

PSE – Interaction membranes-médicaments

Adrien Bertolo, Thomas Tiennot, Marie Rapin, élèves ingénieurs ESPCI

Matériel et méthodes

1. Produits

Nous nous sommes procurés deux types de phospholipides chez SIGMA® pour réaliser des monocouches : du DPPC (1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine) et de l'EPC (Egg Phosphatidylcholine). Les phospholipides sont conservés au congélateur à -20°C.

Nous nous sommes aussi procuré du cholestérol chez SIGMA® afin d'en incorporer dans les monocouches avec le cholestérol. Ceci permet de s'approcher le plus possible des membranes biologiques avec ce modèle, même si dans notre organisme, les membranes comportent aussi de nombreuses protéines qui modifient aussi les propriétés thermodynamiques de la membrane.

2. Préparation des solutions

Pour chaque solution de lipide, nous avons commencé par préparer une solution mère à 1 mol/L : pour le DPPC cela correspond à 0.74g de DPPC dans 0.8mL de chloroforme et 0.2mL d'éthanol; pour le mélange DPPC/cholestérol cela correspond à 0.5g de DPPC et 0.1g de cholestérol dans 0.8mL de chloroforme et 0.2mL d'éthanol; pour l'EPC cela correspond à 0.8g d'EPC dans 0.8mL de chloroforme et 0.2mL d'éthanol; pour le mélange EPC/cholestérol cela correspond à ajouter 0.3g de cholestérol à la solution précédente.

Ensuite, chacune de ces solutions est diluée 1000 fois pour obtenir une concentration de 1mmol/L.

Nous nous sommes aussi procurés du principe actif d'Ibuprofène® chez Sigma®, un anti-inflammatoire non stéroïdien. Nous l'avons mis en solution dans le même mélange chloroforme/éthanol. Nous avons préparé une solution mère à 1mol/L, soit 0.5g dans 2.4mL du mélange de solvant. Nous avons dilué cette solution 100 fois avant de l'utiliser.

3. Matériel

Nous avons utilisé un appareil MilliQ pour la purification de l'eau utilisée en sous-phase. La cuve de Langmuir ainsi que le module électronique qui l'accompagne viennent de Riegler&Kirstein GmbH®. Le logiciel utilisé comme interface avec l'ordinateur est RuKtTrough®, fonctionnant sous Labview®. Enfin, nous avons utilisé un cryo-thermostat pour réguler la température de la cuve ainsi qu'une pompe pour les rinçages.

4. Protocole expérimental

a. Mesure des isothermes

Avant toute chose, rincer deux fois une cuve de Langmuir avec de l'eau ultra pure. Vérifier son horizontalité. Remplir la cuve avec 110mL d'eau ultra pure, et calibrer sur le détecteur la valeur de la pression de surface.

Pour tracer des isothermes typiques du DPPC, commencer par remplir la cuve avec 110mL d'eau ultra pure. Déposer à la surface 25µL d'une solution de DPPC (1mmol/L dans un mélange chloroforme/éthanol 4 :1). Laisser la pression de surface se stabiliser pendant 10 minutes. Lancer la compression du film à vitesse moléculaire.

Pour tracer des isothermes qui montrent l'effet de l'ibuprofène, commencer par remplir la cuve avec 110mL d'eau ultra pure. Déposer à la surface 25µL d'une solution de DPPC (1mmol/L dans un mélange chloroforme/éthanol 4 :1). Laisser la pression de surface se stabiliser pendant 10 minutes. Introduire dans la sous-phase un volume V ($V=140\mu\text{L}$ pour une concentration en ibuprofène de $12.5\mu\text{mol/L}$) d'une solution d'ibuprofène (0.01mol/L dans chloroforme/éthanol 4 :1). Laisser le film se stabiliser 10 minutes. Lancer la compression du film à vitesse moléculaire.

b. Électroformation des vésicules et observations par microscopie de fluorescence

Les GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) sont des vésicules de diamètre compris entre 1 et 100 μm . Elles sont utilisées en recherche pour étudier les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires. Leur taille permet de les observer en microscopie optique. Pour faire de la microscopie de fluorescence, nous avons utilisé du MBD PC (1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphocholine). Ce phospholipide absorbe à 460 nm et émet à 534 nm. Il faut travailler dans l'obscurité pour ne pas altérer la fluorescence du MBD PC.

Nous avons testé deux protocoles et nous avons retenu l'électroformation.

Préparer une solution de DPPC/EPC/Chol/NBD-PC iso 1:1:1:(1/33) à 10 mg/mL en phospholipides, dans du chloroforme.

Nettoyer deux lames ITO à l'éthanol.

Déterminer les faces conductrices des plaques ITO à l'aide d'un multimètre.

Réaliser un dépôt de 15-20 μg du mélange de phospholipides par cm^2 sur une des deux plaques (côté conducteur) à l'aide d'une microseringue.

Laisser le solvant s'évaporer. Cette étape peut être réalisée sous vide.

Préparer la chambre d'électroformation d'environ avec de la pâte de scellement Sigillum Wax Vitrex® qui adhère parfaitement à la plaque ITO, en entourant le dépôt.

Remplir la chambre d'électroformation avec une solution de sucre à 200 mM.

Appliquer la deuxième plaque ITO à la première délicatement de façon à ce que l'ensemble tienne grâce à la pâte Vitrex®.

Appliquer à la chambre d'électroformation une tension alternative à environ 10 Hz et d'amplitude environ 0,7 V_{RMS} pour chaque millimètre d'espacement entre les deux plaques pendant 1h30.

Pour l'observation, commencer par couper un embout de micropipette à son extrémité pour augmenter le rayon du trou de l'embout. Cette étape permet d'empêcher de casser les vésicules contenues dans la chambre au moment du prélèvement. Ouvrir délicatement la chambre d'électroformation et diluer la solution de vésicules contenues dans la chambre d'électroformation dans une solution de glucose. Cette étape permet d'augmenter le contraste. On peut maintenant observer les membranes des vésicules sur un microscope qui excite autour de 460 nm.