



HAL
open science

Purification des Protéines Membranaires en Microfluidique

L Lecorgne, M Taghi, C Chhuon, I C Guerrera, G Phan, I Broutin, A
Pallandre, X Decleves, Marie-Claude C Menet

► **To cite this version:**

L Lecorgne, M Taghi, C Chhuon, I C Guerrera, G Phan, et al.. Purification des Protéines Membranaires en Microfluidique. Analytics 2022, Sep 2022, Nantes, France. hal-04312539

HAL Id: hal-04312539

<https://hal.science/hal-04312539>

Submitted on 26 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

PURIFICATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES EN MICROFLUIDIQUE

L.Lecorgne^{1,2,3,4}, M.Taghi^{1,2}, C.Chhuon^{1,5}, IC.Guerrera^{1,5}, G.Phan^{1,6}, I.Broutin^{1,6}, A.Pallandre^{3,4}, X.Decleves^{1,2}, MC.Menet^{3,4}

¹ *Université Paris Cité, Paris, France.*

² *Inserm, UMR-S 1144, Optimisation Thérapeutique en Neuropsychopharmacologie, Paris, France.*

³ *Université Paris-Saclay, Orsay, France.*

⁴ *CNRS, UMR 8000, Institut de Chimie Physique, Orsay, France.*

⁵ *Plateforme Protéomique 3P5-Necker, SFR Necker, US24, Paris, France.*

⁶ *CNRS, UMR 8015, Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques, Paris, France*

Introduction

Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique régulent les échanges entre le sang et le cerveau grâce à leurs transporteurs membranaires. Des données qualitatives et quantitatives sur ces protéines membranaires sont nécessaires pour comprendre leur implication dans la distribution de xénobiotiques. Nous avons développé une méthode innovante de purification des protéines membranaires en microfluidique par affinité biotine-streptavidine pour pouvoir les analyser par LC-MS/MS. Nous apportons ici les preuves de concept de la liaison de la sulfo-NHS-SS-biotine aux protéines membranaires et de la purification d'une protéine biotinylée présente dans un milieu complexe.

Matériels et méthodes

Biotinylation et marquage cellulaire

Le marquage cellulaire a été réalisé sur des cellules hCMEC/D3 à confluence. De la sulfo-NHS-SS-biotine (Thermo Scientific, réf. : 21331) à 0,41 mmol.L⁻¹ est incubée pendant 30 minutes à T.A. Après avoir fixé et perméabilisé les cellules, un immuno-marquage de la VE-cadhérine est réalisé. De la streptavidine fluorescente Alexa-555 1/2000 est ajoutée. Les cellules sont observées au microscope confocal Leica sp8.

Purification de BSA biotinylée

5 µg de BSA biotinylée sont ajoutés à 100 µg de protéines non biotinylées issues de lysat de cellules hCMEC/D3. La BSA modifiée est purifiée en microtube à l'aide de billes magnétiques couplées à la streptavidine (Sigma Aldrich, réf. : GE66152104010350).

Microfluidique

Un contrôleur de pression OB1 MK3+ et un multiplexer MUX CROSS CHIP (Elveflow) contrôlent les flux. Des aimants (Magnet-shop, réf. : QM-10x05x18-N) sont utilisés pour maintenir les billes magnétiques dans des puces avec un canal droit en PMMA (Microfluidic ChipShop, réf. : 10000246).

Résultats et discussion

Biotinylation et marquage cellulaire

Pour s'assurer que la sulfo-NHS-SS-biotine ne pénètre pas dans les cellules, des expériences de marquage cellulaire ont été réalisées. La biotine est détectée de manière indirecte par la streptavidine Alexa-555. La VE-cadhérine est une protéine localisée à la membrane plasmique. Le résultat en microscopie confocale a mis en évidence une colocalisation du marquage de la VE-cadhérine avec la fluorescence de la streptavidine.

Purification de la BSA biotinylée

De la BSA dérivée avec de la sulfo-NHS-SS-biotine a été utilisée dans le but de mettre au point en microtube les conditions de rinçage et d'éluion pour purifier des protéines biotinylées. Cette BSA a été ajoutée à un lysat de cellules et purifiée à l'aide de billes magnétiques couplées à la streptavidine. La qualité de la purification a été observée par électrophorèse. La BSA se retrouve dans la fraction éluee, les autres protéines dans la fraction non retenue.

En microfluidique, la purification est réalisée dans des puces avec un canal droit. Les billes magnétiques couplées à la streptavidine sont maintenues dans le canal avec des aimants. Différentes tailles, géométries, orientations et dispositions des aimants ont été étudiées pour immobiliser les billes sous la contrainte du flux des tampons et permettre la purification de la BSA biotinylée dans un mélange complexe.

Conclusion

Nous avons développé une méthode de purification de protéines membranaires en microfluidique. La biotinylation des protéines membranaires et le développement des conditions de purification avec la BSA en microtube et en microfluidique nous apportent les preuves de concept pour purifier de faibles quantités de protéines membranaires.