

CONCEPTION D'UN NOUVEAU SYSTÈME MICROFLUIDIQUE DE MANIPULATION DE NANOGOUTTES POUR L'ÉTUDE ET LE CRIBLAGE PHARMACEUTIQUE DE PROTÉINES MEMBRANAIRES

École doctorale : I-MEP2 n°510

Laboratoire d'accueil :

Laboratoire LEGI
1023 rue de la piscine
Domaine Universitaire
38400 Saint Martin d'Hères

Direction de la thèse :

Directeur : Michel VIVAUDOU (IBS)
Co-directeur : Benjamin CROSS (LEGI)

Contacts :

benjamin.cross@legi.grenoble-inp.fr

Collaborations :

Eva PEBAY-PEYROULA
Institut de Biologie Structurale, Grenoble

Résumé

Le système DIB (Droplet Interface Bilayer) est un nouvel outil, élégant et rapide, pour créer des membranes artificielles à l'interface de nanogouttes qui a le potentiel de révolutionner l'étude des protéines membranaires de transport. Le principe consiste à construire une bicouche en joignant les monocouches lipidiques entourant deux nanogouttelettes de solution aqueuse dans un bain d'huile. Le projet de thèse est d'intégrer cette approche, à l'heure actuelle entièrement manuelle, dans un système automatisé et fiable à haut débit pour étudier canaux et transporteurs électrogéniques. Il s'agira de concevoir un système sur puce combinant le déplacement des gouttes par microfluidique digitale (EWOD) et la mesure des courants ioniques (de l'ordre du pA) résultant de l'activité des protéines membranaires grâce à des plots métalliques. Ce projet ambitieux s'appuiera sur les nombreux résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet Nanobiodrop, soutenu par la Fondation Nanosciences, qui démontrent sa faisabilité.

Mots-clés : microfluidique, protéine membranaire, électromouillage, électrophysiologie.

État de l'art

La paroi des cellules et compartiments cellulaires est constituée d'une bicouche lipidique étanche d'environ 3 nm d'épaisseur. Pour assurer la communication et l'import/export de substances au travers de ces membranes, la cellule utilise des protéines spécialisées – récepteurs, canaux, transporteurs – qui résident dans les membranes. Ces protéines membranaires sont essentielles à la vie de la cellule : leur dysfonctionnement suite à des mutations génétiques est à l'origine de nombreuses maladies ; leur modulation par des composés pharmacologiques est largement utilisée en thérapeutique car près de la moitié des médicaments ciblent les protéines membranaires. Si l'étude des protéines membranaires est fondamentale en biologie et médecine, elle demeure difficile car ces protéines fonctionnent uniquement

dans une bicouche lipidique, sont délicates à manipuler biochimiquement et s'expriment en quantités infimes. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques aptes à détecter des molécules uniques. En ce qui concerne les protéines de transport d'ions, canaux ou transporteurs, il s'agit principalement de la technique du patch-clamp¹ et des membranes artificielles suspendues obtenues par la méthode de Langmuir-Blodgett^{2,3}. Ces techniques, qui requièrent des opérateurs chevronnés, nécessitent des volumes importants et sont difficilement automatisables du fait de la fragilité des membranes. Récemment, une nouvelle technique simple de formation de bicouches artificielles stables a été présentée, qui utilise des nanogouttes recouvertes d'une monocouche de phospholipide (Fig.1)^{4,5}. Cette méthode, désignée DIB (Droplet Interface Bilayer), permet de créer des membranes stables sur plusieurs heures ou jours entre des compartiments de volume $<1 \mu L$. Il est possible d'insérer dans les DIB des protéines de transport par injection de protéines purifiées ou de membranes natives dans une goutte. L'activité des protéines peut être observée par mesure de courant dans le cas de canaux ioniques et transporteurs électrogéniques ou, du fait du faible volume, par mesure spectrométrique des variations de concentration d'un substrat dans le cas d'un transporteur.

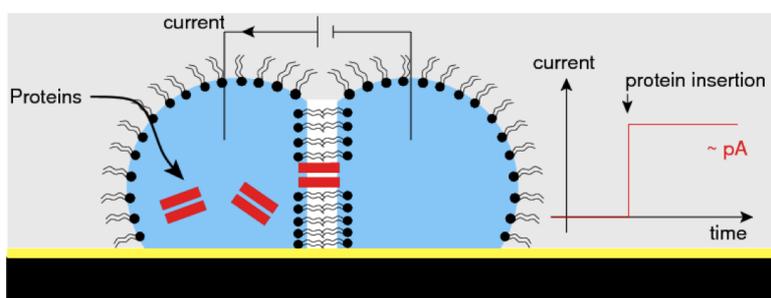


FIGURE 1: Une monocouche de lipides délimite 2 nanogouttes de solution saline dans un solvant. Le rapprochement des gouttes forme une bicouche où peuvent être insérées des protéines membranaires dont l'activité peut être mesurée à l'aide d'électrodes. Le diamètre des gouttes peut être $<1 \text{ mm}$.

À l'heure actuelle, la technique DIB est réalisée manuellement par rapprochement de gouttes avec des électrodes insérées dans les gouttes. Les protéines testées ont été essentiellement des canaux bactériens. Nous nous proposons de l'automatiser pour simplifier et étendre son emploi, et de l'optimiser pour étudier des protéines humaines de plus grand intérêt.

Objectifs de la thèse :

Récemment des membranes suspendues ont été formées en utilisant des gouttelettes d'eau recouvertes de phospholipides ouvrant de nouvelles possibilités pour la formation de membranes biologiques en utilisant des techniques de microfluidique digitale, en gouttes, dont deux spécificités sont particulièrement intéressantes pour l'étude des transferts transmembranaires :

- La possibilité d'intégration de la mesure de l'activité des protéines transmembranaires.
- La possibilité de créer un réseau de membranes formées par un ensemble de gouttelettes. Réseau qui pourra être dynamique par ajout ou retrait de gouttelettes.

1. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* 391 :85-100
2. Mueller P, Rudin D, Tien H, Wescott W (1962) Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature.* 194 :979-80
3. Montal M, Mueller P (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69 :3561-6
4. Funakoshi K, Suzuki H, Takeuchi S (2006) Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Anal Chem.* 78 :8169-74
5. Bayley H, Cronin B, Heron A, Holden MA, Hwang WL, Syeda R, Thompson J, Wallace M (2008) Droplet interface bilayers. *Mol BioSyst.* 4 :1191-208

Nous proposons la mise en place d'une approche originale pour la création de membranes suspendues au sein d'un réseau de microgouttelettes en associant des techniques de microfluidique, des nanotechnologies et de la biologie. Dans ce cadre, les objectifs de la thèse proposée ici sont :

- Appréhender les mécanismes de formation d'une membrane artificielle par le rapprochement par électromouillage de deux nanogouttes recouvertes de lipides. Il s'agit de comprendre le rôle de la composition et de la concentration lipidique sur la formation de la membrane et sur sa stabilité.
- Proposer et réaliser des microsystèmes originaux en termes d'intégration des mesures électriques de l'activité d'une protéine unique en s'appuyant notamment sur les collaborations développées au sein de la plateforme grenobloise de microfabrication Nanofab. Il s'agit d'un challenge expérimental puisque l'enjeu est la mesure d'un courant continu de l'ordre du pA traversant des protéines nanométriques insérées dans des membranes formées dans un microsystème. La difficulté principale est, dans cette grande variation des échelles de longueur (du nm jusqu'à 100 μm), de venir mesurer, en milieu liquide, le courant à travers une seule protéine.
- Étudier l'insertion et la mesure de l'activité de protéines membranaires d'intérêt biologique de manière, par exemple, à connaître l'effet de drogues sur leur activité (drug-screening). Les protéines seront choisies dans le répertoire de celles étudiées à l'IBS, en particulier, les porines bactériennes, les canaux potassiques, et les transporteurs mitochondriaux.

Ces objectifs seront menés en étroite collaboration entre les deux directeurs de thèses. Michel Vivaudou aura en charge les aspects de biologie et de développement instrumental pour la biologie. Quant à Benjamin Cross, il sera responsable des aspects physiques et technologiques de la thèse. Ce projet ambitieux reposera sur le travail poursuivi dans le cadre du projet Nanobiodrop, soutenu par la Fondation Nanosciences, qui a déjà permis la mise en place d'un poste expérimental DIB à l'IBS et au LEGI (Figure 2).

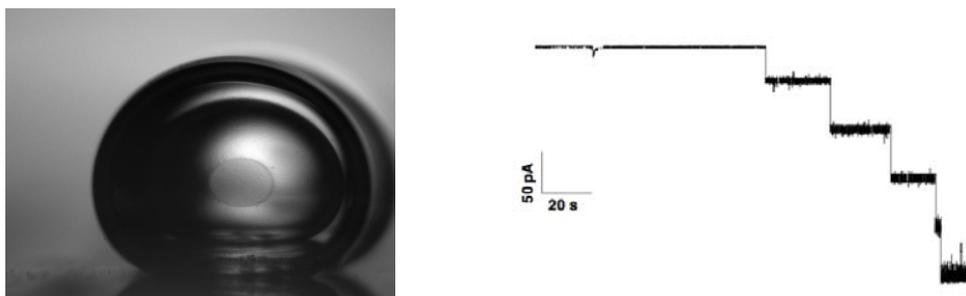


FIGURE 2: Gauche : Deux nanogouttes, une au premier plan et une partiellement masquée en arrière plan, manipulées par EWOD, forment une bicouche matérialisée par la zone de contact au centre de l'image. Expérience conduite au LEGI. Droite : Enregistrement des courants générés par des protéines d' α -hémolysine dans une DIB. Chaque déflexion représente l'insertion d'un pore. Expérience conduite à l'IBS.

Connaissance et compétences requises

Formation : Physique, Mécanique, Biophysique, Nanosciences, Sciences des Matériaux.

Compétences souhaitées : Physique des surfaces, nanofabrication, techniques de mesures électroniques et optiques

Goût pour la biologie et pour le travail dans une communauté pluridisciplinaire.