J., King J. (1991). Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* **253**, p. 54–58.
- Moore PB. (1997). Ribosomes: Protein synthesis in slow motion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, p. R179–R181.
- Nötling B., Golbik R., Fersht AR. (1995). Submillisecond events in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**,

- p. 10668–10672.
- Oas TG., Kim PS. (1988). A peptide model of a protein intermediate. *Nature* **336**, p. 42–48.
- Ohgushi M., Wada AA. (1983). Molten globule state: a compact form of protein with mobile side chains. *FEBS Lett.* **164**, p. 21–24.
- Orengo CA., Jones DT., Thornton JM. (1994). Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**, p. 631–634.
- Pande VS., Grosberg AY., Tanaka T., Rokhsar DS. (1998). Pathways for protein folding: is a new view needed? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, p. 68–79.
- Pecorari F., Minard P., Desmadril M., Yon JM. (1993). Structure and functional complementation of engineered fragments from yeast phosphoglycerate kinase. *Protein Eng.* **6**, p. 313–325.
- Pecorari F., Minard P., Desmadril M., Yon JM. (1996). Occurrence of transient multimeric species during the refolding of a monomeric protein. *J. Biol. Chem.* **271**, p. 5270–5276.
- Perutz MF. (1996). Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 848–858.
- Perutz MF. (1997). Amyloid fibrils. Mutations make enzyme polymerize. *Nature* **385**, p. 773.
- Petukhov M., Kil'Y., Kuramitsu S., Lanzov V. (1997). Insight into thermal resistance of proteins from the intrinsic stability of their  $\alpha$ -helices. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **29**, p. 309–320.
- Plaxco KW., Dobson CM. (1996). Time-relaxed biophysical methods in the study of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 630–636.
- Ptitsyn OB. (1991). How does protein synthesis give rise to the 3-D structure? *FEBS Lett.* **285**, p. 176–181.
- Ptitsyn OB. (1995). Structures of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, p. 74–78.
- Ptitsyn OB. (1996). How molten is the molten globule? *Nat. Struct. Biol.* **3**, p. 488–490.
- Ptitsyn OB., Finkelstein AV. (1980). Similarities of protein topologies: evolutionary divergence, functional convergence or principles of folding? *Q. Rev. Biophys.* **13**, p. 339–386.
- Ptitsyn OB., Rashin AA. (1973). Stagewise mechanism of protein folding. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **213**, p. 473–475.
- Ptitsyn OB., Pain RH., Semisotnov GV., Zerovnik E., Rzgulyaev OI. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.* **26**, p. 20–24.
- Rischel C., Poulsen FM. (1995). Modification of a specific tyrosine enables tracing of the end-to-end distance during apomyoglobin folding. *FEBS Lett.* **374**, p. 105–109.
- Roder H. (1995). Watching protein folding unfold. *Nat. Struct. Biol.* **2**, p. 817–820.
- Sali A., Shakhnovich EI., Karplus M. (1994a). Kinetics of protein folding: A lattice model study of the requirements for folding to the native state. *J. Mol. Biol.* **235**, p. 1614–1636.
- Sali A., Shakhnovich EI., Karplus M. (1994b). How does a protein fold? *Nature* **369**, p. 248–251.
- Sancho J., Ferscht AR. (1992). Dissection of an enzyme by protein engineering. *J. Mol. Biol.* **224**, p. 741–747.
- Schindler TS., Herrier M., Marahiel MA., Schmid FX. (1995). Extremely rapid folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.* **2**, p. 663–673.
- Schmid FX. (1990). Catalysis and assistance in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, p. 36–41.
- Schreiber G., Fersht AR. (1993). The refolding of cis- and trans-peptidylprolyl isomers of bastar. *Biochemistry* **32**, p. 11195–11203.
- Schulz GE. (1977). Structural rules for globular proteins. *Angew. Chem.* **16**, p. 23–32.
- Shortle DR. (1996). Structural analysis of non-native states of proteins by NMR methods. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, p. 24–30.
- Shortle D., Abeygunawardana C. (1993). NMR analysis of the residual structure in the denatured state of an unusual mutant of staphylococcal nuclease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, p. 121–134.
- Skolnick J., Kolinski A. (1990). Simulations of the folding of a globular protein. *Science* **250**, p. 1121–1125.
- Socchi ND., Onuchic JN., Wolynes PG. (1998). Protein folding mechanisms and the multidimensional folding funnel. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **32**, p. 136–158.
- Sosnick TR., Mayne L., Hiller R., Englander SW. (1994). The barriers in protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **1**, p. 149–156.
- Taketomi H., Kano F., Gô N. (1988). The effect of amino acid substitutions on protein folding and unfolding transition studied by computer simulations. *Biopolymer* **27**, p. 527–560.
- Tanford C. (1970). Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Prot. Chem.* **24**, p. 1–95.
- Udgaonkar JB., Baldwin RL. (1995). Nature of the early intermediates of ribonuclease A. *Biochemistry* **34**, p. 4088–4096.
- Uversky VN., Ptitsyn O. (1994). Partly folded state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of  $\alpha$ -lactamase at low temperature. *Biochemistry* **33**, p. 2782–2791.
- Uversky VN., Ptitsyn O. (1996). Further evidence on the equilibrium “pre-molten globule state”: four state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J. Mol. Biol.* **255**, p. 215–228.
- Vidugiris GJ., Royer CA. (1998). Determination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule, and unfolded states. *Biophys. J.* **75**, p. 463–470.
- Vidugiris GJA., Markley JL., Royer CA. (1995). Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes.

- Biochemistry* **34**, p. 4909–4912.
- Viguera AR., Serrano L., Wilmanns M. (1996). Different folding transition-states may result in the same native structure. *Nat. Struct. Biol.* **3**, p. 874–880.
- Vita C., Fontana A., Jaenicke R. (1989). Folding of thermolysin fragments: hydrodynamic properties of isolated domains and subdomains. *Eur. J. Biochem.* **183**, p. 513–518.
- Vogt G., Argos P. (1997). Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing. *Folding Des.* **2**, p. S40–S46.
- Wang Z. (1996). How many fold types of protein are in nature? *Proteins Struct. Func. Genet.* **26**, p. 186–191.
- Weissman JA., Kim PS. (1992). Reexamination of the folding of BPTI: predominance of native intermediates. *Science* **253**, p. 1386–1393.
- Wetlauffer D. (1973). Nucleation, rapid folding and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, p. 697–701.
- Wetlauffer DB. (1981). Folding of protein fragments. *Adv. Protein Chem.* **34**, p. 61–92.
- Wetlauffer DB., Ristow S. (1973). Acquisition of the 3-D structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **42**, p. 135–158.
- Williams S., Causgrove TP., Gilmanshin R., Fang KS., Callender RH., Woodruff WH., Dyer RB. (1996). Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry* **35**, p. 691–697.
- Wolynes PG., Onuchic JN., Thirumalai D. (1995). Navigating the folding routes. *Science* **267**, p. 1619–1620.
- Yon JM. (1996). Protein aggregation. In Meyers RA. (ed). *Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine V* Weinheim VCH., Germany, p.73–93.
- Yon JM. (1997). Protein folding: concepts and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, p. 557–567.
- Zimm BH., Bragg JK. (1959). Theory of the phase transition between helix and random coil polypeptide chains. *J. Chem. Phys.* **31**, p. 526–535.

(140 réf.)