

Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique bottom-up pour la quantification de l'oxydation des cystéines

Massamba Ndiaye

▶ **To cite this version:**

Massamba Ndiaye. Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique bottom-up pour la quantification de l'oxydation des cystéines. Chimie analytique. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET064 . tel-03003473

HAL Id: tel-03003473
https://pastel.hal.science/tel-03003473

Submitted on 13 Nov 2020

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.

PSL
UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris

Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique bottom-up pour la quantification de l'oxydation des cystéines

Soutenue par

Massamba Mbacké NDIAYE

Le 10 décembre 2019

Ecole doctorale n° 388

Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Spécialité :

Chimie analytique

Composition du jury :

Andrew GRIFFITHS Pr, ESPCI Paris	Président du Jury
Emmanuelle LEIZE-WAGNER DR CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
Hélène LAVANANT MC, Université de Rouen	Rapporteur
Jean MARY MC, Sorbonne Université	Examinateur
Agnès DELAUNAY-MOISAN IC, CEA Saclay	Examinateur
Joëlle VINH DR CNRS, ESPCI Paris	Directeur de thèse

ESPCI PARIS | PSL

Remerciements

Mes remerciements vont à l'endroit de Joëlle Vinh qui m'a accordé sa confiance pour ce projet de thèse. Je la remercie aussi pour son soutien, sa patience et ses conseils. J'ai beaucoup appris à ses côtés ces 3 dernières années. J'ai eu de la chance d'être tombé sur une équipe telle que le SMBP. Je pourrais citer, pour chaque membre de l'équipe, des actions qui font que je lui dois beaucoup de gratitude. Je remercie Giovanni Chiappetta pour son accompagnement. Je remercie Iman Haddad pour toute l'aide qu'elle m'a apportée. Je remercie Alexandra Emmanuel, Nicolas Eskenazi, Yann Verdier, Emmanuelle Demey, Martha Zoumpoulaki, Shakir Shakir pour cette ambiance familiale et cette solidarité.

Ce travail est dédié à ma chère mère Dado Diop, cette femme à qui je dois la vie mais aussi tout ce que je suis aujourd'hui. Je pourrais manquer de tout mais jamais de volonté quand je pense à toi

Je remercie celle qui partage ma vie, ma femme, mon amie et mon amour qui m'a soutenu et encouragé tout le long de ce projet de thèse.

Résumé/Abstract

Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique *bottom-up* pour la quantification de l'oxydation des cystéines

La protéomique *bottom-up* est l'approche la plus couramment utilisée pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse. Dans cette approche, la digestion enzymatique s'intègre dans une étape de préparation d'échantillon longue et fastidieuse. Les précautions nécessaires à l'étude des modifications post traductionnelles comme l'oxydation des cystéines introduisent des étapes supplémentaires et rendent le protocole plus complexe. Le protocole OcSILAC, développé dans notre laboratoire pour la quantification de l'oxydation des cystéines, en est une parfaite illustration. La miniaturisation du protocole OcSILAC pour le rendre moins chronophage et consommateur d'échantillon est l'objectif de mon projet de thèse.

Un dispositif microfluidique, inspiré de la méthode *FilterAided Sample Preparation* (FASP), a été développé durant ce projet. C'est un dispositif en PDMS, intégrant une membrane de filtration moléculaire en cellulose régénérée et fabriqué par photolithographie douce. Dans la littérature scientifique, la majorité des dispositifs microfluidiques dédiés à la protéomique s'arrête aux preuves de concept sur des protéines standard. La micropuce développée au cours de cette thèse a permis l'analyse d'échantillons biologiques protéiques complexes avec dix fois moins d'échantillon et un protocole huit fois moins long que les méthodes conventionnelles. Notre protocole de digestion sur puce (CFP pour *ChipFilterProteolysis*) permet d'identifier plus de protéines et plus de peptides par protéine identifiée que la méthode FASP précédemment publiée. Pour la miniaturisation complète du protocole OcSILAC, une unité d'enrichissement des peptides biotinylés a été entreprise en utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées.

Miniaturization of sample preparation for bottom-up proteomics and quantification of cysteine oxidation

Bottom-up proteomics is the most commonly used approach for protein analysis by mass spectrometry. In this approach, enzymatic digestion is one step of a long and tedious sample preparation protocol. Specific care is needed to study post-translational changes, such as cysteine oxidation, with additional steps which makes the protocol even more complex. The OcSILAC protocol, developed in our laboratory for quantifying cysteine oxidation, is a perfect illustration of this. The miniaturization of the experimental setup is an opportunity for the OcSILAC protocol to be less time and sample consuming. It is the objective of my thesis project.

A microfluidic device, inspired by the Filter Aided Sample Preparation (FASP) method, was developed during this project. It is a PDMS device, incorporating a regenerated cellulose molecular filtration membrane and manufactured by gentle photolithography. In the literature, the majority of microfluidic devices dedicated to proteomics stops at proof of concept on standard reference proteins. The microchip developed during this thesis allowed the analysis of biological complex protein samples: with ten times less sample and an eight-times shorter protocol than conventional procedures. Our *ChipFilter* Proteolysis protocol can identify more proteins and more peptides than the previously reported FASP method. For the miniaturization of the OcSILAC protocol, the development of a biotinylated peptide enrichment unit was started using avidin magnetic beads

TABLE DES MATIERES

Sommaire

Remerciements 2

Résumé/Abstract 3

Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique *bottom-up* pour la quantification de l'oxydation des cystéines 3

Miniaturization of sample preparation for bottom-up proteomics and quantification of cysteine oxidation 3

TABLE DES MATIERES 5

Valorisation 9

Publications 9

Vacations - missions doctorales 9

Communications orales 9

Posters 9

Liste des figures 10

Liste des Tableaux 13

Liste des abréviations 15

Liste des abréviations 15

Introduction Générale 17

Chapitre 1 : Généralités 19

1.1 L'analyse des protéines 19

1.1.1 Les méthodes spectrophotométriques et colorimétriques 19

1.1.2 Les méthodes immunologiques 21

1.1.3 Electrophorèse 22

1.1.4 La spectrométrie de masse 23

1.2 Contexte scientifique 23

1.3 Présentation du projet de thèse 25

Chapitre 2: La protéomique par spectrométrie de masse 27

2.1 La spectrométrie de masse 27

2.1.1 Approche *top-down* 30
2.1.2 Approche *bottom-up* 31
2.2 La quantification en spectrométrie de masse 32
2.2.1 Etalonnages internes 33
2.2.2 Marquage isotopique 34
2.2.3 La quantification sans marquage (*LabelFree)* 35
2.3 Limites et challenges de la protéomique *bottom-up* 36
2.3.1 L'étude des modifications post-traductionnelles en protéomique *bottom-up* ... 36
2.3.2 Etude des modifications post-traductionnelles par MS : Cas de OcSILAC 37
Chapitre 3 : La microfluidique 41
3.1 Ecoulement et mélange en microfluidique 42
3.1.1 Ecoulement 42
3.1.2 Mélange 43
3.1.3 Avantages et inconvénients des systèmes microfluidiques 44
3.2 La microfabrication 44
3.2.1 L'environnement 45
3.2.2 Les matériaux utilisés 46
3.2.3 Les techniques de fabrication 47
3.3Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS 49
3.3.1 Photolithographie 49
3.3.2 Réplication par moulage 52
2.3.3 Collage ou scellage 53
3.3.4 Avantages et inconvénients du PDMS 53
3.3.5 Traitement de surface 55
3.4 Couplage à la spectrométrie de masse 56
3.4.1 Couplage à une source MALDI 56
3.4.2 Couplage à une source électrospray (ESI) 57
Chapitre 4 : Applications microfluidiques en protéomique 59
4.1 Préparation de l'échantillon 60
4.2 Digestion 62
4.2.1 Digestion sur puce avec enzyme non immobilisée 63
4.2.2 Digestion sur puce avec enzyme immobilisée 63
4.3 Séparation et couplage à la spectrométrie de masse 65

Chapitre 5 : Design et fabrication d'un dispositif pour la protéomique *bottom-up* 67
5.1 Alternatives à la précipitation acide des protéines 67
5.1.1 Utilisation des phases classiques d'extraction sur phase solide (SPE) 68
5.1.2 Utilisation d'une membrane de filtration moléculaire 69
5.2 Fabrication d'un dispositif microfluidique intégrant une membrane de filtration moléculaire 72
5.2.1 Réalisation du masque 72
5.2.2 Fabrication du moule 74
5.2.3 Insertion de la membrane et assemblage 74
5.2.4 Test de rétention des protéines 76
5.2.5 Mise en œuvre du traitement de surface du PDMS 77
Chapitre 6 : Applications à l'identification des protéines 79
6.1 Installation microfluidique 79
6.1.1 Equipements 79
6.1.2 Montage microfluidique 80
6.1.3 Protocole de digestion sur puce 81
6.2 Evaluation de la cinétique et du rendement de digestion sur la BSA 82
6.2.1 Cinétique de digestion dans le *ChipFilter* 82
6.2.2. Débit d'élution nécessaire 83
6.2.3. Sensibilité de la détection des peptides de BSA dans le *ChipFilter* 84
6.2.4. Conclusion 84
6.3 Première application à un échantillon complexe : protéome de la levure 85
6.3.1 Détermination du volume d'élution 85
6.3.2 Efficacité de la digestion 86
6.3.3 Répétabilité du traitement d'échantillon sur puce 87
6.3.4 Elution au méthanol 88
6.3.5 Conclusion 90
Chapitre 7 : Application à l'étude de l'état redox des cystéines 93
7.1 Miniaturisation du traitement de l'échantillon pour l'étude redox 93
7.1.1. Contrôle de l'oxydation en conditions acides 93
7.1.2. Comparaison avec le protocole de quantification redox OcSILAC 94
7.1.3 Réduction du temps de traitement de l'échantillon 95
7.1.4 Identification et quantification 95
7.2 Vers l'intégration et l'automatisation du CPF 99

7.2.1 Montage en ligne *ChipFilter*-LC pour optimiser les transferts 99
7.2.2 Etude de la répétabilité du couplage *ChipFilter*-LC 100
7.2.3 Intégration de la lyse cellulaire 101
7.2.4 Enrichissement en ligne 103
7.3 Application biologique 103
Conclusion générale 109
Annexe 1 : La spectrométrie de masse par électrospray couplée à la chromatographie liquide 113
A1.1 Chromatographie en phase liquide : 113
A1.2 ESI : Ionisation par électrospray 114
A1.3 Analyseurs de masse : 115
Annexe 2 : Protocoles expérimentaux 117
A2.1 : Séparation en nano-LC 117
A2.2 Acquisition MS 117
A2.3 Recherche avec le logiciel MaxQuant 117
Annexe 3 : Détails sur la microfabrication et manipulation microfluidique 119
A3.1 Design et impression des motifs 119
A3.2 Fabrication du moule 119
Annexe 4 : Echantillon biologique 120
A4.1 Préparation du milieu cellulaire 120
A4.2 Marquage isotopique 120
Annexe 5 :Article 1 123

Valorisation

Publications

- Article 1 (Annexe 5) : On-chip sample preparation using a ChipFilter coupled to NanoLC-MS/MS for bottom-up proteomics - Soumis - Journal of Proteome Research

- Article 2 (Encours de redaction) : On-chip Redoxomic, a completely miniaturized protocol for the quantification of cystein oxidation - Journal of the American Society for Mass Spectrometry

Vacations - missions doctorales

- Septembre 2017 à Janvier 2018 et 2019 (50h): Monitorat TP 2ème année cycle d'ingénieur, ESPCI, Chimie Analytique, Chromatographie ionique

Communications orales

- Mars 2017 : Participations aux XXIIèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, Trélon

- Octobre 2017 : Congrès SMMAP: Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique, Paris

- Mars 2018 : Ndiaye Massamba Mbacké – Giovanni Chiappetta – Joelle Vinh. Miniaturization of the OcSILAC protocol: How to avoid the protein precipitation steps ?XXIIIèmesJournées du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse Montpellier,

- Avril 2018 : Ndiaye Massamba Mbacké – Giovanni Chiappetta – Joelle Vinh. Miniaturization of the OcSILAC protocol: How to avoid the protein precipitation steps ?Ecole thématique FT -MS (Spectrométrie de Masse par transformée de Fourrier), Cabourg, France

Posters

- Juin 2019 : Massamba NDIAYE, Giovanni Chiappetta, Joëlle Vinh. On-chip digestion coupled to nanoLC MS/MS Conférence annuelle de la société américaine de spectrométrie de masse (ASMS)- Atlanta - Georgia - USA

- Juillet 2019 : Massamba NDIAYE, Giovanni Chiappetta, Joëlle Vinh. On-chip digestion coupled to nanoLC MS/MS Congrès mondial de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) Palais des congrès - Paris

- Septembre 2019 : Massamba NDIAYE, Giovanni Chiappetta, Joëlle Vinh On-chip digestion coupled to nanoLC MS/MS Congrès SMMAP: Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique,- Strasbourg, France

Liste des figures

Figure 1 : ELISA direct (Schéma adapté de biocompare.com) 21
Figure 2 : Gel d'électrophorèse 2D, séparation des protéines selon leur point isoélectrique et leur masse 22
Figure 3 : Les deux principales approches en analyse des protéines par spectrométrie de masse 28
Figure 4 : Nomenclature des fragments [124] 29
Figure 5 : Protocole OcSILAC 38
Figure 6 : Masque optique imprimé sur un film photosensible 50
Figure 7 : Etalement de la résine photosensible sur le wafer (*Spin-Coating*) 51
Figure 8 : Exposition de la résine photosensible à la lumière UV à travers le masque optique 51
Figure 9 : Wafer et couche de résine après développement 52
Figure 10 : Schéma de la réplication par moulage 53
Figure 11 : Scellage irréversible de 2 morceaux de PDMS après exposition au plasma à oxygène 53
Figure 12 : Approches de couplage de dispositifs microfluidiques à la MS par électrospray 57
Figure 13 : Schéma de principe d'une microchip en protéomique 60
Figure 14 : Réseaux de piliers dans un canal microfluidiques pour le piégeage et la lyse d'une cellule[72] 61
Figure 15 : Schéma du Compact CD permettant de réaliser mécanique grâce au mouvement des billes aimantés en fonction de la rotation et du champ magnétique[74] 61
Figure 16 : Dispositif de microfluidique permettant de digérer séparément et en ligne des protéines issues d'une séparation chromatographie[80] 63
Figure 17 : Exemples de dispositifs microfluidiques intégrant des billes fonctionnalisées[87] 64
Figure18 : Test de rétention échantillon standard BSA 68
Figure 19 : Distribution des intensités moyennes des peptides identifiés 70
Figure 20 : Comparaison du nombre de peptides identifiés (organisés par gamme de masse) 71
Figure 21 : Nombre de peptides identifiés suite au rinçage (méthanol 70%) des Microcon® après élution, Comparaison avec le nombre de peptide identifié dans l'élution 72
Figure 22 : Masque d'une chambre de réaction de 4 mm de diamètre avec les pylônes de 150 µm de diamètre 73
Figure 23 : Masques pour la réalisation du *ChipFilter* 73
Figure 24 : Figure : Assemblage des 2 chambres de réaction et de la membrane 75
Figure 25 : Test de rétention de la BSA dans la puce (Dosage de la BSA dans un blanc, un échantillon d'1 mg/mL, une solution filtrée et la solution de récupération par percolation inverse) (Absorption UV à 280 nm 77
Figure 26 : Montage pour l'actuation du ChipFilter 80
Figure 27 : Montage microfluidique mis en place pour la digestion sur puce 80
Figure 28 : Principe du fonctionnement du *ChipFilter* 82
Figure 29 : Pourcentage de couverture de la BSA par traitement de protéolyse sur *ChipFilter* 83

Figure 30 : Pourcentage couverture de la BSA obtenus dans différents volumes d'élution (15µL, 2µL/minute dans le *ChipFilter* avec le même traitement sur puce (300 ng de BSA).....83
Figure 31 : Couverture de séquence de la BSA obtenue en fonction de la quantité de protéine traitée.84
Figure 32 : Nombre de peptides identifiés dans chaque phase recueillie et proportion de ceux portant 0, 1 ou 2 sites de coupure manqués 86
Figure 33 :Diagramme de Venn A) Comparaison des protéines identifiées dans les phases pré-élution(Ajout trypsine + digestion)/Elution (Elution 1+ 2+3) et B) comparaison des protéines identifiées dans les différentes élutions 86
Figure 34 : *MultiScatterplot* de 3 traitements sur puce 88
Figure 35 : Diagramme de Venn : Comparaison dans la phase élution et dans la solution de rinçage au méthanol 70%des protéines (A) et des peptides (B) identifiées.....89
Figure 36 : Distribution de l'index d'hydrophobicité des peptides exclusivement identifiés pendant l'élution (Bleu) et avec le rinçage au méthanol (Rouge) 90
Figure 37 : Comparatif du nombre de protéines identifiées en fonction de la couverture de séquence exprimée en nombre de peptides identifiés sur CPF et lors d'une analyse comparative entre la méthode FASP la précipitation acide TCA pour le rinçage des protéines(Extrait protéique de levure). 91
Figure 38 : Comparaison de la durée des différentes étapes de préparation d'échantillon par *ChipFilter* (CPF) et par précipitation acide (TCA) 95
Figure 39 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les fractions enrichies (Bound) et non enrichies (UnBound) du traitement sur puce à gauche (Chip) et classique (TCA) droite 96
Figure 40 : Comparaison des protéines identifiées dans les fractions enrichie et non enrichie avec les approches classique (TCA) et traitement sur puce (CFP) 97
Figure 41: Comparaison des peptides portant une cystéine identifiés dans chaque approche au total (gauche) et uniquement dans la fraction enrichie (droite) 97
Figure 42 : Quantification Label Free de la fraction enrichie - Distribution des log2 des ratios d'abondance des protéines identifiées selon les 2 méthodes ChipFilter/Précipitation TCA; n=3..98
Figure 43 : Quantification *Label Free* de la fraction non enrichie : Distribution des log2 des ratios d'abondance des protéines identifiées selon les 2 méthodes *ChipFilter*/Précipitation TCA ; n=3 .99
Figure 44 : Couplage du *ChipFilter* à une chaine de chromatographie liquide pour le piégeage en ligne des peptides générés par la digestion dans le *ChipFilter* 100
Figure 45 : MultiScatter Plot de 3 analyses d'1 µg d'échantillon sur le *ChipFilter* 101
Figure 46 : Proportion des peptides portant 0, 1 ou 2 sites de coupure.....103
Figure 47 Echantillon contrôle :comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).....105
Figure 48 : Echantillon LPS : comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).....106

Figure 49 : Echantillon LPS_Mn1 :comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).....107
Figure 50 : Coupe verticale du *ChipFilter* avec les dimensions visées durant la microfabrication.....119
Figure 51 : Marquage métaboliqueet préparation des cultures cellulaires. B.Modèle cellulairedu stress oxydant et d'inflammation (lignée HT29-MD2). C. Mime de Superoxide Dismutase, Mn1 121

Liste des Tableaux

Tableau 1: Méthodes colorimétriques pour le dosage des protéines 20
Tableau 2: Les principales méthodes de détection sur gel 22
Tableau 3: Classification des salles propres en fonction de la taille des particules et leur nombre [51] 46
Tableau 4 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du PDMS (PolyDimethylSiloxane) 54
Tableau 5 : Approches de couplage des dispositifs microfluidiques à la spectrométrie de masse 58
Tableau 6 : Dispositifs microfluidiques dédiés à la digestion et basés sur l'immobilisation de l'enzyme . 64
Tableau 7 : Protocole de digestion sur puce 81
Tableau 8 : Description de l'élution séquentielle 85
Tableau 9 : Protocole de traitement sur puce pour l'étude redox 94
Tableau 10 : Nombre de protéines et peptides identifiés par les approches de traitement sur puce et classiques 96
Tableau 11 : Les analyseurs de masse les plus utilisés en protéomique 115
Tableau 12 : Nombre de cellules en milieuSILAC lourd (Lys8, Arg6) et léger (lignée cellulaire HT29-MD2 P45, milieu SILAC lourd et léger P8) en 4 conditions différentes (incubation de 6 heures) 120

Liste des abréviations

Liste des abréviations

Dans ce manuscrit nous avons pris le parti d'employer les abréviations anglaises en usage.

ABC	*Ammonium BiCarbonate*	bicarbonate d'ammonium
ADN		Acide DésoxyriboNucléique
AGC	*Automated Gain Control*	*Contrôle Automatique du Gain*
API	*Atmospheric Pressure Ionisation*	*Ionisation à pression atmosphérique*
ARNm		acide ribonucléique messager
AUC	*Area Under Curve*	*Aire sous la courbe*
Biotin-HPDP		N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide
BSA	*Bovin Serum Albumin*	Albumine de sérumbovin
C18	*octadecyl carbon chain (bonded silica)*	*chaineoctadécyle*
C4	*butyl group (bonded silica)*	chainebutyle
CAD	*Collisionally Activated Dissociation*	
CFP	*ChipFilter Proteolysis*	
DDA	*Data-Dependant Acquisition*	
DIA	*Data Independant Acquisition*	
DMF		diméthylformamide
dpi	*dot per inch*	densité de points sur l'image imprimée en points par pouce
DTT		DiThioThréitol
ECD	*Electron Capture Dissociation*	Dissociation par capture d'électron
EIA	*Enzyme ImmunoAssay*	dosage immuno-enzymatique
ELISA	*Enzyme LinkedImmunoSorbentAssay*	dosage immuno-enzymatique sur support solide
ESI	*Electrospray Ionization*	
ETD	*Electron Transfert Dissociation*,	dissociation par transfert d'électron
FASP	FilterAided Sample Preparation	
FTICR	*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*	
gel 2D	bidimensional gel electrophoresis	électrophorèse bidimensionnelle sur gel
HCD	*Higher Energy Collision Dissociation,*	dissociation induite par collision à plus haute énergie
HGP	*Human Genome Project*	projet du génome humain
HPDP-WS	*Biotin-HPDP Water soluble*	Biotin-HPDP soluble dans l'eau
IAM		iodoacétamide
ICAT	*Isotope Coded Affinity Tag*	
iPAD	*Integrated ProteomeAnalysisDevice*	
IPGG		Institut Pierre Gilles de Gennes
ISO	*International Organization for Standardization*, du grec iso (égal)	
ITRAQ	*isobaric tag for relative and absolute quantification*	

KOH	*Potassium hydroxide*	hydroxyde de potassium
LC	*Liquid Chromatography*	chromatographie en phase liquide
LIT	Linear Ion Trap	trappe d'ion linéaires
LOQ	*Limit Of Quantification*	limite de quantification
m/z	*mass-to-charge ratio*	rapport masse sur charge
MALDI	*Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*,	ionisation laser assisté par une matrice
MCX	*Mixed-mode, strong Cation-eXchange, reversed-phase*	
MS	*Mass Spectrometry*	spectrométrie de masse
MS/MS		Spectrométrie de masse tandem
nanoLC	nano Liquid Chromatography	nanochromatographie en phase liquide
NEM		N-EthylMaléimide
PC		polycarbonate
PDMS		polydiméthylpolysiloxane ou diméthicone
PET		polyethylèneterephtalate
PMMA		polyméthylmétacrylate
PRM	*Parallel Reaction Monitoring*	
PSO_2H		Groupe sulfinique
PSO_3H		Groupe sulfonique
PSOH		Groupe sulfénique
PTFE		polytétrafluoroéthylène
PTM	*Post-Translational Modification*	*Modification post-traductionnelle*
PVA	*PolyVinylAlcohol*	alcool polyvinylique
PVC	PolyVinyl Chloride	polychlorure de vinyle
ROS	*ReactiveOxigenSpecies*	dérivés réactifs de l'oxygène
SCX	*Strong Cation eXchange*	échange de cations forts
SDS	*Sodium DodecylSulfate*	dodécylsulfate de sodium ou laurylsulfate de sodium
SILAC	Stable Isotope Labeling by amino-acid in cell culture	
SPE	*Solid Phase Extraction*	extraction sur phase solide
SRM	*Single Reaction Monitoring*	
TAS/µTAS	Total Analysis System	
TCA	*Trichloroacetic Acid*	acidetrichloroacétique
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	
TMT	*Tandem Mass Tag*	
TOF	*Time Of Flight*	temps de vol
UV	Ultraviolet	

Introduction Générale

La cellule est la plus petite unité biologique mais présente un fonctionnement complexe. Ces dernières années, de grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension de son fonctionnement. Chaque individu est caractérisé par son propre code génétique via l'ADN. L'ADN est ensuite transcrit en ARN qui à son tour va donner l'ARNm. Ce dernier, une fois dans le cytoplasme déclenche la synthèse d'une séquence d'acides aminés donnant ainsi les protéines. Ces protéines font ensuite l'objet d'une étape de maturation et de modifications connues sous le nom de modifications post-traductionnelles (PTMs : *Post-TranslationalModifications*). Le projet du génome humain (*Human Genome Project* : HGP) lancé en 1990 a permis le séquençage complet du génome humain en 2003[1] . Ce projet a permis de savoir que l'humain possède entre 20 000 et 25 000 gènes codant pour des protéines (International Human Genome Sequencing Consortium). A travers les PTMs, il a été montré qu'un seul gène peut coder pour plusieurs protéines fonctionnelles modifiées ou maturées, ou encore protéoformes[2]. Par conséquence, le nombre de protéoformes est largement supérieur au nombre de gènes. L'identité et la quantité des protéines exprimées par une cellule changent en fonction de son état physiologique et de facteurs extérieurs. En permettant une analyse qualitative et quantitative des protéines d'un organisme dans des états physiologiques sain et malade, la protéomique peut être utilisée dans la recherche biomédicale, pharmaceutique et de manière générale dans la compréhension des processus biologiques.

Les techniques mises en œuvre pour l'analyse des protéines ont progressivement évolué en répondant aux questions en biologie, recherche médicale et en pharmacie. La complexité des échantillons protéiques a toujours été et reste un challenge analytique. Des avancées significatives ont été réalisées, améliorant la quantité et la qualité des informations obtenues à partir d'échantillons protéiques. L'introduction de la séparation sur gel 2D et de la spectrométrie de masse (MS) sont parmi les progrès les plus significatifs. La spectrométrie de masse est aujourd'hui considérée comme la technique la plus informative dans l'analyse des protéines[124]. Les protocoles d'analyse des protéines par spectrométrie de masse peuvent être divisés en 4 parties que sont la préparation d'échantillon, la séparation des peptides ou protéines, l'analyse en MS et le traitement des données. Les travaux de cette thèse concernent principalement la préparation d'échantillon. Elle est caractérisée par un certain nombre de challenges. La perte d'échantillon, les risques de modifications durant le traitement et le temps nécessaire sont les principaux inconvénients des protocoles d'analyses des protéines en MS *bottom-up* en l'occurrence[98]. La miniaturisation est aujourd'hui considérée comme l'une des pistes les plus sérieuses pour améliorer ces protocoles. Il est en effet possible, grâce à la miniaturisation, d'intégrer et d'automatiser l'ensemble des étapes de la préparation d'échantillon des protocoles d'analyses des protéines par MS[11]. Ceci permettrait d'augmenter la sensibilité et de réduire les risques de modification d'échantillon. Une plus grande sensibilité permettrait d'appliquer ces protocoles à de très petites quantités d'échantillon. Par exemple, l'analyse protéomique sur une cellule unique apporterait des

informations sur le microenvironnement des tissus, la signalisation cellulaire, l'hétérogénéité cellulaire...[78] L'automatisation réduirait considérablement les risques de modification d'échantillon. La miniaturisation offre aussi un gain de temps et de moyens avec des réactions plus rapides et une plus faible quantité de réactifs et d'échantillons nécessaires.

Ce travail de thèse s'est fixé pour objectif la miniaturisation d'un protocole d'analyse quantitative de l'état redox des cystéines appelé OcSILAC (*Oxidized Cysteine, Stable Isotope Labeling Amino acids in Cell Culture,* Thèse Shakir SHAKIR, 2015*)*. La miniaturisation de ce protocole permettrait tout d'abord de l'appliquer à de faibles quantités d'échantillon, puis de réduire les risques de modifications accidentelles de l'échantillon car les cystéines sont très sensibles aux oxydations artéfactuelles. Enfin, elle permettra aussi de réduire le temps nécessaire à la mise en œuvre de ce protocole. Deux principales approches ont été envisagées et l'utilisation d'une membrane de filtration moléculaire intégrée dans un dispositif microfluidique est celle qui a été retenue. Ce manuscrit présente le travail réalisé durant cette thèse. Il comprend 7chapitres et peut être divisé en deux parties. La première est un résumé bibliographique sur la protéomique par spectrométrie de masse, la microfluidique et les applications de la microfluidique en protéomique (Chapitres 2, 3 et 4). La deuxième partie concerne les résultats et discussions avec la partie conception et fabrication du dispositif microfluidique (Chapitre 5) et son utilisation (Chapitres 6 et 7). Enfin, ce manuscrit s'achève sur les conclusions et perspectives pour la suite de ces études.

Chapitre 1 : Généralités

1.1 L'analyse des protéines

Le PROTEOME désigne l'ensemble des PROtéines exprimées par le génOME d'une cellule. Ce terme a été proposé en 1995 par Wilkins et fait écho à celui de génome[3]. C'est un produit du génome mais contrairement à ce dernier qui est unique et statique (en dehors de quelques rares mutations), le protéome évolue selon l'état physiologique de l'organisme et n'est pas identique d'un tissu à un autre d'un même organisme. L'étude du protéome est appelée protéomique. Pendant longtemps, l'analyse des protéines s'est limitée à la détermination de la quantité totale contenue dans un échantillon grâce généralement grâce à des techniques de dosage colorimétriques ou spectrophotométriques[7]. L'identification et la quantification des protéines sont devenues possibles avec l'introduction de l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel (gel 2D) et les méthodes d'analyse immunologique ou colorimétrique. La séquence primaire des polypeptides d'intérêt pouvait être déterminée par des méthodes de séquençage comme le séquençage d'Edman[4]. La structure secondaire des protéines purifiées peut être étudiée par spectroscopie des rayons X, Raman ou RMN. L'introduction de la spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines s'est faite plus tard avec l'apparition de techniques d'ionisation adaptées aux biomolécules, comme l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) sont celles qui ont connu le plus de succès. La MS est très rapidement devenue une technique de choix pour l'analyse des protéines car elle permet d'accéder à la séquence en acides aminés pour l'identification, la quantification et la caractérisation des modifications post-traductionnelles des protéines qu'elles soient purifiées, enrichies ou dans un échantillon protéique complexe. Par définition, la protéomique est donc l'étude qualitative et quantitative du protéome d'une cellule à un moment donné et dans des conditions données[5].

1.1.1 Les méthodes spectrophotométriques et colorimétriques

Ces méthodes permettent de déterminer la concentration totale en protéines dans un échantillon. Les méthodes spectrophotométriques sont basées sur la spectroscopie UV et visible. En UV, les protéines peuvent être dosées à 280 et à 205 nm. La méthode à 280 nm est basée sur l'absorption UV des acides aminés aromatiques, la tyrosine et le tryptophane. Elle offre une gamme de mesure de 20 à 3000 µg/mL. Cette méthode a été notamment adaptée dans un appareil appelé Nanodrop1000 (ThermoFisher). Le nanodrop1000, avec sa fonction A280, permet de mesurer les concentrations de protéine purifiée. Par exemple, avec un trajet optique de 0.2 mm, il permet de mesurer la concentration de protéine purifiée sans courbe d'étalonnage avec une gamme de mesure allant de 0.1 à 100 mg/mL. Cet appareil a été utilisé durant cette étude pour déterminer les concentrations de BSA (Bovine Serum Albumin). La concentration en BSA est calculée en utilisant un coefficient d'absorption de 6,7 (BSA, solution de 1% : 10mg/mL, longueur d'onde = 280 nm).

La détermination de la concentration totale en protéine à 205 nm est quant à elle basée sur l'absorption de la lumière à cette longueur d'onde des liaisons peptidiques. Sa limite de quantification (LOQ) s'établit à 1 µg/mL. Ces 2 méthodes présentent l'avantage d'être rapides et simples à mettre en œuvre. La méthode à 280 nm est moins sensible mais elle est toutefois la plus utilisée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est aussi moins affectée par les interférents[6]. La détermination des protéines peut aussi se faire en mesurant la fluorescence naturelle des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine). Cette technique permet de déterminer des gammes concentration entre 5 et 50 µg/mL.

Les méthodes colorimétriques sont basées sur l'utilisation d'un composé chimique qui réagit avec les protéines afin de former des complexes colorés. A la fin de la réaction, la mesure de l'intensité de la coloration de la solution permettra de calculer la concentration en protéine. Il existe plusieurs méthodes basées sur ce principe, les plus connues sont les méthodes de Biuret, Lowry, Bradford et BCA (*BiCinchoninic Acid Assay*) (Tableau 1). Ces méthodes ont fait l'objet de publications qui comptent parmi les publications les plus citées. Les méthodes les plus utilisées pour l'analyse d'échantillons protéiques complexes sont les méthodes de Lowry, Bradford et BCA[117]. Ces méthodes seront décrites plus en détails dans les paragraphes suivants.

Tableau 1: Méthodes colorimétriques pour le dosage des protéines

Méthodes	Réactifs	Longueur d'onde	Gamme d'analyse
Biuret	Cu^{2+}, pH basique	540	5-160 mg/mL
Lowry	Cu^{2+},Folin Ciocalteu, pH basique	750	1-1500 mg/mL
Bradford	Bleu de Coomassie g250, pH basique	595	100-2000 µg/mL
BCA	Cu^{2+}/BCA/Milieu alcalin	562	20-2000 µg/mL

La méthode de Lowry est basée sur deux réactions différentes. La première est la formation d'un complexe d'ions de cuivre avec des liaisons amides donnant du cuivre réduit dans une solution alcaline. La deuxième est la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate) par les complexes cuivre-amide mais aussi par les résidus tyrosine et tryptophane. Le réactif de Folin-Ciocalteu une fois réduit devient détectable par mesure spectrophotométrique entre 500 et 750 nm[7].

La méthode de Bradford est basée sur la liaison entre le bleu de Coomassie (colorant G-250 CBBG) aux résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine et phénylalanine des protéines. C'est une méthode populaire du fait de sa simplicité, rapidité, de la stabilité du colorant et de son bas coût[8].

La méthode BCA est similaire avec la méthode de Lowry. Elles sont toutes les 2 basées sur la formation d'un complexe de cuivre. Le réactif BCA (*BiCinchoninic Acid Assay*) remplace le réactif de Folin-Ciocalteu dans la méthode de Lowry. La méthode BCA présente par ailleurs plus de tolérance aux interférents comme les détergents non ioniques[118]. Le réactif BCA forme un complexe chromophore avec les ions Cu^{+} présentant une force absorbance à 562 nm. La méthode est très utilisée de la stabilité du complexe formé et de sa tolérance aux interférents.

1.1.2 Les méthodes immunologiques

Les tests immunologiques ont connu un grand essor après le développement indépendant et presque simultané de deux méthodes : l'EIA (*Enzyme ImmunoAssay*) en Hollande par Anton Schuurs et Bauke Weemen[9] et l'ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) par Peter Perlmann et Eva Engvall à l'université de Stockholm[10]. Ces techniques, basées sur le principe de reconnaissance antigène-anticorps, sont très adaptées à l'analyse qualitative et quantitative ciblée de protéine (antigène ou anticorps) dans des échantillons complexes (plasma, urine...). L'anticorps est le composant le plus important dans une méthode immunologique car il apporte la grande spécificité et la sensibilité, envers l'analyte cible, qui caractérisent ces méthodes. La génération et la purification des anticorps constituent par ailleurs une grande étape préalable à l'analyse d'une protéine par des méthodes immunologiques. L'ELISA est la méthode immunologique la plus utilisée. Elle est appliquée à des échantillons biologiques, industriels ou environnementaux. L'utilisation répandue de la méthode ELISA s'explique par la grande sensibilité et spécificité de cette méthode mais aussi par un haut débit d'analyse[125]. Il plusieurs types de méthode ELISA dont le plus simple à mettre en œuvre est appelé ELISA direct (Figure 1)

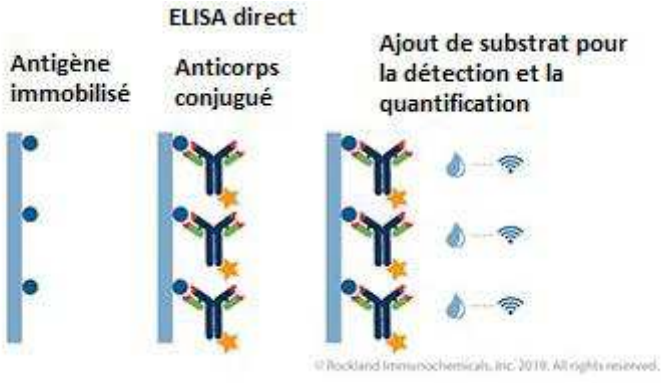


Figure 1 : ELISA direct (Schéma adapté de biocompare.com)

Cependant, pour qu'une protéine puisse être analysée par une méthode immunologique, il faut obligatoirement avoir à disposition un antigène ou anticorps réciproque très spécifique, ce qui limite le nombre de protéines que l'on peut analyser par cette méthode. Par ailleurs, les méthodes immunologiques souffrent d'interférences, de réactivité croisée et de difficultés à différencier les protéoformes[10].

1.1.3 Electrophorèse

L'électrophorèse sur gel est une technique séparative basée sur un support appelé matrice de séparation généralement composée de polyacrylamide, ou acrylamide réticulé. La séparation des protéines peut se faire selon un seul paramètre (généralement la masse moléculaire, électrophorèse monodimensionnelle). Elle peut aussi être basée sur deux paramètres (masse apparente et point isoélectrique, en électrophorèse bidimensionnelle, Figure 2). Publiée en 1975, l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique et le poids moléculaire par électrophorèse en présence de sodium dodecylsulfate (SDS). Une résolution de plus de 1000 protéines est mentionnée et une capacité de séparation pouvant atteindre 5000 protéines[12], ce qui en fait une technique très adaptée aux échantillons complexes.

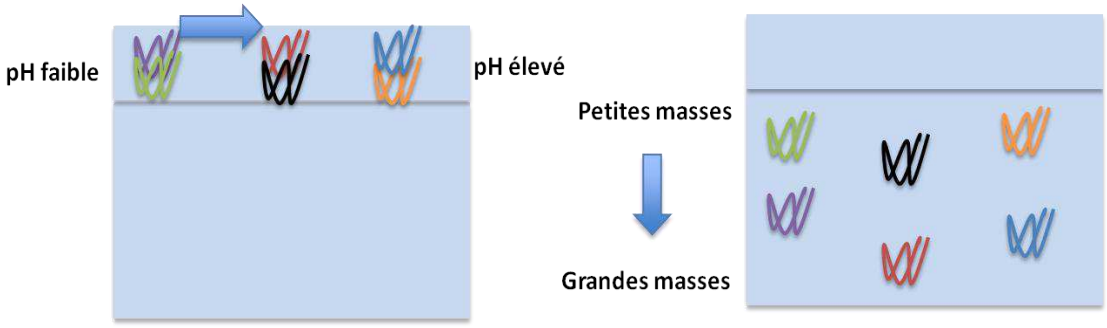


Figure 2 : Gel d'électrophorèse 2D, séparation des protéines selon leur point isoélectrique et leur masse

Après la séparation, les protéines sont fixées et puis visualisées sur les gels grâce à des techniques de coloration dont les plus utilisées sont la coloration au bleu de Coomassie, la coloration négative zinc-Imidazole, la coloration à l'argent[13] (Tableau 2). Si la technique de coloration utilisée est compatible avec la MS, les spots sont découpés et puis analysés par MS.

Tableau 2: Les principales méthodes de détection sur gel

Technique	Avantages	Inconvénients
Coloration au Bleu de Coomassie	Bas coût, compatibilité avec la MS	Sensibilité insuffisante
Coloration négative (zinc-Imidazole)	Rapidité, simplicité, compatible avec la MS	Gamme dynamique restreinte
Coloration à l'argent	Sensibilité	Reproductibilité, complexe et laborieux

Les points faibles de cette méthode sont caractérisés par l'exigence d'une grande expertise des manipulateurs, pour éviter les risques d'obtenir une faible reproductibilité, une détection difficile des protéines présentes en faible quantité ainsi que les protéines ayant un point isoélectrique trop faible ou très élevé (inférieur à 4 ou supérieur à 12). La

2D PAGE est aussi caractérisée par une faible gamme dynamique. La coloration à l'argent, par exemple, présente une sensibilité de l'ordre du nanogramme et une faible gamme dynamique (~10^1)[126].

1.1.4 La spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est un appareil permettant de déterminer le rapport masse sur charge d'une molécule ionisée à l'état gazeux. Il existe différents types de spectromètres de masse mais tous sont constitués de 3 éléments principaux qui sont la source d'ionisation, le ou les analyseur(s) de masse et le détecteur. Les molécules ionisées en phase gazeuse dans la source d'ionisation sont transférées dans l'analyseur qui les sépare en fonction de leur rapport masse sur charge avant de les envoyer vers le détecteur. Depuis l'introduction des techniques d'ionisation douces à savoir l'ESI (ionisation par *electrospray*) et le MALDI (Ionisation laser assistée par une matrice) capables d'ioniser des biomolécules fragiles en les gardant intactes, la spectrométrie de masse (MS pour *Mass Spectrometry*) est devenue une technique incontournable dans le domaine de la protéomique. En effet, la MS présente entres autres avantages une grande sensibilité et rapidité d'analyse, sa facilité d'automatisation ainsi que sa compatibilité avec des techniques de séparation comme la chromatographie liquide. La MS permet l'identification et la quantification des protéines et la caractérisation des modifications post-traductionnelles (PTM pour *Post-Translational Modification*). Les protéines sont analysées en MS selon 2 approches principales : *top-down* et *bottom-up*. Pour leur caractérisation en MS par l'approche *bottom-up*, les protéines sont identifiées à partir des peptides issus de leur digestion alors qu'en mode *top-down*, c'est la protéine entière qui est ionisée et introduite dans le spectromètre de masse. Ces différentes approches seront d'avantages détaillées dans le Chapitre 2: La protéomique par spectrométrie de masse.

L'étude qualitative et quantitative des PTMs dans un protéome est possible par MS. Par l'approche *bottom-up*, cette étude passe souvent par un marquage différentiel des modifications cibles avec des isotopes stables[14]. Cependant, il est nécessaire de passer par une étape d'enrichissement si les PTMs cibles sont à une faible concentration.

1.2 Contexte scientifique

Ces dernières années, les techniques analytiques mises en œuvre dans l'analyse des protéines ont beaucoup évolué. De techniques analytiques ne déterminant que la quantité totale des protéines dans un échantillon, on a aujourd'hui la capacité d'identifier jusqu'à 4000 protéines dans un échantillon complexe en une seule analyse LC-MS/MS voire d'en quantifier une partie[15]. Ces avancées offrent de nouveaux outils à la recherche biomédicale notamment. Ces outils pourraient en effet améliorer le diagnostic médical, le suivi d'un traitement et le développement de nouveaux traitements. Cependant, les échantillons biologiques sont complexes et leur analyse aussi. Les protéines y sont présentes avec une grande diversité à des concentrations variant jusqu'à 10 ordres de grandeur[16]. Dans le plasma, par exemple, le cytokine interleukine-6 est une protéine impliquée dans la signalisation. Elle est mesurée à des niveaux de concentrations de

l'ordre du pg/mL. Tandis que l'albumine de sérum humain, protéine impliquée dans le transport, est mesurée à des concentrations de l'ordre du dizaine de mg/mL[127]. Il faut aussi noter que les protéines spécifiques à un état physiologique sont généralement disponibles à de faibles concentrations. Par ailleurs, la quantification des protéines est aujourd'hui nécessaire à une meilleure compréhension des processus biologiques. La quantification de ces protéines nécessite une mesure avec un rapport signal-sur-bruit plus élevé que ce qui est utile pour une simple identification. L'analyse de ces protéines, d'une grande importance dans la recherche clinique par exemple[17], nécessite des techniques analytiques très performantes.

La technique la plus utilisée pour l'analyse des protéines sans *a priori* est aujourd'hui la spectrométrie de masse. Elle permet en effet l'identification, la quantification et la caractérisation des PTMs d'un nombre important de protéines en une seule analyse. Cependant, ces précieuses informations obtenues par MS exigent parfois une longue et fastidieuse préparation des échantillons, la nécessité d'utiliser une grande quantité d'échantillon pour des rendements modestes ainsi que l'expertise d'un opérateur pour la réalisation de toutes ces étapes préalables de façon robuste. Dans ce cadre, la miniaturisation présente un certain nombre d'avantages par rapport aux systèmes classiques. Elle permet de réduire la consommation en échantillon et la durée des protocoles d'analyse. Par ailleurs, la miniaturisation peut permettre l'intégration et l'automatisation des étapes de préparation d'échantillon, ce qui favoriserait les approches de protéomique en simplifiant les étapes de préparation et améliorerait encore la démocratisation de la protéomique. La miniaturisation semble donc très utile pour les protocoles d'analyse des protéines par MS et plus encore pour la caractérisation des PTMs des protéines. En effet, l'étude des PTMs par *bottom-up* passe généralement par des étapes de marquage et d'enrichissement qui viennent s'ajouter aux protocoles classiques. C'est le cas des études menées au laboratoire en rédoxomique pour l'étude de l'oxydation des protéines. Pour pouvoir travailler avec moins d'échantillon, exécuter le protocole en un temps plus court et le rendre plus robuste en évitant les oxydations artéfactuelles, il est très prometteur d'avoir recours à la miniaturisation.

La miniaturisation a en effet permis des révolutions sans précédent dans le domaine de l'électronique. Les procédés de fabrication qui ont mené à la miniaturisation des dispositifs électroniques ont ensuite été transposés à la biologie, à la chimie[18]. Puis, des techniques de microfabrication spécifiques ont été élaborées pour la miniaturisation dans le domaine des sciences expérimentales. Ce qui a permis le développement de concepts de laboratoire sur puce (*lab-on-chip*)[17], de micro-systèmes d'analyse totale (µTAS)[19], d'organe sur puce (*Organ-on-a-chip*)[20]. L'intérêt des sciences expérimentales à la miniaturisation a donné naissance à la microfluidique. Définie comme étant la science qui traite des écoulements de liquide dans des canaux de taille micrométrique, la microfluidique est aussi considérée comme une technologie car elle englobe les techniques de microfabrication héritées de l'industrie électronique mais adaptées aux sciences expérimentales[21]. La miniaturisation a eu un impact considérable sur le séquençage d'ADN[22]. La protéomique n'échappe pas à cet intérêt vus les avantages que

pourraient avoir la miniaturisation sur l'analyse des protéines. Cependant, la protéomique est toujours à la recherche d'un dispositif qui va révolutionner le séquençage des peptides ou protéines en simplifiant les protocoles de préparation d'échantillon, de séparation et de détection. Il faut noter que le séquençage des protéines est plus complexe que celle de l'ADN ou de l'ARN. Il est en effet difficile d'imaginer, vu le grand nombre d'acide aminé (20) pouvant entrer dans la séquence d'une protéine, un mode de détection intégrée à une micropuce capable de séquencer un millier de protéines sans *a priori*. Cependant, il est tout à fait possible de miniaturiser toute la partie de préparation d'échantillon.

1.3 Présentation du projet de thèse

L'objectif de cette thèse est le développement d'un dispositif microfluidique proposant une miniaturisation de toutes les étapes de la préparation d'échantillon lors de l'analyse des protéines par l'approche *bottom-up*. Dans une première étape le dispositif microfluidique devra permettre la miniaturisation d'un protocole *bottom-up* appliqué à un échantillon complexe pour la caractérisation des modifications post-traductionnelles. Puis le projet vise à la miniaturisation du protocole OcSILAC (Shakir SHAKIR, 2015, Manuscrit de thèse) développé au laboratoire pour la quantification du niveau d'oxydation des cystéines dans le protéome. L'étude de l'oxydation des cystéines est complexe du fait de la grande réactivité des groupements thiols, du caractère labile de certaines modifications de la cystéine (-S-OH, -S-S-, -S-NO) et de la faible concentration des cystéines oxydées. Pour prendre en compte ces difficultés, le protocole OcSILAC inclut plusieurs précipitations acides des protéines dont le but est de contrôler la réactivité des thiols et d'éviter les réactions croisées. Il comprend aussi des étapes de marquage et d'enrichissement des cystéines oxydées de sorte à mieux les caractériser malgré leur faible concentration dans l'échantillon. De plus l'étape de quantification est une étape de quantification relative, c'est-à-dire que celle-ci englobe deux problématiques : tout d'abord comparer l'état d'oxydation de deux échantillons entre eux, puis aussi comparer les abondances des divers états d'oxydation au sein d'un même échantillon. Cette deuxième problématique ne peut se faire par spectrométrie de masse qu'en comparant des espèces moléculaires comparables. C'est pourquoi, la spectrométrie de masse n'étant pas une méthode quantitative *per se*, il faut donc concevoir une stratégie pour pallier à cette limitation. Pour s'affranchir du biais principal de variation de l'efficacité d'ionisation et de détection de deux espèces moléculaires différentes, la stratégie adoptée ici est de résoudre l'ensemble du système à des espèces moléculairement semblables mais avec une composition isotopique différente et maitrisée. C'est le principe du marquage différentiel avec des isotopes stables qui sera détaillé dans le chapitre suivant. La microfluidique offre aujourd'hui la possibilité d'effectuer des réactions chimique et biochimique en une durée réduite et avec de petites quantités d'échantillon et de réactifs dans des structures de petite taille d'environ 100 µm. Cependant, certaines étapes comme la précipitation acide des protéines ne sont pas compatibles avec la microfluidique. Il ne s'agira pas uniquement d'un changement d'échelle mais aussi d'un changement de stratégie du traitement de l'échantillon. En effet, une précipitation entrainerait un colmatage des canaux

microfluidiques du fait de leur petite taille. La miniaturisation du protocole OcSILAC se fera donc en deux étapes. La première étape consistera à trouver une manière d'éliminer les réactifs en excès et effectuer les changements de tampon sans passer par la précipitation des protéines. Et puis, en deuxième étape nous allons imaginer et fabriquer un dispositif microfluidique permettant de miniaturiser et d'intégrer l'ensemble des étapes du protocole OcSILAC.

Notre approche consiste à utiliser un support solide dans un canal microfluidique ou une chambre de réaction pour la rétention spécifique des protéines et pour le lavage des molécules indésirables. Toutes les réactions de blocage des cystéines, de réduction et de marquage par biotinylation des espèces oxydées seront effectuées directement sur les protéines retenues. Elles seront suivies par la digestion, effectuée aussi directement dans la puce. Les peptides générés seront élués avant de subir un enrichissement de ceux contenant une cystéine biotinylée et enfin une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'utilisation de la rétention des protéines comme alternative à la précipitation acide sera testée dans un premier temps afin de développer un protocole qui peut se prêter à la miniaturisation. La photolithographie douce et la réplication par moulage sont les approches utilisées pour la fabrication de la puce microfluidique.

Chapitre 2: La protéomique par spectrométrie de masse

2.1 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technologie permettant de déterminer le rapport masse sur charge (*m/z*) d'une molécule chargée à l'état gazeux. Les spectromètres de masse sont composés de trois parties : une source d'ion, un analyseur et un détecteur. La source d'ion permet de faire passer les molécules d'un état condensé (liquide ou solide) à un état gazeux en les ionisant. Ces ions peuvent être chargés négativement ou positivement. Une fois produites au niveau de la source, les molécules chargées en phase gazeuse peuvent être analysées grâce à un champ électrique ou magnétique dans l'analyseur. L'analyseur permet ainsi de les séparer en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) avant qu'elles ne soient comptées par le détecteur. Le résultat se présente ensuite sous forme d'un spectre de masse qui n'est rien d'autres qu'un graphique représentant les intensités des signaux détectés en fonction des différents m/z mesurés. Il est possible d'associer plusieurs analyseurs de masse pour faire de la spectrométrie de masse en mode tandem ou MS/MS. Dans cette configuration, il est possible d'isoler des molécules, de les fragmenter et d'analyser les fragments. Ce mode de fonctionnement de la MS permet d'obtenir des informations structurales supplémentaires sur les molécules pour en déduire par exemple leur séquence dans le cas des polypeptides.

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'analyse des biomolécules a pris un essor important au début des années 1990 après le développement des méthodes d'ionisation douces l'ESI (ionisation par *electrospray*) et le MALDI (ionisation laser assistée par une matrice)[124]. En effet, ces deux méthodes sont capables d'ioniser des biomolécules fragiles en minimisant leur dégradation sans les fragmenter. Grâce à ces avancées, la MS est devenue une technique de choix pour l'étude des protéines. Les échantillons protéiques étant très complexes, les performances de la MS dépendent énormément de la technique de séparation avec laquelle elle est associée[15]. Indépendamment de la méthode de séparation utilisée, l'analyse des protéines par MS se fait selon deux principales approches : le *bottom-up* et le *top-down* (Figure 3).

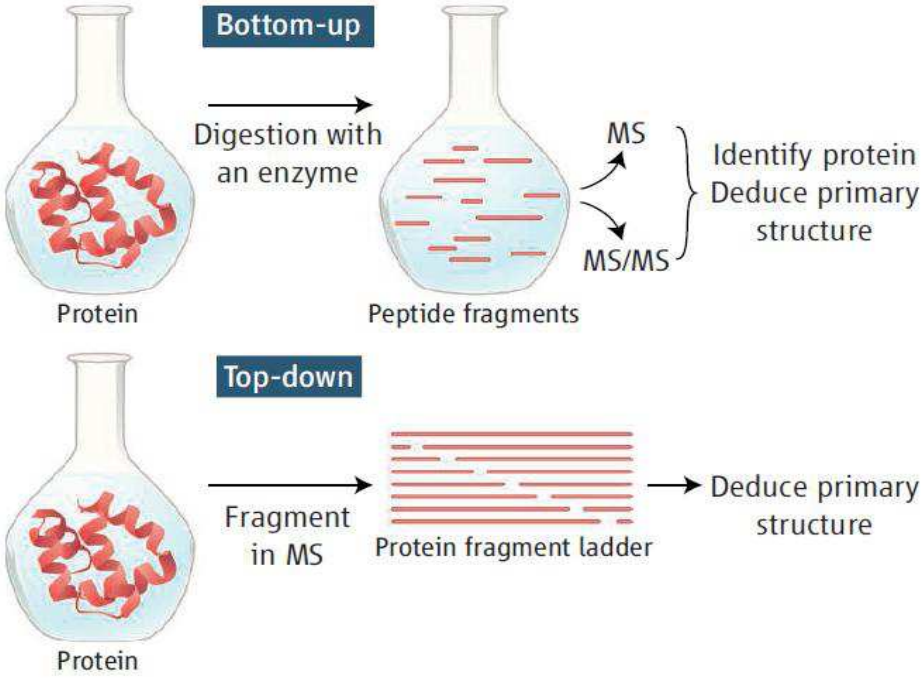


Figure 3 : Les deux principales approches en analyse des protéines par spectrométrie de masse

En protéomique *bottom-up*, les protéines sont digérées (protéolyse) en molécules plus petites appelées peptides protéolytiques qui seront analysés par MS. En *top-down*, par contre, la protéine entière est injectée dans le spectromètre de masse où elle est fragmentée et ses fragments analysés pour son identification. Le mode de fragmentation est d'une grande importance dans l'identification des protéines quelle que soit l'approche (*bottom-up* ou top down). Différentes techniques de fragmentation existent en MS. Le choix d'un mode de fragmentation dépend principalement de l'approche choisie et de l'appareil utilisé. L'analyse des fragments d'un peptide génère un spectre MS/MS qui va être utilisé pour son séquençage. En principe, la détermination de la séquence du peptide se fait en considérant la différence en masse entre 2 pics voisins dans le spectre MS/MS. Un système de nomenclature des fragments a été mis en place pour faciliter la lecture des spectres de fragmentation[29]. Les fragments a, b, et c sont des fragments chargés comprenant le coté N-terminal du peptide fragmenté tandis que les fragments chargés contenant le coté C-terminal sont nommés x, y ou z. Les fragments N-ter sont nommés a, b ou c en fonction du type de la liaison rompue durant la fragmentation, pareil pour les fragments C-ter (x, y ou z) (Figure 4).

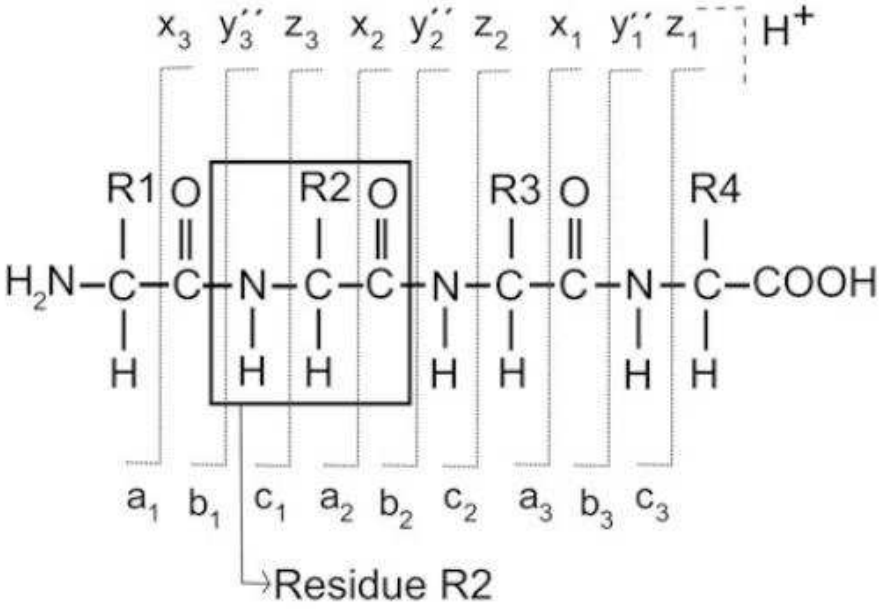


Figure 4 : Nomenclature des fragments [124]

Parmi les modes de fragmentation mis en œuvre en protéomique, le CID (*Collision Induced Dissociation,* dissociation induite par collision) est de loin le plus utilisé[128]. La fragmentation CID commence par l'isolement d'un ion précurseur suivi par une série de collision de ce dernier avec un gaz neutre (Hélium) présent dans la cellule de fragmentation à une pression variant entre 1 et 5 mbar[124]. Ces collisions conduisent à une augmentation de l'énergie vibrationnelle des ions précurseurs qui, une fois un certain seuil atteint, entraine la rupture de liaisons covalentes. Le CID est utilisé dans des appareils de type triple-quadripôle, piège quadripolaire et q-tof. Pour les appareils équipés d'un Orbitrap, c'est la fragmentation HCD *Higher-energy C-trap Dissociation*, dissociation induite par collision à plus haute énergie). La fragmentation HCD est similaire au CID, elle génère les mêmes types de fragments. Elle génère principalement des ions b et y. En dehors du CID, d'autres modes de fragmentation sont utilisés en protéomique comme l'ECD (*Electron Capture Dissociation,* dissociation par capture d'électron) ou l'ETD (*Electron Transfer Dissociation,* dissociation par transfert d'électron). Les modes de fragmentations diffèrent d'abord de par les appareils dans lesquels ils peuvent être mis en œuvre. La fragmentation ETD est mis en œuvre dans les appareils Q-TOF, Q-TRAPs ou LTQ-Orbitrap. On retrouve la fragmentation ECD dans des appareils de type FT-ICR (Analyse par Transformée de Fourier de la Résonance Cyclotronique des Ions). Ensuite, le CID diffère de l'ECD et de l'ETD de par le type de fragments générés. La fragmentation CID fournit des fragments b,y tandis que l'ECD ou l'ETD génère des fragments de type c, z[128].

Durant cette étude, le spectromètre de masse utilisé est un spectromètre de masse hybride associant un filtre quadripolaire, une cellule de collision et un analyseur de type Orbitrap (Q Exactive HF™, ThermoFisher Scientific) avec un mode de fragmentation de type HCD.

2.1.1 Approche *top-down*

Dans une expérience *top-down*, les protéines purifiées et intactes sont séparées avant analyse en MS, détectées puis fragmentées par ECD ou ETD (ou autres) apportant ainsi des informations sur la masse intacte de la protéine et sur sa séquence en acides aminés. L'approche *top-down* réduit considérablement la préparation d'échantillon et préserve ainsi des informations importantes qui seraient perdues avec une approche *bottom-up* comme la détection simultanée de plusieurs PTMs distantes sur la séquence primaire. Il est possible avec cette technique, d'avoir une description complète de la séquence de la protéine si assez de fragments informatifs sont observés[23]. C'est une approche très utilisée dans l'étude des protéoformes et des systèmes biologiques ayant des combinaisons complexes de PTM[24]. Les sources d'ionisation ESI et MALDI peuvent être utilisées pour une analyse *top-down*. L'ionisation ESI est plus avantageuse car elle produit des ions ayant des états de charge plus élevés facilitant ainsi la fragmentation[25], et parce que la gamme de masse de détection nécessaire est restreinte sur l'échelle des m/z. Du fait de la taille importante des protéines intactes et donc des états de charges atteints, une analyse des protéines par *top-down* se fait généralement avec des spectromètres de haute résolution du type FTICR ou Orbitrap. Cependant, des spectromètres de masse moins performants du type quadripôle associé à une fragmentation dans la source ESI ont été utilisés pour l'analyse en *top-down* d'une protéine intacte de plus de 60 kDa[26]. Malgré tous ses avantages, l'approche *top-down* est beaucoup moins utilisée que la protéomique *bottom-up*. Ceci s'explique par plusieurs raisons. i) la solubilité des protéines est plus faible que celle des peptides. La solubilité des protéines, particulièrement les protéines membranaires est l'un des premiers challenges de la protéomique *top-down*. Il est en effet nécessaire, après leur extraction, de maintenir les protéines solubles avant, durant et après le fractionnement. Les détergents permettant de solubiliser ces protéines étant souvent incompatibles avec la MS, de nouveaux détergents sont proposés pour bien solubiliser les protéines sans gêner ensuite leur analyse en *top-down* mais s'avèrent souvent moins performants[24]. ii) Les peptides se prêtent mieux à la séparation chromatographique, à l'ionisation et à la fragmentation que les protéines. La chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée est la plus fréquemment utilisée pour le fractionnement des échantillons complexes de protéines intactes car elle est directement compatible avec le mode d'ionisation ESI. Cependant, du fait d'une grande diversité des propriétés physico-chimiques d'un mélange de protéines intactes et de leur faible taux de récupération, la capacité de pics et la résolution de la séparation de protéines intactes est de loin plus faible que celles des peptides[27]. iii) les spectres issus d'une analyse *top-down* sont beaucoup plus complexes. L'ionisation en ESI des protéines intactes produit une large gamme d'états de charge. Ainsi, une protéoforme détectée sous différents états de charge aura un profil de fragmentation qui apporte des informations redondantes contenues dans des spectres très complexes qu'il faut déconvoluer. Ceci représente un véritable challenge de traitement du signal pour l'analyse bio-informatique qui devient plus complexe lorsque sont intégrées les combinaisons complexes de PTMs inconnues. Récemment, plusieurs outils bio-informatiques ont été développés pour

l'analyse des données issus d'une analyse *top-down* mais le challenge demeure notamment pour l'identification des protéines ayant une grande masse moléculaire[28].

2.1.2 Approche *bottom-up*

La protéomique *bottom-up* vise à l'identification d'une protéine en analysant les peptides protéolytiques issus de sa digestion. Les protéines sont digérées en peptides ayant des tailles comprises entre 500 et 3000 Dalton. On parle de *shotgun proteomics* quand la protéomique *bottom-up* est appliquée à un échantillon complexe. Ce qui implique généralement, dans le cas du *shotgun proteomics*, le couplage d'une étape de séparation du type chromatographie liquide (LC) à une ou 2 dimensions à la spectrométrie de masse. Les peptides issus de la digestion des protéines sont ainsi fractionnés par chromatographie liquide avant d'être détectés par spectrométrie de masse d'abord en mode MS et puis en tandem (MS/MS) pour obtenir leur spectre de fragmentation. On parle ainsi de LC-MS/MS. L'identification des peptides se fait ensuite par la comparaison du spectre MS/MS issu de la fragmentation des peptides aux spectres MS/MS théoriques de peptides issus de la digestion *in silico* d'une base de données de protéines.

La digestion est l'étape la plus critique de la stratégie *bottom-up*. Elle peut être enzymatique ou chimique. Nous ne parlerons ici que la digestion enzymatique qui est de loin l'approche la plus utilisée. Un protocole typique d'une analyse *bottom-up* commence par l'extraction de protéines d'un échantillon biologique (cellules, tissus...). Cette étape consiste à extraire les protéines en détruisant la structure de la membrane cellulaire et en rompant les interactions physico-chimiques entre protéines ou avec d'autres biomolécules. Elle se fait souvent par dénaturation en présence d'un détergent comme le SDS (Sodium DodecylSulfate) dont le rôle est de solubiliser les protéines. Les protéines membranaires sont caractérisées par une faible solubilité. L'utilisation du SDS (ou autres détergents) est essentielle pour la solubilisation et l'extraction de ces dernières. Pour préparer les protéines extraites à la digestion, leurs ponts disulfures sont réduits par des agents réducteurs comme le dithiothréitol (DTT), le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) ou le β-mercaptoéthanol. Ensuite, un agent alkylant comme l'iodoacétamide (IAM) ou le N-EthylMaléimide(NEM) est utilisé pour bloquer les cystéines et empêcher la reformation des ponts disulfures. Les réactifs en excès sont éliminés et un changement de tampon est opéré. Enfin, l'ajout d'une endoprotéase ayant des sites de coupure spécifiques (ou non) permettra de digérer les protéines en peptides. Arg-C, Lys-C, trypsine, chymotrypsine, pepsine, pronase... sont toutes des enzymes de digestion de protéines. Chacune possède des spécificités de sites de coupure et des conditions optimales de fonctionnement (température, pH...). Cependant, la trypsine est sans aucun doute l'enzyme qui est de loin la plus utilisée en *protéomique bottom-up*. La trypsine est une enzyme très spécifique qui coupe les liaisons peptidiques du côté C-terminal des résidus Arginine et Lysine si ces résidus ne sont pas suivis par la proline. En dehors de son coût abordable et de sa disponibilité en grande quantité, la large utilisation de la trypsine s'explique par l'abondance de la lysine et de l'arginine dans les séquences protéiques. De plus les peptides tryptiques portent au moins 2 charges positives, ce qui facilite leur ionisation et leur fragmentation en CID. Les spectres de fragmentation de ces peptides

sont d'une grande qualité, ce qui facilite leur identification par comparaison avec les spectres issus des bases de données de protéines.

La digestion augmente numériquement le nombre de molécules présent dans l'échantillon en transformant les protéines intactes en de nombreux peptides. Cependant, à la différence du mélange de protéines intactes, les peptides générés présentent une certaine homogénéité physico-chimique rendant ainsi la manipulation de cet échantillon moins complexe. Une conséquence directe de cette observation est que la séparation en chromatographie liquide d'un mélange de peptides est plus reproductible et résolue que celle d'un mélange de protéines intactes. L'autre avantage est qu'avec plusieurs peptides provenant d'une même protéine, la probabilité d'identifier cette protéine à partir de l'un de ses peptides en devient plus grande. L'approche *bottom-up* permet ainsi d'identifier un plus grand nombre de protéines par rapport au *top-down*. L'approche *bottom-up* a cependant quelques inconvénients : i) une importante partie du traitement d'échantillon entraine une perte d'échantillon lors du changement de tampon ou de la suppression de réactifs en excès, ii) une perte d'information : la digestion simplifie l'échantillon mais entraine la perte d'information notamment sur les positions et la coexistence des PTMs iii) risque de modification de l'échantillon : avec la manipulation de l'échantillon durant ce protocole long et fastidieux, il n'est pas exclu que quelques modifications de l'échantillon ne se produisent ou se dégradent (perte ou apparition de nouvelles PTMs).

2.2 La quantification en spectrométrie de masse

D'importantes avancées en appareillage en spectrométrie de masse ont été réalisées ces dernières décennies. Par ailleurs, les méthodes de séparation comme la chromatographie liquide ont aussi connu une importante amélioration de leurs performances. Des percées ont aussi été réalisées dans le traitement bioinformatique des spectres de masse. Ces progressions ont permis une couverture de plus en plus large du protéome. Cependant, l'analyse qualitative consistant à générer une liste de protéines identifiées d'un organisme donné n'est pas suffisante pour la compréhension de l'état physiologique de cet organisme[30]. La quantification des protéines par l'approche *bottom-up* peut être absolue (estimation de la concentration en protéine dans un échantillon) ou relative (comparaison de la concentration des protéines entre 2 échantillons)[31]. La quantification en MS dépend largement de la méthode d'acquisition. Les 3 catégories de méthode d'acquisition existent aujourd'hui en MS. *Le Data-Dependant Acquisition* (DDA, Acquisition dépendante des données) où les ions fragmentés et analysés en MS2 sont choisis en fonction de leur intensité. L'acquisition ciblée (PRM, SRM) : les ions à fragmenter sont choisis selon une liste définie à l'avance et incluse dans la méthode. Et enfin le *Data Independant Acquisition* (DIA, acquisition indépendante des données) où les ions précurseurs dans une certaine gamme de masse sont fragmentés sans discrimination. Au cours de cette thèse, toutes les acquisitions ont été faites en mode DDA (Annexe 1): elle est composée de deux étapes. La première, appelée MS1 sert à mesurer l'intensité des molécules séparées en fonction de leur rapport *m/z*. Ensuite, les ions correspondant aux intensités les plus élevées lors du MS1 sont sélectionnés et fragmentés lors de la seconde

étape appelée MS2 permettant d'avoir des informations structurales sur les ions. Les techniques de quantification en MS peuvent se baser sur les données recueillies lors du MS1 ou du MS2.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est aujourd'hui la méthode la plus couramment utilisée pour l'identification des protéines. Cependant, la quantification par cette méthode est plus complexe. Ceci est dû d'abord à la préparation des échantillons. En effet, l'extraction des protéines n'est jamais complète, reproductible et uniforme pour tous les types de protéine. Pour l'approche *bottom-up*, caractérisée par une importante étape de préparation, les pertes d'échantillons par adsorption par exemple sont incompatibles avec la quantification. De plus, la spectrométrie de masse est une technique non quantitative entre molécules différentes. En effet, l'efficacité d'ionisation dépend des propriétés physico-chimiques des peptides ou protéines analysés. Les réponses de détection en MS de 2 peptides diffèrent en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et non pas uniquement en fonction de leur concentration.

Des stratégies de quantification en MS ont été malgré tout développées pour profiter de la sensibilité et de la rapidité d'analyse de cette approche. Ces stratégies peuvent être divisées en 3 catégories : l'utilisation d'étalon interne, le marquage isotopique et enfin la quantification sans marquage appelé *Label Free*.

2.2.1 Etalonnages internes

Le recours à un étalon interne consiste à ajouter à l'échantillon une quantité connue d'une protéine ou peptide (selon l'étape à laquelle on souhaite utiliser l'étalon interne). Les peptides ou protéines étalons sont synthétisés avec des isotopes stables pour mimer les peptides ou protéines de l'échantillon. Ces étalons sont ensuite utilisés pour réaliser une quantification absolue en prenant en compte la différence entre la concentration obtenue et la concentration attendue des étalons ajoutés à l'échantillon. Cette méthode permet de s'affranchir des biais du protocole d'analyse des protéines. Tous les biais situés en amont de leur ajout dans le protocole d'analyse seront effet pris en compte. Il existe différentes approches de quantification absolue utilisant des étalons internes : on peut citer la méthode AQUA (*Absolute Quantification*) utilisant des peptides synthétiques marqués aux isotopes lourds (^{13}C, ^{15}N). Ces étalons sont ajoutés après la digestion et permettent donc de s'affranchir des biais situés en amont de cette étape dans le protocole d'analyse[118]. L'approche PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*) consistant à utiliser des protéines recombinantes comme étalon interne permet de prendre en compte les biais liés à la digestion. Les étalons sont en effet introduits avant cette étape[119].

La méthode est d'autant plus précise que l'étalon est introduit assez tôt dans le protocole d'analyse. L'utilisation de protéine étalon serait alors plus précise que l'utilisation de peptide. Cependant, les coûts des protéines ou peptides étalons sont élevés. Etant donné qu'il faudrait une protéine étalon pour chaque protéine à quantifier, l'utilisation de cette méthode n'est pas viable à l'échelle du protéome. L'utilisation d'étalons internes est donc une technique de quantification absolue ciblée. En effet, seuls

les protéines ou peptides dont les formes marquées (marquage isotopique) ont été ajoutées à l'échantillon pourront être quantifiées. Le marquage isotopique peut cependant être utilisée pour réaliser une quantification relative non ciblée entre 2 échantillons. Ces approches sont développées dans le paragraphe suivant.

2.2.2 Marquage isotopique

L'utilisation d'isotopes stables a pour but de créer un marqueur de masse (différence de quelques Da entre deux peptides identiques et issus de deux échantillons différents) mais de séquence identique). L'étiquette est spécifique à un échantillon et détectable en MS ou en MS/MS. Il est donc possible de mélanger des échantillons préalablement marqués à différentes étapes du protocole d'analyse. Il faut noter que les variations de toutes les étapes en aval du mélange sont prises en compte dans la quantification, d'où l'intérêt de faire le marquage le plus tôt possible. L'abondance relative peut être ensuite obtenue en mesurant les intensités des pics issus de chaque échantillon en les distinguant grâce aux marqueurs isotopiques. Les approches de marquage à l'isotope stable diffèrent par rapport aux stratégies de quantification, l'étape à laquelle le marquage est réalisé et le nombre de conditions comparable.

Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) : spécifique aux résidus cystéines, ce marquage s'effectue avant la digestion enzymatique mais ne concerne que les peptides intégrant un résidu cystéine, séparés du reste de l'échantillon avant l'analyse en LC-MS[129]. Le marqueur ICAT est composé d'une moitié IAM (partie réactive et spécifique aux résidus cystéines), d'une biotine clivable (pour l'enrichissement par affinité des peptides marqués) et enfin d'une chaîne carbonée (9 carbones) contenant des isotopes lourds (^{13}C) ou légers (^{12}C) : ce qui introduit une différence de masse 9 Da reconnaissable lors de l'analyse MS. On parle ainsi de ICAT léger portant une chaine légère et de ICAT lourd portant une chaine lourde. Ces 2 versions permettent de réaliser une quantification relative entre 2 échantillons. Cette quantification ne peut cependant concerner que les peptides intégrant un résidu cystéine. Ce qui en fait une approche adaptée à l'étude de l'oxydation des cystéines : elle a d'ailleurs été utilisée pour déterminer l'équilibre entre les cystéines oxydées (marquées avec un ICAT lourd) et les réduites (marquées avec un ICAT léger) du protéome au sein d'un même échantillon suite à une exposition à un stress oxydatif[32]. Cependant, si on dispose de deux échantillons ayant subi des conditions de stress oxydatif différentes, la comparaison de l'équilibre entre les cystéines réduites et oxydées entre les deux échantillons requiert plus de deux versions de ICAT. Cette méthode ne permet donc pas de réaliser la quantification relative de l'oxydation des cystéines entre deux échantillons.

Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) **:** est une méthode de marquage métabolique consistant à incorporer des acides aminés marqués aux isotopes lourds dans les protéines d'une culture cellulaire. Cette incorporation se fait durant la synthèse protéique et les divisions cellulaires. Le marquage SILAC, développé par Ong et al., [33] en 2002 est considérée comme la moins biaisée de toutes les méthodes de marquage étant donné que le mélange des échantillons à comparer se fait avant même l'extraction des protéines. Cependant, le marquage SILAC ne peut être appliqué à tous les types

d'échantillons car elle nécessite une culture cellulaire. Le marquage métabolique qui utilise l'azote 15 est applicable à davantage de types d'échantillon mais elle est très peu utilisée car le traitement des spectres de masse issus de cette approche s'avère complexe[16]. Le marquage métabolique SILAC a été utilisé dans le protocole OcSILAC pour la quantification de l'oxydation des cystéines de 2 échantillons issus de différentes conditions de stress oxydant.

Les quantifications par ICAT et SILAC sont basées sur la MS1. En effet la détection de l'écart de masse et la comparaison des intensités MS1 permet de faire la quantification relative tandis la MS2 est utilisé pour déterminer la séquence. D'autres méthodes de marquage isotopique permettent de faire une quantification MS2 permettant ainsi une co-isolation et une co-fragmentation des peptides. L'*isobaric tag for relative and absolute quantification* (ITRAQ) et le *tandem mass tag* (TMT)sont dotés de marqueurs isobares (de la même masse) qui ne révèlent une différence qu'après la fragmentation du peptide en deux fragments de même structure et de masse inégale en fonction de l'étiquette utilisée et dont la somme des masses est constante. Les derniers résultats ont utilisé jusqu'à 8 marqueurs isotopiques différents en TMT par exemple[34].

Les méthodes de marquage présentent une grande précision surtout quand elles sont effectuées assez tôt dans le protocole de préparation d'échantillon. Elles permettent aussi de sauvegarder du temps machine car les échantillons à comparer sont analysés simultanément. Cependant, elles entrainent une dilution isotopique de l'échantillon et les étapes supplémentaires allonge les protocoles de préparation d'échantillon. Les marquages détectables en MS rendent plus complexe l'analyse du mélange de molécules. Les marquages détectables en MS/MS lissent le signal par risque de co-sélection d'espèces quasi-isobares marquées et sélectionnées pour leur fragmentation. Par ailleurs, le marquage isotopique présente un coût assez conséquent qui peut pousser à adopter des méthodes de quantification sans marquage.

2.2.3 La quantification sans marquage (*LabelFree)*

La quantification sans marquage est une alternative sérieuse face au coût et au temps de manipulation inhérents aux méthodes de quantification avec marquage. Elle profite aussi des avancées réalisées dans le traitement des spectres MS[35]. C'est une méthode de quantification universelle (tous types d'échantillon) qui permet de comparer un nombre infini d'échantillons. Dans cette approche, les échantillons sont analysés séparément et la quantification peut être effectuée en se basant sur des données MS1 ou MS2. En effet, la quantification relative par la mesure de l'aire sous le pic (AUC *Area Under Curve*) se base sur les intensités MS1. La somme ou la moyenne des aires est ensuite comparée protéine par protéine. Le décompte des spectres MS/MS est basée sur les données MS2 et consiste à comparer le nombre de spectres MS/MS attribué à une protéine donnée. Cependant, la précision de la quantification *Label Free* repose en grande partie sur la reproductibilité des étapes de préparation d'échantillon. Les échantillons sont en général traités en parallèle pour limiter les variations au maximum, mais cela n'élimine pas les biais spécifiques du au traitement séparé de chaque tube.

2.3 Limites et challenges de la protéomique *bottom-up*

La protéomique *bottom-up* est la plus couramment utilisée pour l'identification des protéines car les méthodes de séparation des peptides tryptiques en chromatographie liquide, leur fragmentation et leur détection en spectrométrie de masse sont déjà éprouvées. L'identification d'un peptide grâce à un spectre MS/MS de grande qualité permet de remonter facilement à la protéine dont il provient. Cependant, l'ensemble des peptides d'une protéine est rarement identifié. En effet, tous les peptides tryptiques générés ne sont pas détectés et seulement une partie des peptides détectés fournissent un spectre de fragmentation exploitable. Dans l'étude des PTMs, il faut prendre en considération le fait que seule une portion de la protéine est modifiée et qu'il est difficile d'identifier le ou les peptides portant ces modifications. Il est cependant possible de marquer spécifiquement les peptides modifiés, de les enrichir et les analyser séparément. Cette méthode entraine un allongement du protocole de préparation d'échantillon pour une analyse *bottom-up* qui est déjà long. Les pertes d'échantillons et les modifications possiblement induites durant le protocole sont aussi à prendre en considération.

2.3.1 L'étude des modifications post-traductionnelles en protéomique *bottom-up*

La transcription de l'ADN génère de l'ARNm qui est ensuite traduit en protéines. Les protéines peuvent ensuite faire l'objet de différentes modifications post-traductionnelles pouvant affecter leur structure et donc leur fonction. La caractérisation des PTMs est donc une partie importante de la description du protéome.

La digestion tryptique génère parfois des peptides de petite taille (4 à 5 acides aminés) qui ne peuvent pas être identifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ces peptides sont généralement trop hydrophiles pour être retenus en phase inverse et seront perdus dans le volume de tête d'élution. Si le système est assez perfectionné pour permettre leur identification, leur courte séquence est généralement partagée par plusieurs protéines. Il devient dès lors difficile de situer les PTMs qu'ils intègrent. Un peptide de taille moyenne portant une PTM peut être identifiée avec une séquence qui ne renvoie qu'à une seule protéine. Il est cependant impossible, avec l'approche *bottom-up*, de remonter à la combinaison de PTMs localisées dans différents peptides protéolytiques. Dans le cas, par exemple, d'un pont disulfure, il est impossible de savoir s'il était établi au niveau intra- ou inter-protéique.

L'utilisation de détergent ou d'agent chaotrope (urée, thiourée...) est nécessaire pour la solubilisation des protéines. Cependant ces composés ne sont pas toujours compatibles avec les conditions nécessaires à une digestion tryptique efficace. L'une des approches les plus utilisées pour l'élimination de ces composés avant la digestion est la précipitation acide des protéines, leur rinçage avec de l'acétone et leur reprise avec un tampon dont la composition et le pH sont adaptés à la digestion tryptique. Malheureusement, cette approche entraine une perte d'échantillon non négligeable obligeant à travailler avec au moins 10 µg de protéine minimum au départ.

2.3.2 Etude des modifications post-traductionnelles par MS : Cas de OcSILAC

Plusieurs états physiologiques et pathologiques ont été associés au stress oxydant. Le stress oxydant fait référence à l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans l'organisme. Ils proviennent essentiellement de réactions successives de réduction du dioxygène[120]. Les ROS réagissent avec l'ADN, les lipides et les protéines. La structure et la fonction de ces biomolécules peuvent être altérées en réagissant avec ces espèces[32]. Les protéines sont une des cibles majeures des oxydants du fait de leur grande abondance. Les ROS peuvent oxyder les protéines de manière réversible ou irréversible. Les modifications réversibles font partie du fonctionnement normal d'une protéine et sont parfois nécessaires. L'oxydation du groupement thiol des résidus cystéines en acide sulfénique (S-OH), en disulfure (-S-S) ou en S-nitrosylation (S-NO) ont déjà été identifiées comme étant des acteurs participant à la signalisation cellulaire[36]. Cependant, les modifications irréversibles entrainent une perte définitive de la fonction d'une protéine. Le terme rédoxomique désigne l'étude de l'état redox des protéines. Ces modifications concernent les chaines latérales des acides aminés. Parmi tous les acides aminés, la cystéine est le plus susceptible à l'oxydation du fait du groupement thiol présent dans sa chaine latérale[37]. La caractérisation des PTMs dans un échantillon complexe est un challenge du fait de leur faible abondance. Dans le cas particulier de la caractérisation de l'état redox de la cystéine, il faut prendre en compte la grande réactivité des thiols dans le développement d'un protocole d'analyse.

Pour l'étude de l'oxydation des cystéines, le protocole OcSILAC (Oc pour Oxidized *cysteine* et SILAC comme la méthode de marquage isotopique, Thèse Shakir SHAKIR, 2015) a été développé au sein de notre laboratoire. Il vise à caractériser l'oxydation des cystéines qualitativement et quantitativement dans le protéome. Le protocole OcSILAC combine le marquage métabolique SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino-acid in Cell culture*) et la technologie Biotin-switch pour l'enrichissement des cystéines oxydées vue leur faible abondance. Il comprend donc un marquage différentiel métabolique de cultures à comparer, un marquage différentiel chimique des résidus cystéine (selon qu'ils soient réduits ou oxydés) durant le protocole de préparation d'échantillon, une étape de protéolyse pour l'approche *bottom-up* et une étape d'enrichissement des cystéines initialement oxydées car elles sont généralement minoritaires, avant l'analyse en MS.

Contrôle de réactivité des thiols : Le protocole OcSILAC comprend plusieurs étapes de précipitation acide destinées à contrôler la réactivité des thiols et éviter les réactions croisées (Figure 5). Le pKa de la cystéine est de 8.3 mais peut varier entre 4 et 10 selon les acides aminés de son environnement. La forme la plus réactive du groupement thiol ($-S^-$) est majoritaire quand le pH de la solution est supérieur au pKa de la cystéine. L'utilisation de l'acide trichloroacétique (TCA) permet de se placer à pH égal ou inférieur à 1. A un pH aussi bas, tous les groupements thiols des cystéines sont protonés et donc préservés d'une éventuelle oxydation[38].

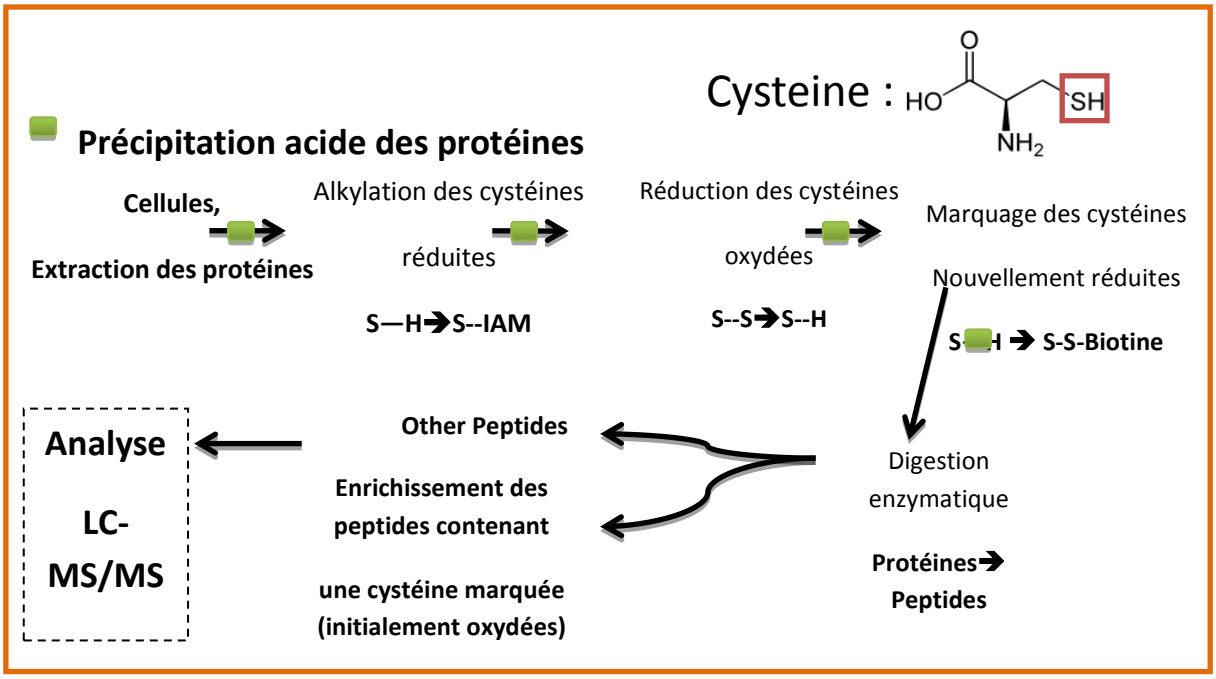


Figure 5 : Protocole OcSILAC
la précipitation acide des protéines est effectuée aux moments où les groupements thiols sont leur forme la plus réactive

Marquage métabolique : On dispose au départ de 2 cultures cellulaires. La première étape consiste à effectuer le marquage métabolique. Pour cela, l'une des 2 cultures est effectuée dans un milieu contenant de la lysine et de l'arginine marquées aux isotopes lourds : K8 : $^{13}C_6{}^{15}N_2$ et R10 : $^{13}C_6{}^{15}N_4$. Ce qui introduit un écart de masse de 8 et 10 Dalton respectivement par rapport à la lysine et l'arginine non marquées. Après ce marquage, on dispose de 2 cultures cellulaires dont la seule différence est la présence d'acides aminés lourds (Lysine, Arginine) dans l'une des 2. Chaque culture est exposée à l'une des 2 conditions à comparer (différents niveaux de stress oxydant par exemple).

Préparation de l'échantillon : Pour l'analyse des protéines par l'approche *bottom-up*, on commence par mélanger un nombre équivalent de cellules marquées aux isotopes lourds (H) et légers (L). On procède ensuite à la lyse de l'ensemble des cellules du mélange en présence de TCA. La lyse cellulaire dans un environnement permet de préserver l'échantillon d'éventuelles réactions d'oxydation ou de réduction artéfactuelles. L'extraction des protéines est effectuée avec une solution de TCA 20% (v/v). Les protéines extraites et précipitées sont rincées à l'acétone froid. Le rinçage à l'acétone froid permet d'éliminer l'acide (TCA) résiduel. Puis, les protéines sont reprises avec une solution tampon contenant un agent alkylant, l'iodoacétamide (IAM) pour bloquer les cystéines réduites. L'excès d'IAM est éliminé à la fin de réaction par précipitation acide des protéines suivi d'un rinçage à l'acétone froid. Les protéines sont de nouveau suspendues dans un tampon contenant un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), pour réduire les protéines réversiblement oxydées. Suite à cette réaction de réduction, l'excès de DTT est éliminé par le même procédé et les protéines sont suspendues dans un tampon contenant de la biotine-HPDP destinée au marquage des cystéines nouvellement réduites (donc oxydées au départ) par formation d'un pont disulfure cystéine-biotine. L'excès de biotine-

HPDP est éliminé à son tour par le même procédé. Après cette étape, les protéines sont reprises avec une solution d'ammonium bicarbonate (ABC) 50 mM compatible avec la digestion tryptique qui est l'étape suivante. Le Biotin-switch permet ensuite d'enrichir les peptides marqués avec la biotine-HPDP en passant l'ensemble des peptides générés par la digestion sur des billes d'agarose sur lesquelles est greffée de la streptavidine. Pour finir, la fraction non retenue est recueillie après une heure de contact avec les billes d'agarose tandis que les peptides retenus spécifiquement sont ensuite élués à l'aide d'une solution de DTT. La solution de DTT permet en effet de réduire les ponts disulfures formés entre la cystéine et la biotine.

Stratégie de quantification : Avec le marquage SILAC et le mélange de quantités équivalentes de cellules marquées et non marquées, les peptides seront présents en deux versions lourde et légère, chacune provenant de l'une des conditions à comparer. Les deux versions sont identiques en tout point sauf dans leur composition isotopique, elles vont être éluées et ionisées en même temps. Une étude quantitative peut alors se faire en comparant les intensités des pics relatifs en MS des deux versions de peptide. Le rapport des intensités MS des peptides (Lourd/léger) contenant une cystéine carbamidométhylée représente le rapport des peptides réduits tandis que celui des peptides portant des cystéines sous forme libre indique le rapport de la forme oxydée. Les autres peptides, à savoir ceux qui n'ont pas de cystéine dans leur séquence primaire permettront de déterminer le niveau d'expression de la protéine associée. Leur rapport d'intensité donne accès à la variation du niveau d'expression des protéines dans chaque condition et permettra de corriger la comparaison quantitative des peptides contenant une cystéine.

Le protocole OcSILAC est à la fois plus long et plus complexe qu'un protocole *shotgun* classique. Ceci s'explique par le fait qu'il s'intéresse à la caractérisation des PTMs en plus de l'identification des protéines. Les précipitations acides des protéines suivies du rinçage avec de l'acétone froid ont été intégrées dans le but de préserver les thiols des modifications artéfactuelles malgré leur grande réactivité. Cependant cette approche allonge encore le protocole et entraine une perte supplémentaire d'échantillon par rapport à un protocole *Shotgun proteomics* classique. Trouver une alternative à la précipitation acide des protéines et procéder à la miniaturisation du protocole permettrait de gagner du temps, de réduire la consommation en échantillon et le préserver des oxydations artéfactuelles.

Chapitre 3 : La microfluidique

Dans le domaine de la micro-électronique et de l'informatique s'est déroulée, ces dernières décennies, une révolution technologique qui tourne autour de la taille des dispositifs et de leur performance. En effet, la miniaturisation des dispositifs électroniques s'est accompagnée d'une multiplication exponentielle de leurs performances. Cette même révolution est en train de s'opérer dans le domaine des sciences expérimentales et porte un nom : la microfluidique. Elle est définie comme un domaine de la science et des technologies encadrant la fabrication d'objets de petite taille(de l'ordre du µm) destinés à la manipulation de très petites quantités de fluide (de l'ordre du µL). C'est un domaine pluridisciplinaire nécessitant des connaissances en microélectronique, science des matériaux, chimie, physique... Elle trouve des applications en biologie, chimie, physique. La chimie analytique est considérée comme l'un des premiers parents de la microfluidique et comme l'un de ses premiers bénéficiaires[18]. Manz et al., ont énoncé en 1990 le concept d'un système analytique miniaturisé (TAS : *Total Analysis chemical System*) intégrant l'ensemble des étapes d'une analyse chimique : de l'échantillonnage jusqu'à la détection[19]. Il faut dire que les promesses d'une analyse nécessitant beaucoup moins d'échantillon, de réactifs et de temps sont suffisantes pour que cette piste soit sérieusement explorée. Le terme microsystème en chimie analytique désigne les *micro-arrays* et les systèmes microfluidiques. Ces 2 systèmes diffèrent de par leur mode opérationnel qui est statique pour les premiers et dynamiques pour les systèmes microfluidiques. La microfluidique analogique ou conventionnelle est caractérisée par des canaux ou chambres de réactions remplies par une phase unique généralement aqueuse. Les canaux microfluidiques peuvent aussi être remplie par 2 phases liquides non miscibles (eau, huile) dont l'une est en émulsion dans l'autre : on parle ainsi microfluidique en gouttes.

Les techniques de fabrication utilisées en microfluidique sont adaptées de celles utilisées en microélectroniques. Cette adaptation s'articule autour du coût pour une grande accessibilité dans le monde académique mais aussi au niveau du choix des matériaux selon des critères comme la biocompatibilité et l'intégration de moyens de détection. Schématiquement, un système microfluidique doit comprendre, i) une entrée pour l'accès des substrats et réactifs et une sortie pour les produits. ii) un mode d'actuation : il peut être extérieur (seringue, pompe) ou interne à la micropuce (électro-osmose, capillarité). iii) des structures pour la manipulation du fluide (microcanal, chambre de réaction) et enfin iv) un mode de détection qui peut aussi être interne (détection électrique, optique...) ou extérieur (spectrométrie de masse, RMN...). Il faut noter que les moyens de détection intégrés ne permettent pas d'analyser les échantillons protéomiques complexes. En effet, la sensibilité et la gamme dynamique requises pour ce type d'échantillon sont loin d'être atteintes par les méthodes de détection intégrée. La plupart des dispositifs microfluidiques destinés à la protéomique sont couplés à la spectrométrie de masse qui est le mode détection de référence en analyse des protéines.

3.1 Ecoulement et mélange en microfluidique

En microfluidique, les fluides sont manipulés dans des structures dont les dimensions varient entre 1 et 100 µm environ. Le comportement d'un fluide dans un volume aussi restreint a un certain nombre de particularités. Ces changements de comportement concernent principalement les phénomènes d'écoulement et de mélange.

3.1.1 Ecoulement

Le nombre de Reynolds permet de déterminer le régime d'écoulement en mécanique des fluides. Il permet de définir 3 états d'écoulement : laminaire caractérisé par un nombre de Reynolds faible, transitoire et turbulent pour des nombres de Reynolds plus élevés. Le nombre de Reynolds découle des équations de Navier-Stokes et représente un rapport entre les forces d'inertie et celles liées à la viscosité du fluide étudié. Il est appliqué à plusieurs domaines notamment dans l'étude de l'aérodynamisme d'un objet volant. Sa forme qui nous intéresse ici sera celle caractérisant l'écoulement d'un fluide dans un tuyau. Il est défini par l'équation suivante :

$$Re = \frac{VL}{v} = \frac{\rho VL}{\mu}$$

avec V = vitesse caractéristique du fluide ($m.s^{-1}$); L = dimension caractéristique (m); v = viscosité cinématique (μ/ρ) ($m^2.s^{-1}$); ρ masse volumique du fluide $kg.m^{-3}$; µ viscosité dynamique : $kg.m^{-1}s^{-1}$)

L'écoulement est laminaire pour des valeurs du nombre de Reynolds très faibles (~1), transitoire si le nombre de Reynolds est entre 2000 et 3000 et enfin turbulent au-delà de 3000.Si on prend l'exemple d'une solution aqueuse s'écoulant dans un canal cylindrique d'1 mm de diamètre interne et de 10 cm de longueur, le nombre de Reynolds est de 0,76. Malgré des dimensions supérieures à celles d'un dispositif microfluidique, les conditions d'un écoulement laminaire sont remplies. Les écoulements dans les dispositifs microfluidiques sont caractérisés par des nombres de Reynolds très faible (inférieur à 1) donc un l'écoulement y est laminaire. Ce flux laminaire va avoir de grandes conséquences sur le mélange au sein des dispositifs microfluidiques.

Pour générer l'écoulement dans un dispositif microfluidique, il faut choisir un mode d'actuation. L'intérêt de la miniaturisation est de disposer d'un petit appareil amovible et disposant de toutes les fonctions intégrées (pompage, écoulement, détection). Cependant, l'intégration d'un mode d'actuation au dispositif microfluidique n'est pas toujours évidente. On trouve ainsi des modes de pompage internes et externes. L'écoulement dans les systèmes microfluidiques est généré principalement par application de pression PDF (*Pressure Driven Flow* ou flux par application de pression) ou par EOF (flux électroosmotique)[39].

Modes de pompage internes : les modes d'actuation ou de pompage internes présentent l'avantage de rendre le dispositif microfluidique autonome avec l'intégration

de la fonction de pompage. On peut citer dans cette catégorie les modes de pompage électroosmotique, thermique, piezoélectrique[40], par capillarité[40]. Le mode de pompage interne le plus utilisé est sans doute le pompage électroosmotique. Dans ce cas de figure, l'écoulement est généré par application d'un champ électrique. L'application d'une tension électrique entre l'entrée et la sortie d'un canal microfluidique dont les parois sont chargées négativement (groupement SiO^- verre, silice) entraine l'accumulation de cations sur les parois. Une couche de contre-ions fixes se forme sur les parois tandis que les contre-ions les plus éloignés de la surface vont se mettre en mouvement et générer un flux électroosmotique(EOF)[41].

Le flux électroosmotique dépend fortement de la chimie de surface des matériaux utilisés et n'est pas applicable aux liquides non polaires[42]. Par ailleurs, l'application d'un champ électrique non adapté entraine l'apparition de bulles de gaz ou de gradient de pH. Il est généralement impossible de contrôler le débit dans un pompage électroosmotique. Le couplage d'un dispositif microfluidique intégrant un pompage électroosmotique à la MS est généralement plus complexe du fait de la nécessité de séparer la tension du flux électroosmotique de celle de la source ESI.

Modes de pompage externe : l'utilisation d'un pompage externe est généralement plus simple. Il se résume à la connexion de la puce microfluidique à une pompe externe ou une pousse-seringue pour générer un flux par application de pression (PDF : *Pressure Driven Flow*). C'est l'approche la plus utilisée car elle est indépendante de la chimie de surface et de la polarité du liquide. Récemment, des pompes ont été développés spécialement pour les puces microfluidiques, offrant la possibilité de contrôler la pression et le débit. Le flux généré par PDF est par ailleurs caractérisé par un profil parabolique, ce qui n'est pas très adapté aux dispositifs destinés à la séparation.

La force centrifuge peut aussi être utilisée pour le transport des liquides dans un dispositif microfluidique. En effet, la rotation d'un dispositif microfluidique en forme de disque a permis de transporter le fluide dans les canaux microfluidiques grâce à la force centrifuge[43].

3.1.2 Mélange

Le caractère laminaire de l'écoulement dans les dispositifs microfluidiques a plusieurs avantages dont la possibilité de travailler avec 2 phases non miscibles : la microfluidique en gouttes. Cependant, la lenteur du mélange dans un canal microfluidique représente un inconvénient pour bon nombre d'applications en chimie organique ou en chimie analytique. Des structures appelées mixeurs ont donc été pensées et intégrées dans les puces microfluidiques afin d'accélérer le mélange. Le mélange est dû à 2 phénomènes : la convection et la diffusion. L'importance relative de ces 2 phénomène peut être déterminée en calculant le nombre de Peclet. Le nombre de Peclet est sans dimension et est défini par l'équation suivante :

$$Pe = \frac{lu}{D}$$

avec l = longueur caractéristique; u vitesse de l'écoulement; D : Coefficient de diffusion

Si Pe>>1 la diffusion peut être négligée et si Pe<<1 c'est la convection qui devient négligeable[44]. Cependant, la valeur numérique du nombre de Peclet peut être trompeuse quand il s'agit de dispositif microfluidique si on ne prend pas en compte le caractère laminaire de l'écoulement. En effet, l'écoulement laminaire dans les canaux microfluidique fait que la diffusion est largement dominante et la convection est même négligeable. Ce mélange lent est un inconvénient pour les dispositifs destinés aux réactions chimiques basées sur le mélange de 2 réactifs. Il peut aussi être mis à profit pour la mise en place d'un gradient de concentration[45]. Des mixeurs microfluidiques ont été développés pour accélérer le mélange. Ils peuvent être caractérisés selon le mécanisme physique en focalisation hydrodynamique, injection alternée, effet géométrique, méthode électro-kinétique, fusion de gouttes et agitation particulaire[46].

3.1.3 Avantages et inconvénients des systèmes microfluidiques

Il faut considérer les performances analytiques de la miniaturisation pour évaluer si elles peuvent dépasser celles des appareils de paillasse. En effet, les nombres sans dimension (comme le nombre de Peclet, le nombre de Fourier, le nombre de Bodenstein) permettent de décrire les microsystèmes et comparer leurs performances aux systèmes classiques. La diffusion des molécules est beaucoup plus importante dans les systèmes miniaturisés car elle est proportionnelle à la dimension caractéristique du du système[47]. En pratique ceci signifie que la diminution à 1/10 du diamètre interne d'une colonne de séparation entraine une réduction non négligeable du temps d'analyse. La miniaturisation permet d'utiliser une plus faible quantité de réactifs et d'échantillon. Cette diminution ne se fait pas généralement au détriment de la qualité des résultats. Elle permet par ailleurs d'amoindrir le coût d'une expérience ainsi que son impact sur l'environnement. La miniaturisation présente donc des avantages financiers et écologiques.

3.2 La microfabrication

La microfabrication est un ensemble de procédés permettant d'usiner des objets dont les dimensions sont comprises entre le micromètre et le millimètre. Elle vient en partie du secteur de l'électronique, notamment de la fabrication des semi-conducteurs pour les circuits intégrés. Les objets microfabriqués peuvent inclure des structures mobiles ou statiques[48]. Comme structures mobiles, on peut citer les valves et comme structures statiques, les canaux microfluidiques, les chambres de réaction... L'utilisation de ces objets a ouvert un nouveau champ expérimental appelé microfluidique. Elle est définie comme étant un domaine de sciences et technologies permettant de manipuler de très faibles quantités de fluide en utilisant des canaux de l'ordre du micromètre[49]. La microfabrication est basée sur les principaux procédés que sont la photolithographie, le dépôt sur couche mince, la gravure chimique et physique, l'usinage laser, les méthodes de moulage... Pour la fabrication d'une puce, on peut avoir recours à un ou une combinaison de ces procédés. Les premiers dispositifs étaient fabriqués en silicium ou en verre qui sont les principaux matériaux utilisés dans l'industrie électronique. Le premier dispositif microfluidique

développé par Manz *et al.*, était en verre et silicium fabriqué avec les méthodes conventionnelles de l'industrie micro-électronique comme la photolithographie et la gravure[50]. Ces méthodes sont précises, mais très coûteuses, sont peu flexibles et pas adaptées à un travail de recherche. En biologie (culture cellulaire par exemple), les matériaux comme le silicium ont vite été remplacés par des matériaux moins couteux et plus adaptés aux applications biologiques comme le PDMS. Etant donnés la taille micrométrique des objets fabriqués, la microfabrication est réalisée dans un environnement propre avec un minimum de particules par mètre cube. Les techniques de microfabrication sont en général sensibles à l'humidité et à la température d'où la nécessité de contrôler ces paramètres dans l'environnement de travail.

3.2.1 L'environnement

La fabrication de microstructures dont la taille est de l'ordre du micromètre nécessite un environnement propre et contrôlé pour assurer le bon déroulement des procédés de microfabrication et amoindrir le risque de défaut de fabrication. La première exigence pour la microfabrication concerne le nombre de particules dans l'air qui doit être maintenu à un niveau le plus faible possible. Un échantillon typique d'air intérieur peut contenir entre 500 000 et 1 million de particules par mètre cube[51]. Ces particules sont de taille micrométrique et ont tendance à s'adsorber sur les surfaces. Le dépôt de ces particules sur les surfaces destinées aux microstructures conduit directement à un défaut de fabrication. Les produits utilisés (résine photosensible, polymères, solvants, eau ultra pure) doivent aussi être préservés de ces particules. Il est donc nécessaire de travailler et de stocker ces produits en atmosphère contrôlée ou "salle propre"(Clean room). Une "salle propre" est définie comme étant un environnement au sein duquel le nombre de particules (poussière, insecte, aérosols) est maintenu à un faible niveau. Par ailleurs, la température est contrôlée (environ 20°C) ainsi que l'humidité (environ 25%) et l'air filtré en permanence.

Les particules sont de différentes tailles, de différents types et différentes origines. Elles peuvent provenir des cheveux humains (en moyenne entre 50 et 70 microns), des pollens (entre 30 et 50 microns), des bactéries (entre 2 et 10 microns) et enfin d'autres particules de plus petite taille aux origines et nature diverses. L'air extérieur (trafic automobile, végétation, vent..) et l'opérateur représentent les principales sources de particules.

Des dispositions sont prises pour forcer la circulation de l'air dans un unique sens : de l'intérieur vers l'extérieur de la salle (avec ou sans recirculation). Le passage de l'air entrant est forcé à travers des filtres capables de retenir des particules aussi petites que 0,5 microns. Malgré cette filtration de l'air, les "salles propres" contiennent quand même des particules. Elles sont donc classées selon le nombre et la taille des particules présentes dans l'air. Cette classification est définie par l'Organisation Internationale des standardisations (ISO, Tableau 3).

Tableau 3: Classification des salles propres en fonction de la taille des particules et leur nombre [51]

ISO 14644-1 Cleanroom Standards

Class	maximum particles/m³						FED STD 209E equivalent
	≥0.1 µm	≥0.2 µm	≥0.3 µm	≥0.5 µm	≥1 µm	≥5 µm	
ISO 1	10	2.37	1.02	0.35	0.083	0.0029	
ISO 2	100	23.7	10.2	3.5	0.83	0.029	
ISO 3	1,000	237	102	35	8.3	0.29	Class 1
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	2.9	Class 10
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29	Class 100
ISO 6	1.0×10^{6}	237,000	102,000	35,200	8,320	293	Class 1,000
ISO 7	1.0×10^{7}	2.37×10^{6}	1,020,000	352,000	83,200	2,930	Class 10,000
ISO 8	1.0×10^{8}	2.37×10^{7}	1.02×10^{7}	3,520,000	832,000	29,300	Class 100,000
ISO 9	1.0×10^{9}	2.37×10^{8}	1.02×10^{8}	35,200,000	8,320,000	293,000	Room air

La précision et la technologie de fabrication déterminent le niveau de la salle propre à choisir. La photolithographie douce est la technique de fabrication utilisée durant cette thèse. Une salle lithographie de niveau ISO 7 (T=21°C, H=45%)a été utilisée pour la fabrication des moules ou *master*. Ensuite la réplication par moulage a été effectuée dans une salle grise, salle de niveau ISO 8. Tous les dispositifs microfluidiques ont été fabriqués au sein de la plateforme technologique de l'Institut Pierre Gilles de Gennes pour la microfluidique (IPGG). L'opérateur est une source non négligeable de particules qui peuvent être émises de ses cheveux, peau, barbe, chaussures et vêtements. Il est donc nécessaire, lors d'un procédé de microfabrication, que l'opérateur soit muni de blouse, couvre-chaussure, charlotte, gants et lunettes pour préserver la qualité de l'air. La température et l'hygrométrie sont aussi des paramètres à contrôler pour assurer le bon déroulement des procédés de microfabrication.

3.2.2 Les matériaux utilisés

Silicium : le silicium est l'un des premiers matériaux testés du fait de son utilisation dans le domaine des circuits intégrés. Il possède des propriétés intéressantes : bonnes résistances mécaniques, chimiques et thermiques. Ce sont des propriétés intéressantes pour les applications en chimie, car elles offrent la possibilité de travailler dans des conditions extrêmes. Il est aussi possible de modifier la surface du silicium pour diverses applications. Cependant, pour les applications biologiques ou médicales, le silicium n'est pas le matériau le plus adapté. En effet, il n'est pas transparent, ce qui le rend inutilisable pour les approches en chimie analytiques utilisant des modes de détection optique. Par ailleurs, il est aussi impossible d'observer une culture cellulaire au microscope avec ce type de matériau. Enfin, son coût élevé limite son utilisation, il est peu utilisé en milieu académique et en recherche et développement.

Verre : contrairement au silicium, le verre a l'avantage d'être transparent et presque chimiquement inerte. Il est biocompatible et ses propriétés de surface sont modulables. Le verre et le silicium ont des propriétés de surface assez intéressantes. En effet, leur surface est chargée négativement, charges qui est à l'origine des flux électroosmotiques. Le verre

s'est révélé très utile dans la séparation et le séquençage ADN[122]. Par ailleurs, le verre est associé à certaines contraintes liées à son micro-usinage. En effet, la précision et la forme des motifs obtenus par gravure sont de faible qualité. A cela s'ajoutent les difficultés liées au collage du verre qui nécessite parfois l'utilisation d'adhésif polymère qui peut être une source de contamination pour les analyses moléculaires comme la spectrométrie de masse.

Polymères : Le silicium et le verre ont rapidement été abandonnés et remplacés par les polymères. Cette évolution vers les polymères s'explique par leur coût moins élevé que celui du verre et du silicium. Par ailleurs, les méthodes de fabrication associées aux polymères sont aussi moins couteuses et ne nécessitent pas toujours de salle blanche. Cependant, les micropuces en polymère présentent certains désavantages : leurs propriétés de surface sont à surveiller contrairement pour le verre et le silicium. Ils ne sont pas toujours compatibles avec les hautes températures, les solvants et solutés organiques de faible poids moléculaire[52]. PMMA (polymethylmetacrylate), PC (polycarbonate), PET (polyethylèneterephtalate), PVC (polyvinylchloride) sont des polymères utilisés pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Les dispositifs microfluidiques en polymère sont généralement fabriqués par ablation laser, moulage par injection, moulage à chaud et moulage par réplication[53]. Mais le polymère le plus utilisé est de loin le PDMS[113]. C'est un polymère connu aussi sous le nom de diméthylpolysiloxane ou diméthicone, il fait partie du groupe des polymères organominéraux (organosiliconés) communément appelés silicones. Les dispositifs en PDMS sont généralement fabriqués par moulage par réplication. Le moule peut être obtenu par différentes techniques dont la plus utilisée est la photolithographie douce. Le dispositif microfluidique développé durant cette thèse a été fabriqué en PDMS par photolithographie et réplication par moulage. Ces techniques de fabrication seront détaillées plus loin (3.3Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS).

D'autres matériaux comme la céramique peuvent aussi être utilisés pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Ce sont des matériaux peu chers, adaptés à un flux électroosmotique et leur manufacture ne nécessite pas une salle blanche. Ils offrent cependant peu de flexibilité, sont opaques et nécessite de l'adhésif pour le collage.

3.2.3 Les techniques de fabrication

Le choix d'un procédé de fabrication dépend de la nature du matériau choisi, du coût ainsi que de la précision nécessaire pour réaliser les motifs souhaités. La gravure, la lithographie et le dépôt en couches minces sont appelés "*méthodes dures*" car les matériaux utilisés pour ces approches : verre, silicium son dits "*durs*". L'ablation laser et les méthodes de moulage sont appelées "*méthodes douces ou plastiques"* car elles sont associées à des matériaux du type plastique (PMMA) ou élastomère (PDMS).

La lithographie renvoie à un ensemble de techniques de microfabrication incluant la photolithographie, le micro-usinage, écriture par faisceau d'électron... La photolithographie est la méthode la plus utilisée. Elle consiste à transférer des motifs sur

une couche de résine photosensible (appelé *photoresist*). Le photoresist est étalé uniformément sur un support lisse appelé *Wafer* et puis exposée à la lumière à travers un masque optique. Le masque optique est un support transparent sur lequel les motifs sont imprimés en opaque (oxyde de Fer ou de Chrome). L'utilisation du masque a pour objectif de protéger une partie de la couche du photoresist des rayonnements incidents. Des rayons X, un faisceau d'électrons ou de photons sont différentes sources de rayonnement utilisées en photolithographie. Une fois exposée à la source d'énergie, la polymérisation de la résine photosensible est activée ou inhibée (résine négative ou positive). La suppression des parties non polymérisées est la dernière étape du transfert des motifs sur le support solide. L'utilisation de longueur d'onde courte permet d'améliorer la précision de la technique. La photolithographie est la forme la plus utilisée avec des longueurs d'onde comprises entre 300 et 450 nm. La précision en photolithographie peut atteindre le submicromètre.

La gravure est une méthode de microfabrication utilisée pour des matériaux comme le verre ou le silicium. Elle peut être physique ou chimique. La gravure chimique consiste à attaquer l'objet à graver avec un agent chimique en phase liquide, on l'appelle aussi gravure humide. La gravure peut se faire de manière isotropique (vitesse de gravure équivalente dans les 3 directions) ou anisotropique (suivant une direction préférentielle). La gravure chimique du silicium peut être réalisée avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) et de l'acide fluorhydrique pour le verre. Dans ce type d'approche, la largeur des canaux microfluidiques est déterminée par la surface de contact entre le matériau et l'agent chimique. Le temps de contact, qui dépend de la vitesse de gravure de l'agent utilisé, détermine la profondeur des canaux microfluidiques. La gravure physique ou sèche consiste à attaquer la surface de l'objet à graver avec des radicaux générés dans un plasma ou un gaz. Les méthodes de gravure permettent de fabriquer des structures dont la taille est comprise entre 0,2 et 500 µm.

L'utilisation croissante des polymères organiques a permis le développement des méthodes de réplication. Ces méthodes sont très adaptées à une fabrication en masse. Les moulages par réplication, par estampage et par microinjection sont les principales méthodes de réplication. i) Le moulage par réplication se fait par dépôt d'un polymère thermoréticulant (PDMS) sur le moule. Après réticulation, la structure solide constituée par le polymère va reproduire le négatif du moule ii) L'estampage consiste à presser le moule contre un matériau chauffé et déformable qui va épouser les reliefs du moule et donner après séparation, le négatif de ce dernier. iii) Pour la microinjection, du plastique chauffé, à l'état liquide, est injecté dans une enceinte fermée dans laquelle est placé le moule. Un moule est fabriqué au préalable par des approches classiques comme la photolithographie. La réplication par moulage est sans doute la plus simple des méthodes de réplication. Elle ne nécessite que le polymère thermoréticulant, le moule, du papier aluminium et une cloche à dégazer. Le facteur limitant est la fabrication du moule, nécessitant au moins une "*salle propre*" de niveau ISO 7 et des équipements spéciaux comme un *spin-coater* et un aligneur de masque. Une fois que la fabrication du moule est terminée, la réplication par moulage en utilisant du PDMS peut se faire dans un

environnement moins exigeant ISO 8, le plus important étant le contrôle de la température et de l'hygrométrie. La fabrication d'un moule par photolithographie suivie de la réplication par moulage est désignée par le terme photolithographie douce. Durant cette thèse, les dispositifs microfluidiques ont été fabriqués par réplication par moulage à partir d'un moule obtenu par photolithographie. Les différentes étapes de fabrication seront détaillées dans le paragraphe suivant.

3.3Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS

3.3.1 Photolithographie

La fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS se fait généralement par photolithographie et réplication par moulage. Ce procédé appelé photolithographie douce a été introduit par Whitesides *et al*.,[54]. Elle passe dans un premier temps par la fabrication d'un moule suivi par une étape de réplication par moulage en utilisant du PDMS. Cette partie va consister en la description des différentes étapes de fabrication d'un moule en utilisant une résine photosensible négative SU-8 et une plaque de silice (*wafer*) comme support.

i) Dessin des motifs : la première étape de ce procédé consiste à dessiner les motifs du dispositif microfluidique à l'aide d'un logiciel de design (*Computational Assisted Design*) comme AutoCAD. Durant ce projet, c'est un logiciel gratuit du nom de CleWin (CleWin5) qui a été utilisé pour l'élaboration et le design de notre dispositif microfluidique.

ii) Fabrication du masque optique arrive après le dessin des motifs. La fabrication du masque optique consiste en l'impression des motifs dessinés sur un papier transparent. Il existe diverses techniques d'impression et différents supports. Les motifs peuvent être imprimés sur des supports en verre ou en quartz recouverts d'un film de chrome et de résine photosensible et imprimé par le moyen d'un laser ou d'un faisceau d'électron. Pour un design dont le plus petit motif est supérieur à 50 µm, comme c'est le cas de tous les designs imprimés durant cette thèse, l'impression peut simplement se faire sur une feuille transparente grâce à une imprimante à haute résolution.

Les motifs présentés à la Figure 6 sont ceux de l'une des chambres de réactions du dispositif microfluidique fabriqué durant cette thèse. Il est constitué de 2 chambres de réaction fabriquées indépendamment en PDMS (Polydimethylsiloxane). Les piliers de support présents dans la chambre de réaction servent à supporter la membrane de filtration moléculaire. Enfin, les marques d'alignement sont utilisés dans le but d'aligner les deux chambres de réaction lors de leur superposition. Ce dispositif sera présenté plus en détail au chapitre 5.

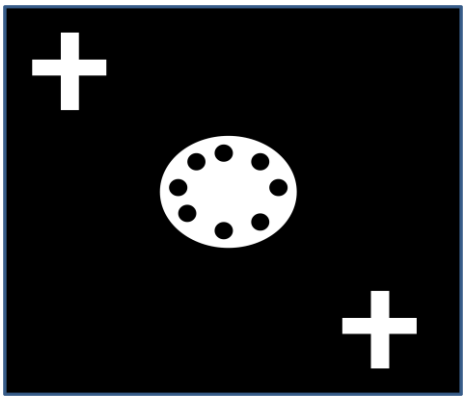


Figure 6 : Masque optique imprimé sur un film photosensible
avec des marques d'alignement (haut gauche et bas droite) et une chambre de réaction et des piliers de support au milieu

iii) Photolithographie est la troisième étape du procédé. L'objectif est de transférer les motifs imprimés (sur un support plan en deux dimensions) sur un support solide en 3D.

Ces opérations se déroulent en salle lithographie (ISO 7)

Matériels :

- *Spin-Coater*
- Plaque en Silice (Wafer)
- Photoresist SU-8 (Résine photosensible)
- Masque
- Plaque chauffante
- Source UV

iii.1) *Spin-Coating* : le wafer est une plaque en silice avec une surface lisse destinée à recevoir la résine photosensible. Avant le dépôt de la résine, cette surface est précautionneusement lavée pour enlever toutes les matières particulaires. Le wafer est ensuite chauffé pour enlever toute trace d'humidité et puis placé sur le *spin-coater*. La résine photosensible est contenue dans une solution composée de solvant et d'additifs destinés à contrôler la cinétique de la résine photosensible. Le photoresist est ensuite déposé sur le wafer et réparti uniformément sur toute sa surface par *spin-coating* (dispersion par rotation, Figure 7). Selon la résine utilisée et l'épaisseur désirée, le catalogue associé permet de choisir la vitesse angulaire adaptée. Les vitesses de rotation appliquées sont comprises entre 1000 et 10 000 tours/minute. Dans le cas d'une double couche de résine, un coefficient de correction est appliqué à la vitesse indiquée pour prendre en compte la différence de rugosité entre la surface lisse du wafer et celle de la première couche de résine.

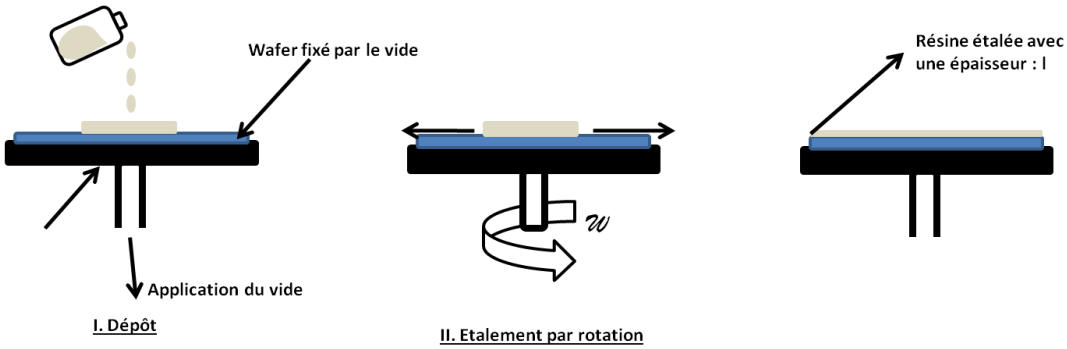


Figure 7 : Etalement de la résine photosensible sur le wafer (*Spin-Coating*)

Le *spin-coating* est suivi du *soft-baking*. Une fois la résine photosensible déposée à l'épaisseur souhaitée, le wafer et la couche de résine subissent un protocole de chauffage destiné à faire évaporer les solvants présents dans la résine et faire adhérer cette dernière à la surface du wafer. Ce chauffage se fait généralement par paliers afin d'éviter un stress thermique. Ce chauffage est effectué à 65°C puis à 95°C à des durées dépendant de la résine.

iii.2) Exposition : elle consiste à exposer la couche de photoresist à la lumière UV à travers le masque optique (Figure 8). Plus le contact entre le masque optique et la couche de photoresist est fort, plus le transfert de motif est précis. Le masque est alors étalé sur une plaque en quartz. L'ensemble est ensuite plaqué contre la couche de photoresist sur le wafer : ce qui assure un fort contact entre la résine photosensible et le masque optique. Selon le type de photoresist choisi (SU-8 2000 par exemple), l'énergie d'exposition est donnée en fonction de l'épaisseur de la couche. La puissance de la lampe UV et l'énergie d'exposition déterminent la durée d'exposition.

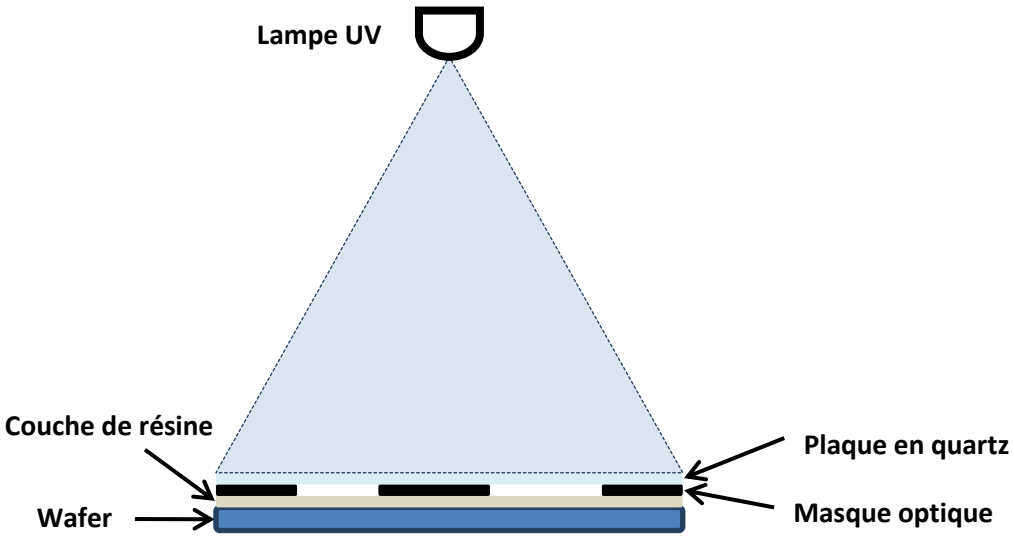


Figure 8 : Exposition de la résine photosensible à la lumière UV à travers le masque optique

iii.3) Développement : avant le développement, un traitement thermique est effectué dans le but de polymériser le photoresist. Le traitement thermique est effectué

par 2 paliers à 65°C, puis à 95°C. Il existe 2 types de résines photosensibles : négative et positive. Pour les résines positives, les parties exposées ne polymérisent pas et sont solubles dans la solution de développement. Par contre, c'est la partie exposée à la lumière UV qui polymérise chez les résines négatives. La suppression des parties non polymérisées dans la solution de développement est la dernière étape du transfert des motifs sur le moule (Figure 9).

Le développement consiste à solubiliser les parties de la couche de résine non polymérisée dans la solution de développement fournie avec le photoresist. Le wafer est placé dans un bécher contenant la solution développeur le tout placé sur un agitateur pour une durée dépendant de l'épaisseur de la couche de photoresist. Le wafer est ensuite retiré et rincé avec la solution de développement, puis avec de l'isopropanol et enfin avec de l'eau. La dernière étape du protocole de photolithographie consiste à chauffer la résine restée sur le wafer, à l'image des motifs du masque optique. Cette dernière étape permet de compléter la polymérisation et la fixation de la résine sur le wafer. Le moule est enfin prêt avec tous les motifs transférés à la surface du wafer. Ces motifs peuvent être reproduits de manière simple et rapide grâce à la réplication par moulage pour fabriquer des dispositifs microfluidiques en PDMS.

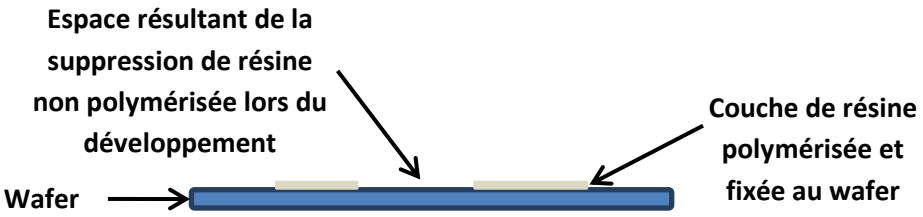


Figure 9 : Wafer et couche de résine après développement

3.3.2 Réplication par moulage

La réplication par moulage, utilisée pour la fabrication de notre dispositif microfluidique, consiste à utiliser le moule fabriqué par photolithographie pour faire des puces en PDMS. Le PDMS est un polymère thermo-réticulant dont le plus utilisé est le Sylgard 184 de *Dow chemical*. La base (oligomère) et l'agent réticulant sont fournis séparément. Ils sont mélangés généralement à une proportion de 10 masses de basse pour une masse d'agent réticulant (rapport base/agent réticulant de 10:1). Le mélange est ensuite versé sur le wafer au-dessus des motifs. Le tout est placé à 70°C pendant 1h pour la polymérisation du PDMS. En durcissant le polymère va reproduire les motifs avec une précision de l'ordre du µm sans se lier au moule, ce qui permet ensuite un décollage simple. Il en résulte un polymère solide, transparent et légèrement élastique contenant à sa surface le négatif du moule (Figure 10).

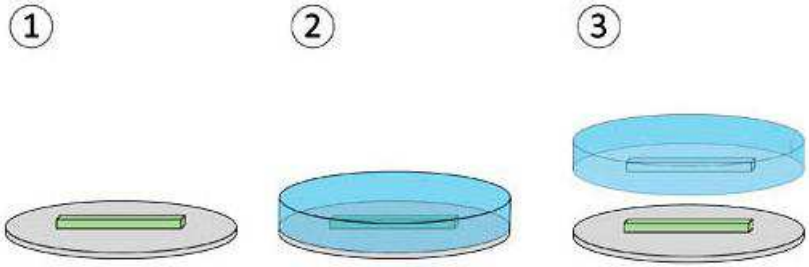


Figure 10 : Schéma de la réplication par moulage
1) Moule 2) Dépôt du PDMS liquide 3) Séparation après réticulation[55]

2.3.3 Collage ou scellage

Après le décollage, le PDMS forme à sa surface des canaux et chambres de réactions microfluidiques ouverts. Le collage vient compléter et donnera des canaux et chambres de réaction fermés. Le collage peut se faire de manière réversible ou irréversible. Une méthode de scellage réversible consiste uniquement à mettre en contact le PDMS à une surface plane (verre, PDMS). En effet des liaisons de Van der Waals vont se former et établir un contact étanche. C'est une méthode collage simple qui ne nécessite pas de traitement de la surface et se fait à température ambiante.

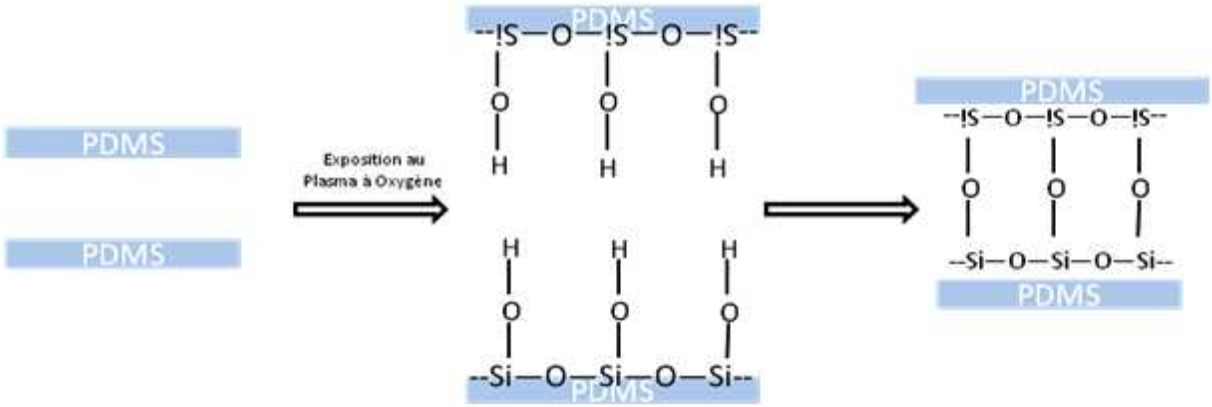


Figure 11 : Scellage irréversible de 2 morceaux de PDMS après exposition au plasma à oxygène

Pour un contact irréversible, le PDMS (ou le verre) doivent être exposé au plasma à oxygène au préalable. La surface du PDMS, une fois traitée au plasma d'oxygène, peut se lier de manière irréversible à un autre morceau de PDMS, de verre, de silicone ou de polyéthylène si ces derniers sont aussi traités au plasma d'oxygène (Figure 11).

3.3.4 Avantages et inconvénients du PDMS

Le premier avantage du PDMS est sa capacité à reproduire les motifs d'un moule à une précision de l'ordre du micron. Il reste liquide à température ambiante et ne nécessite pas une très haute température pour sa polymérisation. La polymérisation se fait à 70°C pendant une heure, ce qui donne un polymère solide transparent et facilement séparable du moule. La réplication par moulage en utilisant en utilisant le PDMS se fait donc rapidement et ne nécessite pas de lourdes installations. Le PDMS présente beaucoup

d'avantages du point de vue de la fabrication et de ses propriétés. Cependant, les caractéristiques de sa surface peuvent poser un certain nombre de problèmes vis-à-vis de certaines applications comme l'analyse des protéines (Tableau 4).

Les propriétés uniques du PDMS viennent de la combinaison d'une ossature en siloxane inorganique et de groupes organiques méthyl liés au silicium. La formule chimique du PDMS est : $CH_3[Si(CH_3)_2O]_nSi(CH_3)_3$, n étant le nombre de répétition du monomère. Il est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique et biomédicale. Pour les applications microfluidiques, il est vendu en kit composé de la base qui est du PDMS liquide (n faible) et de l'agent réticulant qui est un mélange de complexe de platine et copolymère de methylhydrosiloxane et dimethylsiloxane. Une fois ces composants mélangés et chauffés à 70°C pendant une heure, le mélange liquide de départ devient solide. La polymérisation se fait suite à la réaction entre les groupes vinyle (SiCH=CH2) et hydrosilane (RRR-SiH). Lors de sa réticulation, le PDMS épouse les motifs d'une surface plane ou non plane ayant des structures complexes. Sa faible densité d'énergie surfacique est un avantage car elle facilite la séparation du PDMS du moule après la réticulation.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du PDMS (PolyDimethylSiloxane)

Etapes	Avantages	Inconvénients
Fabrication	Bas coût Elasticité Faible densité surfacique d'énergie Stabilité chimique (ne réagit pas avec le moule) Non hygroscopique (pas de gonflement dû à l'humidité) Stabilité thermique (>186°C) Faible conductivité thermique Collage avec le verre ou du PDMS (Scellage des canaux et chambres microfluidiques)	Matière molle (ratio H/L limité 0.2–20, 0.5– 200, and 0.5–200 µm,) Précision (Elasticité et expansion thermique empêche d'atteindre une plus grande précision du type nanofabrication)
Application	Perméabilité aux gaz Transparent en dessous de 300 nm (Intégration méthode de détection optique) Modifications des propriétés de surface Elasticité	Hydrophobicité de la surface Non compatibilité avec certains solvants non polaires Faible conductivité thermique

3.3.5 Traitement de surface

Le PDMS est aujourd'hui le polymère le plus utilisé notamment pour les applications biologiques. La biocompatibilité, la transparence et la perméabilité aux gaz du PDMS en ont fait un matériau de choix pour les applications en biologie cellulaire et moléculaire[53]. Cependant, la surface du PDMS est hydrophobe par défaut. Ce qui entraine des rétentions par interaction hydrophobe d'un certain nombre de biomolécules comme les protéines. Il est donc important de réaliser un traitement de surface de manière à atténuer la rétention hydrophobe qui peut être importante vu le rapport surface/volume des dispositifs microfluidiques. Les techniques de modification de surface du PDMS peuvent être divisées en 2 catégories : les modifications physiques consistant à saturer la surface du PDMS avec une molécule par interaction hydrophobe ou électrostatique et les modifications covalentes.

Le traitement de surface par adsorption physique est très utilisé dans le domaine de l'électrophorèse capillaire notamment pour la suppression du flux électroosmotique ou pour atténuer l'adsorption des protéines sur les parois des micro-canaux. L'exemple le plus répandu est la saturation des parois hydrophobes avec la BSA (Albumine de sérum bovin) du fait de la simplicité du protocole. D'autres protéines comme l'avidine peuvent aussi être utilisées pour rendre les parois hydrophiles[56]. Cependant, cette approche n'est pas très adaptée pour les dispositifs microfluidiques destinés à l'analyse des échantillons protéiques complexes avec la spectrométrie de masse comme méthode de détection. Ces protéines n'étant pas irréversiblement liées de façon covalente, la protéine utilisée pourrait être libérée durant l'analyse. Elle pourrait alors saturer l'échantillon et masquer les protéines d'intérêt au niveau de la détection par spectrométrie de masse. Pour éviter cela, des polymères ou des tensioactifs peuvent être utilisés à la place des protéines. Les tensioactifs sont des molécules possédant une extrémité hydrophobe (ou apolaire) et une extrémité hydrophile (ou polaire). Elles sont retenues par interaction hydrophobe sur la paroi tandis que l'extrémité hydrophile permet ensuite de réduire les interactions hydrophobes avec les protéines. Les surfactants choisis devront être compatibles avec la spectrométrie de masse. Le DDM (n-dodecyl-β-D-maltoside) a été utilisé pour traiter la surface du PDMS pour le rendre hydrophile et réduire considérablement la rétention du BSA et de l'avidine incubé pendant 5 minutes dans un canal microfluidique[57]. Le Tween 20 et certains poloxamères fluorés F68 et F127 (Pluronic) permettent de réduire la rétention non spécifique des protéines jusqu'à 80% après une adsorption à 20°C pendant 24h[58].

Il est possible d'activer la surface du PDMS par exposition au plasma d'oxygène, UV/ozone ou à une décharge corona. Le plasma d'oxygène est l'une des approches les plus utilisées. Il contient des espèces chimiques de très haute énergie comme des électrons, des ions et des radicaux qui vont fortement oxyder les espèces organiques (groupement methyl) de la surface. Exposer la surface du PDMS à un plasma d'oxygène permet de la rendre hydrophile (SiMe ==>SiOH) du fait de la présence de groupe silanol SiOH ==>SiO^- + H^+. Cependant, la surface du PDMS traité uniquement par exposition à un plasma d'oxygène ne reste pas longtemps hydrophile ; au bout de 30 minutes elle recouvre 50% environ de son hydrophobicité. Maintenir la surface du PDMS traité en contact avec de

l'eau milli-Q permettrait de la garder hydrophile plus longtemps[52]. Il est aussi possible de profiter de la réactivité des silanols générés par le plasma pour fonctionnaliser la surface du PDMS. Cette étape d'activation appelée aussi oxydation est préalable à la mise en place de couches auto-assemblées (*Self assembled monolayer*). La surface du PDMS traitée avec du plasma peut être maintenue hydrophile par exposition au PEG (polyEthylène Glycol) silane pendant 2h[59]. Le traitement de surface du PDMS peut aussi se faire après le collage (fermeture des canaux). Passer une solution acidifiée d'eau oxygénée dans les canaux microfluidiques fermés permet de les oxyder et d'activer la surface du PDMS hydrophile. Elle peut ensuite être fonctionnalisée par salinisation puis recouvert avec le PEG[60].

3.4 Couplage à la spectrométrie de masse

Il est aussi possible d'ajouter un tip à la puce pour son couplage à la MS[61]. Cette approche est très adaptée aux puces fabriquées en PDMS. Le couplage le plus simple reste par ailleurs le fait d'utiliser le prolongement du micro-canal comme une source ESI en prenant le soin d'intégrer une microélectrode dans la puce pour l'application du voltage[62].

Les plateformes microfluidiques destinés à la protéomique intègrent rarement des moyens de détection directs. Ceci s'explique par la complexité des échantillons protéiques qui ne peuvent être analysés par les moyens de détection intégrés classiques. Un échantillon complexe comme un extrait protéique total de cellule de levure est caractérisé par un grand nombre de protéine de taille et de concentration très variables. Par ailleurs, contrairement à l'ADN, il n'existe pas encore de technique d'amplification des protéines. Une grande sensibilité de détection est donc nécessaire pour analyser les protéines de faible abondance[63]. L'option de couplage du dispositif microfluidique à un spectromètre de masse est en général celle qui est retenue afin de pouvoir bénéficier d'une sensibilité de détection ainsi qu'une grande gamme dynamique pour la détection et la quantification du plus grand nombre de protéine. Des approches ont ainsi été développées pour coupler les puces microfluidiques directement à la MS[61]. Ce couplage direct permet d'éviter une manipulation manuelle des peptides ou protéines issus d'un protocole miniaturisé avant leur analyse en MS. Des méthodes ont été développées pour coupler les puces microfluidiques aussi à une source ESI qu'à une source MALDI.

3.4.1 Couplage à une source MALDI

Les plateformes microfluidiques peuvent être couplés aux sources ESI et MALDI. Le couplage avec une source MALDI ne se fait qu'en mode *off-line* (hors ligne) car les protéines ou peptides doivent être co-cristallisés avec une matrice absorbant l'énergie du laser incident. Le couplage avec le MALDI présente l'avantage d'être plus tolérant aux contaminants comme le sel. Le caractère hors ligne permet aussi d'éviter les problèmes d'incompatibilité entre les solvants utilisés dans la puce et la spectrométrie de masse. Des dispositifs microfluidiques permettant d'effectuer des étapes de préparation d'échantillon, réactions protéolytiques, préparation et dépôt sur des cibles MALDI intégrées ont été développés. Gustafsson et al., ont mis au point un dispositif microfluidique en forme de CD dans le but de dessaler les peptides issus d'une digestion en utilisant de la phase inverse

intégrée à la puce. L'élution des peptides et le dépôt de matrice se font directement sur un réservoir ouvert intégré à la puce et donc accessible au laser de la source MALDI[43]. Cependant la plupart des puces microfluidiques sont dotées de canaux fermés et donc inaccessibles au laser. Plusieurs approches ont été mises en place pour coupler les canaux microfluidiques fermés à la source MALDI. Cependant, ces solutions sont généralement difficiles à mettre en œuvre.

3.4.2 Couplage à une source électrospray (ESI)

Les meilleures performances de la protéomique par spectrométrie de masse sont atteintes par l'approche chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par la source nanospray[64]. Vu les similarités qu'il ya entre le HPLC et les puces microfluidiques (débit, linéarités), le nanospray est l'approche la plus adaptée pour un couplage robuste entre la microfluidique et la spectrométrie de masse. De ce constat sont nés plusieurs développements visant à trouver la meilleure configuration pour ce couplage. Les méthodes de couplage entre dispositifs microfluidiques et spectromètre de masse peuvent être classées en 3 catégories : spray à partir du canal microfluidique directement, spray à partir d'un tip conventionnel intégré à la puce et enfin spray à partir d'un tip micro-usiné (Tableau 5 et Figure 12) [65]. La qualité du spray dépend du matériau dont la surface externe doit être hydrophobe pour limiter la mouillabilité et éviter la dispersion du liquide. Par ailleurs de meilleures performances sont observées avec des tip ayant une forme conique. Une alternative est d'intégrer un tip conventionnel directement à la puce[39].

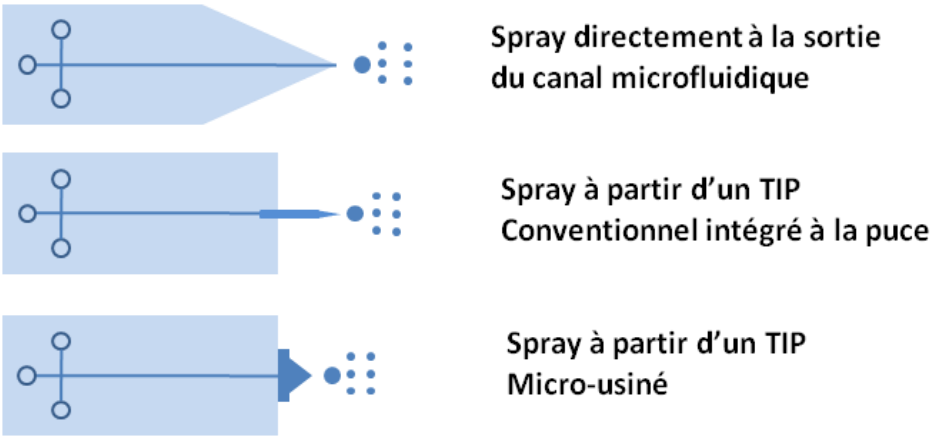


Figure 12 : Approches de couplage de dispositifs microfluidiques à la MS par électrospray

Spray direct : c'est le couplage le plus simple. Il consiste à utiliser le prolongement du micro-canal comme une source ESI en prenant le soin d'intégrer une microélectrode dans la puce pour l'application du voltage[62]. Ce dernier possède une surface hydrophobe. C'est aussi un polymère qui peut être facilement découpé pour obtenir une forme conique. Cependant, cette approche produit un spray instable et est peu sensible. Ces contre performances sont souvent dues à un matériau (hydrophile) et une géométrie (non-conique) inadaptés. Wang *et al.*, ont opté pour un couplage direct et un spray à partir du bord de la puce. Le matériau de la puce étant hydrophile, la sortie du canal microfluidique a été recouverte avec un polymère hydrophobe le polytetrafluoroethylene (PTFE)[66].

TIP conventionnel intégré : l'utilisation d'un composant externe, inséré à la puce microfluidique pour servir d'émetteur électrospray est une bonne alternative face aux faibles performances du spray direct. L'émetteur externe peut être une fibre microstructurée ou un simple capillaire. L'utilisation d'un capillaire doté d'un revêtement avec des particules d'or a permis le couplage d'une unité de digestion sur puce à la MS[67]. Cette approche présente une sensibilité satisfaisante mais elle est caractérisée par un volume mort entrainant une perte de résolution pour les puces intégrant une unité de séparation.

TIP micro-usiné : les meilleures performances du couplage d'une puce microfluidique à la MS sont obtenues avec les TIP micro-usinés directement à la sortie de la puce en choisissant la forme géométrique et le matériau les plus adaptés. Cette approche est cependant peu répandue du fait des exigences nécessaires à sa fabrication. Le couplage entre une puce et la MS repose essentiellement sur l'intégration d'un émetteur avec un voltage élevé sans ou avec un très faible volume mort[11]. Un protocole d'intégration d'un tip conventionnel à une puce microfluidique sans volume mort est proposé par Dietze *et al,*. il consiste à aligner le masque optique et le capillaire émetteur sur la résine photosensible en amont de la polymérisation[68]. Si un polymère hydrophobe comme le PDMS est utilisé pour la fabrication de la puce et du tip, il n'est pas nécessaire de traiter la surface externe du tip[69]. La plupart des approches proposées n'offre pas de résultats leur permettant de rivaliser avec les méthodes conventionnelles.

Tableau 5 : Approches de couplage des dispositifs microfluidiques à la spectrométrie de masse

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Spray à partir d'un micro-canal	Facile, rapide	Instabilité, Dispersion du volume, Sensibilité faible, perte en résolution
TIP conventionnel intégré	Sensibilité	Volume mort, perte en résolution
TIP micro-usiné	Pas de volume mort, spray stable	Fabrication complexe, besoin d'une salle blanche

Chapitre 4 : Applications microfluidiques en protéomique

Ces dernières années, la rapidité et la sensibilité des appareils en MS ont fortement progressé. La nanoLC, caractérisée par l'utilisation de colonnes plus longues avec des particules de plus petite taille, s'est développée dans le même temps. La combinaison de ces avancées a permis une meilleure couverture du protéome. L'ajout d'un mode de fractionnement à pH basique (*High pH Reversed phase*) permet, avec 50 fractions, d'identifier jusqu'à 8400 protéines à partir 100 µg d'échantillon[70]. Cependant, pour mieux étudier l'hétérogénéité cellulaire, il est nécessaire de travailler avec moins d'échantillon. Pour cela, les protocoles d'analyse doivent être plus intégrés pour gagner en sensibilité. La miniaturisation, avec sa capacité d'intégrer plusieurs réactions chimique et biochimique dans un petit volume, est une piste sérieuse pour la réduction de la consommation en échantillon. L'application de la microfluidique à la protéomique a permis la publication de plusieurs dispositifs microfluidiques destinés à la miniaturisation de tout ou une partie d'un protocole d'analyse des protéines. La miniaturisation de l'approche *bottom-up* présente plus d'intérêt car elle est couramment utilisée mais aussi par ce qu'elle présente une étape de préparation d'échantillon plus longue. Le dispositif microfluidique idéal devrait permettre de miniaturiser complètement l'approche *bottom-up* de la culture cellulaire à l'injection des peptides en MS. Malgré tous les avantages qu'il offrirait, ce type de dispositif n'existe pas encore[71]. Cependant, différents dispositifs microfluidiques ont permis la miniaturisation de la lyse cellulaire, la purification des protéines, la digestion et la séparation. L'intégration de toutes ces dispositifs en un seul n'est pas encore réalisée.

Le dispositif microfluidique présenté à la Figure 13 devrait permettre de miniaturiser l'ensemble des étapes d'un protocole *bottom-up*. Il est inspiré des dispositifs microfluidiques publiés dans la littérature[72,74,77] et ayant permis de miniaturiser une partie du protocole *bottom-up*. Une première chambre de réaction (3) permettrait de faire de la culture cellulaire ou d'exposer des cellules à des réactifs. Après la lyse cellulaire, les protéines seraient purifiées avec phase solide du type C4. Cette phase permettra aussi d'effectuer les réactions de réduction, d'alkylation et digestion des protéines. Les peptides issus de cette digestion vont ensuite être séparés sur une colonne C18 intégrée à la puce. Un TIP intégré à la puce permettra de coupler la micropuce directement au spectromètre de masse. La miniaturisation des différentes étapes est déjà réalisée mais leur association sur une même puce résulterait en une micropuce complexe.

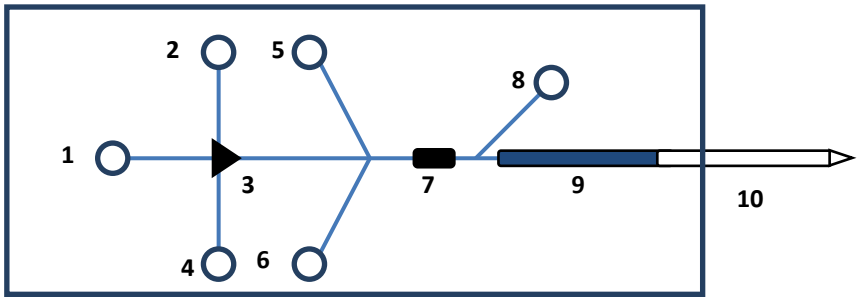


Figure 13 : Schéma de principe d'une microchip en protéomique
1 Tampon; 2: Poubelle; 3: Culture cellulaire; 4: tampon de lyse; 5: Réactifs (DTT, IAM); 6: enzyme de digestion; 7: Phase solide retenant les protéines pour les réactions et la digestion; 8 :poubelle; 9 : colonne de séparation; 10: Tip intégré pour couplage à la SM

La miniaturisation des protocoles d'analyse protéomique peut être réalisée à travers la microfluidique classique, la microfluidique en gouttes et des approches de miniaturisation ne faisant pas appel à la microfabrication.

4.1 Préparation de l'échantillon

La première étape d'une étude protéomique est l'extraction des protéines à partir d'échantillons biologiques (cellules, tissu, fluides biologiques). L'extraction des protéines peut être réalisée par destruction de la membrane cytoplasmique par des méthodes chimique, mécanique, thermique ou optique. C'est une étape très importante car elle détermine la quantité réelle et la diversité des protéines analysées. Miniaturiser cette étape est donc d'une grande importance. Cependant, il n'est pas aisé de miniaturiser la lyse cellulaire dans un dispositif microfluidique. En effet, les débris libérés lors de la lyse cellulaire peuvent entrainer un colmatage.

La lyse chimique : c'est la plus simple méthode à mettre en œuvre dans les canaux microfluidiques. L'une des stratégies les plus simples consiste à piéger les cellules grâce à un réseau de piliers par exemple (Figure 14). Elles sont ensuite lysées en les mettant en contact avec une solution chimique adéquate. Cette stratégie a été mise en place par Hellmich *et al.* en utilisant une solution de SDS 5% pour la lyse cellulaire en 6 secondes[72]. Cette approche est avantageuse dans sa simplicité de mise en œuvre et sa rapidité. Cependant, elle demande une grande résolution pour la microfabrication d'un réseau de piliers capables de piéger une particule de la taille d'une cellule. L'utilisation d'un détergent comme le SDS n'étant pas compatible avec une détection par MS, une étape de purification est nécessaire avant l'analyse en MS. L'ajout d'un compartiment de purification rend la micropuce plus complexe.

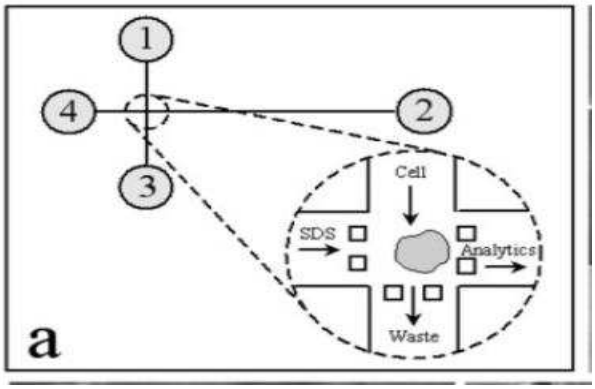


Figure 14 : Réseaux de piliers dans un canal microfluidiques pour le piégeage et la lyse d'une cellule[72]

La lyse mécanique : la compression et la friction sont des actions mécaniques qui peuvent être utilisées pour la lyse cellulaire. Elles sont même nécessaires pour la lyse de certaines cellules comme les levures (Saccharomyces cerevisae). L'utilisation conventionnelle de billes de verre pour générer de la friction menant à la lyse cellulaire a été par ailleurs adaptée dans une plateforme microfluidique en forme de disque en utilisant des billes aimantées soumises à un champ magnétique et un mouvement de rotation (Figure 15). Ce système a permis l'extraction protéique de cellules de levure mais avec une efficacité qui ne représente cependant que 65% de celle de l'approche classique[73]. D'autres dispositifs microfluidiques mettent en œuvre des structures pointues pour percer les cellules ou encore des pièges pour lyser les cellules par compression[74].

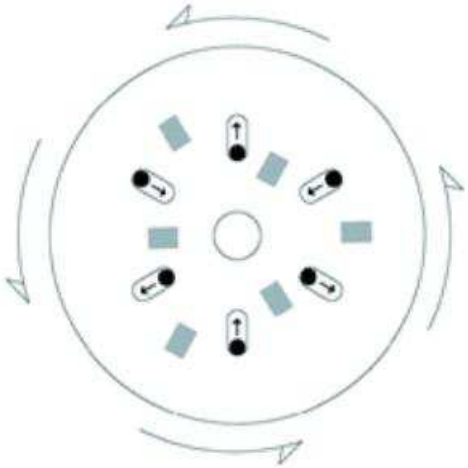


Figure 15 : Schéma du Compact CD permettant de réaliser mécanique grâce au mouvement des billes aimantés en fonction de la rotation et du champ magnétique[74]

La lyse cellulaire dans les dispositifs microfluidiques peut aussi se faire par voie électrique, thermique ou optique (laser). Ce sont cependant des méthodes complexes nécessitant l'intégration d'électrodes (électrique, thermique) ou d'installation couteuse (source laser).

Cependant, la lyse cellulaire dans un canal microfluidique entraine souvent une dilution de l'échantillon d'où la nécessité d'intégrer des unités de concentration et de purification de l'échantillon. Par ailleurs, une purification de l'échantillon est souvent nécessaire pour

la suppression des composants cellulaires inutiles ou même nuisibles (contaminants, sels..) pour la suite du protocole d'analyse. L'ajout d'une unité de concentration rend la micropuce plus complexe mais elle est nécessaire notamment pour l'analyse d'échantillons complexes. Il existe des dispositifs microfluidiques pour la concentration et la purification d'échantillon protéique mais il en existe peu capables de miniaturiser à la fois la lyse cellulaire, la concentration et la purification de l'échantillon. Les méthodes utilisées pour concentrer l'échantillon sont basées sur des techniques comme la dialyse, l'extraction sur phase solide SPE, la précipitation des protéines ou encore la centrifugation. Plusieurs dispositifs microfluidiques destinés à la concentration et à la purification des échantillons protéiques sont basés sur la dialyse.

Il est en effet possible d'intégrer directement une membrane de dialyse dans un dispositif microfluidique permettant la concentration de l'échantillon jusqu'à 600 fois[75]. L'isotachophorèse est aussi une des méthodes très utilisées pour la concentration de protéines dans un micro-canal. Elle permet de concentrer un échantillon jusqu'à 1000 fois[76]. Les phases d'extraction hydrophobes ou échangeuses de cations sont très utilisées vu la facilité de leur intégration dans les dispositifs microfluidiques. Une phase SCX a été utilisée par Ethier *et al.*, pour retenir, concentrer et purifier les protéines. La digestion est effectuée directement sur la phase par ajout de trypsine. Les peptides générés sont ensuite élués avec une solution de bicarbonate d'ammonium [77].

La plupart des dispositifs microfluidiques dédiés à la lyse cellulaire s'arrêtent à cette fonction. Il est cependant nécessaire de rajouter des étapes de concentration et purification des protéines pour les rendre plus utiles et développer d'avantage le concept de Lab-on-chip en protéomique. Ce type de couplage serait d'une grande utilité en protéomique sur cellule unique[78].

4.2 Digestion

La protéomique *bottom-up* est aujourd'hui considérée comme la technique d'analyse des protéines par spectrométrie de masse la plus robuste. Cette robustesse est acquise grâce à la digestion permettant de générer des peptides. L'analyse des peptides plutôt que les protéines a plusieurs avantages : une plus grande efficacité de séparation en chromatographie liquide, une plus faible masse moléculaire menant à moins d'état de charge et donc à plus de sensibilité en spectrométrie de masse[79]. La digestion est généralement effectuée avec la trypsine dont la spécificité des sites de coupure facilite l'identification des protéines. La digestion enzymatique des échantillons complexes se fait sur une durée de 16h en général et constitue donc l'une des étapes les plus importantes à miniaturiser pour accélérer le protocole d'analyse par *bottom-up*. La miniaturisation est l'une des pistes les plus sérieuses pour l'accélération de la digestion. En effet concentrer protéines et enzymes dans un petit volume permettrait d'accélérer la digestion. On peut classer les approches de digestion-sur-puce en 2 catégories principales : d'un côté celle basée sur l'utilisation d'enzyme immobilisée et de l'autre celle faisant appel à une enzyme non immobilisée.

4.2.1 Digestion sur puce avec enzyme non immobilisée

L'enzyme non immobilisée pour la miniaturisation de la digestion est utilisée en microfluidique en gouttes, digital et aussi en microfluidique continue mais généralement associée à une fixation des protéines sur une phase solide. La digestion en microfluidique en gouttes se fait généralement sur une protéine purifiée. Ji *et al.*, ont proposé un dispositif microfluidique pour la digestion séparée de protéines issues d'une séparation chromatographique[80] (Figure 16). Cette technique a été appliquée avec succès à un mélange de 3 protéines standards. Les peptides générés par la digestion peuvent détectés en ligne via une source ESI ou stockés puis analysés par MALDI. Il existe peu d'exemple de digestion en microfluidique en gouttes du fait de la nécessité de travailler avec des échantillons purifiés et de l'absence de possibilité de concentrer ou séparer les peptides après la digestion. Le Tableau 6 présente les performances de dispositifs microfluidiques en goutes et digital.

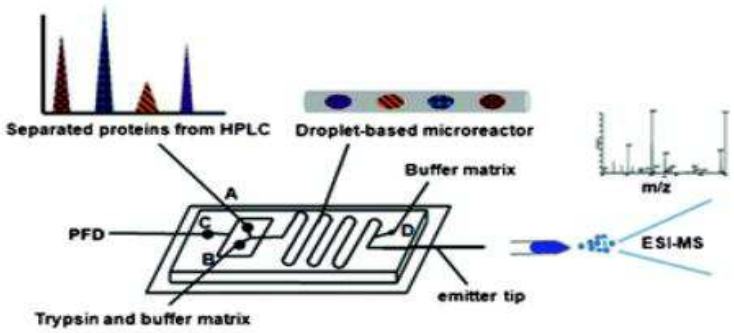


Figure 16 : Dispositif de microfluidique permettant de digérer séparément et en ligne des protéines issues d'une séparation chromatographie[80]

4.2.2 Digestion sur puce avec enzyme immobilisée

La grande majorité des digestions sur puce se fait avec l'utilisation d'enzyme immobilisée. Par ailleurs, l'enzyme immobilisée est aussi utilisée dans la digestion conventionnelle en solution. Elle permet d'augmenter la surface de contact entre protéines et enzymes et donc accélérer la digestion tout en limitant les phénomènes d'autodigestion[82]. Les enzymes de digestion comme la trypsine ou la pepsine peuvent être immobilisées sur des billes aimantées[83], une membrane en PVDF [84] ou encore sur les parois des dispositifs microfluidiques en PDMS [85]. Une autre approche consiste à immobiliser à la fois l'enzyme et les protéines sur une phase solide, généralement une phase SCX (phase d'échange de cation, particulaire, Sigma-Aldrich)[77]. Cette approche permet de réaliser les réactions de réduction et d'alkylation directement sur la puce avant la digestion[86].

Les dispositifs les plus performants sont basés sur l'utilisation d'enzymes immobilisées sur phase solide (Figure 17). D'ailleurs, des échantillons complexes ont pu être digérés sur ce type de dispositif.

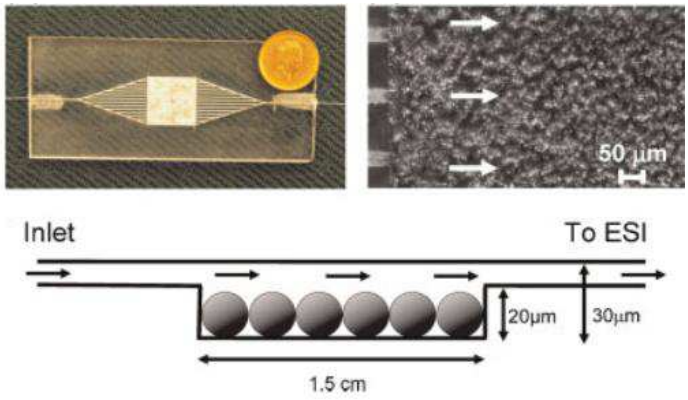


Figure 17 : Exemples de dispositifs microfluidiques intégrant des billes fonctionnalisées[87]

Les dispositifs microfluidiques basés sur les enzymes immobilisés présente généralement une digestion plus rapide (10s-15 minutes) et sont souvent réutilisables[87]. Cependant, l'intégration des billes dans la puce peut parfois être complexe. Des rétentions non spécifiques ainsi que des effets de mémoire (carry-over) sont parfois observés avec ces dispositifs[80].

Tableau 6 : Dispositifs microfluidiques dédiés à la digestion et basés sur l'immobilisation de l'enzyme

Auteurs	Temps de digestion	Ratio Enzyme/protéine	Pourcentage de couverture	Echantillon
Qifeng et al(1997)	10-40 min	1/300	100% à 40 min	Melitin
Ethier et al (2006)4	2h	1/5	205 protéines identifiées	Extrait cellulaire
Ji *et al.*, (2008)[80]	5 sec protéine std	44% BSA	BSA	BSA /191 protéines /macrophage de souris
Luk and Wheeler[121]	10-50 min	1/5	90 %	BSA - Insuline
Liuni et al (2010)[122]	4-15 sec	Enzyme fixée	88-99%	Mb-Ub-BSA
Wang *et al.*, 2010[67]	3 min	Enzyme fixé	85%	Cytochrome C
Ruijun Tian et al (2011)[123]	1h	1/5	60%	BSA
Kecskemeti*et al.*, 2017[80]	5-10 s	Enzyme fixé	29-50%	

La miniaturisation de la digestion ne passe pas toujours par un dispositif microfluidique. Elle peut passer, par exemple, par l'utilisation d'une boucle d'injection comme un mini-réacteur. Chen*et al.*, ont présenté un dispositif appelé iPAD (*Integrated Proteome Analysis Device)* permettant de réaliser la lyse cellulaire et la digestion des

protéines dans une boucle d'injection reliée, grâce à une vanne, à une phase C4 pour la concentration des peptides et une colonne C18 pour leur séparation. Ce système a permis l'identification de 635 protéines à partir de 100 cellules[88]. Ce sont des systèmes qui sont généralement sensibles mais présentent le désavantage d'être complexes dans leur mise en place et le fonctionnement.

4.3 Séparation et couplage à la spectrométrie de masse

Les unités de concentration peuvent avoir différents rôles dans une plateforme microfluidique pour l'analyse des protéines. Elles sont indispensables pour l'analyse des échantillons protéiques complexes. Elles peuvent être utilisées en amont de la digestion pour la purification et l'élimination de contaminants. En aval de la digestion, elles permettent de reconcentrer les peptides générés et de constituer une unité de séparation dans le cas de dispositifs directement couplés à la spectrométrie de masse. L'extraction sur phase solide (SPE) est peut-être l'approche la plus utilisée pour la concentration et la purification d'échantillon dans les dispositifs microfluidiques[65]. La phase solide peut être intégrée au dispositif microfluidique sous forme de particules[89,90]ou polymérisés directement[9192] dans le microcanal. Ces particules sont généralement fonctionnalisées pour des interactions hydrophobes, échange d'ion... Des fonctionnalisations spécifiques peuvent être utilisées dans le but de cibler certaines modifications post-traductionnelles.

La configuration idéale et la plus adaptée à notre étude est un dispositif dont le design permettrait de purifier et concentrer l'échantillon avec un couplage à la spectrométrie de masse. En protéomique *top-down*, les dispositifs microfluidiques sont utilisés pour la purification et la séparation des protéines avant leur analyse en spectrométrie de masse. L'intégration de 2 membranes de microdialyse en sandwich dans une puce en polycarbonate présentée par Xiang *et al.* permet de supprimer les petites et grosses molécules indésirables par dialyse. Le dispositif couplé à la MS permet d'analyser les protéines directement[93]. Lion et al., ont utilisé une membrane ayant des propriétés hydrophobes, le PVDF, intégrée dans un dispositif microfluidique couplé à la MS pour le dessalage de protéines avant leur analyse directe[94]. Une séparation est par ailleurs nécessaire quand il s'agit d'échantillons complexes ou de peptides issus de la digestion d'une protéine. Les débits utilisés en microfluidique sont de l'ordre du µL/min et sont donc très adaptés à une source d'ionisation par électrospray. Certains dispositifs microfluidiques sont aussi adaptés aux sources MALDI. Plusieurs applications microfluidiques dotées d'une source ESI ont été développées et même commercialisées. L'ionisation par nano-électrospray est l'approche la plus prometteuse pour une interface robuste entre la microfluidique et la spectrométrie de masse. En effet, Agilent a commercialisé une puce microfluidique en polyimide dotée d'une unité de séparation en phase inverse et d'une source nanoESI intégrée. Ce système a permis l'analyse de peptides tryptiques de BSA avec des performances similaires à celles de la nanoLC classqiue[95]. Les puces microfluidiques fermées ne sont pas accessibles aux lasers pour une désorption

MALDI. La source MALDI est par ailleurs utilisée sur les systèmes miniaturisés à surface ouverte ou en encore sur les systèmes rotatifs[96].

La protéomique *bottom-up* est un protocole d'analyse long et complexe qu'il serait avantageux de miniaturiser. Cependant, c'est cette complexité même qui rend sa miniaturisation délicate. L'intérêt de la miniaturisation de ce protocole se manifeste depuis plusieurs années par le développement de plusieurs dispositifs destinés à la protéomique.

Pour miniaturiser le protocole de protéomique *bottom-up*, il faudrait une plateforme microfluidique permettant une lyse cellulaire, la rétention des protéines pour les concentrer et les purifier, puis l'ajout de réactifs et le changement de tampon pour la réduction, l'alkylation et la digestion des protéines, ensuite une séparation et des peptides générés et enfin dotée d'une source pour une analyse directe en spectrométrie de masse. Il existe aujourd'hui différentes unités ayant permis de miniaturiser ces étapes mais pas une seule plateforme intégrant toutes ces unités. Quelques rares exceptions permettent de faire dans la même puce la concentration et la purification de l'échantillon, la réduction, l'alkylation des protéines et la digestion. Par ailleurs, la grande majorité des systèmes destinés à la miniaturisation de ces différentes étapes se limitent à des preuves de concept. En effet, ils se limitent souvent à une application sur un échantillon simple composé d'une seule protéine ou d'un mélange de 3 protéines standards.

Chapitre 5 : Design et fabrication d'un dispositif pour la protéomique *bottom-up*

Comme annoncé dans le chapitre 1, une modification du protocole OcSILAC s'impose avant sa miniaturisation. C'est en effet la première étape de ce projet de thèse dont le but est de trouver une alternative à la précipitation des protéines. L'extraction des protéines est généralement suivie par des étapes ayant comme but d'éliminer certains composés indésirables présents dans l'échantillon. Il s'agit de sels et d'autres biomolécules inutiles et parfois indésirables pour la suite du protocole d'analyse des protéines. L'une des approches les plus utilisées consiste à provoquer la précipitation des protéines en ajoutant un acide comme le TCA. Une centrifugation permet de provoquer l'accumulation des protéines au fond du tube et l'élimination du surnageant contenant les composés indésirables comme les sels. L'ajout de solvant organique comme l'acétone renforce la précipitation par attraction électrostatique. En effet, l'acétone froid est utilisé pour éliminer le TCA après la précipitation des protéines. La précipitation acide des protéines (TCA) a été comparée à d'autres méthodes comme l'ultracentrifugation, la précipitation au chloroforme/méthanol au sulfate d'ammonium ou à l'acétone. Elle présente l'avantage d'être simple mais entraine des pertes d'échantillon visibles sur un gel 2D[97].

Ce chapitre aborde les différentes initiatives entreprises pour trouver une alternative à la précipitation acide des protéines. Notre approche de départ, pour miniaturiser le protocole OcSILAC, consistait à trouver une phase solide sur laquelle les protéines pourraient être retenues pendant que le traitement chimique des protéines (Alkylation, réduction et marquage)est réalisé. Une rétention spécifique permettrait en effet que les réactifs en excès ainsi que les contaminants puissent être rincés rapidement sans entrainer de perte d'échantillon. Après le traitement chimique, les protéines sont digérées directement sur la phase solide. Les peptides générés sont ensuite élués et analysés en LC-MS/MS. Dans ce chapitre sont présentés les tests de rétention des protéines en utilisant les phases classiques d'extraction sur phase solide. Il aborde aussi l'adaptation du protocole OcSILAC sur Microcon avec la méthode FASP. Finalement, le choix avait été fait de concevoir un dispositif microfluidique intégrant une membrane de filtration moléculaire et inspiré de la méthode FASP. Les différentes étapes de fabrication de ce dispositif appelé *Chipfilter* sont détaillées dans ce chapitre.

5.1 Alternatives à la précipitation acide des protéines

Pour éviter cette étape de précipitation, notre approche consiste à utiliser un support solide pour fixer de manière spécifique les protéines contenues dans un échantillon tout en laissant les sels et autres molécules à éliminer passer à travers le support sans être retenues. Les réactions d'alkylation, de réduction et de marquage seraient directement sur les protéines fixées. Une élution serait réalisée après la digestion des protéines.

5.1.1 Utilisation des phases classiques d'extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide est très utilisée en dans les étapes de préparation d'échantillon en protéomique. Cependant, elle est souvent associée à une analyse ciblée. Les protéines sont des biomolécules qui peuvent être retenues par des interactions hydrophobes (SPE à polarité de phase inversée), ionique (SPE d'échange d'ions), ou par rétention par affinité... Cependant, l'utilisation de ces propriétés est plus évidente au niveau peptidique qu'au niveau de la protéine entière[79].

La première piste que nous avons envisagée est l'utilisation de phases classiques pour la l'extraction sur phase solide (SPE) comme alternative à la précipitation des protéines. Nous avons ainsi testé certaines phases à polarité inversée, la phase SCX avec des propriétés d'échange de cation et l'oasis MCX (Waters) qui possède à la fois des propriétés de phase à polarité inversée et d'échange de cation. Un test de rétention de la BSA a été effectué en utilisant ces 3 phases. Les performances de la phase MCX pour la rétention de la BSA se sont montrées supérieures à celles des autres phases.

Deux protocoles ont été testés pour la rétention des protéines sur la phase MCX. La différence entre ces protocoles concerne le conditionnement de la phase[77] avant le chargement des protéines. En effet, la phase est conditionnée dans le premier protocole avec du méthanol et dans le deuxième avec de l'acide citrique tamponné à pH=3. Dans le cas du conditionnement avec du méthanol, la cartouche est rééquilibrée avec de l'eau Milli-Q. Après le conditionnement, le protocole est identique. Après avoir passé l'échantillon à travers la cartouche, des solutions d'ammonium bicarbonate de 200 et 500 mM ont été utilisées pour tester la rétention des protéines en condition basique. Pour finir, on procède à l'élution des protéines avec une solution de méthanol 70%. Un dosage protéique BCA est réalisé sur l'ensemble des phases recueillies durant le protocole.

On observe une meilleure rétention suite à un conditionnement avec de l'acide citrique. En effet, plus de 90% de la quantité d'échantillon chargée au départ (200 µg) reste retenue sur la phase lors du chargement, malgré le changement de pH pour être élué à la fin avec 70% de méthanol.

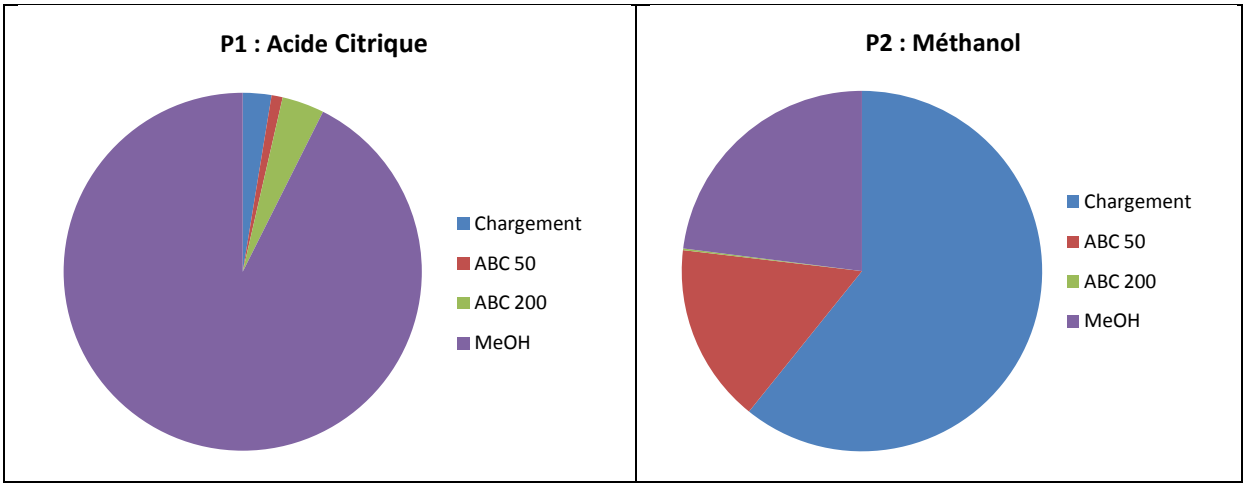


Figure18 : Test de rétention échantillon standard BSA, répartition de la quantité de BSA initialement chargée dans les différentes solutions utilisées après rétention de la BSA sur la phase Oasis MCX (P1 acide citrique, P2 méthanol)

Au vu de ces résultats, la phase MCX a été testée pour la rétention des protéines d'un échantillon complexe et leur digestion. Le test consiste à charger l'échantillon de protéines contenues dans un tampon d'acide citrique sur une cartouche d'oasis MCX conditionnée avec le même tampon. Ensuite les réactifs dissouts dans un tampon d'ammonium bicarbonate pour la réduction, l'alkylation et le blocage des cystéines sont ajoutés successivement. Ensuite, de la trypsine dans une solution de tris-HCl à pH=8 est ajoutée pour la digestion. Pour finir les peptides sont récupérés durant l'élution avec une solution de méthanol 70%. Les résultats de ce protocole exempt de précipitation acide des protéines ont été comparés à ceux issus du même échantillon traité par le protocole OcSILAC classique. Pour cela, 200 µg de protéine marquée (lourd, H) sont traités par OcSILAC classique et la même quantité de protéine non marquée (léger, L) est traitée et digérée sur la cartouche MCX. Les peptides générés des 2 protocoles sont à la fois analysés séparément et mélangés à volume égal avant d'être analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La comparaison du nombre de protéines identifiées que le protocole OcSILAC permet d'identifier un plus grand nombre de protéines malgré les précipitations acides. En réalisant la distribution des rapports lourd/léger (peptide identifié OcSILAC/peptides identifiés par MCX), il apparait que le protocole OcSILAC permet d'identifier plus de peptides et avec des intensités plus élevées. Ces observations pourraient être expliquées par une capacité de rétention de la phase MCX moins performante quand il s'agit d'échantillons complexes.

5.1.2 Utilisation d'une membrane de filtration moléculaire

La préparation d'échantillon par ultrafiltration (*Filter-Aided Sample Preparation* FASP) est une méthode de préparation d'échantillon mise au point dans le but de faciliter l'élimination des détergents après l'extraction et la solubilisation des protéines. Elle consiste à utiliser une membrane de filtration moléculaire en cellulose régénérée permettant de retenir certaines molécules selon leur taille et d'en éliminer d'autres par ultrafiltration. Ces membranes sont aujourd'hui commercialisées avec différents seuils de filtration : 3, 10 et 30 kDa. La membrane avec un seuil de filtration de 10 kDa permet de retenir toutes molécules dont la taille dépasse 10 kDa tandis que celles dont la taille est en dessous ne sont pas retenues. Utilisée en protéomique, elle permet de retenir les protéines dont la grande majorité est à plus de 10 kDa tandis que les détergents (comme le SDS), les réactifs (IAM, DTT, biotin-HPDP 600 Da) et les contaminants (sels) pourront être éliminés de l'échantillon par ultrafiltration. L'utilisation de cette membrane de filtration peut être résumer comme suit : i) rétention des molécules dont la taille est supérieure au seuil de filtration de la membrane de filtration moléculaire (>10 kDa, les protéines), ii) éliminations des molécules de petite qui passeront à travers la membrane sans être retenues (sels), iii) ajout de la trypsine sur la membrane pour la digestion des protéines retenues et en fin iv) récupération des peptides générés par la digestion par l'enzyme trypsine. Les peptides générés par une digestion tryptique sont généralement inférieur à 4000 Da[79] et pourront donc passer à travers la membrane de filtration moléculaire.

Suite à la digestion qui sera effectuée directement sur la membrane, les peptides générés seront de taille assez petite pour passer à travers la membrane et être récupérés par ultracentrifugation. L'utilisation de cette méthode à travers les Microcon® (Merck) constitue une alternative à la précipitation acide des protéines. Dans un premier temps, il était impossible d'effectuer le protocole OcSILAC par FASP car le dimethylformamide (DMF) utilisé pour la dissolution de la biotine-HPDP EZ-link (Thermofisher) était incompatible avec la membrane de filtration en cellulose régénérée.

Des tests ont été effectués dans le but de comparer cette méthode de rinçage à la précipitation acide. Dans un premier temps, la variation de la méthode FASP est étudiée en analysant 5 fois le même échantillon pour comparer les intensités moyennes des peptides identifiés pour chaque analyse. La variation est comparée à celle obtenue avec la même démarche mais pour un échantillon traité en ayant recours à la précipitation acide des protéines pour le rinçage. On observe alors une meilleure reproductibilité avec les échantillons traités par FASP.

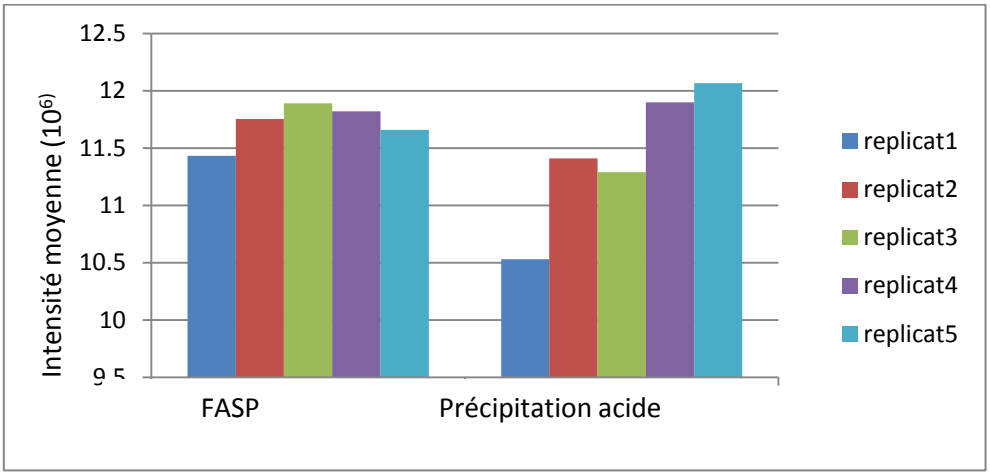


Figure 19 : Distribution des intensités moyennes des peptides identifiés par FASP et précipitation TCA pour 5 analyses

L'utilisation de la biotine-HPDP-WS qui est soluble dans l'eau ne nécessitant pas l'utilisation du DMF permet d'adapter le protocole OcSILAC complètement par FASP. Des versions lourde et légère (marquée et non marquée) d'extrait protéique de levure ont été respectivement traitées par FASP et par précipitation acide. Cette approche a permis de comparer le nombre de peptides identifiés en tenant compte de la distribution de la taille de ces peptides. Ce qui a permis d'observer que la méthode FASP permettait d'identifier plus de peptides que l'approche par précipitation acide des protéines et ce dans toutes les gammes de masse. Ce qui montre que la filtration moléculaire offre un taux effectif de récupération des peptides par ultracentrifugation après la digestion.

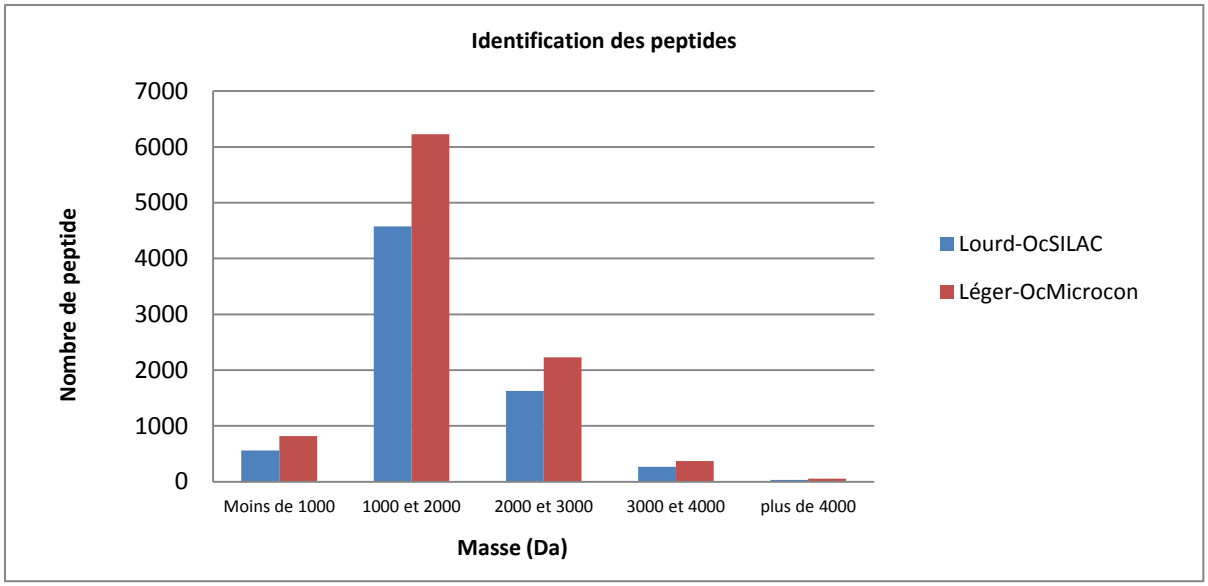


Figure 20 : Comparaison du nombre de peptides identifiés (organisés par gamme de masse) par FASP et par précipitation TCA dans la fraction non retenues (NotBound)

Dans la fraction retenue (Bound) contenant essentiellement les peptides portant une cystéine initialement oxydée, le nombre de peptide identifié est plus grand avec la méthode FASP. Ceci pourrait signifier que la méthode FASP induit plus d'oxydation durant la préparation d'échantillon. Cette tendance étant aussi observée dans la fraction non retenue, cela pourrait s'expliquer par le fait que la méthode FASP offre une meilleure couverture du protéome. Cette observation est d'ailleurs déjà mentionnée dans la littérature[98]. Pour évaluer la collecte des peptides tryptiques avec la méthode FASP, les Microcon® utilisés sont rincés avec une solution de méthanol 70%. Ce rinçage a pour but d'évaluer le nombre de peptides qui reste adsorbés sur la membrane ou les parois des tubes Microcon®. Le méthanol est ensuite évaporé avant d'analyser la solution de rinçage en LC-MS/MS. La figure 18 montre la comparaison entre les peptides identifiés dans l'élution et dans la solution de rinçage. On peut constater qu'un nombre important de peptides restent adsorbés dans le Microcon et ne sont pas collectés. Cependant, malgré cela la méthode FASP offre quand même une meilleure couverture du protéome que la précipitation acide (TCA).

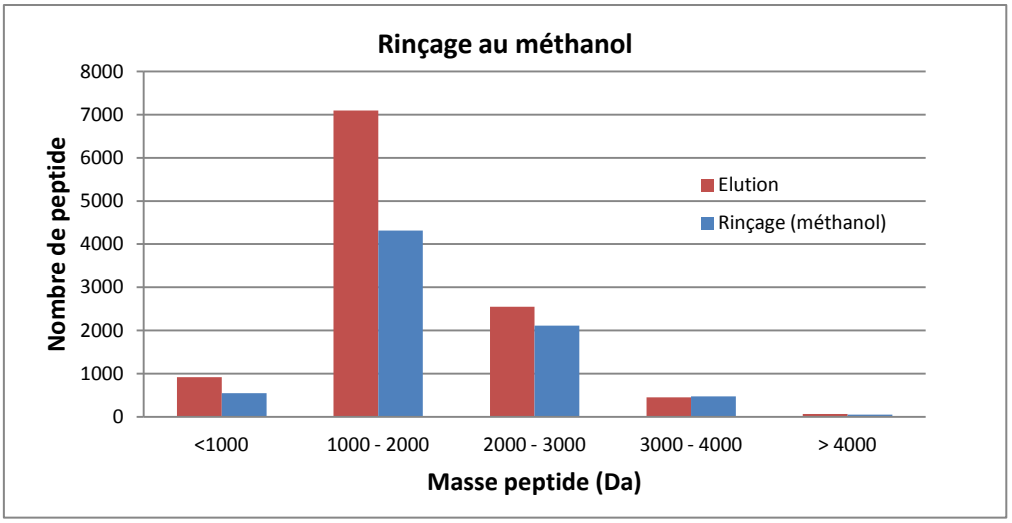


Figure 21 : Nombre de peptides identifiés suite au rinçage (méthanol 70%) des Microcon® après élution, Comparaison avec le nombre de peptide identifié dans l'élution

La méthode FASP se présente comme une bonne alternative à la précipitation acide car elle offre une meilleure reproductibilité et une meilleure couverture du protéome. Cependant, elle ne réduit pas la quantité d'échantillon et de réactif par rapport à la précipitation acide. Elle entraine une légère augmentation du coût des manips avec l'achat des Microcon® qui ne sont pas réutilisables d'ailleurs.

5.2 Fabrication d'un dispositif microfluidique intégrant une membrane de filtration moléculaire

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il n'existe pas encore de dispositif microfluidique capable d'intégrer toutes les étapes de préparation d'échantillon pour une analyse protéomique. Il existe des puces microfluidiques dédié à la miniaturisation de la purification des protéines, de la digestion et à la séparation de protéines ou de peptides protéolytiques. Cependant la grande majorité de ces puces se limitent aux preuves de concepts et n'offre pas d'applications pour des échantillons complexes comme un extrait protéique total. Au vu des avantages de la méthode FASP par rapport à la précipitation acide des protéines, nous avons décidé de nous inspirer de cette approche pour la miniaturisation du protocole de préparation d'échantillon en protéomique *bottom-up*. Durant cette thèse, nous avons développé un dispositif microfluidique appelé *ChipFilter* intégrant une membrane de filtration moléculaire en cellulose régénérée. Le *ChipFilter* permet d'effectuer l'extraction protéique, la purification et la concentration des protéines, les réactions d'alkylation, de réduction et de marquage et enfin la digestion. Le dispositif, en PDMS, est fabriqué par photolithographie douce.

5.2.1 Réalisation du masque

La réalisation du masque est la première étape dans le processus de fabrication d'un dispositif microfluidique par photolithographie douce. Cependant, cette étape doit être abordée avec une idée précise du design de la puce. Dans la première version de la puce, une membrane en disque de 2 cm de diamètre a été utilisée. Quatre chambres de réaction

de 5 mm de diamètre se partageant la même membrane ont été conçues. Ce design a ensuite été changé car la capillarité entrainait le mélange entre les membranes des différentes chambres de réaction. Un système de découpe de la membrane de filtration sans l'endommager a été mis en place dans le but d'avoir des disques de différent diamètre et de la taille de la chambre de réaction. Nous avons imaginé une puce microfluidique composée de 2 chambres de réaction de 4mm de diamètre et séparées par la membrane de filtration moléculaire. Chaque chambre de réaction est fabriquée séparément et l'assemblage se fera ensuite effectuée à l'aide d'un microscope pour gagner en précision dans l'alignement.

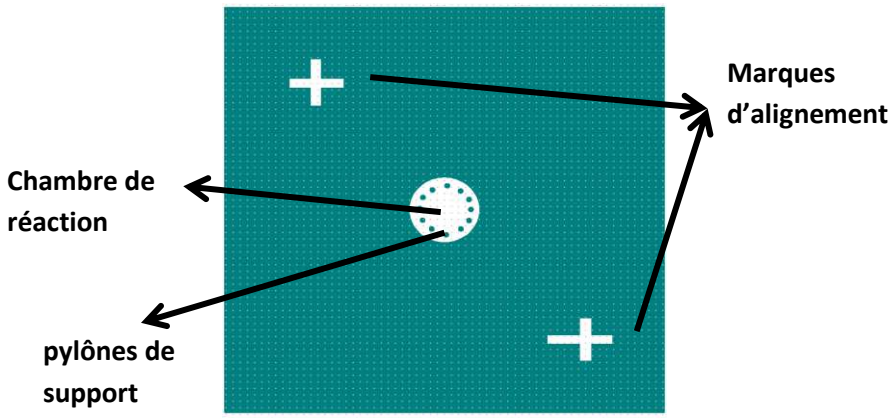


Figure 22 : Masque d'une chambre de réaction de 4 mm de diamètre avec les pylônes de 150 µm de diamètre destinés à soutenir la membrane; Les marques d'alignement utilisées lors de l'assemblage

Cette première version de la puce microfluidique n'a pas passé les tests de filtration. Ces derniers consistent à comparer le contenu en protéine d'une solution avant et après être passée à travers la puce. Ceci signifie que la solution ne passe pas à travers la membrane mais arrive à la contourner. Il a donc été décidé d'effectuer une photolithographie douce à double couche dans le but d'intégrer des structures pour l'amélioration de l'étanchéité. Il faudra alors 2 masques pour chaque chambre de réaction : l'un pour les pylônes et la chambre de réaction et l'autre pour les structures destinées à l'intégration de la membrane et à l'amélioration de l'étanchéité.

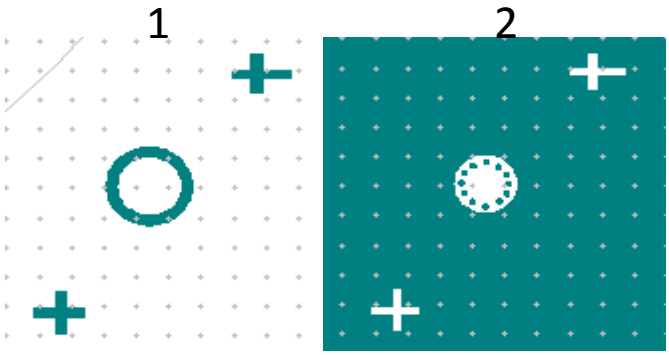


Figure 23 : Masques pour la réalisation du *ChipFilter*
1 Structures destinées à l'intégration de la membrane et à l'étanchéité
et 2 : pour la chambre de réaction

Les masques sont ensuite imprimés sur un film photosensible à haute résolution (25 400 dpi) grâce à un photoplotter FilmStarPLUS.

5.2.2 Fabrication du moule

Le moule a été fabriqué par photolithographie douce double couche en utilisant un support en silice appelé wafer, 2 couches de résine photosensible (résine négative SU-2000) et 2 masques imprimés sur un film photosensible. Il est ensuite utilisé pour la fabrication de la puce par réplication par moulage en PDMS. Pour commencer, la première couche de résine est faite avec de la résine négative SU-2007 étalée par rotation (spin-coating) à une vitesse de 2000 tr/min pendant 15 s pour obtenir une épaisseur de 8 µm. Cette couche est destinée à l'intégration de la membrane et son épaisseur est égale à celle de cette dernière. Après l'étalement de la première couche sur le wafer, l'ensemble est chauffé à 95°C pendant 2 minutes. La résine est ensuite exposée à la lumière UV à travers le masque 1 en utilisant l'aligneur UV-KUB2 (LED, 23.4 mW/cm^2, 120 mJ/cm^2, 5 secondes). Les motifs du masque 1 sont ainsi transférés sur le moule qui va être à nouveau à 95°C pendant 2 minutes. Ensuite la seconde couche de résine, du SU-2050, est étalée par rotation à 4080 tours/minute pour une épaisseur de 50 µm au-dessus de la première. Le masque 2 est aligné sur les motifs du premier sont les motifs sont déjà visibles sur le wafer à l'aide aligneur UV-KUB3.Le wafer, couvert maintenant de couches de résine est exposée à la lumière UV (LED, 40 mW/ cm^2, 160 mJ/ cm^2, 4 secondes). Le motif est chauffé une seconde fois pour fixer tous les motifs transférés. Pour finir, le wafer est plongé dans une solution fournie avec la résine appelé développeur dont le rôle est de dissoudre toutes les parties de la résine qui n'ont pas été exposées à la lumière UV. On obtient alors un moule en 3D résultant des motifs des 2 masques.

Pour avoir la puce en PDMS, les motifs du moule 3D sont reproduits par réplication par moulage. Pour cela, la base et l'agent réticulant du PDMS sont mélangés (PDMS Sylgard 181, rapport base/agent réticulant : 10:1). Le mélange est ensuite dégazé et déposé sur le moule. L'ensemble est placé dans un four réglé à 70°C pendant une heure pour la réticulation du PDMS.

5.2.3 Insertion de la membrane et assemblage

Une fois réticulé, le PDMS démoulé et découpé donne les chambres de réaction et les marques d'alignement comme présenté à la figure 24. Un accès est fabriqué dans chaque chambre de réaction par poinçonnage. Afin d'obtenir une connexion étanche entre le ChipFilter et la pompe microfluidique et la LC, le diamètre utilisé lors du poinçonnage doit être légèrement inférieur au diamètre externe des capillaires. L'élasticité du PDMS réticulé permet d'obtenir cette connexion étanche sans utiliser de produits adhésifs. Le poinçonnage est réalisé avant le traitement du PDMS au plasma.

Avant l'assemblage, la membrane est disposée sur la zone prévue à cet effet au-dessus d'une chambre de réaction. Elle couvre alors cette chambre de réaction et les marques permettront de s'assurer de la superposition des 2 chambres de réaction en utilisant un microscope.

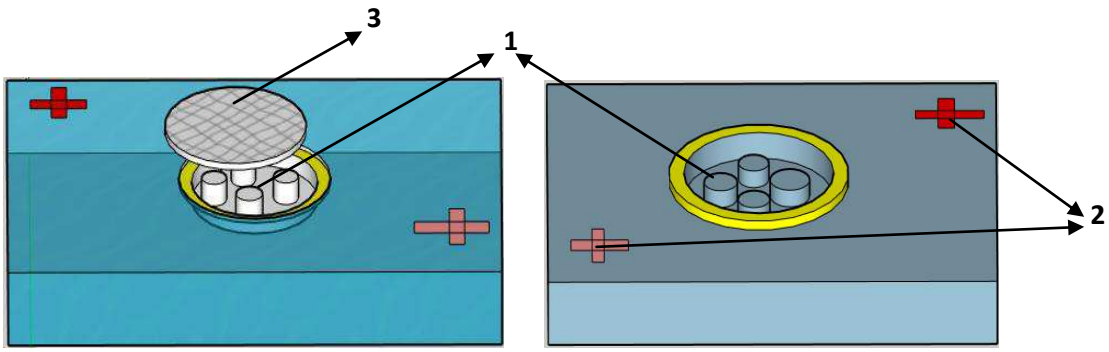


Figure 24 : Assemblage des 2 chambres de réaction et de la membrane
Illustration de 2 chambres de réaction et leurs microstructures en PDMS avant leur assemblage : 1 chambres de réaction avec les pilonnes de support; 2 : marques d'alignement; 3 : membrane de filtration

Le PDMS présente l'avantage de pouvoir se coller sur lui-même une fois sa surface traitée avec un plasma d'oxygène. Ce point est crucial dans la conception de notre dispositif microfluidique. Avant d'être mis en contact, les 2 morceaux de PDMS sont exposés à un plasma d'oxygène (20 W, 8 sccm débit d'oxygène et 0.13 mbar de pression) pendant 1 minute. Ils sont ensuite mis en contact avec la membrane de filtration minutieusement déposée au-dessus d'une chambre de réaction. Les propriétés élastiques du PDMS aidant, les 2 morceaux sont pressés l'un contre l'autre et chauffés au four pendant 20 minutes à 90°C. Cette approche permet un collage entre les 2 morceaux de PDMS tout autour de la membrane en cellulose régénérée.

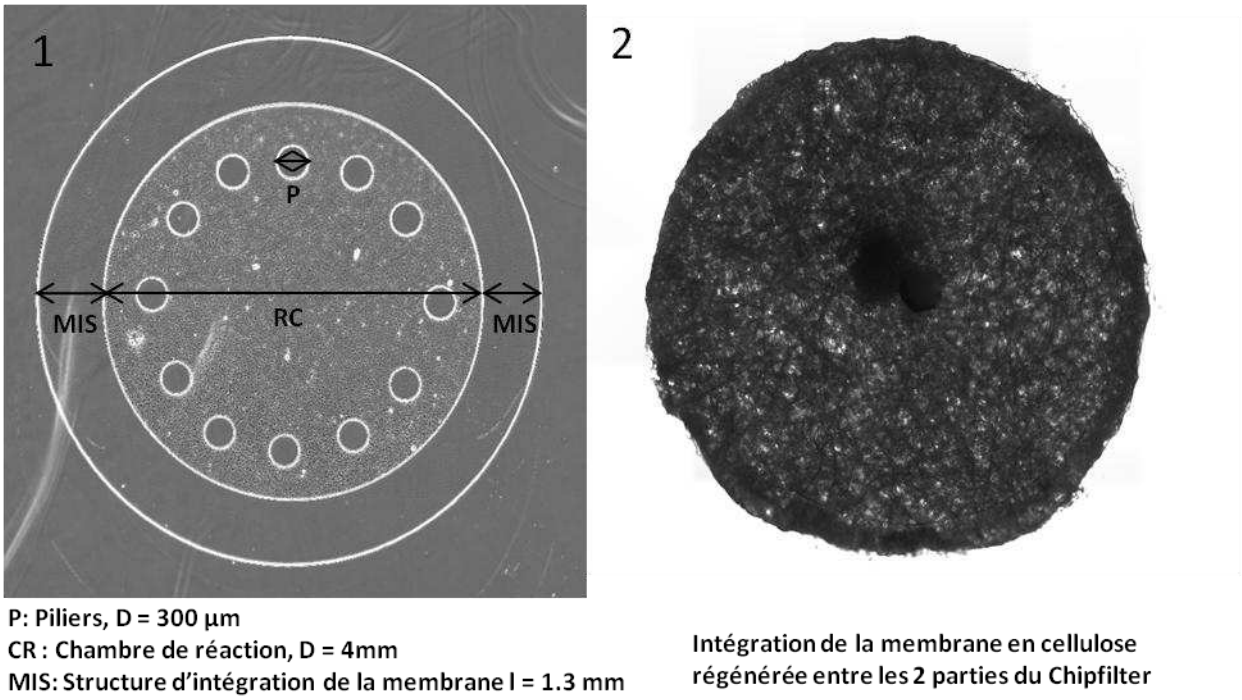


Figure 25 : Images au microscope confocal du Chipfilter avant collage 1), de la membrane de filtration après intégration. 3) image d'un Chipfilter prêt pour l'utilisation avec ses capillaires en PEEK

5.2.4 Test de rétention des protéines

Après l'assemblage de la puce, on évalue la rétention des protéines avec un test de filtration. Un échantillon de BSA (1 mg/mL) est chargé dans la puce et le volume sortant est recueilli. Si la puce est étanche, la solution passe obligatoirement à travers la membrane impliquant ainsi la rétention des protéines. Il est alors possible de récupérer les protéines retenues sur la membrane en faisant passer de l'eau Milli-Q dans le sens inverse de celui du chargement. Pour vérifier cela, la BSA est dosée dans la solution retenue lors du chargement, dans la solution percolée et collectée et dans l'échantillon avant chargement. Les dosages ont été effectués à l'aide d'un Nanodrop 1000 (ThermoFisher). Les résultats montrent que la rétention des protéines est effective car la solution filtrée présente une absorbance similaire au blanc (figure 22). Le dosage de la solution de récupération montre qu'environ 80% de la quantité de BSA chargée

initialement dans la puce a pu être récupérée. La non récupération de l'intégralité de la solution chargée initialement peut être expliquée par la rétention non spécifique due à l'hydrophobicité du PDMS. Un traitement de la surface du PDMS pour la rendre hydrophile est donc nécessaire pour l'augmentation de la sensibilité de la méthode.

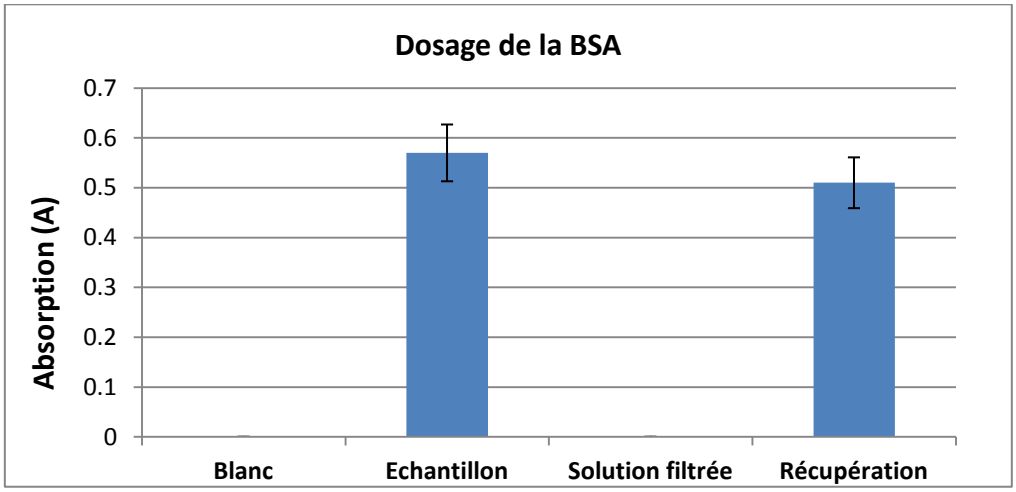


Figure 26 : Test de rétention de la BSA dans la puce (Dosage de la BSA dans un blanc, un échantillon d'1 mg/mL, une solution filtrée et la solution de récupération par percolation inverse) (Absorption UV à 280 nm

Des chambres de réactions de 3, 3.5 et 4 mm de diamètre ont été testées. Celles ayant 4 mm de diamètre ont été finalement sélectionnées car elles engendraient moins de résistance à l'écoulement.

5.2.5 Mise en œuvre du traitement de surface du PDMS

La surface du PDMS est hydrophobe par défaut. Ces propriétés hydrophobes entrainent une adsorption des protéines ou des peptides lors de l'analyse. La perte par adsorption d'une partie de l'échantillon est à prendre en considération pour les dispositifs dédiés à la protéomique d'une part parce que le phénomène est important dans le traitement des protéines mais aussi par ce que dans un dispositif miniaturisé le rapport surface/volume est très élevé.

Plusieurs approches de traitement du PDMS ont été testées durant l'élaboration du *ChipFilter*. Les approches de traitement sur canaux fermés ont été privilégiés. En effet, le traitement hydrophile du PDMS diminue considérablement ses capacités de collage. Or ces dernières sont d'une importance capitale dans l'intégration de la membrane de filtration moléculaire dans le *ChipFilter*.

Silanisation : Le protocole de traitement hydrophile sur canaux fermés le plus utilisé est la silanisation. Il consiste à placer la puce à traiter et un petit volume de silane (TriMethylChloroSilane)dans une enceinte fermée (boite de Petri). Le silane étant très volatile, s'évapore sature l'air et va ainsi pénétrer dans les canaux microfluidiques pour réagir avec la surface du PDMS. Ce protocole a été appliqué au *ChipFilter* mais les analyses comparatives entre puces traitées et non traitées n'ont pas donné de différences significatives. Ceci peut s'expliquer par le fait que la présence de la membrane gène la

circulation de l'air saturé en silane dans les chambres de réaction, ce qui réduit l'accès du silane à la surface du PDMS à l'intérieur du *ChipFilter*

Traitement en solution : Une alternative est la silanisation en solution. Le silane réagit avec l'eau, l'utilisation d'un solvant comme l'héxadecane reste donc la seule possibilité. L'application de ce protocole au *ChipFilter* n'a pas donné satisfaction car l'utilisation du solvant a entrainé une fragilisation des contacts autour de la membrane de filtration. Ce qui fragilise l'étanchéité de la puce et entraine une perte d'échantillon non négligeable lors du traitement sur puce.

Traitement en solution sans solvant : Le PDMS traité avec un plasma d'oxygène devient hydrophile mais de manière temporaire. Il retrouve son hydrophobicité au bout de quelques heures. Une manière de garder ce caractère hydrophile est de le faire réagir par mise en contact avec une solution de PVA (*Poly Vinyl Alcohol*) quelques minutes après l'exposition du PDMS au plasma. Cette approche peut être réalisée sur des canaux ouverts ou fermés. Le traitement sur canaux ouverts présente l'avantage de pouvoir être localisée. Ce protocole a été appliqué durant la fabrication du *ChipFilter* mais des difficultés à confiner la solution uniquement sur la surface des chambres de réaction sans toucher aux bords ont été rencontrées. En effet, la surface du PDMS au bord des chambres de réaction doit rester libre pour le collage et l'étanchéité de la puce.

Le traitement sur canaux fermés en utilisant le PVA entame l'étanchéité de la puce de manière significative car il doit être réalisé juste après le traitement du PDMS au plasma et la fermeture de la puce et l'étanchéité encore fragile dans ces moments est facilement compromise.

Le protocole qui a été retenu a consisté à utiliser le *ChipFilter* le plus rapidement possible après sa fabrication pour profiter de son hydrophilie acquise après le traitement au plasma d'oxygène. Ceci associé à un conditionnement avec une solution d'acide et de détergents (Béta_octyl).

Chapitre 6 : Applications à l'identification des protéines

Le protocole de préparation d'échantillon complexe pour une analyse *bottom-up* est long. Sa miniaturisation dans un dispositif microfluidique n'est pas simple. Outre l'ajout de l'échantillon, au moins 2 réactifs (IAM et DTT) et l'enzyme doivent être ajoutés durant le protocole, puis être éliminés. Ceci implique le développement d'une plateforme microfluidique possédant au moins 5 réservoirs, un système de vanne et un mode d'actuation contrôlable. Une puce microfluidique intégrant toutes ces structures serait complexe aussi bien au niveau de l'usinage qu'au niveau du fonctionnement, et ce notamment pour les études d'optimisation. Nous avons donc opté pour une stratégie plus directe pour évaluer notre dispositif, et de garder la puce microfluidique simple en utilisant des équipements extérieurs pour assurer les fonctions de réservoir, vanne et actuation. Tous ses équipements sont connectés à un ordinateur permettant leur automatisation.

Ce chapitre comprend une description des différents composants microfluidiques utilisés et le montage réalisé pour l'utilisation de la puce. Ensuite, la présentation du protocole de traitement sur puce utilisé est suivie par l'exposition des résultats issus de la digestion de la BSA et d'échantillons complexes. Les performances du *ChipFilter* ont été évalués en le comparant aux méthodes conventionnelles (digestion en solution, FASP). Pour finir, Les résultats de cette comparaison vont aussi être discutés dans ce chapitre.

6.1 Installation microfluidique

6.1.1 Equipements

Pompe et contrôleur de débit : pour le mode d'actuation, nous avons opté pour une pompe externe pour 2 raisons majeures. La première est que la présence de la membrane de filtration moléculaire entraine une résistance hydrodynamique trop importante pour être compatible avec les modes d'actuation par capillarité et par électro-osmose. La seconde raison est liée au besoin de contrôler la pression et le débit durant le protocole de préparation d'échantillon. Le contrôle de la pression permet d'assurer l'intégrité de la puce et de son fonctionnement. Par ailleurs, contrôler le débit permet de calculer la quantité d'échantillon ou de réactif ajoutée et de déterminer le temps d'exposition des protéines à un réactif donné (temps de réaction). Durant cette étude, nous avons utilisé une pompe MFCS et un contrôleur de débit Flow-EZ de Fluigent. Dans l'installation microfluidique définitive, c'est une pompe Flow-EZ associé à un contrôleur de débit Flow-Unit-S qui ont été utilisés. La gamme de pression de la pompe est de 0 à 1000 mbar tandis que le contrôleur de débit fonctionne entre 0 et 7 µL/minute.

Réservoir P-Cap : Les P-Caps sont des accessoires permettant d'utiliser les tubes standards (1,5; 2; 10; ou 50 mL) comme des réservoirs d'échantillon ou de réactifs connectés à un dispositif microfluidique. Ils permettent la pressurisation de ces tubes sans être en contact avec leur contenu.

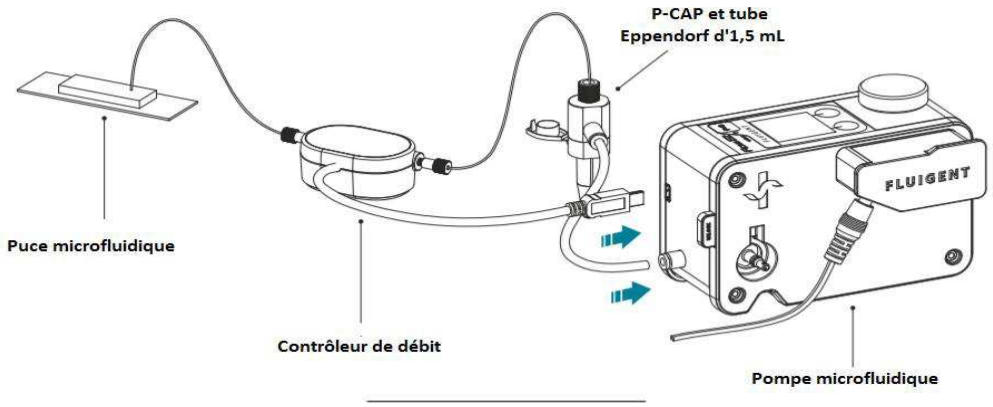


Figure 27 : Montage pour l'actuation du ChipFilter
associant une pompe microfluidique flow EZ, un P-cap et un contrôleur de débit connectés à une puce microfluidique
(Adapté de fluigent.com)

Vanne M-switch : Le M-switch est une vanne possédant une vanne multidirectionnelle, avec 10 entrées et une sortie. Cette configuration permet d'opérer des injections séquentielles depuis 10 réservoirs différents. Ceci permet de réaliser des injections depuis les tubes d'échantillon, de réactifs, d'enzyme et de solution de rinçage pour automatiser le protocole *bottom-up* complètement.

6.1.2 Montage microfluidique

Dans notre montage microfluidique, une pompe Flow-EZ est utilisée pour la génération de la pression. Un split connecté à la pompe permet de pressuriser 4 tubes en même temps. Tous les tubes sont connectés à la vanne M-switch. La sortie de ce dernier est reliée au contrôleur de débit Flow-Unit-S. Le *ChipFilter* est connecté à la sortie du contrôleur de débit.

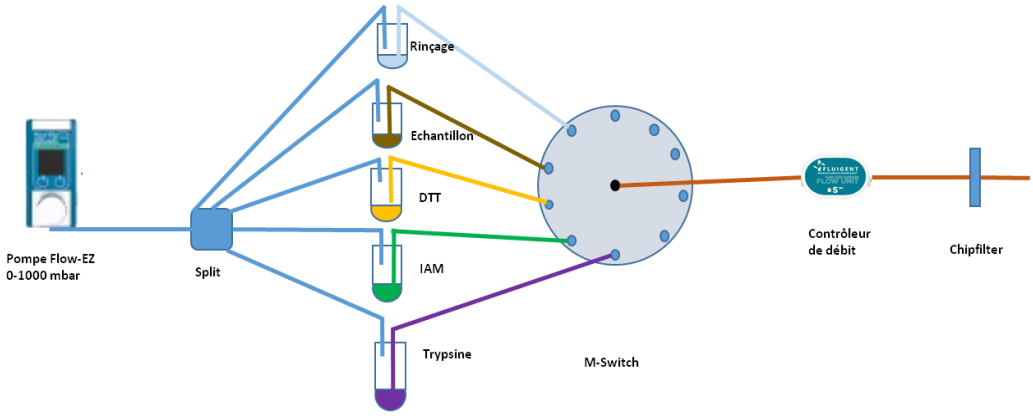


Figure 28 : Montage microfluidique mis en place pour la digestion sur puce

La pompe, la vanne et le contrôleur de débit sont connectés à un ordinateur qui grâce au logiciel *Microfluidic Automation Tool* (MAT) permet d'automatiser complètement leur fonctionnement. Pour les protocoles de digestion, nous avons opté pour le mode *Direct flow control*. Ce mode de fonctionnement consiste à appliquer un débit donné et de laisser la pompe se mettre à la pression la plus appropriée pour se placer à ce débit.

6.1.3 Protocole de digestion sur puce

Pour la digestion sur puce, un protocole automatisable a été développé (voir Figure 29). L'idée était de laisser une très faible pression pour éviter tout reflux pendant les temps d'incubation. Le protocole retenu est détaillé dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Protocole de digestion sur puce

Etapes	Description	Débit (D) et Volume (V)
1) Chargement de l'échantillon	Solution de protéine Standard ou d'extrait protéique solubilisé dans un tampon de lyse	D = 2 µL/min, V : en fonction de la quantité de matériel à traiter
2) Réduction des ponts disulfure	Solution de DTT 20 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 µL/min, V=60 µL, rinçage rapide ii) 1µ/min, V=30 µL
3) Blocage des cystéines pour éviter la reformation des ponts disulfure	Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM	2µL/min, V=60 µL, rinçage rapide 1 µL/min, V=60 µL
4) Rinçage d'excès d'IAM	Tampon d'ABC 50 mM rinçage des réactifs en excès pour préparer la digestion	2 µL/min, V = 60 µL, rinçage pour atteindre les conditions optimales pour la digestion
5) Digestion	Solution de trypsine 0,1 µg/µL dans tampon ABC 50 mM	i) D = 2 µL/min, pour charger la trypsine ii) 0,4 µL/min, V =24 µL soit une heure, durée de la digestion
6) Elution	Solution d'ABC 50 mM	D = 2µL/min, V = 15 µL

Pour commencer, un volume donné d'une solution d'extrait protéique ou de protéine standard est chargé dans la puce à un débit de 2 µL/minute. Pour la réduction et l'alkylation, les réactifs correspondants sont chargés séquentiellement grâce à la vanne de sélection à 10 voies. Ensuite, un rinçage est effectué avec de l'ammonium bicarbonate (ABC) 50 mM, pH 8 pour préparer la digestion. Puis une solution de trypsine de 0.1 µg/µL est chargée à 2µL/min puis le débit est abaissé à 0.4 µL/minute d'une solution d'ABC 50 mM avant de laisser la digestion se faire à faible débit : 0.4 µL/minute avec une solution d'ABC 50 mM. Finalement, l'élution est réalisée en appliquant un débit de 2µL/min.

a) b)

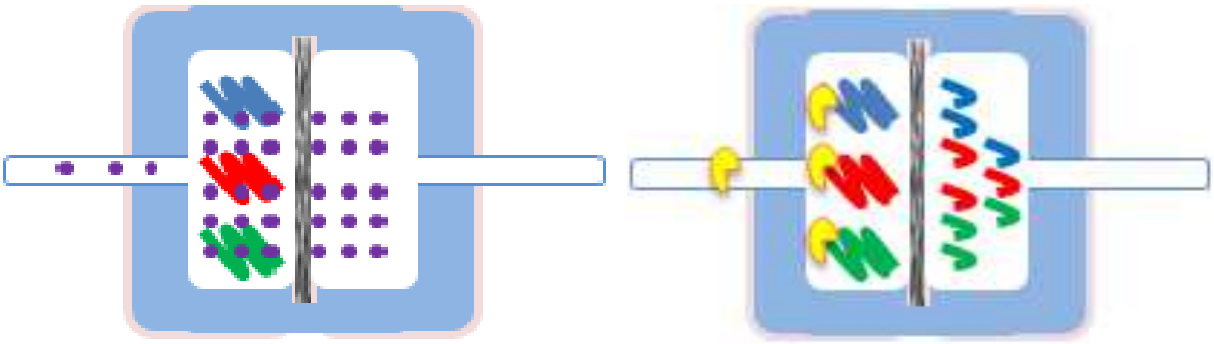


Figure 29 : Principe du fonctionnement du *ChipFilter*
Illustration du fonctionnement de la puce en 2D. En a, on voit la rétention des protéines sur la membrane (en bleu, rouge et vert) tandis que les petites molécules passent à travers (en violet). En b, la trypsine (jaune) et les protéines sont retenues sur la membrane dans un petit volume d'où une digestion rapide, et les peptides protéolytiques associés (de même couleur) à passent à travers la membrane pour être analysés.

6.2 Evaluation de la cinétique et du rendement de digestion sur la BSA

Le protocole a ensuite été appliqué à une protéine standard, la BSA, ou albumine bovine. La BSA est une protéine très utilisée pour les tests de digestion et de séquence parfaitement connue. C'est une protéine de 66.4 kDa possédant 17 ponts disulfure. Elle a été solubilisée dans une solution d'ABC 50 mM pour les tests de la digestion sur puce. Pour les premiers tests de digestion, un volume de 100 µL d'une solution d'1 mg/mL a été chargée dans la puce. Ce qui correspond à 100 µg de protéine digérée. Les concentrations des réactifs sont les mêmes que pour une digestion classique. La réduction est effectuée avec une concentration de 20 mM de DTT et 200 mM d'IAM pour le blocage des cystéines. Le rapport enzyme/protéine appliqué pour une digestion classique est compris entre 1/50 et 1/25. Pour la digestion sur puce de la BSA, un rapport de 1/20 a été appliqué. Ce premier test a donné un pourcentage de couverture de la BSA assez satisfaisant témoignant d'une bonne efficacité de digestion.

6.2.1 Cinétique de digestion dans le *ChipFilter*

Des digestions d'une durée de 10 min, 30 min, 1 heure et 2 heures ont été ont été effectuées et comparées à une digestion sur FASP selon le protocole classique qui se fait sur la nuit. La comparaison s'est effectuée à travers le pourcentage de couverture de la BSA. Pour éviter tout risque de contamination croisée aboutissant à une superposition de signal d'une analyse à l'autre, chaque digestion est effectuée avec une nouvelle puce, leur reconditionnement pour recyclage n'étant pas encore testé et validé. Un pourcentage de couverture de 30% en moyenne est observé pour une digestion de 10 minutes (Figure 30). Le pourcentage de couverture augmente avec la durée pour atteindre 88% pour une heure de digestion, légèrement supérieur au pourcentage obtenu avec la méthode classique qui dure 16 h. La digestion sur puce permet d'obtenir un meilleur pourcentage avec un temps de digestion plus court. Une digestion d'une heure a donc été choisie pour déterminer la sensibilité de la puce en diminuant progressivement la quantité de protéine.

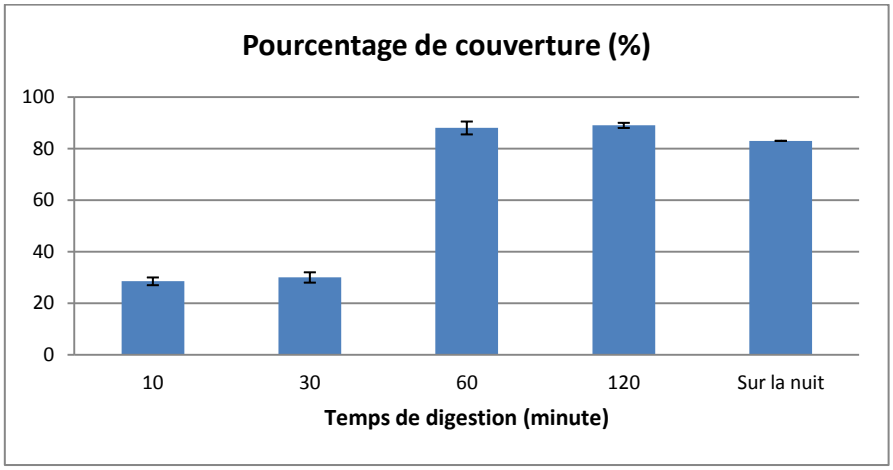


Figure 30 : Pourcentage de couverture de la BSA par traitement de protéolyse sur *ChipFilter*
Digestion sur puce de 10 µg de BSA avec différent temps digestion comparée à la méthode FASP classique qui se fait sur la nuit (soit 16h)

6.2.2. Débit d'élution nécessaire

Afin d'évaluer ce rendement il est aussi indispensable de s'assurer que la collecte des peptides protéolytiques se fait correctement. Des tests supplémentaires ont montré que l'élution des peptides est plus efficace quand elle est effectuée à un débit plus élevé. Dans le protocole initial, l'élution est réalisée à 2 µL/min pour un volume de 15 µL. En maintenant le débit à 2 µL/min après un volume 15 µL, il a été observé que ce volume ne suffit pas pour la collecte de tous les peptides générés par la digestion. Une élution à 2 µL/min reste efficace mais le volume doit être augmenté pour une meilleure élution. La Figure 31 montre le pourcentage de couverture obtenu en réalisant 3 élutions successives de 15µL à un débit de 2µL/min. Ces élutions ont été réalisées suite à un traitement d'un échantillon de BSA, 300 ng. On observe donc qu'un volume d'élution de 15µL ne suffit pas pour la collecte de l'ensemble des peptides générés.

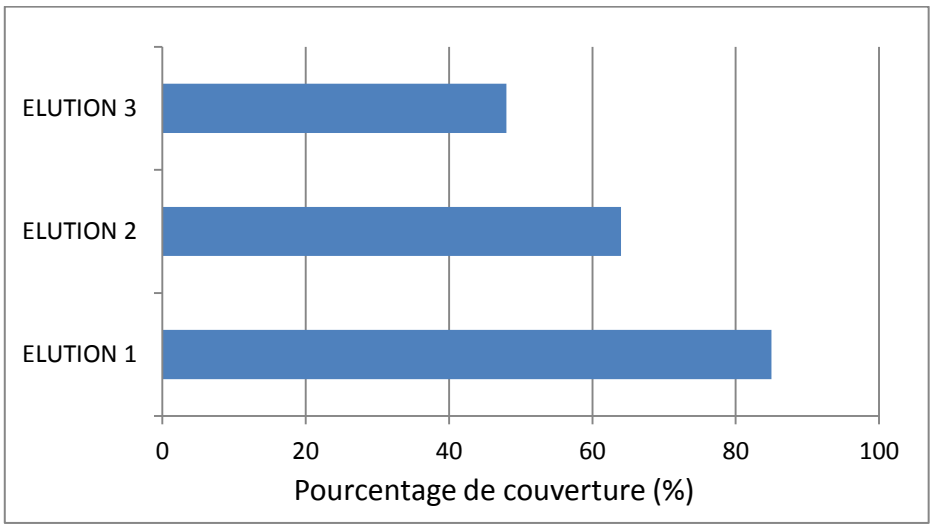


Figure 31 : Pourcentage couverture de la BSA obtenus dans différents volumes d'élution (15µL, 2µL/minute dans le *ChipFilter* avec le même traitement sur puce (300 ng de BSA)

6.2.3. Sensibilité de la détection des peptides de BSA dans le *ChipFilter*

Enfin la quantité minimale de protéine nécessaire est aussi un paramètre clé. Il correspond vraisemblablement à la concentration minimale utilisable avant de voir les pertes de peptide et de protéine par adsorption non spécifique sur les surfaces devenir non négligeables. La sensibilité de la digestion sur puce a été testée en diminuant progressivement la quantité de protéine de départ et en gardant une durée de digestion d'une heure. Le nombre de peptides identifiés ainsi que le pourcentage de couverture diminue avec la quantité de protéine chargée dans la puce initialement. Avec 10 µg de protéine au départ, on obtient 90 % de couverture de séquence de la BSA. Le pourcentage de couverture est d'environ de 80% malgré la diminution de la quantité protéine traitée jusqu'à 400 ng. Elle descend à 30% puis à 20% avec respectivement, 100 et 30 ng de BSA traitée.

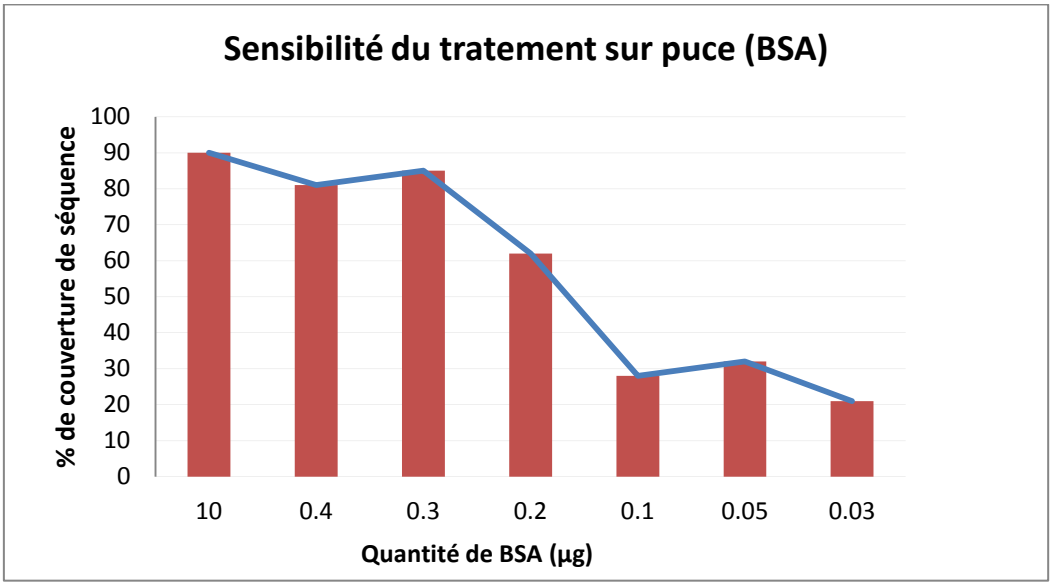


Figure 32 : Couverture de séquence de la BSA obtenue en fonction de la quantité de protéine traitée

6.2.4. Conclusion

Le protocole d'analyse résumé au tableau 7 a été appliqué à une protéine standard la BSA. La réduction des ponts disulfures suivi du blocage des cystéines ont été réalisés dans le ChipFilter. La digestion de cette protéine, toujours dans le ChipFilter, a ensuite été réalisée en ajoutant une solution trypsine. Les peptides générés ont été recueillis et analysés par LC-MS. Les temps d'incubation pour la protéolyse chutent de 16h à 1h avec une couverture de séquence équivalente ce qui permet d'envisager des traitements d'échantillon sur la journée. Enfin il semble que la quantité minimale de protéines nécessaire avant extinction du signal dans ce dispositif est en dessous de 1 µg de quantité de protéine totale au départ avant toute prise en charge. Cette première étude nous permet de valider les débits de réactifs et d'élution et montre que des débits trop faibles semblent défavorables à une bonne récupération des peptides générés.

6.3 Première application à un échantillon complexe : protéome de la levure

Les tests effectués avec la digestion d'une protéine standard, la BSA, ont permis d'optimiser les paramètres de la digestion sur puce. Le protocole a ensuite été appliqué à un extrait protéique total de cellules de levure. Le *ChipFilter* permet d'obtenir un gain considérable sur la durée de la digestion. 100 µg d'extrait de protéine de levure ont été digérés dans la puce microfluidique. Cette quantité est largement supérieure à ce qui est nécessaire d'après la sensibilité obtenue en digérant de la BSA mais elle va nous permettre d'étudier l'élution des peptides après la digestion. Le même protocole présenté au Tableau 7 a été appliqué avec une durée de digestion de 2 heures et un rapport enzyme/protéine de 1/10.

6.3.1 Détermination du volume d'élution

L'élution a été effectuée en 5 étapes présentées dans le tableau 8. Les étapes 1 et 2 correspondent aux solutions recueillies lors de l'ajout de la trypsine(0,1 µg/µL ABC 50 mM, pH 8). Une solution d'ABC 50 mM, pH 8 est ensuite utilisée pour l'élution des peptides générés pour les étapes 3, 4 et 5.Toutes les solutions recueillies ont ensuite été analysées séparément en LC_MS. L'identification des peptides et des protéines a été ensuite réalisée avec le logiciel MaxQuant et la base de données de la levure.

Tableau 8 : Description de l'élution séquentielle
Etapes 1 et 2 avec la solution de trypsine chargée, les étapes 3, 4 et 5 avec une solution d'ABC 50 mM, pH 8

Etapes	Description
1. Ajout_Trypsine	Solution recueillie lors de l'ajout de Trypsine 2µL/min, V=25 µL
2. Digestion à faible débit	Solution recueillie durant la digestion : 0,2 µL/min pendant 2h, V=24 µL
3. Elution 1(ABC 50 mM, pH 8)	Débit 2 µL/min, V= 15 µL
4. Elution 2 (ABC 50 mM, pH 8)	Débit 2 µL/min, V= 15 µL
5. Elution 3 (ABC 50 mM, pH 8)	Débit 2 µL/min, V= 30 µL

L'analyse des différentes phases montre l'identification d'un nombre important de protéines dans toutes les fractions recueillies de l'élution séquentielle (Tableau 8). Les peptides générés commencent à passer à travers la membrane dès que la trypsine atteint la chambre de réaction. Malgré le faible débit maintenu durant la digestion, un nombre important de peptides passent à travers la membrane de filtration. Cependant, il est important de maintenir un faible débit pour assurer l'homogénéisation dans les chambres de réaction ainsi que pour l'ajout de trypsine supplémentaire. Par ailleurs, la répétition de l'élution (3 fois) montre qu'une seule élution ne suffit pas à récupérer l'ensemble des peptides générés. La majorité des protéines sont identifiées dans les phases d'élution 1 et

2 sans doute du fait du débit important (2µL/min) appliqué juste après la digestion (0,2 µL/min). Ceci montre que l'élution devrait comprendre au moins la solution recueillie lors de la digestion (24 µL) et 45 µL d'élution à 2µL/min (70 µL d'élution au total) pour une meilleure couverture du protéome.

6.3.2 Efficacité de la digestion

L'analyse des peptides identifiés montre une proportion importante de peptide portant un ou deux sites de coupures manqués (Figure 33). En effet la proportion de peptides identifiés sans site de coupure manqué est seulement de 50% dans les 3 premières phases recueillies. Elle monte à 60 puis à 68% dans les 2 dernières phases.

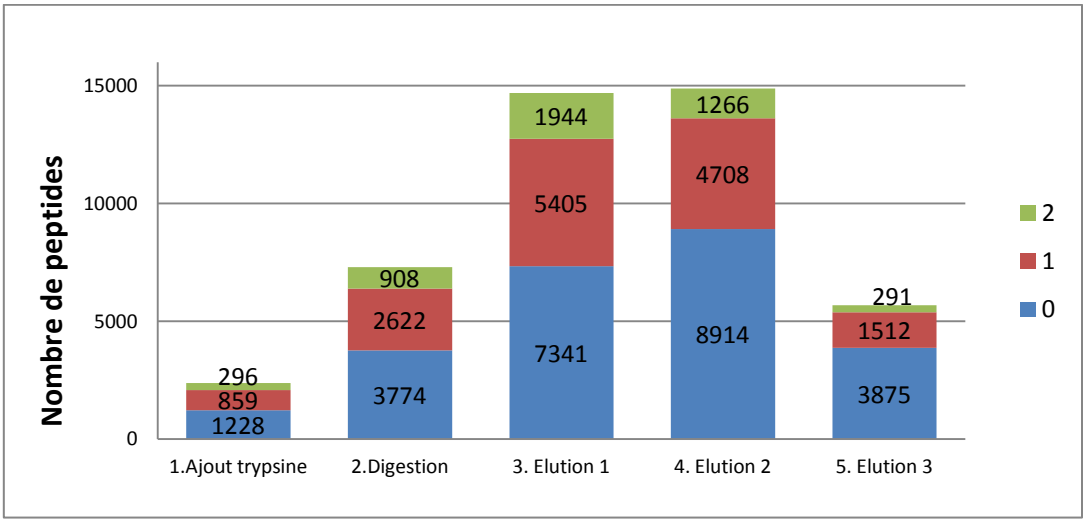


Figure 33 : Nombre de peptides identifiés dans chaque phase recueillie et proportion de ceux portant 0, 1 ou 2 sites de coupure manqués

L'ensemble des protéines identifiées dans les phases ajout de trypsine et digestion sont regroupés sous le nom pré-élution et le reste sous le nom élution pour le diagramme de Venn(Figure 34). On observe ainsi que la très grande majorité des protéines identifiées dans la pré-élution le sont aussi dans l'élution.

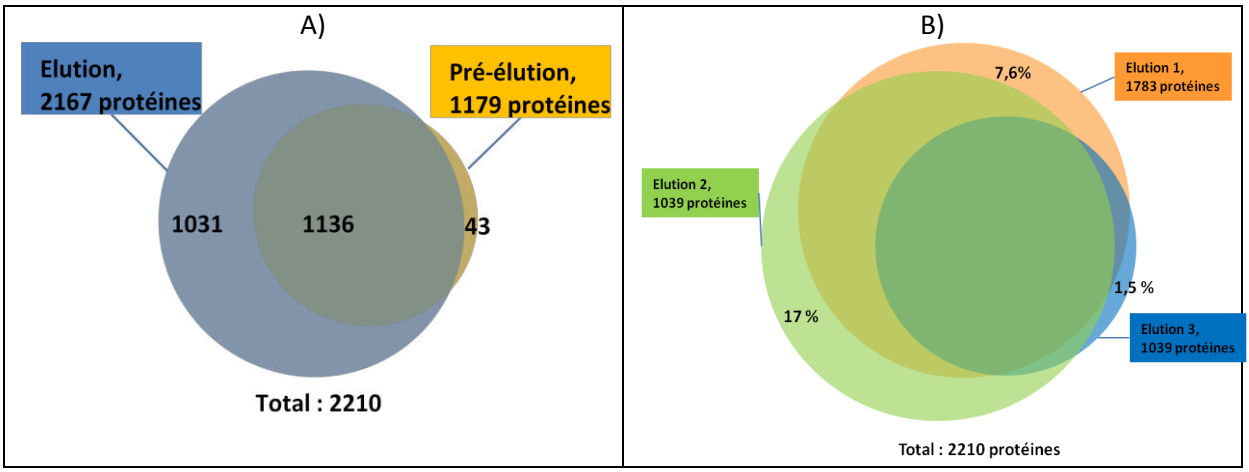


Figure 34 :Diagramme de Venn A) Comparaison des protéines identifiées dans les phases pré-élution(Ajout trypsine + digestion)/Elution (Elution 1+ 2+3) et B) comparaison des protéines identifiées dans les différentes élutions 100 µg d'extrait protéique de levure

L'ensemble des phases recueillies et analysées séparément ont permis d'identifier au total 2210 protéines et 2423 peptides portant une cystéine. La fragmentation de l'élution a certainement permis l'identification d'un plus grand nombre de peptide portant une cystéine. Nous avons donc réalisé une élution groupée d'un volume total de 70 µL pour évaluer la qualité des identifications.

Une élution de 70 µL a été appliquée au traitement de 100 µg d'échantillon d'extrait protéique de levure. Cette analyse s'est limitée à la réduction des ponts disulfure suivie de l'alkylation des cystéines avec l'iodoacétamide. L'analyse a été effectuée en triplicata avec 3 *ChipFilter*s différents. Les résultats montrent que plus de 2100 protéines sont en moyenne identifiées par analyse. Ce qui est une couverture de protéome plutôt satisfaisante pour l'appareil utilisé[104]. Cependant, le nombre de peptides identifiés comportant une cystéine est faible. En effet, moins de 1000 peptides comportant une cystéine ont été identifiés en moyenne sur les 3 analyses. Par ailleurs, 95% de ces peptides sont carbamidométhylés montrant ainsi l'efficacité de la réaction d'alkylation.

6.3.3 Répétabilité du traitement d'échantillon sur puce

Pour estimer la répétabilité du traitement d'échantillon sur puce, une quantification *Label Free* a été réalisée pour comparer les protéines identifiées et leur intensité pour 3 analyses. La linéarité entre les intensités obtenues pour une même protéine est visualisée à travers un *scaterrpolt.* La répétabilité a été évaluée en effectuant une corrélation de Pearson entre 3 analyses effectuées avec des *ChipFilter*s différents (Figure 35).

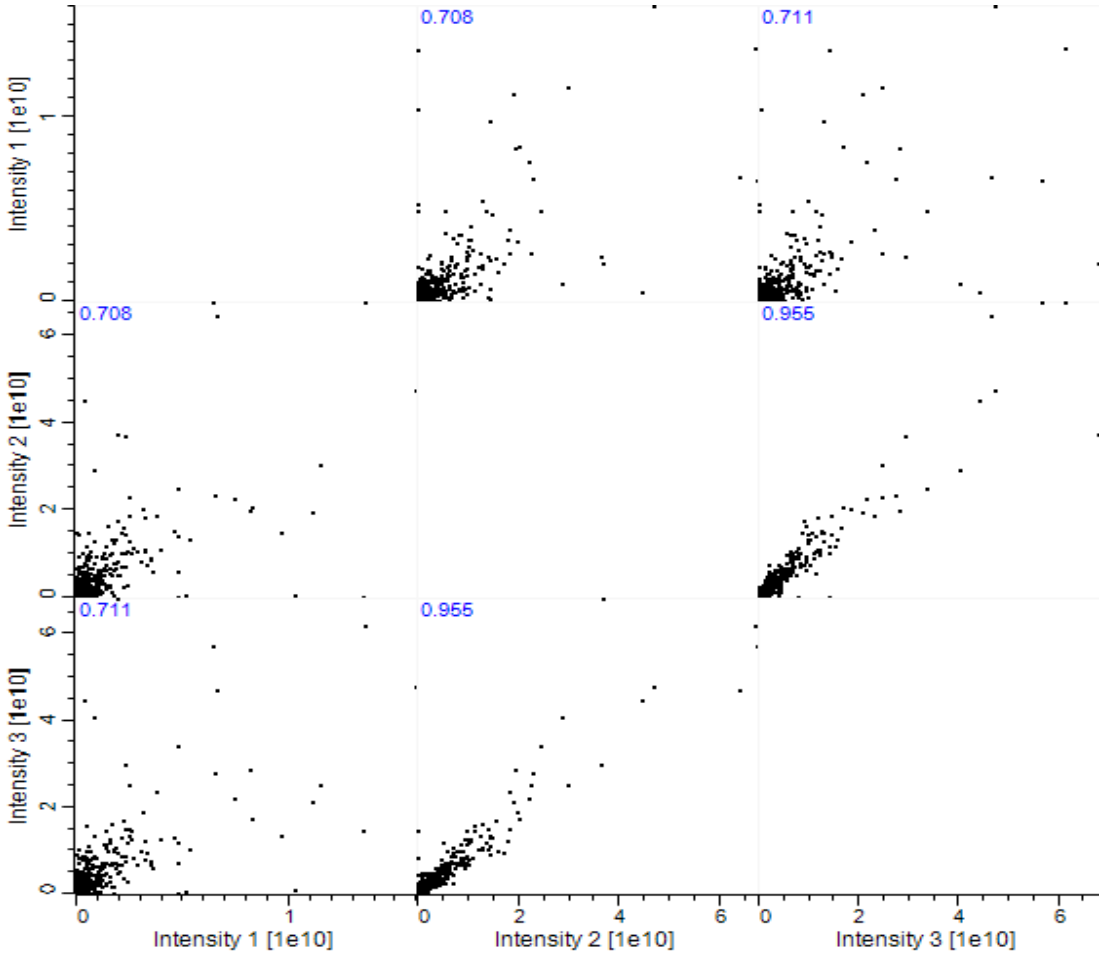


Figure 35 : *MultiScatterplot* de 3 traitements sur puce
100 µg d'extrait protéique de levure

6.3.4 Elution au méthanol

Pour évaluer la rétention non spécifique des peptides dans le *ChipFilter* par adsorption, un rinçage au méthanol 70% est réalisée après l'élution des peptides avec une solution d'ammonium bicarbonate 50 mM. Le méthanol est ensuite évaporé et le reste de la solution est analysée en LC/MSMS et puis comparées à l'élution. On observe qu'un nombre important de protéines sont identifiées dans la solution de rinçage au méthanol 70%. Ceci témoigne de la rétention non spécifique des peptides générés lors de la digestion.

L'adsorption à la surface du PDMS ou sur la membrane de filtration moléculaire peuvent être les causes de cette rétention. En effet, des analyses sur les tubes FASP Microcon® ont montré qu'un rinçage au méthanol permet de récupérer un nombre important de peptides non collectés avec à travers l'élution classique. Lors du traitement de l'échantillon dans le *Chipfilter*, les protéines ou les peptides générés lors de la digestion entrent en contact avec les parois du PDMS et avec la membrane de filtration. Ces éléments peuvent en effet retenir un certain nombre de protéines ou de peptides qui ne seront donc pas collectés lors de l'élution. Le rinçage au méthanol aurait permis l'élution de ces peptides.

Plus de 1000 protéines sont identifiées dans la solution de rinçage. Cependant, on ne compte que 88 protéines exclusivement identifiées suite au rinçage au méthanol, les protéines restantes sont partagées avec la phase d'élution (Figure 36A).

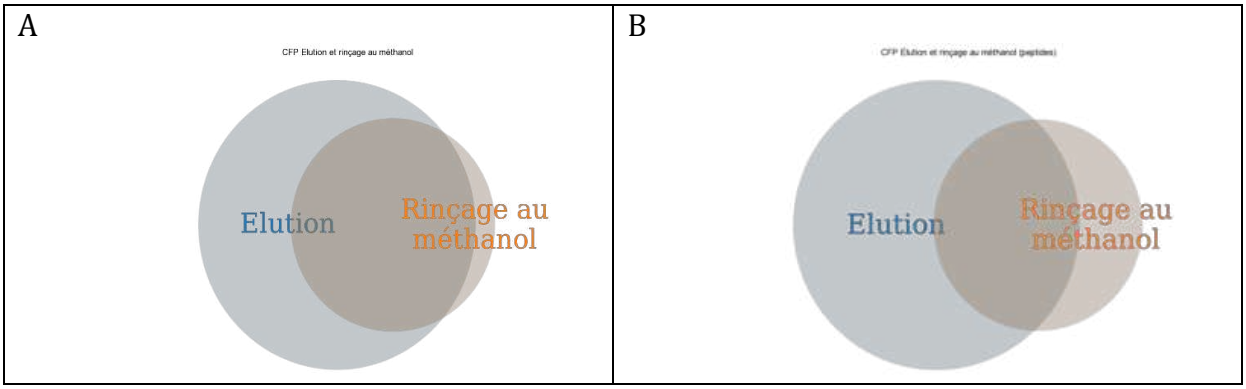


Figure 36 : Diagramme de Venn : Comparaison dans la phase élution et dans la solution de rinçage au méthanol 70%des protéines (A) et des peptides (B) identifiées
100 µg d'extrait protéique de levure

La comparaison des peptides montre par ailleurs un nombre important de peptides identifiés exclusivement dans la solution de rinçage au méthanol (Figure 36B). Pour savoir si la rétention de ces peptides est due à la nature hydrophobe des parois du PDMS, l'hydrophobicité des peptides (HI : *Hydrophobicity Index*) exclusivement identifiés dans l'élution et dans la solution de rinçage a été étudiée. Il existe plusieurs méthodes d'estimation du HI d'un peptide. Nous avons choisi la méthode de Kyte-Doolittle. Elle donne une valeur HI positive pour les séquences globalement hydrophobes. Le HI est négative dans le cas contraire. Elle est basée sur des HI (positif ou négatif) attribués à chaque acide aminé qui donnent ensuite le HI global d'une séquence d'acides aminés.

La distribution des indexes d'hydrophobicité Kyte-Doolittle au tour de zéro (Figure 37) ne montre pas une différence significative d'hydrophobicité entre le groupe exclusivement collecté par rinçage au méthanol qu'à celui identifié par l'élution avec l'ammonium bicarbonate 50 mM. Une différence significative de la distribution HI devrait être visible si la rétention des peptides exclusivement identifiés avec le rinçage au méthanol n'était due qu'aux propriétés hydrophobes de la surface du PDMS.

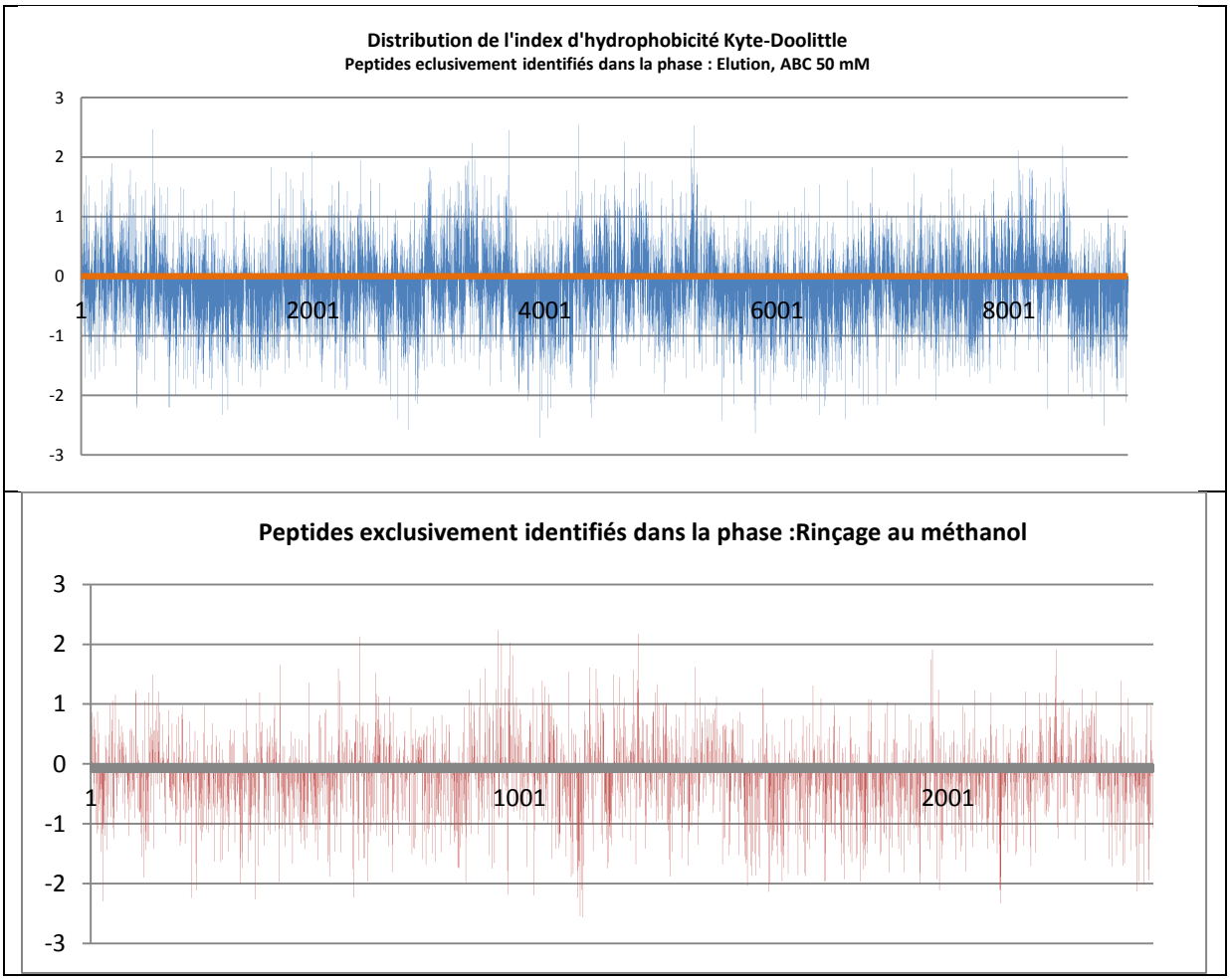


Figure 37 : Distribution de l'index d'hydrophobicité des peptides exclusivement identifiés pendant l'élution (Bleu) et avec le rinçage au méthanol (Rouge)
100µg d'extrait protéique de levure

6.3.5 Conclusion

Après la fabrication du *ChipFilter,* la rétention des protéines a été évaluée avec une solution de BSA. Un protocole d'analyse a été mis en place pour effectuer le traitement chimique et enzymatique incontournable dans le protocole d'analyse des protéines par l'approche *bottom-up*. Une sensibilité de l'ordre du ng a été constatée en diminuant progressivement la quantité de protéine traitée. Le traitement sur puce a ensuite été appliquée à 100 µg d'extrait protéique de levure. Une couverture plutôt satisfaisante du protéome a été obtenue. L'évaluation de la capacité à collecter les peptides lors de l'élution a mené à l'augmentation du volume d'élution prévu dans le protocole.

La couverture du protéome atteinte avec le *ChipFilter* pour 100 µg d'échantillon traité a été confrontée à celle obtenue avec la méthode FASP et celle du traitement en solution (TCA) pour la même quantité d'échantillon (100 µg) et 2 fois plus (200 µg). En effet ces 3 méthodes diffèrent par l'approche utilisée pour le rinçage (contaminants/réactifs en excès). Ce dernier a été effectué par précipitation acide pour le traitement en solution, par centrifugation pour la méthode FASP et enfin par rinçage en flux continu à travers la membrane de filtration moléculaire pour le sur puce. La Figure 38 montre la qualité d'identification obtenue avec chaque approche.

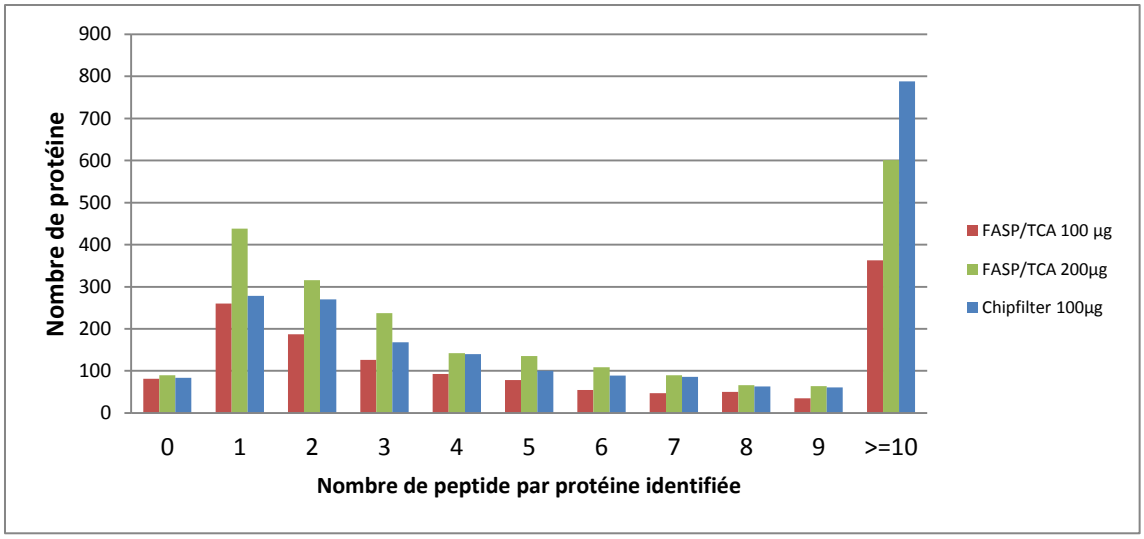


Figure 38 : Comparatif du nombre de protéines identifiées en fonction de la couverture de séquence exprimée en nombre de peptides identifiés sur CPF et lors d'une analyse comparative entre la méthode FASP la précipitation acide TCA pour le rinçage des protéines (0 correspond aux protéines identifiées avec aucun peptide unique (Extrait protéique de levure).

Le traitement sur puce avec le *ChipFilter* montre des performances satisfaisantes par rapport à la méthode FASP et au traitement en solution, vus les résultats présentés dans ce chapitre. La sensibilité du traitement sur puce est un avantage non négligeable dans la quantification redox. Cependant la quantité d'échantillon utilisée reste élevée pour un système miniaturisé.

Chapitre 7 : Application à l'étude de l'état redox des cystéines

Les résultats de la comparaison de la méthode FASP à la précipitation acide (TCA) (chapitre 5) pour l'application du protocole OcSILAC ont montré que la méthode FASP n'induisait pas d'avantage d'oxydation durant le protocole de traitement. Ces observations ont motivé le choix de concevoir un dispositif microfluidique destiné à la miniaturisation du protocole OcSILAC. Le *ChipFilter* a donc été conçu, testé et utilisé pour le traitement d'une protéine standard et ensuite d'un échantillon complexe. Une sensibilité satisfaisante a été constatée avec l'analyse de la BSA. Ensuite, l'analyse d'extrait protéique de cellules de levure a montré une bonne couverture du protéome. L'échantillon d'extrait protéique de levure a ensuite été utilisé pour tester la miniaturisation du traitement de l'échantillon dans le *ChipFilter*.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de la comparaison du protocole OcSILAC effectué dans le *ChipFilter* par rapport à la méthode classique caractérisée par la précipitation acide (TCA) et dont la miniaturisation était l'objectif principal de cette thèse. Malgré la sensibilité du ChipFilter, une quantité d'échantillon de 100 µg a été choisie. Ce choix est motivé par le besoin de se mettre un peu au niveau de la sensibilité de la méthode classique afin de pouvoir comparer la couverture du protéome et une éventuelle oxydation artéfactuelle. Ce chapitre comprend aussi la description du couplage du *ChipFilter* pour l'amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité.

7.1 Miniaturisation du traitement de l'échantillon pour l'étude redox

7.1.1. Contrôle de l'oxydation en conditions acides

L'étude des PTMs de la cystéine est une analyse complexe du fait de la grande réactivité des thiols et du caractère labile de ces modifications qui peuvent être affectées durant la préparation de l'échantillon. L'acide trichloroacétique (TCA) est en général utilisé pour passer en conditions acides et bloquer la réactivité des thiols durant l'extraction des protéines ou l'élimination d'un réactif en excès. Mais la protéolyse pour générer les peptides en *bottom-up* nécessite de neutraliser l'échantillon. L'élimination du TCA passe d'abord par une précipitation des protéines suivi d'un rinçage avec de l'acétone froid. Ensuite l'évaporation de l'acétone permet de reprendre les protéines avec un tampon approprié permettant le blocage définitif des thiols. C'est une approche très utilisée malgré les risques de modification artéfactuelle. L'utilisation du *ChipFilter* pour des applications en rédoxomique est intéressante dans le sens où le rinçage de réactifs en excès peut se faire rapidement dans des conditions réduisant le risque de modifications artéfactuelles.

7.1.2. Comparaison avec le protocole de quantification redox OcSILAC

Comme indiqué au début de ce manuscrit, le protocole mis en œuvre pour la quantification relative de l'état redox des cystéines implique de nombreuses étapes avec un faible rendement et ce notamment à cause des lavages/précipitations multiples du protocole OcSILAC classique. Il est donc très intéressant de le transférer dans le *ChipFilter* afin d'éliminer ces étapes couteuses en échantillon. Ce transfert se fait à travers une petite modification du protocole de traitement sur puce présentée au Tableau 7. La modification consiste en l'intégration de l'étape de marquage des cystéines oxydées avec la biotine. Le protocole appliqué pour cette comparaison est présenté au Tableau 9.

Tableau 9 : Protocole de traitement sur puce pour l'étude redox

Etapes	Description	Débit (D) et Volume (V)
1) Chargement de l'échantillon	Solution d'extrait protéique solubilisé dans un tampon de lyse	D = 2 µL/min, V : en fonction de la quantité de matériel à traiter
2) Blocage des cystéines réduites	Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 µL/min, V=60 µL, rinçage rapide ii) 1µL/min, V = 30 µL réaction
3) Réduction des ponts disulfure et des cystéines oxydées	Solution de DTT 20 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 µL/min, V=60 µL, rinçage rapide ii) 1µ/min, V=30 µL, réaction
4) Marquage des cystéines nouvellement réduites avec la biotine HPDP	Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 µL/min, V=60 µL, rinçage rapide ii) 1 µL/min, V= 30 µL, réaction
5) Rinçage d'excès de biotine	Tampon d'ABC 50 mM rinçage des réactifs en excès pour préparer la digestion	2 µL/min, V = 60 µL pour atteindre les Les conditions optimales de digestion
6) Digestion	Solution de trypsine 0,1 µg/µL dans tampon ABC 50 mM	i) D = 2 µL/min, pour charger la trypsine ii) 0,4 µL/min, V =24 µL soit une heure, durée de la digestion
7) Elution	Solution d'ABC 50 mM	D = 2µL/min, V = 70 µL

La dernière étape du protocole OcSILAC ne peut être réalisée sur le *ChipFilter* car ce dernier n'est pas équipé pour la rétention spécifique des peptides marquées avec la biotine. Après l'étape d'élution, les peptides récoltés vont faire l'objet d'un fractionnement sur une colonne de streptavidine dans les mêmes conditions que dans le protocole OcSILAC classique.

Pour comparer la préparation d'échantillon dans le *ChipFilter* et le protocole OcSILAC classique, 100 µg d'extrait protéique de cellule de levure ont été traités par *ChipFilter* et autant par le protocole OcSILAC classique caractérisé par la précipitation acide. D'un côté, toutes les étapes de préparation des protéines et leur digestion ont été effectuées sur puce. La précipitation acide des protéines n'est plus nécessaire pour éliminer les réactifs

en excès car ces molécules passent facilement à travers la membrane. Pour le protocole OcSILAC classique, les protéines sont précipitées à la fin de chaque réaction pour éliminer les réactifs en excès. Les peptides générés sont passés sur une colonne de streptavidine dans le but d'enrichir sélectivement les peptides portant une cystéine biotinylée. Dans les 2 cas, cet enrichissement est effectué dans les mêmes conditions. Les fractions enrichies(contenant les peptides initialement oxydés et biotinylés) et non enrichies (les autres peptides) ont été analysées séparément. Une quantification sans marquage (*LabelFree*) a ensuite été effectuée séparément dans les fractions enrichie et non enrichie pour comparer le nombre de peptides identifiés ainsi que leur intensité.

Dans le protocole OcSILAC classique comparant 2 conditions de culture cellulaire, la quantification de la fraction enrichie permet de déterminer, en se basant sur le nombre de peptides identifiés et le rapport des intensités (version lourd/léger du même peptide), dans quelles conditions l'oxydation des cystéines a été plus importante. Dans le cadre de cette comparaison, c'est le même échantillon qui est traité de 2 manières différentes. La quantification *Label Free* de la fraction enrichie permettra donc de comparer l'importance de l'oxydation des cystéines survenue durant le traitement. L'identification a été réalisée avec le logiciel Maxquant et la quantification relative *Label Free* avec le logiciel ProteomeDiscoverer.

7.1.3 Réduction du temps de traitement de l'échantillon

La Figure 39 présente la durée de chaque étape du protocole OcSILAC réalisé par le dispositif *ChipFilter* et en solution avec la précipitation TCA pour un échantillon. La réduction du temps de traitement est considérable, le *ChipFilter* offre la possibilité de réaliser le même protocole en 8 à 10 fois moins de temps.

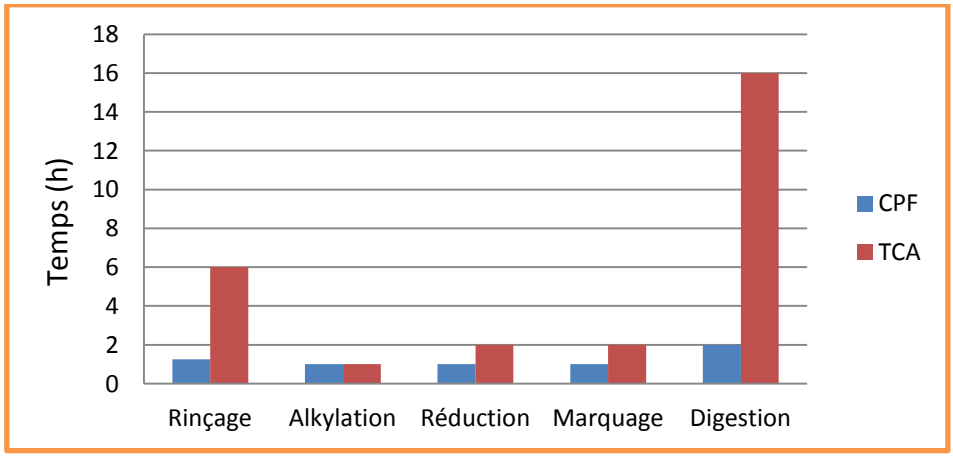


Figure 39 : Comparaison de la durée des différentes étapes de préparation d'échantillon par *ChipFilter* (CPF) et par précipitation acide (TCA)
Nature et quantité d'échantillon

7.1.4 Identification et quantification

Pour résumer, la même quantité d'échantillon a été traitée dans le *ChipFilter* et par le protocole OcSILAC classique (TCA) dans le but de comparer les 2 approches pour la quantification redox. Le C*hipFilter* a permis de miniaturiser toutes les étapes du protocole

OcSILAC sauf le fractionnement qui est effectué dans les mêmes conditions que le protocole classique. Les fractions issues de chaque approche sont analysées séparément. Nous allons donc avoir, pour chacune des 2 approches que nous comparons, une fraction enrichie ou *Bound* et une fraction non enrichie ou *UnBound.* La fraction enrichie contient principalement les peptides contenant une cystéine marquée par la biotine clivable et soluble dans l'eau (donc cystéine oxydée). Ces peptides ont été retenues spécifiquement sur la colonne de streptavidine d'où le nom (*Bound,* lié). La fraction non enrichie correspond à la partie de l'échantillon qui n'a pas été retenue par la colonne de streptavidine et qui contient donc tous les autres peptides. Les résultats de cette comparaison basée sur les peptides et protéines identifiés dans ces fractions ainsi que leurs intensités sont présentés dans cette partie.

Le premier point de comparaison concerne la couverture du protéome avec le nombre de protéines et de peptides identifiées. Le tableau 10 montre le nombre de peptides et de protéines identifiés dans les fractions enrichies (Bound) et non enrichie (Unbound). On observe que dans la fraction enrichie, le nombre de protéines et de peptides identifiés est plus élevé pour l'approche classique (TCA_en_solution) que pour la digestion sur puce (*ChipFilter*). C'est le contraire qui est observé dans la faction non enrichie.

Tableau 10 : Nombre de protéines et peptides identifiés par les approches de traitement sur puce et classiques

	ChipFilter			TCA_en_solution		
	Protéines	Peptides	Peptides avec C	Protéines	Peptides	Peptides avec C
Bound	1018	3616	1644	1220	3544	2819
UnBound	2012	15190	1150	1440	10782	867

Un diagramme de Venn a été réalisé afin de comparer, au sein de chaque approche, les protéines identifiées dans les fractions enrichies et non enrichies (Figure 40). Pour le traitement dans le *ChipFilter* (CFP), la majorité des protéines identifiés dans la fraction enrichie le sont aussi dans la fraction non enrichie. Seules 101 protéines sont exclusivement identifiées dans la fraction enrichie. Pour l'approche classique, 367 protéines sont exclusivement identifiées dans la fraction enrichie.

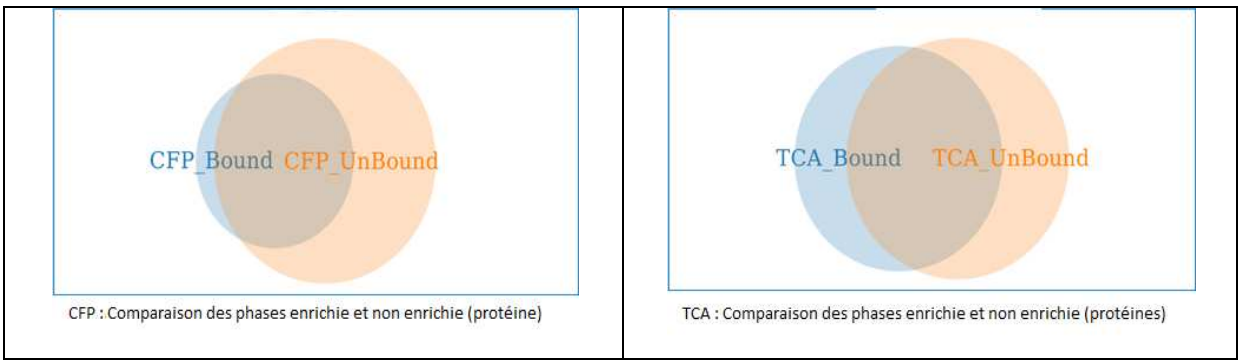


Figure 40 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les fractions enrichies (Bound) et non enrichies (UnBound) du traitement sur puce à gauche (Chip) et classique (TCA) droite
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

On observe qu'un total de 2113 protéines ont été identifiées par le traitement sur puce et 1767 par l'approche classique. Quand on compare l'ensemble des protéines identifiées (Enrichie+NonEnrichie) dans chaque approche, 205 protéines sont exclusivement identifiées avec l'approche classique et 551 sont exclusives au traitement sur puce (Figure 41). Le traitement sur puce offre donc une meilleure couverture du protéome.

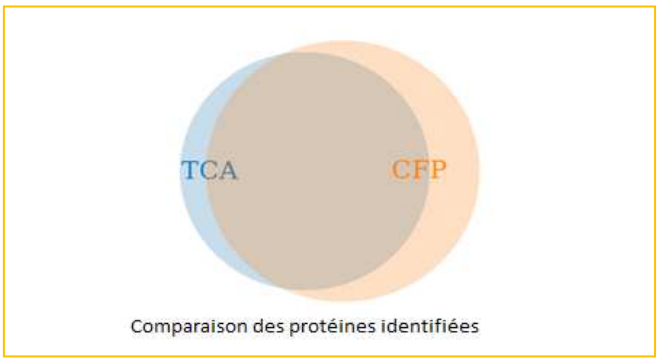


Figure 41 : Comparaison des protéines identifiées dans les fractions enrichie et non enrichie avec les approches classique (TCA) et traitement sur puce (CFP)
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

En ce qui concerne les peptides, on s'aperçoit que d'avantage de peptides comportant une cystéine sont identifiés avec l'approche classique(TCA) (Figure 42).

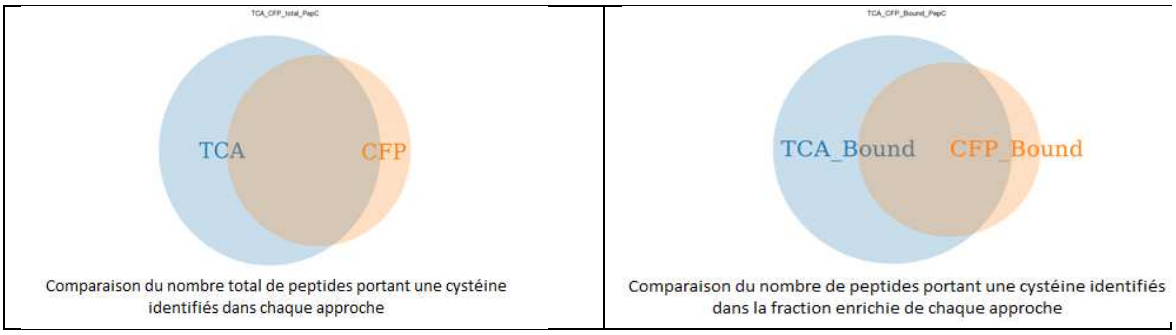


Figure 42: Comparaison des peptides portant une cystéine identifiés dans chaque approche au total (gauche) et uniquement dans la fraction enrichie (droite)

Cependant, la grande majorité des peptides portant une cystéine identifiés avec l'approche classique le sont dans la fraction enrichie. Il s'agit donc de cystéines oxydées. La comparaison de l'ensemble peptides identifiés portant une cystéine (enrichie+NonEnrichie) avec les 2 approches montre que 1282 peptides sont exclusivement identifiés avec l'approche classique (TCA) et 356 avec le traitement sur puce. Cependant, la couverture du protéome obtenue avec le traitement sur puce est meilleure quand on considère l'ensemble des peptides et protéines identifiés. Ceci peut s'expliquer par la survenue d'oxydation artéfactuelle durant le traitement de l'échantillon par le protocole classique étant donné que c'est le même échantillon qui a été analysé dans les approches. En effet, si les peptides sont oxydés, leur enrichissement peut aider à leur identification. Tandis que, s'ils ne sont pas oxydés, ils sont analysés avec la fraction non enrichie (plus complexe), réduisant la probabilité de leur identification. D'où le fait qu'il y'a plus de peptides portant une cystéine identifiés avec l'approche classique (TCA)

alors cette dernière offre une moins bonne couverture du protéome par rapport au traitement sur puce (*ChipFilter*).

La quantification *Label Free* de la fraction enrichie donne une distribution des rapports d'abondance (log 2 ratio *ChipFilter*/TCA) en faveur de l'approche classique (figure 39). Ceci signifie que, dans la fraction enrichie, les protéines identifiées présentent une intensité globalement plus élevée avec l'approche classique qu'avec le traitement sur puce. Cette observation rejoint celle faite sur la comparaison du nombre de peptide et de protéine identifiés dans les fractions enrichies. Elle serait due au fait que la précipitation acide des protéines dans le protocole classique (TCA) pour le rinçage induit d'avantage d'oxydations artéfactuelles comparée au traitement sur puce.

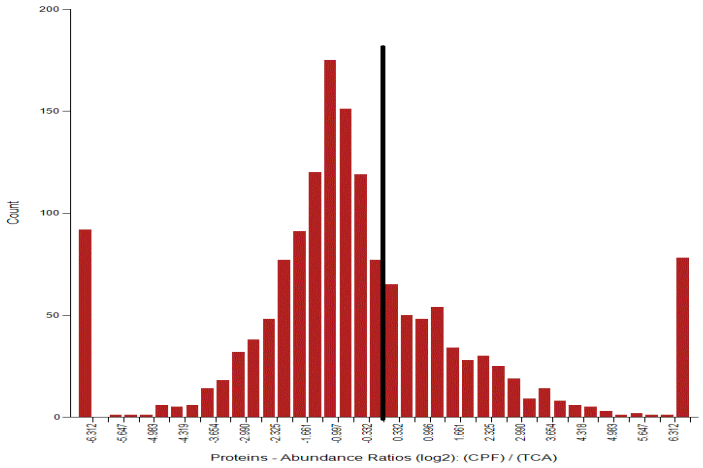


Figure 43 : Quantification Label Free de la fraction enrichie - Distribution des log2 des ratios d'abondance des protéines identifiées selon les 2 méthodes ChipFilter/Précipitation TCA; n=3
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

Cette hypothèse est renforcée par le fait que la distribution des rapports d'abondance dans la fraction non enrichie est favorable au traitement sur puce (Figure 44). Au vu des résultats de la quantification *LabelFree* dans les fractions enrichies et non enrichies, le traitement sur puce permettrait d'obtenir une meilleure couverture du protéome avec moins d'oxydations artéfactuelles. L'utilisation du dispositif miniaturisé a aussi permis de réduire la durée du traitement de l'échantillon de manière significative (Figure 39). Cependant, la quantité d'échantillon utilisée est trop importante et pourrait être diminuée.

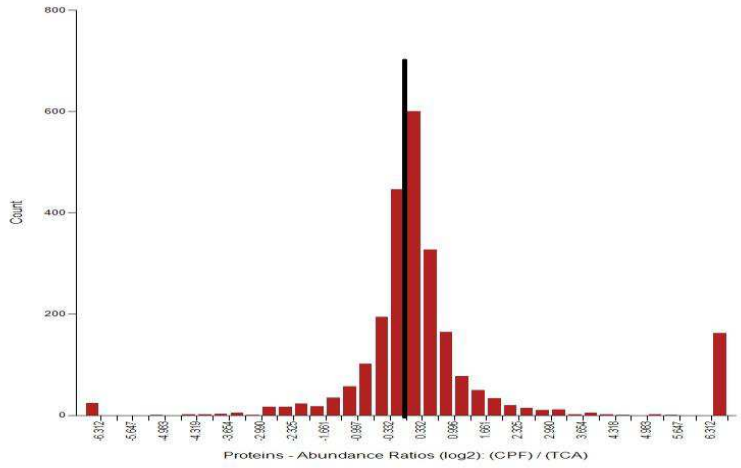


Figure 44 : Quantification *Label Free* de la fraction non enrichie : Distribution des log2 des ratios d'abondance des protéines identifiées selon les 2 méthodes *ChipFilter*/Précipitation TCA ; n=3
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

Les protéines membranaires sont les plus difficiles à identifier du fait de leur faible solubilité dans les solutions aqueuses. L'annotation des protéines identifiées montre que le traitement sur puce a permis d'identifier 426 protéines membranaires et la méthode classique 299 ; 143 de ces protéines ont été exclusivement identifiées avec le traitement sur puce et 16 avec l'approche classique.

7.2 Vers l'intégration et l'automatisation du CPF

L'avantage de la miniaturisation est de pouvoir faire des réactions plus rapides mais aussi d'utiliser moins d'échantillons et de réactifs. Pour déterminer la sensibilité de notre dispositif miniaturisé, nous avons procédé à une diminution progressive de la quantité d'échantillon utilisé tout en surveillant le nombre de protéines identifiées.

7.2.1 Montage en ligne *ChipFilter*-LC pour optimiser les transferts

La diminution de la quantité d'échantillon s'est accompagnée d'une chute du nombre de protéines identifiées. En effet, en dessous de 10 µg d'échantillon, moins de 600 protéines sont identifiées. Ceci est en partie dû au volume d'élution élevé. En effet, éluer avec 70 µL quand la quantité d'échantillon injecté est uniquement de 10 µL entraine une importante dilution des peptides générés. De plus, les étapes de préparation du volume élué avant l'injection en LC-MS peuvent entrainer des pertes d'échantillon non négligeables. La préconcentration des peptides générés et le couplage direct du *ChipFilter* permettraient d'améliorer la sensibilité.

La solution a été de coupler le *ChipFilter* directement à la LC pour le piégeage en ligne des peptides générés. Concrètement, la sortie du *ChipFilter* a été connectée à la vanne d'injection de la LC grâce à un capillaire en PEEK (Polyether ether ketone ou polyétheréthercétone)(Figure 45). C'est une vanne 6 voies qui fonctionnent selon 2 configurations : chargement et Injection. Elle est mise en mode chargement pour ainsi stocker les peptides issus de la digestion dans le *ChipFilter* dans la boucle d'injection. A la

fin de la digestion et de l'élution, elle bascule en mode injection et le contenu de la boucle est envoyé vers la précolonne C18 pour le piégeage des peptides générés.

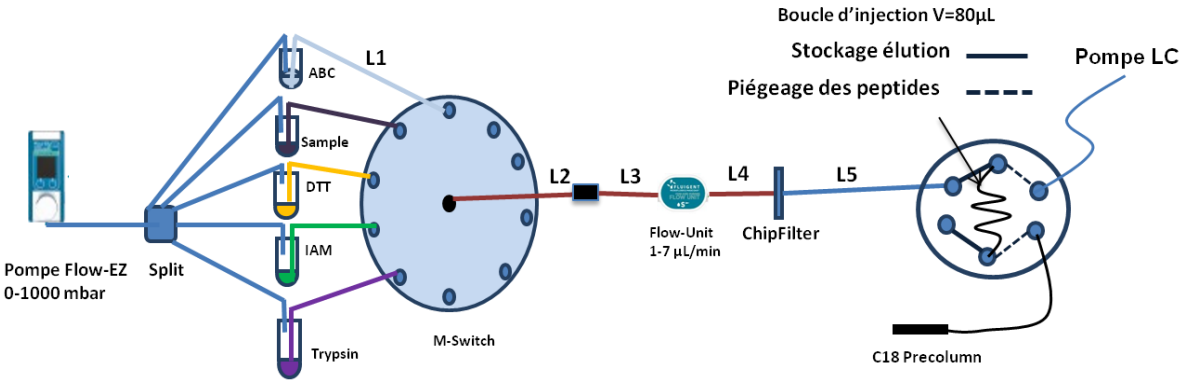


Figure 45 : Couplage du *ChipFilter* à une chaine de chromatographie liquide pour le piégeage en ligne des peptides générés par la digestion dans le *ChipFilter*

Le couplage du *ChipFilter* à la LC a permis d'améliorer la sensibilité de la puce et d'analyser des quantités d'échantillon de l'ordre du microgramme. La sensibilité du *ChipFilter* a été comparée à celle du FASP. 1 µg d'extrait protéique de cellule de levure ont été réduits, alkylés (DTT 20 mM, IAM 50 mM, ABC 50 mM, pH 8, 30 minutes de réaction) puis digérés (ratio Enzyme/protéines 1:1, une heure de digestion 37°C) dans le *ChipFilter*. Les peptides générés sont directement piégés sur une précolonne C18 (300 µm d.i., 50 cm de longueur, Pepmap ThermoFisher Scientific). Une analyse LC MS/MS est ensuite réalisée avec 2 h de gradient (1-40% Acétonitrile). 1 µg et 10 µg d'échantillon du même extrait protéique ont été traités par FASP (20 mM DTT, IAM 200 mM, ABC 50 mM, pH 8) puis digérés pas FASP aussi. La comparaison a été effectuée en triplicata. On observe alors que le *ChipFilter* offre une meilleure couverture du protéome avec dix fois moins d'échantillon et un protocole 8 fois moins long que la méthode FASP. Les résultats détaillés de la comparaison du traitement sur puce et la méthode FASP sont présentés en Annexe (Article 1).

7.2.2 Etude de la répétabilité du couplage *ChipFilter*-LC

La répétabilité du traitement sur puce couplée à la LC a été évaluée avec le traitement d'1 µg d'échantillon traité. L'analyse de la même quantité d'échantillon a été effectuée 3 fois avec à chaque fois un *ChipFilter* neuf. Plus de 1800 protéines ont été identifiées, 16459 peptides dont 1028 portant une cystéine. Comparé aux résultats obtenus avec 100 µg de protéine traitée, l'analyse du centième de cette quantité d'échantillon se traduit par en environ 300 protéines identifiés en moins. Une quantification *LabelFree* a ensuite été effectuée pour évaluer la répétabilité du couplage *ChipFilter_LC*.

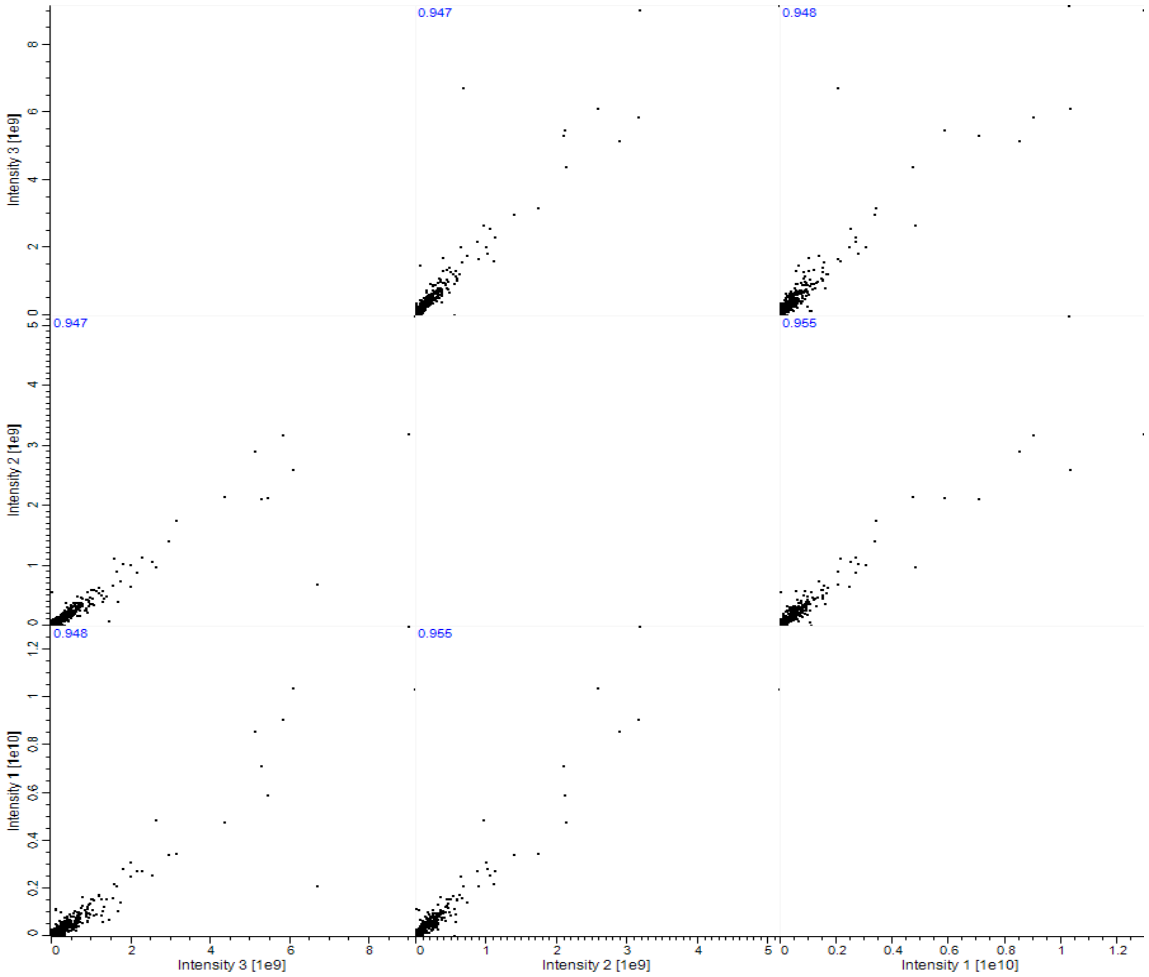


Figure 46 : MultiScatter Plot de 3 analyses d'1 µg d'échantillon sur le *ChipFilter*

La Figure 46 montre la corrélation des intensités des protéines identifiées dans chaque traitement sur puce. Chaque point représente une protéine identifiée avec en abscisse l'intensité obtenue pour le traitement 1 et en ordonnées celle obtenue avec le traitement 2 par exemple. On observe une nette amélioration par rapport au traitement sur puce non couplée à la LC (Figure 35). La corrélation obtenue (Coefficient de Pearson > 9,4) montre que traitement sur puce couplée à la chromatographie liquide a une répétabilité plutôt satisfaisante.

7.2.3 Intégration de la lyse cellulaire

La lyse cellulaire consiste à détruire la membrane de la cellule pour libérer son contenu. C'est la première étape du protocole d'analyse des protéines par spectrométrie de masse. C'est une étape cruciale car elle détermine la quantité et la diversité des protéines à analyser. L'intégration de cette étape permettrait d'améliorer l'extraction des protéines et la réduction des pertes d'échantillon en réduisant la manipulation manuelle de l'échantillon. Le concept de Lab-on-chip en protéomique passe par la miniaturisation et l'intégration de l'ensemble des étapes d'une analyse protéomique, y compris la lyse cellulaire. Plusieurs dispositifs microfluidiques ont donc été proposés pour la miniaturisation de la lyse cellulaire. Cependant, la plupart de ces dispositifs s'arrêtent à l'extraction des protéines et n'intègrent les autres étapes du protocole d'analyse[113]. Après

avoir testé le *ChipFilter* pour la préparation et la digestion d'échantillon protéique complexe, nous avons étudié la possibilité de réaliser la lyse cellulaire directement dans le *Chipfilter*.

La lyse cellulaire par voie chimique a été choisie car elle est compatible avec le *ChipFilter* et ne nécessitait pas la modification de ce dernier. Cependant, une action mécanique (friction billes de silice) est requise pour la lyse des cellules de levure utilisées jusqu'ici. La lyse cellulaire par voie chimique dans le *ChipFilter* a donc été appliquée à des cellules épithéliales humaines (HepG2). Elle consiste à charger les cellules directement dans le *ChipFilter* et ensuite d'utiliser une solution acide (TCA 10%, 1 µL/min, 40 minutes) pour détruire les membranes cellulaires. Les protéines sont ensuite rincées avec une solution tampon avant de commencer le traitement chimique et enzymatique des protéines selon le protocole présenté au Tableau 7. Une quantité d'1 µg de trypsine a été ajoutée pour la gestion. La réalisation de la lyse cellulaire dans le dispositif microfluidique permet d'utiliser un faible nombre de cellule pour une analyse protéomique par criblage. En effet, quand l'extraction des protéines est réalisée dans le ChipFilter, toutes les étapes du protocole de préparation d'échantillon sont intégrées : de la lyse cellulaire aux piégeage des peptides sur précolonne.

Avec la réalisation de la lyse cellulaire dans le ChipFilter, la quantité d'échantillon de départ est exprimée en nombre de cellule et pas en quantité de protéines. Dans un premier temps, le traitement de 300 000 cellules (extraction des protéines, traitement chimique et enzymatique) dans le ChipFilter couplé à la LC pour le piégeage en direct des peptides (dans une précolonne C18) a entrainé l'annulation de l'acquisition en MS du fait d'une quantité d'échantillon trop grande. Le nombre de cellule utilisé a donc été diminué progressivement. L'utilisation de moins de 30 000 cellules (environ 27 000) dans cette configuration a permis de générer une quantité de peptide (directement piégé sur une précolonne) non excessive pour une acquisition MS. Cette analyse constitue le premier exemple d'un échantillon dont la totalité du traitement est réalisée grâce au *ChipFilter* couplé à la LC : de l'extraction des protéines au piégeage des peptides dans une précolonne C18. L'analyse des peptides piégés a permis d'identifier 2750 protéines pour un total de 13950 peptides. Parmi ces peptides, 2868 portent une cystéine. La digestion s'est faite sur 2 heures, près de la moitié des peptides identifiés portent 1 ou 2 sites de coupure manqués.

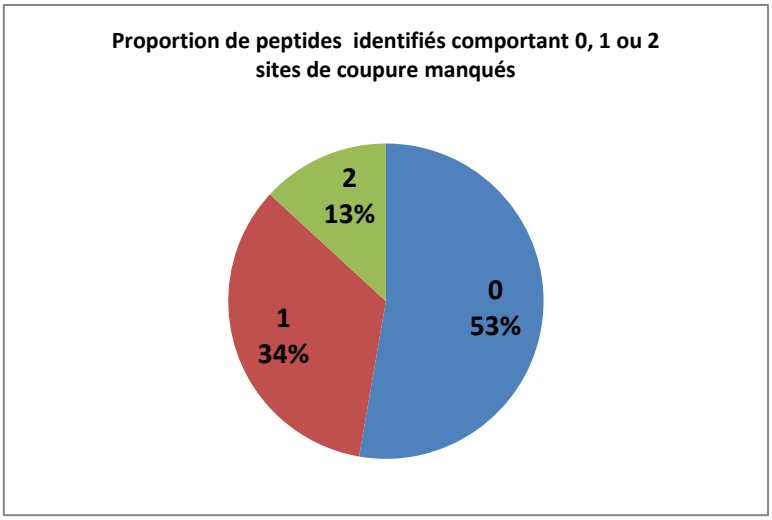


Figure 47 : Proportion des peptides portant 0, 1 ou 2 sites de coupure 27 000 cellules épithéliales HepG2 lysées et traitées dans le ChipFilter

7.2.4 Enrichissement en ligne

Une autre étape à intégrer est le fractionnement par affinité. Ce point a tout d'abord été évalué sur un échantillon standard bien caractérisé d'extrait de protéine de levure

L'analyse d'1 µg d'extrait protéique de levure dans *le ChipFilter* couplé à la LC (n=3) n'a permis d'identifier qu'un faible nombre de peptide portant une cystéine. Le nombre de peptides portant une cystéine et identifiés sur les 3 traitements est en moyenne de 600 peptides par analyse, ce qui est faible, comparée au nombre identifié avec l'approche classique. Le protocole OcSILAC, grâce au marquage et au fractionnement, permet d'identifier environ 3000 peptides portant une cystéine (Tableau 10). Le traitement sur puce n'intègre pas d'étape de fractionnement de l'échantillon visant à retenir spécifiquement les peptides marqués avec la biotine. Il est donc nécessaire d'ajouter un module de fractionnement de l'échantillon au *ChipFilter* couplé à la chaine LC. Cette étape est nécessaire pour la quantification de l'oxydation des cystéines qui est basée principalement sur l'identification des peptides portant une cystéine.

Un module d'enrichissement des peptides marqués avec la biotine, composé de billes magnétiques fonctionnalisées avec la streptavidine a été mis au point. Cependant, l'enrichissement escompté n'a pas été obtenu. Très peu de peptides portant ont été identifiés dans la phase enrichie. Ceci peut s'expliquer par le fait que le protocole utilisé est différent de celui recommandé par le fournisseur. En effet, le protocole recommandé était assez complexe à mettre en œuvre et n'était pas adapté au fonctionnement du *ChipFilter*. Ce point doit donc être encore optimisé.

7.3 Application biologique

L'analyse protéomique d'un échantillon biologique requiert, lorsqu'un protocole classique en traitement en solution est appliqué, entre 1 et 3 millions de cellules. Pour le protocole OcSILAC classique par exemple, 3 millions de cellules par échantillon sont utilisés pour les applications biologiques. Les protéines dont la modification, la sous ou

surexpression sont directement liées à l'état physiologique et/ou à l'environnement cellulaire sont généralement présentes en faible concentration et donc difficile à identifier. L'utilisation d'une grande quantité d'échantillon ne rend pas leur détection plus simple, bien au contraire. Le traitement sur puce avec la lyse cellulaire intégrée détaillé dans le paragraphe précédent pourrait donc être d'une aide précieuse pour l'identification de ces protéines. En effet, l'identification de plus 2700 protéines avec moins de 30 000 cellules, sans fractionnement de l'échantillon, permet l'utilisation d'un nombre de cellules bien plus faible, comparé au traitement en solution (Figure 47).

Dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe du laboratoire des Biomolécules de l'ENS et le SMBP, nous avons appliqué notre CFP à l'étude de l'activité antioxydante d'une molécule synthétique mime de SOD appelé Mn1 sur cellules épithéliales intestinales HT29-MD2. L'analyse protéomique de ces cellules a pour but d'identifier les protéines sensibles au stress oxydatif induit par le lipopolysaccharide (LPS) dans un premier temps. Dans un second temps, l'expression et l'oxydation de ces protéines sont évaluées dans le cas où les cellules sont présentes dans un milieu contenant à la fois du LPS (pour induire le stress oxydatif) mais aussi le Mn1 dont l'effet antioxydant doit être évalué.

L'idéal aurait été de réaliser le protocole OcSILAC sur le ChipFilter couplé à la LC sur environ 30 000 cellules mais il se trouve qu'une étape de fractionnement est nécessaire dans cette étude. Au vu des résultats des tests d'enrichissement en ligne qui ne sont pas suffisamment performants, nous avons décidé de ne pas la mettre en œuvre dans cette première étude . L'étape d'enrichissement sera donc faite ici en mode *offline,* comme dans le protocole OcSILAC classique mais toutes les étapes précédentes seront réalisées dans le *ChipFilter*, ce qui nous permet de travailler avec bien moins de matériel de départ. Au lieu des 3 millions de cellules normalement requises, seulement 150 000 cellules ont donc été utilisées pour prendre en compte la perte d'échantillon qui pourrait survenir lors de cette étape réalisée en dehors du *ChipFilter*.

On dispose de 3 séries d'échantillon : i) des cellules contrôle, n'ayant subi aucun traitement ii) des cellules ayant été exposées à un stress oxydatif iii) des cellules exposées à un milieu de stress oxydatif mais traitées avec l'agent antioxydant Mn1. Chaque série est composée d'une version lourde et d'une version légère du même type de cellule. La version légère est celle qui est traitée dans les 3 cas et la version lourde n'est jamais traitée, et est utilisée comme contrôle. Pour l'analyse protéomique en CFP, 150 000 cellules de chaque version (lourde et légère) d'une série sont donc mélangées avant traitement dans le *ChipFilter*.

Après chaque analyse, la distribution des rapports d'abondance des protéines issues de chaque version d'une série est étudiée. La comparaison des protéines identifiées est ici aussi illustrée dans les diagrammes de Venn qui suivent. Dans ces trois figures sont rassemblés les comparaisons des identifications de protéines identifiées à partir de la fraction non retenue sur streptavidine (ne contenant donc pas de protéines oxydées) et de la fraction retenue (où se retrouvent les peptides oxydés biotinylés) Ces résultats sont

comparés pour les trois séries d'échantillons. Les distributions sont centrées sur 0 ce qui signifie dans tous les cas que les deux échantillons lourds et légers des deux fractions sont en abondance équivalente.

Echantillon contrôle : Il faut constater un léger biais entre les versions lourde et légère du contrôle. La version légère semble légèrement plus riche en identifications que la version lourde.

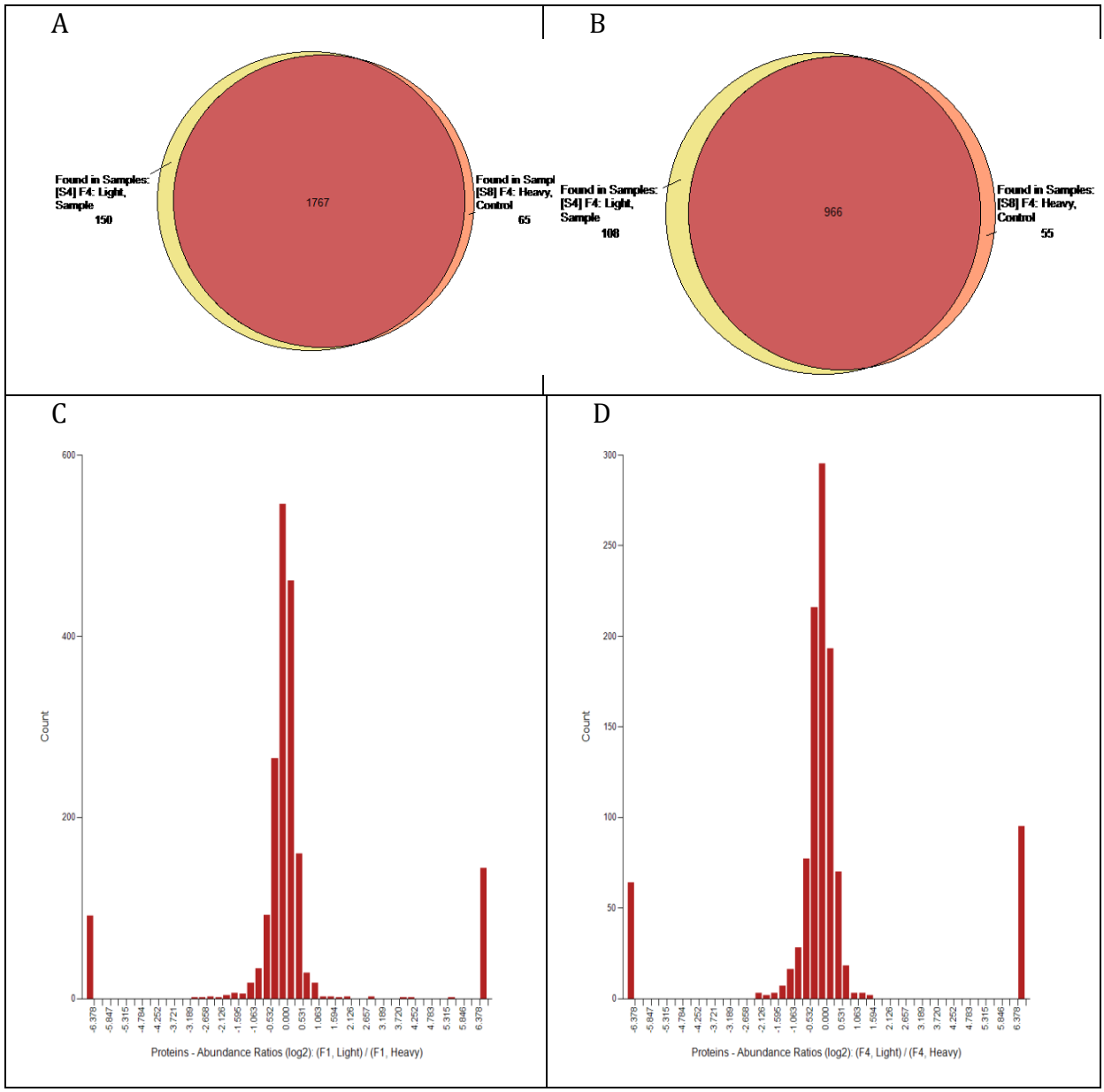


Figure 48 Echantillon contrôle :comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

Echantillon LPS :

Ici comme illustré dans les diagrammes de Venn ci-dessous, l'échantillon léger et l'échantillon lourd contiennent un nombre de protéines relativement comparable dans la fraction non retenue, c'est-à-dire celle contenant les espèces sous leur forme réduite et non biotinylée, en revanche il y a beaucoup plus de protéines retenues sur streptavidine, et donc oxydées, identifiées dans l'échantillon traité LPS. Ce qui signifie qu'il y a plus d'espèces identifiées sous forme oxydée dans l'échantillon LPS ce qui est attendu. En revanche les distributions des rapports d'intensité des formes oxydées identifiées dans les deux échantillons traité et non traité sont cependant décalées vers des ratios léger/lourd inférieurs à 0en ce qui concerne la fraction retenue et donc oxydée (en bas à droite), ce qui signifie que, pour les protéines simultanément identifiées dans les deux échantillons, les espèces oxydées sont plus abondantes dans l'échantillon contrôle.

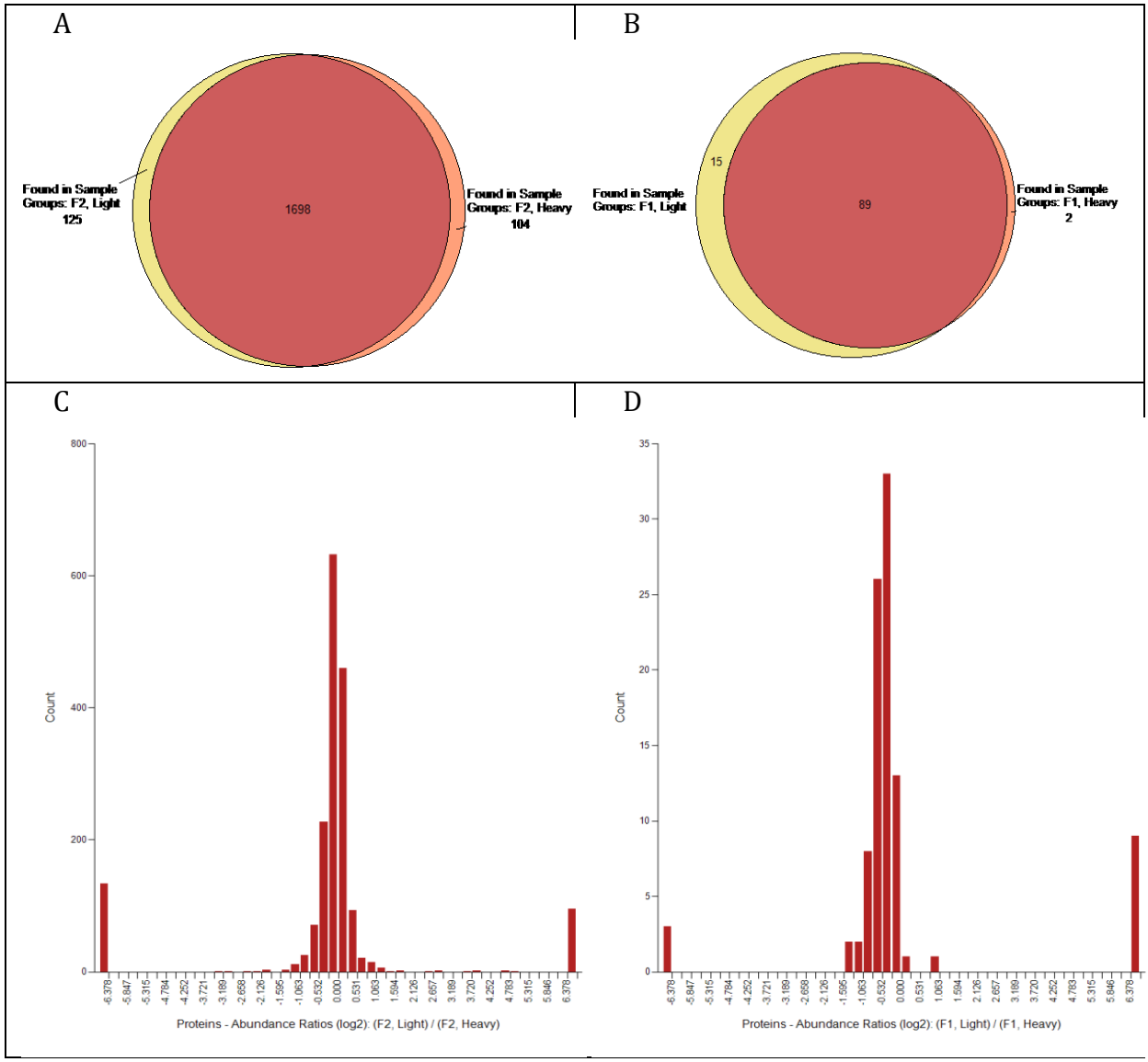


Figure 49 : Echantillon LPS : comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

Echantillon LPS-Mn1 :

Malgré le biais constaté entre les contrôles lourd et léger, les diagrammes de Venn montrent ici que l'échantillon lourd contrôle contient plus de protéines dans la fraction non retenue et donc réduite (en haut à gauche). Le nombre de protéines dans la fraction oxydée (en haut à droite) est comparable dans la fraction retenue sur streptavidine ce qui signifie que les espèces oxydées sont en nombre comparable dans le contrôle et dans l'échantillon réduit. On peut donc émettre l'hypothèse que le Mn1 a bien effet anti-oxydant puisqu'il corrige la tendance observée dans l'échantillon LPS.

Les distributions des protéines sous forme réduite sont centrées sur 0, ce qui implique que l'abondance des protéines réduite est comparable dans ces deux échantillons alors que la distribution des espèces retenues est décalée vers les faibles rapports léger/lourd ce qui renforce l'hypothèse d'une plus faible abondance des espèces oxydées dans l'échantillon traité LPS-Mn1 en comparaison au contrôle.

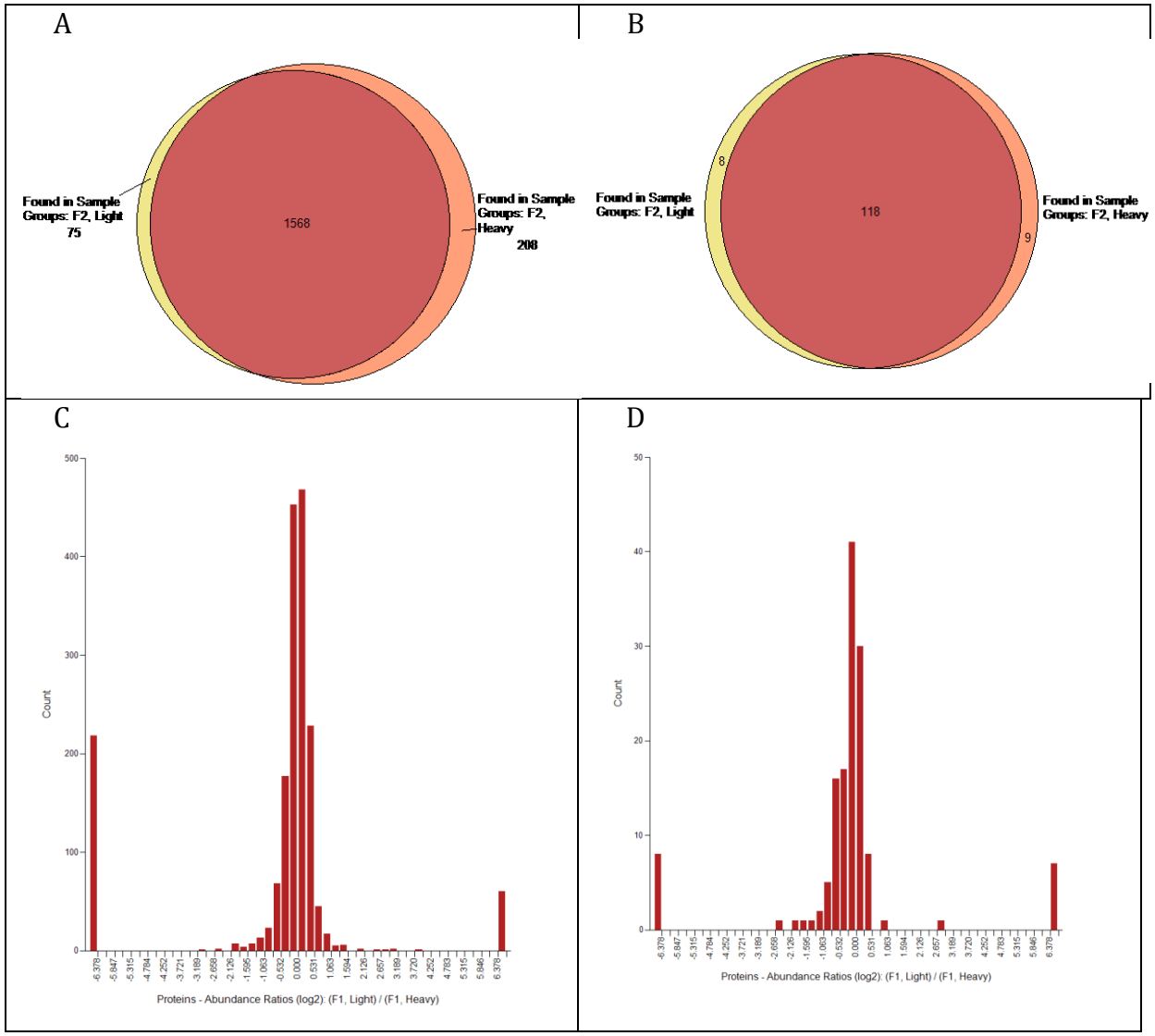


Figure 50 : Echantillon LPS_Mn1 :comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

En conclusion, le CFP appliqué à l'étude du traitement LPS et LPS-Mn1 sur les cellules épithéliales intestinales HT29-MD2 a permis de montrer que après un traitement au LPS l'abondance des protéines oxydées augmente, et que l'application de l'anti-oxydant Mn1 permet de réduire les protéines redox, et ce vraisemblablement avec un effet réducteur suffisamment important pour que l'état redox global des protéines soit décalé vers une état réduit plus important que les conditions basale du contrôle.
Il sera nécessaire de répéter cette étude pour pouvoir réaliser un traitement statistique plus avancé afin de conclure. Les études sont en cours pour finaliser ce point et font l'objet d'une thèse actuellement au laboratoire.

La sensibilité du dispositif permet d'envisager des analyses sur réplicas biologiques plus nombreux car il nécessite un nombre de cellules 20 fois plus faible ce qui est très important pour les designs expérimentaux de cette étude. Encore une fois l'intégration de l'étape de fractionnement streptavidine-biotin serait un atout supplémentaire pour minimiser les pertes d'échantillon et augmenter la couverture du protéome de nos échantillons.

Conclusion générale

Malgré une préparation d'échantillon complexe, la protéomique *bottom-up* est l'approche la plus couramment utilisée pour l'analyse des protéines. Le protocole OcSILAC est une approche de protéomique *bottom-up* optimisée pour la quantification de l'oxydation des cystéines tout en réduisant au maximum les risques d'oxydation artéfactuelle. Il a comme principales faiblesses sa durée et les pertes d'échantillon entrainées par les étapes de précipitation acide des protéines dans le protocole. La miniaturisation du protocole OcSILAC était l'objectif principal de cette thèse. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps développé une alternative à la précipitation acide des protéines dans le protocole OcSILAC. Ce dernier n'était compatible avec le lavage par filtration moléculaire.

En effet, la dissolution de la biotine HPDP EZ-Link (utilisée pour le marquage différentiel des résidus cystéine et non soluble dans l'eau) nécessite l'utilisation du DMF qui est incompatible avec la membrane de filtration en cellulose régénérée. Le DMF n'est pas non plus compatible avec le PDMS, couramment utilisé en microfluidique. Nous avons donc testé l'utilisation de la biotine HPDP-WS qui est modifiée pour être soluble dans l'eau. Les tests comparatifs des 2 types de biotine n'ont pas montré de différence au niveau de l'efficacité de marquage des cystéines oxydées. Ceci permet d'utiliser la biotine modifiée pour transposer le protocole OcSILAC entièrement en solutions aqueuses. Dans une première approche, le protocole OcSILAC a alors été optimisé sur membrane d'ultrafiltration avec un seuil de coupure à 10 kDa, de type Microcon® en étudiant le volume et la nature de la solution de rinçage. Une meilleure couverture du protéome a été obtenue avec le traitement sur membrane et sans précipitation acide des protéines, et sans induire plus d'oxydation artéfactuelle par rapport au protocole classique. Ceci nous a permis de valider l'approche de traitement d'échantillon sur membrane de filtration moléculaire qui est plus compatible avec la conception d'un dispositif microfluidique.

Nous avons fait le choix de fabriquer un dispositif en PDMS par photolithographie douce. Le choix du PDMS est motivé d'abord par son bas coût et l'accès aux installations nécessaires à sa microfabrication par photolithographie douce. Le prototypage est facile. Il est aussi et surtout motivé par les propriétés élastiques de ce polymère et sa capacité à pouvoir se lier de manière covalente à d'autres matériaux y compris un autre morceau de PDMS. Ces propriétés ont été cruciales dans l'intégration de la membrane de filtration. Un premier dispositif multi-réacteurs en PDMS/PMMA avait été conçu. Celui-là a dû être repensé suite à des problèmes de dispersion. Un format à réacteur simple a ensuite été adopté pour éviter la dispersion mais le dispositif n'étant pas assez étanche autour de la membrane, les protéines n'étaient donc pas retenues efficacement. Enfin, le format de

réacteur simple a été conservé mais la conception du réacteur a été modifiée afin d'intégrer de façon robuste l'étape de filtration sur membrane sans perte de rétention notable. En faisant 2 niveaux de photolithographie : le premier destiné aux chambres de réaction et le deuxième aux structures permettant d'intégrer la membrane de filtration elle-même la photolithographie douce double couche a permis de développer un dispositif microfluidique bien adapté à la miniaturisation des étapes de préparation d'échantillon en protéomique *bottom-up* appelé *ChipFilter.* Il a été testé sur la BSA avant d'être utilisé pour la couverture d'un protéome complexe et à la préparation d'échantillon pour une analyse redox. Afin de transférer la stratégie de quantification de l'état redox des cystéines, nous nous sommes ensuite intéressés à divers points plus spécifiques. Le protocole pour l'étude de l'état redox des cystéines inclut une étape d'enrichissement des peptides contenant une cystéine oxydée via une purification par affinité de type streptavidine/biotine. Pour cela les peptides doivent être biotinylés avec une biotine clivable, la biotine HPDP. La faible proportion du nombre de peptides identifiés portant une cystéine rend nécessaire de rajouter un module d'enrichissement des peptides marqués avec la biotine. Une étape d'enrichissement de ces peptides a donc été implémentée au *ChipFilter* mais sans augmentation significative du nombre relatif de peptides portant une cystéine. Le nombre absolu de peptides identifiés est cependant supérieur à ce qui est obtenu avec le protocole en solution avec précipitation acide. Enfin l'étape de lyse des cellules pour l'extraction des protéines a été évaluée avec succès pour les cellules de mammifère au sein même du *ChipFilter.* Ceci permet d'abaisser encore le nombre de cellules nécessaires à l'analyse.

Avec uniquement 1 heure de digestion d'un échantillon complexe, le traitement sur *ChipFilter* a permis d'obtenir une meilleure couverture du protéome que la méthode FASP (16 heures de digestion). Par ailleurs les résultats obtenus montrent que le traitement sur puce induirait moins d'oxydation artéfactuelle. Le couplage du *ChipFilter* à la LC a permis d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité des étapes de préparation d'échantillon de manière significative. Le traitement sur puce d'1 µg et de 500 ng d'extrait protéique initial a permis d'identifier en moyenne 1700 et 1350 protéines respectivement. Comparé à la méthode FASP, le traitement sur puce permet d'obtenir une couverture du protéome légèrement meilleure avec 10 fois moins d'échantillon et un temps de traitement 8 fois inférieur.

En protéomique *bottom-up*, de l'extraction des protéines à leur analyse en MS, les protéines font l'objet de traitements chimiques et enzymatiques suivies par la séparation en LC des peptides générés. Ces manipulations entrainent des pertes d'échantillon au niveau protéique et peptidique tout au long de la préparation. En intégrant les étapes de lyse cellulaire et de traitements chimique et enzymatique, le *ChipFilter* a permis de réduire les pertes d'échantillon au niveau protéique. Son couplage à la LC a permis de réduire les pertes au niveau peptidique. La prochaine étape pour rendre le *ChipFilter* plus performant est de le coupler à une nano-colonne pour la purification et la séparation en ligne des peptides générés. Une nanocolonne capillaire en monolithe C18 serait plus adaptée du fait d'une plus faible pression[117] générée comparée aux colonnes à particules (*Packed column*). Une nanocolonne en monolithe pourrait aussi être équipée d'un tip pour que

l'ensemble soit couplé directement à la MS. Cependant, une meilleure connaissance de la cinétique des réactions dans le *ChipFilter* est nécessaire pour accélérer un maximum possible le traitement sur puce et éviter une monopolisation d'appareil de MS. En effet la cinétique de la digestion sur puce a été évaluée mais celle des réactions chimiques est peu connue. Ces informations permettront de se placer dans des conditions idéales pour le traitement sur puce tout en réduisant au maximum le "temps machine" une fois le couplage réalisé. Cette disposition permettra aussi un couplage direct avec la spectrométrie de masse et donc un gain en sensibilité et en rapidité. La diminution de la taille des chambres de réaction et de la membrane de filtration (4 mm et 4.3 mm respectivement dans sa version actuelle) pourrait permettre un gain en sensibilité. L'amélioration de la sensibilité suite à la réduction des chambres de réactions et le couplage direct à la MS permettra-t-elle de prétendre à la protéomique sur cellule unique ? Ce domaine est en effet en pleine expansion et la microfluidique fait partie des pistes retenues pour faire de la protéomique sur seule cellule unique[113].

Notre dispositif microfluidique pourrait être utilisé dans l'étude du glycoprotéome ou du phosphoprotéome, des PTMs qui font l'objet d'un grand nombre de publications dans la littérature scientifique ces derniers temps. Les membranes de filtration moléculaire ont été utilisées dans l'analyses des N-glycanes[114]. Dans l'étude de la glycosylation des protéines, le *ChipFilter* permettrait de séparer facilement et rapidement les sucres du reste de la protéine avec l'utilisation de la PNGase par exemple. En effet, les glycoprotéines pourraient être retenues sur la membrane de filtration dans un premier temps. Puis, l'ajout de PNGase permettrait de libérer les N-glycanes. Ces derniers peuvent être incorporées dans des structures de différentes masses moléculaire mais celles-ci ne dépassent pas 4000 Da pour les plus connues[115], donc de taille suffisamment faible pour passer à travers la membrane de filtration de 10 kDa. Les N-glycanes peuvent ainsi être séparés des protéines déglycosylées. Les sites de glycosylation peuvent ensuite être identifiés en ajoutant de la trypsine pour digérer les protéines déglycosylées restées retenues dans le *ChipFilter*.

L'analyse des phosphopeptides d'un échantillon protéique complexe passe souvent par une étape de fractionnement car ces peptides ont une faible capacité d'ionisation, spécialement en présence d'autres peptides non phosphorylés[116]. Un traitement dans le *ChipFilter* suivi du piégeage en ligne sur une phase solide spécifique aux phosphopeptides permettrait de gagner en sensibilité. De manière générale, le *ChipFilter* beaucoup de possibilités dans la caractérisation des PTMs. Ceci, grâce au fait que les marquages ciblés peuvent être réalisés rapidement et les réactifs en excès rincés sans causer de perte d'échantillon.

Même si le *ChipFilter* permet de traiter un échantillon protéique en une durée plus courte comparée aux méthodes conventionnelles, il ne peut traiter, dans le format actuel, qu'un échantillon à la fois. Le traitement en parallèle pourrait permettre au *ChipFilter* de rester attractif face aux méthodes conventionnelles pour l'analyse d'un grand nombre

d'échantillon. Un retour au format multi-réacteurs en intégrant les améliorations ayant permis d'intégrer proprement la membrane de filtration est une possibilité à évaluer.

Annexe 1 : La spectrométrie de masse par électrospray couplée à la chromatographie liquide

L'analyse des protéines peut se faire en mode criblage (global) mais aussi en mode ciblé. La protéomique *shotgun* est l'approche la plus utilisée en mode criblage quand l'objectif est de couvrir le protéome le maximum possible. Elle est caractérisée par une digestion en solution suivie d'une analyse des peptides générés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Initialement effectuée en 2 dimensions (échange de cation, phase inverse), la séparation est maintenant plus couramment effectuée à une seule dimension (phase inverse). Ceci est dû d'une part au développement de système de chromatographie à haute pression, ce qui a permis d'augmenter la capacité de pic des systèmes en augmentant les débits de phase mobile et les longueurs de colonne, toute choses égales par ailleurs, et d'autre part à l'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution et haute fréquence d'acquisition qui permettent de séparer toujours plus d'espèce co-éluées. L'analyse *shotgun* est généralement effectuée en nanoLCMS/MS. Nous allons décrire dans cette annexe les composants et les paramètres les plus importants dans un couplage chromatographie -spectrométrie de masse.

A1.1 Chromatographie en phase liquide :

La séparation en chromatographie en phase liquide (LC pour *Liquid Chromatography*) est d'une importance capitale dans l'analyse des protéines par l'approche *bottom-up*. La digestion d'un échantillon complexe génère un nombre élevé de peptides et il est nécessaire de les séparer par chromatographie afin de réaliser des injections séquentielles de mélanges simplifiés dans le spectromètre de masse. Les plus grandes sensibilité sont aujourd'hui attentes avec le nanoLCMS[3]. Par définition, les colonnes nanoLC sont celles ayant un diamètre interne inférieur ou égal à 100 µm associées à des débits de l'ordre de quelques dizaines de nL/min[4]. La séparation des peptides se fait selon plusieurs types d'interaction dont les plus courantes sont les interactions hydrophobes (phase à polarité inversée) et l'échange de cations forts (SCX pour Strong Cation eXchange). Durant cette thèse, une colonne à polarité de phase inversée de 75 µm de diamètre interne et de 50 cm de longueur a été utilisée pour toutes les analyses. Un gradient eau/acétonitrile en présence de 0.1% d'acide formique (v/v) allant de 1 à 40% a été utilisé. Une heure de gradient a été appliquée pour les échantillons moins complexes (échantillon enrichi par chromatographie d'affinité) et 2 voire 3h de gradient pour les échantillons les plus complexes. Les deux paramètres les plus importants du couplage LC-MS sont le facteur de dilution et la capacité de pic.

Le facteur de dilution représente la dilution radiale de l'analyse dans la colonne. Il est directement lié au diamètre interne de cette dernière. L'utilisation d'une colonne de faible diamètre interne entraine une faible dilution radiale et donc une augmentation de la sensibilité par augmentation de la concentration locale de chaque soluté. Ceci montre la compatibilité de la nanoLC à l'analyse de faible quantité d'échantillon.

La capacité de pic est le nombre de pics pouvant être séparés dans une fenêtre de temps avec une résolution donnée. Indépendamment du type de colonne (particulaire ou monolithique), la capacité de pics dépend de la durée du gradient et de la longueur de la colonne de séparation. La combinaison d'un faible diamètre interne et une grande longueur de colonne permet d'augmenter considérablement la capacité de pics et la sensibilité. Une colonne de 87 cm de longueur et 15 µm de diamètre interne a permis d'obtenir une capacité de pic d'environ 1000[5]. Cependant, ces systèmes sont associés à d'importantes pressions de phase mobile.

A1.2 ESI : Ionisation par électrospray

L'ESI est une technique d'ionisation douce et elle fait partie des sources d'ionisation à pression atmosphérique (API : *Atmospheric Pressure Ionisation*), ce qui en fait une source d'ionisation très adaptée à l'analyse des biomolécules et au couplage à la chromatographie liquide ou à l'électrophorèse capillaire. Le processus d'ionisation par ESI des peptides ou protéines (analytes issus d'une séparation par LC par exemple) commence à leur arrivée au niveau d'un capillaire en forme de fine aiguille située entre 0,5 et 3 cm de l'entrée du spectromètre de masse. Une différence de potentiel électrique d'une valeur généralement comprise entre 2 et 5 kV est appliquée entre le capillaire et l'entrée du spectromètre de masse. Ce champ électrique entraine la transformation du liquide sortant du capillaire sous la forme du cône de Taylor, puis à la formation de gouttelettes chargées. En plus du champ électrique, ces gouttelettes sont aussi soumises à un gradient de pression entre la pression atmosphérique au niveau de la source etle vide dans la première partie du spectromètre de masse (10^{-6} mbar environ). La taille initiale de ces gouttelettes composées d'un mélange d'eau et de solvant est de quelques dizaines de micromètres. Elle va diminuer durant le transport entre le capillaire et l'entrée du MS par évaporation mais aussi par des explosions coulombiennes successives dues à une densité de charge trop élevée, menant à la désorption des analytes chargés en phase gazeuse. L'état de charge d'un peptide ou d'une protéine à l'issue de ce processus dépend entre autres de sa taille, de sa séquence et du pH de la solution. Pour produire des ions chargés positivement, on utilise généralement une solution acide. En plus de la charge dans la solution, une protonation supplémentaire est notée durant le processus d'ionisation. L'application d'un flux de gaz à l'interface entre le capillaire et l'entrée du MS peut améliorer l'évaporation du solvant. La miniaturisation de la source ESI dans années 1990 a permis d'obtenir de meilleures performances d'ionisation, une meilleure sensibilité tout en rendant inutile l'utilisation d'un gaz à l'interface. En effet, l'ionisation par nano-électrospray avec un capillaire d'ionisation d'1 µm de diamètre interne a permis de produire des gouttelettes 100 fois plus petites. Ce système associé à un faible débit (0-40nL/min) a permis d'avoir une sensibilité 10 à 100 fois plus élevée[6].

Il existe maintenant des sources ESI permettant de faire la jonction de manière fiable et robuste entre la chromatographie en phase liquide et des analyseurs comme les quadripôles (Q), les trappes d'ions et les Orbitraps ainsi que des combinaisons d'analyseurs comme le Q-TOF (quadripôle-temps de vol). Durant cette thèse, nous avons

utilisé une combinaison de nanochromatographie en phase inverse (nano RPLC) couplée à une source nanoESI et un analyseur hybride quadripôle Orbitrap.

A1.3 Analyseurs de masse :

Le type et la quantité d'ions à analyser dépendent de la source d'ionisation mais la qualité et la fiabilité de l'analyse sont déterminées par le duo : analyseur de masse et détecteur[7]. Les analyseurs les plus couramment utilisés en protéomique sont les trappes d'ion linéaires (LIT), les Orbitraps, les cellules à résonance cyclotronique d'ions (ICR), les quadripôles (Q) et les analyseurs à temps de vol (TOF). Les analyseurs de masse permettent la séparation et le tri des molécules ionisées en phase gazeuse selon leur rapport masse sur charge (m/z). Ils sont caractérisés par leur sensibilité, leur précision et leur gamme dynamique (tableau 7). Les molécules ionisées sont soumises à des champs électriques ou magnétiques dont les variations contrôlées permettent de séparer et de trier les molécules chargées. Les trappes linéaires sont des analyseurs qui permettent à la fois l'isolation et la fragmentation des molécules chargées. Elles sont souvent associées à d'autres analyseurs comme le FT-ICR, le TOF et plus récemment l'Orbitrap. Il est en effet possible d'associer plusieurs analyseurs dans un même appareil de spectrométrie de masse. C'est le cas du Thermo Scientific™ Q Exactive™ HF utilisé durant cette thèse. Cet appareil hybride intègre à la fois un quadripôle (Q) et un orbitrap. Le premier analyseur est utilisé pour le tri et la sélection des ions précurseurs et le deuxième, pour la séparation et la détection.

Tableau 11 : Les analyseurs de masse les plus utilisés en protéomique

Analyseurs	Résolutio à 400 m/z	Précision de masse (ppm)	Gamme dynamique (décades)	Gamme de masse
Quadrupole (Q)	1000 à 2000	100	6	8000
Trappe linéaire (LIT)	1000 à 2000	100	4	6000
Temps de vol (TOF)	10 à 50 milles	20-50	4	500000
Orbitrap	75 à 240 milles	10	4	1000
ICR	100 à 500 milles	5	4	4000

L'analyseur Orbitrap a été présenté pour la première fois en 1999 avant d'être commercialisé en 2005 dans un appareil ou il est associé à une trappe linéaire (LTQ Orbitrap)[7]. C'est un piège à ions orbitalaire électrostatique constitué de 2 électrodes externes (les 2 formant une sorte de baril) électriquement isolés par un espace très fin et reliées par une troisième électrode centrale de forme fuselée. Un champ électrique est généré par application d'une tension continue entre les électrodes centrale et externes. Les ions, injectés ponctuellement de manière tangentielle dans le volume entre les électrodes

externes et centrale, tournent autour de cette dernière, oscillent le long de l'axe de l'électrode centrale à une fréquence inversement proportionnelle à la racine carrée du rapport m/z de l'ion et induisent un courant image sur les électrodes externes. Ce courant image est traité par transformée de Fourier pour passer de l »espace temporel à l'espace des fréquences,puis converti en spectre de masse intensité=f(m/z).

Plusieurs améliorations ont été faites depuis la première commercialisation de l'Orbitrap. L'analyseur a connu une miniaturisation et est maintenant associé à un quadripôle segmenté dans le Q_Exactive_HF. Sa miniaturisation a été associée à un champ électrostatique plus intense et donc un pouvoir résolutif plus important. Comparé à la trappe linéaire, le quadripôle présente l'avantage de pouvoir sélectionner un petit intervalle de masse de manière presque instantanée par modulation de son champ électrique à radiofréquence RF[8].

.

Annexe 2 : Protocoles expérimentaux

A2.1 : Séparation en nano-LC

La séparation en nanoLC des peptides s'est effectuée dans les mêmes conditions pour tous les résultats présentés dans ce manuscrit. Un appareil U3000 RSLCnano System (ThermoFisher Scientific) a été utilisé. Une étape de préconcentration des peptides est d'abord effectuée sur une précolonne C18 Acclaim Pepmap100 (Dionex) d'un diamètre interne de 300 µm, 5 mm de long et 5 µm de granulométrie. La séparation est ensuite effectuée sur une colonne C18 de 75 µm de diamètre interne, 50 cm de longueur et 3 µm de granulométrie Pepmap, Thermofisher Scientific. La séparation est réalisée à une température de 40°C et à un débit de 220 nL/min. Un gradient linéaire de 1 à 40% de tampon B a été appliqué.

Tampon A :98% Eau, 2% Acétonitrile 0,1% acide formique

Tampon B : 90% acétonitrile, 10% eau et 0,1% acide formique

A2.2 Acquisition MS

Un appareil QExactive HF a été utilisé avec une source nanoESI en mode positif pour l'analyse des peptides avec les paramètres suivants :

Paramètre **MS** Résolution 60 000,

AGC Target : 3.10^6,

Temps maximal d'injection 60 ms,

Gamme de masse 375 à 1500 m/z

Paramètre **MS^2 :** Résolution 15 000, top 20

AGC Target : 1.10^5

Masse minimale fixe : 100 m/z, fenêtre d'isolation 2 m/z

Exclusion dynamique : 20 secondes

A2.3 Recherche avec le logiciel MaxQuant

La recherche avec le logiciel MaxQuant s'est effectuée avec sa version MaxQuant 1.6.2.10. Les paramètres par défaut ont été laissés comme tels pour le Type : Standard, Digestion mode : Spécifique, Enzyme : Trypsine/p, Tolérance (première recherche) :20 ppm, Tolérance (recherche principale) : 4,5 ppm, Détermination Intensité Valeur au maximum. Pour les échantillons avec marquage métabolique, la multiplicité est réglée à 2 avec les marqueurs métaboliques Arg10, Lys8. L'oxydation (M), la déamidation (NQ), la

carbamidomethylation de la cystéine sont toujours ajoutées en modifications variables. Selon qu'un marquage des cystéines initialement oxydées ait été effectuées la modification HPDP est ajouté en modifications variables.

Pour la quantification des protéines, seuls les peptides (Unique+Razor) non modifiés et les peptides portant l'oxydation de méthionine sont utilisés.

Annexe 3 : Détails sur la microfabrication et manipulation microfluidique

A3.1 Design et impression des motifs

Tous les motifs imprimés durant cette thèse ont été dessinés avec le logiciel CleWin 5. Les plots situés à l'intérieur des chambres pour supporter la membrane sont les plus petits et font 50 µm de diamètre.

Les motifs ont ensuite été imprimés sur une feuille transparente à l'aide d'un photoplotterFilmstar-Plus équipé d'un Laser-diode 670 nm (BungardElektronik) avec des résolutions de 5 µm (objet) et 18 µm (espace entre objets). L'impression est effectuée avec une résolution verticale de 25400 dpi (*dot per inch*, point par pouce en français) et une résolution horizontale de 8128.

A3.2 Fabrication du moule

Un wafer en silice d'un diamètre de 10 cm a été utilisé. De la résine négative permanent epoxy SU-2000 (Micro-Chchem) et un UV-KUB mask aligner équipé d'une lampe UV (40 mW/cm^2, 120 mJ/cm^2) (KLOE SA) ont été utilisés pour la fabrication du moule en photolithographie. 2 types de résine Su-2000 ont été utilisés : SU-2005 et SU-2050.

Après, les dimensions des structures des 2 parties de la puce ont été mesurées au profilomètre mécanique Dektak. La Figure 51 présente une coupe verticale du *ChipFilter* avec les dimensions visées lors du design. Après fabrication, les dimensions mesurées au profilomètre mécanique donne les dimensions suivantes : H_1A : 44,31 µm, H_2A : 14,3, H_1B : 11,5, H_2A : 52,16 µm

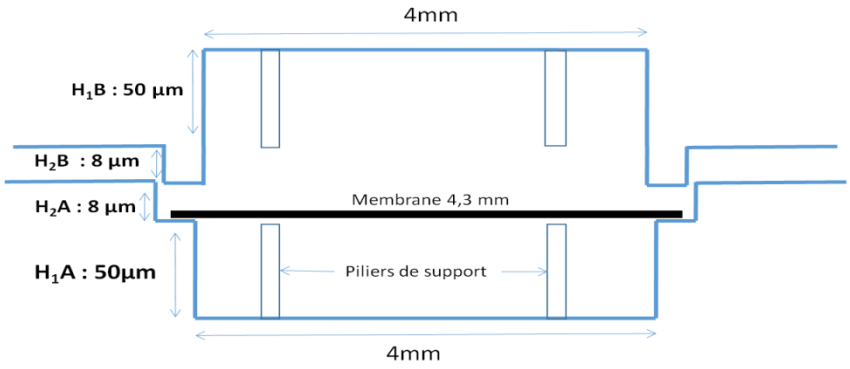


Figure 51 : Coupe verticale du *ChipFilter* avec les dimensions visées durant la microfabrication

Annexe 4 : Echantillon biologique

	Control	LPS	LPS Mn1	LPS $MnCl_2$	Quantité (µL)
Léger	2.799.999,9	3.399.999,9	2.299.999,9	3.499.999,8	100
Lourd	2.799.999,9	2.700.000	1.899.999,9	2.400.000	100

Tableau 12 : Nombre de cellules en milieuSILAC lourd (Lys8, Arg6) et léger (lignée cellulaire HT29-MD2 P45, milieu SILAC lourd et léger P8) en 4 conditions différentes (incubation de 6 heures)

A4.1 Préparation du milieu cellulaire

On a utilisé du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,ThermoScientific), déficient en arginine et lysine, supplémenté avec 10% Sérum de Veau Fœtal (SVF, ThermoScientific) activé par la chaleur pendant 30 minutes à 57°C,0.1% blasticidine (10 mg/mL, Invitrogen),L-arginine-^{13}C monohydrochloride (86.2 µg/mL) et L-lysine-^{13}C ^{15}N dihydrochloride (181.2 µg/mL) pour le milieu lourd ou L-arginine-$^{12}C_6$monohydrochloride (84 µg/mL) et L-lysine-$^{12}C_6N_2$dihydrochloride (146 µg/mL) pour le milieu léger (ThermoScientific).

A4.2 Marquage isotopique

Des cellules épithéliales intestinales HT29-MD2 ont été utilisées pour toutes les expériences décrites ici. Des cellules d'adénocarcinome du colon humain HT29 ont été obtenues de la Collection Européenne de Cultures Cellulaires (Wiltshire, UK) et transfectées pour surexprimer MD2 de manière stable. Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère 5% CO_2/air. Du milieu frais est ajouté tous les 2-3 jours. Des cellules ont été laissées pousser jusqu'à 12 doublages de population cellulaire (3 passages, 4 doublages de population respectifs) en milieu SILAC lourd et léger avant chaque expérience pour assurer un ratio d'incorporation d'acides aminés d'au moins 95%. Après avoir atteint une confluence de 80%-90%, les cellules en milieu lourd subissent des lavages avec 5 mL PBS 1x et 3 mL de milieu frais est rajouté. Puis un lipopolysaccharide (LPS 0.1 µg/mL) est ajouté dans les cellules en milieu léger pour induire une réponse inflammatoire (Figure 1B) et/ou un mime de Superoxide Dismutase Mn1 à 100 µM (Figure 1C). Les cellules sont incubées à 37°C enatmosphère5% CO_2/air pendant 6 heures. Un échantillon contrôle est nécessaire, sans incubation avec LPS ou Mn1 dans la culture cellulaire en milieu léger. Un deuxième contrôle est nécessaire, avec incubation de LPS 0.1 µg/mL et $MnCl_2$ 100 µM. Après incubation, les cellules en milieu léger (traité avec LPS et/ou Mn1) et lourd (non traité) subissent des lavages avec 5 mL PBS 1x et sont incubées à 37°C avec de la trypsine-EDTA (Gibco) pendant 10 minutes. Après centrifugation (3 min, 0.9 rcf), on effectue trois lavages de 3 mLNaCl 0.9%. Lors du 3ème lavage, les cellules sont comptées sur une plaque de Malassez (dilution 1/10) et sont stockées à -20°C dans 100 µL de l'eau distillée.

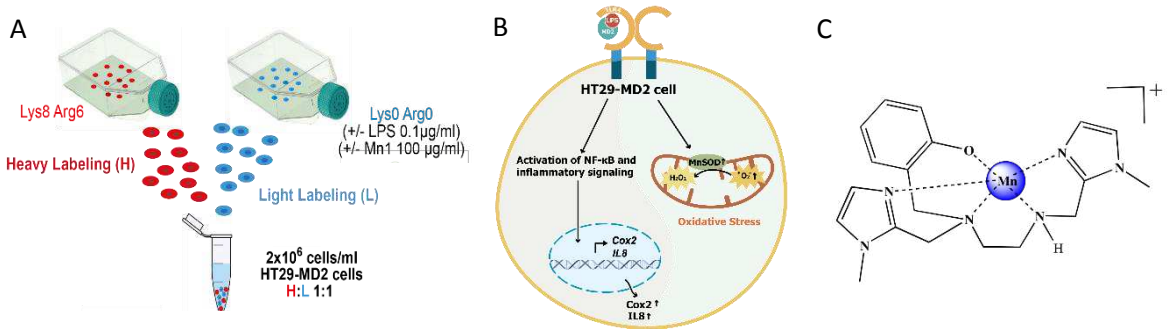


Figure 52 : Marquage métaboliqueet préparation des cultures cellulaires. B.Modèle cellulairedu stress oxydant et d'inflammation (lignée HT29-MD2). C. Mime de Superoxide Dismutase, Mn1

Annexe 5 :Article 1

Onchip sample preparation using a ChipFilter coupled to nanoLC-MS/MS for bottom-up proteomics

*Massamba M. Ndiaye, Ha Phuong Ta, Giovanni Chiappetta, and Joëlle Vinh**

Biological Mass Spectrometry and Proteomics (SMBP), CNRS-ESPCI Paris, PSL University, France

*Corresponding Author joelle.vinh@espci.fr

KEYWORDS: Proteomics, Microfluidic, ChipFilter, FASP, sample processing

ABSTRACT: Sample preparation is a crucial step in bottom-up proteomics. Analytical performances of bottom-up proteomics can be improved by the miniaturization of sample preparation steps. Many microfluidic devices are proposed in the field of proteomics. But many of them are not capable of handling complex sample and do not integrate the processing and digestion steps. We propose a ChipFilter Proteolysis (CFP) microfluidic device derived from the Filter Aided Sample Preparation FASP method for the miniaturization of protein processing and digestion steps in bottom-up proteomics. The microchip has two reaction chambers of 0.6 µL volume separated by a protein filtration membrane in regenerated

cellulose. Cell lysis, protein concentration and rapid chemical and enzymatic treatment can be performed in our microfluidic device. Complex proteomic samples like yeast protein extract have been successfully analyzed with our microchip. Compared to the traditional FASP method, our microfluidic device offers a better proteome coverage with ten times less starting material and eight times quicker protocol.

INTRODUCTION

Mass spectrometry has become the method of choice for the direct detection of bio-organic molecules. It takes a primordial place in the analysis of proteins. Among different strategies, bottom-up proteomics relies on proteolytic peptides separation and sequencing by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) after protein digestion. It is widely used because of its ease of use and robustness compared to top-down proteomics. However, protein processing for the bottom-up approach remains sample and time-consuming. In fact, after the recovery of the protein sample, it requires disulfide bonds reduction, cysteine residue alkylation to avoid any bridges reformation, proteolysis of the proteins with an endoprotease and recovery of the proteolytic peptides before chromatographic separation and tandem mass spectrometry analysis. The experimental time is even more important when aiming at post translational modifications characterization. Sample-loss is also another key issue, and several millions of cells are routinely needed for the bottom-up approach in order to recover at least 10 µg of protein extract[1]. The loss of sample during protein extraction, adsorption, protein or peptide purification and detergent removal creates a gap between the high sensitivity of LC-MS for peptide analysis and the minimum threshold of required starting material[2].

It is acknowledged that sample preparation and digestion steps in bottom-up proteomics need to be improved. Microfluidic is a logical strategy to address the sample and time-consuming problems. Several microfluidic applications dedicated to proteomic have been developed

these last years. Unfortunately, these applications were not as successful as others were in genomics. This is explained by the complexity of the proteomic sample and analysis process. The objectives are to reduce the sample quantity threshold, accelerate sample processing and digestion. Freire et al.,2006[3] pointed out the fact that microchip devices did not integrate the whole sample preparation process for bottom-up proteomics. Individual modules for on-chip digestion, pre-concentration and clean-up, peptide or protein separation were separately already available. Since that review, the situation has barely changed. Digestion is an important and unavoidable step in bottom-up proteomics but remains routinely time consuming. Several microfluidic devices have been realized in order to reduce the necessary time for protein digestion. Microfluidic has been usually combined with immobilized enzyme reactors. Immobilized trypsin, for example, is reputed to have high digestion efficiency, low auto-digestion, and reusability[4]. In fact, a number of microfluidic devices dedicated to proteomic analysis have incorporated a solid phase with immobilized trypsin. Digestion time resulted to be extremely fast: from 10 minutes for cytochrome C[5] to 15 seconds for a two standard protein mixture (Mb-BSA) (Liuni et al., 2010) with a sequence coverage from 80 to 95%. More recently, (Kecskemeti & Gaspar, 2017) presented a PDMS microchip based on immobilized trypsin on silica particles allowing rapid proteolysis in less than 10 seconds. Trypsin has been also immobilized directly on the PDMS walls for the digestion of tear samples in 10 minutes [6]. PMMA surface can be functionalized too with trypsin-agarose for rapid digestion of standard protein in less than 4 seconds (Liuni et al., 2010). Unfortunately, these microchips perform only the digestion step. The other steps involving sample denaturation, reduction of disulfide bonds, alkylation to prevent artefactual disulfide bonds had to be performed off-chip. Furthermore, no protein pre-concentration is associated with these microchips so that the sample must have high protein concentration and low contaminant levels for proper protein identification. However, some microfluidic devices are

dedicated only to sample pre-concentration and clean-up. Those microchips are generally based on sample stacking, solid phase extraction and filtration membrane. Zhang *et al*,.2003[7] integrated a nanocapillary array in a PDMS microchip dedicated to concentrate large molecules according to their charge. After preconcentration, analytes can be recovered for further processing or detected directly. Gasilova *et al*.,2013[8] used C18 functionalized magnetic beads integrated into a microfluidic device coupled to ESI-MS for peptide preconcentration. Microfluidic devices integrating a functionalized solid phase are promising devices for digestion, preconcentration or separation: Ethier *et al*.,2006[9] used SCX solid phase to make a proteomic reactor that allow protein extraction, clean-up, preconcentration, and sample digestion. Mouse cells analyzed by the SCX proteomic reactor showed increased proteome coverage than *in solution* analyses. Unfortunately, such microfluidic devices encountered two main challenges. First, the incorporation of solid support in the micro-system is challenging. Indeed, special designs have to be conceived to specifically introduce and retain solid supports. Second, the physico-chemical properties of the solid support should allow the retention of all the proteins in a sample despite the proteome complexity.

An interesting non microfluidic strategy was reported for bottom-up proteomics, the so-called Filter Aided Sample Preparation (FASP). The FASP method is based on the use of a molecular filtration membrane that retain high molecular weight (proteins) to allow easy removal of impurities and buffer component by centrifugation[10]. However, if this method addressed the issues of sample lost and proteome coverage but it did not address the time-consuming limitation. Recently, Zougman *et al*. described S-traps for the suspension trap. [11]. S-traps approach allows digestion of complex samples in 30 min. It provides the best balance of time, cost and performance when compared to in-solution and FASP digestion method[12].

In the present work, we developed a straightforward microfluidic device integrating a molecular filtration membrane called a ChipFilter. Our system takes advantage of FASP

methods for easy pre-concentration, purification and detergent removal steps and from microfluidic systems for fast reaction kinetics, capacity to integrate multiple processes, minute sample processing, and automation. The filtration membrane allows the retention of high molecular weight species so the great majority of proteins. The membrane integration in the microchip during the microfabrication is easier than solid phase packing into microfluidic devices which can be a very tedious task. Using a filtration membrane, every single step of protein processing for bottom-up proteomics can be done in one microfluidic device using the ChipFilter Proteolysis (CFP) strategy working from 1µg starting material.

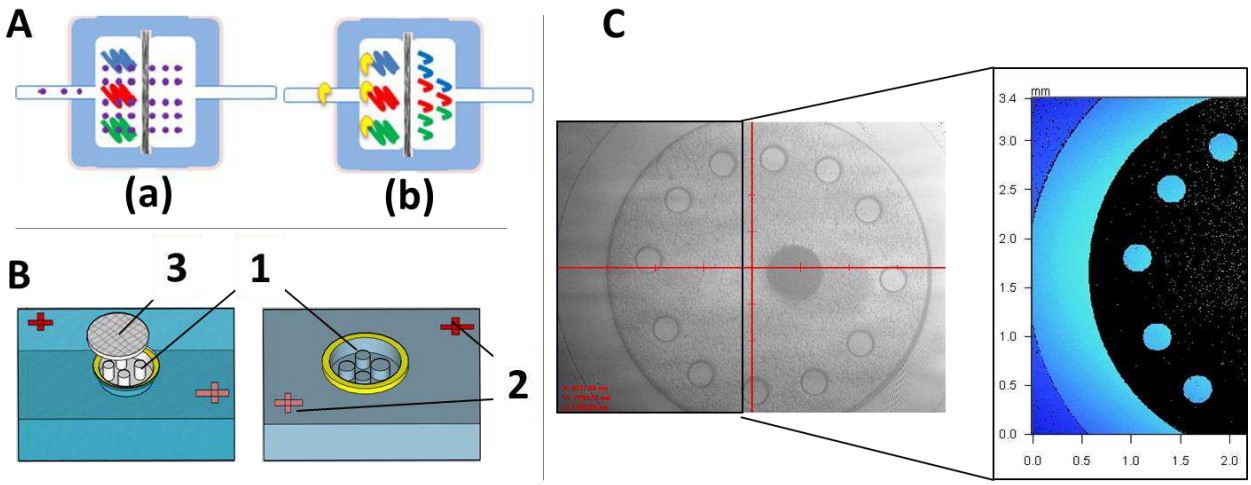
MATERIALS AND METHODS

Materials:

PolyDiMethylSiloxane (PDMS) Sylgard 184 was purchased from Dow Corning, the SU-2000 photoresist from Microchem and the silicon wafer from Entegris. Iodoacetamide (IAM), dithiothreitol (DTT) and BSA protein standard from Sigma Aldrich. Trypsin sequencing grade from bovine pancreas was purchased from Roche. LC-MS quality grade acetonitrile was purchased from ThermoFisher Scientific. The trifluoroacetic acid (TFA), trichloroacetic acid (TCA), formic acid (FA), the ammonium bicarbonate (ABC) and the urea used were from Fluka. The Milli-Q water was produced by an IQ 7000 from Millipore. The filtration membrane inside the ChipFilter was cut from ultrafiltration discs, 76 mm diameter (regenerated cellulose, 10 kDa cut-off) from Amicon Bioseparations. Glass beads for mechanical agitation yeast protein extraction and the β-octanoylglucopyranoside have been purchased from Sigma Aldrich.

FilterChip Design and Microfabrication. The PDMS microfluidic device is composed of two superimposed reaction-chambers (inner diameter 4 mm, height 50 µm, volume 0,6 µL each) assembled under a microscope. They are separated by a filtration membrane (diameter

4.3 mm) slightly larger than the reaction chamber. 150 µm diameter pillars inside the two chambers maintain the filtration membrane (see **"Figure 53**).



"Figure 53: ChipFilter Design. A) ChipFilter sample processing principle (a) sample loading and chemical processing, proteins are retained and reagents or contaminants pass through the membrane (b) enzymatic proteolysis, proteolytic peptides pass through the membrane; B) Scheme of the 2 PDMS chambers before assembly (1) pillars (2) alignments marks, (3) regenerated cellulose, 10k Da cut-off ultrafiltration membrane; C) High definition image of the reaction chamber by optic profilometry (NT9100 Veeco)."

A 3D master mold is used to ensure proper integration of the membrane. The patterns were designed with CleWin software, printed at high resolution (25,400 dpi) on a photosensitive film by a photoplotter FilmStar-PLUS: 1 mask for each reaction chamber, with a 2 steps lithography for 3D molds. The mold is composed of 2 layers of negative photoresist on the silicon wafer. The first layer is a SU-2007 resin (8 µm thickness, spin-coated at 2000 rpm), dedicated to the structure to incorporate the filtration membrane and to avoid any leakage of the reaction chamber (colored in yellow, **"Figure 53**). After baking at 95°C for 2 minutes, the first mask features were transferred onto the wafer by photolithography using a UV-KUB3 aligner (LED, 40 mW/cm^2, 160 mJ/cm^2, 5 seconds). After insolation through the mask 1 and post baked at 95°C for 2 minutes, a second photoresist is spin-coated on the first one. The

second layer is a SU-2050 resin (50 µm thickness, spin-coated at 4080 rpm) dedicated to reaction chambers and pillars. The mask 2 is aligned to the patterns of the mask 1 using a UV-KUB3 aligner. The wafer is then exposed at LED light (40 mW/cm2, 160 mJ/cm2, 4 s). Finally, the developer removed the non-exposed part of the photoresist and reveal the 3D patterns. PDMS elastomeric polymer will be used to replicate the features from the mold with high precision.

PDMS Sylgard 184 is used for the replica molding. Using a two-component mix (base/curing agent, 10:1 (mw/mw)), the liquid pre-polymer is poured on the mold and cured at 70°C for 1 h. The membrane is inserted in the first chamber before assembly. It covers the first reaction chamber and the alignment of the two chambers is obtained under a microscope using alignment marks. **"Figure 53**C shows a high definition image of one chamber and its optic profilometry to estimate the difference of height between pillars and edge and the rest of the reaction chamber. After being exposed to an air plasma (20 W, 8 sccm O2 flow and 0.13 mbar pressure) for 1 min, the 2 PDMS parts are put in contact with the membrane between them. A high pressure contact between the 2 PDMS parts will allow a tight sealing around the filtration membrane.

Yeast extract. The cellular culture has been realized in a synthetic defined liquid media. The proteins were extracted from the Y252 yeast stem by mechanical agitation (beating) with glass beads[13]. The proteins were extracted after cell lysis in 20% (v/v) TCA (600 µL) solution and 500 µL silica beating beds. Five 30s duration beatings (Vortex-T Genie 2, Scientific Industries) spaced by 1 min (cooling on ice) have realized to optimize the homogenization of the sample in a 2 mL microfuge tube. The supernatant was collected and centrifuged for 1 hour at 13,500 rpm. Proteins were rinsed with cold acetone and solubilized in urea 6 M, β-octanoylglucopyranoside 1%, protease inhibitor, and Tris 150 mM. Protein quantification have been realized by BCA quantification.

Epithelial cells

HT29 human (intestinal epithelial) colon adenocarcinoma was obtained from the European Collection of Cell Cultures (Wiltshire, UK). Cells are cultured at 37°C in a 5% CO2/air atmosphere in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoScientific). After incubation, cells are washed with 5 mL PBS 1x and incubated at 37°C with trypsin-EDTA (Gibco) for 10 minutes. After centrifugation (3 min, 0.9 rcf), cells are washed three times with 3 mL NaCl 0.9%. During the 3rd wash, cells are counted on Malassez lamella (1/10 dilution to facilitate counting). They are stored at -20°C in 100 µL of distilled water.

For the FASP analysis, proteins were extracted by adding TCA to HT29 cells (final concentration 10% TCA). After centifugation (13,500 rpm, 1h, 4°C), the supernatant was removed and the protein pellet was rinsed with cold acetone and the proteins were solubilized in urea 6 M, β-octanoylglucopyranoside 1%, protease inhibitor, and Tris 150 mM (tris HCl, pH 8.8).

For CFP analysis, the protein extraction of HT29 human cells has been realized inside the ChipFilter. First, the cells were loaded inside the ChipFilter, then a 10% TCA solution was added at a flow rate of 1 µL/min for 40 min. Proteins were then rinsed with urea 6 M, β-octanoylglucopyranoside 1%, protease inhibitor, and Tris 150 mM (tris HCl, pH 8.8), at 1 µL/min. The protein proteolysis was finally performed in the same ChipFilter.

FASP proteolysis

FASP proteolysis has been previously described[10]. The protein extract in urea 6 M, β-octanoylglucopyranoside 1%, protease inhibitor, and Tris 150 mM was added DTT 20 mM in a Microcon and incubated for 2 h at 37°C. The sample was then centrifuged at 14,000 g for 1h. IAM 200 mM was added and incubated for 1 h at 37°C. The sample was then rinsed with 1mL ABC 50 mM by ultrcentrifugation (14,000 g). Trypsin digestion was performed at a ratio

of 1:20 E/S in 150 µL ABC 50 mM, pH 8 for overnight digestion. The proteolytic peptides were then recovered by ultracentrifugation at 14,000g, 1 hour.

Proteolysis automation. A flow-EZ pressure module, a flow controller, an M-switch (Fluigent) and the soft MAT (Microfluidic Automation Tool, Fluigent) were implemented for complete automation of the digestion protocol. The starting material (1 µg of raw protein extract, quantified by BCA, V=50 µL) was loaded then rinsed with ABC 50 mM, pH 8 (buffer ABC) at 2 µL/min. Proteins were treated on the ChipFilter: reduced with DTT (20 mM) in buffer ABC (2 µL/min for 25 min and 1 µL/min for 5 min), alkylated in 50 mM IAM in buffer ABC (2 µL/min for 25 min and 1 µL/min for 5 min), and rinsed with buffer ABC to remove the residual IAM. A solution of trypsin (0.1 µg/µL in buffer ABC, 1 µg total) was injected at 2 µL/min. When the trypsin reached the reaction chamber, buffer ABC was continuously loaded at 400 nL/min for 1h. In total 3 experimental replicates were performed to compare ChipFilter and FASP methods.

NanoLC MS/MS. The proteolytic peptides were recovered in a precolumn (C18 Pepmap, 300 µm i.d x 5mm length, ThermoFisher Scientific) and analyzed in nanoLC MS/MS with a 2 hours gradient elution from 1 to 40%B (Eluant A 2% ACN in 0.1% aq. FA, eluant B 90% ACN in 0.1% aq. FA v/v) on a 75µm i.d. x 50cm length C18 column (Pepmap, ThermoFisher Scientific) using an RSLC U3000 system coupled to a nanoESI Q-Exactive HF mass spectrometer (ThermoFisher Scientific). The nanoESI (1.5kV) MS acquisition is operated in positive DDA mode using a Top20 method with automated switching between MS (350-1500 m/z, resolution 60k) and MS/MS mode (resolution 15k). Database search was performed with MaxQuant 1.6.2.10 software on Uniprot Yeast database, with a first search peptide tolerance at 20 ppm and a main search peptide tolerance at 4.5 ppm, using trypsin specificity with up to 2 missed cleavages and 3 variable modifications: carbamidomethylation (C), oxidation (M), deamidation (NQ).

Protein assay. Protein concentration was estimated by a UV spectrophotometer Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific) reading the absorbance at 280 nm.

The quantities indicated in this document correspond to the starting material quantities. They are expressed in cell number when the protein extraction is performed in the ChipFilter and in µg of protein extract when the extraction is performed outside the ChipFilter. Before the nanoLC MS/MS analysis, proteolytic peptides are concentrated on a C18 media with an estimated maximal retention capacity of 5µg (Zip-Tip pipette tips, Millipore). The elution solutions are dried (SpeedVac concentrator) and peptides resuspended in 2 µL aqueous TFA 0.1% (v/v). The 2µL volume is then injected for nanoLCMS/MS analysis. This is valid for FASP_10µg, FASP_1µg and CFP_100µg. For CFP_1µg, the ChipFilter was coupled to nanoLC, the total amount of proteolytic peptides was directly trapped and analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the experimental setup. CFP method is composed of several steps consisting first in sample loading (protein extract or cells) in the microchip by pressure driven flow, before proteins retention on the membrane while small molecules and salts are washed off, to concentrate and desalt the sample. Protein extraction and/or proteolysis was easily performed in the microfluidic device since the ChipFilter holds up to 150 °C even in acidic solutions. Moreover, protein reduction, alkylation, and labeling were to be done by adding the corresponding reagents (DTT for reduction and IAM for carbamidomethylation). Because the reagents were smaller than 10 kDa, the cut-off of the filtration membrane, the reagents in excess were completely removed by rinsing the proteins with a washing buffer. Proteolytic digestion was finally performed by flowing the trypsin solution into the reaction chamber. Like proteins, intact trypsin molecules were retained on the membrane so the digestion could be performed in a small volume above the membrane (0.6 µL). Sample and trypsin confined

in such a small volume allowed rapid and efficient digestion. Since the sizes of generated tryptic peptides in bottom-up proteomics are between 500 and 3000 Da, and they passed through the 10 kDa filtration membrane and were recovered for LC-MS analysis (**"Figure 53**A).

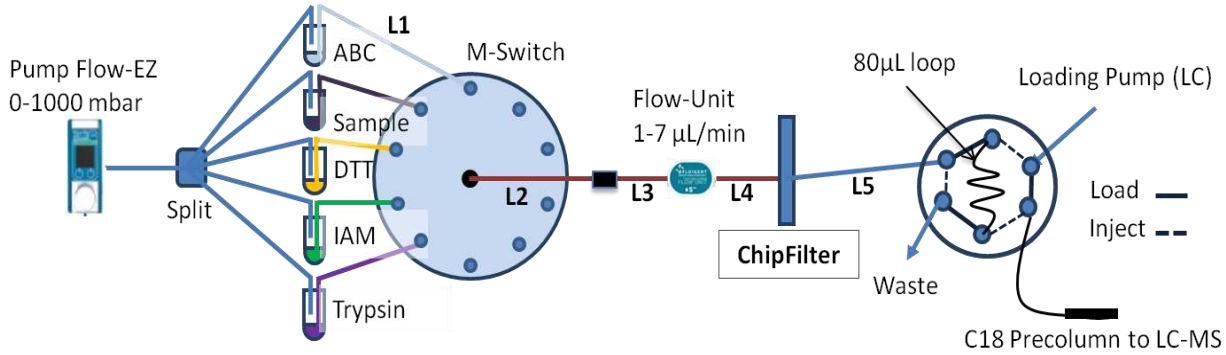
The design of the CFP device integrated a regenerated cellulose molecular membrane into a PDMS microchip. PDMS presents the advantage to irreversibly seal to itself after plasma exposure. This advantage was crucial for the ChipFilter tightness to avoid any sample leak and for the sample to pass through the filtration membrane and not around. Fluid transport and flow-rate inside the microchip were controlled by an external pump and a fluid controller. Different flow-rate values were applied depending on the steps of the digestion protocol. A maximum flow rate of 3 µL/min and a maximum pressure of 500 mbar could be used reliably.

To check if proteins are efficiently retained in the reaction chamber by the membrane, the protein concentration of BSA standard solution (500 µL, 1 mg/mL) was monitored before and after being passed through the ChipFilter membrane by UV absorption. The absorbance of the solutions was measured at 280 nm using a Nanodrop1000. No UV absorption was detected at the exit of the device confirming the absence of leaks. When the solution in reaction the chamber was recovered by reverse percolation a UV absorption slightly lower (89%) than the starting solution was detected (see Suppl Figure S1).

Different rinsing conditions were tested. ABC 50 mM, milli-Q water and a detergent solution (β-octanoyl glucopyranoside, 1%) did not affect the efficiency of the recovery. However, we found that the pressure and the flow rate may affect protein retention on the membrane. The maximum flow rate and pressure reliability were found at 3µL/min and at 500 mbar respectively. Higher values of the flow rate or of the pressure could lead to a low presence of proteins in the flow-through (data not shown).

The proteolysis of BSA (10 µg) in the ChipFilter was tested, leading to a sequence coverage of 90%. In parallel, a protein coverage of 72% was obtained with in solution digestion of 100 µg. To evaluate the limit of detection of interest, the quantity of BSA has been gradually decreased: at 400 ng, the sequence coverage of the BSA was 80%. At 100 ng and 30 ng, it reached 30% and 20% respectively.

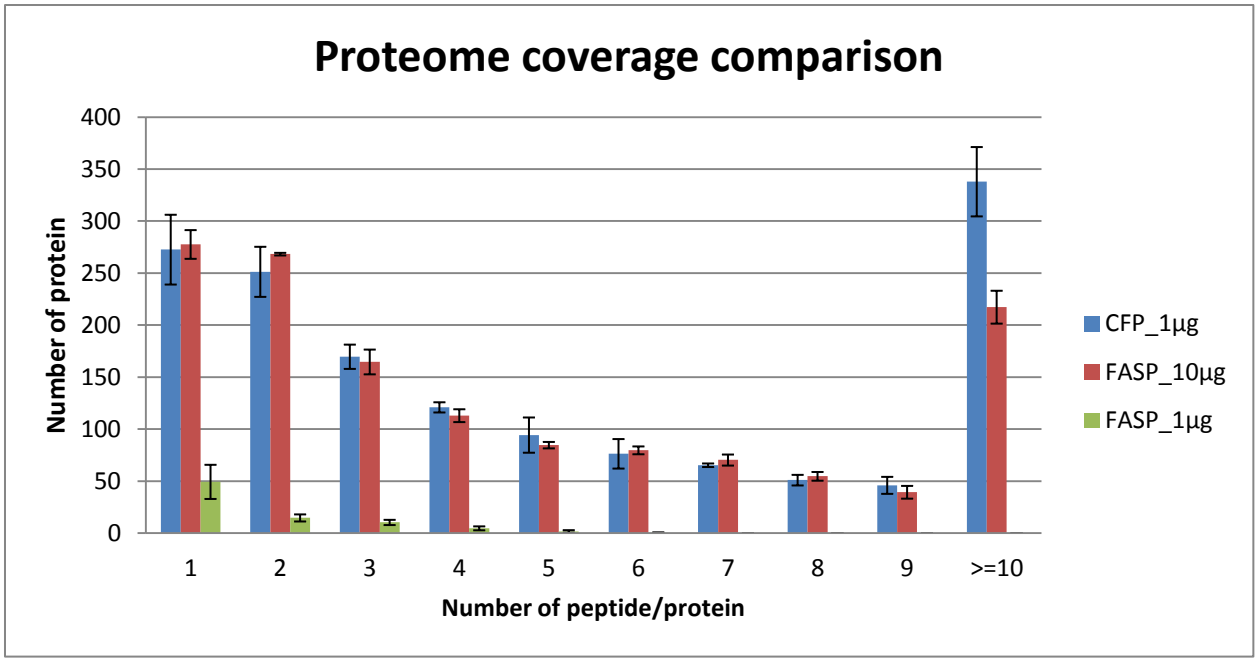
Automation of CFP. Since CFP was proven to be fully operational with BSA, it was further applied to the characterization of a total extract of yeast proteins and compared with the FASP method. The microchip was then interfaced for automation to a flow-EZ pressure module, a flow controller and an M-switch ("**Figure 54**). This setup was operated using the software MAT (see Material and Methods) for the complete automation of the protocol. The outlet of the ChipFilter was connected to the sample loop of the LC autosampler in order to perform the online nano LC-MS/MS analysis of the peptide mixture generated by the CFP.



"**Figure 54:** Automated setup for CFP coupled to nanoLC MS/MS. Using the microfluidic pump (Flow-EZ) the sample, the dithiothreitol (DTT), the iodoacetamide (IAM), the trypsin (TRP), and the ABC buffer were selected with the M-Switch before injection in the ChipFilter, with controlled flow rates using a feedback loop (Flow Unit). Eluted peptides are loaded in an 80µL loop fitted in the injection valve of the nanoLC autosampler before to be injected and concentrated on a C18 precolumn for further nanoLC MS/MS analysis. All the capillaries used in this were in PEEK (Poly EtherEtherKetone). The capillaries (L1 to L5) dimensions can be found in Supp. Table S1"

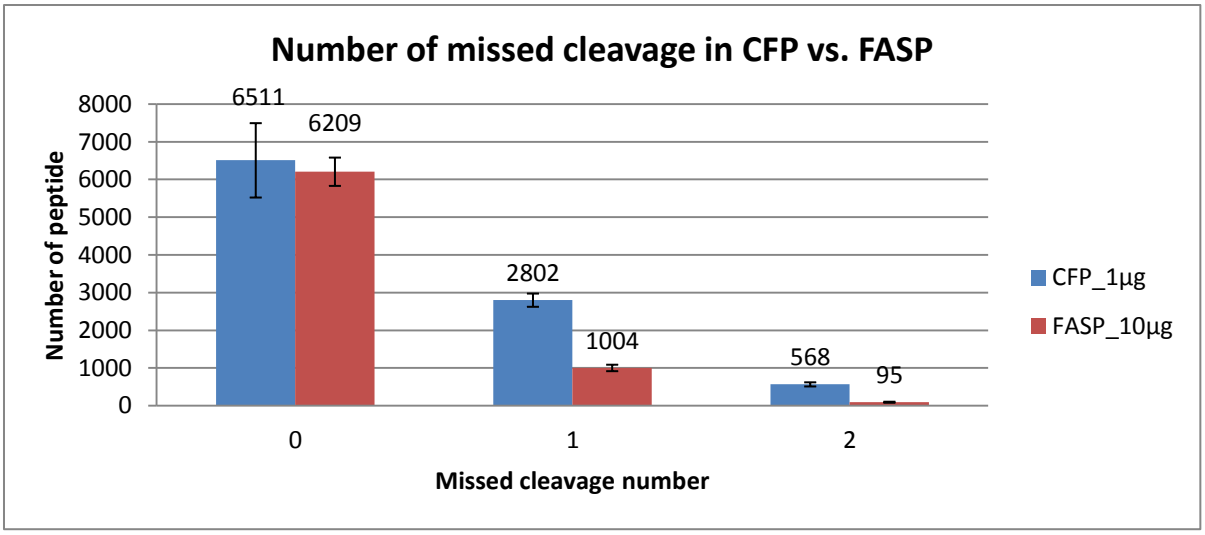
Comparison of CFP and FASP using the proteome of the Y252 strain. To assess the sample loss in our experimental setup, different amounts of raw yeast cell protein extracts were processed and analyzed. According to our validation criteria, starting with 10 µg of raw protein extract, 2300 proteins were unambiguously identified, while 1485 proteins were identified on average starting from 1 µg of protein extract, and 1295 proteins from 500 ng (data not shown).

The results obtained with 1 µg of protein extract were then compared to those of the classical FASP method using 1 and 10 µg of protein extract respectively. One major difference is the digestion time that was 1h for CFP, and 18 h for FASP. All the experiments were performed in triplicate and each CFP digestion was realized in an independent and new device. In total 1815 proteins were unambiguously identified from 1µg of protein extract as a starting material, to be compared with 1652 protein identifications from 10µg and 95 protein identifications from 1µg of starting material. We decided to compare the proteome and sequence coverages between the two most comparable results obtained with the one-hour CFP with 1µg of proteins and the overnight FASP with 10 µg of proteins (**"Figure 55**). All at once, CFP allowed to decrease drastically both the sample processing duration and the amount of required starting material, and led to improved proteome coverage. The number of proteins identified with only one peptide was greater with the FASP method than with CFP. On the opposite, the number of proteins identified with more than 10 peptides was higher for the CFP leading to more robust identifications, since protein coverage is a key parameter to differentiate proteoforms and subclasses of proteins or to detect endogenous proteolysis and protein maturation.



"Figure 55: Comparison between CFP (on chip digestion) and FASP methods (n=3): Number of protein identifications according to the number of sequenced proteolytic peptides in CFP vs. FASP. The amount of protein extract used as starting material is given for each condition"

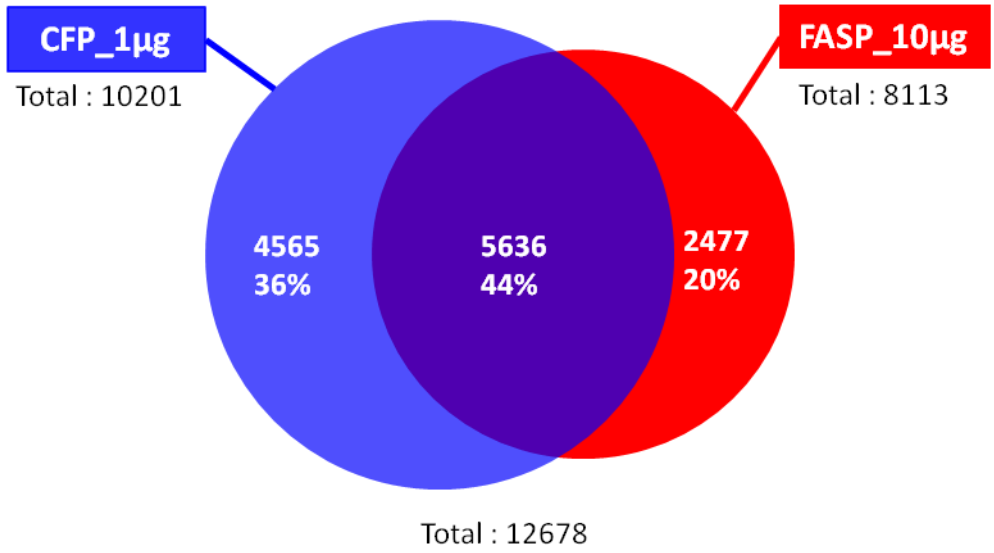
To further evaluate our setup, we compared the percentage of detected peptides with zero, one or two missed cleavages between CFP and FASP. CFP analyses showed that 65% of the detected peptide had no missed cleavage while 29% and 6% had 1 and 2 missed cleavages respectively. FASP analyses showed that 85% had no missed cleavage while 14% and 1% with 1 and 2 missed cleavages respectively (**"Figure 56**). CFP produced, in percentage, more peptides with missed cleavages and this could be related to the shorter digestion times. This effect could be a double edge sword for protein identification, leading to detect short sequence portions usually missed because of their low mass and specificity and to improve protein sequence coverage. Despite this observation regarding the relative number of identifications, it should be noted that the absolute number of identified peptides is globally higher with CFP in any number of missed cleavages. However, the peptide mass distribution remained similar to the two protocols (see Suppl. Figures S4 and S5).



"Figure **56:** Comparison of the number of identified peptides with 0, 1 and 2 missed cleavage(s) between CFP on 1 µg yeast extract and FASP on 10 µg yeast extract. (n=3,)"

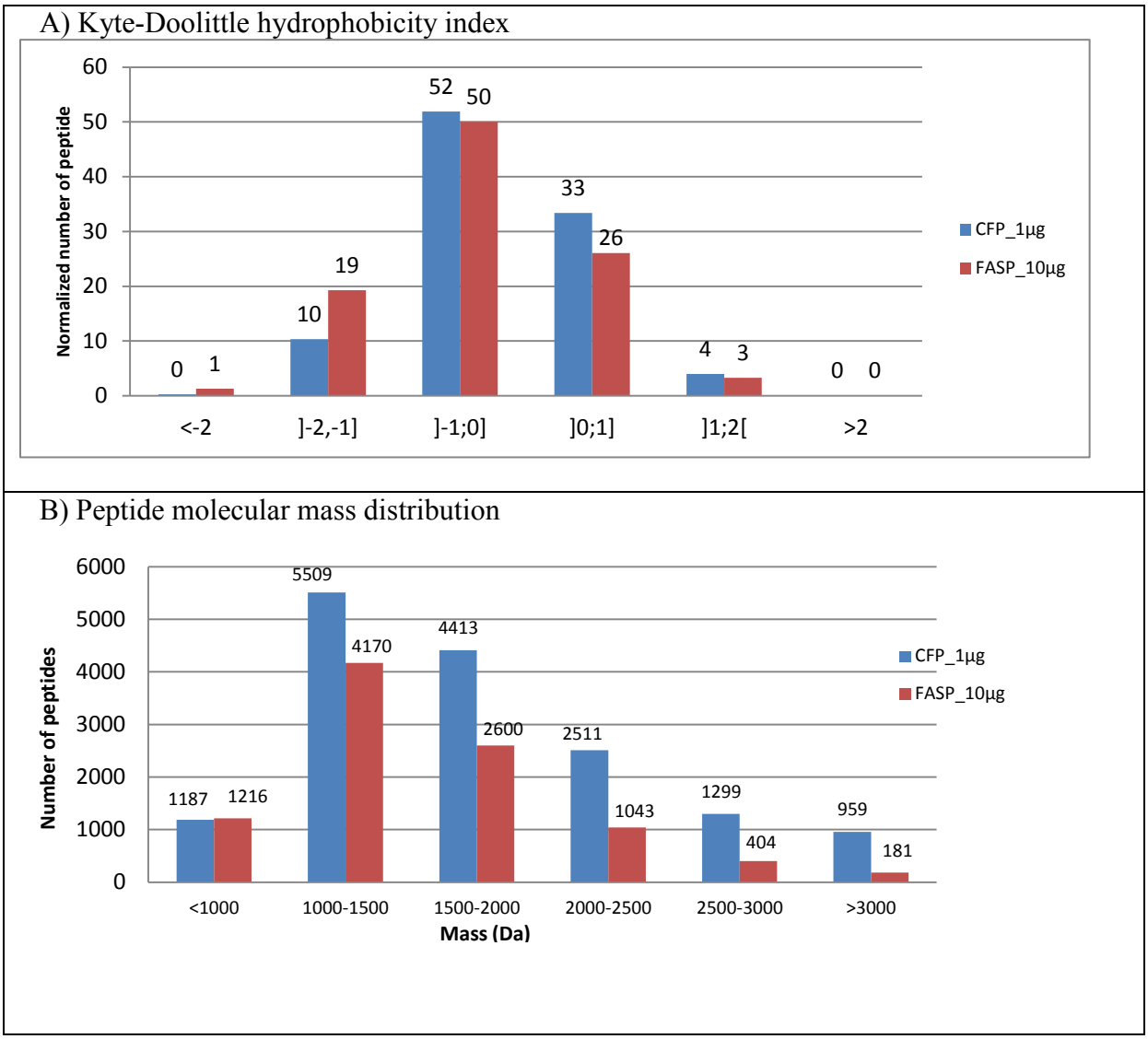
We then evaluated the protein sequence coverage considering the peptides identified with 0, 1 and 2 missed cleavages in each method. Looking at the differences in terms of the number of identifications was then combined with the physico-chemical properties of validated peptides. Indeed, the PDMS surface is hydrophobic and then prone to non-specific adsorption of proteins and hydrophobic peptides. To attenuate this effect, the PDMS device was treated and was O_2 plasma oxidized, as it has been reported to have an effect for a few hours[14]. The PDMS surface of the ChipFilter had not received any other hydrophilic treatment than the plasma exposition during the bonding step. For our experiments, the ChipFilter was fabricated extemporaneously just before for sample processing to take advantage of the hydrophilic property of plasma treated-PDMS over the few hours just after O_2 plasma exposition. To evaluate the efficiency of PMDS plasma pre-treatment we compared some features of the peptides identified with or without miss cleavages in CFP and FASP. In total 4565 peptides without miss cleavages were exclusively identified by CFP while 2477 were exclusively identified by the FASP method (**"Figure** 57). Only 44% of the peptides were common.

Looking at the protein level, however, 70% of the proteins were identified with both protocols (see Suppl. Figure S2).



"Figure 57: Distribution of identified peptides sequences without missed cleavage from CFP 1µg and FASP 10 µg method" BioVenn[15]

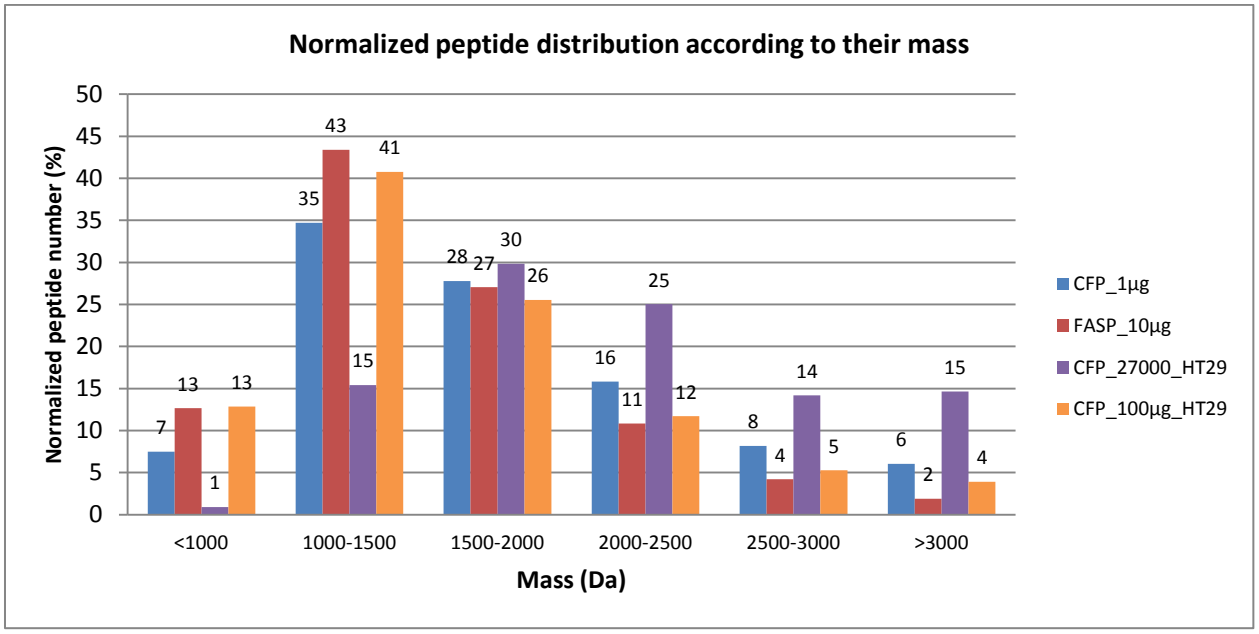
Considering the Kyte-Doolittle hydrophobicity index, the hydrophobic properties of peptides identified exclusively in each method have been compared ("Figure 58A). A two-samples t-test (Student) showed that the mean of CFP exclusively identified peptides hydrophobicity index is greater than the mean of those exclusively identified by the FASP method. This is not the case when considering the complete set of peptide identifications (common or specific to one method, see Suppl Figure S6). The absence of permanent hydrophilic PDMS pre-treatment did not bias the selectivity toward the hydrophobic peptides compared to the FASP method. We also evaluated if CFP induced a bias in the molecular mass range of identified peptides. We compared the molecular mass of the peptides identified with CFP and/or FASP. We observed that if the number of peptides identified with CFP is greater in every mass interval compared to the FASP method, the distributions are slightly biased towards the high mass range in CFP ("Figure 58B). This has to be correlated with the higher number of missed cleavages detected in CFP as it has been discussed previously.



"Figure 58: A) Kyte-Doolittle Hydrophobicity Index of peptides exclusively identified by CFP_1µg and FASP_10µg; B) Mass distribution of peptides identified by CFP_1µg and FASP_10µg. The Kyte-Doolittle index has been calculated from a published package on R-Journal[16]"

Looking at the gene ontology for cellular compartment classification demonstrated that the cytoplasm, the mitochondrion, phosphoproteins, and ribosomal proteins were the most enriched compartments. The CFP digestion allowed the identification of a larger number of proteins in each cellular compartment than the FASP method, but the distribution is similar in both protocols (Supp. Figure S3, Table S4).

On-chip cell lysis CFP nanoLC MS/MS. To minimize sample loss sample handling should be limited, and the direct approach for that is to include the cell lysis and protein extraction steps in the same reactor. If this is not easily implemented with yeast cells due to the structure of their membrane, the smooth membrane of mammals cells, such as human colon adenocarcinoma cell line HT29, can be disrupted using chemical cell lysis. The protein extraction and proteolyis have been implemented inside the ChipFilter using 27,000 HT29 cells leading to 2740 protein identifications. The cell lysis and protein processing realized both in the ChipFilter lead to a bigger proportion of peptides with missed cleavages compared to when only the protein processing is realized in the ChipFilter with the same digestion (Supp. Figure S7). The subcellular compartments are evenly represented when compared to a classical protein extraction outside the ChipFilter (Supp. Figure S8).



"Figure 59: Normalized distribution of peptides identified by CFP_1µg, FASP_10µg and CFP_27000 cells according to their mass"

The onchip cell lysis leads to a peptide mass distribution shifted towards the higher mass range as shown in "Figure 59 which compares the normalized distribution of peptides identified with CFP_1µg, FASP_10µg, and onchip cell lysis, but the Kyte-Doolittle index

distribution is not affected. An improved proteome coverage is observed when protein processing is realized inside the ChipFilter compared to FASP (Suppl. Figure S10). This could be explained by the larger volumes used for peptides recovery and the additional step for preconcentration. That improvement is even better when the cell lysis is performed inside the ChipFilter. This is an illustration of the advantages of sample preparation integration in the field of proteomics.

CONCLUSION

We propose the ChipFilter proteolysis (CFP) method as a simple device for rapid protein processing including at least five main steps: cell lysis, preconcentration, sample clean-up, reduction, alkylation and enzymatic proteolysis in the same reactor. The design for microfabrication of the ChipFilter allowed easy and robust integration of a molecular filtration membrane in PDMS microchip, using soft lithography and replica molding. The efficient protein retention and proteolysis on the membrane have been validated with the BSA standard solution. Then, CFP has been applied to yeast protein extract. According to the comparison to the classical overnight FASP method, CFP allowed reaching better proteome and protein sequence coverage from at least ten times less starting material to work in one hour. The digestion protocol with ChipFilter reduced significantly the amount of sample and the required time for such in depth proteome analysis. CFP is an example of miniaturization that can handle integrated complex sample processing. The on chip cell lysis has been implemented in order to minimize sample loss. This allows a good proteome coverage from 27,000 epithelial cells. It also proves the efficiency of chemical lysis inside the ChipFilter which will contribute to improving the sensitivity of the device. Moreover, the ChipFilter could be directly coupled to nano LC-MS/MS for the proteolytic peptides to be fractionated and sequenced in an integrated and miniaturized automated platform.

Further work may be done to reach a higher sensitivity, however. The inner diameter of reaction chambers may be decreased. More efficient and stable PDMS surface treatment could enhance sample recovery. On-site peptide trapping can be also implemented just below the 10kDa membrane to minimize sample loss by nonspecific adsorption. Another very promising application is the possibility to perform sample derivatization for specific moieties targeting or to adapt our device to functionalized membranes.

ACKOWLEDGEMENTS

MMN received a fellowship from Labex IPGG pour la microfluidique, mass spectrometry was granted by the SESAME 2010 program from Conseil Régional d'Île-de-France.

REFERENCES

1. Huang, E. L. *et al.* SNaPP: Simplified Nanoproteomics Platform for Reproducible Global Proteomic Analysis of Nanogram Protein Quantities. *Endocrinology* **157**, 1307–1314 (2016).

2. Xu, K. *et al.* Benchtop-compatible sample processing workflow for proteome profiling of < 100 mammalian cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018) doi:10.1007/s00216-018-1493-9.

3. Freire, S. L. S. & Wheeler, A. R. Proteome-on-a-chip: Mirage, or on the horizon? *Lab on a Chip* **6**, 1415 (2006).

4. Li, Y. *et al.* High-efficiency nano/micro-reactors for protein analysis. *RSC Advances* **5**, 1331–1342 (2015).

5. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E. & Lee, C. S. Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification. *Analytical Chemistry* **73**, 2648–2655 (2001).

6. Kecskemeti, A., Nagy, C., Csosz, E., Kallo, G. & Gaspar, A. The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples. *PROTEOMICS - Clinical Applications* **11**, 1700055 (2017).

7. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C. & Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343–2394 (2013).

8. Gasilova, N., Qiao, L., Momotenko, D., Pourhaghighi, M. R. & Girault, H. H. Microchip Emitter for Solid-Phase Extraction–Gradient Elution–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 6254–6263 (2013).

9. Ethier, M., Hou, W., Duewel, H. S. & Figeys, D. The Proteomic Reactor: A Microfluidic Device for Processing Minute Amounts of Protein Prior to Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Proteome Research* **5**, 2754–2759 (2006).

10. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* **6**, 359–362 (2009).

11. Zougman, A., Selby, P. J. & Banks, R. E. Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. *PROTEOMICS* **14**, 1006–1000 (2014).

12. Ludwig, K. R., Schroll, M. M. & Hummon, A. B. Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies. *J. Proteome Res.* **17**, 2480–2490 (2018).

13. Nandakumar, M. P. & Marten, M. R. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of Aspergillus oryzae intracellular proteins. *ELECTROPHORESIS* **23**, 2216–2222 (2002).

14. Trantidou, T., Elani, Y., Parsons, E. & Ces, O. Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsystems & Nanoengineering* **3**, 16091 (2017).

15. Hulsen, T., de Vlieg, J. & Alkema, W. BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**, 488 (2008).

16. Osorio, D., Rondón-Villarreal, P. & Torres, R. Peptides: A Package for Data Mining of Antimicrobial Peptides. *The R Journal* **7**, 4 (2015).

Bibliographie

1. Collins, F. S., Morgan, M. &Patrinos, A. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science***300**, 286–290 (2003).

2. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature***431**, 931–945 (2004).

3. Wilkins, M. R. *et al.*Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews***13**, 19–50 (1996).

4. Edman, P. A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22**, 475–476 (1949).

5. Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M. &Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry***404**, 939–965 (2012).

6. Simonian, M. H. & Smith, J. A. Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. in *Current Protocols in Molecular Biology* (eds. Ausubel, F. M. et al.) mb1001as76 (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1002/0471142727.mb1001as76.

7. Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. in *Current Protocols in Protein Science* (eds. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T.) 3.4.1-3.4.29 (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/0471140864.ps0304s48.

8. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).

9. Van Weemen, B. K., Bosch, A. M. G., Dawson, E. C. &Schuurs, A. H. W. M. Enzyme-immunoassay of steroids: Possibilities and pitfalls. *Journal of Steroid Biochemistry***11**, 147–151 (1979).

10. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry***51**, 2415–2418 (2005).

11. Pedde, R. D., Li, H., Borchers, C. H. & Akbari, M. Microfluidic-Mass Spectrometry Interfaces for Translational Proteomics. *Trends Biotechnol.***35**, 954–970 (2017).

12. O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of biological biochemistry* (1975).

13. Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS***4**, 3665–3685 (2004).

14. Schilling, B., Yoo, C. B., Collins, C. J. & Gibson, B. W. Determining cysteine oxidation status using differential alkylation. *International Journal of Mass Spectrometry***236**, 117–127 (2004).

15. Wang, H. &Hanash, S. Mass spectrometry based proteomics for absolute quantification of proteins from tumor cells. *Methods***81**, 34–40 (2015).

16. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C. & Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews***113**, 2343–2394 (2013).

17. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature***507**, 181–189 (2014).

18. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature***442**, 368 (2006).

19. Manz, A., Graber, N. & Widmer, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical***1**, 244–248 (1990).

20. Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Delivery and Cell Characterization: A Review. *Sensors and Materials* 1 (2015) doi:10.18494/SAM.2015.1136.

21. Becker, H. &Gärtner, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *ELECTROPHORESIS***21**, 12–26 (2000).

22. Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research***6**, 639–645 (1996).

23. Chait, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science***314**, 65–66 (2006).

24. Brown, K. A. *et al.*A photocleavable surfactant for top-down proteomics. *Nat Methods***16**, 417–420 (2019).

25. Lanucara, F. &Eyers, C. E. Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. *Mass Spectrometry Reviews***32**, 27–42 (2013).

26. Ginter, J. M., Zhou, F. & Johnston, M. V. Generating protein sequence tags by combining cone and conventional collision induced dissociation in a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom***15**, 1478–1486 (2004).

27. Doucette, A. A., Tran, J. C., Wall, M. J. & Fitzsimmons, S. Intact proteome fractionation strategies compatible with mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics***8**, 787–800 (2011).

28. Chen, B., Brown, K. A., Lin, Z. & Ge, Y. Top-Down Proteomics: Ready for Prime Time? *Analytical Chemistry***90**, 110–127 (2018).

29. Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). in *Methods in Enzymology* vol. 193 886–887 (Academic Press, 1990).

30. Vidova, V. &Spacil, Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta***964**, 7–23 (2017).

31. Blein-Nicolas, M. &Zivy, M. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics***1864**, 883–895 (2016).

32. Leichert, L. I. *et al.*Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences***105**, 8197–8202 (2008).

33. Ong, S.-E. *et al.* Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics***1**, 376–386 (2002).

34. Werner, T. *et al.* High-Resolution Enabled TMT 8-plexing. *Anal. Chem.***84**, 7188–7194 (2012).

35. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc***11**, 2301–2319 (2016).

36. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. &Stamler, J. S. Protein S -nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol***6**, 150–166 (2005).

37. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine***80**, 148–157 (2015).

38. Chiappetta, G. *et al.* Proteome Screens for Cys Residues Oxidation. in *Methods in Enzymology* vol. 473 199–216 (Elsevier, 2010).

39. Lion, N. *et al.* Microfluidic systems in proteomics. *ELECTROPHORESIS***24**, 3533–3562 (2003).

40. Hwang, I.-H., Lee, S.-K., Shin, S.-M., Lee, Y.-G. & Lee, J.-H. Flow characterization of valveless micropump using driving equivalent moment: theory and experiments. *Microfluid Nanofluid***5**, 795–807 (2008).

41. Hossan, M. R., Dutta, D., Islam, N. & Dutta, P. Review: Electric field driven pumping in microfluidic device. *ELECTROPHORESIS***39**, 702–731 (2018).

42. Tesa, V. PRESSURE DRIVEN MICROFLUIDICS. 13 (2004).

43. Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jörnvall, H. & Bergman, T. Integrated Sample Preparation and MALDI Mass Spectrometry on a Microfluidic Compact Disk. *Analytical Chemistry***76**, 345–350 (2004).

44. Fan, J., Li, S., Wu, Z. & Chen, Z. Diffusion and mixing in microfluidic devices. in *Microfluidics for Pharmaceutical Applications* 79–100 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-812659-2.00003-X.

45. Takayama, S. *et al.* Selective Chemical Treatment of Cellular Microdomains Using Multiple Laminar Streams. *Chemistry & Biology***10**, 123–130 (2003).

46. Suh, Y. K. & Kang, S. A Review on Mixing in Microfluidics. *Micromachines***1**, 82–111 (2010).

47. Janasek, D., Franzke, J. &Manz, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature***442**, 374–380 (2006).

48. Voldman, J., Gray, M. L. & Schmidt, M. A. Microfabrication in Biology and Medicine. 26.

49. Farré, M., Kantiani, L. & Barceló, D. Microfluidic Devices. in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* 177–217 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-384862-8.00007-8.

50. Whitesides, G. M. &Stroock, A. D. Flexible Methods for Microfluidics. *Physics Today***54**, 42–48 (2001).

51. Cleanroom Classification, Classes and Standards | PortaFab. https://www.portafab.com/cleanroom-classification.html.

52. McDonald, J. C. *et al.*Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS***21**, 27–40 (2000).

53. Wong, I. & Ho, C.-M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics***7**, (2009).

54. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. &Ingber, D. E. Soft Lithography in Biology and Biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering***3**, 335–373 (2001).

55. La microfluidique et les puces microfluidiques. *Elveflow* https://www.elveflow.com/fr/histoire-de-la-microfluidique-et-des-puces-microfluidiques/.

56. Deval, J., Umali, T. A., Lan, E. H., Dunn, B. & Ho, C.-M. Reconfigurable hydrophobic/hydrophilic surfaces in microelectromechanical systems (MEMS). *J. Micromech. Microeng.***14**, 91–95 (2003).

57. Huang, B., Wu, H., Kim, S. & N. Zare, R. Coating of poly(dimethylsiloxane) with n -dodecyl-β- d -maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. *Lab on a Chip***5**, 1005–1007 (2005).

58. Boxshall, K. *et al.* Simple surface treatments to modify protein adsorption and cell attachment properties within a poly(dimethylsiloxane) micro-bioreactor. *Surface and Interface Analysis***38**, 198–201 (2006).

59. Sharma, V., Dhayal, M., Govind, Shivaprasad, S. M. & Jain, S. C. Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS for micro fluidic applications. *Vacuum***81**, 1094–1100 (2007).

60. Sui, G. *et al.* Solution-Phase Surface Modification in Intact Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels. *Analytical Chemistry***78**, 5543–5551 (2006).

61. Chan, J. H., Timperman, A. T., Qin, D. &Aebersold, R. Microfabricated Polymer Devices for Automated Sample Delivery of Peptides for Analysis by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry***71**, 4437–4444 (1999).

62. Rohner, T. C., Rossier, J. S. &Girault, H. H. Polymer Microspray with an Integrated Thick-Film Microelectrode. *Analytical Chemistry***73**, 5353–5357 (2001).

63. DeVoe, D. L. & Lee, C. S. Microfluidic technologies for MALDI-MS in proteomics. *ELECTROPHORESIS***27**, 3559–3568 (2006).

64. Verpoorte, E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *2002*.

65. Freire, S. L. S. & Wheeler, A. R. Proteome-on-a-chip: Mirage, or on the horizon? *Lab on a Chip***6**, 1415 (2006).

66. Wang, Y.-X., W. Cooper, J., S. Lee, C. & L. DeVoe, D. Efficient electrospray ionization from polymer microchannels using integrated hydrophobic membranes. *Lab on a Chip***4**, 363–367 (2004).

67. Wang, C., Jemere, A. B. & Harrison, D. J. Multifunctional protein processing chip with integrated digestion, solid-phase extraction, separation and electrospray. *ELECTROPHORESIS***31**, 3703–3710 (2010).

68. Dietze, C. *et al.* Rapid prototyping of microfluidic chips for dead-volume-free MS coupling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry***407**, 8735–8743 (2015).

69. Kim, J.-S. & Knapp, D. R. Microfabrication of polydimethylsiloxane electrospray ionizationemitters.

70. Kuljanin, M., Dieters-Castator, D. Z., Hess, D. A., Postovit, L.-M. & Lajoie, G. A. Comparison of sample preparation techniques for large-scale proteomics. *PROTEOMICS***17**, 1600337 (2017).

71. Chao, T.-C. &Hansmeier, N. Microfluidic devices for high-throughput proteome analyses. *PROTEOMICS***13**, 467–479 (2013).

72. Hellmich, W., Pelargus, C., Leffhalm, K., Ros, A. &Anselmetti, D. Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology. *ELECTROPHORESIS***26**, 3689–3696 (2005).

73. Kim, J. *et al.* Cell lysis on a microfluidic CD (compact disc). *Lab Chip***4**, 516–522 (2004).

74. Nan, L., Jiang, Z. & Wei, X. Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review. *Lab on a Chip***14**, 1060–1073 (2014).

75. Foote, R. S., Khandurina, J., Jacobson, S. C. & Ramsey, J. M. Preconcentration of Proteins on Microfluidic Devices Using Porous Silica Membranes. *Analytical Chemistry***77**, 57–63 (2005).

76. Jung, B., Bharadwaj, R. & Santiago, J. G. Thousandfold signal increase using field-amplified sample stacking for on-chip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS***24**, 3476–3483 (2003).

77. Ethier, M., Hou, W., Duewel, H. S. &Figeys, D. The Proteomic Reactor: A Microfluidic Device for Processing Minute Amounts of Protein Prior to Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Proteome Research***5**, 2754–2759 (2006).

78. Hosic, S., Murthy, S. K. &Koppes, A. N. Microfluidic Sample Preparation for Single Cell Analysis. *Anal. Chem.***88**, 354–380 (2016).

79. Switzar, L., Giera, M. &Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *Journal of Proteome Research***12**, 1067–1077 (2013).

80. Ji, J. *et al.* Proteolysis in microfluidic droplets: an approach to interface protein separation and peptide mass spectrometry. *Lab Chip***12**, 2625–2629 (2012).

81. Nelson, W. C. *et al.* Incubated Protein Reduction and Digestion on an Electrowetting-on-Dielectric Digital Microfluidic Chip for MALDI-MS. *Analytical Chemistry***82**, 9932–9937 (2010).

82. Kecskemeti, A., Nagy, C., Csosz, E., Kallo, G. & Gaspar, A. The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples. *PROTEOMICS - Clinical Applications***11**, 1700055 (2017).

83. Qin, W. *et al.* Trypsin Immobilization on Hairy Polymer Chains Hybrid Magnetic Nanoparticles for Ultra Fast, Highly Efficient Proteome Digestion, Facile ^{18} O Labeling and Absolute Protein Quantification. *Analytical Chemistry***84**, 3138–3144 (2012).

84. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E. & Lee, C. S. Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification. *Analytical Chemistry***73**, 2648–2655 (2001).

85. Cheng, G., Hao, S.-J., Yu, X. & Zheng, S.-Y. Nanostructured microfluidic digestion system for rapid high-performance proteolysis. *Lab on a Chip***15**, 650–654 (2015).

86. Tian, R. *et al.* Development of a Multiplexed Microfluidic Proteomic Reactor and Its Application for Studying Protein–Protein Interactions. *Analytical Chemistry***83**, 4095–4102 (2011).

87. Kecskemeti, A. & Gaspar, A. Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion. *Talanta***166**, 275–283 (2017).

88. Chen, Q., Yan, G., Gao, M. & Zhang, X. Ultrasensitive Proteome Profiling for 100 Living Cells by Direct Cell Injection, Online Digestion and Nano-LC-MS/MS Analysis. *Anal. Chem.***87**, 6674–6680 (2015).

89. Oleschuk, R. D., Shultz-Lockyear, L. L., Ning, Y. & Harrison, D. J. Trapping of Bead-Based Reagents within Microfluidic Systems: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography. *Analytical Chemistry***72**, 585–590 (2000).

90. Dahlin, A. P., Bergström, S. K., Andrén, P. E., Markides, K. E. & Bergquist, J. Poly(dimethylsiloxane)-Based Microchip for Two-Dimensional Solid-Phase Extraction-Capillary Electrophoresis with an Integrated Electrospray Emitter Tip. *Analytical Chemistry***77**, 5356–5363 (2005).

91. Ramsey, J. D. & Collins, G. E. Integrated Microfluidic Device for Solid-Phase Extraction Coupled to Micellar Electrokinetic Chromatography Separation. *Analytical Chemistry***77**, 6664–6670 (2005).

92. Yu, C., Davey, M. H., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device. *Analytical Chemistry***73**, 5088–5096 (2001).

93. Xiang, F., Lin, Y., Wen, J., Matson, D. W. & Smith, R. D. An Integrated Microfabricated Device for Dual Microdialysis and On-Line ESI-Ion Trap Mass Spectrometry for Analysis of Complex Biological Samples. *Analytical Chemistry***71**, 1485–1490 (1999).

94. Lion, N., Gellon, J.-O., Jensen, H. &Girault, H. H. On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A***1003**, 11–19 (2003).

95. Yin, H. *et al.* Microfluidic Chip for Peptide Analysis with an Integrated HPLC Column, Sample Enrichment Column, and Nanoelectrospray Tip. *Analytical Chemistry***77**, 527–533 (2005).

96. Chatterjee, D., Ytterberg, A. J., Son, S. U., Loo, J. A. &Garrell, R. L. Integration of Protein Processing Steps on a Droplet Microfluidics Platform for MALDI-MS Analysis. *Analytical Chemistry***82**, 2095–2101 (2010).

97. Jiang, L., He, L. &Fountoulakis, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A***1023**, 317–320 (2004).

98. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods***6**, 359–362 (2009).

99. Zhu, Y. *et al.* Proteomic Analysis of Single Mammalian Cells Enabled by Microfluidic Nanodroplet Sample Preparation and Ultrasensitive NanoLC-MS. *AngewandteChemie International Edition***57**, 12370–12374 (2018).

100. Wilson, S. R., Vehus, T., Berg, H. S. &Lundanes, E. Nano-LC in proteomics: recent advances and approaches. *Bioanalysis***7**, 1799–1815 (2015).

101. Shen, Y. *et al.* High-Efficiency Nanoscale Liquid Chromatography Coupled On-Line with Mass Spectrometry Using Nanoelectrospray Ionization for Proteomics. *Anal. Chem.***74**, 4235–4249 (2002).

102. Wilm, M. *et al.* Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature***379**, 466–469 (1996).

103. Zubarev, R. A. & Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry***85**, 5288–5296 (2013).

104. Scheltema, R. A. *et al.*The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-filter, High-performance Quadrupole and an Ultra-high-field Orbitrap Analyzer. *Molecular & Cellular Proteomics***13**, 3698–3708 (2014).

105. Huang, E. L. *et al.*SNaPP: Simplified Nanoproteomics Platform for Reproducible Global Proteomic Analysis of Nanogram Protein Quantities. *Endocrinology***157**, 1307–1314 (2016).

106. Xu, K. *et al.* Benchtop-compatible sample processing workflow for proteome profiling of < 100 mammalian cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018) doi:10.1007/s00216-018-1493-9.

107. Li, Y. *et al.* High-efficiency nano/micro-reactors for protein analysis. *RSC Advances***5**, 1331–1342 (2015).

108. Gasilova, N., Qiao, L., Momotenko, D., Pourhaghighi, M. R. &Girault, H. H. Microchip Emitter for Solid-Phase Extraction–Gradient Elution–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry***85**, 6254–6263 (2013).

109. Zougman, A., Selby, P. J. & Banks, R. E. Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. *PROTEOMICS***14**, 1006–1000 (2014).

110. Ludwig, K. R., Schroll, M. M. &Hummon, A. B. Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies. *J. Proteome Res.***17**, 2480–2490 (2018).

111. Trantidou, T., Elani, Y., Parsons, E. &Ces, O. Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsystems &Nanoengineering***3**, 16091 (2017).

112. Wu, C., Liang, Y., Liang, Z., Zhang, L. & Zhang, Y. Ethane-bridged hybrid monoliths with well-defined mesoporosity and great stability for high-performance peptide separation. *Analytica Chimica Acta***1019**, 128–134 (2018).

113. Hosic, S., Murthy, S. K. &Koppes, A. N. Microfluidic Sample Preparation for Single Cell Analysis. *Anal. Chem.***88**, 354–380 (2016).

114. Yang, Y. *et al.* N-glycosylation proteomic characterization and cross-species comparison of milk fat globule membrane proteins from mammals. *PROTEOMICS***16**, 2792–2800 (2016).

115. Common N-Linked Structures and Masses. http://www.ionsource.com/Card/carbo/carbstr.htm.

116. Thingholm, T. E., Jensen, O. N. & Larsen, M. R. Analytical strategies for phosphoproteomics. *PROTEOMICS***9**, 1451–1468 (2009).

117. Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. in *Current Protocols in Protein Science* (eds. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T.) 3.4.1-3.4.29 (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/0471140864.ps0304s48.

118. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85 (1985).

119. Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. & Gygi, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *PNAS* **100**, 6940–6945 (2003).

120. Sies, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **69**, 965–968 (1991).

121. Luk, V. N. & Wheeler, A. R. A Digital Microfluidic Approach to Proteomic Sample Processing. *Anal. Chem.* **81**, 4524–4530 (2009).

122. Liuni, P., Rob, T. & Wilson, D. J. A microfluidic reactor for rapid, low-pressure proteolysis with on-chip electrospray ionization: A simple proteolytic chip for ESI-MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 315–320 (2010).

123. Tian, R. *et al.* Development of a Multiplexed Microfluidic Proteomic Reactor and Its Application for Studying Protein–Protein Interactions. *Analytical Chemistry* **83**, 4095–4102 (2011).

124. Matthiesen, R. & Bunkenborg, J. Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. in *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* (ed. Matthiesen, R.) vol. 1007 1–45 (Humana Press, 2013).

125. Vashist, S. K. & Luong, J. H. T. Immunoassays. in *Handbook of Immunoassay Technologies* 1–18 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00001-3.

126. Lilley, K. S. & Friedman, D. B. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics* **1**, 401–409 (2004).

127. Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D. & Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology* **13**, 942 (2017).

128. Frese, C. K. *et al.* Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J. Proteome Res.* **10**, 2377–2388 (2011).

129. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**, 994–999 (1999).

Miniaturisation de la préparation d'échantillon en protéomique bottom-up pour la quantification de l'oxydation des cystéines

RÉSUMÉ

La protéomique *bottom-up* est l'approche la plus couramment utilisée pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse. Dans cette approche, la digestion enzymatique s'intègre dans une étape de préparation d'échantillon longue et fastidieuse. Les précautions nécessaires à l'étude des modifications post traductionnelles comme l'oxydation des cystéines introduisent des étapes supplémentaires et rendent le protocole plus complexe. Le protocole OcSILAC, développé dans notre laboratoire pour la quantification de l'oxydation des cystéines, en est une parfaite illustration. La miniaturisation du protocole OcSILAC pour le rendre moins chronophage et consommateur d'échantillon est l'objectif de mon projet de thèse.

Un dispositif microfluidique, inspiré de la méthode *FilterAided Sample Preparation* (FASP), a été développé durant ce projet. C'est un dispositif en PDMS, intégrant une membrane de filtration moléculaire en cellulose régénérée et fabriqué par photolithographie douce. Dans la littérature scientifique, la majorité des dispositifs microfluidiques dédiés à la protéomique s'arrête aux preuves de concept sur des protéines standard. La micropuce développée au cours de cette thèse a permis l'analyse d'échantillons biologiques protéiques complexes avec dix fois moins d'échantillon et un protocole huit fois moins long que les méthodes conventionnelles. Notre protocole de digestion sur puce (CFP pour *ChipFilterProteolysis*) permet d'identifier plus de protéines et plus de peptides par protéine identifiée que la méthode FASP précédemment publiée. Pour la miniaturisation complète du protocole OcSILAC, une unité d'enrichissement des peptides biotinylés a été entreprise en utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées

Protéomique, Rédoxomique, Microfluidique

ABSTRACT

Bottom-up proteomics is the most commonly used approach for protein analysis by mass spectrometry. In this approach, enzymatic digestion is one step of a long and tedious sample preparation protocol. Specific care is needed to study post-translational changes, such as cysteine oxidation, with additional steps which makes the protocol even more complex. The OcSILAC protocol, developed in our laboratory for quantifying cysteine oxidation, is a perfect illustration of this. The miniaturization of the experimental setup is an opportunity for the OcSILAC protocol to be less time and sample consuming. It is the objective of my thesis project.

A microfluidic device, inspired by the Filter Aided Sample Preparation (FASP) method, was developed during this project. It is a PDMS device, incorporating a regenerated cellulose molecular filtration membrane and manufactured by gentle photolithography. In the literature, the majority of microfluidic devices dedicated to proteomics stops at proof of concept on standard reference proteins. The microchip developed during this thesis allowed the analysis of biological complex protein samples: with ten times less sample and an eight-times shorter protocol than conventional procedures. Our *ChipFilter* Proteolysis protocol can identify more proteins and more peptides than the previously reported FASP method. For the miniaturization of the OcSILAC protocol, the development of a biotinylated peptide enrichment unit was started using avidin magnetic beads

Proteomic, Redoxomic, Microfluidic