



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **16 juillet 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **CHADLI Meriem**

Titre de la thèse : « Développement de la technologie « TransMembraChip » : biopuces à membranes pour la réinsertion et le criblage d'agonistes / antagonistes de protéines membranaires »



Résumé

Ces travaux de thèse concernent le développement d'une biopuce à membranes permettant de réincorporer de manière fonctionnelle une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), CXCR4, dans une bicouche lipidique attachée et espacée sur un substrat d'or par pilotis peptidiques (pep-tBLM), sous un format miniaturisé et parallélisé. Le peptide pilotis utilisé, P19-4H, possède une cystéine en position N-terminale pour son greffage covalent sur la surface d'or et quatre résidus Histidine en position C-terminale pour l'attachement par chélation, en présence de Nickel, de protéoliposomes réintégrant CXCR4. La synthèse de cette protéine s'effectue par expression acellulaire sous forme de protéoliposomes, dans une composition lipidique adaptée et en présence d'un lipide chélatant, le DOGS-NTA, à 2% de la quantité molaire totale des lipides. Le peptide AH, un peptide fusogène, est utilisé dans une dernière étape pour fusionner les protéoliposomes attachés. La caractérisation approfondie des protéoliposomes et l'optimisation des conditions expérimentales ont permis d'aboutir à l'attachement robuste des protéoliposomes avec une densité lipidique suffisante pour leur fusion par le peptide AH et la formation d'une pep-tBLM réintégrant CXCR4. Des études de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont montré que la pep-tBLM réinsérant CXCR4 était fluide, homogène et continue, avec un coefficient de diffusion de $2.10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Des études d'interaction entre CXCR4 et un ligand antagoniste, le T22, ont révélé que la protéine s'insère dans la pep-tBLM de manière fonctionnelle et orientée. Le processus de formation de la pep-tBLM a été miniaturisé par microstructuration du support consistant à recouvrir la surface d'or de polystyrène puis à former des micropuits exposant la surface d'or en leur fond. Le peptide P19-4H a été déposé de manière contrôlée dans les micropuits à l'aide d'un robot de dépôt pour former des plots de pep-tBLM intégrant CXCR4. La fonctionnalité de CXCR4 réinsérée dans ces plots de membranes a été attestée par des études d'interaction avec son ligand T22. L'ensemble des étapes de formation, d'optimisation et de miniaturisation des pep-tBLM a été suivi, visualisé et caractérisé en temps réel et sans marquage par la technique d'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi). La technologie « *TransMembraChip* » développée au cours de cette thèse représente une méthode de choix pour la réincorporation et l'étude fonctionnelle de protéines transmembranaires dans une composition lipidique adaptée. Les protéines transmembranaires, en particulier les RCPG, représentent des cibles thérapeutiques intéressantes. Ainsi, dans le cadre de la recherche de candidats médicaments pour le traitement de pathologies impliquant des protéines transmembranaires, cette nouvelle génération de biopuce à membranes constitue un outil prometteur adapté au criblage de ligands agonistes ou antagonistes de ces protéines.