Proposition de stage M2 Biophysique 2020-2021

Nom du responsable de stage : Françoise Bonneté

Ecole Doctorale de Rattachement : MTCI - Université de Paris

Nom du Laboratoire : LBPC-PM UMR7099

Directeur : Bruno Miroux

Adresse complète : Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 Pierre et Marie Curie, 750005 PARIS

site web: http://www.ibpc.fr/UMR7099/

Titre du stage (en français et en anglais) **:** Expression, purification of UCP1 for biophysical and structural studies

Résumé du projet (environ une demi-page)

UCP1 (UnCoupling Protein) est une protéine membranaire intégrale de la membrane mitochondriale interne du tissu adipeux brun (TAB). Le TAB, largement étudié chez les rongeurs et les mamifères hibernants, est un acteur essentiel de la thermogénèse adaptative et du maintien de la température du corps à 37°C. Il régule la dépense énergétique grâce à l'activité d'UCP1.

UCP1 appartient à la famille des transporteur mitochondriaux comme les transporteurs (AAC) de l'ADP/ATP ou les transporteurs de phosphate (PiC). 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 sans une structure 3D à haute résolution.

L'objectif du projet est d'optimiser l'expression, et la purification d'UCP1 permettant des études biophysiques (SEC-MALLS, SEC-SAXS) et structurales par cristallographie. La principale difficulté rencontrée avec UCP1 est l'obtention de protéine purifiée en quantité suffisante et de qualité suffisante (non-agrégée, repliée, fonctionnelle). Différentes stratégies pourront être testées pour exprimer la protéine recombinante :

1) Dans un premier temps, une optimisation des conditions actuelles d'expression et de purification à partir de mitochondries de levure (système déjà maîtrisé au laboratoire) sera effectuée. Plusieurs voies d'optimisation seront testées, en particulier sur le fractionnement des membranes mitochondriales, la solubilisation et la stratégie de purification.

2) Dans un second temps, des constructions plasmidiques comportant des séquences permettant l'adressage de UCP1 à la membrane d'E. coli seront réalisées, afin d'éviter la formation de corps d'inclusion bactérien insoluble et d'obtenir un adressage et une insertion fonctionnelle d'UCP1 dans la membrane interne bactérienne. Le rendement de purification sera comparé au système d'expression dans la levure.

Avant d'entreprendre des études biophysiques, la fonctionnalité d'UCP1 sera testée par mesure du transport de proton en liposomes en présence ou absence de modulateur de son activité.

En fonction des quantités d'UCP1 obtenues, des études biophysiques (SEC-MALLS, SEC-SAXS) pourront être effectuées en amont des essais de cristallisation.

Ce projet de M2 s'inscrit en support d'une thèse actuellement en cours visant à identifier les bases moléculaires de la régulation d'UCP1 par mutagenèse dirigée et expression fonctionnelle dans les mitochondries de levure.

Références éventuelles de l'équipe sur le sujet

M. Piel, S. Masscheleyn, F. Bouillaud, K. Moncoq and B. Miroux "Structural models of mitochondrial uncoupling proteins obtained in DPC micelles are not physiologically relevant for their uncoupling activity",bioRxiv, 2020.