



Relations structure - fonction des transporteurs mitochondriaux

Iulia Blesneac

► **To cite this version:**

Iulia Blesneac. Relations structure - fonction des transporteurs mitochondriaux. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2010. Français. <tel-00675938>

HAL Id: tel-00675938

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00675938>

Submitted on 2 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCE DU VIVANT

THÈSE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Iulia BLESNEAC

le 7 juillet 2010

Relations structure - fonction des transporteurs
mitochondriaux

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel
sous la direction d'**Eva Pebay-Peyroula** et sous la co-direction de **Michel Vivaudou**

Composition du jury

Bruno Miroux	Rapporteur
Catherine Berrier	Rapporteur
Uwe Schlattner	Président
Eva Pebay-Peyroula	Examinatrice
Michel Vivaudou	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Eva et Michel pour m'avoir accueilli et guidé pendant la thèse. Votre confiance, aide, conseils et capacité à interpréter positivement les résultats ont été extrêmement précieux.

Merci Bruno pour ton aide et soutien pendant cette thèse et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci Catherine, pour ton rôle de rapporteur et pour m'avoir enseigné une technique que j'ai bien aimé : le patch clamp sur liposomes géants. Merci à Uwe Schlattner d'avoir accepté d'examiner ce travail et de présider le jury de thèse.

Un grand MERCI à Stéphanie. Tu m'a beaucoup aidé et soutenu pendant cette thèse et je te serai toujours très reconnaissante pour cela. C'était un vrai plaisir de t'avoir à côté de moi dans le monde difficile des transporteurs mitochondriaux.

Merci Céline, pour tout le temps passé à me montrer différentes techniques, pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci Jean pour m'avoir guidé dans mes premiers pas en biologie moléculaire et électrophysiologie. Merci Jean-Luc et Lavinia pour m'avoir appris la synthèse *in vitro* et merci Bernard pour m'avoir fourni les composés fluorés si précieux pour ce travail. Merci Sandrine et Manuela pour toutes vos merveilleuses preps d'UCP1. Merci Guy et Daphna pour avoir regardé mes liposomes bizarres en microscopie électronique, Dominique pour le joli spectre CD et Jérôme et Lionel pour le temps passé à regarder des pics invisibles en RMN. Merci Annie et Florent pour votre implication dans le projet CEA-PM.

Merci Vivi pour ton amitié, ton soutien et tes conseils. Tu as toujours été là pour moi et toutes nos discussions autour d'un thé ou biscuit vont beaucoup me manquer. Merci Carmen, ma merveilleuse compagne de bureau, pour ta gentillesse, amitié et pour tout ton support.

Thank you Vera and Pankaj. It was a pleasure to be part of the same team.

Merci Jean-Michel, Andrea et Frank pour tous vos précieux conseils et encouragements. Merci à Tof pour avoir répondu à toutes mes nombreuses questions liés à l'enseignement ou la science. Merci à Isabelle pour ton aide et pour les merveilleux bouquins que tu m'as fait découvrir.

Merci dans le désordre à Katya, Richard, Andreja, Lydia, Ieva, David, PJ, Juliette, Antoine M, Antoine P, Céline L.,Thierry, Claire, Corinne, Michel, Hien-Ahn, Anne-Emmanuelle, Argel, Lina, Eric, Georges, Anne, Catherine, Casey et à tous les membres du LPM et IBS. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail dans les meilleures conditions matérielles et humaines. J'ai pris vraiment plaisir à travailler en votre compagnie.

Merci à la « international team » de la Houille Blanche : Elvis, Amith, Min, Fabio, Bridgette, Harry, Heddi, Rafik, Ali, Camille, Francesco, Rita pour toutes les dîners, soirées , discussions et randonnées. Sans votre amitié et bonne humeur, ma vie à Grenoble n'aurait pas été la même.

Merci Yanik pour ta confiance et ton soutien quotidien.

Mulțumesc părinților, bunicilor și surorii mele fără de care această teză de doctorat nu ar fi existat. Voi sunteți cei care ați făcut-o posibilă.

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	4
<i>Liste des tableaux</i>	5
<i>Abréviations</i>	6
<i>Avant-propos</i>	9
Chapitre I Introduction	13
I.A La mitochondrie	13
I.A.1 Historique, morphologie, dynamique	13
I.A.2 Fonctions mitochondriales	16
I.B Les transporteurs mitochondriaux	17
I.B.1 Les transporteurs ADP/ATP	19
I.B.1.1 Petite histoire de la découverte	19
I.B.1.2 Rôle physiologique, isoformes et pathologies associées	20
I.B.1.3 Inhibiteurs et conformations	21
I.B.1.4 Structure	23
I.B.1.5 Caractéristiques du transport	24
I.B.1.6 Autres fonctions de l'AAC	26
I.B.2 Les protéines découplantes UCP (Uncoupling Proteins)	27
I.B.2.1 La protéine découplante UCP1	27
I.B.2.1.1 Petite histoire de la découverte	27
I.B.2.1.2 Rôle physiologique	28
I.B.2.1.3 Topologie	30
I.B.2.1.4 UCP1 - transporteur de protons	31
I.B.2.1.5 UCP1 - transporteur d'anions	36
I.B.2.1.6 Mécanisme de transport de protons	37
I.B.2.2 Les autres UCPs	39
I.C Production des transporteurs mitochondriaux	39
I.C.1 Transporteur ADP/ATP	40
I.C.1.1 Expression chez <i>E. coli</i>	40
I.C.1.2 Expression chez la levure	41
I.C.2 Protéine découplante UCP1	41
I.C.2.1 Expression chez <i>E. coli</i>	41
I.C.2.2 Expression chez la levure	42
I.D Production des protéines membranaires - un défi	42
I.E Objectifs de ce travail	43
Chapitre II - Matériel & Méthodes	47
II.A Produits chimiques	47
II.A.1 Milieux de culture	47
II.A.2 Surfactants et lipides	47
II.B Matériel biologique	47

II.C	Techniques générales d'analyse biochimique et biophysique	48
II.C.1	Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	48
II.C.2	Immunodétection (Western blot)	49
II.C.3	Chromatographie d'exclusion	49
II.C.4	RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)	50
II.D	Techniques de biologie moléculaire	50
II.D.1	Les ADNc utilisés	50
II.D.2	Les vecteurs d'expression	51
II.D.3	Préparation de l'ADN, dosage, amplification par PCR	51
II.D.4	Techniques de clonage	52
II.D.4.1	Clonage classique en utilisant des enzymes de restriction	52
II.D.4.2	Clonage sans enzyme de restriction (Restriction Free Cloning)	52
II.D.4.3	Réalisation des constructions	53
II.E	Purification des transporteurs mitochondriaux natifs	55
II.E.1	Purification des mitochondries du tissu adipeux brun	55
II.E.2	Purification d'UCP1 à partir des mitochondries	55
II.F	Production des protéines recombinantes	56
II.F.1	La synthèse <i>in vitro</i>	56
II.F.1.1	Tests d'expression	56
II.F.1.2	Production des protéines à l'échelle préparative	56
II.F.1.3	Purification	57
II.F.2	Expression chez <i>E. coli</i>	57
II.F.2.1	Tests d'expression chez <i>E. coli</i>	57
II.F.2.2	Expression à l'échelle préparative	58
II.F.2.2.1	Solubilisation des membranes	59
II.F.2.2.2	Purification	59
II.F.3	L'expression en ovocyte de xénope	60
II.G	Techniques d'analyse fonctionnelle	61
II.G.1	Test fonctionnel spectrophotométrique	61
II.G.1.1	Préparation des liposomes	61
II.G.1.2	Incorporation de la protéine	61
II.G.1.3	Mesures d'activité	62
II.G.2	Test fonctionnel basé sur la mesure des courants électriques	62
II.G.2.1	Préparation des liposomes	62
II.G.2.2	Incorporation de la protéine	63
II.G.2.3	Mesures d'activité	63
II.G.3	Test fonctionnel AAC - Radioactivité	63
II.G.4	Double électrode - Two Electrode Voltage-Clamp (TEVC)	64
Chapitre III	Résultats & Discussion : Transporteurs mitochondriaux natifs	67
III.A	Purification d'UCP1 native	67
III.B	Tests d'activité d'UCP1	68
III.B.1	Test fonctionnel spectrophotométrique	69
III.B.2	Test fonctionnel basé sur la mesure des courants électriques	71
III.B.2.1	Détection d'un courant spécifique à l'UCP1	72
III.B.2.2	Effet de la congélation des liposomes	74
III.B.2.3	Stabilité du signal	74
III.B.2.4	Effet des acides gras	75
III.B.2.5	Effet des ions chlorure	78
III.B.3	Test SURFE2R - avantages et désavantages	78
Chapitre IV	Résultats & discussion : Transporteurs mitochondriaux recombinants	83
IV.A	La synthèse <i>in vitro</i> des transporteurs mitochondriaux	83
IV.A.1	Principe de la synthèse <i>in vitro</i>	83
IV.A.2	Mise au point des conditions de synthèse	85
IV.A.2.1	Vers une protéine soluble...	86
IV.A.2.1.1	La solubilisation du culot	87

IV.A.2.1.2	La production en présence de surfactants	87
IV.A.2.1.3	Expression en présence de liposomes	92
IV.A.3	Mise au point de l'expression d'autres transporteurs mitochondriaux	93
IV.A.4	Synthèse à l'échelle préparative - RTS 500	94
IV.A.5	Purification	95
IV.A.6	Analyse biophysique de la protéine purifiée	98
IV.A.6.1	Analyse par chromatographie d'exclusion de taille	98
IV.A.6.2	Analyse par RMN	99
IV.A.7	Analyse fonctionnelle de la protéine	99
IV.A.7.1	Test fonctionnel spectrophotométrique	99
IV.A.7.2	Test fonctionnel basé sur la mesure de courants électriques	102
IV.A.8	La synthèse <i>in vitro</i> - une méthode efficace de production de transporteurs mitochondriaux ?	103
IV.B	Expression chez <i>E. coli</i>	105
IV.B.1	Protéines de fusion	105
IV.B.1.1	Protéines de fusion avec Mystic	106
IV.B.1.1.1	Criblage des conditions optimales d'expression	106
IV.B.1.1.2	Expression de Mystic-rUCP1 dans les membranes	108
IV.B.1.1.3	Solubilisation des membranes exprimant Mystic-rUCP1	108
IV.B.1.1.4	Expression dans les membranes et solubilisation des autres transporteurs mitochondriaux	109
IV.B.1.1.5	Fonctionnalité des protéines de fusion avec Mystic	110
IV.B.1.2	Protéines de fusion avec MBP	112
IV.B.1.2.1	Criblages des conditions d'expression et purification des protéines de fusions MBP	113
IV.B.1.2.2	Étude des propriétés fonctionnelles des fusions MBP	115
IV.B.1.3	L'expression chez <i>E. coli</i> – un système efficace de production de transporteurs mitochondriaux ?	118
IV.C	Expression en ovocytes de xénope	120
Chapitre V	Conclusions et perspectives	125
Annexes		129
Bibliographie		139
Publications et communications orales		159

Liste des figures

Figure 1. Structure d'une mitochondrie.....	14
Figure 2. Topologie des transporteurs mitochondriaux basée sur la structure de l'AAC bovin (d'après Pebay Peyroula 2003).....	17
Figure 3. Rôle d'AAC dans la mitochondrie.....	20
Figure 4. Localisation des mutations pathologiques.....	21
Figure 5. Structure chimique des inhibiteurs d'AAC.....	22
Figure 6. Etats conformationnels du transporteur ADP/ATP.....	23
Figure 7. Structure du transporteur ADP/ATP bovin en complexe avec CATR (d'après Pebay-Peyroula 2004).....	24
Figure 8. Rôle d'UCP1 dans la mitochondrie.....	29
Figure 9. Alignement rUCP1-bAAC1.....	30
Figure 10. Structure chimique des nucléotides.....	32
Figure 11 Localisation des résidus impliqués dans la liaison du GDP sur le modèle tridimensionnel de hUCP1.....	33
Figure 12. Structure chimique d'un acide gras.....	35
Figure 13. Les deux mécanismes principaux proposés pour le transport H ⁺ d'UCP1.....	38
Figure 14. Principe du clonage RF.....	53
Figure 15. Purification de la protéine UCP1 en présence de Triton X-100.....	68
Figure 16. Principe du test fonctionnel spectrophotométrique d'UCP1.....	69
Figure 17. Mesure de l'activité d'UCP1-TX avec le test spectrophotométrique.....	70
Figure 18. Principe de la technologie SURFE2R.....	71
Figure 19. Mesure de l'activité de transport d'UCP1.....	73
Figure 20. Effet de la congélation des liposomes.....	74
Figure 21. Stabilité du signal en fonction du temps.....	75
Figure 22. Effet des acides gras / BSA.....	76
Figure 23. Effet de l'acide l'aurique.....	77
Figure 24. Effet des ions chlorure sur l'activité d'UCP1.....	78
Figure 25. Représentation schématique des systèmes RTS 100 et 500.....	84
Figure 26. Représentation schématique des constructions utilisées pour la synthèse <i>in vitro</i> de rUCP1.....	85
Figure 27. Synthèse <i>in vitro</i> de rUCP1-pIVEX 2.4a et rUCP1-pIVEX 2.3 MCS.....	86
Figure 28. Solubilisation du culot obtenu par synthèse <i>in vitro</i> de rUCP1.....	87
Figure 29. Effet de la concentration des surfactants sur la solubilité de rUCP1.....	90
Figure 30. Structure chimique du cardiolipide.....	92
Figure 31. Synthèse <i>in vitro</i> de rUCP1 en présence de F ₈ TAC ₅ et Brij35.....	94
Figure 32. Analyse du surnageant de la synthèse <i>in vitro</i>	95
Figure 33. Purification de rUCP1 par chromatographie d'affinité sur résine de nickel.....	97
Figure 34 Analyse par chromatographie d'exclusion de taille de rUCP1.....	98
Figure 35. Courbe de solubilisation des liposomes par le Triton X-100.....	100
Figure 36. Vérification de l'incorporation en liposomes d'UCP1.....	101
Figure 37. Vérification de l'incorporation en liposomes d'UCP1.....	102
Figure 38. Criblage des conditions d'expression de Mistic-rUCP1 dans les membranes d' <i>E. coli</i>	108
Figure 39. Criblage des détergents pour la solubilisation des membranes exprimant rUCP1-Mistic.....	109
Figure 40. Principe du test fonctionnel d'AAC.....	110
Figure 41. Activité des protéines de fusion avec Mistic.....	111
Figure 42. Activité d'AtAAC avec ou sans MBP.....	112
Figure 43. Expression et activité des protéines de fusion MBP chez <i>E. coli</i>	113
Figure 44. Criblage des détergents pour la solubilisation des membranes exprimant MBP-hAAC1.....	114
Figure 45. Inhibition des fusions MBP par BA et CATR.....	115
Figure 46. Spécificité du transporteur ADP/ATP pour les nucléotides.....	116

Figure 47. Cinétiques de MBP-hAAC1 et MBP-alvAAC.....	117
Figure 48. Expression des transporteurs mitochondriaux en ovocyte de xénope	121
Figure 49. Structure chimique de DDM	131
Figure 50. Structure chimique du SDS	132
Figure 51. Structure chimique de LAPAO	132
Figure 52. Structure chimique de la digitonine.....	132
Figure 53. Structure chimique du F ₈ TAC ₅	133
Figure 54. Structure chimique du C _n U _m	133
Figure 55. Structure chimique de l'amphipole A8:35	134

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition en phospholipides des membranes plasmiques et mitochondriales chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (d'après Zinser <i>et al.</i> 1991)	15
Tableau 2. Description des souches bactériennes utilisées	48
Tableau 3. Protéines utilisées	50
Tableau 4. Vecteurs utilisés.....	51
Tableau 5. Constructions réalisées.....	54
Tableau 6. Influence des surfactants sur la solubilité de rUCP1	88
Tableau 7. Effet des additifs sur la solubilité d'UCP1	91
Tableau 8. Synthèse <i>in vitro</i> de rUCP1 en présence des liposomes	92
Tableau 9. Effet des surfactants et additifs sur la solubilité des transporteurs mitochondriaux	93
Tableau 10. Influence des conditions d'expression sur le niveau d'expression des transporteurs mitochondriaux chez <i>E. coli</i>	107

Abréviations

ADP	Adénosine di-phosphahte
AAC	Transporteur ADP/ATP (<i>ADP/ATP Carrier</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine mono-phosphahte
ARN	Acide ribonucléique
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphahte
ATR	Atractyloside
BA	Acide bongkréique
Brij	Polyoxyethylene-glycol-ether
BSA	Serum albumin bovine
C ₁₀ E ₅	n-Decylpentaoxyethylene
CATR	Carboxy-attractyloside
CCCP	Carbonyl cyanide phényl hydrazone
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CL	Cardiolipide
CMC	Concentration micellaire critique
C-ter	Partie C-terminale de la proteine
Cymal5	Cyclohexyl-pentyl-maltoside
Da	Dalton
DDM	n-dodecyl beta-D-maltoside
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
DO	Densité optique
FC	Fos-choline
GDP	Guanosine di-phosphate
GMP	Guanosine mono-phosphate
GTP	Guanosine tri-phosphate
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
His ₆	hexahistidine
k _M	Constante d'affinité
k _I	Constante d'inhibition
LAPAO	3-(laurylamido)-N,N'-dimethylaminopropylamine oxide
LB	Lysogeny broth
LDAO	Lauryldimethylamine-oxide
MCF	Famille de transporteurs mitochondriaux

N _A	Nombre d'agrégation
N-ter	Partie N-terminale de la protéine
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
MBP	Maltose Binding Protein
MW	Masse moléculaire (<i>Molecular weight</i>)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SASS	Séquence signale de l'albumine du sérum humain
SDS	Dodécylsulfate de sodium
TB	Terrific Broth
Triton X-100	Polyoxyethylene octyl phenyl ether
UCP	Protéine découplante (<i>Uncoupling Protein</i>)
(v/v)	Rapport volume/volume
(w/v)	Rapport masse/volume (<i>weight/volume</i>)
(w/w)	Rapport masse/poids (<i>weight/weight</i>)

Avant-propos

Le projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse concerne l'étude structure-fonction de deux sous-familles de transporteurs mitochondriaux : les AAC (ADP-ATP carrier) et les UCP (Uncoupling proteins). Il s'agit d'un projet ambitieux et difficile qui n'a pas abouti à une étude structure-fonction complète. Cependant il m'a permis de réaliser des études fonctionnelles de transporteurs mitochondriaux et de mettre en place au laboratoire de nouvelles techniques et stratégies ouvrant ainsi des perspectives pour des études futures.

Ce mémoire présente ce travail. Il est structuré en cinq chapitres.

Le premier chapitre, l'introduction, présente le contexte de cette étude. Je présente successivement, du plus général au plus spécifique : la mitochondrie, la famille des transporteurs mitochondriaux puis les principales connaissances relatives à l'AAC et à l'UCP.

Le deuxième chapitre présente les matériels et méthodes employés au cours de cette étude. La partie résultats et discussions est structurée en deux chapitres qui traitent des études effectuées sur des transporteurs mitochondriaux natifs (purifiés à partir du tissu natif) ou sur des transporteurs mitochondriaux recombinants (produits en utilisant différents systèmes d'expression hétérologues). Enfin, le dernier chapitre est consacré à une conclusion globale de cette étude et aux perspectives.

Chapitre I

Introduction

Chapitre I Introduction

I.A La mitochondrie

Une des différences fondamentales entre une cellule eucaryote et une cellule procaryote est la présence dans les cellules eucaryotes d'organites divisant l'espace cellulaire en compartiments spécialisés. La mitochondrie est un de ces organites et elle joue un rôle primordial dans le fonctionnement de la cellule. Elle est notamment le siège de la production de l'ATP, molécule à haut potentiel énergétique qui intervient dans la plupart des voies métaboliques cellulaires. Les mitochondries fournissent 90% de l'énergie utilisée par nos cellules et sont considérées comme « les centrales énergétiques » de la cellule.

I.A.1 Historique, morphologie, dynamique

La première mention des mitochondries remonte à 1857 quand Kolliker (Université de Wurtzbourg, Allemagne) les décrit dans les fibres musculaires cardiaques mais il faudra attendre la fin du XIX^{ème} siècle pour une caractérisation plus précise et pour qu'elles soient reconnues comme organites. Leur nom a été donné par Benda en 1898 et provient du grec « mitos », fil, et « chondros », grain, ce qui fait référence à leur forme variable, soit cylindrique soit sphérique.

Leur forme et nombre varient en fonction du type cellulaire. Par exemple dans les cellules élaboratrices d'hormones stéroïdiennes les mitochondries sont filamenteuses avec un diamètre allant de 0,2 μm à 20 μm de long, alors que dans les hépatocytes (foie), elles sont granulaires, avec un diamètre de 0,5-5 μm . Leur nombre est proportionnel aux besoins énergétiques de la cellule et peut aller de quelques unités à plusieurs milliers. Cependant il est relativement vain de décrire avec précision la forme des mitochondries ou de les dénombrer

exactement car elles ne sont pas des organites statiques : elles peuvent augmenter ou diminuer de volume, fusionner entre elles ou se fragmenter et tout cela dans un laps de temps n'excédant pas quelques minutes. Les mécanismes de fusion et de fission ont été beaucoup étudiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue voir Okamoto & Shaw 2005)

Toutefois, quel que soit le type observé, les mitochondries présentent une structure similaire : elles sont entourées par une enveloppe formée de deux membranes, membrane externe et membrane interne (Figure 1.A et B). La membrane interne délimite l'espace matriciel et l'espace entre les deux membranes est appelé espace inter-membranaire.

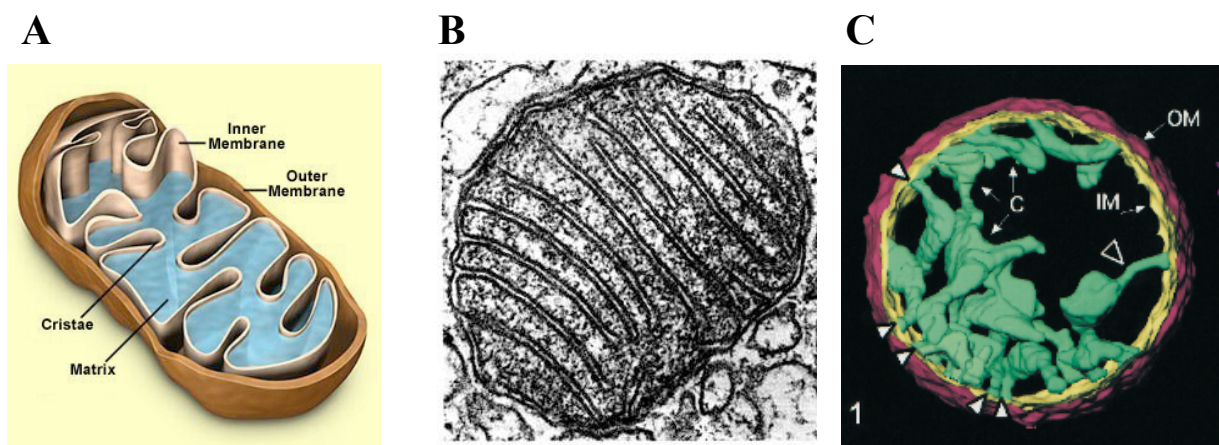


Figure 1. Structure d'une mitochondrie

A. Schéma en coupe

B. Vue en coupe par microscopie électronique

C. Vue en 3D des crêtes mitochondriales par tomographie électronique (Manella 2001)

OM- membrane externe, IM- membrane interne, C- crêtes, flèches pleines - point de contact des crêtes avec la périphérie de la membrane interne

Les deux membranes ont des compositions et des fonctions différentes. La membrane externe est lisse et composée, comme la membrane plasmique, de 40% de lipides et 60% de protéines. Elle est caractérisée par une grande perméabilité aux ions et aux petites molécules. Cette perméabilité est principalement due à la présence de VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), une protéine homologue aux porines bactériennes, qui est perméable à des molécules d'une taille inférieure à 5000 Da. Il en résulte que l'espace inter-membranaire a une composition très proche de celle du cytoplasme.

Au contraire, la membrane interne est imperméable à la plupart des ions ou métabolites. C'est une membrane assez particulière caractérisée par sa richesse en protéines

(80%) et en cardiolipide (plus de 15% des lipides) (voir Tableau 1). Une caractéristique de la membrane interne est aussi son potentiel membranaire très élevé (autour de -180 mV) (Kamo 1979) par rapport à celui de la membrane plasmique (entre- 40 mV et -80 mV à l'état de repos). La membrane interne se replie pour former de nombreuses crêtes (cristae), ce qui a pour conséquence d'augmenter sa surface totale d'échange. Grâce à la microscopie et tomographie électronique, il a été montré que ces cristae ne sont pas des simples invaginations de la membrane mais plutôt des micro-compartiments internes, sous forme des tubules ou saccules, connectées à la périphérie de la membrane interne par des jonctions (Manella 2001) (Figure 1C)

	PC	PE	PI	PS	CL	PA
Membrane mitochondriale externe	45,6%	32,6%	10,2%	1,2%	5,9%	4,4%
Membrane mitochondriale interne	38,4%	24,0%	16,2%	3,8%	16,1%	1,5%

Tableau 1. Composition en phospholipides de la membrane mitochondriale externe et interne chez *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Zinser *et al.* 1991)

On peut remarquer la richesse en CL de la membrane mitochondriale interne. Le pourcentage (w/w) est donné par rapport aux phospholipides totaux. Les pourcentages sont très proches des ceux observés chez les mammifères (pour revue van Meer 2008). PC- phosphatidylcholine PE- phosphatidyléthanolamine, PI- phosphatidylinositol, PS- phosphatidylsérine, CL-cardiolipide, PA- acide phosphatidique

Cette topologie de la membrane interne a un effet sur la diffusion interne des métabolites et protéines solubles et régule ainsi différentes activités mitochondriales (comme la synthèse de l'ATP). Jusqu'à ce jour deux protéines ont été décrits comme étant impliquées dans la morphologie de la membrane interne : une GTP-ase appelé Mgm1p chez les levures et OPA1 chez les mammifères et l'ATP synthase (pour revue voir Mannella 2008).

Cette composition et structure particulières de la mitochondrie ainsi que d'autres observations (comme le fait que la mitochondrie est capable de se diviser indépendamment de la cellule, qu'elle a son propre génome et ses propres ribosomes et ARNs de transfert similaires à ceux bactériens) ont conduit à la théorie de l'origine endosymbiotique de la mitochondrie, proposée par Lynn Margulis dans les années 1970. Selon cette théorie, les mitochondries proviennent de l'endocytose des procaryotes avec lesquelles une cellule eucaryote primitive aurait entretenu une relation symbiotique. La bactérie originelle pourrait

être apparentée aux α -protéobactéries de la famille de *Rickettsia* (Falah & Gupta 1994), selon des analyses des arbres phylogénétiques d'ARN ribosomiaux (Yang 1985), des protéines chaperonnes (Viale 1994) et des cytochromes (Sicheritz-Pontén 1998).

Au cours de l'évolution, la mitochondrie s'est spécialisée dans la production de l'énergie en condition aérobie. La majorité des gènes de l'endosymbionte originel a été perdue ou bien transférée vers le noyau de la cellule hôte. Aujourd'hui, l'ADN mitochondrial humain est circulaire et contient 37 gènes qui codent pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiaux et 13 protéines qui font partie des complexes de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires, synthétisées dans le cytosol et puis importées dans la mitochondrie. Le génome mitochondrial se transmet par la mère. Son étude permet donc de retracer les relations généalogiques entre les individus seulement selon la voie maternelle.

I.A.2 Fonctions mitochondriales

La mitochondrie exerce un rôle essentiel dans la respiration cellulaire qui a comme conséquence la production d'ATP. En effet, les dernières étapes du métabolisme du glucose (avec le cycle de Krebs) et des acides gras (dont la β -oxydation) prennent place dans la matrice mitochondriale. Les produits de ces processus (NADH et FADH₂) s'oxydent en transférant leurs électrons aux complexes de la chaîne respiratoire. Le transfert d'électrons au sein des protéines de la chaîne respiratoire génère un gradient de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. Ce gradient est utilisé par l'ATP synthase pour catalyser la synthèse d'ATP à partir d'ADP et du phosphate inorganique. La découverte de ce couplage chimio-organique valut à Mitchell (Mitchell 1961) le prix Nobel en 1978.

Parmi les autres fonctions importantes de la mitochondrie, on peut citer : participation à la mort cellulaire programmée (apoptose) et à la prolifération cellulaire, protection contre le stress oxydant, la synthèse de l'hème et des hormones stéroïdes, le maintien de l'homéostasie calcique et la production de chaleur. Cette dernière fonction va être expliquée plus en détail page 28.

I.B Les transporteurs mitochondriaux

Vu la diversité et l'importance des fonctions que la mitochondrie assure, un échange rapide et spécifique des molécules entre le cytosol et la matrice mitochondriale est nécessaire. Cet échange est principalement réalisé par des protéines de la membrane mitochondriale interne appelées transporteurs mitochondriaux. Ces transporteurs ont des caractéristiques communes ce qui a permis leur rassemblement au sein d'une famille, la famille MCF (Mitochondrial Carrier Family) :

- une structure tripartite qui consiste en 3 domaines homologues d'environ 100 acides aminés chacun, probablement générée par des événements de duplication anciens successifs ; chaque répétition/domaine est formée de 2 hélices transmembranaires connectées par une boucle (Figure 2)
- une séquence signature P-X-(D/E)-X-X-(K/R)-X-(K/R)-...20-30 résidus...- (D/E)-G-X-X-X-X-(W/Y/F)-(K/R)-G
- ils sont tous codés par des gènes nucléaires
- leur masse moléculaire est comprise entre 30 et 35 kDa
- d'après leur séquence ils contiennent probablement six hélices transmembranaires
- ils ont un point isoélectrique élevé (autour de 9)

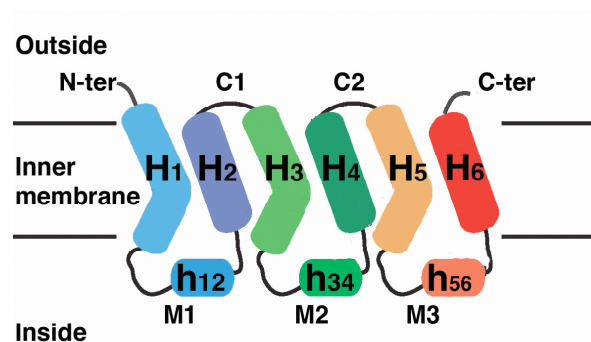


Figure 2. Topologie des transporteurs mitochondriaux basée sur la structure de l'AAC bovin (d'après Pebay Peyroula 2003)

Le transporteur ADP/ATP et la protéine découplante UCP ont été les premiers membres de la famille des transporteurs mitochondriaux à être découverts. En se basant sur les caractéristiques énoncées ci-dessus, d'autres membres de la famille ont été découverts par la suite : 35 chez *Saccharomyces cerevisiae*, 59 chez *Arabidopsis Thaliana* et 50 chez l'humain (Palmieri & Pierri 2009). Actuellement, chez l'humain, la famille MCF est la plus grande parmi les familles de transporteurs SLC (Solute Carriers). Aucun homologue n'a jamais été encore observé chez les organismes procaryotes. La plupart des transporteurs mitochondriaux sont présents chez tous les organismes eucaryotes. Néanmoins il y a quelques exceptions comme le transporteur GDP/GTP (Vozza 2004) qui n'est pas présent chez les mammifères et les plantes, et qui est donc une cible potentielle de médicaments contre des parasites qui attaquent les plantes ou les humains.

Les substrats transportés par les transporteurs mitochondriaux sont très divers tant du point de vue de leur nature (anionique, cationique, zwitterionique) que de leur structure ou dimension. Les substrats peuvent être très petits comme le proton ou très grands comme l'ATP, le NAD⁺ ou la coenzyme A. En se basant sur la spécificité du substrat transporté, sur l'alignement de séquence de plusieurs MCF et sur la connaissance de la structure d'AAC bovin, Robinson & Kunji (2006) ont proposé un site de liaison du substrat commun à tous les membres de la MCF. Ce site serait formé par des résidus des hélices transmembranaires paires.

Les transporteurs mitochondriaux sont codés par le génome nucléaire et doivent donc être importés dans la membrane interne de la mitochondrie (pour revue Rehling 2004). Alors que de nombreuses protéines mitochondriales portent une séquence d'adressage N-terminale qui permet leur importation, ce n'est pas le cas pour la plupart des transporteurs mitochondriaux qui sont dénués d'une telle séquence. Les mécanismes de leur adressage sont encore mal connus, mais il semblerait que certaines séquences internes interagissent entre elles pour former un élément d'adressage tridimensionnel (De Marcos Lousa 2006). Plusieurs étapes distinctes de l'importation ont été identifiées : à la sortie du ribosome, la protéine est prise en charge par des chaperons (Hsp70 et Hsp90) et transportée vers le complexe général d'import TOM (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane) de la membrane externe mitochondriale. Elle est transportée par celui-ci vers l'espace intermembranaire où des membres du complexe d'import TIM (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) se chargent de les insérer dans la membrane interne sous une forme correctement repliée (Chacinska 2009).

Deux familles de transporteurs mitochondriaux ont fait l'objet de cette étude : les transporteurs ADP/ATP et les protéines découplantes UCPs. Les deux seront présentées ci-dessous.

I.B.1 Les transporteurs ADP/ATP

Une fois synthétisé, l'ATP doit sortir de la mitochondrie pour pouvoir être utilisé par l'ensemble de la cellule. Sa sortie semble être couplée à l'entrée d'ADP dans la mitochondrie et cet échange de nucléotides est réalisé par le transporteur ADP/ATP également appelé AAC pour ADP/ATP Carrier. Grâce à son abondance naturelle dans certains tissus et à la découverte d'inhibiteurs spécifiques, AAC est le membre de la famille des transporteurs mitochondriaux le plus étudié et fut le premier à être découvert. On retrouve des AACs chez tous les organismes eucaryotes. En plus du motif signature des transporteurs mitochondriaux, les AACs sont tous caractérisés par un enchaînement d'arginines et de méthionines de type RRRMMM dans la partie C-terminale de leur séquence.

I.B.1.1 Petite histoire de la découverte

C'est en étudiant les cas d'intoxication provoquée par l'ingestion des racines d'une plante appelée *Atractylis gummifera*, que l'existence d'AAC a été mise en évidence. Cette plante contient un poison, appelée atractyloside qui inhibe la phosphorylation oxydative de l'ADP dans les mitochondries (Bruni 1962 ; Vignais 1962). Il a été démontré que cette substance inhibait de façon spécifique la fixation de l'ADP sur la membrane mitochondriale (Bruni 1965) et l'échange transmembranaire des adénines nucléotides (Pfaff 1965 ; Duee & Vignais 1965). La cible de cette molécule a été identifiée comme étant une protéine qui transporte des adénines nucléotides, protéine nommée par la suite transporteur ADP/ATP (Klingenberg & Pfaff 1966). Ce n'est qu'en 1975 que cette protéine a été purifiée à partir du cœur du bœuf (Riccio 1975). En 1982 sa séquence protéique est déterminée (Aquila 1982) et en 2003 sa structure tridimensionnelle en complexe avec son inhibiteur est résolue (Pebay-Peyroula 2003).

I.B.1.2 Rôle physiologique, isoformes et pathologies associées

Le rôle d'AAC est de transporter l'ATP néo-synthétisé de la matrice mitochondriale vers le cytosol, en échange de l'ADP (Figure 3). Il existe plusieurs isoformes d'AAC et leur niveau d'expression dépend du type de tissu et du stade de développement (Stepien 1992). Chez l'humain, 4 isoformes ont été décrites : AAC1 est l'isoforme dominante dans les muscles cardiaques et squelettiques, AAC2 est faiblement exprimé dans tous les tissus, AAC3 est ubiquitaire et son niveau d'expression est proportionnel à l'activité respiratoire, AAC4 est exprimé dans le foie, les testicules et le cerveau (Stepien 1992 ; Dolce 2005).

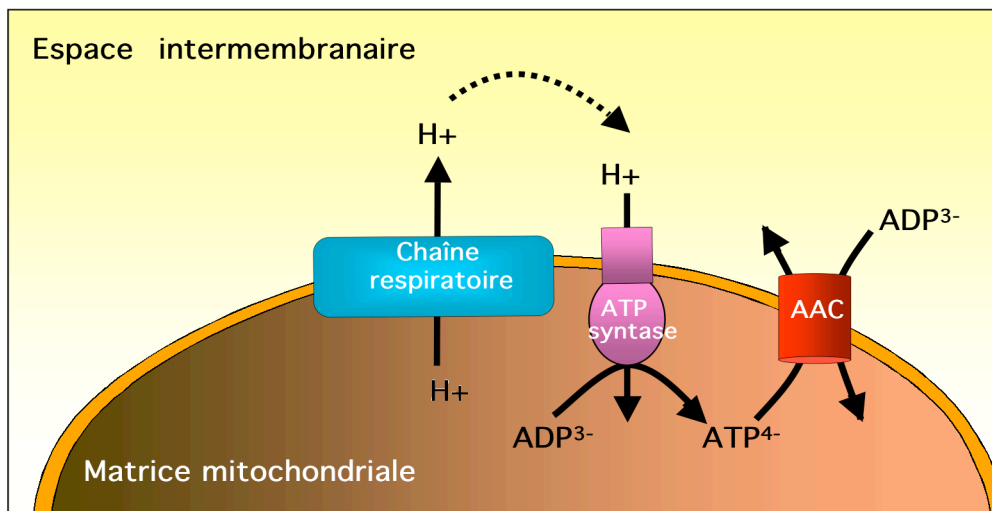


Figure 3. Rôle d'AAC dans la mitochondrie

Au cours de la phosphorylation oxydative, la chaîne respiratoire crée un gradient de protons qui est utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP. L'ATP synthétisé est transporté dans le cytosol par l'AAC en échange de l'ADP. L'ATP peut ensuite être utilisé par l'ensemble de la cellule.

À cause de sa fonction physiologique clef dans le métabolisme énergétique de la cellule, des défauts de l'AAC ont des conséquences physiopathologiques graves. Ceci a été premièrement mis en évidence par la construction de lignées transgéniques de souris, dont les gènes codant pour les isoformes AAC1 et AAC2 ont été inactivés. L'inactivation d'AAC1 donne des animaux présentant une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des fibres musculaires (Graham 1997) et l'inactivation d'AAC2 est létale avant la naissance (Kokoszka 2001). Des déficiences de l'AAC ont été observées chez des patients atteints par différentes myopathies comme le syndrome de Senger ou l'ophtalmoplégie progressive externe (adPEO). Dans les tissus musculaires des patients atteints par le syndrome de Senger le niveau

d'expression d'AAC est fortement diminué, mais des mutations d'AAC n'ont pas été observées. Les autres maladies liées à l'AAC semblent être causées par des mutations dans AAC. Cinq mutations de l'AAC1 ont été décrites pour l'ophtalmoplégie (A90D, A114P, L98P, D104G, V289M) et une mutation (A123D) chez des patients souffrant d'une autre déficience d'AAC (Palmieri 2008) (voir **Figure 4**).

Certaines études suggèrent aussi l'implication de l'AAC dans le pore de transition de perméabilité et donc dans l'apoptose (pour revue voir Zhivotovsky 2009).

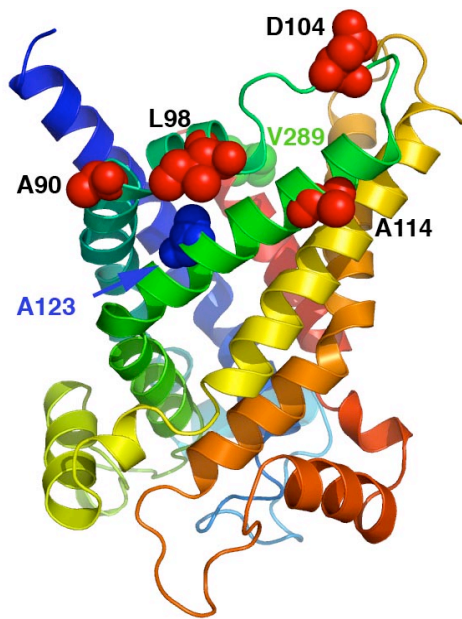


Figure 4. Localisation des mutations pathologiques

Les résidus présentant des mutations pathologiques sont représentés en rouge/vert (ophtalmoplégie) et bleu (une autre déficience d'AAC) sur la structure d'AAC bovin (98% d'identité de séquence avec l'AAC humain). Pour plus de détails sur la structure d'AAC voir paragraphe I.B.1.4

I.B.1.3 Inhibiteurs et conformations

L'étude de l'AAC a été facilitée par l'existence de deux familles de molécules qui inhibent la protéine de façon très spécifique : les atractylosides et les acides bongkréiques. Les deux molécules sont des poisons naturels, ont des structures et propriétés chimiques très différentes et présentent une haute affinité pour l'AAC (Figure 5).

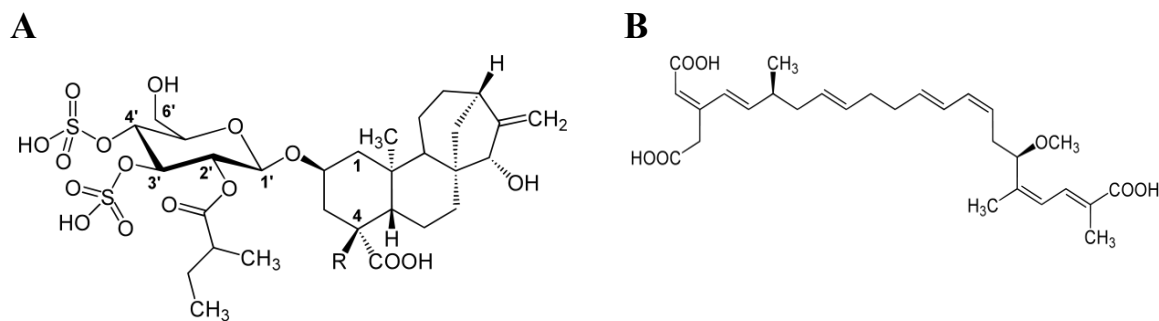


Figure 5. Structure chimique des inhibiteurs d'AAC

A. Les atractylosides : carboxyatractyloside (CATR, R=CCOH) et atractyloside (ATR, R=H)

B. L'acide bongkreique (BA)

La famille des **atractylosides** comprend l'atractyloside (ATR) et le carboxyatractyloside (CATR). Leur structure diffère par un groupement carboxyl supplémentaire pour le CATR. Ils proviennent d'une plante appelé *Atractylis gumifera*, un chardon du bassin méditerranéen. Les atractylosides ne peuvent pas passer la membrane mitochondriale interne; ils se fixent à l'AAC du côté de l'espace inter-membranaire (appelé pour la suite côté cytosolique car la composition de l'espace inter-membranaire est similaire à celle du cytosol). L'ATR est un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la fixation des nucléotides, ayant une constante de dissociation de l'ordre de 100 nM. Le CATR présente une affinité plus forte (constante de dissociation de l'ordre de 10 nM).

Les **acides bongkréiques** (acide bongkréique (BA) et isobongkréique (isoBA)) sont sécrétés par une bactérie (*Pseudomonas cocovenenans*) qui se développe sur la pulpe de la noix du coco. Ces composées sont des inhibiteurs non compétitifs, capables de traverser la membrane mitochondriale interne. Ils se fixent sur la protéine de côté matriciel avec une affinité voisine de celle du CATR (K_D d'environ 10 nM).

Au cours du transport des nucléotides, l'AAC passe par différents états conformationnels. Les conformations inhibées par le CATR et le BA sont décrites comme les conformations « extrêmes » adoptées par la protéine. Le complexe AAC-CATR est bloqué dans un état ouvert vers l'espace intermembranaire supposé être celui fixant l'ADP (appelé « c-state »). Le complexe AAC-BA est bloqué dans un état supposé être celui qui accepte un ATP depuis la matrice mitochondriale (appelé « m-state ») (Figure 6) (pour revue voir Brandolin 1993).

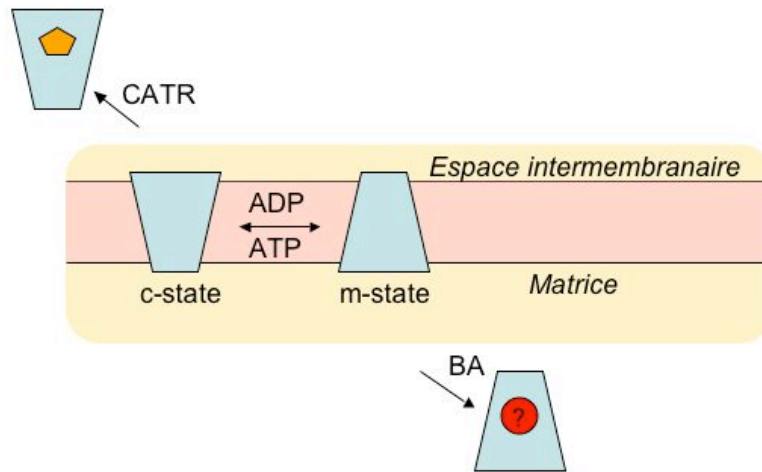


Figure 6. Etats conformationnels du transporteur ADP/ATP

Pendant le cycle normal de transport, AAC adopte plusieurs conformations. Il est supposé que parmi ces conformations, existent deux conformations dites « extrêmes » (c-state et m-sate) bloquées par la fixation d'inhibiteurs, respectivement CATR et BA

I.B.1.4 Structure

Grâce à l'effet stabilisant que les inhibiteurs exercent sur la protéine, deux études structurales de l'AAC en complexe avec CATR ont pu être réalisées : une carte de projection de l'AAC3 de la levure obtenue par microscopie électronique (8 Å de résolution) (Kunji 2003) et une structure tridimensionnelle d'AAC1 bovin par cristallographie aux rayons X (2,2 Å de résolution) (Pebay-Peyroula 2003).

La structure obtenue par cristallographie montre 6 hélices transmembranaires (H1 à H6) connectées par 3 boucles matricielles (M1 à M3) et deux boucles externes (C1 et C2). Les boucles matricielles sont partiellement structurées en hélices α (h12, h34, h56) parallèles à la membrane (Figure 7). Les hélices transmembranaires sont fortement inclinées par rapport à l'axe perpendiculaire à la membrane et les hélices impaires sont coudées (20-35°) au niveau des résidus prolines de la séquence signature. Ainsi que le laissait supposer la structure tripartite de la séquence, la structure tridimensionnelle peut être divisée en trois motifs présentant des repliements superposables. Chaque motif est constitué de 2 hélices transmembranaires reliées par une boucle matricielle. Une autre forme cristalline résolue plus tard dans notre laboratoire a révélé des molécules de cardiolipide étroitement liées à ces motifs (Nury 2005).

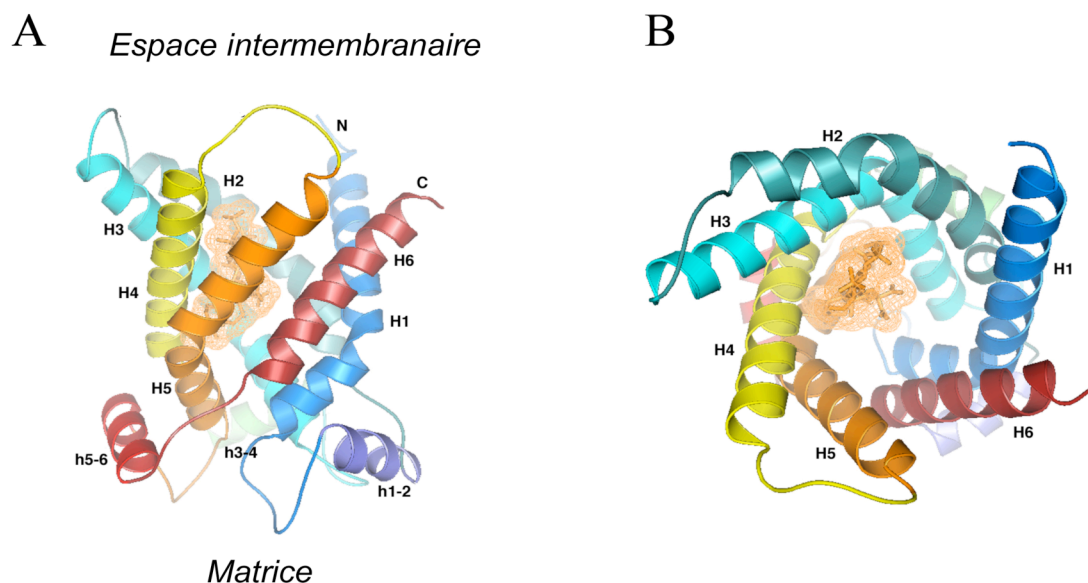


Figure 7. Structure du transporteur ADP/ATP bovin en complexe avec CATR (d'après Pebay-Peyroula 2004)

A. Vue latérale du complexe

B. Vue depuis l'espace intermembranaire

Les hélices sont colorées de bleu à rouge de l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale. Le volume occupé par CATR est entouré par un quadrillage orange

Les 6 segments transmembranaires délimitent, sur la face exposée à l'espace intermembranaire, une cavité profonde, hydrophile, et chargée positivement. Cette cavité est en forme de tronc conique, de diamètre maximal de 20 Å et profonde de 30 Å. La molécule de CATR se trouve au fond de cette cavité, maintenue par des nombreuses interactions avec la protéine, dont des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques. Cette structure permet d'expliquer la différence d'affinité entre CATR et ATR, la présence du groupement carboxyle supplémentaire pour le CATR augmentant les nombres de liaisons avec la protéine.

I.B.1.5 Caractéristiques du transport

Les caractéristiques du transport ADP/ATP ont été étudiées tant dans la mitochondrie isolée qu'en système reconstitué (protéine purifiée et incorporée en liposomes). Le transport est très spécifique envers l'ADP et l'ATP (la liaison de ces nucléotides est caractérisée par un K_D de l'ordre du μM) (Vignais 1985). Aucun autre nucléotide, ni même l'AMP ne peut être transporté (Pfaff & Klingenberg 1968). Toutefois, certains composés peuvent se fixer sur l'AAC sans être transportés. C'est le cas par exemple de : 8'Br-ATP, 2-azido ADP, 2-azido ATP, AMP (Klingenberg 2008). Ceci indique l'existence de deux étapes lors du transport : la fixation et puis le passage du substrat, la première étape étant moins restrictive.

Une stoechiométrie de 1:1 a pu être établie dans la mitochondrie. Un ATP^{4-} est échangé contre un ADP^{3-} . Seules les formes libres des nucléotides sont transportées, les complexes avec des cations comme le Mg^{2+} n'étant pas reconnus. Le transport est donc électrogénique, avec le transport d'une charge négative nette à travers la membrane. Les propriétés électrogéniques de l'AAC ont pu être mises en évidence par Brustovetsky *et al.* (1996) par l'enregistrement de courants associés à l'activité de transport de l'AAC. Ces enregistrements, qui ont été faits sur des protéoliposomes, montrent également la possibilité de transporter un seul nucléotide. Ceci est en contradiction avec des études précédentes démontrant la nécessité d'un échange 1:1 (Brandolin 1980). *In vivo*, il semble obligatoire que l'échange ait une stoechiométrie moyenne de 1:1 (Duée & Vignais 1965).

Le transport des nucléotides est un transport actif qui se fait dans le sens du champ électrique (donné par le potentiel membranaire). Le potentiel étant négatif à l'intérieur de la mitochondrie, l' ATP^{4-} va sortir en échange de l' ADP^{3-} qui va entrer dans la mitochondrie. Environ un tiers de l'énergie produite par la chaîne respiratoire est consommé par ce transport (Duszynski 1981). En système reconstitué, en inversant le potentiel membranaire, le transport est possible dans les deux directions (Klingenberg 1980).

La vitesse moyenne du transport mesurée dans les mitochondries de foie de rat à 18°C est de l'ordre de 600 min^{-1} (Klingenberg 1980). Cette activité est relativement faible, en sachant qu'un humain consomme chaque jour sa propre masse en ATP donc qu'environ 60 kg d'ADP et ATP sont échangés entre la mitochondrie et le reste de la cellule à travers l'AAC. Ceci est possible grâce à l'abondance du transporteur, qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines de la membrane interne (Vignais 1985).

En ce qui concerne l'unité fonctionnelle de transport, des études contradictoires apportent des preuves tant pour l'existence d'un dimère qu'un monomère. En solution, la protéine purifiée semble être monomérique (Bamber 2007, Nury 2008) mais la forme oligomérique du transporteur dans son environnement naturel, la membrane mitochondriale interne n'est pas encore clairement établie (pour revue Kunji 2010).

Plusieurs études suggèrent un mécanisme de transport séquentiel dans lequel les deux nucléotides se lient à l'AAC avant le transport (Duyckaerts 1980, Barbour 1981). Des études de photomarquage ont permis d'identifier du côté cytosolique quelques régions qui semblent

impliquées dans la liaison de l'ADP : F153-M200, Y250-M282 (Dalbon 1988) de l'AAC du boeuf, S183-R191 et I311-K318 (Dianoux 2000) de la levure. La structure de l'AAC permet aussi d'avancer des hypothèses quant à la liaison de l'ADP à la protéine. Dans la structure, on peut remarquer une cavité ouverte vers l'espace intermembranaire. L'ADP se lie probablement au fond de cette cavité. Des résidus chargés positivement (K22, R79 et R279) et une tyrosine (Y186) présents dans cette cavité, pourraient former un filtre de sélectivité en présélectionnant les nucléotides (Pebay-Peyroula & Brandolin 2004). Des travaux de modélisation et de dynamique moléculaire (Dehez 2008) de la forme apo-AAC (sans CATR) montrent en effet la présence dans la cavité, d'une sorte d'entonnoir électrostatique qui attire rapidement les nucléotides (chargés négativement) vers le fond de la cavité. La liaison de l'ADP à l'AAC pourrait entraîner un changement de conformation (les résidus proline P27, P132 et P229 en jouant le rôle charnières) permettant ainsi le transport.

I.B.1.6 Autres fonctions de l'AAC

Des études d'électrophysiologie (Brustovesky 1996, Brustovesky 2002) ont montré que'en présence de 1 mM Ca^{2+} , l'AAC peut être converti en un pore ayant une conductance de 600 pS en 100 mM KCl symétrique. Ce canal est inhibé par ADP et BA mais pas par CATR, il se ferme à des pH < 5,5 et il est régulé par le voltage à des potentiels supérieurs à 150 mV. Ces caractéristiques présentent des similarités avec le MTP (Mitochondrial Transition Pore). Cette observation, et celles d'autres études, ont conduit à l'hypothèse que l'AAC pourrait être un des composants du MPT et impliqué de cette manière dans l'apoptose.

Quelques études suggèrent aussi la participation de l'AAC dans la conductance de la membrane mitochondriale aux protons induite par les acides gras. En effet tant dans les mitochondries (Andreyev 1989), que dans des liposomes contenant la protéine purifiée (Brustovetsky 1994) une conductance aux protons induite par les acides gras a été observée, conductance sensible à l'ATR, l'inhibiteur spécifique de l'AAC.

I.B.2 Les protéines découplantes UCP (Uncoupling Proteins)

Une autre sous-famille très étudiée au sein de la famille des transporteurs mitochondriaux est celle des UCPs. De nombreuses espèces animales ou végétales contiennent des gènes codant pour des UCPs. La plupart des gènes décrits proviennent des mammifères, mais des gènes UCPs ont aussi été trouvés chez les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les plantes. Des tests fonctionnels suggèrent aussi leur présence chez les champignons et les protozoaires. À ce jour, plusieurs membres de cette sous-famille ont été décrits chez les mammifères : UCP1, UCP2 et UCP3. Le plus étudié et le premier à avoir été découvert est UCP1 (Nicholls 1976).

I.B.2.1 La protéine découplante UCP1

I.B.2.1.1 Petite histoire de la découverte

Des recherches datant des années 1960 montrent que le tissu adipeux brun (TAB), tissu ayant un rôle important dans la thermogenèse sans frisson, se distingue par le comportement original des mitochondries de ses adipocytes bruns. Si la respiration mitochondriale est relativement bien couplée à la production d'ATP pour la majorité des cellules, cette affirmation n'est plus valable pour les mitochondries des adipocytes bruns, leur respiration étant naturellement découplée de la synthèse de l'ATP.

Dans les années 1970, en étudiant les mitochondries du TAB de hamster, Nicholls *et al.* (Nicholls 1973; Nicholls 1974) remarquent leur grande perméabilité aux ions chlorure et aux protons, perméabilité fortement diminuée en présence de GDP et d'albumine (généralement utilisée pour piéger les acides gras). La perméabilité aux protons est vite reliée au potentiel de la membrane et au découplage de la respiration remarquée dans les mitochondries du TAB, le GDP et l'albumine étant nécessaires pour avoir un recouplage de la respiration. Détectant ensuite la présence d'un site de forte affinité pour le [³H]GDP, Nicholls propose en 1976 la présence d'une protéine liant le GDP, protéine qui serait responsable du découplage de la respiration (Nicholls 1976). En utilisant un photomarquage par des nucléotides radioactifs qui se lient de façon covalente à la protéine, Heaton *et al.* (1978) arrivent à identifier cette protéine de 32 kDa et l'appellent UCP (UnCoupling Protein). C'est

Lin et Klingenberg (Lin & Klingenberg 1980 ; Lin & Klingenberg 1982) qui mettront au point une méthode de purification de la protéine (en se basant sur la méthode de purification utilisée pour le transporteur ADP/ATP) et qui feront les premières caractérisations biochimiques de la protéine. En 1985, la séquence protéique d'UCP1 est déterminée par Aquila *et al.* Suivent de nombreuses études visant à mieux comprendre son mécanisme de transport, sa régulation, sa signification physiologique, etc. Aujourd'hui, après plus de 30 ans d'études, beaucoup de questions sont encore ouvertes concernant cette protéine. Ce manuscrit présentera de façon succincte les avancées principales dans la compréhension du fonctionnement de cette protéine ainsi que les questions pour lesquelles une réponse est encore nécessaire.

I.B.2.1.2 Rôle physiologique

UCP1 est une protéine présente majoritairement dans le tissu adipeux brun (TAB), un tissu très particulier dont le rôle principal est de fournir de la chaleur à l'organisme. Ce processus de production de chaleur est nommé la thermogenèse sans frisson car, contrairement au frisson thermique qui implique les muscles et qui épuise rapidement les réserves musculaires, le tissu adipeux brun produit de la chaleur tout en permettant à l'individu d'utiliser normalement ses muscles. Ce type de thermogenèse est induit généralement par une exposition au froid mais des études suggèrent aussi une induction par l'alimentation (Kopecky 1995).

Le tissu adipeux brun est présent chez tous les mammifères homéothermes. Il joue un rôle très important chez les animaux hibernants au moment du réveil et chez les petits rongeurs où il est présent durant toute la vie. Chez l'humain, on a longtemps cru qu'il n'était présent que chez les nouveau-nés pour pallier la baisse de température au moment de la naissance. Récemment, la présence de ce tissu a été démontrée chez l'humain adulte exposé au froid (van Marken Lichtenbelt 2009). Il est situé principalement dans la région supraclaviculaire et son activité est significativement réduite chez les humains obèses. Ceci indique un rôle potentiel dans le métabolisme de l'adulte. Des biopsies de ce tissu ont révélé la présence d'UCP1 en quantité importante (Virtanen 2009).

Quel est le lien entre l'UCP1, le découplage de la respiration et la production de chaleur par le tissu adipeux brun ? En réponse à une stimulation par le froid ou par d'autres facteurs (comme une alimentation très riche), le système nerveux sympathique stimule la lipolyse dans les adipocytes du TAB. Cette lipolyse génère des acides gras libres qui sont transportés dans la mitochondrie. Les acides gras participent à la β -oxydation mais activent aussi directement UCP1 qui, en transportant des protons vers la matrice mitochondriale, dissipe le gradient de protons créé par la chaîne respiratoire. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse d'ATP et un découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP (Figure 8). Ce découplage entraîne une augmentation de l'activité respiratoire et par conséquent une augmentation des réactions métaboliques de la cellule s'accompagnant d'une forte production de chaleur (Mattson 2010 ; Rousset 2004).

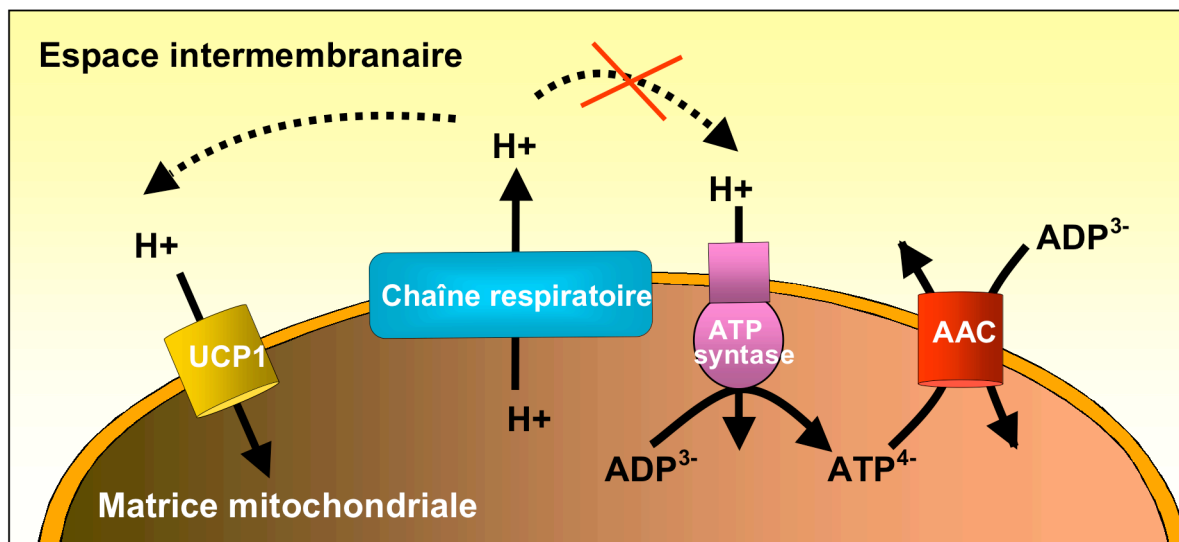


Figure 8. Rôle d'UCP1 dans la mitochondrie

Au cours de la phosphorylation oxydative, la chaîne respiratoire crée un gradient de protons qui est utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP. Lorsque UCP1 est présent et actif, il transporte ces protons dans la matrice en dissipant ainsi le gradient ce qui a comme conséquence un découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP et une forte production de chaleur

I.B.2.1.3 Topologie

UCP1 présente une topologie commune aux transporteurs mitochondriaux (comme décrite page 17). Ceci a pu être confirmé expérimentalement à l'aide de l'accessibilité d'anticorps spécifiques de certaines régions de la protéine (Miroux 1991 ; Miroux 1993). L'accessibilité aux protéases est également en accord avec cette topologie (Eckerskorn & Klingenberg 1987). Sa structure n'a pas encore été déterminée. Toutefois, en se basant sur la structure de l'AAC (21% d'identité de séquence protéique entre bAAC1 et rUCP1, voir Figure 9), des modèles de la structure secondaire et tridimensionnelle d'UCP1 ont pu être réalisés.

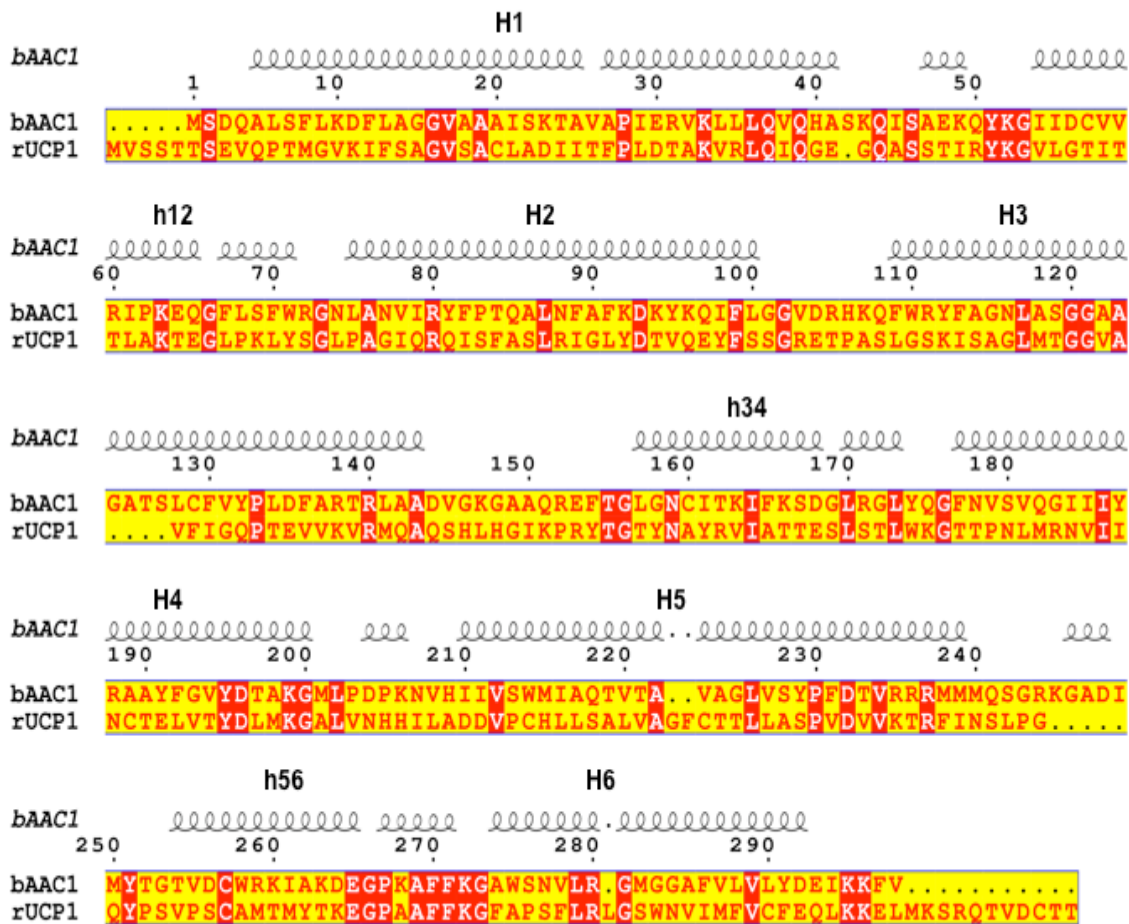


Figure 9. Alignement rUCP1-bAAC1

La structure secondaire de bAAC1 est reporté au-dessus de l'alignement. Les caractéristiques communes des transporteurs mitochondriaux laissent penser que cette structure secondaire peut s'appliquer à rUCP1

I.B.2.1.4 UCP1 - transporteur de protons

La fonction d'UCP1 est de transporter des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale (ou des OH⁻ dans l'autre sens). Ce sens de transport suit la force protomotrice de la membrane interne mitochondriale, force qui dépend du gradient de protons à travers la membrane ainsi que du potentiel membranaire. Klingenberg *et al.* (1985 b), ont pu montrer, en reconstituant la protéine dans des liposomes, qu'UCP1 était capable de transporter des protons dans les deux sens, l'inversion de potentiel membranaire étant suffisante pour avoir un transport équivalent dans le sens opposé. La vitesse de transport décrite pour l'UCP1 varie dans la littérature en fonction des conditions expérimentales, allant de 1000 s⁻¹ (Winkler 1994) à 20 s⁻¹ (Garlid 1996) et 14 s⁻¹ (Urbankova 2003b) pour l'UCP1 native et 7 s⁻¹ (Klingenberg 1985) et 3 s⁻¹ (Mondriansky 1997) pour l'UCP1 recombinant.

L'unité fonctionnelle d'UCP1 est généralement décrite comme étant un dimère. Ceci a été suggéré par des études de pontage chimique sur les mitochondries du tissu adipeux brun et sur la protéine purifiée et incorporée en liposomes (Klingenberg 1989) ainsi que des travaux de centrifugation analytique (Lin 1980). Des approches analogues faites sur l'AAC avaient également permis l'hypothèse de l'existence d'un dimère pour l'AAC. Cependant, plusieurs études récentes suggérant l'état monomérique de l'AAC remettent aussi en question l'état oligomérique d'UCP.

1.B.2.1.4.1 Régulation de l'UCP

Les principaux régulateurs de l'activité protonophore d'UCP1 sont les acides gras et les nucléotides, les premiers agissant en activant le transport et les seconds en l'inhibant.

a) La régulation par les nucléotides

La liaison et l'inhibition par les nucléotides ont été étudiées tant sur la mitochondrie que sur la protéine isolée ou sur la protéine incorporée en liposomes (les mesures ont été faites par dialyse à l'équilibre, sur colonne échangeuse d'anions ou par fluorescence). Les paragraphes suivants décrivent quelques caractéristiques de cette liaison et inhibition du transport.

1. Spécificité

UCP1 présente une grande affinité pour les nucléotides di et tri phosphate et une très faible affinité pour les nucléotides monophosphate indiquant le rôle important des charges dans la liaison. Aussi on peut remarquer une préférence pour les bases purines et plus spécialement guanine (Figure 10), l'ordre de l'affinité des nucléotides purines pour l'UCP étant : $GTP > GDP > ATP > ADP \gg \gg GMP/AMP$ (Lin 1982). Les K_D pour les nucléotides purines di et tri phosphate sont de l'ordre du micromolaire, allant de 0,4 à 4 μM à pH 6,7 (Huang 1998). Comme AAC, UCP1 lie seulement les nucléotides libres, non-complexés au Mg^{2+} (Klingenberg 1988).

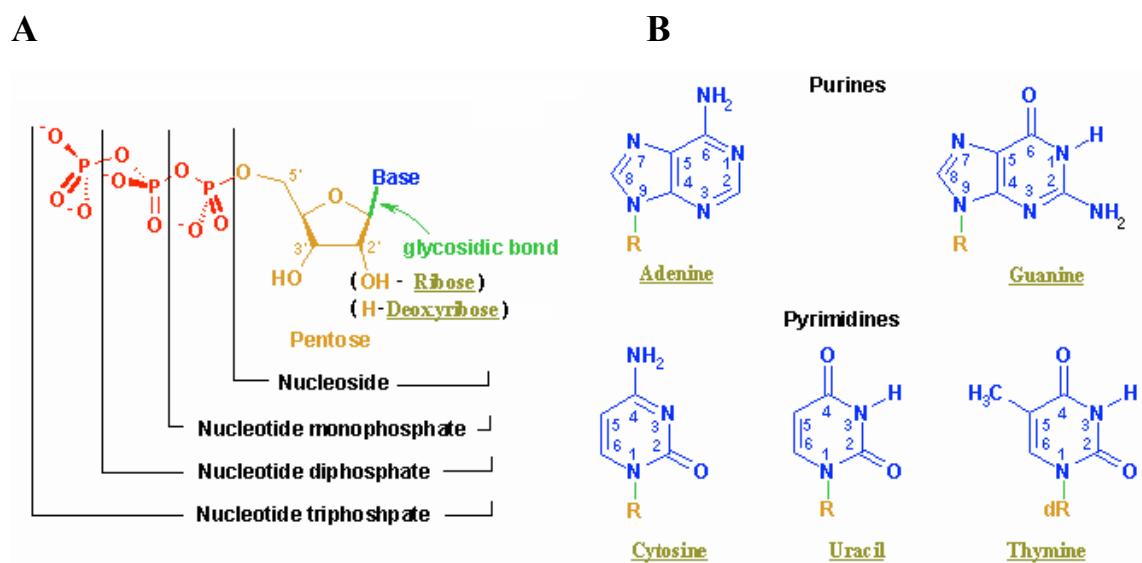


Figure 10. Structure chimique des nucléotides

A. Schéma général d'un nucléotide, avec ses trois parties : groupements phosphate (rouge), sucre (orange) et base (bleu).

B. Les différentes bases : bases purines (A et G) et bases pyrimidine (C, U et T)

2. Site de liaison des nucléotides

Le site de liaison des nucléotides a pu être localisé grâce à des expériences utilisant la mutagenèse dirigée et des nucléotides marqués. En utilisant des nucléotides présentant des groupements réactifs sur le cycle purine, des interactions avec trois résidus de la troisième hélice matricielle prédite (h56), C253, T259, T264, ont été mis en évidence (Mayinger 1992). Toujours dans cette région de la protéine, dans les années 1990, Bouillaud *et al.* remarquent la similarité des résidus 261-269 d'UCP1 avec le site de fixation de l'ADN du récepteur aux œstrogènes. En supprimant trois résidus au niveau de cette région (F267, K268, G269), le transport de protons est conservé mais pas l'inhibition par les nucléotides (Bouillaud 1994). Il est intéressant de remarquer que le résidu G269 fait partie du motif signature de la famille

MCF. Comme tous les transporteurs mitochondriaux, UCP1 a une structure tripartite. Les résidus 261-269 sont présents dans le troisième tiers de la protéine. Des délétions ont donc été réalisées dans les régions analogues situées dans le premier et deuxième tiers de la protéine et le même résultat a été observé (Gonzales-Barroso 1999). De façon assez étonnante, ces résidus se trouvent du côté matriciel de la protéine alors que, dans la mitochondrie, les nucléotides agissent du côté cytosolique. Le modèle proposé actuellement est que le nucléotide accède par le côté cytosolique et entre assez profondément dans la protéine, le cycle purine interagissant avec les régions matricielles (Arechaga 2001). La mutagenèse dirigée de trois résidus arginines situés dans les hélices transmembranaires (R83, R182 et R276), semble aussi montrer leur implication aussi dans la liaison des nucléotides (Mondriansky 1997). Il a été proposé que ces résidus chargés positivement soient orientés vers la cavité en interagissant ainsi avec les groupements phosphate du nucléotide. Les acides aminés impliqués dans la liaison du GDP sont indiqués sur le modèle d'UCP1 humain réalisé d'après la structure de bAAC1 dans la Figure 11. Il est intéressant à remarquer que les arginines R83 et R276 sont conservées en AAC et ils semblent impliqués dans la liaison à l'ADP (Dehez 2008).

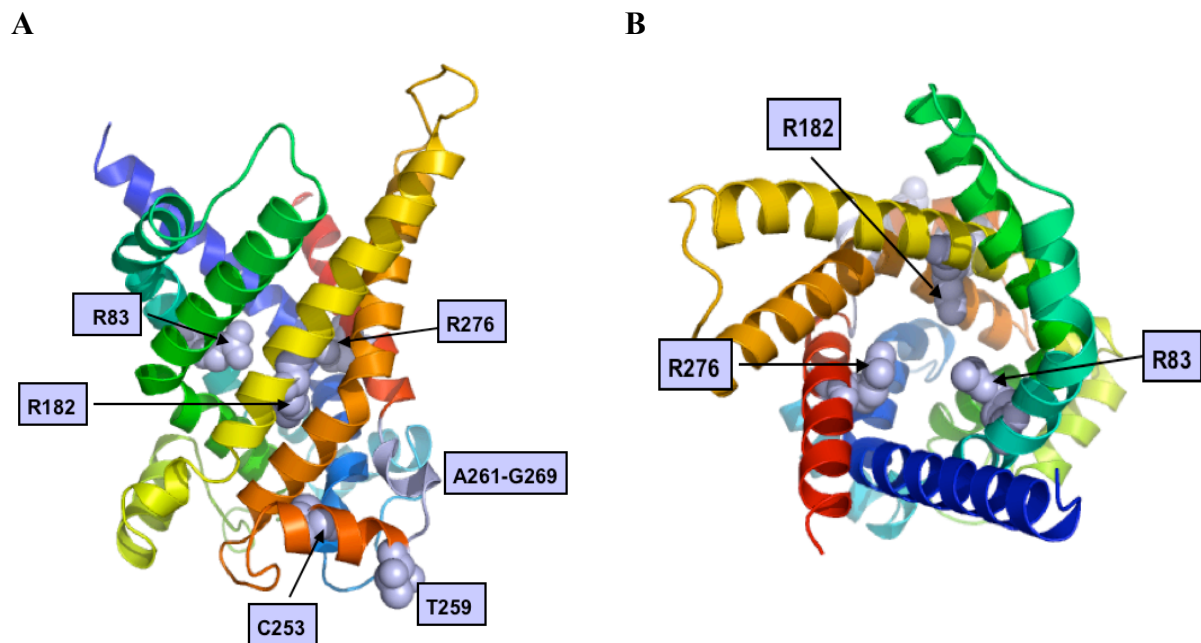


Figure 11 Localisation des résidus impliqués dans la liaison du GDP sur le modèle tridimensionnel de hUCP1

A. Vue dans le plan de la membrane

B. Vue depuis l'espace intermembranaire

Les acides aminés et les régions décrits comme étant impliqués dans la liaison du GDP sont représentés en gris. Les hélices sont colorées de bleu à rouge de l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale. La numérotation des acides aminés est celle de rUCP1. Modèle réalisé par Eva Pebay Peyroula avec Sybil avec l'aide d'A. Imberty (CERMAV)

3. Dépendance en fonction du pH

La liaison des nucléotides à l'UCP est fortement influencée par le pH. L'affinité augmente lorsque le pH diminue, mais pas de façon linéaire, l'augmentation étant moins importante à des pH inférieurs à 6,8. De façon intéressante, l'influence du pH sur l'affinité est plus marquant pour les nucléotides tri-phosphate que pour les nucléotides di-phosphate (Klingenberg 1988). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le résidu E190 joue un rôle important dans la dépendance du pH de la liaison des nucléotides (Winkler 1997).

4. Cinétiques / étapes de la liaison

L'équipe de Klingenberg a observé des différences dans la liaison des nucléotides à la protéine en fonction de la technique utilisée pour la mesurer : (1) méthode par échange ionique (le complexe UCP1-nucléotide est passé à travers d'une résine anionique qui retient seulement les nucléotides non liés), ou (2) par fluorescence (utilisation de nucléotides fluorescents). Suite à ces observations, il a proposé l'existence de deux états de liaison : un état de faible liaison, atteint très rapidement et qui ne provoque pas l'inhibition du transport proton, suivi d'une transition lente vers un état de forte liaison pour lequel l'activité de transport est inhibée (Huang & Klingenberg 1995; Huang & Klingenberg 1996). En effet, la méthode par fluorescence détecte les deux états alors que la méthode par échange ionique ne révèle que le nucléotide fortement lié à la protéine. En identifiant par mutagenèse un résidu (R276) qui n'affecte pas la liaison aux nucléotides mais l'inhibition du transport, l'équipe de Garlid (Mondriansky 1997) propose une extension de ce modèle à l'existence de trois états : (1) un état de faible liaison (le nucléotide entre dans la cavité, sa base purine interagit avec les hélices matricielles et le phosphate β avec R182) (2) un état de forte liaison (protonation de E190, R83 se lie au β et γ -phosphate, une histidine se lie au γ -phosphate et (3) et un état de forte liaison où le transport est inhibé (le phosphate α se lie au R276).

5. Effet des anions

Par compétition, les anions inhibent la liaison du GDP à la protéine. Différents anions ont été testés et l'ordre d'inhibition est le suivant : pyrophosphate ($K_i = 0,16$ mM) > sulfate (1 mM) > phosphate (4,4 mM) > maleate (8mM) > chlorure (9,3 mM) >>> acétate (Huang & Klingenberg 1995). De façon intéressante, l'imidazole inhibe aussi la liaison (Lin & Klingenberg 1982).

b) La régulation par les acides gras

Les études sur les adipocytes bruns, sur les mitochondries du TAB et sur la protéine purifiée reconstituée en liposomes ont montré que l'activité de transport de protons d'UCP1 est activée par les acides gras. Cette activation est dépendante du pH, et augmente vers les pH basiques (Rial 1983). La longueur de la chaîne est un paramètre important. Une chaîne hydrophobe supérieure à 8 carbones est nécessaire pour activer le transport, l'activation étant maximale pour les acides gras de type C12 et C14. Pour les acides gras à longue chaîne, la conductance augmente avec le nombre d'insaturations. Les acides gras estérifiés ne sont pas capables d'activer le transport, suggérant le rôle important du groupement carboxyle (Rial 1983 ; Winkler 1994) (Figure 12). En construisant des chimères UCP1-UCP2 Jimenez-Jimenez *et al.* (2006a) ont pu montrer que la deuxième boucle matricielle d'UCP1 (boucle connectant les hélices 3 et 4) est critique pour l'activation par les acides gras.

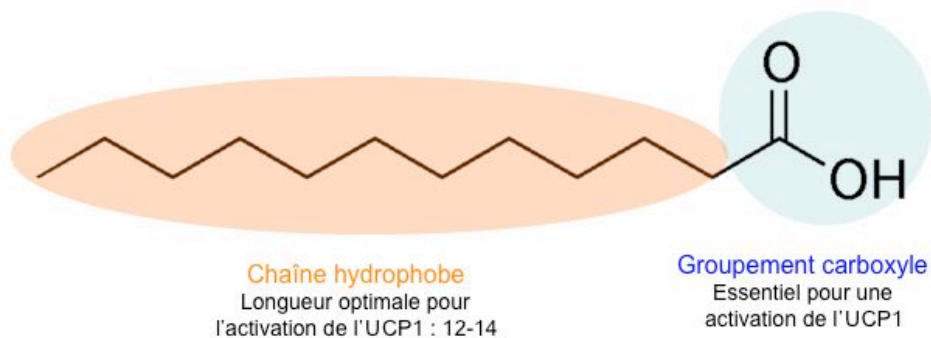


Figure 12. Structure chimique d'un acide gras

Si l'activation par les acides gras est largement acceptée, une question demeure : sont-ils totalement indispensables à la fonction de transport d'UCP1 ? Lors d'études réalisées avec des mitochondries, une conductance basale (en absence d'acides gras) est toujours observée, ce qui est difficile à expliquer seulement par la présence des acides gras endogènes (Shabalina 2004). Par contre, lorsqu'on travaille avec la protéine purifiée et incorporée en liposomes par l'ajout des billes de polystyrène (qui adsorbent le détergent mais aussi les acides gras) le transport de protons est généralement observé exclusivement en présence des acides gras (Winkler 1994). Des études sont encore nécessaires pour pouvoir établir la nécessité ou non des acides gras dans le transport.

c) D'autres régulateurs d'UCP1

À part les acides gras et les nucléotides, d'autres régulateurs d'UCP1 ont été mis en évidence. Plusieurs molécules activatrices ont été décrites : les acides rétinoïques (Rial 1999), la coenzyme Q10 (ubiquinone) (Echtay 2000), le superoxide (Echtay 2002) et un produit de la peroxydation des lipides, le 4-hydroxynonanal (Echtay 2003). Cependant, la capacité d'activation directe de ces trois derniers est encore débattue. Par exemple, la coenzyme Q10 a été considérée initialement comme un co-facteur nécessaire pour le transport H^+ d'UCP1 (Echtay 2000). Ceci a été infirmé plus tard par Esteves *et al.* (2004) qui montrent que l'UCP1 exprimé dans une levure dont le gène codant pour la coenzyme Q10 a été inactivé, a une activité de transport normale. De même Jaburek *et al.* (2003) ne voient pas d'activation par la coenzyme Q10 du transport de protons de la protéine reconstituée en liposomes. Tomas *et al.* (2002) ont montré que la coenzyme Q10 peut activer UCP1 de façon indirecte, en augmentant son affinité pour l'acide rétinoïque et une étude plus récente montre que dans les mitochondries du TAB la coenzyme Q10 dans sa forme réduite (et pas oxydée) peut activer l'UCP1 en surmontant l'inhibition par les nucléotides (Swida-Barteczka 2009). Les alkylsulfonates semblent aussi pouvoir activer le découplage par l'UCP1 dans les mitochondries TAB (Rial 2004) mais une étude par Jezek *et al.* (2006) remet en cause cette activation. Un inhibiteur protéique d'UCP1 a été également mis en évidence. Il s'agit de CIDEA, fortement exprimé dans le tissu adipeux brun. Des souris transgéniques déficientes en CIDEA montrent une dépense énergétique accrue ce qui peut suggérer une inhibition d'UCP1 par cette protéine (Lin 2004)

Une étude récente (Carroll 2008) montre la phosphorylation des certains résidus serine de la protéine (S3 ou S4 et S41). Cette phosphorylation est plus importante chez les animaux exposés au froid (par rapport aux animaux restant à température ambiante), suggérant ainsi une régulation de l'activité d'UCP1 par l'état de phosphorylation de la protéine.

I.B.2.1.5 UCP1 - transporteur d'anions

Une des caractéristiques des mitochondries du tissu adipeux brun est leur perméabilité aux ions chlorure, perméabilité fortement réduite en présence de GDP. Des mesures effectuées sur des liposomes ayant incorporés UCP1 purifié (Jezek 1990a) ont pu confirmer que cette perméabilité était due à l'UCP1. Des études plus extensives ont révélé qu'UCP1 est capable non seulement de transporter des ions chlorure mais aussi diverses classes d'anions

comme: les halogénés (Br^- , I^- , F^-), les sulfonates, les alkylsulfonates, les oxohalogénides, les dérivés du phosphate monovalent et les anions organiques monovalents (comme le pyruvate). Tous ces anions transportés inhibent le transport Cl^- de façon compétitive (Jezek 1990b). Des études d'électrophysiologie sur des liposomes géants contenant UCP1 ont montré que ce transport chlorure présente des caractéristiques correspondant à un canal avec une conductance de 75 pS en 100 mM KCl symétrique (Huang 1996). Ce transport d'anions ne dépend pas du pH et est inhibé par les nucléotides. Les acides gras n'activent pas le transport, au contraire, ils semblent plutôt avoir un effet inhibiteur (Jezek 1994). Quelques études suggèrent aussi que les anions des acides gras sont transportés par l'UCP1 (Garlid 1996 ; Jezek 1997).

I.B.2.1.6 Mécanisme de transport de protons

Un débat important existe dans la littérature sur le mécanisme moléculaire du transport de protons par UCP1. Deux modèles principaux ont été proposés (Figure 13), avec autant d'études supportant l'un ou l'autre des modèles :

➤ « *Fatty acid cyclic model* ».

Dans ce modèle, les acides gras, protonés dans l'espace intermembranaire passent d'un feuillet à l'autre (mouvement de flip-flop) à travers la membrane mitochondriale interne indépendamment d'UCP1. Dans la matrice, en raison du pH élevé, les protons se dissocient des acides gras et les acides gras anioniques sont transportés vers l'espace inter-membranaire par l'UCP1. D'après ce modèle, UCP1 transporte des acides gras anioniques et non des protons et le transport H^+ observé serait donc totalement dépendant de la présence des acides gras. Ce modèle a été initialement proposé par Skulachev (1991) et très soutenu par Garlid et Jezek (pour revue Garlid 2001). Ceci est basé sur des études suggérant la capacité d'UCP1 à transporter des anions et plus précisément des anions des acides gras. En effet, Garlid *et al.* montrent qu'UCP1 incorporé dans les liposomes est capable de faire un transfert de charge à travers la membrane en utilisant des acides gras et plus précisément un analogue non protonable d'acide gras, le undécane sulfonate (Garlid 1996, Jezek 1997). En revanche, ce modèle demeure incompatible avec l'observation que les acides trans-rétinoïques qui n'ont pas une capacité de découplage et de flip-flop inné, peuvent activer le transport H^+ (Shabalina 2008).

➤ « *Proton buffering model* »

Les protons traversent la membrane *via* des fonctions acides et amines de la protéine. Les acides gras vont offrir des groupements protonables supplémentaires et activent ainsi le passage des protons. Ce modèle a été proposé par l'équipe de Klingenberg (Winkler 1994). Un des arguments pour ce modèle est l'existence de résidus (H145, H147, R152) dont la mutation diminue l'activation par les acides gras du transport H^+ ainsi que l'affinité de la protéine pour les acides gras mais n'affecte pas le transport des anions ou la liaison du GDP (Bienengraeber 1998 ; Urbankova 2003a).

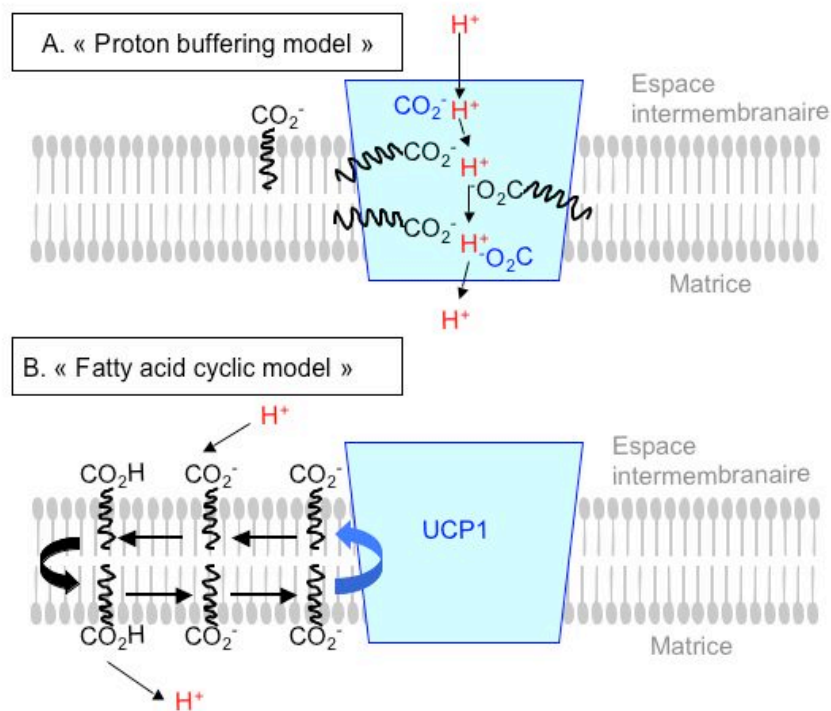


Figure 13. Les deux mécanismes principaux proposés pour le transport H^+ d'UCP1
En bleu UCP1 et les résidus appartenant à UCP1, en noir les acides gras et en rouge les protons

D'autres modèles, différents de ces deux modèles présentés ci-dessus peuvent être élaborés. Des études montrent par exemple qu'il y a une inhibition compétitive entre les acides gras et les nucléotides, la liaison du GDP à la protéine étant diminuée en présence d'acides gras (Huang 2003 ; Shabalina 2004). Ceci suggère que les acides gras activent la protéine de façon indirecte en surmontant l'inhibition par les nucléotides. Le transport de protons ne serait donc pas dépendant des acides gras.

Il est possible aussi d'avoir deux voies indépendantes du transport de protons au sein d'UCP1. Ceci est proposé par l'équipe de Rial qui montre que la mutation de deux résidus conservés du point de vue de l'évolution (E134 et M140) inhibe le transport H^+ basal mais pas le transport induit par les acides gras ou la liaison au GDP (Jimenez-Jimenez 2006b)

I.B.2.2 Les autres UCPs

Après le clonage d'UCP1 en 1986 (Bouillaud 1986) d'autres gènes codant pour des UCPs ont été découverts. Chez les mammifères, UCP2 et UCP3 ont 59% et 57% d'identité de séquence respectivement avec UCP1 et 73% d'identité entre elles. Au contraire d'UCP1 qui est exprimé seulement dans le TAB, les distributions tissulaires de ces UCPs sont assez variées : UCP2 est exprimé de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus et UCP3 est exprimé dans les muscles squelettiques, le cœur mais aussi le TAB. Ils semblent impliqués dans des fonctions très diverses comme : l'export des acides gras, la sécrétion d'insuline, la protection contre les ROS (Reactive Oxygen Species), la régulation du métabolisme, et la protection contre l'obésité (Rousset 2004, Krauss 2005). Que leur activité physiologique implique ou non un transport des protons est un sujet assez débattu dans la littérature. Ces nouvelles UCPs sont encore assez peu connus et des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider leur fonction et importance dans la physiologie et pathologie humaine.

I.C Production des transporteurs mitochondriaux

Une grande partie des études menées jusqu'à présent sur les transporteurs mitochondriaux (notamment AAC et UCP) a été réalisée avec des protéines natives : transporteur AAC extrait des mitochondries du cœur ou de foie et UCP1 extrait des mitochondries du tissu adipeux brun. Ces sources naturelles présentent un double avantage : l'abondance naturelle des protéines (jusqu'à 10 % des protéines de la membrane interne) et un environnement natif (notamment l'insertion dans une bicouche lipidique) qui garantit une fonctionnalité et une stabilité accrue de la protéine.

L'utilisation de la protéine native présente toutefois quelques limitations :

- Impossibilité de réaliser des mutations ce qui représente un frein aux études structure-fonction
- Maîtrise réduite de l'environnement de la protéine purifiée

En effet, il est difficile de contrôler précisément l'environnement de la protéine. L'isolation d'AAC ou d'UCP1 se réalise par une chromatographie dite « négative », la résine (HTP-Hydroxylapatite) liant toutes les autres protéines mitochondriales sauf les transporteurs

mitochondriaux qui se retrouvent dans la fraction non retenue par la colonne. La protéine est ainsi éluée avec une quantité importante de détergent, lipides ou molécules du tissu natif qu'il est difficile de contrôler. Or, une telle maîtrise de la solution de protéine est importante pour entreprendre des études de cristallisation, afin de déterminer la structure de la protéine.

- Nécessité d'avoir une animalerie ou un accès à des organes des mammifères

L'utilisation de systèmes de production de la protéine recombinante s'est donc vite imposée comme une nécessité pour l'étude des transporteurs mitochondriaux. Deux principaux systèmes d'expression des AACs et UCPs ont été décrits dans la littérature : l'expression chez *E. coli* et l'expression chez la levure. Ils sont brièvement présentés ci-après.

I.C.1 Transporteur ADP/ATP

I.C.1.1 Expression chez *E. coli*

Plusieurs équipes ont décrit l'expression d'AAC chez *E. coli*. L'expression d'AAC1 bovin et d'ACC2 de levure dans les corps d'inclusion d'*E. coli* donne lieu à des niveaux d'expression très faibles ne permettant pas leur étude (Fiermonte 1993, Heimpel 2001). Un niveau d'expression faible a également été obtenu avec des AAC de rat et de plantes exprimés dans les membranes d'*E. coli* (Haferkamp 2002). Toutefois, les auteurs montrent que, dans les membranes, la protéine est fonctionnelle.

Des résultats plus intéressants ont été décrits pour l'AAC de *Neurospora crassa* qui peut être renaturé à partir de corps d'inclusion dans des quantités suffisantes (Heimpel 2001). Cependant, l'AAC de *N. crassa* est différent de l'AAC humain (seulement 49% d'identité et de 67% similarité de séquence). Il n'est donc pas un modèle approprié pour l'étude de mutations humaines. Le seul AAC humain qui a pu être exprimé avec succès dans les corps d'inclusion d'*E. coli* est l'AAC4 (Dolce 2005), une isoforme d'AAC découverte en 2005 (identité de séquence avec hAAC1 68 %, similarité 81%).

I.C.1.2 Expression chez la levure

La plupart des études de mutagenèse entreprises sur l'AAC ont été réalisées avec l'AAC2 de levure (yAAC2) exprimé chez des souches de *S.cerevisiae* dont le gène codant pour l'AAC endogène a été supprimé. Ce système d'expression a permis la production, la purification et la réalisation des tests fonctionnels sur yAAC2 (Gawaz 1990). yAAC3 a aussi pu être produit avec ce système et a donné lieu à la détermination d'une carte de projection par microscopie électronique (Kunji 2003). Cependant, les AAC de levure ne sont pas non plus un bon modèle d'étude de mutations humaines car leur homologie de séquence avec l'AAC humain (ou AAC de mammifères en général) n'est pas très élevé (49% d'identité de séquence entre hAAC1 et yAAC2 et 65% similarité). Des essais d'expression des AACs de mammifères chez la levure ont donné lieu à des niveaux d'expression très faibles. Des quantités plus importantes ont pu être obtenues après l'ajout de la partie N-terminale de yAAC2 dans le vecteur d'expression de bAAC1 (Hashimoto 1999). En utilisant la même stratégie, hAAC1, hAAC2 et hAAC3 ont pu être exprimés chez la levure et des test fonctionnels sur les mitochondries isolées ont pu être réalisés (De Marcos Lousa 2002 ; De Marcos Lousa 2005). Cependant, aucun autre article faisant référence à la purification de ces constructions n'a été publié par la suite ce qui laisse penser que les quantités produites ne sont pas suffisantes pour pouvoir réaliser une purification avec un bon rendement.

I.C.2 Protéine découplante UCP1

I.C.2.1 Expression chez *E. coli*

En 2000, Echtay *et al.* ont décrit la production d'UCP1 à partir de corps d'inclusion d'*E. coli*. Cependant, la protéine ainsi produite ne semble fonctionnelle qu'en présence d'un co-facteur, la coenzyme Q10. Ces résultats ont ensuite été infirmés par Jaburek & Garlid (2003) qui décrivent la production fonctionnelle de rUCP1 après renaturation des corps d'inclusion d'*E. coli* sans ajout de la coenzyme Q10. La même méthode de production a ensuite été employée avec succès pour la production d'hUCP1 (Breen 2006) et mUCP1

(Jelokhani-Niaraki, 2008). Cependant, nos collaborateurs (Bruno Miroux, IBPC, communication personnelle) n'ont pas pu reproduire ces protocoles.

I.C.2.2 Expression chez la levure

Comme pour l'AAC, la levure a été le système de choix pour les études de mutagenèse d'UCP1. Murdza-Inglis *et al.* (1991) sont les premiers à décrire l'expression fonctionnelle d'UCP1 de rat chez *S. cerevisiae*. La protéine a pu être produite et purifiée dans des quantités suffisantes pour la réalisation de tests fonctionnels. Cependant, ce système présente plusieurs désavantages : (1) purification et reconstitution d'UCP1 plus difficile que pour la protéine native (2) contamination par la porine de la levure (3) coût élevée de la préparation (4) les quantités produites restent faibles pour entreprendre des études structurales (B.Miroux, communication personnelle).

I.D Production des protéines membranaires - un défi

Les protéines membranaires représentent environ un tiers du protéome et elles sont la cible principale des industries pharmaceutiques. Leur étude est donc d'un intérêt majeur. Cependant, très peu de structures de protéines membranaires sont déposées dans la *Protein Data Bank*. À ce jour, seulement 237 structures uniques de protéines membranaires ont été déterminées, un chiffre particulièrement dérisoire si on le compare aux dizaines de milliers de structures de protéines solubles qui ont déjà été résolues.

Les raisons de ce constat sont multiples. En effet, les protéines membranaires, molécules amphiphiles insérées *in vivo* au sein des membranes cellulaires, s'avèrent difficiles à produire et à manipuler. Comparées aux protéines cytoplasmiques, les contraintes suivantes doivent être prises en compte :

1. Les protéines membranaires doivent être adressées vers la membrane de destination (les protéines solubles sont juste « relâchées » dans le cytosol).
2. Une étape d'insertion de la protéine dans la membrane est nécessaire et cette insertion nécessite souvent des machineries de translocation (Sec pour les procaryotes et Sec61 pour les eucaryotes).

3. La surexpression de la protéine dans la membrane de l'organisme hôte est souvent toxique pour ce dernier.

4. Le volume de membrane disponible pour la protéine est plus réduit que le volume du cytosol.

5. La protéine doit être extraite de la membrane cellulaire après expression et transférée en micelles de détergent (solubilisation). Il s'agit d'une étape délicate ; le relâchement de la pression latérale que la membrane exerçait sur la protéine, la perte des lipides individuels qui interagissaient avec la protéine et le contact avec ces détergents peuvent entraîner une déstabilisation de la protéine et favoriser sa dénaturation et son agrégation.

6. La nature hydrophobe de la protéine rend sa préparation et sa manipulation difficile. De façon générale, plusieurs surfactants, lipides ou mélanges des deux doivent être criblés afin d'obtenir les conditions optimales dans lesquelles la protéine est fonctionnelle et stable. Pour une description des principales classes de surfactants utilisées pour les protéines membranaires voir Annexe A.

La mise en place des protocoles pour la production efficace de protéines membranaires est donc une tâche difficile et, comme décrit page 40, les transporteurs mitochondriaux n'échappent pas à cette règle. Toutefois, différents systèmes de production des protéines membranaires existent (pour revue voir Junge 2008) et certains ont été testés lors de ce travail.

I.E Objectifs de ce travail

La structure du transporteur ADP/ATP (résolue en 2003 dans notre équipe) en complexe avec son inhibiteur CATR est actuellement la seule structure connue d'un membre de la famille des transporteurs mitochondriaux. Cette structure en lien avec l'ensemble des données biochimiques et biophysiques disponibles a permis de faire un certain nombre d'analyses et d'hypothèses quant au mode de fonctionnement d'AAC et des transporteurs mitochondriaux en général (voir page 24). Cependant des études sont encore nécessaires pour

la caractérisation et la compréhension des mécanismes mis en jeu par ces transporteurs. Même si les caractéristiques communes des MCF suggèrent une structure et un mécanisme de transport probablement similaires, les informations dont nous disposons sont trop partielles pour pouvoir expliquer la sélectivité et la spécificité de chaque transporteur et les détails moléculaires du mécanisme. Aujourd'hui, l'un des enjeux majeurs est de déterminer les bases mécanistiques communes à toute la famille et les déterminants structuraux et fonctionnels spécifiques de chaque transporteur.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce cadre. Deux sous-familles de transporteurs mitochondriaux les AACs (ADP/ATP carriers) et les UCPs (Uncoupling proteins) ont été choisies pour être étudiées. Bien qu'elles présentent les caractéristiques communes à tous les MCFs (voir page 17), les deux transportent des substrats très différents du point de vue de leur structure, dimension ou charge électrostatique : $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ pour AAC et H^+ pour UCP1. L'étude comparative structure-fonction de ces deux transporteurs pourrait nous guider vers la compréhension de la spécificité du substrat et du mécanisme de transport des MCF.

Pour réaliser cette étude les objectifs de ma thèse ont été :

1. Mettre en place un système hétérologue de production de ces transporteurs (étape essentielle et limitante dans l'étude fonctionnelle et structurale des transporteurs).
2. Développer des tests fonctionnels permettant un criblage rapide et robuste de la fonctionnalité des transporteurs mitochondriaux produits

Ce manuscrit va présenter par la suite les trois systèmes d'expression qui ont été explorés au cours de ce travail (la synthèse *in vitro*, l'expression chez *E.coli* comme protéines de fusion et l'expression en ovocyte de Xénope) et les tests fonctionnels développés. Pour la protéine découplante UCP1 le test fonctionnel a été développé en utilisant la protéine UCP1 native (isolée du tissu adipeux brun de souris). La première partie de la section résultat va donc présenter ce travail avec la protéine native et la deuxième partie sera consacrée aux protéines produites de façon recombinante.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Chapitre II - Matériel & Méthodes

II.A Produits chimiques

II.A.1 Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés. Les milieux LB et TB ont été préparés à partir de poudres achetées chez Athena Enzyme System et Sigma, respectivement. Le milieu 2YT contient 16 g de bactotrypone, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau.

II.A.2 Surfactants et lipides

Tous les détergents utilisés ont été achetés chez Anatrace sauf le Triton X-100 (Sigma). Les surfactants fluorés (FTAC), les surfactants ressemblant à des lipides (CnUm) et les amphiphiles faciaux nous ont été fournis par B. Pucci (Université d'Avignon), l'amphipole A8:35 par J.L. Popot (IBPC, Paris), les peptergents par S. Zhang (MIT, Etats-Unis) et le cis-inositol par K. Hegetschweiler (Université de Saarbrücken).

Les lipides utilisés ont été achetés chez Avanti Polar Lipids.

II.B Matériel biologique

Les souches de *E. coli* employées au cours de ce travail sont les souches TOP10 utilisées pour l'amplification des plasmides et les souches C43(DE3), C41(DE3), BL21(DE3), Rosetta(DE3) utilisées pour la surexpression hétérologue des protéines. Leur génotype est présenté dans le Tableau 2. Elles sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium.

Souche	Génotype
TOP10	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, rpsL(strr), endA1, nupG (Invitrogen)
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ (DE3). Contient le prophage λ DE3 portant un gène codant pour la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur lacUV5 (VWR)
C41(DE3),	Souche mutante dérivée de BL21(DE3), mutation sur le promoteur lacUV5 de la T7ARNpolymérase, accumulation d'ARNm plus lente (Miroux 1996 ;Wagner 2008)
C43(DE3),	Souche mutante dérivée de C41(DE3), expression retardée de la lactose perméase (lacY) responsable de l'entrée d'IPTG dans la cellule (Miroux 1996)
Rosetta(DE3)	Souche dérivée de BL21(DE3), portant le plasmide pRare, permettant l'expression des protéines avec des codons rares (VWR)

Tableau 2. Description des souches bactériennes utilisées

II.C Techniques générales d'analyse biochimique et biophysique

II.C.1 Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'échantillon protéique à analyser est mélangé avec 1/3 de volume de tampon Laemmli 4X (250 mM Tris-HCl pH6,8, 40% (v/v) glycérol, 8% (w/v) SDS, 4% (v/v) β -mercaptoéthanol et 0,04% (w/v) bleu de bromophénol). Le tout est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide. Ce dernier est composé d'un gel de séparation (300 mM Tris-HCl pH 8,8, 10-12% (w/v) acrylamide/bisacrylamide, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) persulfate d'ammonium et 0,001% (w/v) TEMED) et d'un gel de concentration (100 mM Tris-HCl pH8,8, 5% (w/v) acrylamide/bisacrylamide, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) persulfate d'ammonium et 0,001% (w/v) TEMED). Le système Mini-Protean de Bio-Rad a été utilisé pour la préparation des gels et l'électrophorèse. La migration s'effectue sous potentiel constant (220 mV) dans un tampon contenant 25 mM Tris, 250 mM glycine et 0,1% (w/v) SDS. Pour la visualisation des bandes protéiques, le gel est coloré pendant environ 30 minutes dans une solution de coloration (1,5 g/L bleu de Coomassie R250, 10% (v/v) acide acétique, 50% (v/v) éthanol). La décoloration se fait dans une solution composée de 10% (v/v) acide acétique et 30% (v/v) éthanol.

II.C.2 Immunodétection (Western blot)

Après séparation par électrophorèse les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide à une membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène, Bio-Rad) par électrophorèse dans un système liquide (Mini-Protean, Bio-Rad). Le transfert se réalise dans un tampon 25 mM Tris, 190 mM glycine, 0,1% (w/v) SDS pendant 45 min à 350 mA.

Pour la détection des protéines à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette His₆ ou contre la MBP, la membrane est ensuite incubée 30 min dans un tampon PBS-T (PBS 1X, Tween (v/v) 0,03%) additionné de 5% (w/v) de lait en poudre. L'anticorps anti-His₆ (Monoclonal Anti-polyHistidine Peroxidase Conjugate, Sigma) ou anti-MBP (Anti-MBP-Monoclonal Antibody HRP conjugated, Ozyme) est ensuite ajouté à une dilution finale de 1/2000 et après une incubation d'1h sous agitation, la membrane est lavée 2 fois pendant 15 min dans le tampon PBS-T. La révélation est réalisée par la précipitation de la diaminobenzidine en présence de peroxydase (Sigma Fast Diaminobenzidine Tablets, Sigma) selon les recommandations du fournisseur.

Pour la détection des transporteurs mitochondriaux sans étiquette, les anticorps suivants ont été utilisés : anti-UCP1 de mouton (donné par Bruno Miroux, IBPC) pour l'UCP1, et anti-AAC1 ((Ab-1)(2-17), Calbiochem) pour l'AAC1. Les anticorps sont dilués 1/3000 et 1/100, respectivement. La détection est réalisée comme décrit dans le paragraphe précédent avec une incubation supplémentaire (1h, tampon PBS-T, 5% (w/v) de lait) avec un anticorps secondaire et un lavage entre les deux incubations avec des anticorps.

II.C.3 Chromatographie d'exclusion

Afin de vérifier l'état des protéines purifiées, des analyses chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'un tamis moléculaire (colonne SuperdexTM 200 PC 3,2/30, GE Healthcare). Après une centrifugation de 10 min à 15 000 g, pour sédimenter les possibles agrégats, 100 µL de protéine sont injectés sur la colonne préalablement équilibrée avec un tampon 50 mM Hepes, pH 7, 0,02 µg/µL cardiolipide, 200 mM NaCl et 0,08% (w/v) DDM. L'élution est visualisée en suivant l'absorbance à 280 nm. La calibration de la colonne est réalisée dans les mêmes conditions de tampon en injectant les protéines suivantes: Ferritine, Aldolase, Conalbumine, Ribonuclease A (High et Low Molecular Weight Gel Filtration kit, Amersham) préparés à 5 mg/mL (sauf pour la ferritine qui est à 1mg/mL). Le volume mort de la colonne est déterminé en injectant une solution de bleu dextran à 1 mg/mL.

II.C.4 RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Les mesures ont été réalisées à 25°C dans un spectromètre VNMR opérant à une fréquence du proton de 800 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. Avant les mesures, 10% (v/v) D₂O ont été ajoutés aux échantillons. Des spectres TROSY (¹H-¹⁵N) et HMQC (¹H-¹³C) ont été enregistrés.

II.D Techniques de biologie moléculaire

II.D.1 Les ADNc utilisés

Afin de réaliser les différentes constructions plusieurs ADNc, provenant de différents organismes ont été utilisés. Les protéines codées par ces ADNc sont données dans le Tableau 3.

Abréviation	Nom complet	Organisme	Isoforme	No° UniProt
hAAC1	Transporteur ADP/ATP	<i>Homo sapiens</i> (humain)	1	P12235
hAAC2	Transporteur ADP/ATP	<i>Homo sapiens</i> (humain)	2	P05141
AlvAAC	Transporteur ADP/ATP	<i>Alvinella pompejana</i>	-	*
AtAAC	Transporteur ADP/ATP	<i>Arabidopsis Thaliana</i>	?	P31167
rUCP1	Protéine découplante	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	1	P56499
hUCP2	Protéine découplante	<i>Homo sapiens</i> (humain)	2	P55851
hUCP3	Protéine découplante	<i>Homo sapiens</i> (humain)	3	P55916
mUCP2	Protéine découplante	<i>Mus musculus</i> (souris)	2	P70406
mUCP3	Protéine découplante	<i>Mus musculus</i> (souris)	3	P56501
zUCP	Protéine découplante	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	-	Q9W720
avUCP	Protéine découplante	<i>Gallus gallus</i> (oiseau)	-	Q8AYM4
TMDO	Fragment du récepteur des sulfonilurées SUR (premiers 195 acides aminés)	<i>Homo sapiens</i> (humain)	2A	O60706
SASS	Séquence signal de l'albumine du sérum humain (18 acides aminés)	<i>Homo sapiens</i> (humain)	-	P02768

Tableau 3. Protéines utilisées

* gène synthétisé, accès à la banque génomique accordé par Odile Lecompte, Laboratoire de Bioinformatique et Génomique Intégratives IGBMC, Illkirch, France

II.D.2 Les vecteurs d'expression

Les différents vecteurs d'expression utilisés sont regroupés dans le Tableau 4. Ils contiennent tous un promoteur T7.

Plasmide	Système d'expression	Etiquette	Antibiotique	Particularités
pGH	Ovocyte xénope	-	Ampicilline	contient des régions du gène de la globine $\beta 1$ du Xénope qui augmente l'efficacité de la traduction
pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	His ₆ en N-ter	Ampicilline	Site de coupure au facteur Xa après le His ₆ , (Roche)
pIVEX2.3MCS	Synthèse <i>in vitro</i>	His ₆ en C-ter	Ampicilline	(Roche)
Pet20b-MBP	<i>E. coli</i>	-	Ampicilline	Permet l'expression avec la MBP en N-ter ; site de coupure à la thrombine après la MBP (donné par H.Nury, Institut Pasteur)
pLim14	<i>E. coli</i>	His ₆ en N-ter	Kanamycine	Construit par la plateforme RoBioMol (IBS) à partir du Pet41 ; permet l'expression avec Mystic en N-ter
pDEST-17	<i>E. coli</i>	His ₆ en N-ter et Strep en C-ter	Ampicilline	(Invitrogen)
pDEST-17-Mistic	<i>E. coli</i>	His ₆ en N-ter et Strep en C-ter	Ampicilline	Construit à partir du pDEST-17 dans le cadre du projet CEA-PM ; permet l'expression avec Mystic en N-ter

Tableau 4. Vecteurs utilisés

II.D.3 Préparation de l'ADN, dosage, amplification par PCR

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique ont été réalisées par miniprep ou midiprep avec les kits commerciaux (QIAprep Spin Miniprep ou HiSpeed Plasmid Midi, Qiagen). La concentration des préparations d'ADN a été déterminée par spectrophotométrie, une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 50 μ g d'ADN/mL. L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction), nécessaire pour le clonage a été réalisée en utilisant l'enzyme Pfu polymérase (Fermentas) selon les indications du fournisseur.

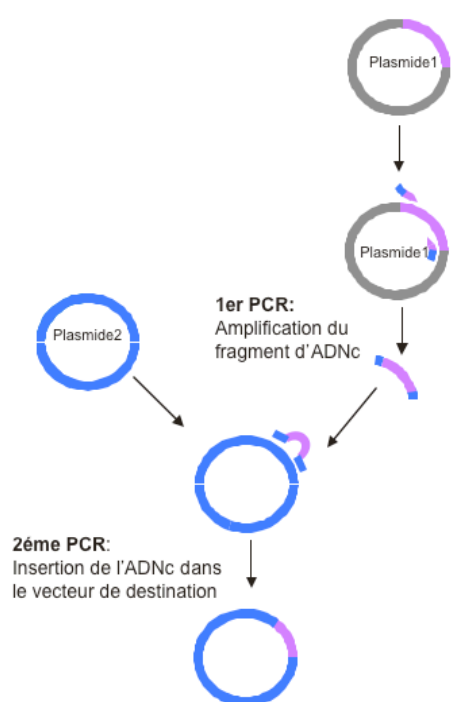
II.D.4 Techniques de clonage

II.D.4.1 Clonage classique en utilisant des enzymes de restriction

Les ADNc sont premièrement amplifiés par PCR puis purifiés (utilisation du kit QIAQuick PCR purification, Qiagen). Le produit PCR purifié et le vecteur dans lequel on veut l'introduire sont ensuite digérés par des enzymes de restriction selon les indications du fournisseur (Fermentas). Les fragments de digestion sont déposés sur un gel d'agarose à 1 %, et la bande correspondante est récupérée par excision puis purifiée (QIAQuick gel extraction kit, Qiagen). La ligation des fragments d'ADN (typiquement plasmide et insert) a été faite en présence de la T4 DNA ligase (Fermentas) selon les recommandations du fournisseur, suivie d'une transformation dans des souches de *E. coli* compétentes, TOP10. Afin de vérifier les clones obtenus, des minipreps ont été réalisés et envoyés au séquençage, après vérification sur gel d'agarose.

II.D.4.2 Clonage sans enzyme de restriction (Restriction Free Cloning)

Certaines constructions (voir Tableau 5) ont été réalisées à l'aide d'une méthode mise au point au laboratoire et basée sur la méthode décrite par Geiser *et al.*, 2001 (adaptation du protocole du kit QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis, Stratagene). La première étape de ce type de clonage consiste à amplifier les fragments d'ADNc qu'on veut insérer dans le vecteur de destination grâce à une première PCR. Ces fragments vont être utilisés ensuite comme amorces lors d'une deuxième PCR qui va permettre l'insertion de l'ADNc dans le plasmide de destination (Figure 14). La première PCR est une PCR d'amplification et est réalisée avec l'enzyme Pfu polymérase (Fermentas) et la deuxième est réalisée en utilisant un kit commercial (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis, Stratagene). Ce type de clonage va être appelé par la suite clonage RF (« Restriction Free »).

**Figure 14. Principe du clonage RF**

L'ADNc qu'on veut introduire dans le plasmide est amplifié à travers une première PCR. Le produit PCR résultant contient aussi des bouts complémentaires au plasmide de destination (plasmide 2). Il va donc s'hybrider avec ce plasmide lors d'une deuxième PCR. Ainsi l'ADNc va être inséré dans le plasmide.

Cycles 1^{ère} PCR :

1. Dénaturation initiale 94°C 3 minutes
 2. Dénaturation 94°C 1 minute
 3. Hybridation 55°C 1 minute
 4. Elongation 72°C 2 minutes
 5. Elongation finale 72°C 6 minutes
 6. Conservation 8°C infini
- } 30 fois

Cycles 2^{ème} PCR :

1. Dénaturation initiale 95°C 1 minute
 2. Dénaturation 95°C 1 minute
 3. Hybridation 55°C 1 minute
 4. Elongation 68°C 22 minutes
 5. Elongation finale 68°C 18 minutes
 6. Conservation 10°C infini
- } 22 fois

II.D.4.3 Réalisation des constructions

Les différentes constructions réalisées ou utilisées sont regroupées dans le Tableau 5. Pour chaque construction sont précisés le système d'expression pour lequel la construction a servi, le type de clonage et le nom des oligonucléotides utilisés pour ce clonage. La séquence des oligonucléotides est donnée dans l'Annexe B. Certaines constructions ont été réalisées par la plateforme RoBioMol de notre institut ou dans le cadre du projet CEA-PM. Si tel est le cas, les détails concernant le type de clonage et les oligonucléotides utilisés ne sont pas précisés.

Nom construction	Système expression	Type clonage	Oligonucléotides utilisés
hAAC1-pGH	Ovocyte xénope	Classique, enzymes : Cfr9I, XbaI	1ANT1Cfr9I-fwd, 1ANT1XbaI-rev
SASS-hAAC1-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF *, matrice PCR : hAAC1-pGH	SASS fw, SASS-ANT1REV
TMD0-hAAC1-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF, matrice 2 ^{ème} PCR : hAAC1-pGH	TMD0-PGHFW, TMD0-ANT1 REV
hAAC2-pGH	Ovocyte xénope	Classique, enzymes : Cfr9I, XbaI	2ANT2Cfr9I-fwd, 2ANT2XbaI-rev
SASS- hAAC2-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF *, matrice PCR : hAAC1-pGH	SASS fw, SASS-ANT2REV
TMD0-hAAC2-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF, matrice 2 ^{ème} PCR : hAAC1-pGH	TMD0-PGHFW, TMD0-ANT2 REV
rUCP1-pGH	Ovocyte xénope	Classique, enzymes : Cfr9I, XbaI	UCP1rCfr9I-fwd, UCP1rXbaI-rev

SASS-rUCP1-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF *, matrice PCR : rUCP1-pGH	SASS fw, SASS-UCP1REV
TMD0-rUCP1-pGH	Ovocyte xénope	Clonage RF, matrice 2 ^{ème} PCR : rUCP1-pGH	TMD0-PGHFW, TMD0-UCP1-REV
hAAC1-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	hANT1-PIV-FOR, hANT1-PIV-REV
hAAC2-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	hANT2-PIV-FOR, hANT2-PIV-REV
rUCP1-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	UCP1-NOTI-FW, UCP1-CFR9I-24A-REV
rUCP1-pIVEX2.3MCS	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	UCP1-NOTI-FW, UCP1-CFR9I-MCS-REV
mUCP2-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	mUCP2-PIV-FW, mUCP2-PIV-REV
mUCP3-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	mUCP3-PIV-FW, mUCP3-PIV-REV
hUCP3-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	hUCP3-PIV-FW, hUCP3-PIV-REV
zUCP-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	zUCP-PIV-FOR, zUCP-PIV-REV
avUCP-pIVEX2.4a	Synthèse <i>in vitro</i>	Classique, enzymes : NotI, Cfr9I	avUCP-PIV-FW, avUCP-PIV-REV
MBP-hAAC1	<i>E. coli</i>	Classique, enzymes : NotI, XhoI	MALhAAC1-NOT-FW, MALhAAC1-Xho-Rev
MBP-AtAAC1	<i>E. coli</i>	Classique, enzymes : NotI, XhoI	MAL-AT-AAC-NOT, MAL-AT-AAC-XHO-REV
MBP-AlvAAC	<i>E. coli</i>	Classique, enzymes utilisées : NotI, XhoI	MAL-Alv-NOT-FW, MAL-Alv-Xho-Rev
Mistic-hAAC1-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-hAAC2-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-mUCP2-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-mUCP3-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-hUCP3-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes: BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-zUCP-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
Mistic-avUCP-pLim14	<i>E. coli</i>	Enzymes : BamHI et NcoI	RoBioMol
AtAAC-pDEST 17	<i>E. coli</i>	-	CEA-PM
Mistic-AtAAC-pDEST 17	<i>E. coli</i>	-	CEA-PM
rUCP1-pDEST17	<i>E. coli</i>	-	CEA-PM
Mistic-rUCP1-pDEST17	<i>E. coli</i>	-	CEA-PM

Tableau 5. Constructions réalisées

*Pour ces clonages seule la deuxième PCR a été réalisée (les oligonucleotides contiennent l'ADNc de SASS)

II.E Purification des transporteurs mitochondriaux natifs

II.E.1 Purification des mitochondries du tissu adipeux brun

Des souris sont mises environ une semaine au froid (4°C) pour favoriser le développement du tissu adipeux brun (TAB). Après le sacrifice des animaux, une incision dans la partie dorso-cervicale permet le prélèvement du tissu adipeux brun qui se distingue de la graisse blanche grâce à sa couleur brune. Le tissu est ensuite mis dans le tampon TESi (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 250 mM saccharose) et broyé au Potter. Une centrifugation de l'homogénat de 20 min à 750 g (4°C), permet l'élimination des débris cellulaires qui se retrouvent dans le culot. Le surnageant est récupéré et centrifugé 45 min à 11 000 g (4°C). Le culot contenant les mitochondries est repris dans du tampon TESi et le dosage des protéines mitochondriales se fait par BCA (Bicinchoninic Acid, Pierce).

II.E.2 Purification d'UCP1 à partir des mitochondries

L'équivalent de 10 mg de protéines mitochondriales est centrifugé 15 min à 20 000 g, 4°C. Le culot est repris dans 320 µL de tampon MOPS (20 mM MOPS, 20 mM Na₂SO₄, 0,16 mM EDTA, pH 6,8) contenant 5% (v/v) Triton X-100 (rapport détergent/protéine (w/w) = 1,6). Après la solubilisation des membranes mitochondriales pendant 1h à 4°C sous agitation, une centrifugation de 30 min à 20 000 g (4°C) est réalisée. Le surnageant est recueilli et déposé sur une colonne d'hydroxyapatite (Bio-Rad) dont le volume est 2,5 fois supérieur au volume du solubilisé. La plupart des transporteurs mitochondriaux ont comme propriété de ne pas être retenus sur cette colonne. L'application de tampon MOPS (20 mM MOPS, 20 mM Na₂SO₄, 0,16 mM EDTA, pH 6,8) en haut de la colonne permet donc d'éluer la protéine. Des fractions de 500 µL sont collectées à la sortie de la colonne. Pour la purification en présence de C₁₀E₅ les mitochondries sont solubilisées par 2% (w/v) C₁₀E₅ et une étape de pré-solubilisation en 3,2% lubrol (30 min, 4°C) est effectuée afin d'enlever la membrane externe.

II.F Production des protéines recombinantes

II.F.1 La synthèse *in vitro*

II.F.1.1 Tests d'expression

Les réactions de synthèse *in vitro* à petite échelle ont été réalisées en utilisant un kit commercial (RTS 100 *E. coli* HY, Roche) selon les indications du fournisseur avec quelques petites modifications. 0,5 µg d'ADN ont été incubés avec 6 µL de lysat d'*E. coli*, 5 µL de mélange réactionnel, 6 µL d'acides aminés sans méthionine et 0,5 µL d'une solution de méthionine, dans un volume final de 25 µL. Ce mélange est ensuite incubé pendant 24 h à 20°C (sauf mention contraire). Après l'incubation, une centrifugation de 15 min à 18 000 g (4°C), permet de séparer la fraction soluble (surnageant) de la fraction insoluble (culot). Le culot est repris dans 25 µL de tampon 50 mM Tris, pH 7,5. 5 µL de chacune de ces fractions sont déposés sur un gel de polyacrylamide 12% et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) suivie d'un Western blot.

Pour les expériences de solubilisation du culot, celui-ci est repris dans une solution de détergent à 2% (w/v) préparée en 50 mM Hepes, pH 7,5. Après 1h30 d'incubation à 30°C, la fraction soluble est séparée de la fraction insoluble par centrifugation (18000 g, 15 min, 4°C) et la détection de la protéine est réalisée par Western blot.

Pour la production des protéines membranaires sous une forme soluble différents surfactants, additifs ou liposomes sont ajoutés directement au mélange réactionnel avant le début de la réaction de synthèse.

II.F.1.2 Production des protéines à l'échelle préparative

Pour les expériences à une échelle préparative, un autre kit a été utilisé (RTS 500 ProteoMaster *E. coli* HY, Roche) selon les recommandations du fournisseur. 10 µg d'ADN sont incubés avec le mélange réactionnel, en présence des surfactants pour un volume final de 1 mL. Après une incubation de 24 h à 20°C, le mélange réactionnel est centrifugé à 18 000g (4°C) et la fraction soluble est ensuite utilisée pour la purification de la protéine.

II.F.1.3 Purification

La purification de la protéine est réalisée par chromatographie d'affinité sur une résine de nickel-agarose grâce à l'étiquette His₆ présente du côté N-terminal de la protéine. Le surnageant de la synthèse *in vitro* est dilué dix fois dans un tampon Hepes 50 mM, pH 7, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazole et incubé avec 250 µL de résine (Ni-NTA Superflow, Qiagen) préalablement équilibrée avec le même tampon dans lequel le surnageant a été dilué. Après incubation 1 h à 4°C, sous agitation, le mélange est mis dans une colonne chromatographique. La résine est ensuite lavée plusieurs fois avec un tampon A (50 mM Hepes, pH 7, 200 mM NaCl) dans lequel des surfactants (0,08% DDM (w/v) ou 0,08% Triton X-100 (w/v) ou 0,3 mM F₈TAC₅) et 0,02 mg/mL de cardiolipide ont été ajoutés. Trois lavages avec des concentrations croissantes d'imidazole (10, 20 et 40 mM) sont effectués. L'élution est réalisée avec 200 mM d'imidazole. Deux fractions de 900 µL chacune et contenant la protéine sont collectées.

II.F.2 Expression chez *E. coli*

II.F.2.1 Tests d'expression chez *E. coli*

Afin de trouver les conditions optimales d'expression des transporteurs mitochondriaux dans *E. coli* des cultures en petit volume ont été réalisées. Pour cela, des bactéries compétentes BL21(DE3), Rosetta(DE3), C43(DE3) ou C41(DE3) ont été transformées avec le plasmide d'intérêt et une ou plusieurs colonies ont été utilisées pour ensemercer 10 mL de milieu de culture LB, TB ou 2YT, supplémenté en antibiotiques (0,1 g/L ampicilline ou 0,05 g/L kanamycine en fonction du plasmide utilisé). La préculture est incubée à 37°C, sous agitation et est utilisée pour ensemercer des cultures de 50 mL à partir d'une absorbance à 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1. La culture bactérienne est ensuite incubée à 37°C sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,6-0,8. L'expression protéique est déclenchée par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 0,1 ou 1 mM suivi d'une incubation à 37°C pendant 3 h ou 20°C pendant la nuit.

Pour vérifier le niveau d'expression obtenu, 1 mL de culture bactérienne avant et après induction à l'IPTG sont centrifugés pendant 10 min à 3000 g et le culot bactérien est repris dans un tampon Laemmli 1X afin que la DO_{600} final soit 1. 10 μ L du culot bactérien sont déposés sur un gel de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un Western blot.

Pour la préparation des membranes, 8 mL de culture bactérienne sont centrifugés 10 min à 3000 g. Les culots bactériens sont repris dans un tampon PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4) contenant des inhibiteurs de protéases, DNase et lysozyme à 1mg/mL. Après une incubation de 30 min à température ambiante suivie d'une sonication (1min, 1 s marche / 1 s arrêt) une centrifugation de 10 minutes à 3000 g (4°C) permet l'élimination des débris cellulaires et des protéines insolubles (fraction insoluble I). Le surnageant est ensuite centrifugé à haute vitesse (100 000 g, 4°C). Après 1 h de centrifugation, le surnageant est récupéré (fraction soluble S) et le culot comportant les membranes est repris dans 750 μ L PBS 1X supplémentés avec 0,3 % (w/v) SDS (fraction membranaire M). 10 μ L de chaque fraction sont déposés sur un gel d'acrylamide à 10 % (w/v) et un Western blot est réalisé.

II.F.2.2 Expression à l'échelle préparative

Pour la préparation des membranes pour des tests de solubilisation ou pour la purification de la protéine, des volumes de 1 à 8 L de culture sont réalisés à partir de précultures de bactéries C43(DE3) transformées avec le plasmide d'intérêt. Les cultures sont initiées à une DO_{600} de 0,1 et l'induction par 0,1 mM IPTG est réalisée à une DO_{600} de 0,6-0,8. Après une induction sur la nuit, 20°C, sous agitation, les cultures sont centrifugées à 7000g (4°C). Après lavage en PBS 1X les culots sont repris dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 7,5, 20% glycérol, 300 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoéthanol, des inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) et 1 mM benzamidine.

Les cellules sont lysées par deux passages à la presse de French (16 000 psi). Les débris cellulaires sont enlevés par une centrifugation à 24 000 g, 15 min (4°C) et le surnageant est ultracentrifugé 45 min à 150 000 g (4°C). Le culot de l'ultracentrifugation, contenant les membranes, est repris à l'aide d'un broyeur de type Potter-Elvehjem dans un tampon 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 250 mM saccharose (1 mL de tampon par litre de culture). La concentration des protéines dans les membranes est

déterminée par BCA (Bicinchoninic Acid, Sigma) selon les indications du fournisseur. Les membranes ainsi préparées sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

II.F.2.2.1 Solubilisation des membranes

Les expériences de solubilisation des protéines membranaires ont été réalisées en présence de différents détergents à une concentration au dessus de leur cmc (allant de 1 à 2% (w/v) selon le détergent utilisé) et en se plaçant à une concentration de protéine finale de 3 mg/mL. Le tampon de solubilisation (TS) est composé de 50 mM Tris pH 7,5, 20% (v/v) glycérol, 300 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoéthanol, des inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche) et 1 mM benzamidine (volume final 1 mL). Après 1h d'incubation à 4°C sous agitation, cette solution est centrifugée à 100000 g à 4°C pendant une heure. À l'issue de cette étape de centrifugation, les protéines solubilisées par le détergent se retrouvent dans le surnageant et leur présence est détectée par Western blot.

II.F.2.2.2 Purification

La purification de MBP-hAAC1 est réalisée sur une colonne d'amylose. Le surnageant de solubilisation est mélangé avec 500 μ L de résine d'amylose, préalablement lavée avec le tampon de solubilisation (TS). Après 2h d'incubation à 4°C, sous agitation, la solution est déposée dans une colonne de gravité et la fraction non liée à la résine est récupérée. La résine est ensuite lavée deux fois avec 5 mL de tampon B (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 2 μ M CATR) contenant 0,05% (w/w) et 0,02% (w/w) C₁₂E₈, respectivement. L'élution est réalisée dans le même tampon contenant 0,02% C₁₂E₈ et 20 mM maltose. Six fractions d'élution de 500 μ L chacune sont collectées. 10 μ L de chaque fraction sont déposés sur un gel d'acrylamide 12% et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'une coloration au bleu de coomassie ou d'un Western blot.

II.F.3 L'expression en ovocyte de xénope

Les ovocytes sont obtenus par opération des xénopes anesthésiés avec 1 g/l de benzocaïne. Une incision latéro-ventrale permet de récupérer les ovocytes organisés en lobes. Pour éliminer le tissu conjonctif et les cellules folliculaires entourant les ovocytes, un traitement à la collagénase est effectué (2 mg/mL, 3 fois 40 minutes à 19°C sous agitation). Les ovocytes sont ensuite triés et conservés dans une solution isotonique contenant un mélange d'antibiotiques (pénicilline, gentamicine, streptomycine).

Un jour après l'opération des Xénopes, des ARNm correspondant à nos constructions sont injectés dans les ovocytes à l'aide de micropipettes de 10-20 µm de diamètre et d'un microinjecteur (Nanoject, Drummond). Ces ARNm sont préparés par transcription de l'ADNc, à l'aide du kit T7 mMessage mMachine (Ambion). L'ADN est linéarisé par une enzyme de restriction qui coupe en aval de l'extrémité 3' de la région codante et purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol. Cet ADN sert de matrice à la T7 RNA polymérase qui se lie au promoteur T7 du vecteur pGH pour initier la transcription. Les transcrits sont purifiés par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol. Leur quantification se fait par migration sur gel d'agarose au formaldéhyde (ils sont comparés avec un marqueur de concentration connue) ainsi que par mesure de densité optique.

Les ARN ainsi obtenus peuvent être stockés à -80°C pendant plusieurs mois. 8 ng d'ARNm codant pour nos constructions d'intérêt sont injectés dans chaque ovocyte. Ensuite, les ovocytes sont incubés pendant 2 à 5 jours à 19°C ce qui permet en général une bonne expression protéique.

II.G Techniques d'analyse fonctionnelle

II.G.1 Test fonctionnel spectrophotométrique

II.G.1.1 Préparation des liposomes

Des lipides dans une solution de chloroforme (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine et cardiolipide) sont mélangés dans un tube en verre (Corex) à un ratio w/w/w de 8/1/1. Après évaporation du chloroforme sous flux d'azote et l'obtention d'un film lipidique, du tampon phosphate (70 mM K_2SO_4 , 5mM KPi, pH=6,8) est ajouté, afin d'avoir une concentration lipidique finale de 10 mg/mL. Après une agitation vigoureuse la solution devient blanchâtre, signe de la formation des vésicules multilamellaires (MLV pour Multi Lamellar Vesicles). La sonication de cette solution permet l'obtention des petits liposomes unilamellaires (SUV pour Small Unilamellar Vesicles) à 10 mg/mL, la solution devenant translucide avec des reflets bleuâtres.

II.G.1.2 Incorporation de la protéine

Afin d'incorporer la protéine en liposomes, 833 μ L de liposomes SUV préparés précédemment sont mélangés avec 416 μ L de tampon phosphate (70 mM K_2SO_4 , 5 mM KPi, pH=6,8) et 100 μ L de protéine native UCP1 purifiée (correspondant à 30-50 μ g de protéine). Pour l'incorporation de la protéine UCP1 synthétisé *in vitro* du Triton X-100 est ajouté à une concentration finale de 0,14% (v/v). Ce pourcentage de Triton X-100 correspond au pourcentage de Triton X-100 final estimé être présent dans les fractions d'éluion de la protéine native. Après une équilibration à 4°C, sous agitation, deux incubations de 1h30 chacune à 4°C avec 150-200 mg de billes de polystyrène (appelées par la suite « biobeads », Bio-Beads SM2, Bio-Rad) permettant l'élimination du détergent et la formation de liposomes étanches. Des liposomes témoins sont également préparés en suivant le même protocole et en mettant à la place de la solution de protéine UCP1, 100 μ L de tampon sans protéine (20 mM MOPS, 20mM NA_2SO_4 , 0,16mM EDTA, pH 6,8, 2% (v/v) Triton X-100).

La vérification de l'incorporation de la protéine est réalisée à l'aide des gradients de saccharose. L'échantillon est mélangé dans un rapport 1 : 1 (v/v) avec une solution de saccharose à 90% (w/v) et déposé dans des tubes d'ultracentrifugation de 2 ou 4 mL. Après l'ajout de plusieurs couches successives de saccharose à 45%, 35%, 20%, 15% et 0%, les tubes sont centrifugés à 200 000 g pendant 16h (4°C). L'apparition d'un anneau blanchâtre dans le gradient indique la présence des liposomes. Plusieurs fractions du gradient sont récupérées et la présence de la protéine dans ces fractions est détectée par Western blot.

II.G.1.3 Mesures d'activité

Après l'incorporation d'UCP1 en liposomes, ceux-ci sont mis dans des boudins de dialyse (seuil de coupure à 10 kDa) et dialysés trois fois contre 1L de tampon de dialyse (200 mM saccharose, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM Hepes pH=6,8) pendant 1 h à 4°C. Ceci va permettre la création d'un gradient de potassium entre l'extérieur et l'intérieur des protéoliposomes. 100 µL de protéoliposomes ainsi préparés sont ajoutés dans une cuve du spectrophotomètre contenant 100 mM de chlorure de choline et 20 µM de safranine O dans un volume final de 2 mL. L'ajout de 100 nM de nigéricine permet de démarrer la réaction. L'absorbance à 520 nm de la safranine O est suivie en fonction du temps. Différentes concentrations d'acide laurique et de GDP sont ajoutés afin d'évaluer l'activation ou l'inhibition d'UCP1. L'ajout de 5 µM de CCCP en fin de réaction permet de vérifier l'étanchéité des liposomes.

II.G.2 Test fonctionnel basé sur la mesure des courants électriques

II.G.2.1 Préparation des liposomes

La préparation de liposomes pour le test fonctionnel réalisé avec l'appareil SURFE²R s'effectue suivant le même protocole que celui décrit précédemment (voir page 61) avec les deux modifications suivantes : le tampon utilisé est composé de 50 mM MOPS, pH 7, 140 mM gluconate de potassium et les SUVs sont préparés à 12 mg/mL.

II.G.2.2 Incorporation de la protéine

Les liposomes SUV sont mélangés avec la protéine UCP1 à un ratio lipide/protéine de 10 (w/w). Après une équilibration sous agitation pendant 30 min (4°C), 250 mg de biobeads sont ajoutés suivie d'une incubation sur la nuit à 4°C afin d'enlever le détergent. L'ajout supplémentaire de 250 mg de biobeads pendant 1h30 permet d'éliminer les traces éventuelles de détergent. Les liposomes sont ensuite centrifugés 30 min à 350 000 g et le culot est repris dans un tampon final (50 mM MOPS, pH7, 140 mM gluconate de potassium) afin que la concentration finale en lipide soit de 10 mg/mL. La vérification de l'incorporation de la protéine dans les liposomes est réalisée comme décrit dans le paragraphe II.G.1.2.

II.G.2.3 Mesures d'activité

10 µL de liposomes sont dilués dix fois dans un tampon 50 mM MOPS, pH7, 140 mM gluconate de potassium puis soniqués 20 secondes (sonicateur UP50H, IonGate) à 30% d'amplitude. 10 µL de liposomes ainsi préparés sont déposés sur la cellule de mesure, préalablement traitée par les tampons SensorPrepA et SensorPrepB1 fournis par IonGate suivant les indications du fournisseur. Les cellules de mesure sont ensuite centrifugés 30 min à 2500 g et gardées à 4°C pendant minimum 2h. Pour la détection des courants électriques, la cellule de mesure est insérée dans l'appareil SURFE²R (IonGate, Allemagne) et le transport est activé par l'échange rapide d'une solution à pH 7 (50 mM MOPS, pH 7, 140 mM gluconate de potassium) par une solution à pH 6 (50 mM MES, pH6, 140 mM gluconate de potassium).

II.G.3 Test fonctionnel AAC - Radioactivité

Le test fonctionnel d'AAC a été réalisé suivant les protocoles décrits par Haferkam *et al.* (2002), Tjaden *et al.* (1998) et Thuswaldner *et al.* (2007) avec quelques modifications. 50 mL de culture d'*E coli* exprimant la protéine d'intérêt ont été préparés comme décrit page 58. Après un lavage dans un tampon phosphate (50 mM KPi, pH 7), le culot bactérien est repris dans ce même tampon afin d'avoir 0,1 g de cellules par mL de tampon. La réaction de

transport est initiée par l'ajout de 10 μM de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 mCi/mmol ; Perkin Elmer) à 30 μL de suspension bactérienne. Après une incubation à 25°C, pendant différents temps allant de 0 à 40 minutes, le transport est arrêté par l'ajout de tampon phosphate froid. Les nucléotides non-transportés sont éliminés par filtration sous vide sur des filtres de 0,45 μM (Millipore, France). Après trois lavages avec 1 mL de tampon phosphate froid, les filtres sont transférés dans des fioles de scintillation contenant 3,5 mL d'eau et la radioactivité est mesurée dans un compteur de scintillation (Beckman Coulter, Fullerton, Etats Unis).

Pour les expériences d'inhibition, avant le démarrage de la réaction de transport, les bactéries sont pré-incubées 15 min à température ambiante avec 0,5 mg/mL de lysozyme (permettant la perméabilisation de la membrane externe) et 5 min en présence de 100 μM d'inhibiteur (CATR ou BA). Le transport est arrêté après 30 min d'incubation. Des expériences contrôle avec un plasmide ne contenant pas l'ADNc de la protéine d'intérêt ont également été réalisées.

II.G.4 Double électrode - Two Electrode Voltage-Clamp (TEVC)

Les ovocytes préparés comme décrit page 60 sont placés dans une cuve contenant une solution standard appelée « bain » (91 mM KCl, 5 mM Hepes, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,3 mM acide niflumique, pH 7,4), devant un système de perfusion délivrant différentes solutions suivant les conditions à tester. Des pipettes en verre sont réalisées en étirant des capillaires de borosilicate après chauffage sous l'effet d'une tension contrôlée (extrémités de l'ordre du dixième de micromètre, résistance de l'ordre de 0,5 $\text{M}\Omega$). Celles-ci sont ensuite remplies d'une solution ionique conductrice (3 M KCl) puis montées sur les électrodes de stimulation et de mesure et implantées dans l'ovocyte. La première électrode est assignée au maintien du potentiel de membrane (V_m) tandis que la seconde permet la mesure des courants observés sur l'ensemble de la membrane plasmique de l'ovocyte (utilisation de l'amplificateur GeneClamp 500, Axon Instruments). L'acquisition puis l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel pClamp (Axon Instruments). Le programme utilisé permet d'imposer successivement des pulses de potentiel de 500 ms à -50, 0, et +50 mV à intervalles de 5 secondes. Différents ligands des transporteurs mitochondriaux sont alors appliqués par perfusion, et les courants résultants enregistrés.

Chapitre III

Résultats & Discussion : Transporteurs mitochondriaux natifs

Chapitre III Résultats & Discussion :

Transporteurs mitochondriaux natifs

- La protéine découplante UCP1 -

L'étude de la protéine native UCP1 a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Bruno Miroux (IBCP, Paris). Même si j'ai réalisé certaines préparations d'UCP1 lors de ce travail la plupart des protéines que j'ai utilisées ont été purifiées par cette équipe.

III.A Purification d'UCP1 native

La purification d'UCP1 native se réalise à partir du tissu adipeux brun de souris adaptées au froid. Les mitochondries extraites de ce tissu sont solubilisées par 5% Triton X-100 ou 2% C₁₀E₅ et les protéines mitochondriales ainsi obtenues sont déposées sur colonne d'hydroxylapatite. La plupart des protéines s'accrochent à la colonne alors qu'UCP1 se retrouve dans la fraction non retenue par la colonne. La purification s'effectue à température ambiante pour éviter une co-purification avec le transporteur ADP/ATP qui est aussi non retenu sur une colonne de hydroxylapatite mais qui est beaucoup plus sensible à la température.

Une analyse par SDS-PAGE des fractions d'élution contenant UCP1 (Figure 15) montre la présence dans les fractions 2 et 3 d'une bande vers 30 kDa correspondant à UCP1. La protéine semble assez pure. Cependant, une analyse par spectrométrie de masse réalisée par nos collaborateurs (Miroux, Paris) a montré l'existence dans ces fractions d'élution d'autres protéines mitochondriales et notamment la présence de VDAC, un canal ionique présent dans la membrane externe (Bensalem 2007). Afin d'éliminer ce contaminant, l'équipe de B. Miroux a introduit une étape supplémentaire de pré-incubation des mitochondries avec

le lubrol. Le lubrol est un détergent plus doux qui solubilise seulement la membrane mitochondriale externe en laissant la membrane interne intacte. Cette étape permet donc l'élimination des contaminants provenant de la membrane externe dont VDAC.

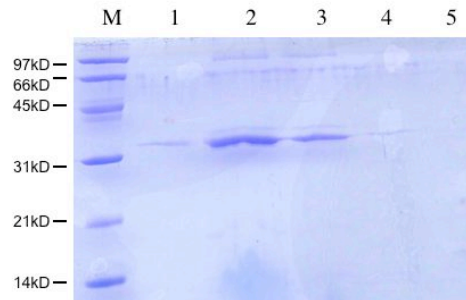


Figure 15. Purification de la protéine UCP1 en présence de Triton X-100.

M – Marqueur de masse moléculaire ; 1,2,3,4,5 - des fractions d'élution après la colonne d'hydroxylapatite. Dépôt - 10 μ L d'échantillon.

Ce manuscrit présentera des résultats obtenus avec deux types de préparation d'UCP1 :

1. UCP1-TX : Protéine obtenue par la solubilisation des mitochondries avec Triton X-100, sans l'étape de solubilisation par le lubrol
2. UCP1-C₁₀E₅ : Protéine obtenue par la solubilisation des mitochondries avec C₁₀E₅ avec une pré-solubilisation en lubrol

III.B Tests d'activité d'UCP1

Au début de ce travail un test fonctionnel spectrophotométrique permettant d'évaluer l'activité d'UCP1 était déjà disponible (Mozo 2006). Après avoir réalisé quelques fois ce test, j'ai pu mettre au point un autre test fonctionnel, basé sur la mesure directe de courants électriques associés à l'activité de transport de protons d'UCP1. Ce manuscrit présentera les deux tests en donnant plus des détails sur le nouveau test, en soulignant ses avantages et désavantages.

III.B.1 Test fonctionnel spectrophotométrique

Ce test est basé sur la mesure du changement du potentiel membranaire des liposomes dû au transport des protons par UCP1. La protéine est premièrement incorporée en liposomes SUV (rapport lipides/protéines = 300 (w/w)) réalisés en présence d'une solution de sulfate de potassium (70 mM K_2SO_4 , 5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 , pH 6,8). La dialyse des protéoliposomes contre un tampon iso-osmotique contenant du saccharose (200 mM saccharose, 0,5 mM Hepes, 0,5 mM EDTA pH 6,8) permet la création d'un gradient de potassium à travers la membrane des liposomes (Figure 16A). L'ajout de la nigéricine, drogue dont la propriété est d'échanger un proton contre un ion potassium, provoque une sortie d'ions potassium dans le milieu extérieur et une entrée de protons à l'intérieur des liposomes (Figure 16B). L'échange net de charge est nul et le potentiel membranaire (V_m) reste constant. Cependant grâce à l'accumulation des protons à l'intérieur des liposomes un gradient de protons est généré. Lorsque UCP1 est présent, il utilise ce gradient pour transporter les protons à l'extérieur des liposomes. Comme conséquence, le potentiel membranaire augmente. Cette polarisation des liposomes peut être ensuite quantifiée grâce à la safranine dont l'absorbance à 520 nm varie avec le potentiel (Figure 16C).

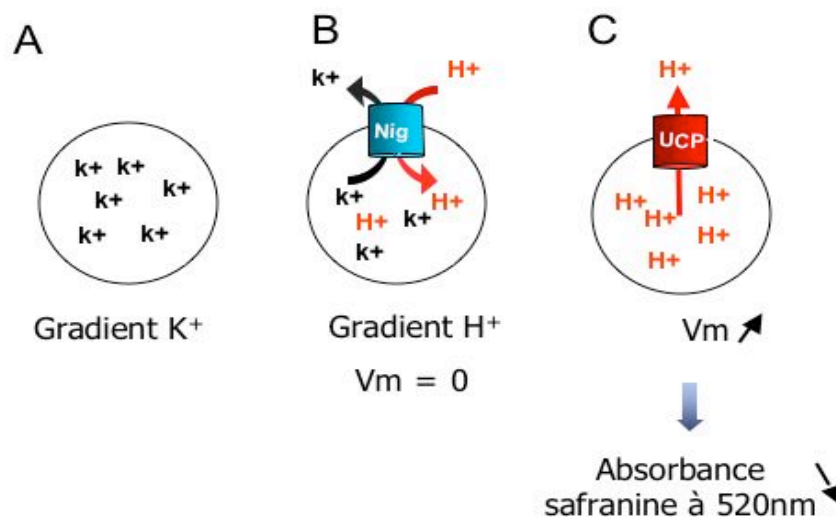


Figure 16. Principe du test fonctionnel spectrophotométrique d'UCP1

V_m - potentiel membranaire des liposomes ; explications dans le texte. Nig- nigéricine

La Figure 17 présente un exemple typique des résultats obtenus en suivant cette méthode de mesure de l'activité d'UCP1. La pente de décroissance de l'absorbance à 520 nm reflète l'activité de transport d'UCP1. Une décroissance importante peut être observée en présence d'un activateur d'UCP1, l'acide laurique. Cette décroissance est beaucoup diminuée en présence d'un inhibiteur d'UCP1, le GDP.

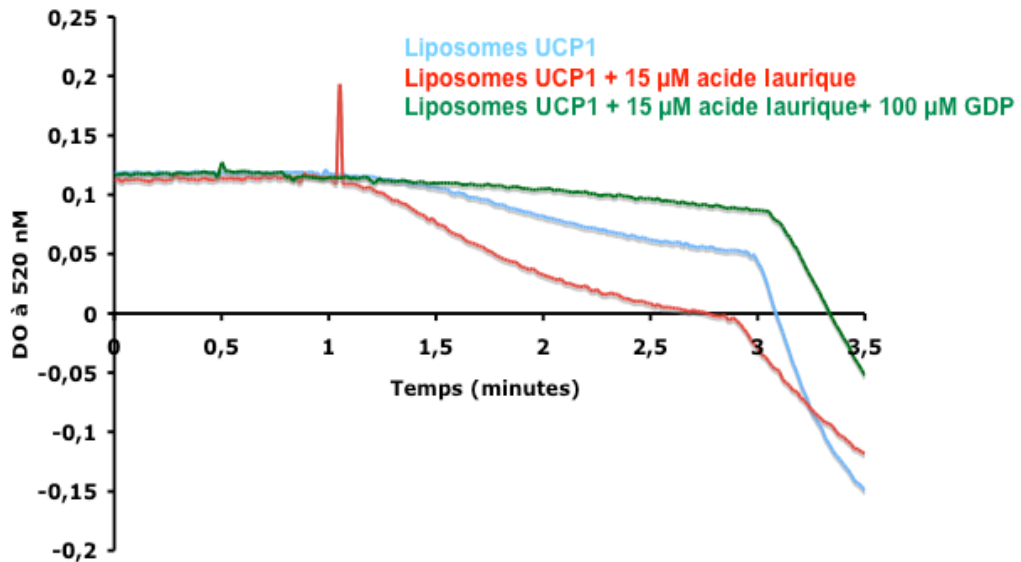


Figure 17. Mesure de l'activité d'UCP1-TX avec le test spectrophotométrique.

L'ajout de la nigéricine à 1 min déclenche le transport. Suite à l'activité de transport les liposomes se polarisent et l'absorbance de la safranine diminue (courbe bleue). La présence de l'acide laurique induit une décroissance plus rapide de l'absorbance (courbe rouge) alors que l'ajout concomitant d'acide laurique et de GDP provoque une décroissance plus lente (courbe verte). Autour de 3 min le CCCP (un protonophore puissant permettant de vérifier l'étanchéité du liposome) est ajouté. Parfois, l'ajout des différentes molécules dans la cuve peut perturber pendant quelques secondes l'absorbance (cas du pic rouge observé lors de l'ajout de la nigéricine). Des courbes similaires sont obtenues avec UCP1-C₁₀E₅ (B.Miroux, IBPC, communication personnelle) .

III.B.2 Test fonctionnel basé sur la mesure des courants électriques

Le principale désavantage du test fonctionnel spectrophotométrique est le fait qu'il s'agit d'une mesure indirecte de l'activité de transport de protons d'UCP1. Comme ce transport est électrogénique nous avons exploré une autre méthode de mesure d'activité d'UCP1, méthode basée sur la mesure directe des courants associés à son activité de transport. La vitesse de transport d'UCP1 est trop faible (14 s^{-1}) pour utiliser des techniques d'électrophysiologie comme le patch clamp (qui est plutôt adapté aux canaux ioniques dont les vitesses de transport sont au moins 10^4 fois plus élevées). La technologie SURFE²R (SURFace Electrogenic Event Reader) (Figure 18) développée par la compagnie IonGate nous a donc semblé la plus appropriée pour réaliser des mesures d'activité d'UCP1.

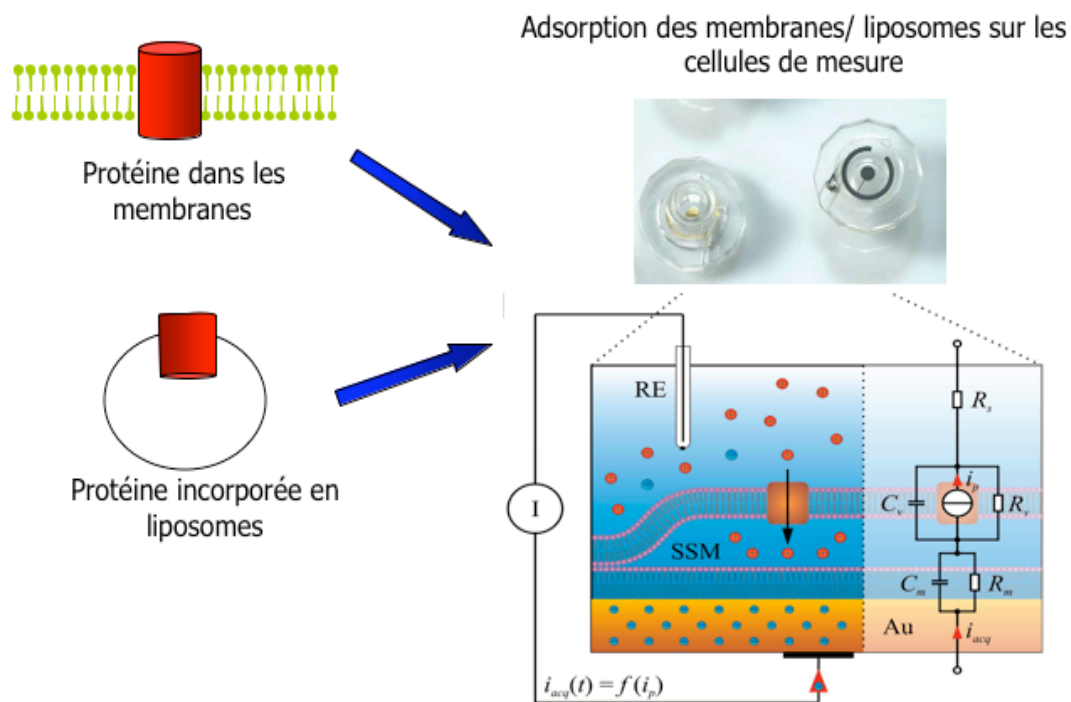


Figure 18. Principe de la technologie SURFE²R

La cellule de mesure est constituée d'une membrane sur support solide (ou SSM=« Solid Supported Membrane »). Elle comprend une électrode en or recouverte par une monocouche lipidique. Des fragments de membrane ou des liposomes contenant la protéine d'intérêt sont adsorbés sur cette couche lipidique, un couplage capacitif entre les deux étant ainsi réalisé. La présence dans les membranes/protéoliposomes de protéines actives, transportant des substrats de façon électrogénique génère un courant électrique capacitif qu'on peut enregistrer via l'électrode en or et une électrode de référence présente en solution. Pour l'activation de la protéine, une solution dépourvue du substrat de la protéine est rapidement échangée par une solution contenant le substrat. L'enregistrement des courants électriques ainsi que l'échange rapide des solutions est réalisé par l'appareil SURFE²R One.

III.B.2.1 Détection d'un courant spécifique à l'UCP1

Des premiers tests réalisés en absorbant des mitochondries du tissu adipeux brun sur les cellules de mesure se sont avérés infructueux, probablement à cause de la présence dans les mitochondries d'autres protéines dont l'activité interfère avec nos mesures. L'autre variante a été d'effectuer les mesures avec la protéine purifiée et incorporée en liposomes. L'UCP1 purifiée en présence de $C_{10}E_5$ a été incorporée en liposomes à un ratio massique protéine/lipides de 10. Ce ratio assez grand est essentiel pour pouvoir effectuer des mesures sur l'appareil SURFE²R. La vitesse de transport d'UCP1 n'étant pas très grande, une quantité importante de protéines est nécessaire pour pouvoir détecter le courant.

Un exemple de résultats est donné dans la Figure 19. La création d'un gradient de protons par l'échange rapide d'une solution à pH 7 avec une solution à pH 6 donne lieu à un courant important (1-3 nA) pour les liposomes ayant incorporée UCP1 (courbe bleue). Le courant est positif, ce qui est en concordance avec une entrée de charges positives dans les liposomes. Le passage de pH 6 à pH 7 provoque un courant similaire dans le sens opposé. En présence de GDP, un inhibiteur d'UCP1, le courant est fortement diminué (courbe magenta). Lorsque le même protocole est appliqué aux liposomes contrôle (sans protéine), le courant obtenu est très faible (0,1-0,2 nA) et le GDP n'as pas d'influence sur ce courant (courbe orange et cyan). Ces différents contrôles (liposomes vides et inhibition par le GDP) indique que le courant mesuré est bien celui correspondant à l'activité de transport des protons d'UCP1. L'inhibition par le GDP est réversible, le passage dans des solutions dépourvues de GDP restaure le courant observé initialement.

Plusieurs informations peuvent être tirées des courants obtenues. La valeur du premier pic correspond au courant maximal obtenu et il dépend du nombre de protéines actives présentes dans les liposomes adsorbés sur la cellule de détection. La surface du pic correspond à la quantité de charges (dans ce cas de protons) transportée par la protéine pendant l'activation. Enfin, les constantes de temps de la décroissance du courant sont caractéristiques du processus de relaxation qui suit les processus d'activation de la protéine.

Le nombre de liposomes et donc de protéines adsorbées sur la cellule de mesure est difficilement contrôlable et peut varier d'une cellule à l'autre. Il est donc difficile de donner des chiffres précis pour la valeur maximale du pic ou de la surface du pic. Cependant, on peut comparer les pourcentages d'inhibition par le GDP. Six différents lots de protéoliposomes ont été réalisés à partir de six préparations de protéines différentes. De façon générale, pour ces lots, le courant maximal observé est inhibé d'environ 40-50% par le GDP. Ce taux

d'inhibition peut être due à deux orientations possibles des protéines dans les liposomes (50% des protéines avec le site de liaison du GDP à l'extérieur des liposomes et 50% avec le site du GDP à l'intérieur des liposomes). Comme la protéine peut transporter des protons dans les deux sens, seules les protéines ayant le site de liaison du GDP orienté vers l'extérieur des liposomes sont inhibées.

La quantité de protons transportés (donnée par la surface du pic) est inhibée par le GDP de seulement 30%. En fait, le transport de protons par l'UCP1 va dépendre, entre autres, du gradient électrochimique établi, c'est à dire du potentiel membranaire (V_m) et du potentiel d'équilibre des protons (E_{H^+} , donné par le gradient de protons). Lors de l'échange de la solution à pH 7 avec la solution à pH 6, le V_m est nul mais un gradient des protons est établi ce qui favorise l'entrée des protons dans les liposomes. Au fur et à mesure que les protons rentrent, les liposomes vont se polariser, le V_m va augmenter et le gradient de protons va diminuer. Un équilibre va s'établir et le transport de protons médié par UCP1 va diminuer et même cesser. Si 50% des protéines sont inactivées par le GDP, l'équilibre va s'établir moins vite que lorsque 100% des protéines sont actives. Comme conséquence, les protéines actives restantes transportent plus de protons, ce qui fait que l'inhibition de la quantité de protons transportés est seulement de 30%.

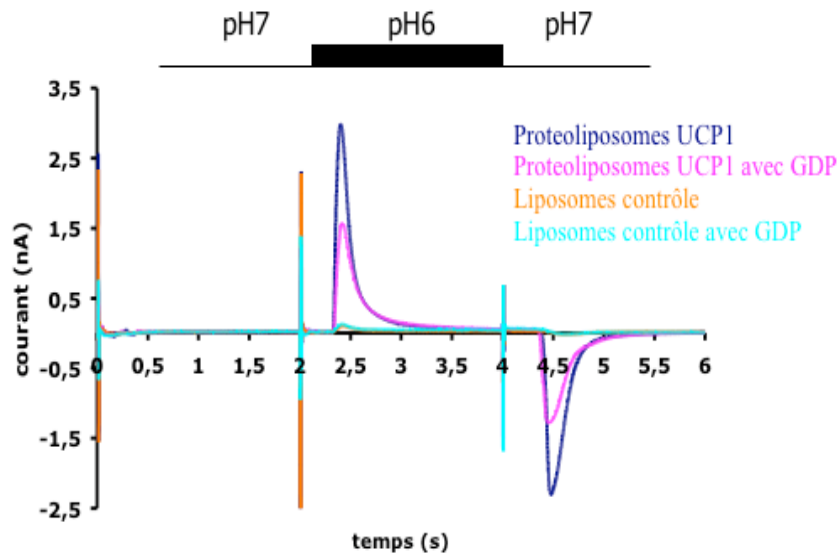


Figure 19. Mesure de l'activité de transport d'UCP1

Des liposomes contenant UCP1 et des liposomes contrôle ont été adsorbés sur les cellules de mesure. Le transport a été activé par la création d'un gradient de pH obtenu par l'échange rapide d'une solution à pH 7 (140 mM gluconate de potassium, 30 mM Mops pH 7) avec une solution à pH 6 (140 mM gluconate de potassium, 30 mM Mes pH 6). Les courbes bleue et magenta représentent les courants mesurés pour les liposomes contenant UCP1 en l'absence et en présence de 100 μ M de GDP respectivement. Les courbes orange et cyan représentent les courants mesurés pour les liposomes contrôle en l'absence et en présence de 100 μ M de GDP respectivement.

III.B.2.2 Effet de la congélation des liposomes

Seulement 1 μ l de protéoliposomes préparés à 10 mg/mL est nécessaire pour réaliser plusieurs mesures d'activité avec une seule cellule de mesure. Nous avons donc testé la possibilité de congeler les liposomes restants pour pouvoir les utiliser plus tard. La Figure 20 présente des courants obtenus avec le même lot de liposomes avant et après congélation de plusieurs semaines à -80°C. Les courants sont similaires ainsi que l'inhibition par le GDP indiquant que la congélation n'affecte pas l'activité d'UCP1.

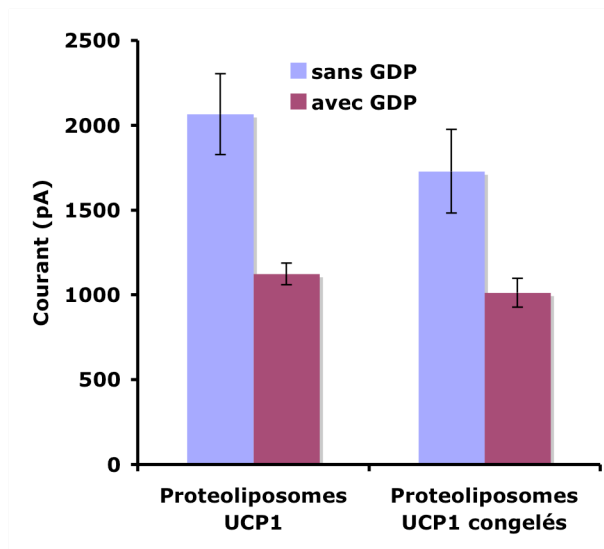


Figure 20. Effet de la congélation des liposomes
Les valeurs données sont des moyennes de minimum 7 mesures.

III.B.2.3 Stabilité du signal

Parfois les mesures sur une même cellule de détection peuvent prendre plus d'une heure. Il était donc intéressant de tester si l'activité de la protéine diminue au cours du temps. Plusieurs mesures ont été réalisées sur deux cellules de détection différentes sur des temps allant jusqu'à environ deux heures (Figure 21). Le signal semble assez stable car il ne diminue pas de façon significative au cours de ces deux heures.

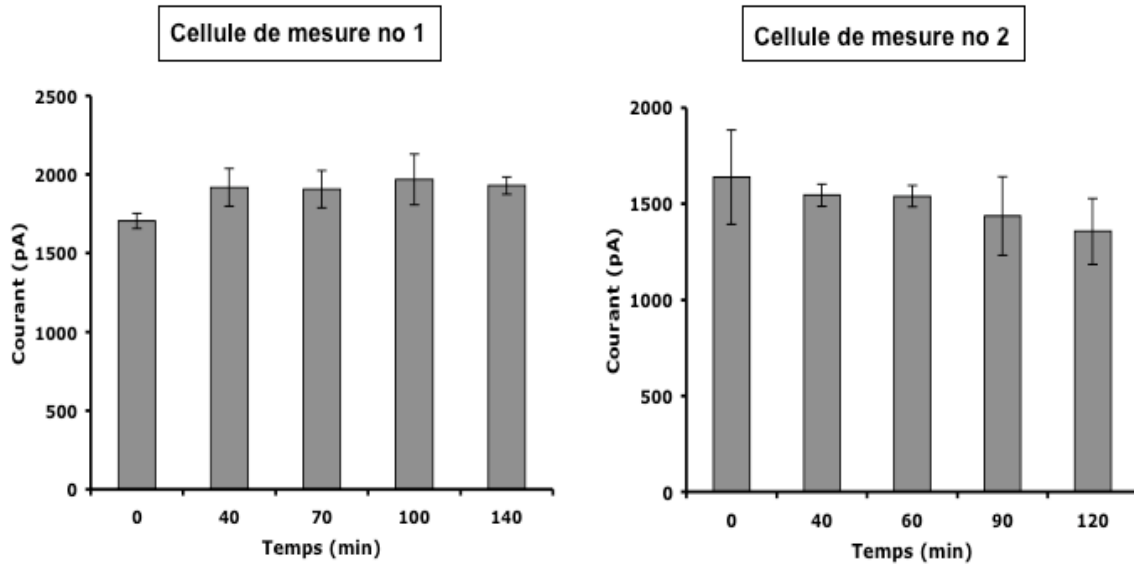


Figure 21. Stabilité du signal en fonction du temps

Mesures réalisées sur deux cellules de mesure différentes à des temps allant de 0 à 120-140 min. À chaque temps, au moins 7 mesures ont été réalisées.

III.B.2.4 Effet des acides gras

Le transport médié par UCP1 est activé par les acides gras. Toutefois, il n'est pas clairement établi si les acides gras sont indispensables ou non à l'activité de transport d'UCP1 (voir Chapitre I). Les mesures présentées précédemment ont été obtenues sans ajout d'acide gras mais il est possible que les préparations de protéine utilisées contiennent encore des acides gras endogènes provenant du tissu adipeux brun.

Afin de tester cette hypothèse des mesures ont été réalisées en présence de 6 μ M BSA (« Bovine Serum Albumin »), une protéine ayant la propriété d'adsorber les acides gras (Figure 22). Le courant est fortement inhibé en présence de la BSA mais le bruit augmente (la courbe bleu et plus épaisse que la courbe rouge). La BSA est une protéine qui peut s'attacher aux membranes et peut perturber de cette manière nos mesures. Afin de vérifier que l'effet inhibiteur observé est bien spécifique d'UCP1, des mesures contrôle avec des protéoliposomes contenant une protéine autre qu'UCP1 sont nécessaires.

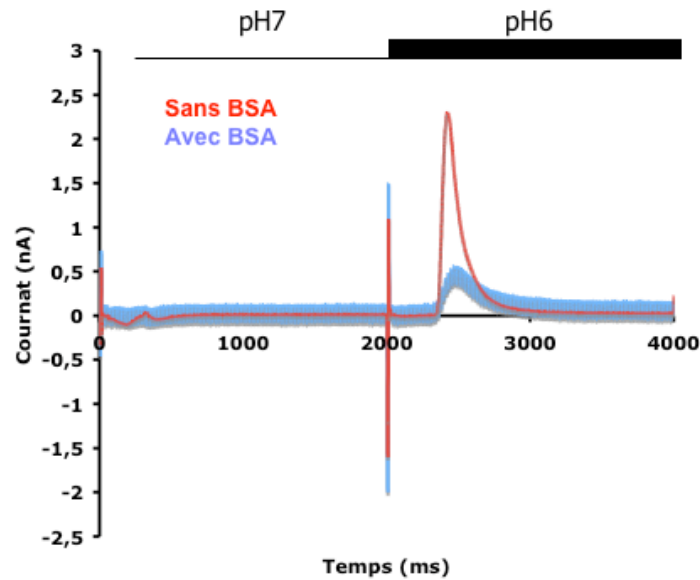
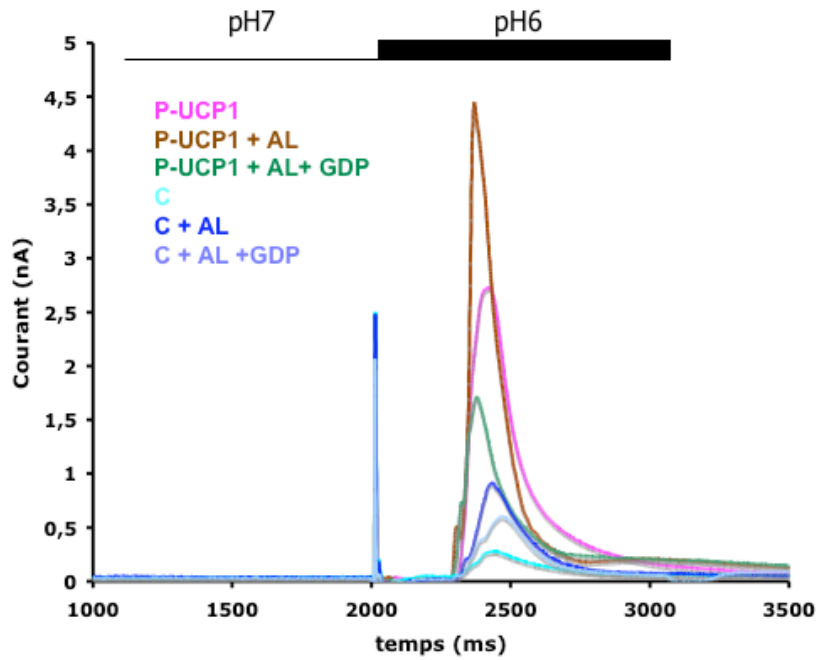


Figure 22. Effet des acides gras / BSA

Le transport a été activé par la création d'un gradient de pH obtenu par l'échange rapide d'une solution à pH 7 (140mM Gluconate de potassium, Mops 30mM pH 7) avec une solution à pH 6 (140mM Gluconate de potassium, Mes 30mM pH 6). Les courbes rouges et bleues représentent les courants mesurés pour les liposomes contenant UCP1 en absence et en présence de 15 μ M BSA dans les solutions respectivement.

Afin de voir si le courant observé pour les liposomes contenant UCP1 peut être activé par les acides gras, des mesures en présence d'acide laurique ont été réalisées (Figure 23). L'acide laurique active fortement le courant observé et l'ajout du GDP inhibe ce courant. Toutefois, un effet activateur peut être remarqué pour les liposomes contrôle aussi. En effet, les acides gras peuvent interagir et même solubiliser les membranes à des concentrations élevées. Même si l'activation par les acides gras est moins importante pour les liposomes contrôle que pour les liposomes contenant UCP1, il est difficile de conclure sur le pourcentage d'activation spécifique de l'activation d'UCP1 par les acides gras.

A



B

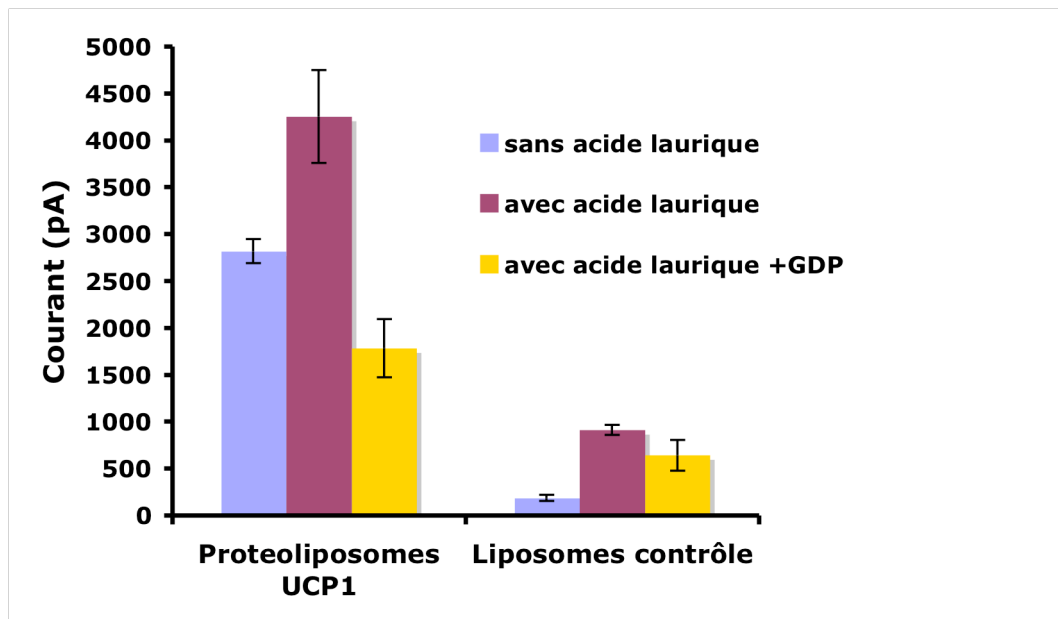


Figure 23. Effet de l'acide l'aurique

A. Courbes des courants enregistrés

B. Histogrammes des courants enregistrés

Le transport a été activé par la création d'un gradient de pH obtenu par l'échange rapide d'une solution à pH 7 (140 mM Gluconate de potassium, 30 mM Mops pH 7) avec une solution à pH 6 (140 mM gluconate de potassium, 30 mM Mes pH 6). Pour certaines mesures 30 μ M d'acide laurique et /ou 100 μ M GDP ont été ajoutés dans les solutions

III.B.2.5 Effet des ions chlorure

Les halogènes tels que les ions chlorure peuvent avoir un effet inhibiteur du transport des protons par l'UCP1 (voir Chapitre I). Nous avons donc réalisé des mesures en remplaçant le gluconate de potassium (utilisé habituellement) par le chlorure de potassium (Figure 24). La valeur maximale du courant n'a pas diminué mais la quantité des charges transportées a été diminuée d'environ 30%. Aucun effet n'a été observé sur les liposomes contrôle. C'est la première fois qu'il est montré que les ions Cl^- n'affecte pas la vitesse de transport de la protéine mais plutôt la quantité de charge totale transportée. L'inactivation de la protéine est donc plus rapide en présence des ions chlorure.

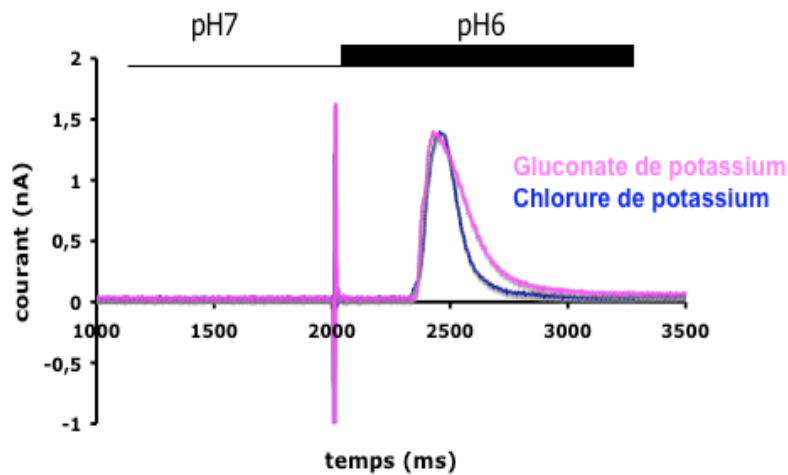


Figure 24. Effet des ions chlorure sur l'activité d'UCP1

Le transport a été activé par la création d'un gradient de pH obtenu par l'échange rapide d'une solution de pH 7 (30 mM Mops pH 7 additionné de 140 mM gluconate de potassium ou 140 mM chlorure de potassium) avec une solution à pH 6 (30 mM Mes pH 6 additionné de 140 mM gluconate de potassium ou 140 mM chlorure de potassium).

III.B.3 Test SURFE2R - avantages et désavantages

Les données présentées montrent que la technologie SURFE²R permet d'enregistrer le courant correspondant à l'activité de transport d'UCP1. Le signal est stable au cours du temps, il est inhibé par les nucléotides comme le GDP et semble être activé par les acides gras. Ce test fonctionnel présente l'avantage de réaliser une mesure directe de l'activité

d'UCP1 (par rapport aux tests fonctionnels classiques comme le test spectrophotométrique qui réalise une mesure indirecte) et de permettre une étude plus fine du mécanisme de transport. Le résultat obtenu pour l'inhibition du transport exercée par les ions chlorure est un bon exemple. Les tests fonctionnels classiques sont capables de détecter seulement une inhibition globale tandis que notre test a permis de montrer que les ions chlorure ne diminuent pas la vitesse maximale du transport d'UCP1 mais augmente la vitesse d'inactivation du transporteur.

Toutefois, une des principales contraintes de ce test est que, afin d'obtenir un signal détectable, les protéoliposomes doivent avoir un contenu protéique élevé et une concentration lipidique d'environ 10 mg/mL. Le ratio lipide/protéine (w/w) optimal est autour de 10 alors que pour les tests classiques les ratios utilisés sont beaucoup plus élevés (par exemple un ratio de 300 est suffisant pour le test spectrophotométrique). Une quantité de protéine assez importante est donc nécessaire. Toutefois, si la concentration nécessaire est élevée, de très faibles volumes (1 μ L de protéoliposomes) suffisent pour réaliser plusieurs mesures sur une même cellule de mesure. Le reste de la préparation de protéoliposomes peut être conservée à -80°C pendant plusieurs mois sans perte d'activité. Ainsi, avec une seule préparation de 150 μ L de protéoliposomes, de nombreuses mesures sont possibles permettant ainsi le criblage des différentes conditions et ligands. L'appareil actuellement présent dans notre laboratoire (SURFE²R One) permet la mesure du courant provenant d'une seule cellule de détection mais des appareils plus performants, réalisant des mesures concomitantes sur 8 pistes contenant chacune des plaques de 96 ou 384 puits sont également disponibles (ex : SURFE²R Workstation 5000). Ces appareils semi-automatiques peuvent réaliser plusieurs milliers des mesures par jour et permettre ainsi un criblage à haut débit.

Ce test fonctionnel ne s'applique pas uniquement à l'UCP1. Tout autre transporteur dont le transport est électrogénique peut être caractérisé par ce test. En particulier, le transport d'AAC étant électrogénique (un ATP⁴⁻ contre un ADP³⁻) la technologie SURFE²R peut s'appliquer à l'AAC. Gropp *et al.* (1999) avaient déjà démontré la faisabilité d'une telle méthode en mesurant les courants électriques générés par l'AAC .

Chapitre IV

Résultats & Discussion : Transporteurs mitochondriaux recombinants

Chapitre IV Résultats & discussion :

Transporteurs mitochondriaux recombinants

IV.A La synthèse *in vitro* des transporteurs mitochondriaux

IV.A.1 Principe de la synthèse *in vitro*

La synthèse *in vitro* est une technique acellulaire de production de protéines basée sur le couplage de la transcription et de la traduction qui ont lieu simultanément dans le même mélange réactionnel. Le principe est assez simple : l'ADNc de la protéine d'intérêt est ajouté à un mélange réactionnel contenant les éléments nécessaires à la transcription et la traduction. Grâce à ces composants, l'ADNc est transcrit et traduit, la protéine résultante pouvant être récupérée à la fin de la réaction. Actuellement, les mélanges réactionnels les plus utilisés sont faits à partir d'extraits d'*E. coli* ou de germes de blé enrichis en nucléotides, acides aminés, ARN de transfert, ARN polymérase, substrats énergétiques et systèmes enzymatiques de régénération énergétique.

Cette technique a récemment émergé comme un outil rapide et efficace de production des protéines membranaires (pour revue voir Schwarz 2008). Une variété de protéines membranaires procaryotes ou eucaryotes, appartenant à diverses familles et ayant jusqu'à 12 hélices membranaires et des masses moléculaires dépassant 100 kDa pour certaines, ont pu être produites avec succès en utilisant ce système.

Pour réaliser la synthèse *in vitro* plusieurs systèmes commerciaux existent. Notre choix a porté sur le système RTS (« Rapid Translation System ») basé sur des extraits d'*E. coli* et commercialisé par Roche. Plusieurs systèmes RTS sont disponibles. Le RTS 100 est un système dont le volume réactionnel est assez réduit (25-50 μ L) et pour lequel la réaction est réalisée dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Cependant, dans ce système, la synthèse s'arrête après 4-6 heures à cause de l'épuisement des substrats et de l'accumulation de produits de la réaction qui deviennent inhibiteurs. Ce système est donc plutôt adapté aux tests d'expression à petite échelle.

Pour pouvoir obtenir des quantités plus importantes de protéine les systèmes RTS 500 ou RTS 900 peuvent être utilisés. Ces systèmes se caractérisent par un volume réactionnel plus important (1 mL pour RTS 500 et 10 mL pour RTS 900) et la possibilité d'avoir une synthèse pendant 24 heures. La réaction est réalisée dans un dispositif présentant deux compartiments (réactionnel et réservoir) séparés par une membrane semi-perméable permettant l'échange des substrats et des produits inhibiteurs entre les deux compartiments. La synthèse de la protéine a lieu dans le compartiment réactionnel. Les composés inhibiteurs produits pendant la réaction vont diffuser dans le compartiment réservoir alors que les substrats présents dans le compartiment réservoir vont diffuser dans le compartiment réactionnel, permettant ainsi une synthèse pendant 24 heures (Figure 25).

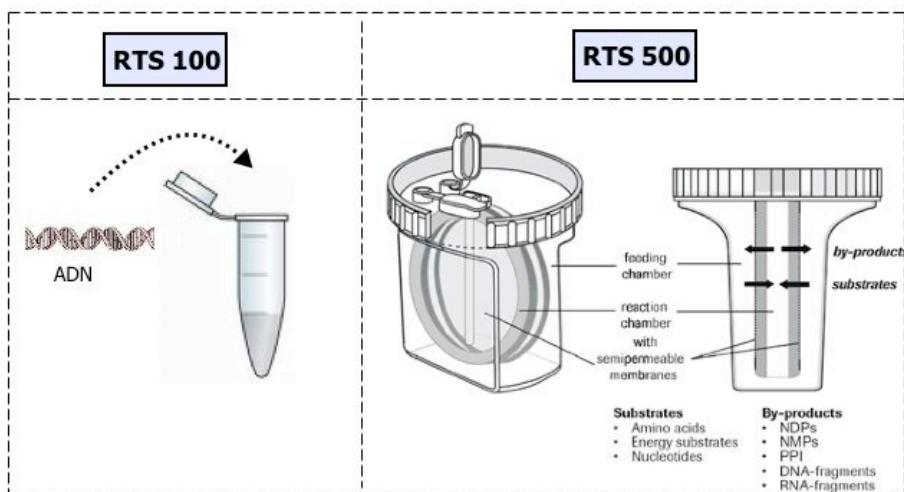


Figure 25. Représentation schématique des systèmes RTS 100 et 500

IV.A.2 Mise au point des conditions de synthèse

La protéine UCP1 de rat (rUCP1) a été choisie pour réaliser les premiers tests d'expression des transporteurs mitochondriaux dans le système RTS afin d'évaluer si ce système est adapté pour la production des transporteurs mitochondriaux recombinants. Le choix a porté sur UCP1 car il est le seul parmi les transporteurs mitochondriaux étudiés pour lequel un test fonctionnel de la protéine purifiée était disponible dans notre laboratoire ou chez nos collaborateurs (voir Chapitre III).

L'ADNc de rUCP1 a été cloné dans 2 vecteurs adaptés à la synthèse *in vitro* : un vecteur permettant l'expression avec une étiquette histidine (His₆) du côté N-terminal de la protéine (pIVEX 2.4a) et un vecteur permettant l'expression avec une étiquette Histidine (His₆) su côté C terminal de la protéine (pIVEX 2.3 MCS). Le vecteur pIVEX 2.4a possède un site de coupure au facteur Xa entre l'étiquette His₆ et le gène codant pour la protéine (Figure 26).

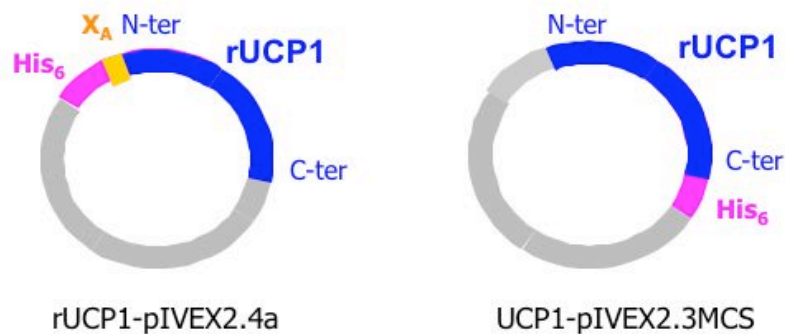


Figure 26. Représentation schématique des constructions utilisées pour la synthèse *in vitro* de rUCP1

Les premiers tests d'expression de la protéine ont été réalisés avec le système RTS 100. Les plasmides rUCP1-pIVEX 2.4a et rUCP1-pIVEX 2.3 MCS ont été introduits dans 25µL de mélange réactionnel et incubés à 28°C pendant 24h. Après centrifugation et séparation du surnageant et du culot, la présence de la protéine dans ces fractions a été vérifiée par Western blot (en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette His₆ de la protéine). La protéine a pu être détectée seulement pour la construction rUCP1-pIVEX 2.4a (Figure 27). Un problème de synthèse semble exister avec la construction rUCP1-pIVEX 2.3

MCS. En effet, il est connu que la synthèse *in vitro* des protéines dépend fortement de l'initiation de la traduction. L'augmentation de la production par une étiquette histidine présente du côté N-terminal (N-ter) a été observée par Murthy *et al* (2004). En changeant la position de l'étiquette histidine de N-ter en C-ter pour 63 protéines, ils ont remarqué que la présence de l'étiquette en C-ter diminue et parfois même inhibe complètement la synthèse de la protéine. Il est donc possible que l'étiquette histidine présente en N terminal de la protéine pour la construction rUCP1-pIVEX 2.4a soit essentielle pour une bonne initiation de la traduction et une bonne synthèse de la protéine. Pour cette raison, seule cette construction a été utilisée par la suite.

Afin de tester l'effet de la quantité d'ADN sur la synthèse, la même expérience a été réalisée en présence de deux fois plus d'ADN (1 µg au lieu de 0,5 µg) avec le même résultat. Dans la gamme utilisée, la quantité d'ADN ne semble donc pas affecter de façon visible la production de la protéine.

Il est intéressant de remarquer dans la Figure 27 que la protéine synthétisée pour la construction rUCP1-pIVEX 2.4a n'est présente que dans le culot, donc sous forme agrégée. Ceci n'est pas très surprenant pour une protéine membranaire. La prochaine étape a donc été l'obtention d'une protéine soluble.

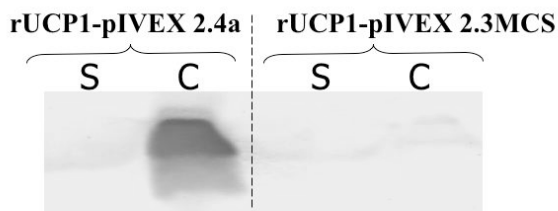


Figure 27. Synthèse *in vitro* de rUCP1-pIVEX 2.4a et rUCP1-pIVEX 2.3 MCS
Détection par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine
S-surnageant, C-culot

IV.A.2.1 Vers une protéine soluble...

Deux stratégies ont été employées afin d'obtenir une protéine soluble : (1) la solubilisation du culot et (2) la production de rUCP1 en présence de surfactants.

IV.A.2.1.1 La solubilisation du culot

Plusieurs détergents ont été testés afin d'évaluer leur capacité à solubiliser le culot contenant la protéine précipitée issue de la synthèse *in vitro*. Les détergents ont été utilisés à une concentration finale de 2% (w/v) et ont été sélectionnés parmi différentes classes de détergents : les maltosides et glucosides (DDM, Cymal6, β -OG), les polyoxyéthylènes (C₁₀E₅, Brij35), les polyéthylènes glycol (Triton X-100), les stéroïdes (CHAPS) et les amines oxydes (LAPAO). Certains de ces détergents ont déjà été utilisés avec succès pour la solubilisation des protéines membranaires provenant de la synthèse *in vitro*. On peut citer par exemple le Triton X-100 (MscL (Berrier 2004) ; EmrE (Klammt 2005)), le β -OG (proteorhodopsine (Gourdon 2008)) le CHAPS et DDM (EmrE, (Klammt 2005)). Dans le cadre de ce travail, aucun de ces détergents n'a réussi à solubiliser le culot, la majeure partie de la protéine restant toujours dans la partie insoluble. Un exemple de résultats obtenus avec le C₁₀E₅ est donné dans la Figure 28, en sachant que des résultats similaires ont été obtenus avec les autres détergents. Un résultat intéressant a été toutefois observé avec un surfactant, l'amphipole A8:35. Utilisé à une concentration finale de 5% (w/v) il a été capable de re-solubiliser partiellement le culot (Figure 28).

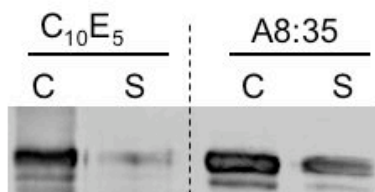


Figure 28. Solubilisation du culot obtenu par synthèse *in vitro* de rUCP1
Détection par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine
S-surnageant, C-culot

IV.A.2.1.2 La production en présence de surfactants

L'autre possibilité pour obtenir une protéine soluble est l'ajout de surfactants directement dans le mélange réactionnel, lors de la réaction de synthèse de la protéine. Après la réaction, le mélange réactionnel est récupéré, centrifugé et la solubilité de la protéine est estimée sur la base de sa présence dans le surnageant.

Le Tableau 6 regroupe les différents surfactants utilisés ainsi que les résultats obtenus en terme de solubilité de la protéine. Il s'agit d'une évaluation qualitative. En effet, d'une expérience à l'autre la quantité d'UCP1 détectée dans le surnageant peut présenter une certaine variation. Ceci peut provenir des variations lors de la synthèse mais aussi d'une séparation délicate du surnageant et du culot après la centrifugation. Le culot étant souvent très petit et fragile, une récupération complète du surnageant est parfois difficile.

Type surfactant	Surfactant	Charge	Cmc (mM)	Concentration (mM)	Solubilité UCP1
Glucosides	DDM	N	0,17	1,7	3
	Cymal 5	N	2,4	24	2
Polyethylene glycols	triton X-100	N	0,23	2,3	0
Polyoxyéthylènes	C10E5	N	0,81	8,1	0
	Brij35	N	0,091	3,3	5
	Brij 58	N	0,004	0,9	5
Steroides	Digitonine	N	0,5	6,5	5
Amine oxides	LDAO	Z	1,00	10	Inhibiteur
	LAPAO	Z	1,56	15,6	Inhibiteur
Detergents "Lipd like"	FC12	Z	1,5	15	Inhibiteur
	FC14	Z	0,12	1,2	Inhibiteur
	FC16	Z	0,013	0,13	3
Surfactants "phospholipid like"	C13U19	N	0,008	0,08	6
	C15U25	N	0,0055	0,055	6
	C17U16	N	0,005	0,05	6
Composées fluorés	HFTAC	N	0,45	9	6
	F6TAC10	N	0,3	7,5	6
	F6TAC5	N	0,3	7,5	6
	F8TAC5	N	0,03	0,75	6
Amphipoles	A8:35	A	-	0,125	Inhibiteur
Amphiphiles faciaux	C ₅ GluOH ₃	N	0,12	1,23	0

Tableau 6. Influence des surfactants sur la solubilité de rUCP1.

La solubilité est notée sur une échelle de 0 à 10, 10 correspondant à la détection de la protéine exclusivement dans le surnageant. « Inhibiteur » indique une inhibition de la synthèse protéique par le surfactant. N : non-ionique, A : anionique et Z : zwitterionique. Les concentrations ont été choisies de façon à être en excès par rapport à la cmc du surfactant (minimum 10 fois la cmc). Pour plus de détails sur les différentes classes de surfactants et leur propriétés voir Annexe A.

La plupart des surfactants zwitterioniques (LDAO, LAPAO, FC12, FC14) inhibent la production de la protéine. FC16 est le seul parmi les surfactants zwitterioniques testés qui n'inhibe pas la réaction et permet même une solubilisation partielle de la protéine. Il est possible que la longueur plus importante de la chaîne hydrocarbonée lui confère un pouvoir dénaturant plus faible et donc non-inhibiteur pour la réaction. Le surfactant anionique utilisé, l'amphipole A8:35 inhibe aussi la synthèse.

Le Triton X-100, un détergent non ionique, ne semble pas affecter la production de la protéine mais il n'améliore pas la solubilité. Les maltosides (DDM et Cymal5) permettent de maintenir seulement une partie de la protéine en solution. Un résultat intéressant est obtenu pour les polyoxyéthylènes. Alors que le C₁₀E₅ ne semble pas augmenter la solubilité de la

protéine, des détergents moins homogènes (avec les chaînes moins bien définies) comme Brij35 et Brij58 solubilisent environ 50% de la protéine produite. Des résultats assez bons sont obtenus avec un surfactant stéroïdien, la digitonine, ainsi qu'avec des surfactants ressemblant à des phospholipides (C_nU_m) et les surfactants fluorés (FTAC).

De façon générale, nous pouvons remarquer que les meilleurs résultats sont obtenus avec les surfactants les plus doux (Brij, digitonine, C_nU_m , FTAC). Ces surfactants ne sont pas capables vraiment de solubiliser les membranes et ils ont donc été peu utilisés jusqu'à maintenant pour l'extraction des protéines des membranes après leur production dans les systèmes cellulaires classiques. Toutefois, leurs propriétés non dénaturantes font d'eux les meilleurs surfactants pour la synthèse *in vitro*.

Parmi les surfactants testés, certains ont déjà été utilisés avec succès pour la synthèse d'autres protéines membranaires. C'est le cas du Brij-35, Brij-58, FTAC, digitonine, DDM et du Triton X-100 (pour revue voir Schwarz 2008). L'utilisation des surfactants comme C_nU_m , FC16, C_2GluOH_2 , $C_{10}E_5$ ou Cymal5 pour la synthèse *in vitro* n'avait encore jamais été décrite dans la littérature. Nous avons montré pour la première fois qu'ils sont compatibles avec la synthèse *in vitro*.

Toutefois, même si certains surfactants ont donné des bons résultats au niveau de la solubilité de la protéine, aucun des surfactants testés ne permet la solubilisation complète. Afin de trouver des conditions conduisant à une meilleure solubilité, différents paramètres réactionnels ont ensuite été variés.

IV.A.2.1.2.1 La température de la réaction de synthèse

Il est possible qu'une température élevée soit dénaturante pour la protéine. La réaction de synthèse est optimale à 37°C. Cependant, 37°C est une température assez élevée, surtout pour des protéines qui ne sont pas très stables. Les premières réactions ont donc été réalisées à 28°C. Afin de voir si une diminution de la température augmente la capacité des surfactants à maintenir la protéine en solution, des réactions à 28°, 20° et 15°C ont été réalisées. La proportion de protéines présentes dans le surnageant ne semble pas varier entre les trois températures. Cependant, à 15°C la production de la protéine est fortement diminuée. Nos expériences ont donc été réalisées à 28°C ou 20°C.

IV.A.2.1.2.2 La quantité de surfactant

Nous avons ensuite évalué l'effet de la concentration du surfactant utilisé. L'augmentation de la concentration en DDM de 1,7 mM à 20,4 mM ne semble pas améliorer la solubilité de la protéine. Au contraire, la quantité de protéines présente dans le culot augmente et une inhibition de la synthèse pour des quantités de DDM importantes (20,4 mM) est remarquée. Des quantités croissantes de F₈TAC₅ (Figure 29) n'ont pas d'effet majeur sur la proportion de la protéine présente dans le surnageant. Toutefois, contrairement au DDM, des fortes concentrations de F₈TAC₅ ne semblent pas inhiber la réaction de synthèse. Un résultat similaire a été obtenu pour C₁₃U₁₉. Ces résultats sont en accord avec le faible pouvoir dénaturant des surfactants non détergents comme FTAC et C_nU_m, même à des concentrations très élevées (contrairement aux détergents dont le pouvoir dénaturant augmente avec leur concentration). Ceci a été déjà observé dans la littérature pour la synthèse *in vitro* du canal mécanosensible MscL (Berrier 2004)

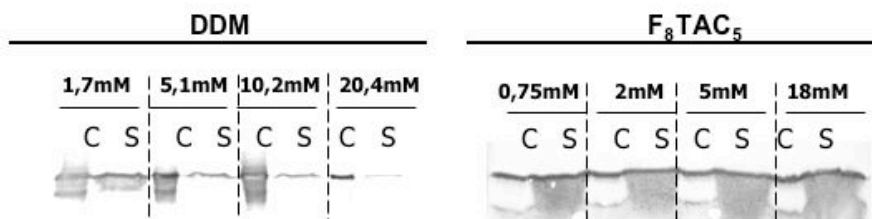


Figure 29. Effet de la concentration des surfactants sur la solubilité de rUCP1
Détection par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine
S-surnageant, C-culot

IV.A.2.1.2.3 Les additifs

En complément des surfactants donnant les meilleurs résultats, différents types d'additifs ont été rajoutés à la réaction (Tableau 7). Les peptergents sont des petits peptides ayant des propriétés de détergents. Ils présentent une queue hydrophobe formée par des acides aminés apolaires et une tête hydrophile formée par des acides aminés chargés. Ils ont été utilisés avec succès pour la stabilisation des protéines membranaires (Yeh 2005). Leur ajout en plus du F₈TAC₅ ou du DDM n'as pas eu d'effet sur la solubilité de rUCP1. Le cis inositol

(molécule développée par Kaspar Hegetschweiler (université de Saarbrücken) dans le cadre du projet européen IMPS), ne semble pas avoir un effet remarquable non plus. L'ajout des deux ligands d'UCP1, l'acide laurique et le GDP inhibe plutôt la réaction de synthèse.

Surfactant	Additifs	Concentration	Solubilité
DDM 1,7mM	sans additif	-	3
	lipides E.Coli	0,01g/L	1
	cardiolipide	0,4g/L	1
	cis inositol	2,50%	3
	peptergent Aca6D	0,06mM	3
	peptergent DA6	0,1mM	3
	peptergent Aca6K	0,06mM (1mM)	3
	peptergent KA6	0,1mM	3
F8TAC5 0,75mM (4mM)	sans additif	-	6
	lipides E.Coli	0,4g/L	6
	cardiolipide	0,4g/L	9
	cis inositol	2,50%	6
	amphiphile facial C ₅ GluOH ₃	0,3g/L	6
	peptergent KA6	0,1mM (0,4mM)	6
	acid laurique	0,1mM	Inhibiteur
	GDP	0,1mM	Inhibiteur
C13U19 0,8mM	sans additif	-	6
	E.Coli lipids	0,01g/L	6
	cardiolipide	0,4g/L	4
	peptergent KA6	0,1mM (0,4mM)	2
Brij35 3,3mM	sans additif	-	5
	cardiolipide	0,4g/L	9
Brij58 0,9mM	sans additif	-	5
	cardiolipide	0,4g/L	0
Digitonine 3,2mM	sans additif	-	5
	cardiolipide	0,4g/L	5

Tableau 7. Effet des additifs sur la solubilité d'UCP1

La solubilité est notée sur une échelle de 0 à 10, 10 correspondant à la détection de la protéine exclusivement dans le surnageant. Comme auparavant, il s'agit d'une notation qualitative. Une concentration suivie d'une concentration écrite en parenthèse signifie que les deux concentrations ont été testées.

L'ajout d'un mélange de lipides de *E. coli* ne semble pas avoir un effet bénéfique sur la solubilité. Cependant, des résultats très intéressants ont été obtenus avec un autre lipide : le cardiolipide, un lipide caractéristique de la membrane mitochondriale interne. Ce lipide augmente de façon significative la solubilité de la protéine en présence de F₈TAC₅ et de Brij35, presque toute la protéine est retrouvée dans le surnageant. En effet, le cardiolipide est un lipide très particulier. Il présente 4 chaînes alkyl au lieu de 2 pour un phospholipide classique (Figure 30) et il peut avoir un rôle important dans la structure et fonction des transporteurs mitochondriaux (Klingenberg 2009, Nury 2005).

Le cardiolipide pourrait avoir un effet bénéfique en stabilisant la protéine. Contrairement aux détergents, F₈TAC₅ se mélange difficilement avec les lipides. Les molécules de cardiolipides ne vont pas être piégées dans les micelles de surfactant et vont

pouvoir interagir avec la protéine. L'effet bénéfique du cardiolipide en présence de Brij35 est plus difficile à expliquer. Un amphiphile faciale qui a des propriétés structurales semblables au cardiolipide a été aussi testé mais il n'augmente pas de façon considérable la solubilité. Le rôle du cardiolipide semble donc être assez complexe.

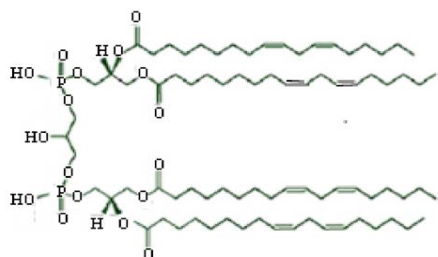


Figure 30. Structure chimique du cardiolipide

IV.A.2.1.3 Expression en présence de liposomes

Certains articles (Kalmbach 2007 ; Wu 2008 ; Liguori 2008 ; Guilvout 2008) décrivent la synthèse *in vitro* de protéines membranaires en présence de liposomes. À l'issue de la réaction de synthèse, les protéines semblent être directement incorporées dans les liposomes. Afin d'évaluer l'efficacité de cette méthode sur rUCP1, plusieurs types de liposomes SUV (préparés dans 2 tampons différents et ayant des compositions lipidiques différentes) ont été testés dans le cadre de ce travail (Tableau 8). Les liposomes ont été ajoutés dans le mélange réactionnel et, une fois la réaction finie, l'incorporation de la protéine dans les liposomes a été évaluée à l'aide d'un gradient de saccharose. Les résultats obtenus montrent que le tampon 70 mM K₂SO₄, 5 mM KPi, pH 6,8 inhibe la synthèse de la protéine, alors que la préparation des liposomes dans le tampon RTS fourni avec le kit ne pose pas de problèmes. Toutefois, tant pour des liposomes PC:PE:CL que pour les liposomes d'azolectine, la protéine n'est pas incorporée dans les liposomes car elle se retrouve toujours dans la fraction des gradients de saccharose correspondant aux précipités.

Liposomes	Composition lipidique	Concentration lipidique	Tampon	Incorporation UCP1
1	PC:PE:CL 8:1:1 (w/w/w)	10mg/ml	70mM K ₂ SO ₄ , 5mM KPi, pH 6,8	(Inhibition synthèse)
2	PC:PE:CL 8:1:1 (w/w/w)	10mg/ml	Tampon RTS	Non
3	azolectine	10mg/ml	Tampon RTS	Non

Tableau 8. Synthèse *in vitro* de rUCP1 en présence des liposomes

IV.A.3 Mise au point de l'expression d'autres transporteurs mitochondriaux

Vu les bons résultats obtenus avec rUCP1, nous avons voulu tester l'applicabilité de cette méthode de production à d'autres transporteurs mitochondriaux. Plusieurs membres de la sous-famille des UCPs (hUCP3, mUCP2, mUCP3, zUCP, avUCP) et des AACs (hAAC1, hAAC2) ont été clonés dans le vecteur pIVEX2.4a permettant l'expression avec une étiquette His₆ en N terminal de la protéine.

Les premiers tests d'expression ont confirmé l'expression *in vitro* de ces protéines dans des quantités comparables à UCP1. Différents surfactants et additifs ont donc été ajoutés dans le mélange réactionnel, comme pour rUCP1. Le Tableau 9 regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Le DDM et le Brij35 semblent être meilleurs du point de vue de la solubilité pour les AACs que pour les UCPs. Les détergents zwitterioniques LDAO et FC12 inhibent la synthèse de tous les transporteurs suggérant un effet général sur le système *in vitro*. FC16 et Cymal 5 ont des effets semblables pour tous les transporteurs. En ce qui concerne F₈TAC₅ il y a de petites variations entre les différents protéines mais, globalement, l'ajout de cardiolipide augmente la solubilité de tous les transporteurs testés. Les transporteurs mitochondriaux semblent donc avoir un comportement similaire en présence des différents surfactants.

Surfactant	Concentration	rUCP1	hAAC1	hAAC2	mUCP2	mUCP3	hUCP3	avUCP	zUCP
DDM	1,7mM	3	7	6	5	4	1	1	3
DDM+ cardiolipide	1,7mM+0,4g/L	1	6	4	-	-	-	-	3
Cymal-5	24mM	2	2	2	1	1	2	1	1
Brij35	0,8mM	5	7	7	5	5	5	5	5
Brij35+cardiolipide	0,8mM+0,4g/L	8	7	9	-	-	-	-	8
LDAO	10mM	In	In	In	In	In	In	In	In
FC12	15mM	In	In	In	In	In	In	In	In
FC16	0,25mM	3	3	3	3	3	3	1	2
F8TAC5	4mM	6	7	6	7	7	8	8	5
F8TAC5+ cardiolipine	4mM+0,4g/L	9	9	9	9	9	9	9	9

Tableau 9. Effet des surfactants et additifs sur la solubilité des transporteurs mitochondriaux

La solubilité approximative est notée sur une échelle de 0 à 10, 10 correspondant à la détection de la protéine exclusivement dans le surnageant. Comme auparavant, il s'agit d'une notation qualitative. In-Inhibiteur pour la production de la protéine.

La solubilisation du culot de synthèse s'est avérée inefficace pour rUCP1 mais nous avons voulu tester cette méthode pour un autre transporteur mitochondrial. La réalisation des

mêmes expériences avec hAAC1 a abouti pourtant à des résultats similaires : aucun détergent n'a pu solubiliser la protéine.

Les transporteurs ADP/ATP sont inhibés de façon spécifique par deux molécules: le BA et le CATR. Afin de tester l'effet de ces inhibiteurs sur la solubilité de la protéine, 40 μM de BA ou CATR ont été ajoutés en plus de DDM à la réaction de synthèse d'hAAC1. Cependant aucune amélioration de la solubilité n'a été observée.

IV.A.4 Synthèse à l'échelle préparative - RTS 500

Après avoir établi les conditions dans lesquelles la protéine est synthétisée sous une forme soluble, la prochaine étape a été la production de quantités plus importantes permettant la purification subséquente de la protéine. Le système RTS 500 a été employé et les premiers tests ont été réalisés sur rUCP1.

Les deux meilleures conditions de synthèse déterminées avec le système RTS 100 ont été retenues afin de réaliser ces tests : (1) La synthèse en présence de 4 mM de F_8TAC_5 et 0,4 g/L de cardiolipide et (2) La synthèse en présence de 3,3 mM de Brij35 et 0,4 g/L de cardiolipide. L'analyse par Western blot a révélé que la protéine est majoritairement présente dans le surnageant (Figure 31). Toutefois, la proportion de la protéine présente dans le surnageant est plus importante en présence de F_8TAC_5 .

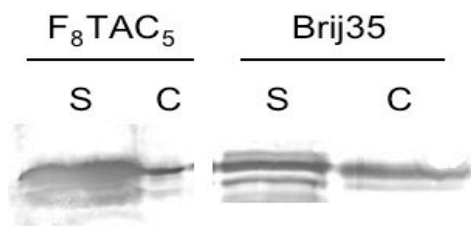


Figure 31. Synthèse *in vitro* de rUCP1 en présence de F_8TAC_5 et Brij35
Détection par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine
S-surnageant, C-culot

Cette dernière condition a été également testée pour la synthèse d'hAAC1 avec le même résultat. Les tests d'expression d'hAAC1 réalisés avec le système RTS 100 ont révélé aussi une autre condition prometteuse : la synthèse en présence de DDM. Dans cette condition

environ 70% de la protéine est soluble à la fin de la synthèse (voir Tableau 9). Toutefois, l'application de cette condition au système RTS 500 n'a pas donné le même résultat, la protéine se retrouvant majoritairement dans le culot à la fin de la synthèse. Il est donc possible que les conditions optimales déterminées en RTS 100 ne soient pas toujours applicables en RTS 500.

Le surnageant obtenu après la synthèse *in vitro* contient beaucoup de protéines dont rUCP1 synthétisé (Figure 32). D'une synthèse à l'autre il y a des variations en ce qui concerne la quantité de protéine synthétisée, la bande correspondant à UCP1 n'étant pas toujours bien visible sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

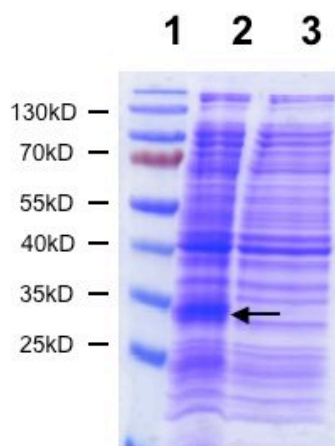


Figure 32. Analyse du surnageant de la synthèse *in vitro*
 1- Marqueur de masse moléculaire (Fermentas, PageRuler™ Prestained Protein Ladder)
 2- Surnageant de la réaction de synthèse *in vitro* de rUCP1
 3- Fraction non liée sur la résine de nickel (voir paragraphe sur la purification)
 Synthèse en présence de F₈TAC₅+CL pendant 24h à 20°C. La flèche indique la bande correspondant à rUCP1

IV.A.5 Purification

Les surnageants des réactions de synthèse de rUCP1 réalisées en présence de F₈TAC₅+CL et Brij35 + CL (système RTS 500) ont été soumis à une étape de purification de la protéine. Des premiers tests de purification sur résine de Ni-agarose ont montré des problèmes de liaison de la protéine à la résine. Une dilution de 1/10 du surnageant s'est avérée être la solution adéquate pour la protéine produite en F₈TAC₅+CL mais pas pour la protéine produite en Brij35+CL. Les études suivantes ont donc porté sur la protéine produite en présence de F₈TAC₅+CL.

Afin de mettre au point la purification de la protéine plusieurs paramètres ont été variés :

- *la rapport entre le volume de surnageant et volume de résine de Ni-agarose*

Un rapport de 4 s'est avéré optimal. Des rapports plus faibles favorisent une liaison non spécifique des contaminants protéiques à la résine et entraînent l'apparition de ces contaminants dans les fractions d'élution.

- *le temps d'incubation du surnageant avec la résine*

L'incubation sur la nuit ou pendant 1h à 4°C donne des résultats similaires en terme d'efficacité de liaison. L'incubation pendant 1 heure a été retenue, permettant une purification plus rapide.

- *la quantité de sels présente dans le tampon de purification*

La concentration en NaCl présente dans les tampons de purification a été variée de 0 à 350mM. Une concentration de 200 mM s'est montrée suffisante pour limiter les interactions non spécifiques avec la résine.

- *la quantité d'imidazole*

Des lavages avec des quantités d'imidazole allant de 10 à 50 mM se sont avérés nécessaires pour éliminer les protéines attachées de façon non spécifique à la résine. Pour éluer la protéine des quantités d'imidazole allant de 100 mM à 500 mM ont été testées. Une concentration de 200 mM a été retenue, représentant un bon compromis entre la quantité de protéine éluee et la pureté obtenue.

- *le surfactant utilisé*

Trois surfactants ont été testés dans les tampons de purification : DDM, F₈TAC₅ et Triton X-100. Les quantités de protéines obtenues en présence de ces surfactants et leur degré de pureté ont été comparables pour les trois. Parmi ces surfactants, le DDM est celui qui est le plus utilisé pour la cristallisation. Comme notre but est la production des protéines en vue de la cristallisation, le DDM a été choisi pour la plupart des expériences qui suivent.

Un exemple typique de purification de rUCP1 est donné dans la Figure 33. Généralement, avec ce type de purification, environ 0,4 à 0,8 mg de protéine sont obtenus par synthèse de 1 mL. La variation peut apparaître importante mais ceci reflète la variation du système de synthèse.

Dans les fractions d'éluion, outre la bande correspondant à rUCP1, une autre bande est présente à une masse moléculaire plus faible. Cette bande est reconnue par l'anticorps dirigé contre l'étiquette histidine de la protéine. Il s'agit probablement de fragments de rUCP1 résultant d'une synthèse partielle. Ceci est un problème récurrent lors de la réaction de synthèse *in vitro*. Afin d'obtenir seulement la protéine entière, une étiquette streptavidine (Strep) a été ajoutée en C-ter. Lors des premiers tests réalisés avec cette construction (en absence de détergent) la protéine a pu être détectée dans le culot par un anticorps anti-His₆ et un anticorps anti-Strep. De façon intéressante lorsque la synthèse a été réalisée en présence de F₈TAC₅+CL (qui rend la protéine soluble) la détection a été possible uniquement grâce à l'anticorps anti-His₆. Le fait que l'anticorps anti-Strep ne semble pas pouvoir se lier à la protéine en solution suggère que l'état de repliement de la protéine est responsable de l'accessibilité de la partie C terminale ou que la micelle est trop volumineuse. Vu ce défaut d'accessibilité, la purification en utilisant cette étiquette n'a pas été réalisée.

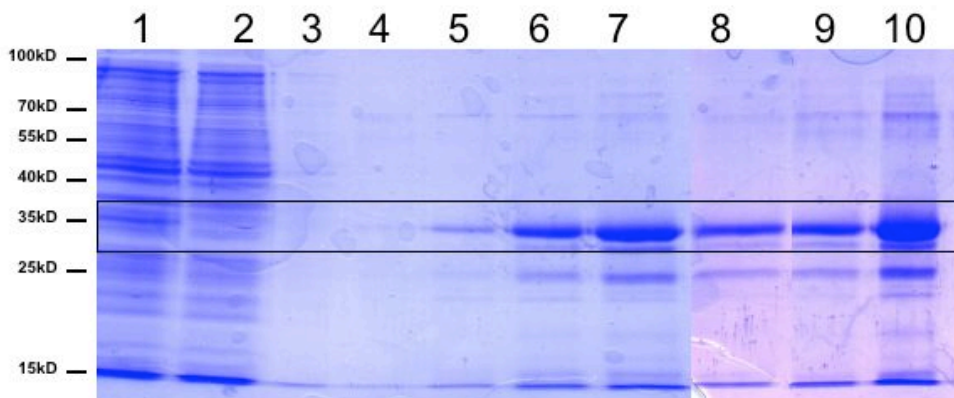


Figure 33. Purification de rUCP1 par chromatographie d'affinité sur résine de nickel.

Le surnageant provenant de la réaction de synthèse *in vitro* (1) a été incubé avec la résine de nickel (2 – fraction non retenue). Après lavage de la résine avec 10 mM (3), 20 mM (4) et 50 mM (5) imidazole, la protéine a été éluée avec 2 fois 200 mM Imidazole (6, 7). Les deux fractions d'éluion ont été mises ensemble (8) et puis dialysées afin d'enlever l'imidazole (9) et concentrées (10). Gel à 12% acrylamide coloré au bleu de Coomassie.

IV.A.6 Analyse biophysique de la protéine purifiée

Afin d'évaluer la qualité de la protéine produite, des analyses par chromatographie d'exclusion de taille et par RMN ont été réalisées.

IV.A.6.1 Analyse par chromatographie d'exclusion de taille

Le profil chromatographique de la protéine (Figure 34) révèle un pic important d'une taille estimée à 80 kDa, présentant un épaulement. Ce pic pourrait correspondre à une protéine monomérique entourée de micelles de détergent et l'épaulement pourrait correspondre à une ou plusieurs formes oligomériques de la protéine (dimère ?). Un deuxième pic plus petit peut être également remarqué. Il n'est pas dû à l'absorbance de la protéine (confirmé par analyse sur gel SDS-PAGE) mais probablement à l'absorbance du détergent ou d'imidazole résiduel. Ce profil suggère une protéine non agrégée (absence de pic correspondant au volume mort de la colonne), plutôt homogène mais pas complètement monodisperse.

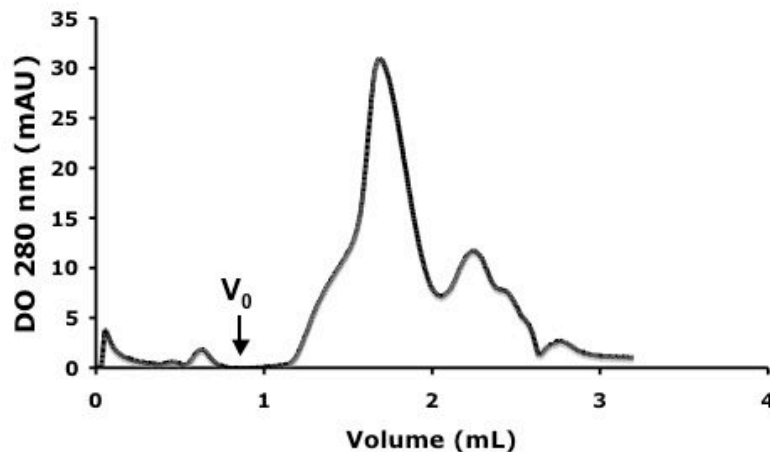


Figure 34 Analyse par chromatographie d'exclusion de taille de rUCP1

150 μ g de protéine rUCP1 ont été injectés sur une colonne SuperdexTM 200 PC 3,2/30 (GE Healthcare), V_0 -volume mort

IV.A.6.2 Analyse par RMN

Les études par RMN ont été réalisées en collaboration avec J. Boisbouvier (IBS). Des acides aminés deutérés et marqués ^{15}N ont été utilisés à la place des acides aminés fournis par le kit Roche. Un excès d'alanine non deutérée et marquée ^{13}C a été également ajouté au mélange réactionnel. Des spectres TROSY (^1H - ^{15}N) et HMQC (^1H - ^{13}C) du surnageant brut obtenu après la synthèse d'haAC1 ou de rUCP1 ainsi que des deux protéines purifiées ont été réalisés. Cependant, les signaux enregistrés ont été peu nombreux et de faible intensité ne permettant pas leur interprétation. Ces études ont aussi été difficiles à réaliser à cause de l'instabilité de la protéine. L'enregistrement des spectres nécessite plusieurs heures à une température de 25°C. Cependant, la protéine est peu stable, et précipite généralement durant les mesures. Ainsi, il est possible que la quantité de protéine présente en solution ne soit pas suffisante pour obtenir des signaux visibles. Un autre problème peut provenir de l'hétérogénéité de la préparation en ce qui concerne les états conformationnels adoptés par la protéine (le signal est divisé par le nombre des états existants) ou de la présence du détergent entourant la protéine (augmentant ainsi la taille de l'ensemble).

IV.A.7 Analyse fonctionnelle de la protéine

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine les tests fonctionnels utilisés pour la protéine native ont été réalisés.

IV.A.7.1 Test fonctionnel spectrophotométrique

La réalisation de ce test implique premièrement l'incorporation de la protéine en liposomes à un ratio lipide/protéine de 300 (w/w). Des essais d'incorporation à ce ratio ont été réalisés pour rUCP1 purifié en présence de DDM ou de F_8TAC_5 . Les mêmes conditions d'incorporation et de mesure d'activité que celles utilisées pour la protéine native UCP1 ont été employées. Le seul paramètre qui a été modifié a été la quantité de détergent présente au moment de l'incorporation. Il s'agit d'un paramètre important pour la réussite de l'incorporation car le pourcentage d'insertion de la protéine dans les liposomes peut varier en fonction du degré de solubilisation des liposomes par le détergent (Rigaud 1995).

La protéine native est généralement purifiée en présence de Triton X-100. La concentration finale de détergent estimée dans la fraction d'éluion d'UCP1 native est d'environ 2% (w/v). Lors de l'incorporation en liposomes, cette fraction d'éluion est mélangée avec des liposomes, la concentration résultante de Triton X-100 étant de 0,16% (w/v). Cette quantité de détergent est suffisante pour déstabiliser les liposomes et permettre l'incorporation de la protéine dans les liposomes.

La protéine recombinante est purifiée dans des surfactants différents (F_8TAC_5 ou DDM). Lors des premiers essais, le mélange de la protéine avec les liposomes sans ajout supplémentaire de détergent n'a pas conduit à des liposomes fonctionnels. Une des hypothèses expliquant ce résultat peut être le fait que la quantité de DDM ou de F_8TAC_5 présente ne permet pas à la protéine de s'insérer correctement dans les liposomes. Le DDM est connu pour être un détergent qui solubilise lentement les liposomes et le F_8TAC_5 est un surfactant qui ne se mélange pas avec les lipides et donc qui ne peut pas déstabiliser les liposomes.

Une solution possible afin de déstabiliser les liposomes et permettre l'incorporation est l'ajout du Triton X-100 lors de la reconstitution. Une courbe de la solubilisation des liposomes en fonction de la concentration en triton a alors été établie (Figure 35). En fonction de cette courbe, des quantités de Triton X-100 allant de 0,16% à 1% (w/v) et correspondant à différents points de la courbe ont été ajoutées au moment de l'incorporation. Cependant, aucune de ces conditions n'a conduit à des protéoliposomes fonctionnels. Une activité a pu être mesurée seulement une fois, lors de l'incorporation de la protéine recombinante purifiée en DDM et l'ajout de 0,6% (w/v) Triton X-100 mais ceci n'a pas été reproductible.

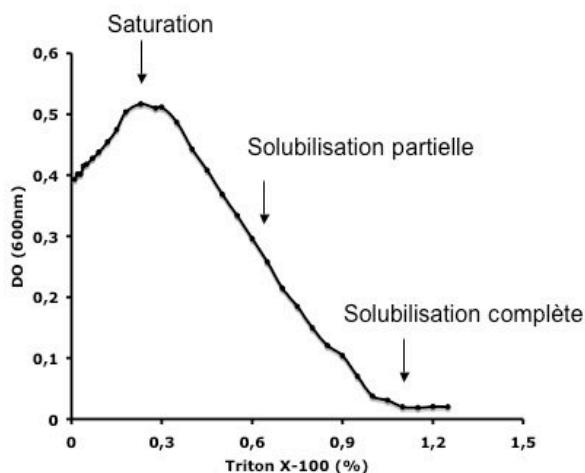


Figure 35. Courbe de solubilisation des liposomes par le Triton X-100

Des quantités croissantes de Triton X-100 ont été ajoutées aux liposomes contrôle (sans protéine) et l'absorbance est lue à 600 nm. Pour des concentrations faibles de Triton X-100 l'absorbance augmente, dû à une saturation des liposomes par des molécules de détergent. Au-delà de 0,3%, les molécules de détergent commencent à solubiliser les liposomes et une décroissance de l'absorbance peut être remarquée. A environ 1%, l'absorbance est proche de zéro indiquant que les liposomes ont été complètement solubilisés

Afin de déterminer si le manque de fonctionnalité est dû à un défaut d'incorporation de la protéine en liposomes, la technique de flottaison des liposomes dans des gradients de saccharose a été utilisée. Cette technique permet la séparation des protéines en fonction de leur incorporation en liposomes. Si la protéine n'est pas incorporée, elle va se retrouver en bas du gradient de saccharose alors que, si elle est incorporée, elle va se retrouver dans la fraction de liposomes au pourcentage de saccharose correspondant à la densité des liposomes.

La Figure 36 présente les résultats obtenus pour les liposomes incorporant la protéine native (P-Native) et pour les protéoliposomes avec la protéine recombinante purifiée en présence de F₈TAC₅ (P-FTAC) ou DDM (P-DDM).

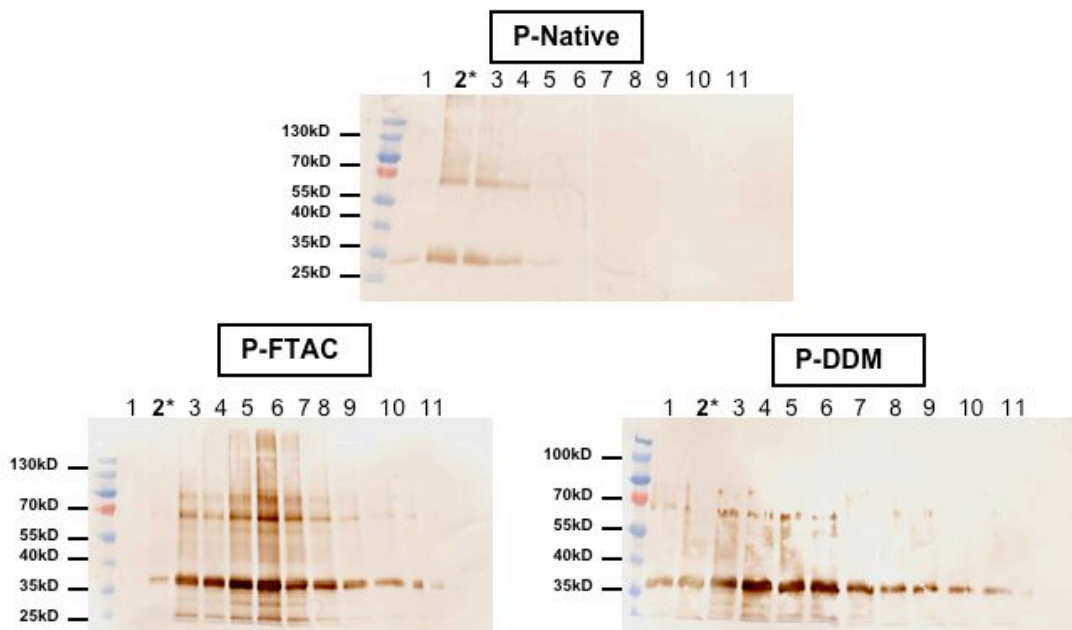


Figure 36. Vérification de l'incorporation en liposomes d'UCP1

Les fractions en gras marquées avec une étoile sont les fractions contenant les liposomes. P-Native – protéoliposomes avec UCP1 native ; P-FTAC- protéoliposomes avec rUCP1 recombinant purifié en FTAC ; P-DDM- protéoliposomes avec rUCP1 recombinant purifié en DDM. 0,8% de Triton X-100 a été ajouté lors de l'incorporation en liposomes. Western blot avec anticorps contre rUCP1 pour la protéine native et contre l'étiquette histidine pour la protéine recombinante. Les deux bandes principales observées sur le gel pourrait correspondre à la protéine monomérique et dimérique respectivement.

Pour P-Native, la protéine est détectée dans la fraction contenant les liposomes. Ce n'est pas le cas pour P-FTAC et P-DDM, la protéine se retrouvant dans presque toutes les fractions du gradient. Pour P-FTAC, il est possible que la protéine recombinante soit encore entourée par le FTAC ce qui lui permet de flotter dans le gradient. En effet, FTAC n'est pas adsorbé par les biobeads et il peut donc rester autour de la protéine. Pour P-DDM une explication similaire peut être proposée. La synthèse *in vitro* se réalise en présence de FTAC

et même si le FTAC est échangé par le DDM au cours de la purification, il se peut que cet échange ne soit pas complet et que des molécules de FTAC restent attachées à la protéine. Une étude intéressante (Park 2007) montre qu'une autre protéine membranaire, MscL, purifiée en présence de FTAC, peut s'incorporer spontanément en liposomes. Les auteurs postulent que, en présence de liposomes, la protéine va préférer les lipides par rapport au FTAC ce qui va favoriser son incorporation en liposomes. Vu les résultats obtenus, ceci ne semble pas être le cas pour la protéine UCP1 recombinante.

L'état de la protéine est un autre paramètre qui peut influencer son incorporation en liposomes. Généralement, pour les expériences présentées ci-dessus, l'incorporation en liposomes se fait un jour après sa purification, la protéine étant gardée à 4°C entre temps. Il est possible que pendant ce temps, la protéine soit abîmée sans toutefois précipiter. Pour tester cette hypothèse, des études de reconstitution ont été réalisées en utilisant la protéine juste à la sortie des étapes de purification. La vérification de l'incorporation à l'aide des gradients de saccharose, montre que la protéine a été incorporée dans les liposomes (Figure 37). Il reste à vérifier la fonctionnalité de ces liposomes.

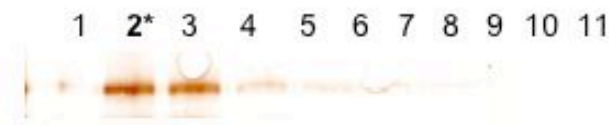


Figure 37. Vérification de l'incorporation en liposomes d'UCP1

Les fractions en gras marquées avec une étoile sont les fractions contenant les liposomes. Le gel est restreint à la seule portion indiquant un signal

IV.A.7.2 Test fonctionnel basé sur la mesure de courants électriques

Pour effectuer ce test une étape d'incorporation en liposomes est aussi nécessaire mais le ratio lipides/protéines doit être autour de 10 (w/w). Comme la concentration optimale en lipides est de 10 mg/mL cela signifie une concentration protéique d'environ 1 mg/mL. Plusieurs tentatives pour concentrer la protéine et l'incorporer en liposomes immédiatement après purification ont été sans succès, principalement à cause d'une précipitation de la protéine pendant ces étapes. Le plus petit ratio lipide/protéine qui a pu être réalisé a été d'environ 50. Les études réalisées grâce aux gradients de saccharose ont montré que la protéine est incorporée en liposomes dans ces conditions. Cependant les courants enregistrés à l'aide de l'appareil SURFE²R One (dans les mêmes conditions que pour la protéine native),

ont été semblables aux courants observés pour les liposomes contrôle (sans protéine). Des activateurs d'UCP1 comme l'acide laurique ou la coenzyme Q10 ont été rajoutés dans les liposomes avant les mesures mais sans succès. Il est possible qu'un ratio lipides/protéines de 50 soit trop grand pour pouvoir détecter des courants spécifiques à l'UCP1.

IV.A.8 La synthèse *in vitro* - une méthode efficace de production de transporteurs mitochondriaux ?

La production des protéines membranaires représente souvent un problème car les différentes étapes d'adressage, de translocation et d'intégration des protéines membranaires dans les membranes cellulaires de l'organisme hôte sont souvent défectueuses et leur présence dans la membrane peut s'avérer toxique pour le système d'expression. Le principal atout de la synthèse *in vitro* est qu'elle permet de s'affranchir de toutes ces étapes puisque la production des protéines s'effectue dans un système acellulaire. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser la synthèse *in vitro* pour la production des transporteurs mitochondriaux.

Différentes approches de synthèse *in vitro* ont été testées (1) la production en présence de surfactants (2) la production en absence de surfactants et la solubilisation du culot et (3) la synthèse en présence des liposomes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la production de la protéine en présence de surfactants et plus particulièrement en présence de FTAC et de cardiolipide. Cette condition a été retenue pour réaliser la production d'un des transporteurs mitochondriaux, rUCP1 dans un plus grand volume (RTS 500) et pour mettre au point sa purification. Environ 0,4 à 0,8 mg de protéine purifiée sont obtenus par synthèse de 1 mL.

Les analyses fonctionnelles réalisées par mesure de courant à travers une membrane sur support solide sur la protéine incorporée en liposomes n'ont pas permis de mettre en évidence que la protéine est fonctionnelle. Il est probable que ce résultat soit dû au fait que le ratio lipide/protéine de 10 nécessaire pour pouvoir détecter un courant électrique n'a pas pu être atteint. Les nombreux tests fonctionnels réalisés par spectrophotométrie ont aussi été négatifs. Toutefois, l'analyse de l'incorporation de la protéine dans les liposomes a révélé que la protéine n'était pas complètement intégrée dans les liposomes ce qui pourrait expliquer le résultat observé. Les études d'incorporation de la protéine dans les liposomes effectués

ultérieurement ont montré qu'une bonne incorporation de la protéine peut être obtenue lorsqu'elle est réalisée juste après la purification. De nouveaux tests fonctionnels doivent être réalisés afin de re-évaluer les protéoliposomes produits de cette manière.

La qualité de la protéine produite peut être aussi vérifiée avant l'incorporation en liposomes. Notre idée a été de vérifier l'état de repliement de la protéine par une analyse RMN. La synthèse *in vitro* est en effet adaptée pour la production de protéines marquées. Cependant ces essais ont été infructueux ; aucun signal n'a pu être détecté probablement à cause de plusieurs problèmes : instabilité de la protéine lors d'une mesure de plusieurs heures à 25°C, présence du détergent, existence de plusieurs états conformationnels, présence de fragments de protéine partiellement synthétisée. Ces problèmes sont récurrents pour les protéines membranaires synthétisées *in vitro* et, il n'y a que très récemment que la structure d'un fragment d'une telle protéine a pu être résolue par RMN (Sobhanifar 2010).

Un autre moyen d'évaluer la qualité de la protéine est de tester sa capacité à lier son inhibiteur naturel, le GDP. Des expériences de fluorescence intrinsèque de la protéine réalisées avec des différentes quantités de GDP n'ont pas été concluantes à cause probablement du signal dû au détergent (Triton X-100, résultats non montrés). Nous pourrions envisager la réalisation de tests de liaison avec des nucléotides radioactifs. De tels essais ont déjà été réalisés avec succès pour la protéine UCP1 native (Lin & Klingenberg 1982 ; Mondriansky 1997).

Seulement trois surfactants ont été testés pour la purification de la protéine : DDM, FTAC et Triton X-100. Le choix de surfactant est essentiel pour maintenir l'intégrité fonctionnelle et structurale de la protéine. Un criblage plus large de détergents (longueur de la chaîne hydrophobe, nature du groupe polaire, cmc, quantité ...) peut donc s'avérer utile afin d'obtenir une meilleure stabilité et qualité de la protéine. Cependant, le principal désavantage de la synthèse *in vitro* est le prix élevé des mélanges réactionnels disponibles commercialement ce qui limite le nombre d'essais qu'on peut réaliser.

IV.B Expression chez *E. coli*

Au début de ce travail de thèse, l'équipe d'Eva Pebay-Peyroula a été impliquée dans un programme du CEA/DSV, appelé CEA-PM (Criblages des systèmes d'expression alternatifs pour les protéines membranaires) dont l'objectif était de tester l'expression de 20 protéines membranaires dans 6 systèmes d'expression. Parmi ces protéines, deux étaient des transporteurs mitochondriaux : la protéine découplante de rat (rUCP1) et le transporteur ADP/ATP provenant d'*Arabidopsis Thaliana* (AtAAC), (cloné sans sa séquence signal correspondant aux 63 premiers acides aminés, Haezlewood 2003). Les deux protéines ont été clonées dans des vecteurs pDEST17 (Invitrogen) permettant leur expression avec une étiquette His₆ en N-terminal. Un des systèmes d'expression testé était la production dans les membranes d'*E. coli*. Les tests d'expression préliminaires ont révélé des taux de production assez faibles pour UCP1 (< 1 mg/L) et d'environ 3 mg/L pour AtAAC (F.Bernaudeau, IBS, communication personnelle). Les résultats obtenus pour AtAAC paraissaient suffisamment intéressants pour être explorés plus en détail. Cependant, des tests réalisés dans notre équipe (S.Ravaud) semblent indiquer que seules des quantités très faibles de protéines peuvent être obtenues après purification d'AtAAC à partir des membranes d'*E. coli*.

IV.B.1 Protéines de fusion

Afin d'augmenter le niveau d'expression des transporteurs mitochondriaux dans les membranes d'*E. coli* notre stratégie a été d'utiliser des protéines de fusion. Nous avons testé deux protéines Mistic et MBP qui ont donc été fusionnées à l'extrémité N terminale des différents transporteurs mitochondriaux.

Mistic (acronyme de « Membrane-Integrating Sequence for Translation of IM Protein Constructs ») est une protéine de 13 kDa de *Bacillus subtilis* (Rooslid 2005) qui s'associe aux membranes et qui augmente le niveau d'expression chez *E. coli* des protéines membranaires fusionnées à son extrémité C-terminale. Mistic a été utilisée avec succès pour une série de protéines membranaires incluant les canaux potassiques voltage dépendants (Rooslid 2005, Dvir 2009), les récepteurs à activité histidine kinase (Kefala 2007), le CD40 (Lee 2008), la protéine mitochondriale trifonctionnelle MTP (Liu 2008) et la bactériorhodopsine (Nekraskova 2010).

MBP (**M**altose **B**inding **P**rotein) est une protéine soluble de 42 kDa d'*E. coli* qui est généralement utilisée pour augmenter la solubilité des protéines cytoplasmiques exprimées chez *E. coli* (Pryor 1997, Kapust 1999). Elle est aussi connue pour favoriser l'insertion des protéines membranaires dans la membrane plasmique et récemment la structure d'une protéine ainsi produite a pu être résolue (Bocquet 2009). Deux types de vecteurs permettant l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée avec MBP sont actuellement utilisés : un vecteur permettant l'adressage cytoplasmique de la MBP et l'autre permettant l'adressage périplasmique. Lors de ce travail, le vecteur permettant l'adressage périplasmique de la MBP a été utilisé.

IV.B.1.1 Protéines de fusion avec Mystic

Des premiers tests d'expression des transporteurs mitochondriaux en fusion avec Mystic ont été réalisés dans le cadre du programme CEA-PM. Environ 3 mg/L de Mystic-rUCP1 et d'environ 6 mg/L de Mystic-AtAAC1 ont été obtenues dans les membranes d'*E. coli* (F.Bernaumat, communication personnelle). Ces résultats encourageants nous ont convaincus de réaliser le sous-clonage d'autres transporteurs mitochondriaux dans un vecteur d'expression permettant l'expression de la protéine avec Mystic. Ces clonages ont été réalisés par la plateforme de biologie moléculaire existant au sein de l'IBS (Robiomol). Les protéines qui ont été sous-clonées sont : deux transporteurs ADP/ATP (hAAC1, hAAC2) et cinq protéines découplantes (mUCP2, mUCP3, hUCP3, zUCP, avUCP).

IV.B.1.1.1 Criblage des conditions optimales d'expression

Afin de déterminer les conditions optimales d'expression des transporteurs chez *E. coli*, plusieurs paramètres ont été explorés :

- la souche bactérienne utilisée (BL21(DE3), Rosetta(DE3) ou C43 (DE3))
- le milieu de culture (LB ou TB)
- la quantité d'IPTG ajouté pour l'induction (0,1 ou 1 mM)
- la température et le temps d'induction (induction durant la nuit (12-15h) à 20°C ou pendant 3 heures à 37°C)

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 10. Vu le grand nombre de protéines à tester, ces résultats ont été le fruit d'un travail d'équipe. Mes efforts se sont surtout focalisés sur les tests d'expression de Mistic-rUCP1. Pour cette construction, les meilleures conditions d'expression ont été obtenues en C43(DE3) et Rosetta(DE3). Le milieu de culture LB ou TB n'as pas d'effet remarquable sur le niveau d'expression. L'induction sur la nuit à 20°C donne une meilleure expression alors que la quantité d'IPTG (0,1 ou 1 mM) n'a pas d'influence majeure. D'une façon générale, pour tous les transporteurs testés, l'expression en Rosetta(DE3) et l'induction sur la nuit à 20°C donne de bons résultats. Les étapes suivantes ont été la quantification des protéines exprimées dans la membrane en fonction des différentes conditions et la solubilisation de ces membranes. Seuls les résultats obtenus pour Mistic-rUCP1 seront présentés en détail, les tests d'expression dans les membranes pour les autres transporteurs mitochondriaux étant réalisés par les autres membres de l'équipe (S. Ravaud, C. Juillan Binard).

			hAAC 1	hAAC 2	rUCP1	mUCP2	hUCP3	mUCP3	ZfUCP	
C43	LB	37° 3h	0.1 mM IPTG	1	1	3	2	2	1	1
			1 mM IPTG	1	1	3	2	2	1	1
		20° OV	0.1 mM IPTG	1	1	5	2	2	1	1
			1 mM IPTG	1	1	5	2	2	1	1
	TB	37° 3h	0.1 mM IPTG	1	1	3	2	2	2	1
			1 mM IPTG	1	1	3	2	2	2	1
		20° OV	0.1 mM IPTG	1	1	5	2	2	2	1
			1 mM IPTG	1	1	5	2	2	2	1
BL21	LB	37° 3h	0.1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	1
			1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	1
		20° OV	0.1 mM IPTG	3	5	2	3	4	3	2
			1 mM IPTG	3	5	2	3	4	3	2
	TB	37° 3h	0.1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	1
			1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	1
		20° OV	0.1 mM IPTG	4	5	2	5	5	3	2
			1 mM IPTG	4	5	2	5	5	3	2
Ros	LB	37° 3h	0.1 mM IPTG	2	2	3	3	2	3	2
			1 mM IPTG	2	2	3	3	2	3	2
		20° OV	0.1 mM IPTG	4	5	4	3	4	4	3
			1 mM IPTG	4	5	4	3	4	4	3
	TB	37° 3h	0.1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	2
			1 mM IPTG	2	2	2	3	2	3	2
		20° OV	0.1 mM IPTG	5	5	4	5	5	5	3+
			1 mM IPTG	5	5	4	5	5	5	3+

Tableau 10. Influence des conditions d'expression sur le niveau d'expression des transporteurs mitochondriaux chez *E. coli*

Le niveau d'expression est noté sur une échelle de 1 à 5 , 5 représentant une bonne expression. OV- induction sur la nuit (« overnight ») Ros-Rosetta (DE3). Les meilleurs niveaux d'expression obtenus sont surlignés en jaune.

IV.B.1.1.2 Expression de Mystic-rUCP1 dans les membranes

Afin de déterminer les meilleures conditions pour l'expression de la protéine dans les membranes, différentes conditions ont été testées. Comme les résultats précédents ont montré que l'expression de Mystic-rUCP1 est meilleure lorsque l'induction se réalise sur la nuit à 20°C et que la composition du milieu (TB et LB) n'a pas d'influence sur le niveau d'expression, les expériences suivantes ont été réalisées en LB avec une induction à 20°C sur la nuit. La Figure 38 présente les résultats que j'ai obtenus pour Mystic-rUCP1. La proportion de protéines présentes dans les membranes semble plus importante pour les souches C43(DE3) et Rosetta(DE3). La quantité d'IPTG utilisée pour l'induction n'a pas d'effet majeur pour l'expression dans les membranes de la souche Rosetta(DE3), mais pour la souche C43(DE3) l'induction par 1mM IPTG semble meilleure.

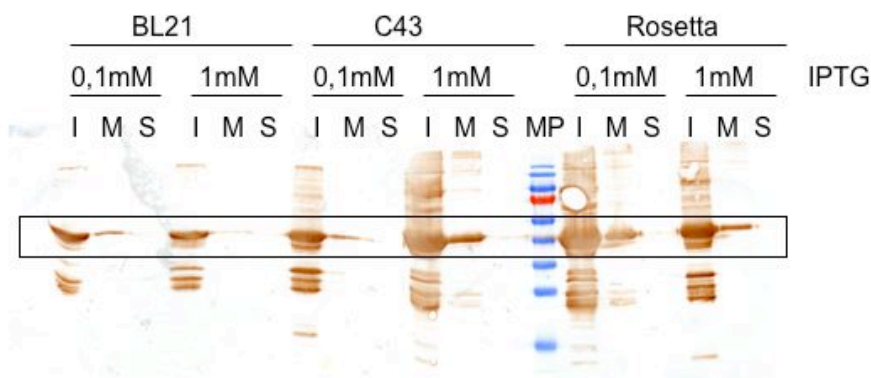


Figure 38. Criblage des conditions d'expression de Mystic-rUCP1 dans les membranes d'*E. coli*
 I- corps d'inclusion, M-fraction membranaire, S- fraction soluble, MP-marqueur de masse moléculaire (Fermentas PageRuler Prestained Ladder). Les cultures bactériennes ont été réalisées en LB. L'expression a été induite par l'ajout de 0,1 ou 1 mM d'IPTG, sur la nuit à 20°C.

IV.B.1.1.3 Solubilisation des membranes exprimant Mystic-rUCP1

Afin de regarder si la solubilisation des protéines exprimées dans les membranes d'*E. coli* est possible, une des meilleures conditions obtenues précédemment a été retenue : l'induction par 1 mM IPTG dans la souche C43(DE3). Des membranes ont été préparées à partir d'un litre de culture bactérienne. Il est intéressant de noter que, en effectuant des Western blots avec des anticorps dirigés contre l'étiquette histidine, deux bandes sont révélées : une à environ 50 kDa, taille correspondant à celle d'un monomère de Mystic-rUCP1

et une à environ 100 KDa qui pourrait correspondre à un dimère (Figure 39). Plusieurs détergents ont été testés quant à leur propriété de solubiliser ces membranes (Figure 39). Des résultats positifs ont été obtenus seulement avec FC16. Cependant, le FC16 a un fort pouvoir détergent ce qui pourrait suggérer que la protéine pourrait être agrégée à la membrane et pas proprement insérée. En parallèle, des tests d'activité avec Mistic-hAAC1 ont montré que la protéine n'est pas fonctionnelle (voir page 110) Les études d'expression de Mistic-rUCP1 en *E. coli* n'ont donc pas été poursuivies.

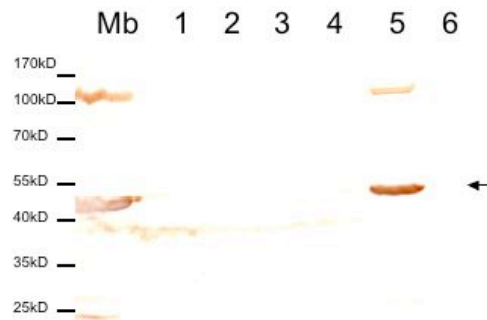


Figure 39. Criblage des détergents pour la solubilisation des membranes exprimant rUCP1-Mistic

Surnageant de solubilisation des membranes avec 1- DDM 1%, 2- Triton X-100 1% , 3-LAPAO 2%, 4-LDAO 1%, 5-FC16 1%, 6-C₁₀E₅ 2%. Mb- fraction membranaire à 1 mg/mL . Les concentrations des détergents utilisés pour la solubilisation ont été choisies par rapport aux valeurs décrites dans la littérature. Détection avec un anticorps dirigé contre l'étiquette His₆. La flèche indique la bande correspondant à celle d'un monomère de Mistic-rUCP1.

IV.B.1.1.4 Expression dans les membranes et solubilisation des autres transporteurs mitochondriaux

Pour Mistic-mUCP3 et Mistic-hUCP3 environ 50% de la protéine se retrouvent dans les membranes dans toutes les conditions testées. Pour Mistic-hAAC1 et Mistic-hAAC2 la meilleure condition obtenue (moitié de la protéine dans les membranes) est l'expression dans la souche Rosetta(DE3) avec une induction sur la nuit à 20°C par 0,1mM IPTG. Pour Mistic-hAAC1 des tests de solubilisation des membranes et de purification de la protéine ont également été réalisés. Les meilleurs détergents pour la solubilisation se sont avérés LDAO, LAPAO et FC12. À partir des membranes solubilisées par ces deux derniers détergents des essais de purification sur colonne de Nickel ont été entrepris avec des résultats assez bons en terme de quantité de protéine purifiée (visible sur un gel SDS-PAGE colorée au bleu de Coomassie) (tests réalisés par les autres membres de l'équipe).

IV.B.1.1.5 Fonctionnalité des protéines de fusion avec Mistic

Les transporteurs mitochondriaux sont des protéines présentes exclusivement chez les eucaryotes. Il est donc important de déterminer si leur surexpression dans les membranes de *E. coli* comme protéines de fusion avec Mistic, permet de conserver leur fonctionnalité.

Pour les protéines découplantes (UCPs) il n'existe pas actuellement un test fonctionnel permettant d'évaluer l'activité des UCPs directement dans les membranes de *E. coli*. Durant ce travail, des essais ont été réalisés en utilisant la technologie SURFE²R qui permet la mesure de l'activité d'UCP1 natif purifié et incorporé en liposomes. Des vésicules inversées ont été préparées à partir des membranes d'*E. coli* surexprimant Mistic-rUCP1 et ont été déposées sur les cellules de mesure. Le même protocole d'activation que celui utilisé pour la protéine UCP1 native a été appliqué. Cependant, le bruit important généré par les autres protéines présentes dans les membranes d'*E. coli* n'a pas permis la détection d'un signal spécifique à rUCP1.

En ce qui concerne les transporteurs ADP/ATP, un test fonctionnel a été mis en place dans notre équipe à partir de protocoles déjà publiés dans la littérature. Ce test permet de mesurer l'entrée d'ATP radioactif dans les cellules d'*E. coli* surexprimant l'AAC (Krammer 2009). Pour réaliser cette mesure, les bactéries sont incubées avec de l'ATP radiomarqué ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$) à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'ajout d'un tampon froid et l'ATP non transporté est éliminé par filtration des bactéries sur des membranes de 0,45 μm et plusieurs lavages. Une quantification de la radioactivité présente dans les bactéries (sur les membranes) permet d'évaluer l'activité de transport d'AAC (Figure 40).

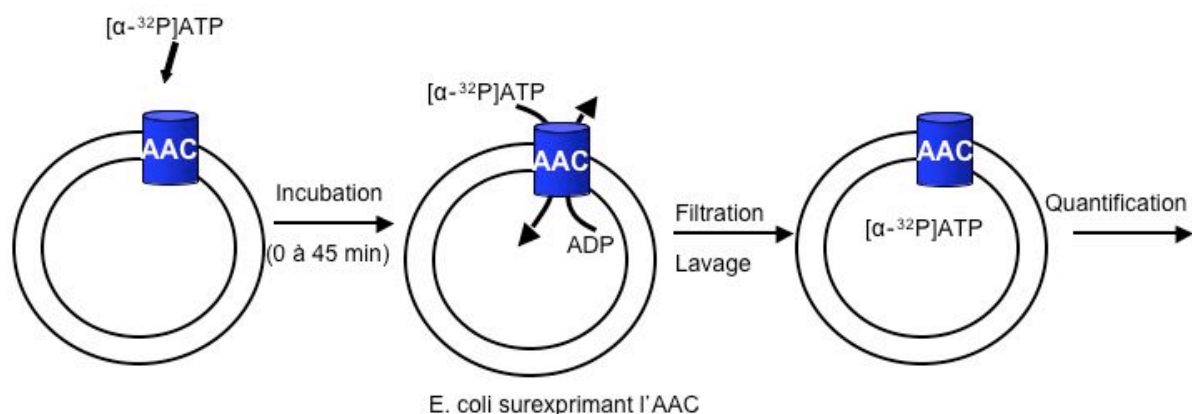


Figure 40. Principe du test fonctionnel d'AAC .
La membrane interne d'*E. coli* est représenté en noir

Ce test fonctionnel a été utilisé pour tester l'activité de *Mistic-hAAC1* exprimé dans 3 souches différentes d'*E. coli* : BL21(DE3), Rosetta (DE3), C43(DE3) (milieu LB, induction par 0,1mM IPTG, 20°C, sur la nuit). Pour contrôle négatif, des bactéries C43(DE3) transformées avec le même vecteur ne contenant pas l'ADNc codant pour *hAAC1* (vecteur vide) ont été utilisées. Indifféremment de la souche utilisée, les bactéries exprimant *Mistic-hAAC1* ont montré une activité quasi nulle, semblable aux bactéries contrôle (Figure 41A).

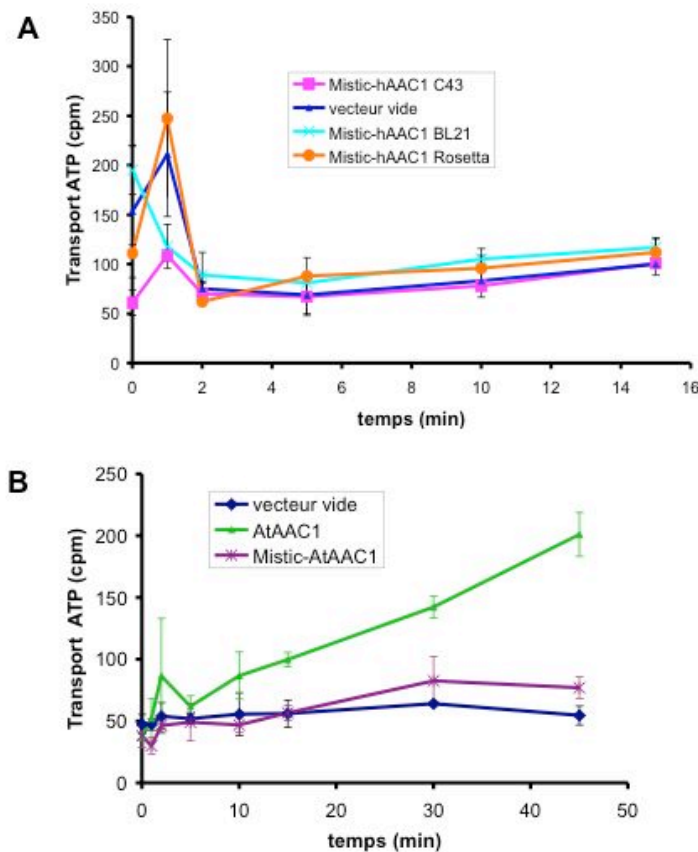


Figure 41. Activité des protéines de fusion avec *Mistic*

A. Activité de *Mistic-hAAC1* en trois souches différentes : BL21(DE3), C43 (DE3), Rosetta (DE3)

B. Activité d'*AtAAC1* avec ou sans *Mistic*

Vecteur vide- vecteur dépourvu de l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt. Moyennes sur minimum 3 mesures. Communication personnelle S.Ravaud et A.Barrand-Frelet

La protéine de fusion *Mistic-hAAC1* ne semble donc pas être active dans la membrane d'*E. coli*. Afin de voir si ce résultat est du à la fusion avec *Mistic* ou à un problème général d'expression des transporteurs ADP/ATP chez *E. coli*, des tests avec la protéine *AtAAC* ont été réalisés. *AtAAC* a été choisi car (1) deux constructions étaient disponibles : avec ou sans *Mistic* (2) les deux constructions permettaient l'expression chez *E. coli* de la protéine (voir page 106). *AtAAC*, *Mistic-AtAAC* et le vecteur vide ont donc été exprimés chez *E. coli*

C43(DE3) (milieu LB, induction par 0,1mM IPTG, 20°C, sur la nuit) et des mesures de transport radioactif ont été réalisées (Figure 41B). Alors que les courbes de transport d'ATP radioactif en fonction de temps sont similaires pour le vecteur vide et pour *Mistic-AtAAC*, une différence nette est remarquée pour *AtAAC*. L'expression fonctionnelle des transporteurs ADP/ATP est donc possible chez *E. coli* mais pas en fusion avec *Mistic*.

IV.B.1.2 Protéines de fusion avec MBP

Étant donné les résultats obtenus avec *Mistic*, nous avons voulu tester la fusion avec d'autres protéines. *AtAAC1* a d'abord été cloné dans un vecteur permettant l'expression avec MBP fusionnée du côté N-terminal de la protéine. Les premiers tests d'expression de cette construction ont montré une très faible quantité de protéine produite, à peine détectable par Western blot. Cependant, lorsque le test de fonctionnalité de la protéine a été réalisé, MBP-*AtAAC* a montré une activité 5-6 fois supérieure à *AtAAC* sans MBP (Figure 42).

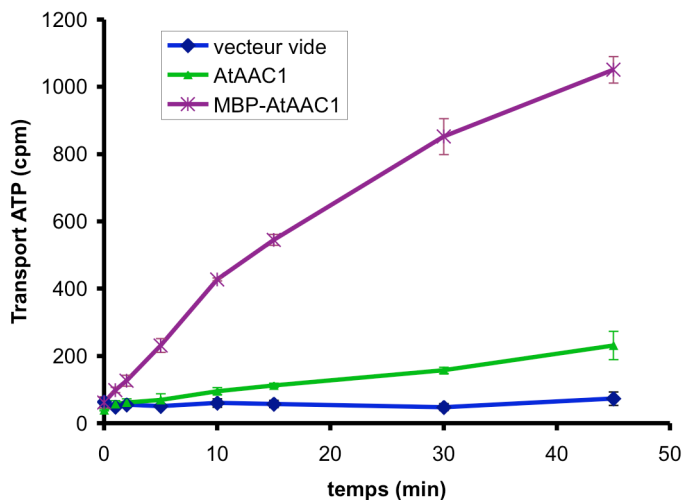


Figure 42. Activité d'AtAAC avec ou sans MBP

Vecteur vide- vecteur dépourvu de l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt. Moyennes sur minimum 3 mesures.

Ce résultat positif nous a encouragé à fusionner deux autres transporteurs ADP/ATP à MBP : *hAAC1* et *AlvAAC*. Ce dernier provient d'un ver vivant au fond des océans (*Alvinella Pompejana*). Il s'agit d'un organisme présentant une thermotolérance exceptionnelle pour un eucaryote (de 20° à plus de 80°C chez l'adulte), qui peut donc être qualifié d'extrémophile ; on peut donc espérer une plus grande stabilité des protéines provenant de cet organisme. Des

tests d'expression dans les mêmes conditions que celles utilisées pour MBP-AtAAC (souche C43(DE3), milieu LB, induction par 0,1mM IPTG, 20°C, sur la nuit) ont montré des taux d'expression très faibles (Figure 43A). Le criblage des différentes conditions d'expression (souches C41(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3) ou BL21(DE3) et milieux de culture LB, TB ou 2YT) n'a pas abouti à des taux d'expression plus élevés. Toutefois, même si exprimées en faible quantité, les deux protéines présentent une activité de transport très élevée (Figure 43B)

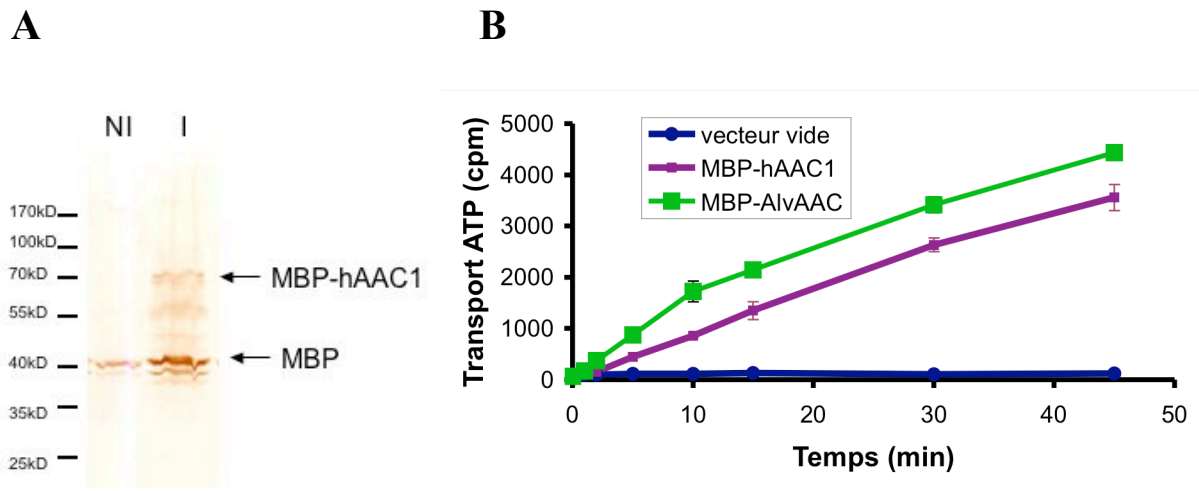


Figure 43. Expression et activité des protéines de fusion MBP chez *E. coli*

A. Test d'expression d'*hAAC1* ; Détection par Western blot grâce à un anticorps dirigé contre la protéine MBP. NI- Non induit, I –Induit ; même résultat obtenu pour MBP-AtAAC et AlvAAC.

B. Activité de MBP-*hAAC1* et MBP-*AlvAAC*

IV.B.1.2.1 Criblages des conditions d'expression et purification des protéines de fusions MBP

Etant donné le faible niveau d'expression des constructions MBP-AtAAC, MBP-hAAC1 et MBP-AlvAAC, nous avons voulu cribler plusieurs conditions d'expression afin de trouver des conditions permettant une meilleure expression. Plusieurs souches (C41(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3), BL21(DE3)), milieux de cultures (LB, TB, 2YT) et quantités d'IPTG (0,1 et 1 mM) ont été testés. Aucune de ces conditions n'a abouti à des taux d'expression meilleurs.

Nous avons toutefois voulu évaluer si ces conditions permettraient une purification ultérieure des transporteurs. Des membranes exprimant MBP-hAAC1 ont été préparées à partir des plusieurs litres de culture (souche *E. coli* C43(DE3), milieu LB, induction par 0,1 mM IPTG, 20°C, sur la nuit) et des tests de solubilisation ont été entrepris. Tous les détergents testés ont été capables de solubiliser les protéines des membranes (Figure 44). Cependant, certains détergents semblent conserver la protéine dans un état semblable à celui observé dans les membranes non solubilisées et d'autres non. En effet, dans les membranes, la bande correspondant à MBP-hAAC1 (confirmé par Western blot avec des anticorps contre la MBP et contre hAAC) se situe à environ 140 kDa, taille correspondant à un dimère. La solubilisation des membranes par C₁₂E₈ et CHAPS semble déstabiliser ce dimère puisque la bande correspondant à MBP-hAAC1 est alors visible après solubilisation à environ 70 kDa (taille correspondante à un monomère). La solubilisation par les autres détergents préserve la bande à 140 kDa.

Une purification sur résine d'amylose a été entreprise à partir des membranes solubilisées par C₁₂E₈. Cependant, lors des premiers essais, la protéine n'a pas pu être détectée dans les fractions d'éluion.

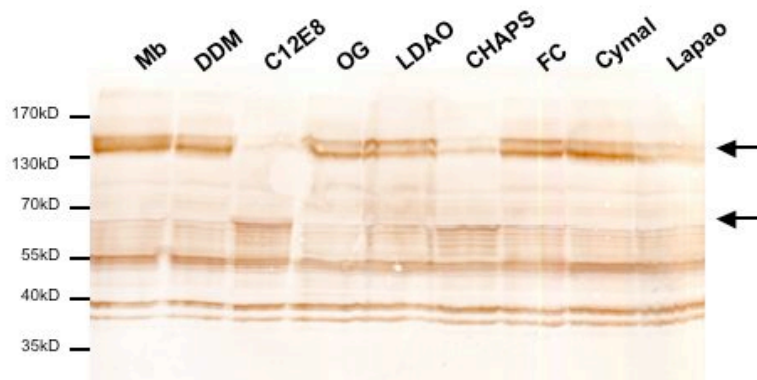


Figure 44. Criblage des détergents pour la solubilisation des membranes exprimant MBP-hAAC1

Surnageants de solubilisation des membranes; Mb- membranes avant solubilisation

Détection des protéines par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la MBP. Les nombreuses bandes présentes sur chaque piste (principalement à 55 kDa et 40 kDa) sont probablement dues à la détection de la MBP seule (sans AAC). Les bandes indiquées par les flèches correspondent à MBP-hAAC1 (confirmé par Western blot avec des anticorps dirigés contre hAAC1). La concentration des détergents (en w/v) utilisés est la suivante : DDM 1%, C₁₂E₈ 2%, OG 2%, LDAO 1%, CHAPS 1%, FC12 1%, Cymal 6%, LAPAO 2%.

IV.B.1.2.2 Étude des propriétés fonctionnelles des fusions MBP

IV.B.1.2.2.1 Inhibition par les inhibiteurs connus d'AAC

Le CATR et le BA sont des inhibiteurs connus de l'AAC humain. Afin de voir si cette inhibition peut être observée par le test fonctionnel de transport d'ATP, des mesures d'activité en présence de BA ou CATR ont été réalisées (Figure 45). On peut remarquer que les 3 protéines sont inhibées à environ 70% par BA. Pour l'effet de CATR une inhibition de 40-60% est remarquée pour MBP-hAAC1 et MBP-AlvAAC mais aucun effet remarquable n'a pu être observé sur MBP-AtAAC. Cependant, une seule série de mesures d'inhibition a été réalisée pour cette dernière construction. Des mesures supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ce résultat. Nous avons ainsi montré pour la première fois que BA et CATR inhibent le transporteur ADP/ATP d'*Alvinella* et que BA inhibe le transporteur ADP/ATP de plantes.

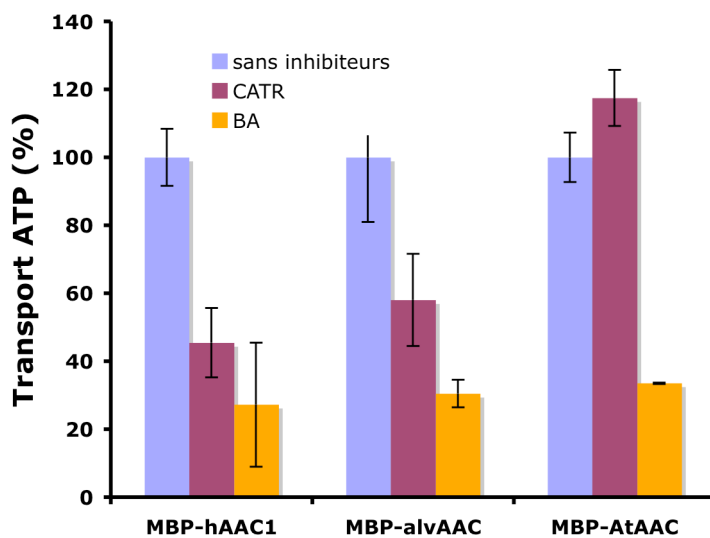


Figure 45. Inhibition des fusions MBP par BA et CATR

100 μ M d'inhibiteur (CATR ou BA) ont été ajoutés pendant la réaction. Les activités sont données en pourcentage par rapport à l'activité de la protéine mesurée en absence d'inhibiteur.

Moyenne sur minimum trois mesures

IV.B.1.2.2.2 Spécificité du transport des nucléotides

Le transporteur ADP/ATP transporte de l'ADP en échange de l'ATP. Afin de déterminer la spécificité de ce transport, d'autres nucléotides ont été ajoutés pendant la réaction du transport (Figure 46). Ces nucléotides sont non radioactifs et ils peuvent entrer en compétition avec l'ATP radioactif s'ils présentent une affinité pour l'AAC ou s'ils sont transportés par l'AAC. Les résultats obtenus montrent que les nucléotides adénine di et triphosphate inhibent le transport d'ATP radioactif. Cette observation est cohérente avec le fait que l'ADP et l'ATP sont transportés par l'AAC. L'AMP inhibe seulement à 40% le transport et les nucléotides guanine (GTP, GDP, GMP) n'ont pas d'effet remarquable sur le transport médié par l'AAC. Ces résultats sont consistants avec ceux de la littérature (voir Chapitre I).

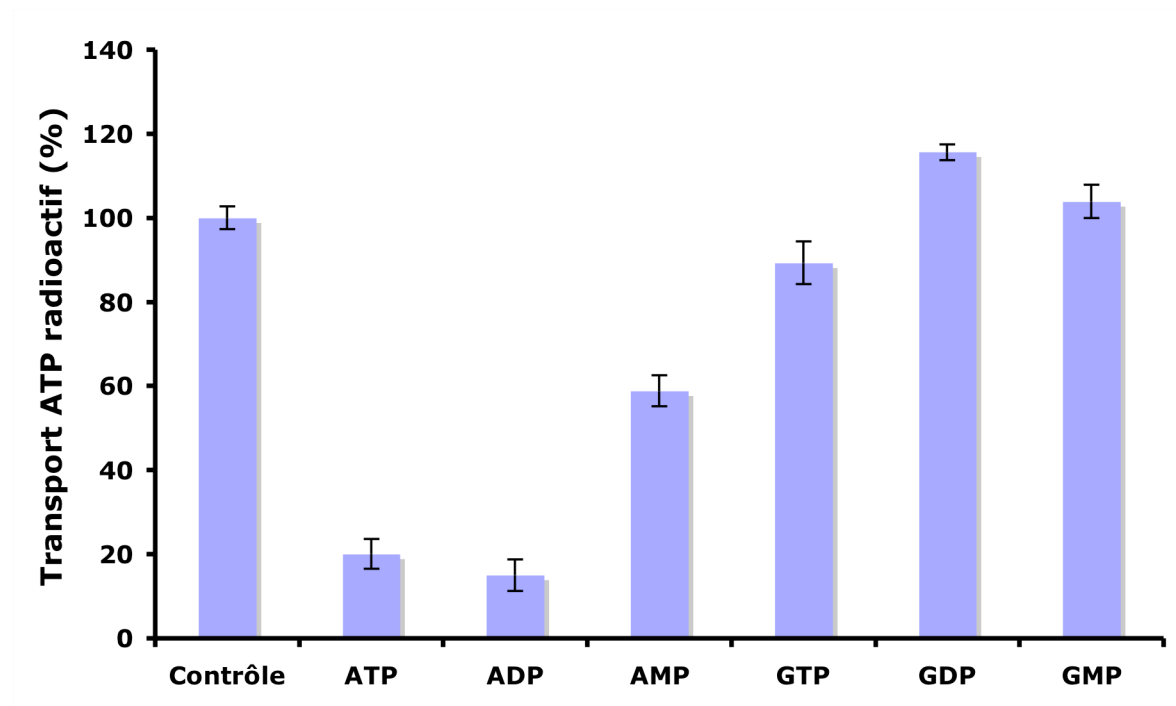


Figure 46. Spécificité du transporteur ADP/ATP pour les nucléotides

100 μ M de plusieurs types de nucléotides ayant une base purine ont été ajoutés pendant la réaction. La construction MBP-hAAC a été utilisée pour réaliser les mesures. Les activités sont données en pourcentage par rapport à l'activité de la protéine en absence de ces nucléotides ajoutés (contrôle). Moyenne sur minimum 3 mesures.

IV.B.1.2.2.3 Cinétique

Le test fonctionnel développé permet aussi la mesure des cinétiques des différents transporteurs. Des mesures d'activité de MBP-hAAC1 et MBP-alvAAC en fonction d'une concentration croissante de substrat (ATP radioactif) ont été réalisées et des paramètres cinétiques ont pu être déterminés (Figure 47). Les valeurs des k_m des deux transporteurs sont très similaires ($23,7 \pm 5 \mu\text{M}$ pour MBP-hAAC1 et $22,3 \pm 3,5 \mu\text{M}$ pour MBP-AlvAAC) indiquant la même affinité pour l'ATP. Les valeurs obtenues pour la vitesse maximale sont pourtant très différentes : $73 \pm 5 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour MBP-hAAC1 et $680 \pm 34 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. La vitesse de transport du transporteur *d'Alvinella pompejana* est donc 10 fois supérieure à celle de l'AAC humain. Les conditions extrêmes de vie de ce ver pourrait expliquer la nécessité d'une vitesse supérieure de transport. Il s'agit de la première caractérisation de transporteur alvAAC. Les valeurs obtenues pour l'AAC humain sont 7 fois plus faibles que celles rapportés dans la littérature pour hAAC1 exprimé chez la levure (De Macos Lousa 2002) Cette différence peut provenir des conditions expérimentales différentes ou des environnements lipidiques différents chez *E. coli* par rapport à la levure.

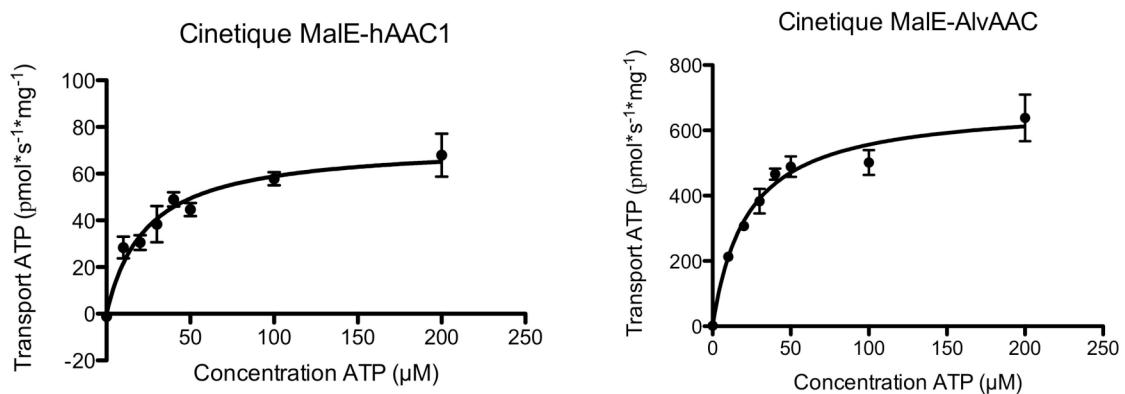


Figure 47. Cinétiques de MBP-hAAC1 et MBP-alvAAC
Moyenne sur 3 mesures

IV.B.1.3 L'expression chez *E. coli* – un système efficace de production de transporteurs mitochondriaux ?

L'expression chez *E. coli* est actuellement le système le plus utilisé pour la production recombinante de protéines. Ce système a déjà été utilisé pour la production des transporteurs mitochondriaux mais soit les taux d'expression obtenus sont très faibles (AAC) soit une grande partie de la protéine est présente dans les corps d'inclusion (UCP1) (voir Chapitre I). Lors de ce travail nous avons voulu évaluer l'effet de deux protéines de fusion (Mistic et MBP) sur l'expression des transporteurs mitochondriaux.

La fusion avec Mistic a permis d'obtenir à un bon niveau d'expression de différents transporteurs mitochondriaux dans la fraction membranaire. Cependant, pour rUCP1, la solubilisation de la protéine n'a pu être réalisée qu'avec un détergent assez fort (la FC16) ce qui suggère que la protéine pourrait être agrégée à la membrane et non pas proprement insérée. Pour hAAC1 la solubilisation et la purification ont été possibles mais les tests d'activité réalisés dans les membranes d' *E. coli* ont montré que le protéine de fusion n'est pas fonctionnelle.

Le mécanisme par lequel Mistic augmente l'expression des protéines membranaires est actuellement inconnu. Aucune séquence signal de Mistic n'a été identifiée et il n'est pas très clair si la protéine est insérée dans la membrane ou juste associée à la membrane. Du point de vue structural Mistic est différent des protéines membranaires. Sa surface n'est pas très hydrophobe et contient des acides aminés plutôt acides. Sa structure, déterminée par RMN (Rooslid 2005), présente quatre hélices qui ne sont pas prédites comme des hélices transmembranaires. Le mécanisme par lequel Mistic s'associe ou s'insère dans la membrane est encore inconnu mais il semble indépendant du translocon d'*E. coli* (Dvir 2009). Le fait que Mistic ne passe pas par le translocon pourrait être une des raisons pour lesquelles cette protéine augmente l'expression des protéines membranaires. Toutefois, le passage par le translocon pourrait être nécessaire pour un bon repliement des transporteurs mitochondriaux ce qui pourrait expliquer qu'ils ne sont pas fonctionnels lorsque ils sont fusionnés avec Mistic. Une autre hypothèse pouvant expliquer nos résultats est que Mistic interagit avec AAC et influence son intégrité fonctionnelle en inhibant les changements de conformation nécessaires au mécanisme de transport.

La fusion avec la MBP a donné des niveaux d'expression très faibles pour trois AACs (MBP-rUCP1 n'a pas été testé lors de cette étude) mais les tests fonctionnels ont montré que les protéines ainsi produites sont actives. La fonction est mesurée par détection de l'ATP radioactif transporté par les cellules *E. coli* ayant exprimé l'AAC. Il s'agit d'un test relativement simple qui représente un moyen rapide d'évaluer la fonctionnalité des protéines directement dans les membranes sans besoin des étapes de solubilisation et purification. Grâce à ce test, nous avons pu montrer pour la première fois que les inhibiteurs spécifiques de hAAC1, BA et CATR inhibent le transporteur ADP/ATP d'*Alvinella pomejana* et que BA inhibe le transporteur ADP/ATP de plantes. Nous avons également effectué des études sur la spécificité du transport des nucléotides par hAAC1 et établi des paramètres cinétiques pour MBP-hAAC1 et MBP-alvAAC.

Le système de production des AACs comme protéines de fusion avec MBP n'est pas encore adapté pour la production des transporteurs mitochondriaux en vue d'études structurales mais il s'avère particulièrement utile et efficace utile pour la réalisation des test fonctionnels dans le cadre des études structure-fonction (des mutants peuvent être générés facilement et l'évaluation de leur fonctionnalité est rapide).

IV.C Expression en ovocytes de xénope

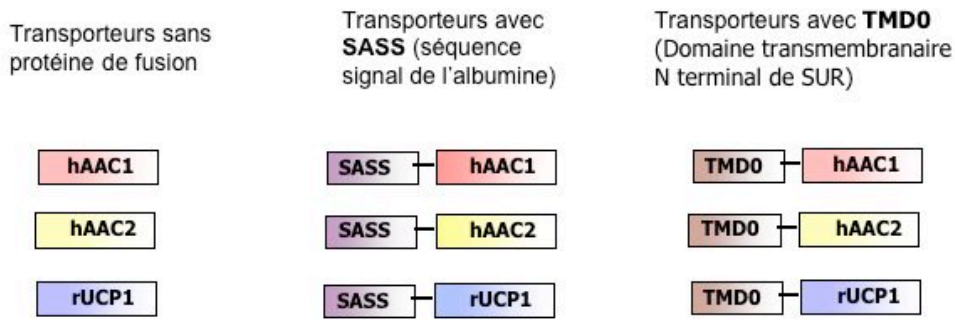
Un autre système d'expression exploré durant ce travail a été l'ovocyte de xénope (*Xenopus laevis*). Notre idée était d'exprimer les transporteurs mitochondriaux dans l'ovocyte de xénope, de les adresser à la membrane plasmique et d'effectuer des mesures de courant électrique dû au transport électrogénique réalisé par l'AAC et UCP. Ce système pouvait permettre ainsi un criblage rapide des mutants et de leurs propriétés fonctionnelles dans le cadre d'une étude structure-fonction.

L'expression dans l'ovocyte de xénope présente plusieurs avantages. Premièrement, il s'agit d'une grosse cellule sphérique d'un millimètre de diamètre ce qui la rend facilement manipulable, sans besoin d'appareillage sophistiqué. Deuxièmement, son cytoplasme est rempli de réserves accumulées au cours de l'ovogenèse (ribosomes, enzymes, ARNt, protéines indispensables aux étapes traductionnelles et post traductionnelles) ce qui permet une traduction efficace d'ARNm exogènes.

L'expression de rUCP1 dans l'ovocyte de xénope a déjà été décrite par Klaus *et al.* (1990). En injectant l'ARNm d'UCP1 dans l'ovocyte, ils parviennent à obtenir une bonne expression protéique d'UCP1 dans les mitochondries. Cependant, la purification de ces mitochondries s'est avérée difficile et ce système est apparu finalement comme peu approprié pour la production des transporteurs mitochondriaux. Notre idée a été d'utiliser ce système exclusivement pour des études fonctionnelles.

La première étape a été de réaliser des constructions permettant l'adressage à la membrane plasmique. L'adressage des transporteurs mitochondriaux à la mitochondrie est un processus complexe et, à ce jour, aucune séquence d'adressage n'a été clairement décrite (voir Chapitre I). Notre idée a donc été d'ajouter du côté N-terminal des transporteurs des protéines pouvant promouvoir leur adressage à la membrane plasmique des ovocytes. Deux protéines de fusion ont été choisies : (1) la séquence signal de l'albumine (SASS) (2) le domaine TMD0 du SUR1. La première a déjà été utilisée pour l'adressage d'un transporteur ABC mitochondrial à la membrane plasmique (Ardehali 2005). La deuxième est connue pour être impliquée dans l'adressage de la protéine SUR1 à la surface de la cellule (Chan 2003).

A



B



C

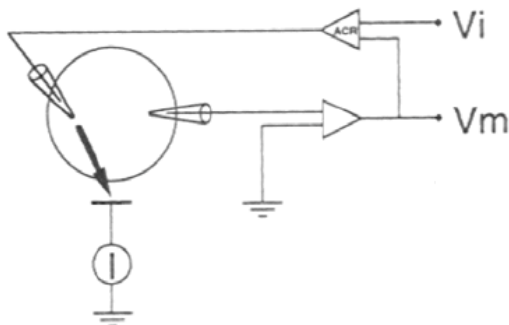


Figure 48. Expression des transporteurs mitochondriaux en ovocyte de xénope

A. Représentation schématique des constructions réalisées pour l'expression en ovocyte

SASS- séquence signal de l'albumine du sérum humain , TMD0- fragment de SUR2A (premiers 195 acides aminés)

B. Principe d'expression

L'ADNc de la protéine d'intérêt est transcrit en ARN qui est ensuite injecté dans l'ovocyte. Une incubation de l'ovocyte pendant 48h est nécessaire pour une bonne expression protéique.

C. Principe du Two Electrode Voltage-Clamp (TEVC) - Double électrode

Les ovocytes sont empalés par deux microélectrodes. La première électrode maintient le potentiel de membrane (V_m) à une valeur constante (V_i) fixée par l'expérimentateur (technique du potentiel imposé (« Voltage-Clamp »)) et la seconde permet la mesure des courants observés sur l'ensemble de la membrane plasmique de l'ovocyte.

Trois transporteurs mitochondriaux : rUCP1, hAAC1 et hAAC2 ont été clonés dans un vecteur adapté pour l'expression dans l'ovocyte de Xénope (pGH2), avec ou sans protéine de fusion (Figure 48A). Suite à la transcription *in vitro* de ces constructions, des ARNm ont été générés et injectés dans les ovocytes. Après 48h d'incubation, permettant l'expression des transporteurs, la technique de double électrode a été employée afin de mesurer des courants électriques à la surface de l'ovocyte (voir Figure 48B et C). Des courants électriques ont pu être détectés, mais l'ajout des activateurs ou inhibiteurs spécifiques d'UCP ou AAC (acide laurique et GDP pour UCP1 ; BA et CATR pour AAC) n'a eu aucun effet sur ces courants indiquant qu'il s'agit de courants non spécifiques. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : (1) les protéines ne sont pas exprimées (2) les protéines ne sont pas adressées à la membrane plasmique (3) l'activité de transport d'AAC et UCP n'est pas assez importante pour permettre la détection de courants électriques avec la technique utilisée. Des tests d'expression et d'adressage à la membrane plasmique doivent être réalisés afin de pouvoir confirmer ou infirmer ces hypothèses. Le problème semble toutefois assez complexe et ces expériences n'ont pas été poursuivies.

Chapitre V

Conclusions & Perspectives

Chapitre V Conclusions et perspectives

Les transporteurs mitochondriaux jouent un rôle clef dans les fonctions métaboliques des cellules eucaryotes et leur dysfonctionnement est à l'origine d'un certain nombre de maladies graves chez l'homme. Afin de mieux comprendre leur mécanisme de transport et les caractéristiques de chaque transporteur, deux sous-familles de transporteur mitochondriaux ont été étudiées : les AACs (ADP/ATP carriers) et les UCPs (Uncoupling proteins).

La production des transporteurs mitochondriaux est un premier obstacle majeur pour leur étude. Au cours de ce travail, plusieurs systèmes d'expression ont été testés et évalués par rapport à leur capacité à produire des transporteurs mitochondriaux fonctionnels : l'expression en ovocyte de xénope, l'expression en *E. coli* et la synthèse *in vitro*.

Les premiers tests d'expression en ovocyte de xénopes n'ont pas permis la mise en évidence d'une activité spécifique des transporteurs. Les raisons peuvent être multiples (la protéine n'est pas synthétisée ou correctement adressée à la membrane plasmique, la vitesse de transport est trop lente pour pouvoir détecter un courant électrique) et cette étude n'a pas été poursuivie.

L'expression dans *E. coli* a été réalisée en utilisant deux protéines de fusion : Mystic et MBP. La fusion avec Mystic a permis d'obtenir des taux d'expression dans les membranes intéressants mais la protéine ainsi produite s'est avérée difficile à solubiliser (Mystic-rUCP1) ou non fonctionnelle (Mystic-hAAC1). Il reste à évaluer si après coupure de Mystic la protéine est fonctionnelle. En revanche, nous avons pu obtenir une expression fonctionnelle des AACs fusionnés avec la MBP dans les membranes d'*E. coli*. Les quantités obtenues sont faibles mais le test fonctionnel utilisé nous a permis d'étudier différentes caractéristiques du transport : effet des inhibiteurs, constantes cinétiques et spécificité du transport vis à vis des nucléotides. Ce système de production des AACs, est donc adapté à la réalisation des études fonctionnelles et ouvre des perspectives pour des études structure-fonction. En effet, en

utilisant ce système, l'activité de mutants peut être facilement et rapidement évaluée sans étapes préalables de solubilisation ou purification.

La synthèse *in vitro* a été le système qui nous a permis l'obtention des plus grandes quantités de protéine pure (0,4-0,8 mg par mL de mélange réactionnel pour rUCP1). Cependant, nous n'avons pas pu montrer la fonctionnalité de la protéine ainsi produite. Des essais supplémentaires doivent être réalisés afin d'évaluer l'intégrité fonctionnelle de la protéine. Pour caractériser la protéine en solution, des tests de liaison de nucléotides (inhibiteurs d'UCP1) pourraient être réalisés ainsi que des analyses par dichroïsme circulaire. La caractérisation des protéoliposomes incorporant UCP1 par cryofracture pourrait aussi être un bon contrôle préalable à la réalisation des tests fonctionnels.

Toutefois, il est possible que la protéine produite par synthèse *in vitro* ne soit pas fonctionnelle. Dans la cellule, des chaperons prennent en charge les transporteurs mitochondriaux et assurent leur adressage et leur repliement. Le complexe d'import TIM (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) est impliqué dans l'insertion des transporteurs mitochondriaux dans la membrane interne sous une forme correctement repliée (voir Chapitre I). L'ajout des protéines impliquées dans ce complexe dans le mélange réactionnel de synthèse *in vitro* pourrait donc participer au bon repliement de la protéine (collaboration initié avec J.Gulbis, Melbourne, Australie).

Le système de synthèse *in vitro* utilisé au cours de ce travail a été le système RTS commercial (Roche). Récemment, avec les conseils de C. Schaffitzel (EMBL, Grenoble) et F.Zito (IBPC, Paris) un système de synthèse *in vitro* a été mis en place dans notre laboratoire (C. Juillan-Binard et C. Vives) et les premiers tests effectués avec rUCP1 sont encourageants. L'utilisation d'un tel système présente un double avantage : (1) le coût est réduit par rapport au système commercial et (2) plusieurs paramètres réactionnels peuvent être variés (pH, sels, ..). Un criblage plus extensif des conditions de synthèse pourra donc être réalisé.

Les expériences décrites dans ce manuscrit ont été réalisées avec un système de synthèse *in vitro* basé sur des extraits de *E. coli*. Cependant, plus récemment, des systèmes basés sur des extraits d'organismes eucaryotes comme le germe de blé ou de réticulocytes de lapin ont également été commercialisés. De tels systèmes pourraient être plus adaptés pour la

production des transporteurs mitochondriaux car ils contiennent des systèmes de repliement eucaryotes.

Une étude de la protéine native UCP1 a également été réalisée lors de ce travail. Un nouveau test fonctionnel rapide et direct, basé sur la mesure des courants électriques générés par l'activité de transport d'UCP1 a été développé. Ce nouveau test peut permettre une caractérisation plus fine d'UCP1, un criblage à haut débit de nouveaux ligands et il peut facilement être appliqué à tous les transporteurs mitochondriaux qui transportent des substrats de façon électrogénique.

Annexes

Annexe A

-Les surfactants et les protéines membranaires-

Les surfactants ou tensioactifs sont des molécules amphiphiles c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une hydrophobe et apolaire, l'autre hydrophile et polaire. Parmi les surfactants, les détergents (molécules tensioactives capables de solubiliser les graisses) sont les plus utilisés pour l'étude des protéines membranaires.

En fonction de leur structure, les détergents sont classifiés généralement en quatre catégories (pour revue Seddon, 2004) :

1. Les détergents non-ioniques (polyoxyéthylènes, alkylglucosides, alkylmaltosides)

Ils ont une tête hydrophile non chargée. Ils sont des détergents doux, généralement peu dénaturants et représentent le type de détergent le plus utilisé pour l'étude des protéines membranaires. Les molécules dont la chaîne hydrocarbonée est courte (C_7 - C_{10}) sont toutefois plus inactivantes que celles avec des chaînes longues (C_{12} - C_{14}). C'est le type de détergent le plus utilisé pour l'étude des protéines membranaires et notamment pour la cristallisation.

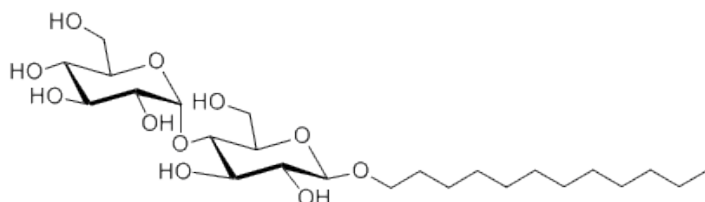


Figure 49. Structure chimique de DDM

MW = 510,6 ; cmc = 0,17 mM (0,0087%) ; N_A =78-149

2. Les détergents ioniques (comme le SDS)

Ils contiennent une tête hydrophile chargée négativement ou positivement. Ils sont très efficaces pour la solubilisation des protéines membranaires mais ils sont presque toujours dénaturants.

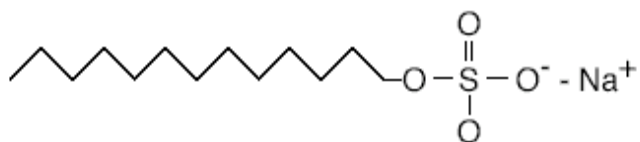


Figure 50. Structure chimique du SDS

MW = 288,38 ; cmc = 2,6 mM (0,075%) ; $N_A=62-101$

3. Les détergents zwitterioniques (LAPAO, LDAO, les Fos cholines,..)

Ils combinent les propriétés des détergents ioniques et non ioniques et ils sont globalement plus dénaturants que les détergents non ioniques. Plusieurs d'entre eux ont été utilisés avec succès pour l'étude des protéines membranaires. Un exemple est le LAPAO utilisé pour la cristallisation de bAAC1 (Dahout-Gonzales 2003)

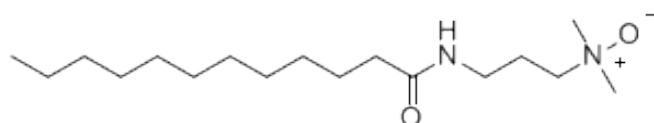


Figure 51. Structure chimique de LAPAO

MW = 300,5 ; cmc = 1,65 mM (0,052%) ; $N_A=126$

4. Les détergents de type stéroïdes (CHAPS, digitonine,..)

Ils sont relativement doux et souvent moins dénaturants que les détergents avec des chaînes linéaires qui portent la même tête hydrophile.

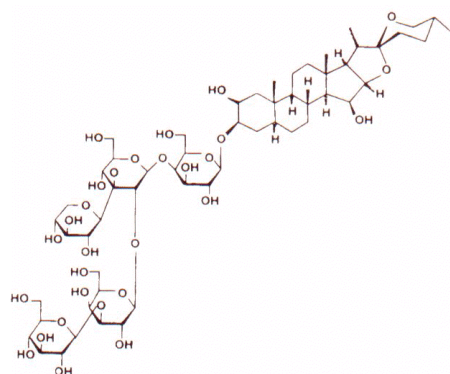


Figure 52. Structure chimique de la digitonine

MW = 1229,31 ; cmc < 0,5 mM ; $N_A=60$

Dans les dernières années, des nombreuses études ont été réalisées afin de développer des nouveaux surfactants non détergents qui pourraient maintenir les protéines membranaires en solution tout en étant moins dénaturants que les détergents utilisés classiquement. Parmi ces nouveaux surfactants, on peut citer :

1. Les surfactants fluorés

Ce sont des polymères qui présentent une tête hydrophile non chargée et une partie hydrophobe composée de chaînes fluorées. Ils sont de bons solvants pour les protéines mais pas pour les lipides. Grâce à la chaîne fluorée qui se mélange mal avec les chaînes hydrocarbonées des lipides, ces surfactants ne solubilisent pas les membranes et ils sont peu dénaturants pour les protéines.

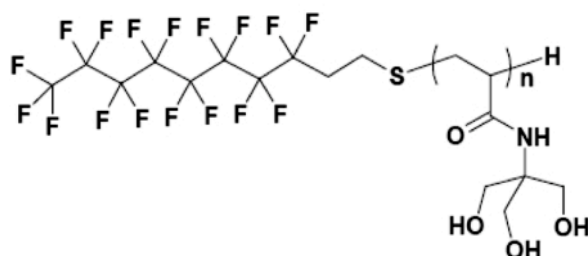


Figure 53. Structure chimique du F₈TAC₅
cmc = 0,03 mM ; La chiffre 8 indique le nombre de carbones avec des substitutions fluor

2. Les surfactants ressemblant à des lipides (C_nU_m)

Ce sont des surfactants non-ioniques qui présentent deux queues hydrophobes et miment ainsi les phospholipides naturels. Afin d'accroître leur solubilité dans l'eau ces surfactants ont une tête hydrophile assez importante formée par la polymérisation du Tris (hydroxyméthyl) acrylamidomethane (Damian 2007).

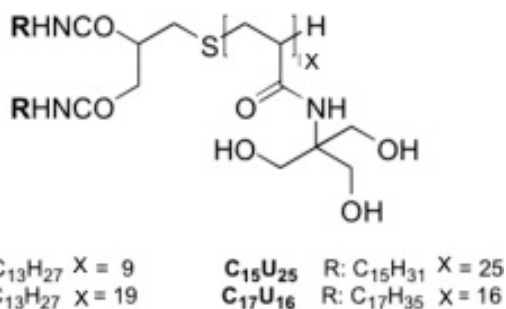


Figure 54. Structure chimique du C_nU_m
cmc = 4,9-7,9 μM ;

3. Les amphipoles

Il s'agit de polymères amphipatiques qui ont la propriété de s'adsorber sur les surfaces hydrophobes. Ils s'attachent à la surface de la protéine de façon quasi-irréversible et augmentent ainsi la stabilité de la protéine en solution (Popot 2003).

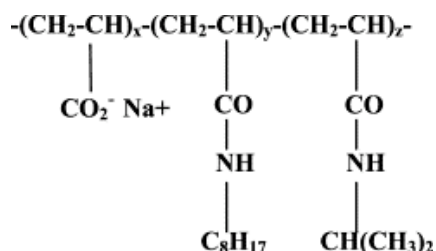


Figure 55. Structure chimique de l'amphipole A8:35
 $x=35$, $y=25$, $z=40$

5. Les peptergents

Ils présentent une queue hydrophobe formée par des acides aminés apolaires et une tête hydrophile formée par des acides aminés chargés. Ils ont été utilisés avec succès pour la stabilisation des protéines membranaires (Yeh 2005).

Annexe B

-Les oligonucléotides utilisés-

No°	Nom oligonucléotide	Séquence 5'>3'
1	UCP1rCfr9I-fwd	TGCCCCGGGATGGTGAGTTCGACAACCTCC
2	UCP1rXbaI-rev	TCCTCTAGACTATGTGGTGCAGTCCACTGTCTG
3	1ANT1Cfr9I-fwd	TGCCCCGGGATGGGTGATCAGCTTGGAGCTTC
4	1ANT1XbaI-rev	TCCTCTAGATTAGACATATTTTTTGTCTCATC
5	2ANT2Cfr9I-fwd	TGCCCCGGGATGACAGATGCCGCTGTGTCC
6	2ANT2XbaI-rev	TCCTCTAGATTATGTGTACTTCTTGATTTTCATC
7	SASS fw	CTTTGGCAGATCAATTCCCCGGGATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTC
8	SASS-ANT1REV	GGAAGCTCCAAGCGTGATCACCCATGGAATAAGCCGAGCTAAAGAGAA AAAGAAGGGAAATAAAG
9	SASS-ANT2REV	CGAAGGACACAGCGGCATCTGTCATGGAATAAGCCGAGCTAAAGAGAA AAAGAAGGGAAATAAAG
10	SASS-UCP1REV	CTTCGGAAGTTGTGCGAACTCACCCATGGAATAAGCCGAGCTAAAGAGAA AAAGAAGGGAAATAAAGG
11	TMD0-PGHFW	CAACTTTGGCAGATCAATTCCCCGGGATGGATTACAAGGACGACGATGAC
12	TMD0-ANT1 REV	GGAAGCTCCAAGCGTGATCACCCATGTACCTCCTCACTCTGATGACGTTG
13	TMD0-ANT2 REV	CGAAGGACACAGCGGCATCTGTCATGTACCTCCTCACTCTGATGACGTTG
14	TMD0-UCP1-REV	CTTCGGAAGTTGTGCGAACTCACCCATGTACCTCCTCACTCTGATGACGTTG
15	UCP1-NOTI-FW	TATGAGCGGCCGCATGGTGAGTTCGACAACCTCCG
16	UCP1-CFR9I-24A-REV	CGGATCCCCGGGCTATGTGGTGCAGTCCACTGTCTGC
17	UCP1-CFR9I-MCS-REV	CGGATCCCCGGGTGTGGTGCAGTCCACTGTCTGCC
18	hANT1-PIV-FOR	TATGAGCGGCCGCATGGGTGATCAGCTTGGAGCTTCC
19	hANT1-PIV-REV	TACGTGCTCGAGTTAGACATATTTTTTGTCTCATCATAC
20	hANT2-PIV-FOR	TATGAGCGGCCGCATGACAGATGCCGCTGTGTCTTCCG
21	hANT2-PIV-REV	TACGTGCTCGAGTTATGTGTACTTCTTGATTTTCATC
22	zUCP-PIV-FOR	TATGAGCGGCCGCATGGTGGGTCTGAAGCCGTC
23	zUCP-PIV-REV	TACGTGCTCGAGTACGCAGCGGCTTCGATTCTG
24	avUCP-PIV-FW	TATGAGCGGCCGCATGGTGGGCCTGAAGCCCCCG
25	avUCP-PIV-REV	TACGTCTCGAGTCAGGGGGTGCAGACCGGGCCAAC
26	hUCP3-PIV-FW	TATGAGCGGCCGCATGGTTGGACTGAAGCCTTCAGACG
27	hUCP3-PIV-REV	TACGTCTCGAGTCAAAACGGTGATTCCCGTAACATC
28	mUCP2-PIV-FW	TATGAGCGGCCGCATGGTTGGTTTCAAGGCCACAG
29	mUCP2-PIV-REV	ACGTGCTCGAGTCAGAAAGGTGCCTCCCGTGATTGG
28	mUCP3-PIV-FW	TATGAGCGGCCGCATGGTTGGACTTCAGCCCTCCG
29	mUCP3-PIV-REV	ACGTGCTCGAGTCAAAACGGAGATTCCCGCAGTACC
30	MAL-AT-AAC-NOT	CAGCGCGGCCGAGCTTCTCCCGTGTGGTCC
31	MAL-AT-AAC-XHO-REV	GGTGTCTCGAGTACTTCTCGAATTGTGGGTG
32	MALhAAC1-NOT-FW	TTAAGCGGCCGCAATGGGTGATCAGCTTGG
33	MALhAAC1-Xho-Rev	GGTGTCTCGAGTTAGACATATTTTTTGTATC
34	MAL-Alv-NOT-FW	AGCGCGGCCGCAATGCCTGAGAAAAAGGGTCTG
35	MAL-Alv-XhoI-Rev	GTGCTCGAGTTAACCGGAACGCCAGGTCATG

Bibliographie

Bibliographie

Andreyev, A., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P., Tsofina, L.M., Volkov, N.I. and Vygodina, T.V. (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem*, 182, 585-592.

Aquila, H., Link, T.A. and Klingenberg, M. (1985) The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *Embo J*, 4, 2369-2376.

Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. and Klingenberg, M. (1982) Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 363, 345-349.

Ardehali, H., Xue, T., Dong, P. and Machamer, C. (2005) Targeting of the mitochondrial membrane proteins to the cell surface for functional studies. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1143-1151.

Arechaga, I., Ledesma, A. and Rial, E. (2001) The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life*, 52, 165-173.

Bamber, L., Slotboom, D.J. and Kunji, E.R. (2007) Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents as demonstrated by differential affinity purification. *J Mol Biol*, 371, 388-395.

Barbour, R.L. and Chan, S.H. (1981) Characterization of the kinetics and mechanism of the mitochondrial ADP-atp carrier. *J Biol Chem*, 256, 1940-1948.

- Bensalem, N., Masscheleyn, S., Mozo, J., Vallee, B., Brouillard, F., Trudel, S., Ricquier, D., Edelman, A., Guerrera, I.C. and Miroux, B.** (2007) High sensitivity identification of membrane proteins by MALDI TOF-MASS spectrometry using polystyrene beads. *J Proteome Res*, 6, 1595-1602.
- Berrier, C., Park, K.H., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J.M. and Ghazi, A.** (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry*, 43, 12585-12591.
- Bienengraeber, M., Echtay, K.S. and Klingenberg, M.** (1998) H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry*, 37, 3-8.
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.P., Delarue, M. and Corringier, P.J.** (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*, 457, 111-114.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P.X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., Rial, E. and Ricquier, D.** (1994) A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *Embo J*, 13, 1990-1997.
- Bouillaud, F., Weissenbach, J. and Ricquier, D.** (1986) Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem*, 261, 1487-1490.
- Brandolin, G., Doussiere, J., Gulik, A., Gulik-Krzywicki, T., Lauquin, G.J. and Vignais, P.V.** (1980) Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 592, 592-614.
- Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J. and Vignais, P.V.** (1993) Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 25, 459-472.
- Breen, E.P., Gouin, S.G., Murphy, A.F., Haines, L.R., Jackson, A.M., Pearson, T.W., Murphy, P.V. and Porter, R.K.** (2006) On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. *J Biol Chem*, 281, 2114-2119.

Bruni, A., Contessa, A.R. and Scalella, P. (1965) The Binding of Atractyloside and Oligomycin to Liver Mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 100, 1-12.

Bruni, A. and Luciani, S. (1962) Effects of atractyloside and oligomycin on magnesium-stimulated adenosine triphosphatase and on adenosine triphosphate-induced contraction of swollen mitochondria. *Nature*, 196, 578-580.

Brustovetsky, N., Becker, A., Klingenberg, M. and Bamberg, E. (1996) Electrical currents associated with nucleotide transport by the reconstituted mitochondrial ADP/ATP carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 664-668.

Brustovetsky, N. and Klingenberg, M. (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J Biol Chem*, 269, 27329-27336.

Carroll, A.M., Porter, R.K. and Morrice, N.A. (2008) Identification of serine phosphorylation in mitochondrial uncoupling protein 1. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 1060-1065.

Chan, K.W., Zhang, H. and Logothetis, D.E. (2003) N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *Embo J*, 22, 3833-3843.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. and Pfanner, N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 138, 628-644.

Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. and Pebay-Peyroula, E. (2003) Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59, 2353-2355.

Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J. and Vignais, P.V. (1988) Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[α -³²P]adenosine diphosphate. *Biochemistry*, 27, 5141-5149.

Damian, M., Perino, S., Polidori, A., Martin, A., Serre, L., Pucci, B. and Baneres, J.L. (2007) New tensio-active molecules stabilize a human G protein-coupled receptor in solution. *FEBS Lett*, 581, 1944-1950.

- De Marcos Lousa, C., Trezeguet, V., David, C., Postis, V., Arnou, B., Pebay-Peyroula, E., Brandolin, G. and Lauquin, G.J.** (2005) Valine 181 is critical for the nucleotide exchange activity of human mitochondrial ADP/ATP carriers in yeast. *Biochemistry*, 44, 4342-4348.
- De Marcos Lousa, C., Trezeguet, V., Dianoux, A.C., Brandolin, G. and Lauquin, G.J.** (2002) The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry*, 41, 14412-14420.
- De Marcos-Lousa, C., Sideris, D.P. and Tokatlidis, K.** (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem Sci*, 31, 259-267.
- Dehez, F., Pebay-Peyroula, E. and Chipot, C.** (2008) Binding of ADP in the mitochondrial ADP/ATP carrier is driven by an electrostatic funnel. *J Am Chem Soc*, 130, 12725-12733.
- Dianoux, A.C., Noel, F., Fiore, C., Trezeguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M., Lauquin, G.J. and Brandolin, G.** (2000) Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[beta-32P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry*, 39, 11477-11487.
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D. and Palmieri, F.** (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett*, 579, 633-637.
- Duee, E.D. and Vignais, P.V.** (1965) [Exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides]. *Biochim Biophys Acta*, 107, 184-188.
- Duszynski, J., Bogucka, K., Letko, G., Kuster, U., Kunz, W. and Wojtczak, L.** (1981) Relationship between the energy cost of ATP transport and ATP synthesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 637, 217-223.
- Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C.M., Fux, J.P., Sluse, F.E. and Liebecq, C.** (1980) Kinetic mechanism of the exchanges catalysed by the adenine-nucleotide carrier. *Eur J Biochem*, 106, 1-6.
- Dvir, H. and Choe, S.** (2009) Bacterial expression of a eukaryotic membrane protein in fusion to various Mistic orthologs. *Protein Expr Purif*, 68, 28-33.

Echtay, K.S., Winkler, E. and Klingenberg, M. (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, 408, 609-613.

Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J. and Brand, M.D. (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J*, 22, 4103-4110.

Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C. and Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415, 96-99.

Eckerskorn, C. and Klingenberg, M. (1987) In the uncoupling protein from brown adipose tissue the C-terminus protrudes to the c-side of the membrane as shown by tryptic cleavage. *FEBS Lett*, 226, 166-170.

Esteves, T.C., Echtay, K.S., Jonassen, T., Clarke, C.F. and Brand, M.D. (2004) Ubiquinone is not required for proton conductance by uncoupling protein 1 in yeast mitochondria. *Biochem J*, 379, 309-315.

Falah, M. and Gupta, R.S. (1994) Cloning of the hsp70 (dnaK) genes from *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas cepacia*: phylogenetic analyses of mitochondrial origin based on a highly conserved protein sequence. *J Bacteriol*, 176, 7748-7753.

Fiermonte, G., Walker, J.E. and Palmieri, F. (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J*, 294 (Pt 1), 293-299.

Garlid, K.D., Jaburek, M. and Jezek, P. (2001) Mechanism of uncoupling protein action. *Biochem Soc Trans*, 29, 803-806.

Garlid, K.D., Jaburek, M., Jezek, P. and Varecha, M. (2000) How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta*, 1459, 383-389.

Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, S. and Jezek, P. (1996) On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem*, 271, 2615-2620.

- Gawaz, M., Douglas, M.G. and Klingenberg, M.** (1990) Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J Biol Chem*, 265, 14202-14208.
- Geiser, M., Cebe, R., Drewello, D. and Schmitz, R.** (2001) Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques*, 31, 88-90, 92.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Jimenez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Bouillaud, F. and Rial, E.** (1999) Structural and functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCP1: the three matrix loops are involved in the control of transport. *J Mol Biol*, 292, 137-149.
- Gourdon, P., Alfredsson, A., Pedersen, A., Malmerberg, E., Nyblom, M., Widell, M., Berntsson, R., Pinhassi, J., Braiman, M., Hansson, O., Bonander, N., Karlsson, G. and Neutze, R.** (2008) Optimized in vitro and in vivo expression of proteorhodopsin: a seven-transmembrane proton pump. *Protein Expr Purif*, 58, 103-113.
- Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R. and Wallace, D.C.** (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*, 16, 226-234.
- Gropp, T., Brustovetsky, N., Klingenberg, M., Muller, V., Fendler, K. and Bamberg, E.** (1999) Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J*, 77, 714-726.
- Guilvout, I., Chami, M., Berrier, C., Ghazi, A., Engel, A., Pugsley, A.P. and Bayan, N.** (2008) In vitro multimerization and membrane insertion of bacterial outer membrane secretin PulD. *J Mol Biol*, 382, 13-23.
- Haferkamp, I., Hackstein, J.H., Voncken, F.G., Schmit, G. and Tjaden, J.** (2002) Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the Escherichia coli membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur J Biochem*, 269, 3172-3181.
- Hashimoto, M., Shinohara, Y., Majima, E., Hatanaka, T., Yamazaki, N. and Terada, H.** (1999) Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers. *Biochim Biophys Acta*, 1409, 113-124.

Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., Jr. and Nicholls, D.G. (1978) Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem*, 82, 515-521.

Heimpel, S., Basset, G., Odoj, S. and Klingenberg, M. (2001) Expression of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Escherichia coli*. Renaturation, reconstitution, and the effect of mutations on 10 positive residues. *J Biol Chem*, 276, 11499-11506.

Huang, S.G. (2003) Binding of fatty acids to the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 412, 142-146.

Huang, S.G. and Klingenberg, M. (1995) Fluorescent nucleotide derivatives as specific probes for the uncoupling protein: thermodynamics and kinetics of binding and the control by pH. *Biochemistry*, 34, 349-360.

Huang, S.G. and Klingenberg, M. (1996) Two-stage nucleotide binding mechanism and its implications to H⁺ transport inhibition of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Biochemistry*, 35, 7846-7854.

Huang, S.G., Lin, Q.S. and Klingenberg, M. (1998) Slow-phase kinetics of nucleotide binding to the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem*, 273, 859-864.

Jaburek, M. and Garlid, K.D. (2003) Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem*, 278, 25825-25831.

Jelokhani-Niaraki, M., Ivanova, M.V., McIntyre, B.L., Newman, C.L., McSorley, F.R., Young, E.K. and Smith, M.D. (2008) A CD study of uncoupling protein-1 and its transmembrane and matrix-loop domains. *Biochem J*, 411, 593-603.

Jezek, P., Orosz, D.E. and Garlid, K.D. (1990a) Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport. *J Biol Chem*, 265, 19296-19302.

- Jezek, P. and Garlid, K.D.** (1990b) New substrates and competitive inhibitors of the Cl⁻ translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem*, 265, 19303-19311.
- Jezek, P., Orosz, D.E., Modriansky, M. and Garlid, K.D.** (1994) Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem*, 269, 26184-26190.
- Jezek, P., Modriansky, M. and Garlid, K.D.** (1997) Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett*, 408, 161-165.
- Jezek, P., Spacek, T., Garlid, K. and Jaburek, M.** (2006) Undecanesulfonate does not allosterically activate H⁺ uniport mediated by uncoupling protein-1 in brown adipose tissue mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1965-1974.
- Jimenez-Jimenez, J., Ledesma, A., Zaragoza, P., Gonzalez-Barroso, M.M. and Rial, E.** (2006a) Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1292-1296.
- Jimenez-Jimenez, J., Zardoya, R., Ledesma, A., Garcia de Lacoba, M., Zaragoza, P., Mar Gonzalez-Barroso, M. and Rial, E.** (2006b) Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance. *J Mol Biol*, 359, 1010-1022.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dotsch, V. and Bernhard, F.** (2008) Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1729-1755.
- Kalmbach, R., Chizhov, I., Schumacher, M.C., Friedrich, T., Bamberg, E. and Engelhard, M.** (2007) Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: in situ insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J Mol Biol*, 371, 639-648.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y.** (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol*, 49, 105-121.
- Kapust, R.B. and Waugh, D.S.** (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8, 1668-1674.

- Kefala, G., Kwiatkowski, W., Esquivies, L., Maslennikov, I. and Choe, S.** (2007) Application of Mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics*, 8, 167-172.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dotsch, V. and Bernhard, F.** (2005) Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *Febs J*, 272, 6024-6038.
- Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F., Raimbault, S. and Ricquier, D.** (1990) Expression of the brown fat mitochondria uncoupling protein in *Xenopus* oocytes and import into mitochondrial membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 167, 784-789.
- Klingenberg M et Pfaff, E** (1966) dans : Regulation of metabolic process in mitochondria (édité par J.M Tager, S.Papa, E. Quagriliariello et E.C.Slater) 7. BBA library , elsevier publishing co, 180-201
- Klingenberg, M.** (1980) The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol*, 56, 97-105.
- Klingenberg, M.** (1988) Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation. *Biochemistry*, 27, 781-791.
- Klingenberg, M.** (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1978-2021.
- Klingenberg, M.** (2009) Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 2048-2058.
- Klingenberg, M. and Appel, M.** (1989) The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile C-terminal SH groups. *Eur J Biochem*, 180, 123-131.
- Klingenberg, M. and Winkler, E.** (1985) The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator. *Embo J*, 4, 3087-3092.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Sligh, J.E., Levy, S.E., Amy, S.P., MacGregor, G.R., Wallace, D.C.** (2001) Genetic inactivation of adenine nucleotide translocator 2 (anc2) in mouse results in cardiac insufficiency and embryonic lethality. *Mitochondrion*, 1(S57), 2001.

- Kopecky, J., Clarke, G., Enerback, S., Spiegelman, B. and Kozak, L.P.** (1995) Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*, 96, 2914-2923.
- Krammer, E.M., Ravaud, S., Dehez, F., Frelet-Barrand, A., Pebay-Peyroula, E. and Chipot, C.** (2009) High-chloride concentrations abolish the binding of adenine nucleotides in the mitochondrial ADP/ATP carrier family. *Biophys J*, 97, L25-27.
- Krauss, S., Zhang, C.Y. and Lowell, B.B.** (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 248-261.
- Kunji, E.R. and Harding, M.** (2003) Projection structure of the atractyloside-inhibited mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278, 36985-36988.
- Kunji, E.R. and Crichton, P.G.** (2010). Mitochondrial carriers function as monomers. *Biochim Biophys Acta*. [Epub ahead of print]
- Lee, K.E., Kim, H.M., Lee, J.O., Jeon, H. and Han, S.S.** (2008) Regulation of CD40 reconstitution into a liposome using different ratios of solubilized LDAO to lipids. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 62, 51-57.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Mendez, A., Rothe, R. and Lenormand, J.L.** (2008) Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J Control Release*, 126, 217-227.
- Lin, C.S., Hackenberg, H. and Klingenberg, E.M.** (1980) The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study. *FEBS Lett*, 113, 304-306.
- Lin, C.S. and Klingenberg, M.** (1980) Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett*, 113, 299-303.
- Lin, C.S. and Klingenberg, M.** (1982) Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. *Biochemistry*, 21, 2950-2956.
- Lin, S.C. and Li, P.** (2004) CIDE-A, a novel link between brown adipose tissue and obesity. *Trends Mol Med*, 10, 434-439.

Liu, X., Wu, L., Deng, G., Li, N., Chu, X., Guo, F. and Li, D. (2008) Characterization of mitochondrial trifunctional protein and its inactivation study for medicine development. *Biochim Biophys Acta*, 1784, 1742-1749.

Mannella, C.A. (2008) Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 171-179.

Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, II, Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K. and Marko, M. (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, 52, 93-100.

Mattson, M.P. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev*, 9, 69-76.

Mayinger, P. and Klingenberg, M. (1992) Labeling of two different regions of the nucleotide binding site of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria with two ATP analogs. *Biochemistry*, 31, 10536-10543.

Miroux, B., Casteilla, L., Klaus, S., Raimbault, S., Grandin, S., Clement, J.M., Ricquier, D. and Bouillaud, F. (1992) Antibodies selected from whole antiserum by fusion proteins as tools for the study of the topology of mitochondrial membrane proteins. Evidence that the N-terminal extremity of the sixth alpha-helix of the uncoupling protein is facing the matrix. *J Biol Chem*, 267, 13603-13609.

Miroux, B., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D. and Bouillaud, F. (1993) The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *Embo J*, 12, 3739-3745.

Miroux, B. and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260, 289-298.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148.

- Modriansky, M., Murdza-Inglis, D.L., Patel, H.V., Freeman, K.B. and Garlid, K.D.** (1997) Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J Biol Chem*, 272, 24759-24762.
- Mozo, J., Ferry, G., Masscheleyn, S., Miroux, B., Boutin, J.A. and Bouillaud, F.** (2006) Assessment of a high-throughput screening methodology for the measurement of purified UCP1 uncoupling activity. *Anal Biochem*, 351, 201-206.
- Murdza-Inglis, D.L., Patel, H.V., Freeman, K.B., Jezek, P., Orosz, D.E. and Garlid, K.D.** (1991) Functional reconstitution of rat uncoupling protein following its high level expression in yeast. *J Biol Chem*, 266, 11871-11875.
- Murthy, T.V., Wu, W., Qiu, Q.Q., Shi, Z., LaBaer, J. and Brizuela, L.** (2004) Bacterial cell-free system for high-throughput protein expression and a comparative analysis of Escherichia coli cell-free and whole cell expression systems. *Protein Expr Purif*, 36, 217-225.
- Nekrasova, O.V., Wulfson, A.N., Tikhonov, R.V., Yakimov, S.A., Simonova, T.N., Tagvey, A.I., Dolgikh, D.A., Ostrovsky, M.A. and Kirpichnikov, M.P.** (2010) A new hybrid protein for production of recombinant bacteriorhodopsin in Escherichia coli. *J Biotechnol*. [Epub ahead of print]
- Nicholls, D.G.** (1974) Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *Eur J Biochem*, 49, 585-593.
- Nicholls, D.G.** (1976) Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur J Biochem*, 62, 223-228.
- Nicholls, D.G. and Lindberg, O.** (1973) Brown-adipose-tissue mitochondria. The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities. *Eur J Biochem*, 37, 523-530.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G. and Pebay-Peyroula, E.** (2005) Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett*, 579, 6031-6036.

- Nury, H., Manon, F., Arnou, B., le Maire, M., Pebay-Peyroula, E. and Ebel, C.** (2008) Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species. *Biochemistry*, 47, 12319-12331.
- Okamoto, K. and Shaw, J.M.** (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39, 503-536.
- Palmieri, F.** (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 564-578.
- Palmieri, F. and Pierri, C.L.** (2009) Structure and function of mitochondrial carriers - Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Lett.*
- Park, K.H., Berrier, C., Lebaupain, F., Pucci, B., Popot, J.L., Ghazi, A. and Zito, F.** (2007) Fluorinated and hemifluorinated surfactants as alternatives to detergents for membrane protein cell-free synthesis. *Biochem J*, 403, 183-187.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G.J. and Brandolin, G.** (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 426, 39-44.
- Pebay-Peyroula, E. and Brandolin, G.** (2004) Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol*, 14, 420-425.
- Pfaff, E. and Klingenberg, M.** (1968) Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur J Biochem*, 6, 66-79.
- Pfaff, E., Klingenberg, M. and Heldt, H.W.** (1965) Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 104, 312-315.
- Popot, J.L., Berry, E.A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D.M., Flotenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., Lakey, J.H., Leonard, K., Shuman, H.A., Timmins, P., Warschawski, D.E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B. and Tribet, C.** (2003) Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1559-1574.
- Pryor, K.D. and Leiting, B.** (1997) High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif*, 10, 309-319.

- Rehling, P., Brandner, K. and Pfanner, N.** (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 519-530.
- Rial, E., Poustie, A. and Nicholls, D.G.** (1983) Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *Eur J Biochem*, 137, 197-203.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Gubern, M. and Bouillaud, F.** (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Embo J*, 18, 5827-5833.
- Rial, E., Aguirregoitia, E., Jimenez-Jimenez, J. and Ledesma, A.** (2004) Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1608, 122-130.
- Riccio, P., Aquila, H. and Klingenberg, M.** (1975) Purification of the carboxy-tractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, 56, 133-138.
- Rigaud, J.L., Pitard, B. and Levy, D.** (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1231, 223-246.
- Robinson, A.J. and Kunji, E.R.** (2006) Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2617-2622.
- Roosild, T.P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R. and Choe, S.** (2005) NMR structure of Mystic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science*, 307, 1317-1321.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F. and Ricquier, D.** (2004) The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S130-135.
- Schwarz, D., Dotsch, V. and Bernhard, F.** (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics*, 8, 3933-3946.
- Seddon, A.M., Curnow, P. and Booth, P.J.** (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 105-117.

Shabalina, I.G., Backlund, E.C., Bar-Tana, J., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2008) Within brown-fat cells, UCP1-mediated fatty acid-induced uncoupling is independent of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 642-650.

Shabalina, I.G., Jacobsson, A., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem*, 279, 38236-38248.

Sicheritz-Ponten, T., Kurland, C.G. and Andersson, S.G. (1998) A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochim Biophys Acta*, 1365, 545-551.

Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 294, 158-162.

Sobhanifar, S., Schneider, B., Lohr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., Pulawski, W., Ghoshdastider, U., Kolinski, M., Filipek, S., Guntert, P., Bernhard, F. and Dotsch, V. (2010) Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A. and Wallace, D.C. (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, 267, 14592-14597.

Swida-Barteczka, A., Woyda-Ploszczyca, A., Sluse, F.E. and Jarmuszkiewicz, W. (2009) Uncoupling protein 1 inhibition by purine nucleotides is under the control of the endogenous ubiquinone redox state. *Biochem J*, 424, 297-306.

Thuswaldner, S., Lagerstedt, J.O., Rojas-Stutz, M., Bouhidel, K., Der, C., Leborgne-Castel, N., Mishra, A., Marty, F., Schoefs, B., Adamska, I., Persson, B.L. and Spetea, C. (2007) Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from Arabidopsis. *J Biol Chem*, 282, 8848-8859.

Tjaden, J., Schwoppe, C., Mohlmann, T., Quick, P.W. and Neuhaus, H.E. (1998) Expression of a plastidic ATP/ADP transporter gene in *Escherichia coli* leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, 273, 9630-9636.

- Tomas, P., Ledesma, A. and Rial, E.** (2002) Photoaffinity labeling of the uncoupling protein UCP1 with retinoic acid: ubiquinone favors binding. *FEBS Lett*, 526, 63-65.
- Urbankova, E., Hanak, P., Skobisova, E., Ruzicka, M. and Jezek, P.** (2003a) Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequences of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H⁺ uniport. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 212-220.
- Urbankova, E., Voltchenko, A., Pohl, P., Jezek, P. and Pohl, E.E.** (2003b) Transport kinetics of uncoupling proteins. Analysis of UCP1 reconstituted in planar lipid bilayers. *J Biol Chem*, 278, 32497-32500.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhomerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P. and Teule, G.J.** (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360, 1500-1508.
- van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W.** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-124.
- Viale, A.M., Arakaki, A.K., Soncini, F.C. and Ferreyra, R.G.** (1994) Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol*, 44, 527-533.
- Vignais, P.V., Vignais, P.M. and Stanislas, E.** (1962) Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*, 60, 284-300.
- Vignais, P.V., Block MR, Boulay F, Brandolin G, Lauquin GJ-M** (1985) Molecular aspects of structure-function relationships in mitochondrial adinine nucleotide carrier. *Structure and Properties of Cell Membranes*, 2, 139-179.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S. and Nuutila, P.** (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 360, 1518-1525.
- Vozza, A., Blanco, E., Palmieri, L. and Palmieri, F.** (2004) Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279, 20850-20857.

Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Høgbom, M., van Wijk, K.J., Slotboom, D.J., Persson, J.O. and de Gier, J.W. (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14371-14376.

Winkler, E. and Klingenberg, M. (1994) Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem*, 269, 2508-2515.

Winkler, E., Wachter, E. and Klingenberg, M. (1997) Identification of the pH sensor for nucleotide binding in the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochemistry*, 36, 148-155.

Wuu, J.J. and Swartz, J.R. (2008) High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1237-1250.

Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. and Woese, C.R. (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4443-4447.

Yeh, J.I., Du, S., Tortajada, A., Paulo, J. and Zhang, S. (2005) Peptergents: peptide detergents that improve stability and functionality of a membrane protein, glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 44, 16912-16919.

Zhivotovsky, B., Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G. (2009) Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death Differ*, 16, 1419-1425.

Publications et communications orales

Publications et communications orales

Publications

Nury H, Blesneac I, Ravaud S and Pebay-Peyroula E, Structural approaches of the mitochondrial carrier family, In " Methods in Molecular Biology : Membrane Protein Structure Determination" Ed. J.J. Lacapère. Accepté, publication prévue en 2010.

Deniaud A, Liguori L, Blesneac I, Lenormand JL, Pebay-Peyroula E. (2010) Crystallization of the membrane protein hVDAC1 produced in cell-free system. *Biochimica et Biophysica Acta*. Sous Presse *

Varnier A, Kermarrec F, Blesneac I, Moreau C, Liguori L, Lenormand JL, Picollet-D'hahan N. (2010) A simple method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *The Journal of Membrane Biology*, 233(1-3):85-92. *

Liguori L, Blesneac I, Madern D, Vivaudou M, Lenormand JL. Single-step production of functional OEP24 proteoliposomes. (2010) *Protein Expression and Purification*, 69(1):106-11.*

* ces publications sont le fruit des collaborations que j'ai pu avoir pendant la thèse

Communications orales

Blesneac I et al., workshop "Membrane Protein Production, Crystallization and Crystallography", June 2009, Oxford (UK)

Blesneac I et al., GDR 2478 meeting « Membrane proteins : Molecular Properties in amphiphilic environment », March 2009, Les Houches (France).

Blesneac I et al., GDR 2478 meeting « Membrane proteins : Molecular Properties in amphiphilic environment », March 2008, Praz sur Arly (France).

Blesneac I et al., CNRS workshop « Heterologous expression of integral membrane proteins », June 2008, Grasse (France).

Résumé

Le passage sélectif d'ions et de métabolites à travers les membranes biologiques est essentiel à de nombreux processus cellulaires fondamentaux. Au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, la communication cellulaire et les processus d'échanges sont principalement assurés par les transporteurs mitochondriaux. Ces protéines membranaires jouent un rôle clef dans les fonctions métaboliques des cellules eucaryotes et leur dysfonctionnement est à l'origine d'un certain nombre de maladies graves chez l'homme

Parmi les transporteurs mitochondriaux, deux familles ont été étudiées au cours de ce travail : les AACs (ADP/ATP Carriers) et les UCPs (UnCoupling Proteins). Deux systèmes de production hétérologue de ces transporteurs ont été mis en place : la synthèse *in vitro* et l'expression chez *E. coli* de protéines de fusion. Le premier a permis la production et la purification d'environ 0,6 mg de protéine par mL de réaction et le deuxième a été exploité afin de réaliser des caractérisations fonctionnelles des transporteurs ADP/ATP. Un test fonctionnel pour la protéine découplante a également été mis au point. Ce test, basé sur la mesure directe des courants électriques associés à l'activité de transport de l'UCP, a permis la caractérisation fonctionnelle de la protéine UCP1 native.

Mots-clés : transporteurs mitochondriaux, protéine découplante, transporteur ADP/ATP, protéines membranaires

Summary

The Mitochondrial Carrier Family (MCF) groups integral membrane proteins that transport various metabolites across the inner mitochondrial membrane. This transport is needed in major metabolic pathways occurring in mitochondria and is essential in eukaryotic metabolism. The mis-function of several identified human mitochondrial carriers has been associated with severe diseases.

In order to achieve a better understanding of mitochondrial carriers two different families of mitochondrial carriers were chosen to be studied: the AACs (ADP/ATP Carriers) and the UCPs (UnCoupling Proteins). Two heterologous expression systems of these carriers were developed: the cell free and the expression in *E. coli* as fusion proteins. The cell free system allowed the production and purification of about 0,6 mg of protein per milliliter of reaction mixture and the expression in *E. coli* proved to be very efficient for the functional characterization of ADP/ATP carriers. A functional test was developed for the uncoupling protein also. This test, based on the measure of electrical currents generated by the transport activity of UCP, allowed the functional characterization of native UCP1.

Key words: mitochondrial carriers, uncoupling protein, ADP/ATP carrier, membrane protein