

Titre : Les bases moléculaires de la thermogenèse induite par la protéine découplante UCP1.

Résumé : La protéine découplante UCP1 est localisée dans la membrane interne des mitochondries du tissu adipeux brun. Elle fait partie de la famille des transporteurs mitochondriaux (SLC25). En présence d'acide gras à chaîne longue, UCP1 permet le passage des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, découplant ainsi la chaîne respiratoire de la production d'ATP. Ceci provoque un emballement de l'oxydation des substrats dans la mitochondrie et mène à la production de chaleur. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la conductance aux protons provoquée par l'ajout d'acides gras sur UCP1 mais la localisation précise du site de fixation des acides gras reste inconnue.

Plusieurs modèles structuraux d'UCP1 et UCP2 ont été obtenus par RMN en présence de dodécylphosphocholine (DPC) et deux résidus, K56 et K269, ont été proposés comme étant cruciaux pour la fixation des acides gras et l'activation d'UCP1 en protéoliposomes. Des études antérieures ont cependant montré que le DPC inactive UCP1. Ces mutants ont donc été revisités dans le contexte plus physiologique des mitochondries de levure. Les mesures de respiration sur des sphéroplastes perméabilisés contenant des mitochondries exprimant les mutants ou la protéine sauvage permettent de visualiser l'activation ou l'inhibition de la protéine. Aucun défaut d'activation n'a été détecté pour les mutants K56S, K269S, ou le double mutant K56S/K269S dans notre système, réfutant ainsi les travaux de Zhao *et al.*

Afin d'obtenir des informations sur le site de fixation des acides gras sur UCP1 deux approches ont été entreprises en parallèle. La première consiste à réaliser de la mutagenèse par triplet, un résidu dans chaque tiers de la protéine, afin d'explorer la cavité de la protéine dans sa hauteur. L'analyse des mutants par respiration a permis l'identification de deux mutants différents de la protéine sauvage : un mutant non activable par les acides gras et un mutant présentant une meilleure stimulation par les acides gras mais non inhibable par le GDP. Les premiers résultats de mutagenèse vont dans le sens d'un site de liaison des acides gras localisé dans le site commun des substrats des transporteurs mitochondriaux, probablement à proximité immédiate du site inhibiteur des nucléotides puriques.

La deuxième approche fut de synthétiser des ligands fonctionnalisés avec des sondes photoactivables telle que l'AzDA (12-((4-azido-2-nitrophényl)amino)dodécanoïque)). La β -lactoglobuline (BLG), utilisée comme protéine modèle, a permis la détermination des conditions d'irradiation en solution ou sur des co-cristaux BLG/AzDA. Les premiers tests sur des mitochondries exprimant UCP1 montrent, par spectrométrie de masse linéaire, un photomarquage de la protéine.

Title : Molecular bases of mitochondrial uncoupling protein 1 induced thermogenesis.

Abstract : Uncoupling protein 1 (UCP1) is found in the inner mitochondrial membrane of brown adipocyte and belongs to the mitochondrial carrier family (SLC25). In the presence of long-chain fatty acids (LCFA), UCP1 increases the H⁺ conductance to 'short-circuit' the proton-motive force, which, in turn, increases fatty acid oxidation and energy release as heat. Hypotheses have been made to explain this mechanism. The precise location of the LCFA binding site(s) has however not been determined.

Different atomic models of UCP1 and UCP2 have been obtained by NMR in dodecylphosphocholine (DPC) and Zhao *et al.* proposed that K56 and K269 are crucial for LCFA binding and UCP1 activation in proteoliposomes. However DPC has been shown to inactivate UCP1. We therefore revisited those UCP1 mutants in a more physiological context by expressing them in the mitochondria of *S. cerevisiae*. Mitochondrial respiration, assayed on permeabilized spheroplasts, enables the determination of UCP1 activation and inhibition. The K56S, K269S and K56S/K269S mutants did not display any defect in activation, which confirms that the NMR-DPC model is not relevant to understand UCP1 function.

Two methods were used to address the identification of the fatty acid binding site in UCP1. Mutagenesis was done with triple mutations, one at the same position of each third of the protein to scan different levels of the protein's cavity. By respiration analyses on permeabilised spheroplasts two triplet mutants deviating from the wild-type protein were identified: one that can not be activated by fatty acids and one, which is more stimulated by fatty acids but can not be inhibited. Those first results seem to indicate that the LCFA binding site is located within the common substrate binding site of mitochondrial carrier and partially overlap with nucleotide binding site.

The second approach was to synthesise fatty acids based ligands functionalized with active probes, which are able to crosslink the protein under irradiation, such as the AzDA (12-((4-azido-2-nitrophenyl)amino)dodecanoic acid). We used β -lactoglobulin as a template to optimize crosslinking conditions either in solution or in crystals. The first crosslinking experiments on mitochondria expressing UCP1 led to the visualisation by linear mass spectrometry of UCP1 crosslinked to the AzDA.