

## 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 entraîne 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  $\mu\text{L}/\text{minute}$ .

**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.

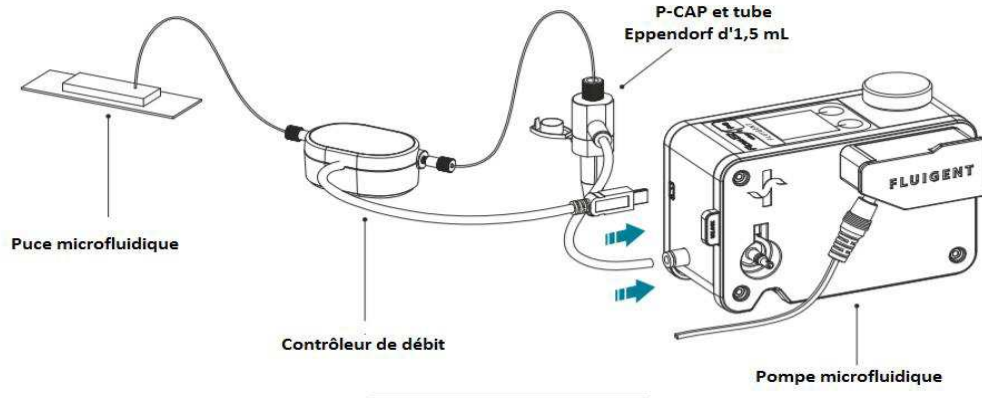


Figure 27 : Montage pour l'actuation du ChipFilter associant une pompe microfluidique flow EZ, un P-cap et un contrôleur de débit connectés à une puce microfluidique (Adapté de fluigent.com)

**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.

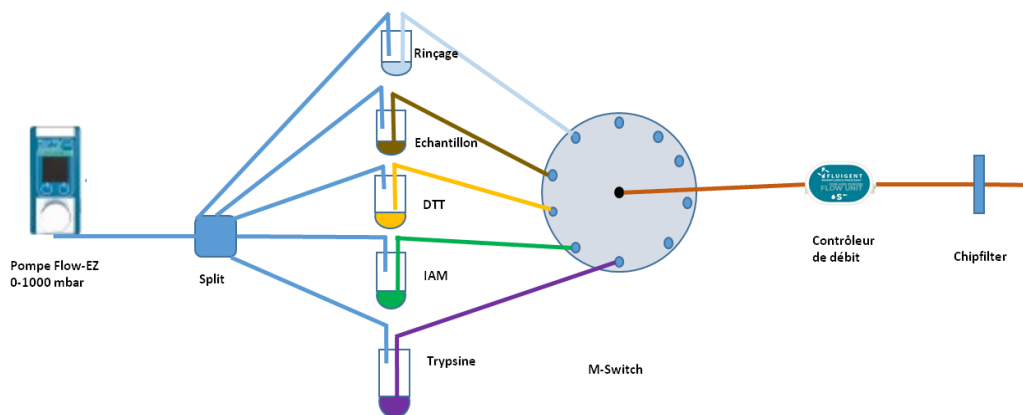


Figure 28 : Montage microfluidique mis en place pour la digestion sur puce

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)  |
|--|--|--|
| <b>1) Chargement</b> de l'échantillon  | Solution de protéine Standard ou d'extrait protéique solubilisé dans un tampon de lyse | D = 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V : en fonction de la quantité de matériel à traiter  |
| <b>2) Réduction</b> des ponts disulfure  | Solution de DTT 20 mM dans un tampon ABC 50 mM   | i) 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V=60 $\mu\text{L}$ , rinçage rapide<br>ii) 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V=30 $\mu\text{L}$                                   |
| <b>3) Blocage</b> des cystéines pour éviter la reformation des ponts disulfure | Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM  | 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V=60 $\mu\text{L}$ , rinçage rapide<br>1 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V=60 $\mu\text{L}$  |
| <b>4) Rinçage</b> d'excès d'IAM  | Tampon d'ABC 50 mM rinçage des réactifs en excès pour préparer la digestion            | 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V = 60 $\mu\text{L}$ , rinçage pour atteindre les conditions optimales pour la digestion  |
| <b>5) Digestion</b>  | Solution de trypsine 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans tampon ABC 50 mM               | i) D = 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , pour charger la trypsine<br>ii) 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V =24 $\mu\text{L}$ soit une heure, durée de la digestion |
| <b>6) Elution</b>  | Solution d'ABC 50 mM   | D = 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , V = 15 $\mu\text{L}$  |

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  $\mu\text{L}/\text{minute}$ . 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  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  est chargée à 2 $\mu\text{L}/\text{min}$  puis le débit est abaissé à 0.4  $\mu\text{L}/\text{minute}$  d'une solution d'ABC 50 mM avant de laisser la digestion se faire à faible débit : 0.4  $\mu\text{L}/\text{minute}$  avec une solution d'ABC 50 mM. Finalement, l'élution est réalisée en appliquant un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ .

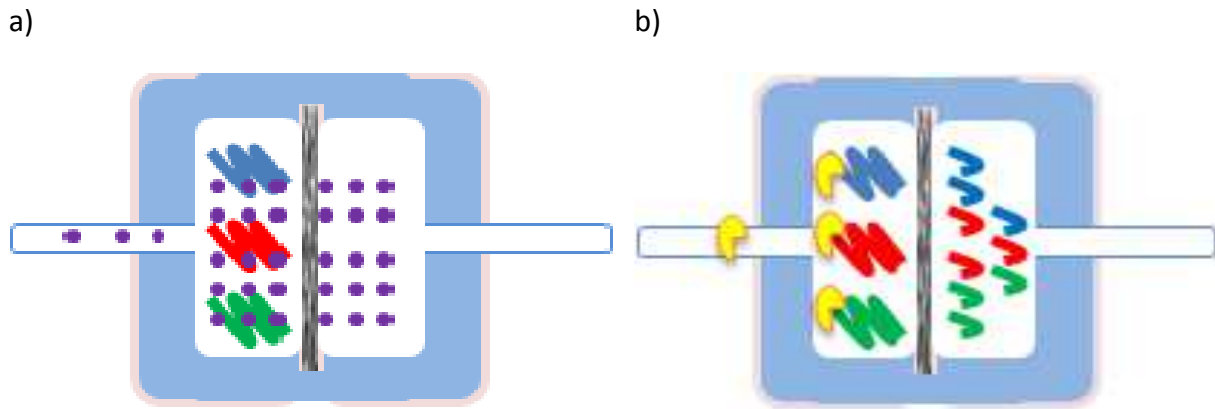


Figure 29 : Principe du fonctionnement du *ChipFilter*

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  $\mu$ L d'une solution d'1 mg/mL a été chargée dans la puce. Ce qui correspond à 100  $\mu$ g 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 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.

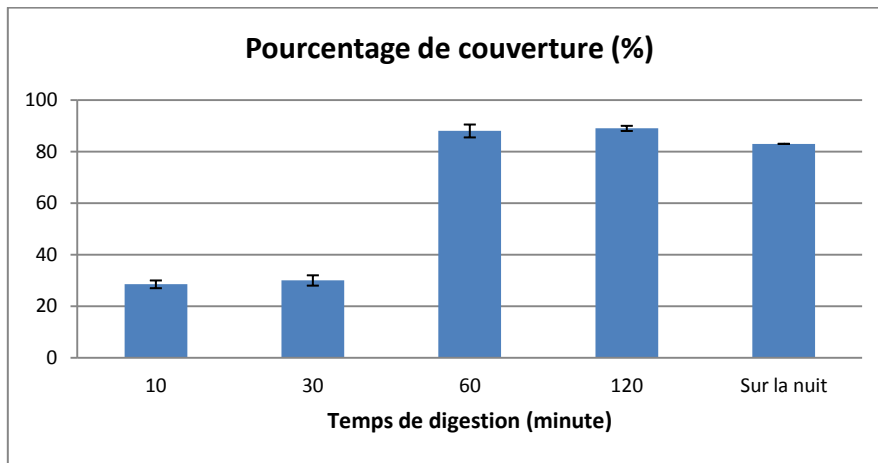


Figure 30 : Pourcentage de couverture de la BSA par traitement de protéolyse sur *ChipFilter*. Digestion sur puce de 10 µg de BSA avec différents temps de digestion comparée à la méthode FASP classique qui se fait sur la nuit (soit 16h)

### 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 éluions successives de 15µL à un débit de 2µL/min. Ces éluions 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.

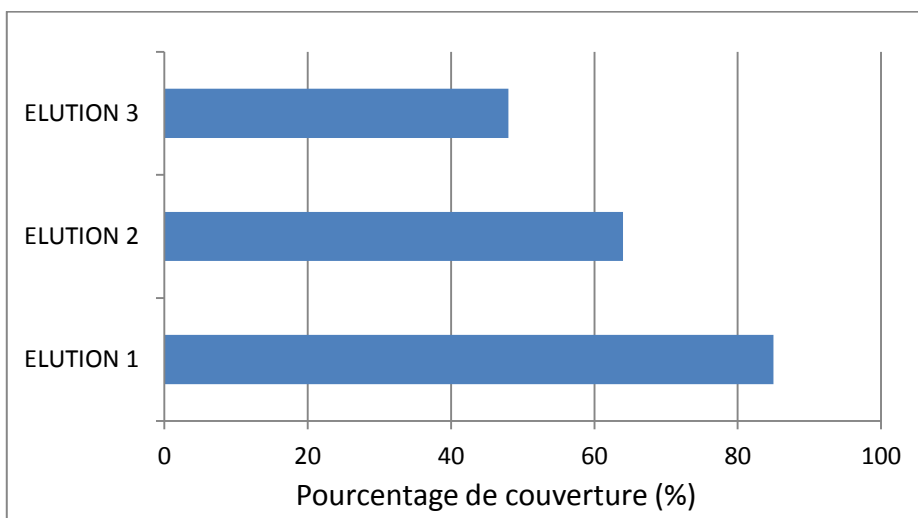


Figure 31 : Pourcentage de couverture de la BSA obtenus dans différents volumes d'élution (15µL, 2µL/minute dans le *ChipFilter* avec le même traitement sur puce (300 ng de BSA)

### 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  $\mu\text{g}$  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.

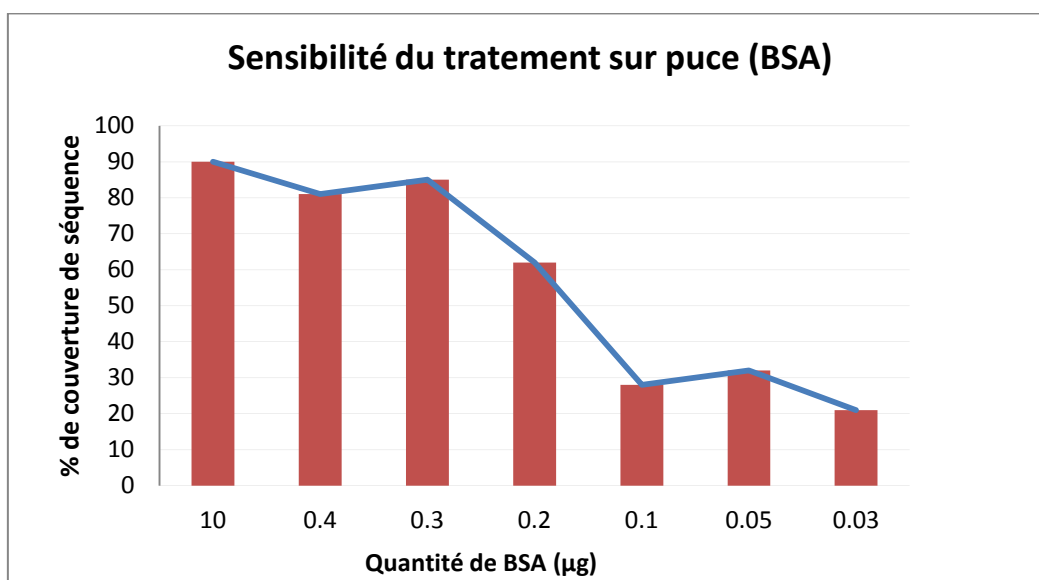


Figure 32 : Couverture de séquence de la BSA obtenue en fonction de la quantité de protéine traitée

### 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  $\mu\text{g}$  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.

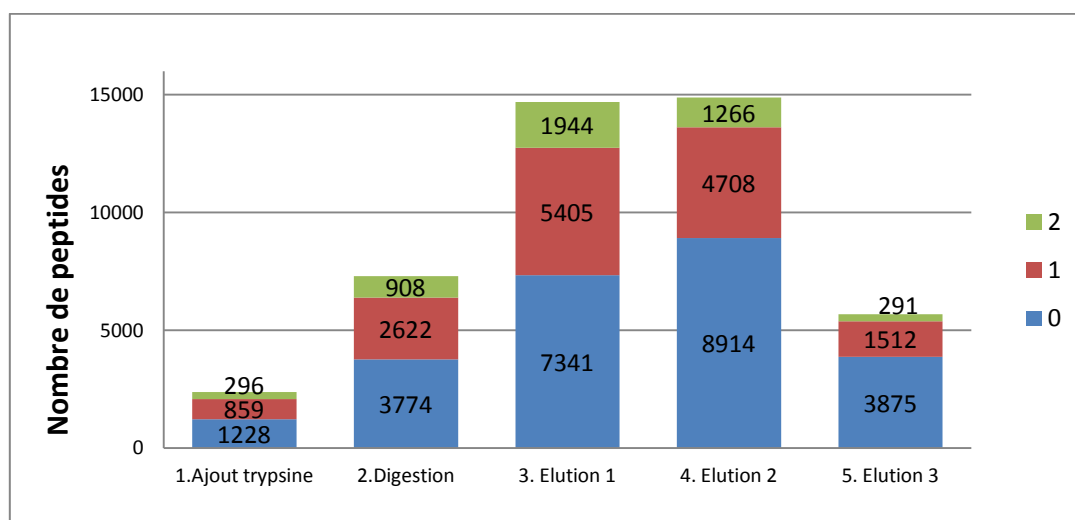


Figure 33 : Nombre de peptides identifiés dans chaque phase recueillie et proportion de ceux portant 0, 1 ou 2 sites de coupure manqués

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.

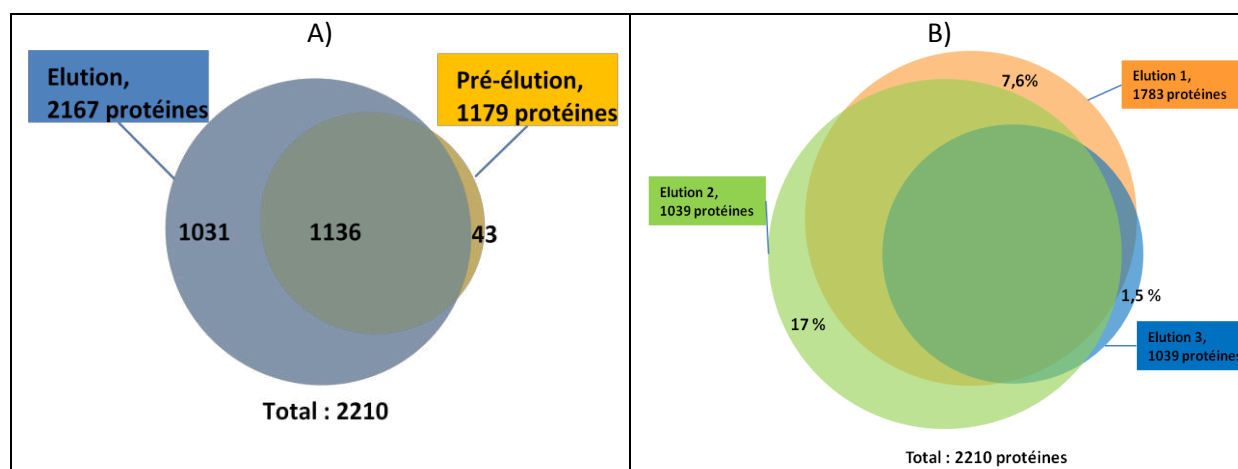


Figure 34 : Diagramme de Venn A) Comparaison des protéines identifiées dans les phases pré-élution (Ajout trypsine + digestion) / Elution (Elution 1 + 2 + 3) et B) comparaison des protéines identifiées dans les différentes éluions 100 µg d'extrait protéique de levure



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  $\mu$ L pour évaluer la qualité des identifications.

Une élution de 70  $\mu$ L a été appliquée au traitement de 100  $\mu$ g 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 *ChipFilters* 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<sup>104</sup>. 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 *scaterrplot*. La répétabilité a été évaluée en effectuant une corrélation de Pearson entre 3 analyses effectuées avec des *ChipFilters* différents (Figure 35).

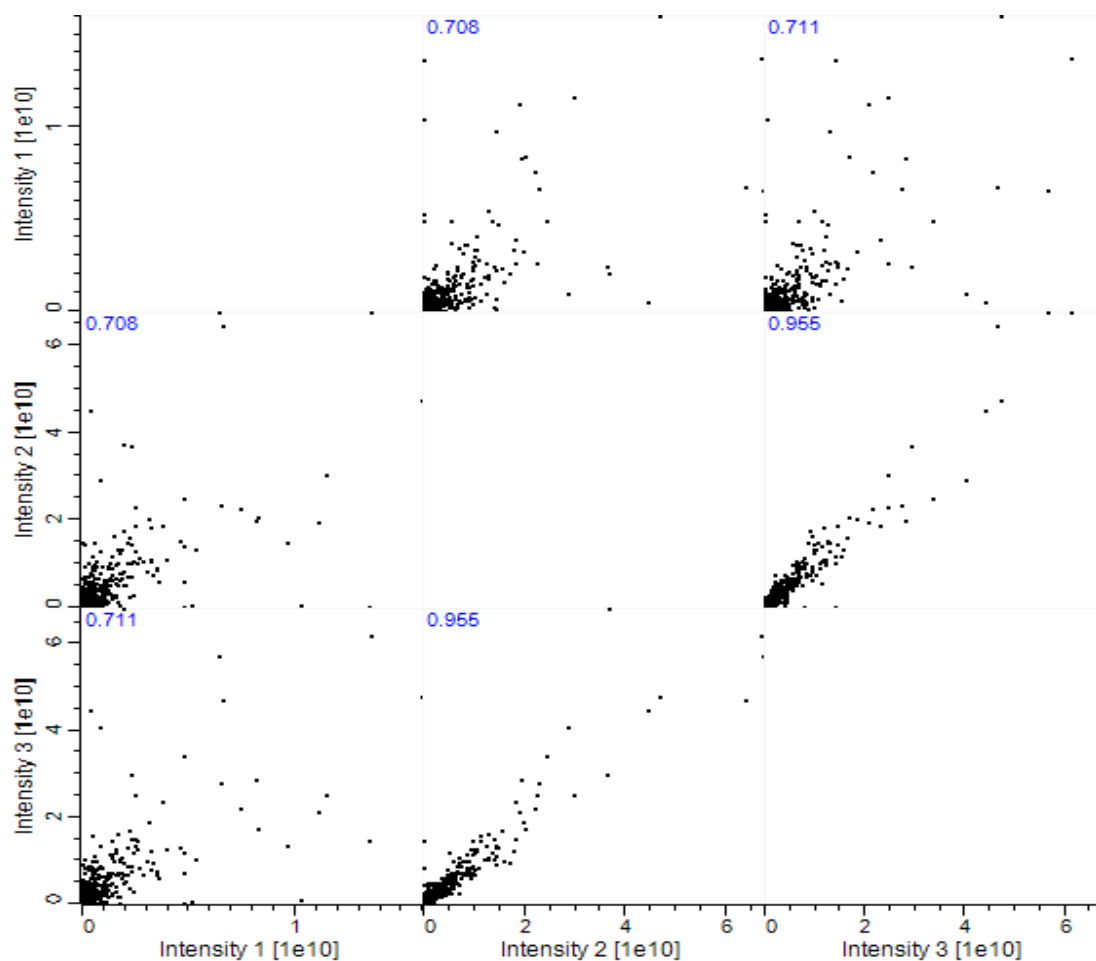


Figure 35 : MultiScatterplot de 3 traitements sur puce  
100 µg d'extrait protéique de levure

### 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'éluion (Figure 36A).

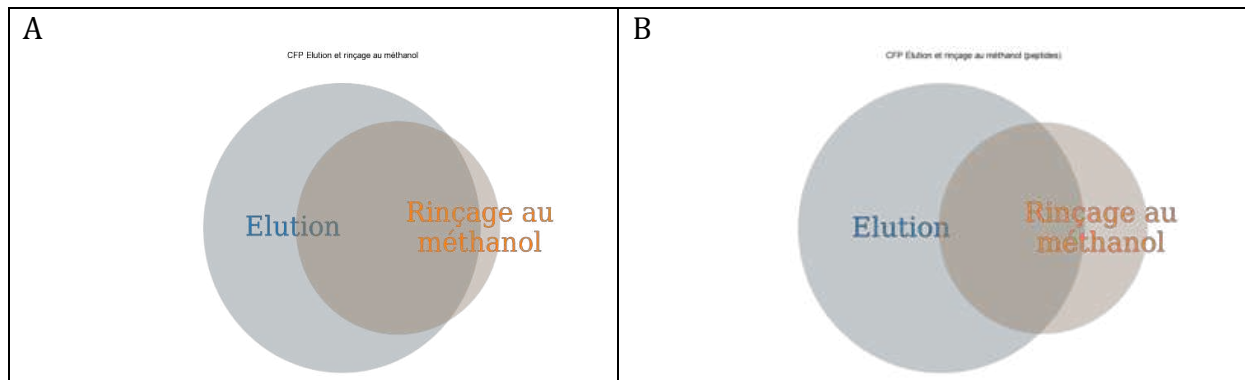


Figure 36 : Diagramme de Venn : Comparaison dans la phase élution et dans la solution de rinçage au méthanol 70% des protéines (A) et des peptides (B) identifiées 100 µg d'extrait protéique de levure

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'éluion 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'éluion 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.

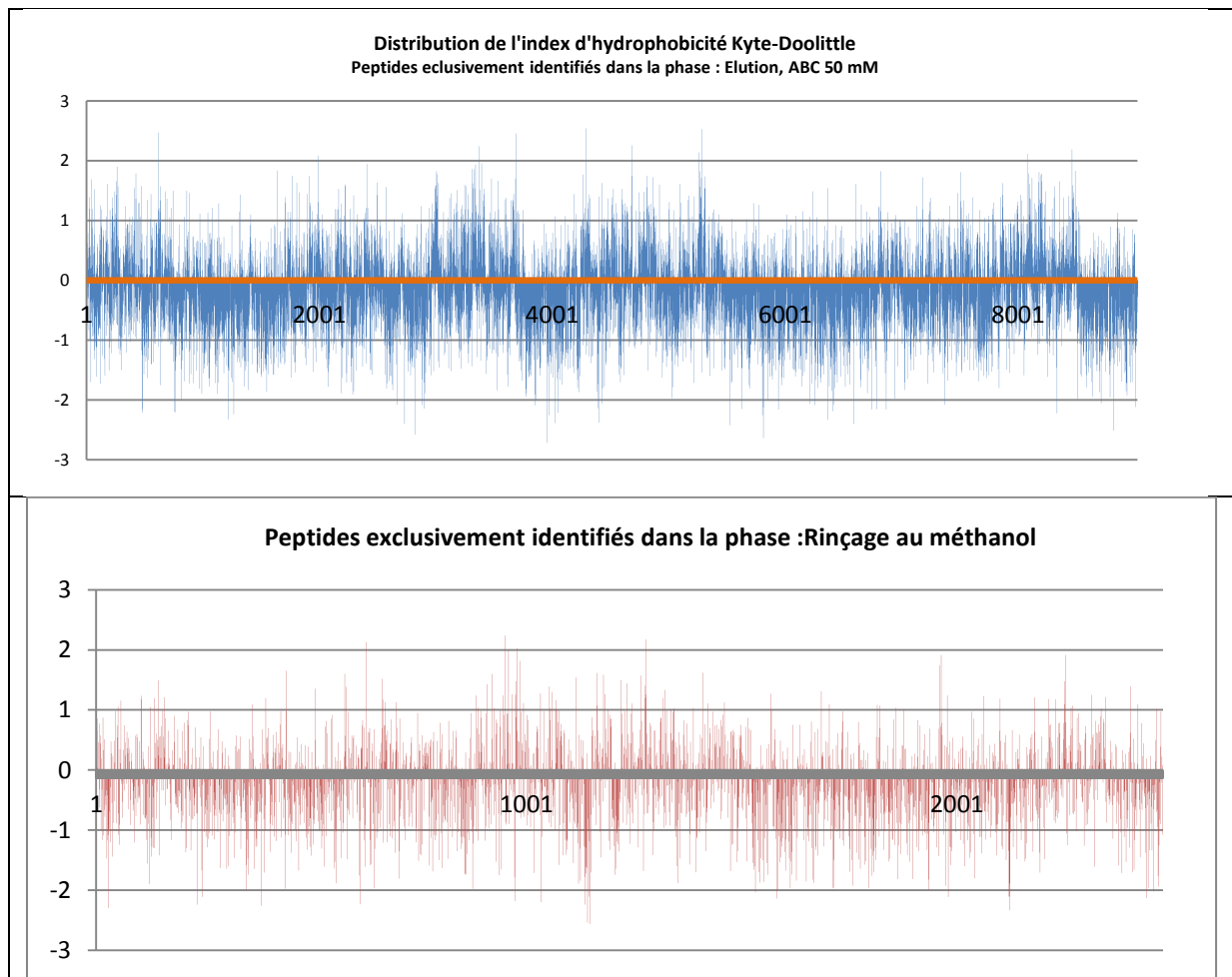


Figure 37 : Distribution de l'index d'hydrophobicité des peptides exclusivement identifiés pendant l'éluion (Bleu) et avec le rinçage au méthanol (Rouge) 100µg d'extrait protéique de levure

### 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'éluion a mené à l'augmentation du volume d'éluion 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.

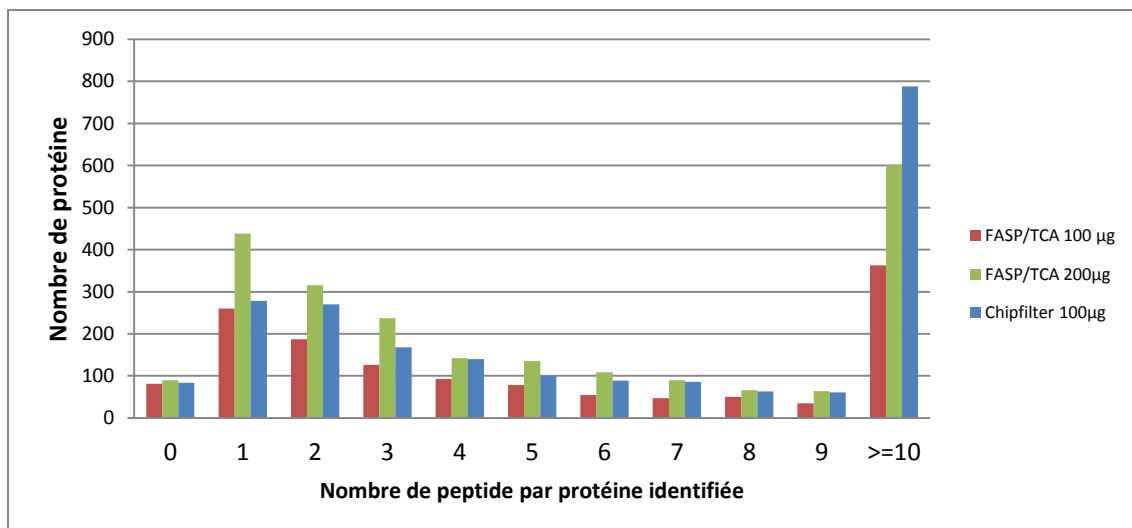


Figure 38 : Comparatif du nombre de protéines identifiées en fonction de la couverture de séquence exprimée en nombre de peptides identifiés sur CPF et lors d'une analyse comparative entre la méthode FASP la précipitation acide TCA pour le rinçage des protéines (0 correspond aux protéines identifiées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

