



HAL
open science

Purification des protéines membranaires en microfluidique

Lucas Lecorgne, Meryam Taghi, Cerina Chhuon, Ida Chiara Guerrera, Gilles Phan, Isabelle Broutin, Antoine Pallandre, Xavier Declèves, Marie-Claude Menet

► **To cite this version:**

Lucas Lecorgne, Meryam Taghi, Cerina Chhuon, Ida Chiara Guerrera, Gilles Phan, et al.. Purification des protéines membranaires en microfluidique. SEP23 - 15ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP, Mar 2023, Paris, France. hal-04312576

HAL Id: hal-04312576

<https://hal.science/hal-04312576>

Submitted on 30 Nov 2023

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 protéines membranaires en microfluidique

Lucas Lecorgne^{1, 2, 3, 4}

Meryam Taghi^{1, 2}, Cerina Chhuon^{1, 5}, IC.Guerrera^{1, 5}, Gilles Phan^{1, 6}, Isabelle Broutin^{1, 6}, Antoine Pallandre^{3, 4}, Xavier Decleves^{1, 2}, Marie-Claude 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 8038, CiTCoM (Cibles Thérapeutiques et Conception de Médicaments), Paris, France

Contact : lucas.lecorgne@gmail.com

Le système nerveux central (SNC) est une cible thérapeutique pour de nombreux composés pharmacologiquement actifs. Pour atteindre leur cible, ces molécules doivent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est une interface sélective entre le système sanguin (SS) et le SNC, dont le rôle est de maintenir l'homéostasie cérébrale. Ainsi, pour passer du SS au SNC ou inversement, les composés endogènes et exogènes doivent traverser les cellules endothéliales de la BHE. Ces cellules régulent la pénétration des molécules grâce à leurs transporteurs membranaires [1]. L'étude de l'expression de ces protéines est nécessaire pour comprendre leur implication dans l'administration, la distribution, la métabolisation et l'excrétion de xénobiotiques.

L'objectif de ce projet est de développer une méthode micro-préparative en microfluidique pour la purification de protéines membranaires à partir de cellules endothéliales. L'approche utilisée est la biotinylation des protéines de surface par la sulfo-NHS-SS-biotine et leur purification dans des puces microfluidiques à l'aide de billes magnétiques couplées à la streptavidine ou à la neutravidine, deux protéines ayant une très forte affinité pour la biotine ($K_d = 10^{14}$ - 10^{15} mol.L⁻¹) [2].

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 ont déjà été apportées [3]. Dans la continuité de ces résultats, une validation de la méthode de micropurification à partir de cellules biotinylées, par analyse LC-MS/MS, est en cours.

Un modèle cellulaire de cellules endothéliales de la BHE est utilisé pour réaliser ces validations : la cellule hCMEC/D3 [4]. Ces cellules ont été biotinylées puis lysées et les protéines totales ont été dosées. 250 µg de protéines ont été introduits dans des puces de microfluidique en PMMA avec ou sans traitement de surface hydrophile. Pour purifier les protéines biotinylées, des billes magnétiques couplées à la streptavidine ou à la neutravidine ont préalablement été immobilisées dans le canal de la puce. Après les étapes de rinçage et d'élution, les fractions purifiées ont été analysées par LC-MS/MS. La purification microfluidique a été validée par la détermination du rendement des fractions membranaires purifiées par rapport au lysat cellulaire brut. Des comparaisons des purifications obtenues avec des puces traitées hydrophiles ou non, ainsi qu'avec des billes magnétiques couplées streptavidine ou neutravidine sont en cours de réalisation.

[1] Abbott N.J. *et al.* (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol Dis.** 37(1):13–25

[2] Ohtsuki S. *et al.* (2013). Quantitative Targeted Absolute Proteomic Analysis of Transporters, Receptors and Junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood–Brain Barrier Model. **Mol Pharm.** 10:289-296

[3] Communication orale au congrès **Analytix 2022**. 08/09/2022

[4] Hirsch J.D. *et al.* (2002). Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. **Anal Biochem.** 308(2):343-57