Programme 2019/2021 – Action n° 4

Thème *Risques liés à la contamination chimique des milieux aquatiques* -

Protéomique ciblée pour la quantification multiplexée de biomarqueurs: perspectives pour la surveillance environnementale

Construction d'une stratégie partagée et généralisable entre espèces pour l'identification de protéines d'intérêt – Cas d'étude chez *Gammarus fossarum*

Rapport d'étape

Anabelle Espeyte, Davide Degli-Esposti, Julien Faugère, Sophie Ayciriex, Arnaud Salvador, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot

Décembre 2019

- **AUTEURS**

Laboratoire d'écotoxicologie, UR RiverLy, INRAE Lyon-Villeurbanne

Anabelle Espeyte, Ingénieur d'étude (INRAE), anabelle.espeyte@inrae.fr

Davide Degli-Esposti, chargé de recherche (INRAE), davide.degli-esposti@inrae.fr

Olivier Geffard, directeur de recherche (INRAE), olivier.geffard@inrae.fr

Arnaud Chaumot, chargé de recherche (INRAE), arnaud.chaumot@inrae.fr

Laboratoire AnabioMS, UMR 5280 Institut des Sciences Analytiques, Lyon1

Julien Faugère, doctorant (ISA Lyon 1), julien.faugere@univ-lyon1.fr

Sophie Ayciriex, maître de conférence (ISA Lyon1), sophie.ayciriex@univ-lyon1.fr

Arnaud Salvador, professeur (ISA Lyon1), arnaud.salvador@univ-lyon1.fr

- **CORRESPONDANTS**

AFB/OFB : Olivier Perceval, DAST (OFB), olivier.perceval@afb.fr

IRSTEA/INRAE : Arnaud Chaumot, Chargé de recherche (INRAE), arnaud.chaumot@inrae.fr

- **RESUME**

Bien qu'une attente grandissante existe aujourd'hui vis-à-vis de l'utilisation des outils biologiques pour l'évaluation de la qualité des milieux, l'utilisation des outils moléculaires pour la biosurveillance (biomarqueurs) reste aujourd'hui limitée notamment chez les invertébrés, ceci du fait de l'existence de plusieurs verrous techniques et scientifiques. Comme nous avons pu le démontrer lors de nos précédents travaux chez l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*, la mise en place d'une surveillance active qui procède par l'encagement d'organismes calibrés provenant d'une unique population source, facilite l'utilisation des marqueurs biologiques pour évaluer la qualité des milieux. Par ailleurs, nous avons récemment pu bénéficier chez cette espèce des dernières innovations en termes de biologie moléculaire et notamment développer l'approche dite de protéogénomique en collaboration avec le CEA (Marcoule), conduisant à la création d'une liste de plusieurs centaines de protéines associées à diverses fonctions physiologiques. Dans le même temps, nous avons exploité les performances de la spectrométrie de masse en collaboration avec l'ISA (Lyon) faisant la preuve de concept qu'à l'instar des approches multi-résidus développées pour le dosage des contaminants, ces méthodes analytiques de pointe permettent d'identifier et de quantifier sur un même échantillon et en une unique analyse plusieurs dizaines de ces protéines biomarqueurs. La présente action a pour objectif de prolonger cette dynamique vers la mise en œuvre de ces méthodologies dans le cadre de la surveillance opérationnelle. Pour cela, deux axes de travail y sont poursuivis. Le premier axe auquel se rapportent les travaux présentés dans ce premier rapport d'étape est de développer chez le gammare une capacité d'acquisition massive de données en protéomique ciblée pour aller vers la définition de valeurs de référence et la construction d'un indicateur intégré de la qualité des milieux. Ceci est passé au cours de cette première année par le développement d'une nouvelle méthode multiplexe qui permet de quantifier simultanément la concentration d'une quarantaine de peptides rapporteurs de grandes fonctions biologiques chez ce crustacé, l'automatisation de la préparation des échantillons, et le test de la robustesse du protocole de préparation et d'analyse via l'acquisition des niveaux de ces biomarqueurs sur 325 échantillons. Ce jeu d'échantillons correspond à des mâles encagés une semaine sur 60 stations à l'échelle nationale (réseaux de surveillance auxquels se sont ajoutés quelques sites choisis spécifiquement sur des stations d'épuration du projet interreg franco-belge Diadem). Sont ainsi évalués ici les effets campagnes de déploiement, les effets séries d'analyse. Ces résultats permettent de constater ainsi sur un premier jeu de données représentatif des masses d'eau soumises à la surveillance en milieu continental, la variabilité des niveaux de ces biomarqueurs protéiques entre individus, entre sites, la répétabilité entre campagnes de mesure. Ces résultats préliminaires montrent la possibilité de définir des valeurs de base pour chacun de ces biomarqueurs, ainsi que leur sensibilité en termes d'induction ou d'inhibition (notamment soulignant la nécessaire prise en compte de la variabilité inter-individu dans la définition des designs d'acquisition et l'interprétation statistique de ces données). Le deuxième axe qui sera engagé parallèlement au cours de l'action vise à ouvrir la réflexion « protéomique pour la surveillance » à d'autres espèces d'intérêt environnemental déjà proposées comme sentinelles pour la surveillance des milieux aquatiques d'eaux douces, de transition et marines, et éventuellement terrestre.

- **MOTS CLES (CONTAMINATION CHIMIQUE, TOXICITE, BIOMONITORING ACTIF, PROTEOMIQUE, BIOMARQUEURS, INDICATEUR, NATIONAL)**

SOMMAIRE

1. Introduction 5
1.1. Contexte 5
1.2. Objectifs 7
2. Matériel & Méthodes 7
2.1. Sites d'encagement sur les réseaux de surveillance 7
2.2. Sites d'encagement DIADEM 8
2.3. Préparation d'échantillons et analyse par HPLC-MS/MS 9
2.3.1. Extraction 10
2.3.2. Digestion et SPE 10
2.3.3. Analyse par HPLC-MS/MS 12
2.3.4. Peptides analysés, quantifiés 13
2.4. Validation de la méthode HPLC-MS/MS 15
2.4.1. Solutions de standards internes 15
2.4.2. Gamme d'étalonnage 16
2.4.3. Critères de validation 16
3. Résultats 16
3.1. Optimisation de la méthode 16
3.2. Automatisation de la préparation d'échantillons 17
3.2.1. Chauffage 17
3.2.2. Pipetage 17
3.2.3. SPE par pression positive 18
3.2.4. Comparaison préparation d'échantillons manuelle vs automatisée 18
3.3. Validation de la méthode dMRM 19
3.4. Analyse des échantillons 20
3.4.1. Retraitement informatique 20
3.4.2. Méthode et taux de quantification 21
3.5. Première exploitation des résultats 21
4. Perspectives 26
5. Références 27
6. Annexes 29
6.1. Annexe n°1 29
6.2. Annexe n°2 32

1. Introduction

1.1. Contexte

Cette action concerne une question nationale relative à la surveillance de la qualité chimique et toxique des milieux aquatiques. L'objectif de l'action qui s'inscrit dans le développement des outils de biosurveillance soutenu depuis une dizaine d'années par le partenariat AFB-Irstea aujourd'hui OFB-INRAE, est de lever certains verrous scientifiques devant permettre l'utilisation de biomarqueurs moléculaires à large échelle, ceci en bénéficiant des dynamiques actuellement mises en place d'une part autour de l'utilisation du gammare encagé dans le cadre de la surveillance chimique des milieux (par les agences de l'eau) et d'autre part sur la question de la diversité des espèces pour une meilleure surveillance (e.g., projet AFB Biosurveillance) :

L'application de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) dans le cadre de la surveillance de la contamination chimique des eaux de surface consiste aujourd'hui à déterminer si différents niveaux de contamination pour certaines substances sont conformes aux normes de qualité environnementale réglementaires (NQE). Les NQE sont des concentrations de polluants prioritaires dans l'eau ou dans le biote qui ne doivent pas être dépassées, afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Pour la conformité aux NQE-biote, les approches passives (échantillonnage des organismes résidents) ont été les premières à émerger pour les environnements côtiers avec, par exemple, le "Mussel Watch" initié en 1976 (Borja *et al*., 2008). Ces approches passives sont moins développées pour les masses d'eau continentales qui sont plus complexes au regard de la grande diversité des hydrosystèmes et du nombre d'espèces aquatiques, rendant ainsi difficile le recours à un nombre faible d'espèces indicatrices (géographiquement représentatives et réparties sur le territoire) et impose l'étude d'un très grand nombre de sites d'échantillonnage. La biosurveillance active, basée sur des organismes transplantés, a récemment été proposée comme approche alternative. Elle a l'avantage d'utiliser une seule espèce sur l'ensemble d'un territoire, de minimiser la variabilité biologique en utilisant des organismes calibrés (taille, sexe, etc.) provenant de la même population et enfin de maitriser le temps d'exposition (Bervoets *et al*., 2005). Dans ce contexte, le laboratoire d'écotoxicologie de Lyon (Irstea/INRAE) a développé un outil de diagnostic de la contamination chimique des milieux, basé sur l'encagement de l'amphipode *G. fossarum*, ce type d'outil étant actuellement proposé par exemple pour évaluer la conformité aux NQE biote[1].

Aujourd'hui, les outils écotoxicologiques (bioessais et biomarqueurs) ne sont pas encore intégrés dans la DCE. Toutefois leur intérêt et leur utilisation ont récemment été interrogés et encouragés, aussi bien au niveau européen au travers des projets comme SOLUTIONS et DEMEAU, favorisant l'utilisation de tests *in vitro*, qu'au niveau national au travers du plan Micropolluants (2016-2021) et de l'appel à manifestation d'intérêt (AMI, 2017) porté par l'Agence Française de la Biodiversité. Ceci s'est traduit également par la mise en place de groupes de travail, comme celui porté par l'INERIS sur le rôle et l'intérêt que doivent avoir les bioessais dans la surveillance des milieux aquatiques. Les outils biologiques restent cependant encore peu considérés en surveillance principalement en raison des critiques autour de leur variabilité naturelle qui peut masquer les réponses induites par le stress chimique. De nombreuses études ont en effet montré l'influence de facteurs abiotiques

[1] EC. Technical Report 2014 – 083. Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document N°32 on biota monitoring (the implementation of EQS-Biota) under the Water Framework Directive.

(température, salinité,…) sur les traits d'histoire de vie et la réponse de biomarqueurs de toxicité (Bocchetti *et al*., 2008), ce qui rend difficile l'établissement d'un lien clair entre les réponses biologiques et la contamination chimique des milieux. Pour lever ce verrou, l'impact de ces facteurs sur le niveau des marqueurs de toxicité doit être formalisé au travers de valeurs de référence et de valeurs seuils caractérisant respectivement le niveau de base de chacun des marqueurs et le niveau au-delà duquel on peut conclure à un effet biologique, avant de les proposer comme outils de biosurveillance (Farkas *et al*., 2017, Menéndez-Helman et al., 2015). Comme l'illustrent nos travaux sur l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*, les approches *in situ* basées sur l'encagement d'organismes offrent dans ce cadre l'opportunité d'obtenir des données de biosurveillance limitant l'impact de facteurs biologiques de confusion (genre, statut reproductif, durée d'exposition et historique).En recourant en complément à des approches de modélisation de l'influence de facteurs abiotiques comme la température, des valeurs de référence et des valeurs seuils ont pu être ainsi définies chez *G. fossarum* pour certains marqueurs individuels: fertilité, fécondité, mue, croissance des ovocytes (Chaumot *et al*., 2020 ; Lopes *et al* ., 2020), taux d'alimentation (Coulaud *et al*., 2011). Ces outils sont par exemple utilisés aujourd'hui dans le cadre de contrôles d'enquête menés par les agences de l'eau, ou d'études d'impact par différentes collectivités ou industriels.

Pour les biomarqueurs moléculaires, d'autres limites techniques contraignent leur utilisation en routine pour la biosurveillance, notamment le manque de méthodes de quantification directe permettant d'assurer la répétabilité/reproductibilité dans le temps et la comparaison des résultats entre études, avec des unités de mesures qui sont le plus souvent arbitraires ou dépendantes du protocole d'analyse choisi par chaque laboratoire. Par ailleurs, l'approche multi-marqueurs est essentielle pour intégrer une large gamme de réponses biologiques / physiologiques induites par les différentes classes de contaminants présentes, visant à une évaluation exhaustive des facteurs de stress chimique. Certains indices ont été proposés pour interpréter les modulations de plusieurs biomarqueurs de manière intégrée, comme l'IBR (Beliaeff et Burgeot, 2002). Cependant, malgré cette simplification de l'interprétation via l'intégration de plusieurs biomarqueurs dans un seul indice, il reste nécessaire de mettre en place une méthode spécifique pour chaque biomarqueur. Comme discuté par Trapp *et al*., (2014a), la plupart des biomarqueurs protéiques disponibles aujourd'hui chez les invertébrés reposent sur des méthodes indirectes, qui sont spécifiques à chaque biomarqueur d'intérêt, multipliant le travail de laboratoire, le coût et le temps nécessaires à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, comme cela est nécessaire dans les programmes de surveillance

Au cours de la dernière décennie, les énormes progrès technologiques réalisés en chimie analytique ont fait émerger des approches par spectrométrie de masse hautement performantes. Parmi celles-ci, la protéogénomique a récemment été proposée comme une approche de rupture en écotoxicologie, alliant la protéomique et la génomique (Armengaud *et al*., 2014). Cette approche apparaît comme une alternative au difficile séquençage du génome chez chaque espèce d'intérêt et consiste à séquencer uniquement les ARNm matures (partie codante du génome) pour obtenir des informations sur les séquences protéiques spécifiques d'une espèce. Aujourd'hui, la technologie RNAseq permet un séquençage profond du transcriptome et ainsi d'identifier rapidement les gènes codants pour les protéines. Le transcriptome d'une espèce d'intérêt peut être ainsi facilement établi et utilisée pour interpréter les spectres obtenus pour l'identification des protéines. Cette approche par séquence *de novo* a été appliquée chez *G. fossarum*, conduisant à une base de données de plusieurs centaines de protéines spécifiques de cette espèce et de réelles perspectives dans l'utilisation de biomarqueurs moléculaires dans la surveillance. En effet, en mode SRM (Selected Reaction Monitoring), la spectrométrie de masse offre la

possibilité de quantifier de façon absolue des protéines dans un mélange complexe, mais également une quantification simultanée et spécifique de plusieurs protéines d'intérêt (multiplexage) sur un même échantillon et en une même analyse. En reproduisant les développements réalisés dans le domaine médical, une telle méthode multiplexée a été développée et validée chez notre espèce sentinelle, permettant la mesure d'une vingtaine de protéines simultanément en une analyse sur un organisme (Charnot *et al*., 2017). La pertinence de cette nouvelle méthode d'analyse pour la mesure de biomarqueurs a été confirmée lors d'étude au laboratoire (Gouveia *et al*., 2017a), mais également sur le terrain (Gouveia *et al*., 2017b), illustrant l'intérêt et la force de la méthodologie mise en place et son intérêt dans un objectif de biosurveillance, notamment chez une espèce déjà utilisée pour la surveillance chimique via l'approche d'encagement.

1.2. Objectifs

Le travail de cette première année a eu pour but le développement d'une méthode d'analyse en protéomique ciblée multiplexée pour le dosage de biomarqueurs protéiques chez *Gammarus fossarum* (liste de biomarqueurs augmentée par rapport aux travaux antérieurs de preuve de concept dans le cadre de la thèse de Duarte Gouveia) et une première évaluation de sa mise en œuvre dans le cadre d'une acquisition de données sur un large jeu d'échantillons environnementaux correspondant à l'exposition *in situ* d'organismes par encagement à l'échelle nationale.

Le principal verrou levé a été celui de l'automatisation de la méthode tant au niveau de la préparation d'échantillon, via l'acquisition d'un automate dédié à cet effet, qu'au niveau du retraitement des données brutes après acquisition. L'acquisition d'un nouveau système HPLC-MS/MS au laboratoire d'écotoxicologie a par ailleurs nécessité le transfert de la méthode développée initialement dans nos précédents travaux de preuve de concept sur ce nouveau système. Des tests de miniaturisation du protocole de préparation d'échantillons ont aussi été menés afin d'augmenter le nombre d'échantillons préparés et analysés en simultané.

Une fois la méthode développée et validée, l'objectif a été de démontrer les performances de la procédure d'acquisition haut débit définie sur un jeu de de données expérimentales acquises à l'échelle nationale (60 sites). L'obtention en 2 mois des niveaux de 38 biomarqueurs sur 325 échantillons individuels permet d'envisager une démarche de définition de niveaux de référence pour chacun des biomarqueurs (notion de robustesse), et met en évidence des changements significatifs correspondant à des inductions-inhibitions des différents biomarqueurs (notion de sensibilité).

2. Matériel & Méthodes

2.1. Sites d'encagement sur les réseaux de surveillance

Au cours d'une précédente action Irstea/AFB (Geffard et al 2019 ; action 48), deux campagnes d'encagement *in situ* ont été mises en œuvre afin d'exposer pendant 7 jours des gammares mâles dans les cours d'eau de 64 sites à l'échelle nationale française sur les réseaux de surveillance (figure n°1) :

- La campagne 1 comprend 48 sites d'encagement, de septembre à octobre 2017
- La campagne 2 compte 16 sites d'encagement, de mars à avril 2018

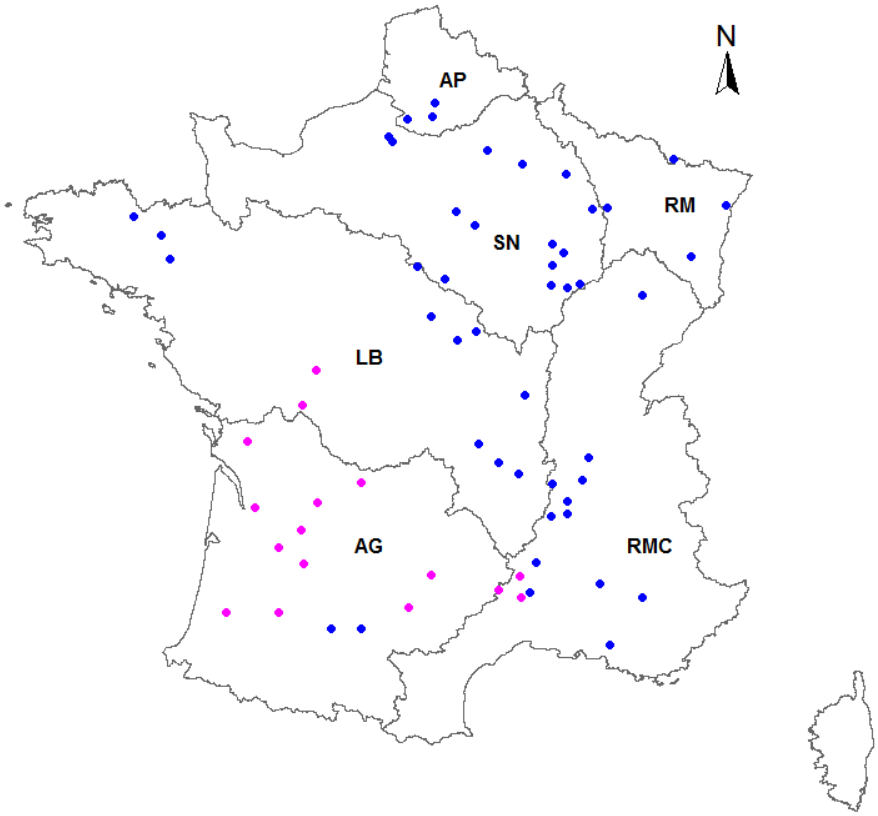


Figure n°1 : *Localisation des sites de l'étude AFB48 (Geffard 2019). Les points bleus et roses correspondent respectivement aux campagnes 1 et 2. Les délimitations géographiques sur la carte représentent les limites de six agences de bassin : Adour-Garonne (AG), Artois-Picardie (AP), Loire-Bretagne (LB), Rhin-Meuse (RM), Rhône-Méditerranée-Corse (RMC).*

L'exposition de gammares a été réalisée selon le protocole décrit par Besse et al. (2013). Il consiste à transplanter sur site des gammares mâles calibrés en taille et provenant d'une population contrôle située ici dans une ancienne cressonnière à Saint Maurice de Rémens (Ain 01). Cinq gammares par site ont été prélevés, pesés et congelés individuellement dans de l'azote liquide pour les dosages protéomiques par spectrométrie de masse. Ils ont été conservés dans des congélateurs à -80°c au laboratoire. Durant ces expositions, des évènements ponctuels tels que l'ensablement des cages ou un étiage sévère ont eu lieu sur 9 sites et ont parfois conduit à un taux de mortalité supérieur à 50%. Par conséquent, les gammares prélevés sur ces sites n'ont pas été considérés dans notre étude de modulation des biomarqueurs protéiques. Ainsi, au total cinq gammares sur 55 sites soit 275 échantillons ont été analysés.

2.2. Sites d'encagement DIADEM

Un autre jeu de déploiements sur site a été ajouté pour élargir le nombre de campagnes et les contextes d'exposition à la contamination. Il s'agit d'expositions réalisées dans le cadre du projet interreg franco-belge DIADEM, s'intéressant au développement des approches de

biosurveillance active pour caractériser l'impact des rejets urbains sur la qualité des cours d'eau du bassin de la Meuse. Pour ce projet, suivant le même protocole d'encagement, des gammares mâles ont été exposés pendant 7 jours dans les cours d'eau de 10 sites franco-belges, en amont et aval de stations d'épuration (figure n°2) en octobre 2018.

Figure n°2 : *Localisation géographique des 10 sites DIADEM*

Toujours avec des gammares provenant de la cressonnière à Saint Maurice de Rémens et selon le protocole d'exposition décrit par Besse et al. (2013), 10 individus par site ont été prélevés, pesés et congelés individuellement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°c pour les dosages protéomiques. Seules 5 stations ont été retenues pour l'étude, en ciblant des sites où différents effets physiologiques (inhibition alimentaire, perturbation de la mue) ont été enregistrés parallèlement au cours de ces mêmes expositions. Il s'agit des stations Bouillon Amont STEP, Bouillon Aval STEP, Namur Amont STEP et ville, Namur Amont STEP, Namur Aval STEP. Au total, 10 individus sur 5 stations soit 50 échantillons ont été analysés.

2.3. Préparation d'échantillons et analyse par HPLC-MS/MS

La méthode pour la préparation et l'analyse des échantillons par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) a été développée en collaboration avec l'ISA et est schématisée sur la figure n°3 ci-dessous :

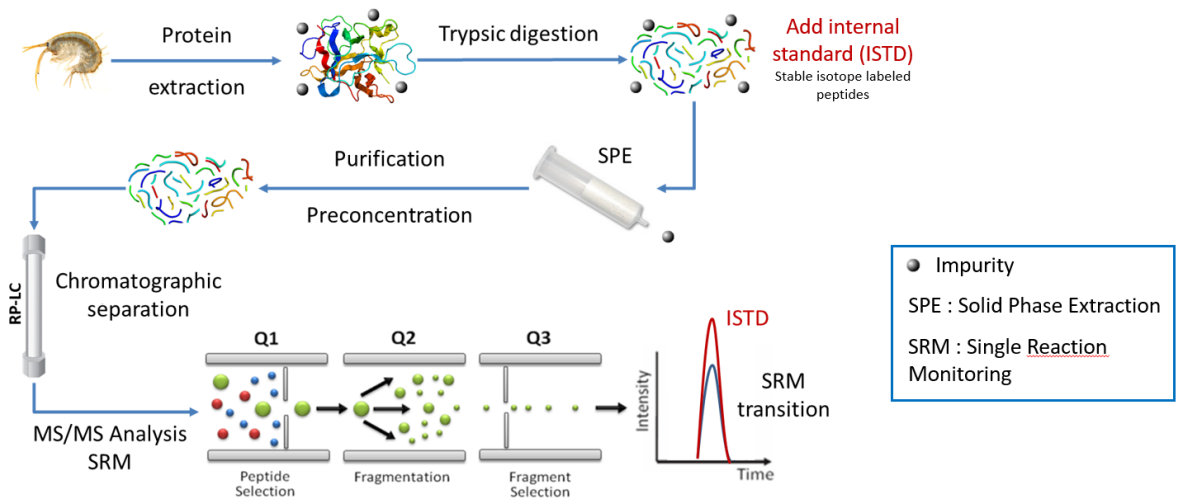


Figure n°3 : *Schéma représentant les étapes de préparation d'échantillons ainsi que leur analyse par HPLC-MS/MS*

2.3.1. Extraction

Le protocole d'extraction des protéines à partir de l'organisme entier est adapté de Simon et al (2010). Le broyage du gammare est réalisé dans du tampon tris (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0.1% v/v) à pH 7,8 contenant 10 µg/mL des inhibiteurs à protéases leupeptine et aprotinine, à l'aide d'un broyeur à billes. Ce tampon permet de solubiliser les protéines. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 15 min à +4°c afin de récupérer 250 µL du surnageant dans un nouveau tube. 750 µL d'une solution de délipidation éthanol absolu/diéthyléther (1 :1 v /v) sont ajoutés au surnageant. Le mélange est ensuite vortexé et incubé 10 min dans de la glace puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à +4°c. Le surnageant contenant la fraction lipidique solubilisée dans le solvant organique est éliminé alors que le culot contenant les protéines précipitées au contact du solvant organique est re-suspendu dans 250 µL de tampon tris.

2.3.2. Digestion et SPE

- Protocole

Après extraction, la préparation d'échantillons se décompose en 3 grandes étapes : la digestion des protéines, l'ajout de standards internes et la purification des peptides. Les protéines sont digérées afin d'obtenir des peptides en utilisant la trypsine comme enzyme de digestion. Celle-ci hydrolyse les liaisons peptidiques après les acides aminés basiques lysine ou arginine. Des standards internes sont ajoutés pour la quantification des peptides endogènes selon la stratégie AQUA. Ces standards sont des peptides lourds marqués (isotopes stables lourds ^{13}C ou ^{15}N) de même séquence que les peptides endogènes recherchés. L'intérêt réside dans le fait que le peptide lourd a ainsi le même comportement en chromatographie liquide et en spectrométrie de masse que le peptide endogène mais un m/z différent permettant de le différencier lors de l'analyse du signal spectrométrique. Ces standards permettent ainsi de corriger spécifiquement pour chaque peptide les pertes au cours de la préparation et de l'analyse des échantillons. Enfin, les peptides sont purifiés par extraction sur phase solide (SPE) en pression positive et concentrés avant analyse.

3 mL de bicarbonate d'ammonium (AMBIC) à 50 mM sont ajoutés aux 250 µL d'extrait protéique précédemment obtenu. Ce tampon à pH 8 permet à la trypsine d'avoir une activité optimale. Après ajout de 362 µL de dithiothréitol (DTT) à 150 mM, les échantillons sont incubés à 60°c pendant 40 min afin de réduire les ponts disulfures et linéariser les protéines. Après retour à température ambiante, les échantillons sont complétés avec 402 µL d'iodoacétamide (IAM) à 150 mM et portés à l'obscurité pendant 40 min à température ambiante afin d'alkyler les cystéines réduites et empêcher la reformation des ponts disulfure. La digestion est ensuite réalisée en ajoutant 150 µL d'une solution de trypsine TPCK à 2 mg/mL et en incubant les échantillons à 37°c pendant 1h. 20 µL d'acide formique (AF) permettent finalement de bloquer la réaction de digestion. La dernière étape consiste en l'ajout de 10 µL d'une solution de peptides lourds à 4 µg/mL dans chaque échantillon.

La purification des peptides se fait sur une cartouche de phase inverse Oasis HLB 3 cc (60 mg). Les échantillons sont d'abord centrifugés à 10 000 g pendant 5 min à température ambiante. 3 mL d'échantillon sont ensuite déposés sur la cartouche et l'élution des peptides est réalisée avec 1 mL de méthanol 0,5% AF. 100 µL d'une solution de méthanol contenant 10% de glycérol sont ajoutés afin de retenir les peptides au fond du tube lors de l'évaporation sous flux d'azote à sec. Les culots sont re-suspendus dans 90 µL d'une solution H_2O/ACN (90/10) 0.1% AF.

- Miniaturisation du protocole de préparation d'échantillons

Afin d'augmenter le nombre d'échantillons préparés et analysés en simultané, des tests de miniaturisation du protocole ont été menés. En effet, l'objectif était de passer d'une préparation dans des tubes Eppendorf 5 mL vers des tubes 1,5 ou 2 mL. Avec des tubes plus petits, deux fois plus d'échantillons peuvent être préparés. Par ailleurs, cela permettrait de réduire la consommation de solvants. Plusieurs tests ont été effectués de façon à garder la concentration constante des réactifs en solution, c'est-à-dire en ajustant les volumes, ou de façon à garder les quantités constantes, c'est-à-dire en ajustant les concentrations initiales des réactifs. Nous avons notamment joué sur le DTT, l'IAM et la trypsine pour:

- Garder les concentrations en solution de tous les réactifs identiques entre 5 mL et 2 mL
- Adapter les concentrations en solution de tous les réactifs en fonction de la concentration en protéines dans l'échantillons
- Garder les concentrations en solution du DTT et de l'IAM identiques entre 5 mL et 2 mL mais avec une concentration en solution de trypsine fonction de la concentration en protéines dans l'échantillons
- Adapter les concentrations en solution du DTT et de l'IAM en fonction de la concentration en protéines dans l'échantillons mais avec la concentration en solution de trypsine identique entre 5 mL et 2 mL

- Automatisation

Le laboratoire d'écotoxicologie a pu acquérir début 2019 un automate dédié à la préparation d'échantillons Biomek Nxp de chez Beckman Coulter (figure n°4) piloté via le logiciel Biomek® Software version 3.3 (Build 14). L'objectif d'un tel équipement est d'automatiser au maximum la préparation d'échantillons afin d'améliorer la reproductibilité des essais en s'affranchissant des effets opérateur. Il s'agit du modèle. L'automatisation de la digestion des protéines et de la SPE par pression positive a pris environ 1 mois. Elle permet le pipetage des différents volumes de solvant grâce à des « doigts » (ou tips) sur lesquels viennent se positionner des cônes 1000 µL. Le chauffage des échantillons est réalisé à l'aide d'un module Peltier dont le gradient de température possible s'étend de 4 à

70°c. Un bras « gripper » permet de déplacer les plaques d'échantillons. Enfin, un module de SPE par pression positive est également présent et sur lequel il a fallu déterminer les différentes pressions à appliquer.

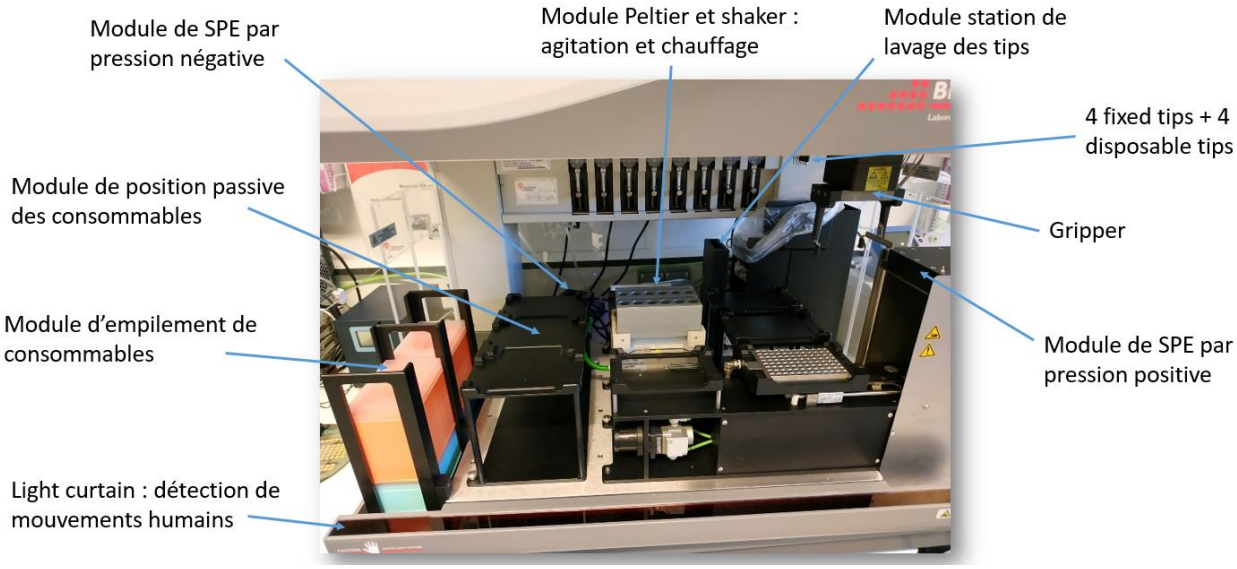


Figure n°4 : *Photo intérieure des différents modules composant l'automate Biomek Nxp*

Toutes les étapes de la digestion enzymatique et de la SPE sont réalisées sur l'automate, hormis l'ajout des 10 µL de peptides lourds ainsi que la centrifugation.

- Validation de l'automatisation

Afin de valider l'automatisation du protocole, une comparaison du protocole réalisé manuellement ou avec l'automate a été menée. Pour l'étape de digestion, nous avons évalué l'effet de l'automatisation en nous appuyant sur l'ensemble des protéines suivies. Nous avons poolé des extraits protéiques de gammares. 3 échantillons ont été digérés manuellement puis ont été purifiés par SPE manuelle et 3 autres échantillons ont été digérés par l'automate puis ont été purifiés de la même façon par SPE manuelle. Pour chaque peptide, les 3 aires obtenues pour chacune des 2 conditions ont été moyennées et comparées entre elles par le calcul d'un « pourcentage de récupération » relatif. Pour le processus de SPE, les pourcentages de récupération d'un ajout contrôlé de peptides lourds ont été déterminés dans chaque condition (manuelle/automate). A partir d'un même pool d'extraits protéiques de gammares, 3 échantillons ont été préparés avec un même ajout dosé de peptides lourds avant la SPE et 3 autres échantillons avec l'ajout des peptides lourds après la SPE. La SPE a été réalisée en conditions manuelles ou automatisées avec une digestion manuelle dans les 2 cas. L'utilisation de 3 échantillons par condition permet de moyenner les aires obtenues pour le calcul des pourcentages de récupération et d'estimer la dispersion des résultats autour de la moyenne par le calcul d'un coefficient de variation. Le calcul du pourcentage de récupération se fait comme suit :

$$\%\ de\ récupération = \frac{moyenne\ des\ 3\ aires\ du\ peptide\ lourd\ ajouté\ avant}{moyenne\ des\ 3\ aires\ du\ peptide\ lourd\ ajouté\ après}\ x\ 100$$

2.3.3. Analyse par HPLC-MS/MS

L'équipe d'écotoxicologie a également fait l'acquisition en janvier 2019 d'un équipement pour l'analyse des échantillons par HPLC-MS/MS présenté figure n°5. La chaîne HPLC est

une chaîne Agilent 1290 Infinity II couplée à un spectromètre de masse triple quadrupôle Agilent QQQ 6495B équipé d'une source Electrospray Agilent Jet Stream (AJS).

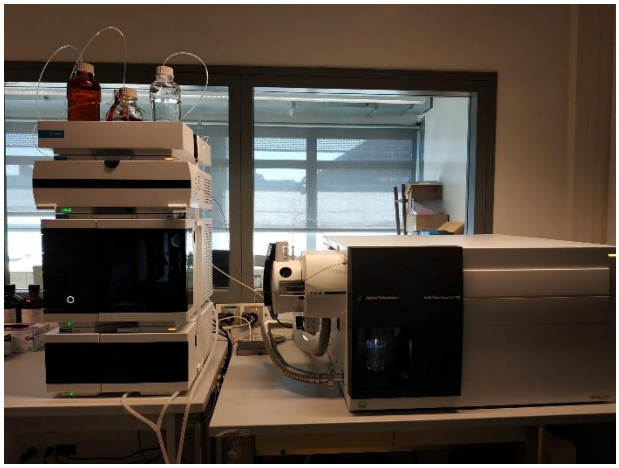


Figure n°5 : *Equipement HPLC-MS/MS. Sur la gauche, chaîne HPLC Agilent 1290 Infinity II et sur la droite, spectromètre de masse QQQ Agilent 6495B.*

Dans un premier temps, le transfert de méthode de l'ancien système AB SCIEX QTRAP 5500 vers ce nouveau spectromètre de masse Agilent QQQ 6495B a été réalisé. Les paramètres chromatographiques n'ont pas été modifiés du fait que les mêmes systèmes chromatographiques ont été utilisés avant et après acquisition du spectromètre Agilent. Il a fallu par contre recaler les temps de rétention de chaque peptide du fait de l'utilisation d'un matériel neuf encore non utilisé et d'une colonne neuve. Les paramètres de spectrométrie de masse ont été redéfinis également (tensions appliquées au sein des différents compartiments du spectromètre, les énergies de collision, etc…) dans le but d'obtenir un signal le plus intense possible pour chaque peptide. Une colonne Waters Xbridge de dimensions 100mmx2,1mmx3,5µm est utilisée pour la séparation des analytes par HPLC. 20µL d'échantillon sont injectés par analyse. Le four est thermostaté à 40°C. Le débit appliqué est de 300 µL/min sur une phase mobile contenant H_2O 0,1% AF (v:v) en voie A et ACN 0,1% AF (v:v) en voie B. Le gradient d'élution appliqué est le suivant : palier de 2 min à 5% d'ACN, puis gradient linéaire de 5% à 35% d'ACN en 36 min, palier de 5 min à 100 % d'ACN puis retour à 5% d'ACN pendant 5 min. Les paliers à 5% d'ACN permettent l'équilibrage de la colonne tandis que le palier à 100% d'ACN permet de laver la colonne des éventuels impuretés restées accrochées en fin de gradient. La durée totale d'injection est de 48 min.

L'acquisition des données se fait grâce au logiciel MassHunter Data Acquisition (version B.09.00) et le retraitement se fait via le logiciel MassHunter Quantitative Analysis (version B.09.00). Le spectromètre de masse est calibré à chaque début de semaine avant la première série d'analyses avec le calibrant Agilent ESI-L Tuning Mix.

2.3.4. Peptides analysés, quantifiés

Une méthode dMRM (dynamic Multiple Reaction Monitoring) a été développée. Elle permet de suivre des transitions MRM, c'est-à-dire un couple ion précurseur-ion fragment sélectionné, sur une fenêtre de temps connue autour de son temps de rétention. Pour chaque peptide, 3 transitions intenses et peu interférées ont été sélectionnées et suivies

avec une résolution unitaire en Q1 et Q3, un dwell time minimum de 5,32 ms et un temps de cycle de 1500 ms afin d'avoir au minimum 10 points d'acquisition par pic chromatographique. Une transition est appelée quantifiante quand elle permet la quantification des peptides grâce à son aire sous le pic chromatographique. Cette transition est généralement choisie de manière à être la plus intense et/ou la moins interférée pour que la quantification soit la plus précise possible. Les 2 autres transitions sont appelées transitions qualifiantes, elles serviront à confirmer l'identité du peptide par vérification de la superposition des 3 transitions et calcul du rapport des transitions qui doit toujours être constant.

La méthode établie au cours de l'étude permet le suivi de 308 peptides avec 3 transitions chacun soit 924 transitions au total. Chaque peptide a été sélectionné de façon à être spécifique d'une seule protéine, on parle de peptides protéotypiques. Une protéine peut être représentée par 1 ou plusieurs peptides selon le nombre de peptides protéotypiques qu'elle possède.

Sur la figure n°6 est représenté le nombre de transitions MRM suivies en fonction du temps de rétention auxquelles elles sont détectées. Au maximum, une méthode MRM peut suivre 200 transitions en simultané. Toutes les transitions sont comprises entre 4 et 36 min, temps pendant lequel le gradient de séparation est appliqué (et suffisant pour séparer tous les composés suivis). Par ailleurs, c'est entre 16 et 18 min que sont recherchées le plus de transitions en simultané.

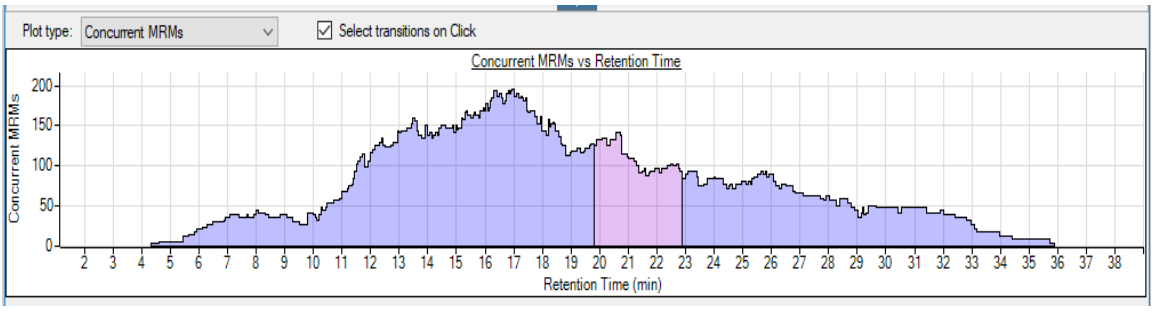


Figure n°6 : *Nombre de transitions suivies en fonction du temps de rétention*

Sur l'ensemble des 308 peptides, nous avons mis en place une quantification à l'aide de l'utilisation de peptides lourds pour 43 peptides. Ils ont été choisis pour être rapporteurs de protéines impliquées dans des processus relatifs à la réponse aux contaminants ou encore de différentes grandes fonctions physiologiques telles que l'osmorégulation, la mue, le développement embryonnaire, etc. Ces 43 peptides sont donnés dans le tableau n°1.

Parmi les 43 peptides lourds recherchés, cinq n'ont pas été retraités car non détectés (inférieurs aux LOD) ou fortement interférés. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur les 38 peptides restants pour retraiter toutes les données de quantification des peptides légers associés.

Peptides actuels 2019				
Peptide	**Protéine**	**Fonction**	**MW (Da)**	**Groupe fonctionnel**
HIEIFSPITK	64	Vitellogin	1184,38	Female yolk proteins
VVPSLSAEDTLSQR	276	Hemolymph clottable protein	1501,64	
HAEFSVNPPLDSTQAVK	276		1839,92	
IIYPAEALTIVIEK	276		1572,92	
IFNVLQPIAESK	17046	Clottable protein 2	1358,77	
TSEVFLPLTNELYQQTK	17046		2011,24	
ISPLINSPSDLPK	39606	Clotting protein precursor	1380,77	
ELTSAAEVVSSLLK	200426	Vitellogenin	1446,81	
AAIETAFVNHLK	206469	Clotting protein precursor	1313,72	
SFILSDLTNLQQSQAPYK	194758	Apolipolocrustacein	2053,28	
FVGLISLIDPPR	32234	Na+K+ ATPase α1 subunit	1326,78	Osmoregulation
VIMVTGDHPITAK	110907	Na+K+ ATPase	1796,98	
LGAIVAVTGDGVNDSPALK	110907		1381,75	
LQTNPDTGLSTAEAR	209438	Na+K+ ATPase	1573,78	
EAFDTVGR	208857	Na+ K+ ATPase	893,42	
EVNGDASEAALLK	208857		1315,66	
SGQDGVPILK	208857		1012,56	
LIFDNLK	17127	sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase alpha subunit D isoform	861,5	
LIIVEGCQR	17127		1086,59	
GIDIIGDAFEADR	2562	Prophenoloxidase	1391,68	Molt-related
APILEGYFSK	2562		1124,6	
GIDFGTTQSVR	2562		1180,26	
ATQPSYTVAQLELPGVNITR	2562		2158,42	
ILEDFVDVFNR	100255	Cytochrome P450 enzyme, CYP4C39	1366,7	
VPAILESFPGR	15561	Prophenoloxidase	1184,64	
AFWGSLPLR	144144	JHE-like carboxylesterase 1	1046,58	
ILTTMWADFAR	144144		1324,55	
EFWIATDHNEVR	166723	Farnesoic acid methyltransferase	1516,61	
LVLGTATYGR	181833	Chitinase	1050,21	
GTLAVIPVQNR	1917	Transglutaminase	1167,68	General biomarkers
GLCLPTDACPR	1975	Hemocytin-like	1143,35	
VLAVDILAK	7169	Transglutaminase	941,6	
FSESSAILR	40079	Glutathion-S-transferase	1009,53	
LGSNFLQIPVNCPYR	45375	Catalase	1720,99	
ADPALGQAIQER	110912	Catalase	1268,66	
LADNIAGHVINTQEFIR	110912		1911,13	
LSAWLAACK	142711	Glutathion-S-transferase	962,51	
ELFDFADAHR	213317	Cellulase	1220,57	

Tableau n°1 : *Liste des 43 peptides suivis et quantifiés grâce à l'ajout de peptides lourds (sur un total de 308 peptides suivis). Le code pour chaque protéine correspondante est relatif à l'identifiant des contigs de la base transcriptomique de référence GFOSS (Trapp et al 2014b).*

2.4. Validation de la méthode HPLC-MS/MS

2.4.1. Solutions de standards internes

Les peptides lourds, standards internes sont reçus individuellement sous forme lyophilisée. Des solutions stock de chacun des peptides lourds sont alors préparées de la façon suivante : 0,2 mg de chaque peptide lourd sont dissous dans une solution H_2O/ACN (50:50, v:v) 0,1% AF afin d'atteindre une concentration en solution de 400 µg/mL. Ces

solutions stock sont ensuite diluées par 100 dans une solution H_2O 0,5% AF et mélangées ensemble pour atteindre la concentration en solution de 4 µg/mL.

2.4.2. Gamme d'étalonnage

A partir de la solution stock à 4 µg/mL regroupant tous les peptides, une gamme d'étalonnage est réalisée en cascade afin d'atteindre les concentrations 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 15.625 et 3.90625 dans le solvant de reprise des échantillons H_2O/ACN (90:10, v:v) 0,5% AF. La même gamme est réalisée en matrice, c'est-à-dire avec un pool d'extraits protéiques de gammares.

2.4.3. Critères de validation

Les limites de détection (LOD) et quantification (LOQ) ainsi que la linéarité des essais en matrice peuvent être déterminés à l'aide des courbes d'étalonnage produites automatiquement par le logiciel MassHunter Quantitative Analysis à partir des aires mesurées. Les courbes de calibration sont représentées suivant une régression linéaire qui ne passe pas par l'origine. L'effet matrice a également été évalué par comparaison des essais en solvant et en matrice. 3 échantillons par point de gamme sont réalisés et analysés. Dans la littérature, la LOD et la LOQ correspondent respectivement à la plus petite concentration à laquelle l'analyte peut être détecté et quantifié de manière fiable. Le rapport signal sur bruit a été choisi comme paramètre utilisé pour nos mesures de LOD et LOQ. Ce rapport doit être de 3:1 pour déterminer la LOD et 10:1 pour la LOQ. La répétabilité de la méthode a été déterminée à chaque niveau de concentration par le calcul du coefficient de variation. Ce coefficient ne doit pas dépasser 20% pour que la répétabilité de la méthode soit considérée comme satisfaisante.

3. Résultats

3.1. Optimisation de la méthode

Dans un premier temps, nous avons eu pour objectif de miniaturiser le protocole de préparation d'échantillons afin de consommer moins de solvants et réaliser plus d'échantillons à la fois, ceci en passant d'une préparation d'échantillons dans des tubes Eppendorf 5 mL à des tubes Eppendorf 1,5 ou 2 mL pour augmenter la cadence de préparation (figure n°7).

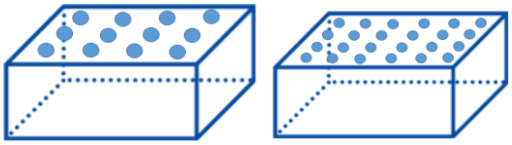


Figure n°7 : *Format des portoirs à tubes 5 mL à gauche et à tubes 1,5 ou 2 mL à droite*

Au final, l'ensemble des tests ont été insatisfaisants, les résultats ayant montré une perte significative de signal (>40%) pour nos peptides quel que soit l'ajustement en concentration ou en quantité réalisé. Nous avons donc dû rester en tubes 5 mL ce qui nous a par ailleurs

imposé une fabrique à façon d'un portoir compatible avec l'automate Biomek Nxp pour mettre en place l'automatisation.

3.2. Automatisation de la préparation d'échantillons

Un protocole de préparation d'échantillons automatisé guidé par le logiciel dédié a été défini, incluant la digestion des protéines ainsi que la SPE par pression positive. Le logiciel Biomek® Software a permis de programmer les différentes étapes d'un protocole : pipetage, mouvement d'un portoir, chauffage, etc. Différents procédés clés de l'optimisation du protocole sont décrits ci-après.

3.2.1. Chauffage

La digestion des protéines nécessite le chauffage des échantillons premièrement à 60°c puis secondement à 37°C (thermostaté sur module Peltier). Nous avons dû définir et ajouter, dans la programmation automatique, des temps de pause optimisés afin que le Peltier puisse atteindre la bonne température : 20 min pour le chauffage à 60°c et 12 min pour 37°c.

3.2.2. Pipetage

La deuxième étape d'optimisation a été celle du pipetage des différents volumes utilisés au cours de la préparation d'échantillons. Des tests ont été menés pour contrôler le volume pipeté par ajustement des différents paramètres de pipetage et nous avons évaluer les pourcentage d'erreur sur les volumes à pipeter, c'est-à-dire la précision de la mesure (tableau n°2). Nous avons également étudié la répétabilité sur 4 volumes de pipetage avec le calcul du coefficient de variation.

Solvant	Volume à pipeter	Scaling factor	Offset	% d'erreur sur le volume à pipeter	Répétabilité (CV en %)
AMBIC	750µL x 4 = 3mL	1,02	1	0,8	0,3
DTT	362 µL	1,05	1	1,3	0,2
IAM	402 µL	1,05	1	1,8	0,5
Trypsine	150 µL	1,05	1	3,6	0,1
AF	40 µL	1,15	1	6,2	3,7
MeOH	500 µL x 2 = 1mL	1	1	8,9	1,6
H_2O 0,5% AF	500 µL x 2 = 1mL	1,05	0	0,5	0,3
H_2O/MeOH (95:5 v:v) 0,1% AF	500 µL x 2 = 1mL	1,05	1	1,2	0,2
MeOH 0,1% AF	500 µL x 2 = 1mL	1,02	1	6,1	1,8

Tableau n°2 : *Ajustement des volumes à pipeter selon le scaling factor, l'offset et le pourcentage d'erreur*

Les répétabilités sur les volumes de pipetage sont satisfaisants puisque inférieurs à 20%, au maximum les CV sont de 4% pour l'acide formique. L'homogénéisation après chaque volume de pipetage ajouté est réalisée par aspiration/refoulement de 800 µL d'échantillons prélevés à 2 mm du fond du tube 4 fois de suite. La perte d'échantillons en termes de volume liée à cette façon d'homogénéiser a été estimée inférieure à 0,3% ce qui est acceptable.

3.2.3. SPE par pression positive

La dernière étape d'optimisation a été la SPE par pression positive (sous azote). Beckman Coulter a mis en place un script permettant au portoir contenant les cartouches SPE d'être acheminé jusqu'au module de SPE par pression positive, d'envoyer le flux d'azote dessus et d'en ressortir. Les deux seuls paramètres à régler sont 1) la pression mécanique à appliquer sur le rail pour déplacer le portoir à cartouches dans le module fixe et 2) la pression d'azote à appliquer sur les cartouches pour le processus de filtration. Etant donné la pression en sortie de la bouteille d'azote de 3 bar, voici les pressions qui ont été définies pour des conditions de SPE optimales :

1) Pression de 0,25 MPa pour déplacer le portoir de façon correcte, c'est-à-dire ni trop vite pour ne pas renverser les échantillons et ni pas assez vite pour éviter de donner des à-coups au portoir et faire éclabousser les échantillons

2) Pression de 0,04 MPa : pour que le goutte-à-goutte des échantillons en sortie de cartouche SPE soit lent afin de permettre aux peptides de s'accrocher sur la phase solide de la cartouche et ainsi être filtrés

3.2.4. Comparaison préparation d'échantillons manuelle vs automatisée

L'automatisation du protocole de préparation d'échantillons a été validée par comparaison des pourcentages de récupération au cours des processus de digestion et SPE en manuel *vs* sur l'automate.

Le tableau présentant les résultats concernant le processus de digestion est donné en annexe n°1. Au bilan, 22% des peptides présentent un pourcentage de récupération relatif inférieur à 80%, (i.e., signal obtenu au moins 20% plus faible après une préparation automatisée comparée à une préparation manuelle). 66% des peptides ne présentent ni perte ni gain de signal en protocole automatisé. 12% des peptides légers ont un gain de signal suite à la digestion automatisée. Donc au total, 78% des peptides légers préparés par l'automate ont un signal supérieur ou égal à celui obtenu avec un protocole manuel, ce qui est satisfaisant et valide notre méthode automatisée de digestion.

Concernant la SPE (tableau n°3 ci-dessous), les analyses ont montré que les pourcentages de récupération des peptides lourds étaient quasiment tous plus élevés lorsque la préparation d'échantillons est réalisée sur l'automate plutôt qu'en manuel. En effet, en moyenne 98% de la quantité de peptide est récupérée après la SPE automatisée contre 88% après la SPE manuelle. Ceci nous permet de valider l'automatisation de la SPE.

De plus, le fait d'avoir réalisé 3 réplicas pour chaque condition nous a permis d'estimer la dispersion des résultats obtenus entre un protocole réalisé en totalité manuellement et un protocole réalisé automatiquement par le robot. En moyenne, les CV obtenus sont de 7% aussi bien en manuel qu'en automatisé. Ces résultats sont également très satisfaisants puisque cela signifie que l'automatisation n'a pas augmenté la dispersion des résultats et est donc répétable.

peptides lourds	% recup SPE manuel	% recup SPE robot
AAIETAFVNHLK	97	89
ADPALGQAIQER	97	103
AFWGSLPLR	96	103
APILEGYFSK	78	91
ATQPSYTVAQLELPGVNITR	93	110
EAFDTVGR	88	96
EFWIATDHNEVR	82	87
ELFDFADAHR	87	104
ELTSAAEVVSSLLK	76	105
EVNGDASEAALLK	78	108
FSESSAILR	84	91
FVGLISLIDPPR	87	95
GIDFGTTQSVR	87	104
GIDIIGDAFEADR	70	94
GLCLPTDACPR	94	113
GTLAVIPVQNR	86	94
HAEFSVNPPLDSTQAVK	89	98
HIEIFSPITK	87	97
IFNVLQPIAESK	99	97
IIYPAEALTIVIEK	79	98
ILEDFVDVFNR	98	123
ILTTMWADFAR	95	103
ISPLINSPSDLPK	94	94
LADNIAGHVINTQEFIR	63	67
LGAIVAVTGDGVNDSPALK	85	94
LGSNFLQIPVNCPYR	92	97
LIFDNLK	90	87
LIIVEGCQR	68	88
LQTNPDTGLSTAEAR	85	101
LSAWLAACK	89	100
LVLGTATYGR	90	87
SFILSDLTNLQQSQAPYK	84	95
SGQDGVPILK	86	100
TSEVFLPLTNELYQQTK	92	105
VIMVTGDHPITAK	91	99
VLAVDILAK	113	113
VPAILESFPGR	101	103
VVPSLSAEDTLSQR	91	95
Moyenne	**88**	**98**

Tableau n°3 : *Pourcentages de récupération lors de la SPE par comparaison des protocoles réalisés en manuel et sur l'automate. En vert sont surlignés les pourcentages les plus élevés.*

3.3. Validation de la méthode dMRM

Les LOD et LOQ ainsi que le domaine de linéarité pour chacun des 38 peptides lourds retraités ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage comme illustré à la figure n°8. La répétabilité sur chaque point de gamme a été mesurée par le calcul d'un coefficient de variation.

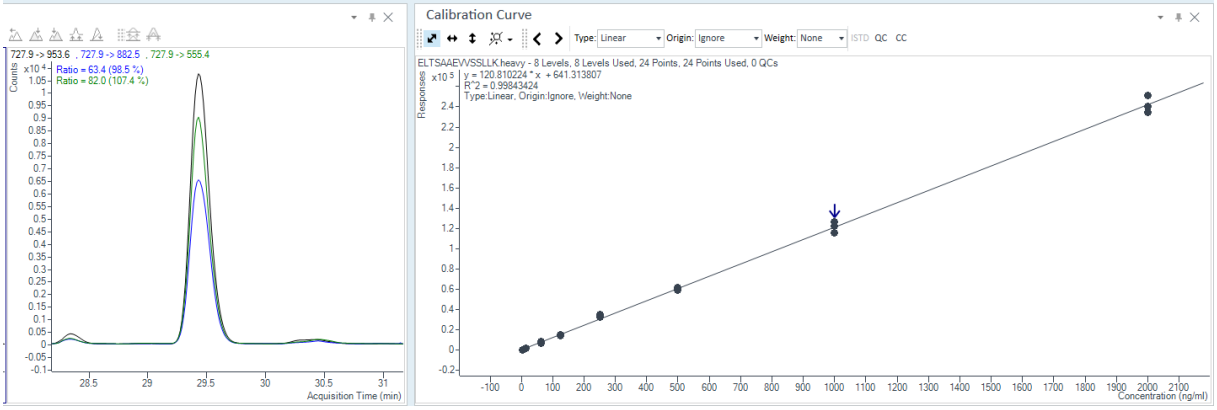


Figure n°8 : *Courbe d'étalonnage pour le peptide ELTSAAEVVSSLLK*

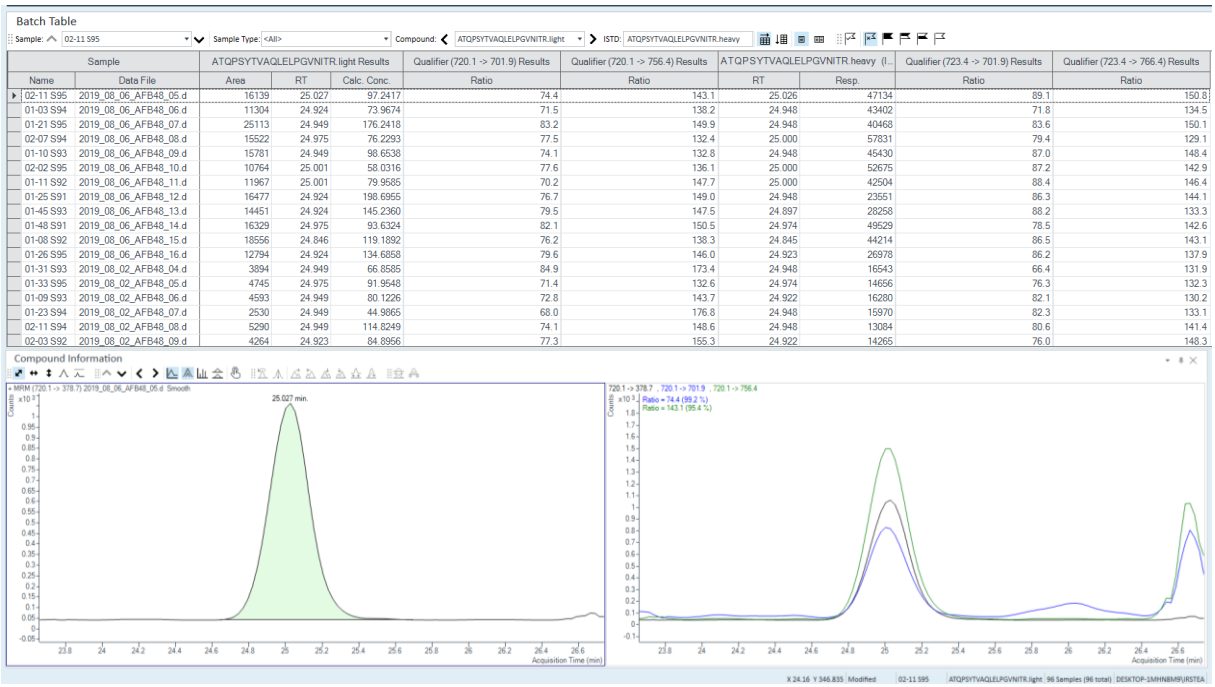
3.4. Analyse des échantillons

Nous avons ensuite appliqué la méthode sur les 275 échantillons AFB48 ainsi que les 50 échantillons DIADEM (gammares mâles entiers, exposés 7 jours sur site). L'analyse de l'ensemble des échantillons a été réalisée en 2 mois, à raison de 48 échantillons par semaine de 5 jours. Sur ces 325 échantillons, seulement 2 n'ont pas pu être retraités car un problème de SPE est survenu empêchant leur interprétation. Ceci permet de souligner la fiabilité de la procédure définie ici pour le traitement automatique / analyse des échantillons. Les 323 autres ont été retraités de la manière décrite ci-après.

3.4.1. Retraitement informatique

Le retraitement informatique a été opéré à l'aide du logiciel MassHunter Quantitative Analysis. Il permet de calculer automatiquement l'aire, le temps de rétention, les rapports de transitions, le signal sur bruit, la concentration obtenue en peptides légers. Une capture d'écran est donnée figure n°9. Cette étape de retraitement est longue à mettre en place. La méthode de retraitement est aujourd'hui automatisée mais nécessite encore des ajustements manuels ponctuels notamment pour l'ajustement des intégrations de pics chromatographiques.

On considère que l'on a bien identifié un peptide lorsque ces 3 transitions sont superposées les unes sur les autres au même temps de rétention. Il faut que le rapport des transitions entre elles soit constant à ±20%.



Batch Table

Sample: 02-11 S95 | Sample Type: <All> | Compound: ATQPSYTVAQLELPGVNITR.light | ISTD: ATQPSYTVAQLELPGVNITR.heavy

Sample		ATQPSYTVAQLELPGVNITR.light Results			Qualifier (720.1 -> 701.9) Results	Qualifier (720.1 -> 756.4) Results	ATQPSYTVAQLELPGVNITR.heavy (I...		Qualifier (723.4 -> 701.9) Results	Qualifier (723.4 -> 766.4) Results
Name	Data File	Area	RT	Calc. Conc.	Ratio	Ratio	RT	Resp.	Ratio	Ratio
02-11 S95	2019_08_06_AFB48_05.d	16139	25.027	97.2417	74.4	143.1	25.026	47134	89.1	150.8
01-03 S94	2019_08_06_AFB48_06.d	11304	24.924	73.9674	71.5	138.2	24.948	43402	71.8	134.5
01-21 S95	2019_08_06_AFB48_07.d	25113	24.949	176.2418	83.2	149.9	24.948	40468	83.6	150.1
02-07 S94	2019_08_06_AFB48_08.d	15522	24.975	76.2293	77.5	132.4	25.000	57831	79.4	129.1
01-10 S93	2019_08_06_AFB48_09.d	15781	24.949	98.6538	74.1	132.8	24.948	45430	87.0	148.4
02-02 S95	2019_08_06_AFB48_10.d	10764	25.001	58.0316	77.6	136.1	25.000	52675	87.2	142.9
01-11 S92	2019_08_06_AFB48_11.d	11967	25.001	79.9585	70.2	147.7	25.000	42504	88.4	146.4
01-25 S91	2019_08_06_AFB48_12.d	16477	24.924	198.6955	76.7	149.0	24.948	23551	86.3	144.1
01-45 S93	2019_08_06_AFB48_13.d	14451	24.924	145.2360	79.5	147.5	24.897	28258	88.2	133.3
01-48 S91	2019_08_06_AFB48_14.d	16329	24.975	93.6324	82.1	150.5	24.974	49529	78.5	142.6
01-08 S92	2019_08_06_AFB48_15.d	18556	24.846	119.1892	76.2	138.3	24.845	44214	86.5	143.1
01-26 S95	2019_08_06_AFB48_16.d	12794	24.924	134.6858	79.6	146.0	24.923	26978	86.2	137.9
01-31 S93	2019_08_02_AFB48_04.d	3894	24.949	66.8585	84.9	173.4	24.948	16543	66.4	131.9
01-33 S95	2019_08_02_AFB48_05.d	4745	24.975	91.9548	71.4	132.6	24.974	14656	76.3	132.3
01-09 S93	2019_08_02_AFB48_06.d	4593	24.949	80.1226	72.8	143.7	24.922	16280	82.1	130.2
01-23 S94	2019_08_02_AFB48_07.d	2530	24.949	44.9865	68.0	176.8	24.948	15970	82.3	133.1
02-11 S94	2019_08_02_AFB48_08.d	5290	24.949	114.8249	74.1	148.6	24.948	13084	80.6	141.4
02-03 S92	2019_08_02_AFB48_09.d	4264	24.923	84.8956	77.3	155.3	24.922	14265	76.0	148.3

Compound Information

Figure n°9 : *Capture d'écran du logiciel MassHunter Quantitative Analysis*

3.4.2. Méthode et taux de quantification

Comme indiqué précédemment, la première étape du retraitement des données a été la quantification des 38 peptides endogènes pour lesquels l'ajout de peptides lourds a été réalisé. L'aire obtenue pour le peptide lourd sur la transition quantifiante et l'aire obtenue sur cette même transition pour le peptide léger permettent de calculer la quantité de chacun des peptides légers endogènes. Ces quantités massiques en ng de peptide léger, sont ensuite transformées en quantités molaires (pmol) grâce à la masse molaire connue de chaque peptide. Les quantités molaires obtenues peuvent alors être normalisées par la masse de chaque gammare. Un exemple de résultats obtenus est présenté en annexe n°2 pour le peptide ADPALGQAIQER.

En fixant les LOQ à 5 fois le signal/bruit, seul 1 peptide (toutefois avec un signal supérieur à la LOD de 3 fois le signal/bruit) n'a pu être quantifié.

3.5. Première exploitation des résultats

Un premier regard sur les résultats pour les 38 peptides marqueurs dosés dans les 325 échantillons obtenus en seulement 2 mois (préparation/analyse/retraitement) est dressé ici.

- Normalisation des données par la masse de gammare

Les quantités molaires non normalisées et normalisées par la masse du gammare ont été comparées. Pour visualiser l'effet de la normalisation sur la variabilité du niveau du biomarqueur, nous avons représenté les niveaux individuels mesurés en les regroupant par site d'exposition. Un exemple sur le peptide ADPALGQAIQER (relatif à une activité catalase) est donné ci-dessous sur la figure n°10 pour la campagne 1 du projet AFB48 (sites nationaux, 5 individus par site):

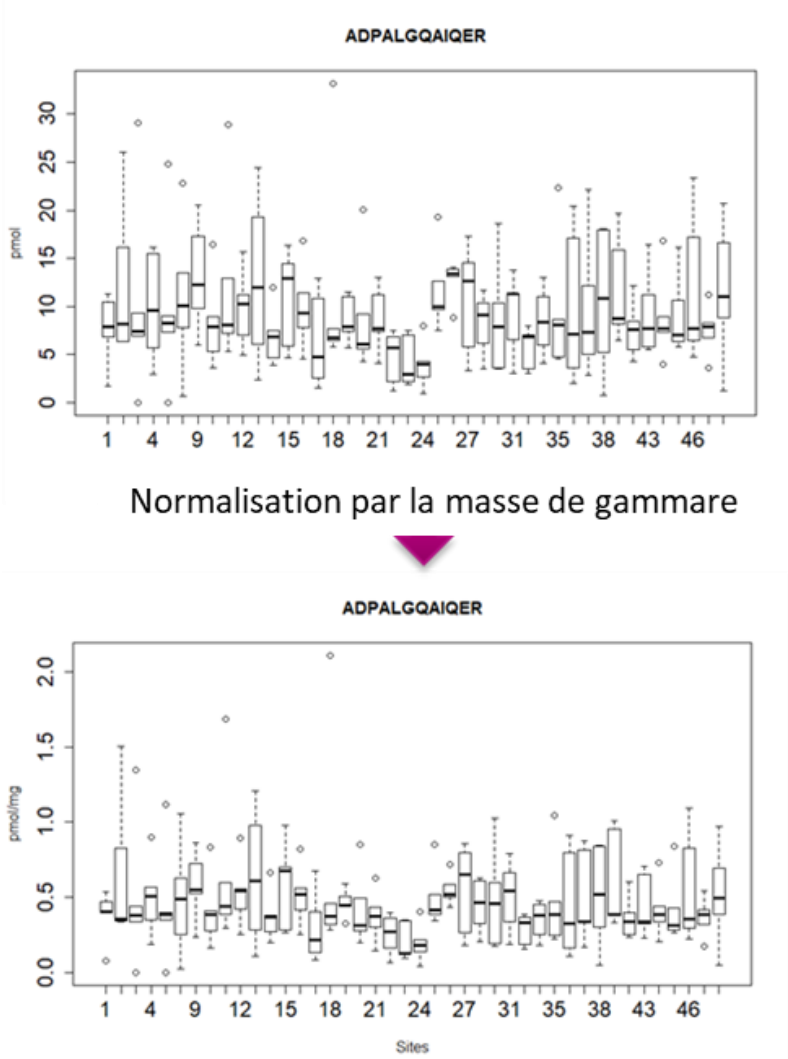


Figure n°10 : *Quantités molaires brutes et quantités molaires normalisées par la masse de gammare (poids frais) pour le peptide ADPALGQAIQER (relatif à une activité catalase) lors de la campagne 1 (5 individus par site).*

De manière globale, la normalisation par la masse de gammare (poids frais) ne semble pas jouer fortement sur la dispersion des données, que ce soit en termes de variabilité inter-individus ou inter-sites. Il faut souligner ici que l'effort de calibration de la taille des organismes utilisés lors des tests d'encagement dans le cadre de la biosurveillance active permet certainement de s'affranchir de cette problématique de normalisation pour la comparaison des niveaux des biomarqueurs. Conformément à l'usage le plus répandu dans la littérature, nous présentons par la suite les données normalisées par la masse du gammare.

- Examen des effets campagne et série d'analyses

Afin d'étudier un potentiel effet campagne, les niveaux de concentrations peptidiques mesurées sur les sites lors des différentes études et différentes campagnes de déploiement ont été comparées pour chacun des peptides biomarqueurs, ici visuellement sur la figure 11 (avec l'exemple du peptide LIFDNLK relatif à une protéine de pompe ionique) en classant l'ensemble des sites par ordre croissant de concentrations médianes. Chaque campagne AFB48_C1, AFB48_C2 et DIADEM y est représentée par une couleur différente.

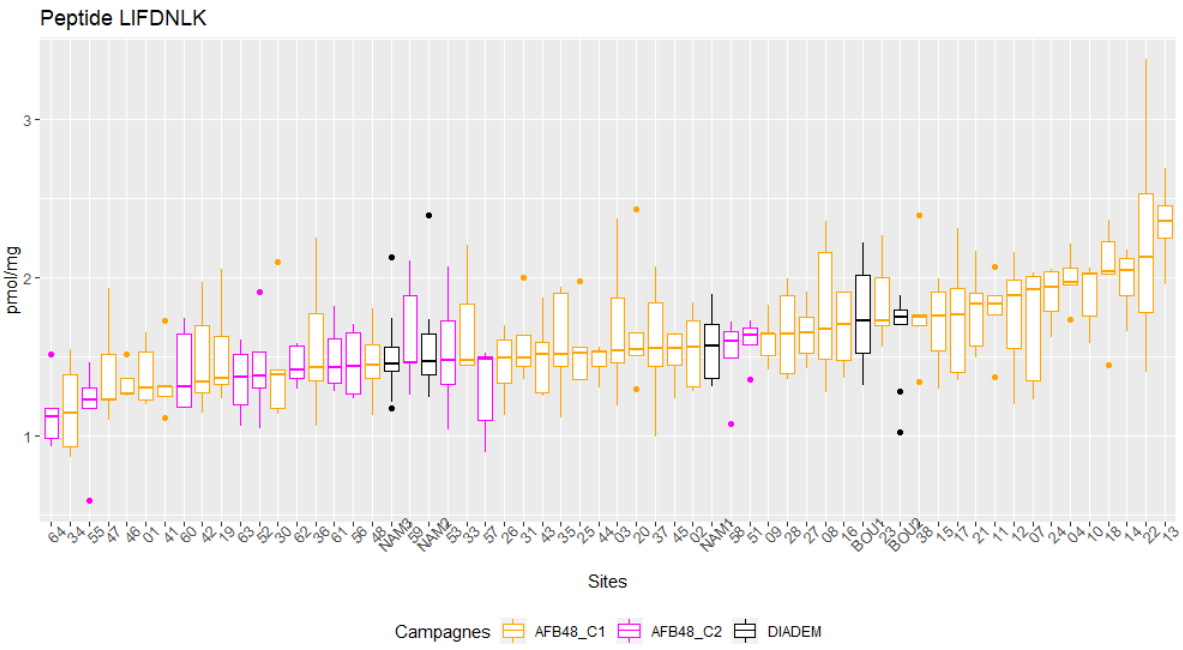


Figure n°11 : *Boxplots des quantités molaires normalisées pour le peptide LIFDNLK (relatif à une pompe ionique) lors des campagnes AFB 1 en jaune, 2 en rose et DIADEM en noir*

Aucun effet majeur de la campagne sur le niveau moyen quantifié pour un peptide donné ne semble se dégager. La campagens d'encagement (qui sous-entend une influence du lot de gammares utilisé, d'effet saisonnier, des procédures de déploiement, de conservation des échantillons,…) n'a donc pas d'impact sur l'analyse des résultats.

Nous avons également évalué l'effet série d'analyses, une série correspondant à une date (jour) d'utilisation du spectromètre de masse. Cela permet de vérifier qu'il n'y a pas de biais apporté par la préparation d'échantillons (répétabilité) et/ou de dérive de l'équipement analytique au cours du temps. Etant donné que l'ordre de passage des échantillons a été randomisé pour éviter des biais sur l'effet site, les données sont cette fois-ci représentées individuellement (un point = un échantillon = un individu). Les 28 séries d'analyses sont représentées par une couleur différente. L'exemple du peptide ADPALGQAIQER (relatif à une activité catalase) est présenté sur la figure n°12.

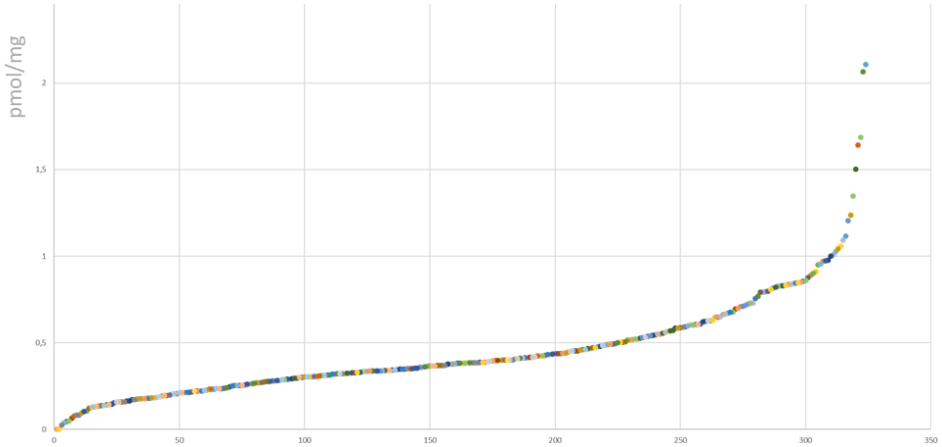


Figure n°12 : *Distribution individuelle des échantillons AFB et DIADEM classés par couleur selon les 28 séries pour le peptide ADPALGQAIQER (relatif à une activité catalase).*

Là encore en première analyse, nous pouvons observer que les échantillons de chaque série semblent répartis de manière aléatoire. Nous en avons conclu que le protocole automatisé de préparation des échantillons et les procédures d'analyse chromatographique et de spectrométrie de masse ont permis de garantir une mesure répétable et donc comparable de ces biomarqueurs entre séries d'analyse.

- Vers des niveaux de référence : notion d'induction-inhibition et de variabilité individuelle

La distribution des mesures individuelles pour chaque peptide biomarqueur a pu être représentée sur des graphiques montrant la quantification en pmol/mg de gammare par ordre croissant (e.g., figure 12 pour la catalase), ou alors en les regroupant par site d'exposition (e.g., figure 11 pour une pompe ionique). Ces deux types de représentation permettent d'appréhender la possibilité de définir des niveaux de référence et ainsi mettre en avant les notions d'induction et d'inhibition.

En effet, de façon très similaire à nos précédents travaux réalisés à l'échelle nationale sur les niveaux d'accumulation en différentes substances métalliques et organiques par des gammares encagés (Geffard *et al* 2014, Recoura-Massaquant *et al* 2014), on voit le plus souvent se dessiner un profil de distribution des concentrations peptidiques (figure 12) où se discriminent deux groupes de données : un premier groupe majoritaire distribué de façon gaussienne et un ensemble minoritaire de valeurs hautes qui se détachent de ce groupe gaussien: sur l'exemple de la catalase (figure 12), on pourrait définir ainsi un niveau de référence de l'ordre de 0,4 pmol/mg et un niveau seuil d'induction de l'ordre de 0,75 pmol/mg.

Un cas particulier est celui des peptides liés aux protéines de la vitellogénèse, souvent proposées comme biomarqueur de perturbation endocrinienne. Chez les mâles ils ne sont ici généralement pas détectés (inférieurs à la LOD). Mais ces peptides ont été détectés de manière ponctuelle chez certains individus mâles. Par exemple, pour le peptide ELTSAAEVVSSLLK, lié à une protéine vitellogénine, 17 individus sur les 325 testés expriment ce peptide (figure n°13). Le niveau de base serait ici de 0 et toute quantification pourrait être interprétée comme un niveau anormal chez l'individu considéré.

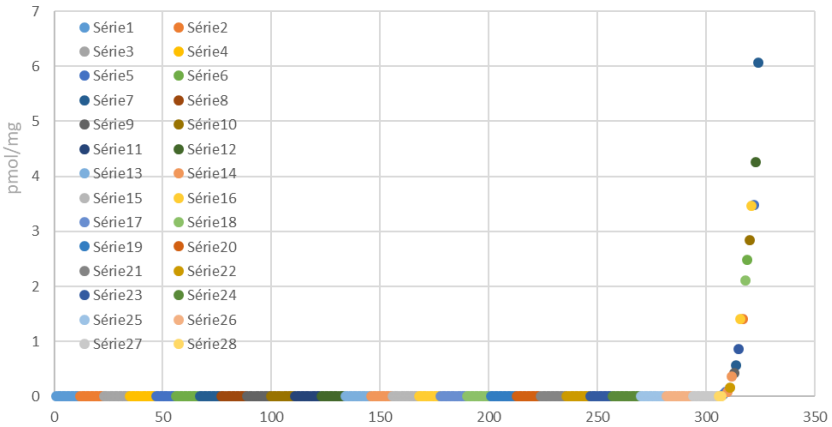


Figure n°13 : *Distribution individuelle pour le peptide* ELTSAAEVVSSLLK (*relatif à une protéine vitellogénine-like)*

Si l'on regarde maintenant pour ce même peptide la distribution regroupée par site d'exposition (figure n°14), on peut voir que l'induction de ce peptide n'est pas systématique

pour tous les individus exposés sur un même site, par contre elle est tout de même présente chez 2 individus sur 5 pour les sites 4 et 26 de la campagne 1. En cohérence avec nos précédents travaux sur l'expression de la vitellogénine chez le crustacé comme biomarqueur de perturbation endocrinienne chez le mâle (Jubeaux et al 2012, Gouveia et al 2017b), il apparaît que la variabilité inter-individu est forte dans ce type de réponse à la contamination. Cet exemple caricatural d'une réponse qualitative souligne clairement la nécessité d'optimiser le nombre d'individus analysés par site dans le cas de biomarqueurs dont la modulation est marquée par une forte variabilité inter-individuelle de la réponse à l'exposition, ainsi que définir des stratégies d'interprétation non basées simplement sur le niveau moyen du biomarqueur mesuré sur plusieurs réplicas mais également sur la dispersion des mesures (eg, Coulaud et al 2011).

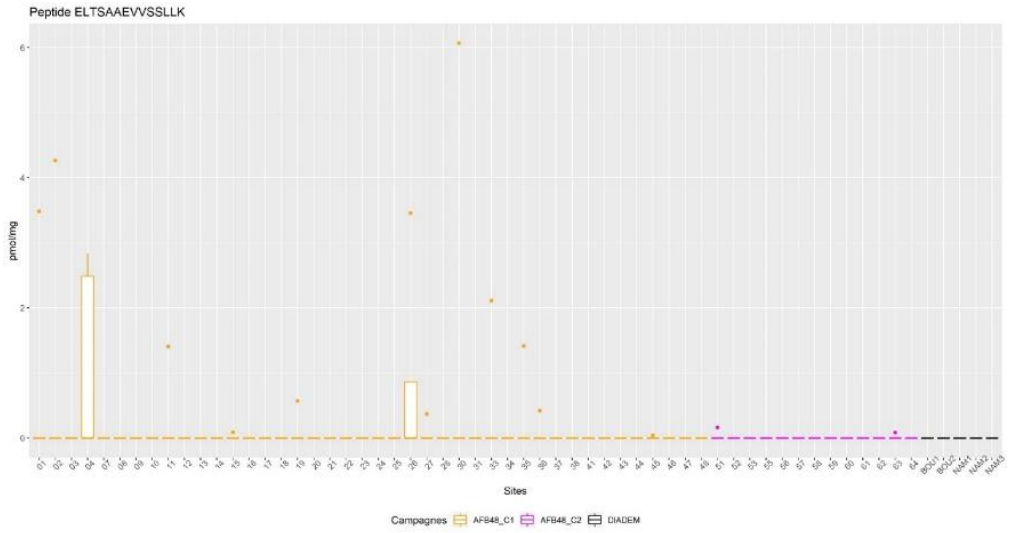


Figure n°14 : *Regroupement par site d'exposition des quantités molaires normalisées pour le peptide* ELTSAAEVVSSLLK (*relatif à une protéine vitellogénine-like) lors des campagnes AFB 1 en jaune, 2 en rose (5 individus par site) et DIADEM en noir (10 individus par site).*

Enfin pour certains peptides liés à différentes grandes fonctions de la physiologie de ces organismes (e.g., osmorégulation, mue, …) et quantifiés systématiquement chez les individus, la gamme de valeurs référence (distribution gaussienne) peut également être encadrée par des valeurs basses correspondant à des inhibitions traduisant également une perturbation possible de l'état de santé des organismes exposés.

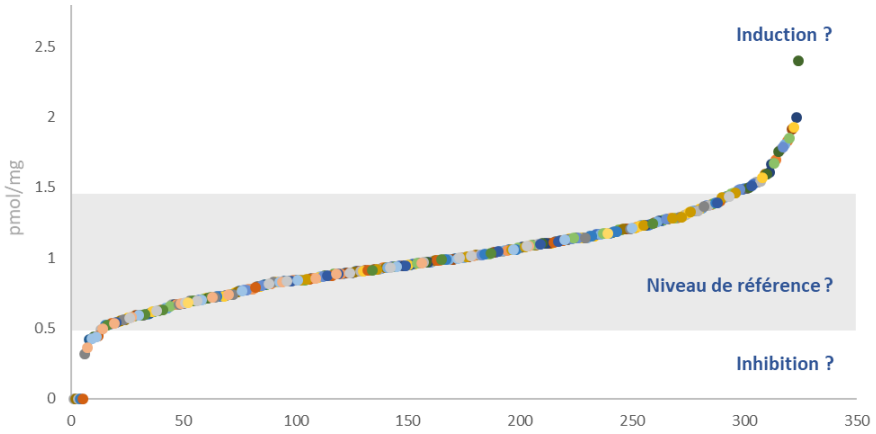


Figure n°15 : *Distribution des concentrations individuelle pour le peptide GIDFGTTQSVR (relatif à une prophenoloxidase)*

4. Perspectives

En conclusion, une méthode analytique par protéomique ciblée a été développée, optimisée, validée pour le dosage multiplexé de concentrations de peptides rapporteurs de différentes fonctions biologiques chez le gammare. Elle permet une acquisition massive de données multi-marqueurs (mesures de 38 biomarqueurs sur 325 échantillons individuels de gammares mâles en 2 mois), correspondant à des concentrations protéiques quantifiées de manière directe. Le recours à un automate a permis d'optimiser la préparation d'échantillons pour la digestion trypsique et la purification des peptides par SPE. La validation du protocole de préparation d'échantillons couplé à l'analyse par HPLC-MS/MS a été menée avec succès. Les premières conclusions sont l'absence d'effet campagne et d'effet série, qui s'explique à la fois par l'automatisation de la préparation des échantillons, la robustesse de l'analyse par HPLC-MS/MS, en combinaison avec le choix de travailler sur des organismes calibrés issus d'une même population source, conditionnés et exposés selon des protocoles fixés. Ceci aboutit à la possibilité de définir des niveaux de référence et des seuils d'induction ou d'inhibition des différents biomarqueurs protéiques. Les poursuites de ce travail seront donc de définir ces niveaux de référence et seuils pour chacun des marqueurs, et proposer un indicateur intégré multi-marqueur tenant compte de la déviation de chacun de ces biomarqueurs par rapport à sa gamme de référence. Le jeu des données acquis (notamment au regard de la variabilité inter-individuelle et inter-site constatées) va permettre d'évaluer le nombre de mesures individuelles nécessaires pour caractériser de façon suffisamment robuste ce niveau de déviation par rapport à un état de référence. Enfin, au cours de ces mêmes analyses, les données sur 220 peptides légers non quantifiés ont été acquises (simultanément au 38 peptides quantifiés par l'utilisation d'un standard). Ces données semi-quantitative vont être également inspectées pour identifier si certains peptides pourraient être d'intérêt et ajoutés à la liste des 38 quantifications réalisées dans le but d'améliorer la qualification des effets de l'exposition. L'acquisition de données sera poursuivie sur de nouveaux sites d'étude. Par ailleurs, la faisabilité de la démarche chez d'autres espèces sera interrogée dans un deuxième axe d'étude en concertation avec différents laboratoires nationaux, en visant une harmonisation des approches développées sur les différentes espèces aujourd'hui proposée dans le cadre de la biosurveillance active des milieux.

5. Références

Armengaud *et al*., (2014). Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. J. Proteo, 105 (2014): 5-18.

Beliaeff & Burgeot (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. Environ Toxicol Chem 21: 1316-1322.

Bervoets *et al.* (2005). Use of transplanted Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. Environ Sci Technol 39: 1492-505.

Bocchetti *et al.* (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. Mar Environ Res 66: 24-26.

Borja *et al.* (2008). Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. Mar. Pollut. Bull. 56: 1519-1537.

Charnot *et al.* (2017). Multiplexed assay for protein quantitation in the invertebrate *Gammarus fossarum* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 409: 3969-3991.

Chaumot *et al.* (2020). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum*: Part 1 - gauging the confounding influence of non-toxic environmental factors. Environ Tox Chem. *In press.*

Coulaud *et al.* (2011). *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. Water Res 45: 6417-6429.

Farkas *et al.* (2017). Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. Sci Tot Environ 599-600: 760-770.

Geffard *et al.* (2019). Lien entre la toxicité, la contamination des milieux aquatiques mesurés chez Gammarus fossarum et la perturbation des communautés biologiques - Proposition de valeurs seuils au niveau national pour la mesure de marqueurs de toxicité chez Gammarus fossarum. *Rapport AFB – programme 2016-2018*.

Geffard *et al.* (2014). Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales Rapport de synthèse de l'étude pilote - Déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés. *Rapport Onema – programme 2013-2015.*

Gouveia D, *et al* (2017a) Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species Gammarus fossarum: A physiological and ecotoxicological study. *Aquatic Toxicology, 190*(Supplement C):199-209.

Gouveia *et al.* (2017b). Ecotoxico-proteomics for aquatic environmental monitoring: first *in situ* application of a new proteomics-based multibiomarker assay using caged amphipods. Environ Sci Technol 51: 13417-13426.

Jubeaux G, *et al* (2012) Vitellogenin-like protein measurement in caged Gammarus fossarum males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: Inconclusive experience. *Aquatic Toxicology, 122–123*(0):9-18.

Lopes *et al.* (2020). *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum*: Part 2 - evaluating the relevance of using a molt cycle temperature-dependent model as reference to assess toxicity in freshwater monitoring. Environ Tox Chem. *In press.*

Menéndez-Helman *et al.* (2015). Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotox Environ Saf, 111: 236-241.

Recoura-Massaquant, R, *et al.* (2015) Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales Rapport de synthèse de l'étude pilote - Déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les substances organiques ciblées. *Rapport Onema – programme 2013-2015*

Simon R *et al.* (2010) Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (Gammarus fossarum). *Journal of Chromatography A, 1217*(31):5109-5115.

Trapp *et al.* (2014a). Next-generation proteomics: Toward customized biomarkers for environmental biomonitoring. Environ Sci Technol 48: 13560-13572

Trapp J, *et al* (2014b) Proteogenomics of Gammarus fossarum to Document the Reproductive System of Amphipods. *Molecular & Cellular Proteomics, 13*(12):3612-3625.

6. Annexes

6.1. Annexe n°1

Tableau des pourcentages de récupération relatif pour chacun des 265 peptides légers de la méthode :

< 80%	perte	59 peptides	22%	
> 120%	gain	32 peptides	12%	78%
80<%<120	identique	174 peptides	66%	

Name	% recup relatif (automate/manuel)
AAAILIGALR	115
AADLGLDSTNNR	77
AAFSPDAPWR	100
AAIETAFVNHLK	95
AALNAQFEIDASAAK	120
ADGISLVR	68
ADPALGQAIQER	118
ADVVESWIAEK	121
AEGQINLGPK	99
AEIGIAMGSGTAVAK	62
AFNMYVLDPIFK	123
AFWGSLPLR	81
AGVLGQLEEIR	71
AILNIASSGK	106
ALIALSNLR	116
ALSTIAALCNR	118
APAISNTQWEVVR	128
APILEGYFSK	77
ASHSDILASIAK	102
ATGIQTLSGTGGLR	98
ATQPSYTVAQLELPGVNITR	83
AVAEIVQDYDSDGFFPALGFGGK	81
AVIDSGEGLIR	100
AVLVDLEPGTMDSIR	113
AYEWQNTSGK	107
CEVQVPGLK	96
DGLAFCALIHR	140
DGQVTVEEFK	52
DGSSVSTIDPK	111
DGYQSLIQR	139
DIATEDKLEYR	102
DIDAAFLVGAMPR	211
DLLHAVTECR	157
DLTHLAQFYK	76
DNLDQLSNIAAR	83
DNTLQAELK	76
DQCQNLFSR	118
DVDEQMINIQSK	111
DVNAAIAAIK	91
DVNAAIATIK	93
DVVATDDPAVAFK	97
DYISTDPTER	94
EAFDTVGR	103
EAGAGALAISVEGPSK	144
EAGEGVTIDFK	80
EALPELIGSIK	92
EELFITSK	97
EFTPWVEEAEGK	94
EFWIATDHNEVR	99
EGDPILLDVK	99
EGLLLWCQR	102
EGYNSLLNTDVK	60

GFMGECGLR	93
GIDFGTTQSVR	87
GIDIIGDAFEADR	81
GLCLPTDACPR	136
GLWVKPFEK	99
GMMEIVESGR	114
GMWLLLNK	88
GNLANVIR	98
GQIQYWNSEK	97
GSIDAVINNSFR	84
GSTDNLMDDIER	81
GSWEILSSSVSR	86
GTDVTFTVPFK	71
GTLAVIPVQNR	97
GTVPDSEFTSLK	63
GVVINIGDR	96
GWEITMAVPVAR	85
HAEFSVNPPLDSTQA	79
HGLIPNLLDGGPK	134
HIEIFSPITK	73
HTDAIPDPK	101
IAMGAFDR	85
IATVVIR	76
IEDYVLPR	130
IFNVLQPIAESK	82
IFVVTGSNK	99
IGFALAEGLK	111
IGGELGGPR	79
IINEGAALLR	87
IIQDNLSSLCR	91
IISIVNK	51
IIYPAEALTIVIEK	127
ILACDNLDDAAK	100
ILEDFVDVFNR	88
ILEEFVK	103
ILGPLYDVK	42
ILTTMWADFAR	124
IMFEVQDLR	62
INICGLTTK	89
INVYYSEGCTGK	115
IQVDPAK	93
ISPLINSPSDLPK	119
IVDGMDVVR	82
IVSTILGDAALR	94
IVSTVLNDPK	100
IYGNFFPYGDASK	93
IYIDANSNPER	105
LADNIAGHVINTQEFIF	108
LDFLPSDSER	61
LEEGESAFFEAR	66
LELTFPGSK	56
LEPVGDPTMK	88
LETNFNTLQTK	79

EGYNSLLNTDVK	60
EITSLAPGTIK	99
EIWGVEPSWEK	93
ELEELSER	82
ELFDFADAHR	86
ELISNASDALDK	68
ELTSAAEVVSSLLK	98
ENIEAIIK	98
EQGFLAFWR	83
EVDEQMLSVQNK	76
EVNGDASEAALLK	94
EYEPEMGK	83
FAIQDISVEEMTAK	84
FALSVIK	82
FAMIDAR	130
FGFYEVFK	75
FGTPEELK	87
FLALDLGGTNFR	107
FLDIAQPDNIR	99
FLLSNLR	73
FSESSAILR	101
FVGLISLIDPPR	119
FVPSNIIDR	106
FYGLSSK	177
GAALVAAVANR	96
GAFTGETSTGMIK	100
GAPSTPLVSVATTR	123
GDFVIVVR	88

LETNFNTLQTK	79
LFAYADTHR	118
LFEVGGPPSCTK	101
LFINNEWR	95
LGAIVAVTGDGVNDS	79
LGFLTFCPTNLGTTIR	111
LGIYTWLFEK	84
LGMMEIIK	74
LGSNFLQIPVNCPYR	111
LIAILSTTLR	89
LIFDNLK	63
LIGQIVSSITASLR	98
LIINSLYR	95
LIIVEGCQR	99
LKPLVTDSGFVR	118
LLATCISSATR	108
LLEFEITGSTYEPIGD\	86
LLYNNVSNFAR	104
LPIDIFEGLTR	82
LPTVAAIIYR	108
LQTNPDTGLSTAEAR	92
LSANIVSGLVSQR	111
LSAWLAACK	114
LSLEEFIEGAK	83
LSNFEAQLVK	132
LTDVTIQDAGK	75
LTESSAILR	122
LTIVESER	123

LTVVVESQGR	90
LVEGCLVAGR	97
LVGNVAAQLR	81
LVLGIPFYGR	135
LVLGTATYGR	89
LVSGVEQIEK	94
LVSLEMGK	99
LVWDDFPNVGLIK	110
LWDLAAGK	82
LWNTLAQCK	87
LYIFDLK	84
MGLTEYQAVK	119
MIFAGIK	28
MIWYDPR	107
MMIPADLR	83
MQYPDFK	93
MVLGEDSVAVK	93
MVVFIGGK	115
NEFWSALLEK	82
NFPDMILSASR	65
NGEQIEEPDDWLR	88
NIQVEADYFR	123
NLPADQAAALASSDPDYAIR	88
NNVVNTMR	102
NSAAYFR	140
NVFGESDQLISEK	111
NVNVQNFHTSFK	115
QDLVDYIR	91
QGDEYILNGQK	95
QGTDNEYMTAIR	61
QIADVIEAK	86
QIDNPDYK	82
QLIMVVR	101
QLYSDILSR	79
QMSLLLR	78
QPMFYAMGHFSK	92
QTPVFTTSLK	117
QVFLGGVDK	53
SAASLLLR	100
SAMNVALIAFK	74
SDLETITK	105
SFILSDLTNLQQSQAPYK	92
SGQDGVPILK	62
SLVNLGDVQEGK	96
SQVTLLVR	110
SSIQTEYVVIK	93

QMSLLLR	78
QPMFYAMGHFSK	92
QTPVFTTSLK	117
QVFLGGVDK	53
SAASLLLR	100
SAMNVALIAFK	74
SDLETITK	105
SFILSDLTNLQQSQAPYK	92
SGQDGVPILK	62
SLVNLGDVQEGK	96
SQVTLLVR	110
SSIQTEYVVIK	93
SVNLDDCQDR	69
SVQDIANAWK	90
SYADFPAAFK	78
TCISQALSK	104
TDVGQAYCCESGLEEPGLVGTKP	137
TEGIPGFGFLDK	70
TEWLGDVK	104
TFISSTFK	77
TGQILWIR	69
TIDVNGDGLVGIDEYR	88
TIIAALTAR	78
TLGALELDVFSEAGK	46
TLYGPFECAVTMK	102
TMPIFGLGTWK	95
TSEVFLPLTNELYQQTK	90
TSFDAFPEK	112
TSWLDGK	112
TTNTLVVR	50
VAIEPGVPCR	82
VALITGGGSGIGR	93
VALIVVQR	109
VAMDCTEVDNGYK	78
VANILGQDEVTAR	48
VCDDELILIR	96
VDNSSLTGESEPQSR	69
VEAQGTGNLPTK	65
VECIAGFILPLEFK	140
VFDCSLDQK	237
VFELAER	58
VFFDVSIGGQPAGR	103
VGEGVATVTLR	99
VGINYQPPTVVPGGDLAK	84
VGTYTEFR	106
VIGDQEVFENDSAR	123

SVNLDDCQDR	69		VIMVTGDHPITAK	134
SVQDIANAWK	90		VINSFLAFR	103
SYADFPAAFK	78		VIYAPTGPLDR	66
TCISQALSK	104		VLAVDILAK	108
TDVGQAYCCESGLEEPGLVC	137		VLSQDVQYTYK	113
TEGIPGFGFLDK	70		VLTLQGPFFK	99
TEWLGDVK	104		VLYPNDNFFEGK	94
TFISSTFK	77		VPAILESFPGR	78
TGQILWIR	69		VQLDWPSTMNVK	100
TIDVNGDGLVGIDEYR	88		VTWTFEGR	13
TIIAALTAR	78		VVPSLSAEDTLSQR	80
TLGALELDVFSEAGK	46		VWSLTNCK	95
TLYGPFECAVTMK	102		VYIEVADR	139
TMPIFGLGTWK	95		VYTVVPGILTELGK	92
TSEVFLPLTNELYQQTK	90		WLGANTFR	120
TSFDAFPEK	112		WNCIEVDK	336
TSWLDGK	112		WSIVQGLPIDDFSK	112
TTNTLVVR	50		YEYGIFAQK	75
VAIEPGVPCR	82		YFPTQALNFAFK	100
VALITGGGSGIGR	93		YLLYTLK	102
VALIVVQR	109		YNPFDMTK	76
VAMDCTEVDNGYK	78		YPDHQPMGFPLDR	208
NLPADQAAALASSDPDYAIR	88		YQDLYAQFISNPDEK	62
NNVVNTMR	102		YSTWSGGLGAR	134
NSAAYFR	140		YTGSEVSVR	107
NVFGESDQLISEK	111		YTLTLENELGR	68
NVNVQNFHTSFK	115			
QDLVDYIR	91		**Moyenne**	**97**
QGDEYILNGQK	95			
QGTDNEYMTAIR	61			
QIADVIEAK	86			
QIDNPDYK	82			
QLIMVVR	101			
QLYSDILSR	79			

6.2. Annexe n°2

Tableau représentant la quantification du peptide ADPALGQAIQER en fonction de l'échantillon AFB :

			ADPALGQAIQER (MM=1268,6593 g/mol)		
Name	Masse gammare (mg)	Data File	Quantité en ng	Quantité en pmol	Quantité en pmol/mg de gammare
01-01 S91	17,20	2019_07_09_AFB48_10.d	8,700	6,857	0,399
01-01 S92	21,61	2019_08_13_AFB48_05.d	2,103	1,657	0,077
01-01 S93	24,05	2019_07_25_AFB48_12.d	14,386	11,340	0,471
01-01 S94	19,38	2019_07_12_AFB48_10.d	13,210	10,412	0,537
01-01 S95	19,53	2019_08_14_AFB48_15.d	9,960	7,851	0,402
01-02 S91	23,94	2019_08_07_AFB48_06.d	10,286	8,108	0,339
01-02 S92	19,60	2019_07_10_AFB48_09.d	20,544	16,194	0,826
01-02 S93	18,52	2019_07_24_AFB48_07.d	7,995	6,302	0,340
01-02 S94	17,97	2019_08_21_AFB48_11.d	8,040	6,338	0,353
01-02 S95	17,37	2019_07_30_AFB48_09.d	33,093	26,085	1,502
01-03 S91	21,13	2019_08_01_AFB48_11.d	11,774	9,281	0,439
01-03 S92	18,39	2019_07_10_AFB48_11.d	8,796	6,933	0,377
01-03 S93	21,62	2019_08_08_AFB48_10.d	36,948	29,123	1,347
01-03 S94	18,11	2019_08_06_AFB48_06.d	0,000	0,000	0,000
01-03 S95	22,04	2019_07_24_AFB48_14.d	9,432	7,435	0,337
01-04 S91	16,17	2019_08_07_AFB48_15.d	7,184	5,663	0,350
01-04 S92	28,45	2019_07_11_AFB48_12.d	20,472	16,137	0,567
01-04 S93	17,20	2019_07_16_AFB48_15.d	19,633	15,476	0,900
01-04 S94	18,96	2019_07_25_AFB48_05.d	12,145	9,573	0,505
01-04 S95	16,03	2019_08_20_AFB48_09.d	3,719	2,931	0,183
01-07 S91	23,73	2019_07_17_AFB48_10.d	10,508	8,283	0,349
01-07 S92	21,87	2019_08_01_AFB48_13.d	0,000	0,000	0,000
01-07 S93	22,27	2019_07_04_AFB48_11.d	31,516	24,842	1,115
01-07 S94	18,93	2019_08_14_AFB48_06.d	9,277	7,313	0,386
01-07 S95	22,63	2019_07_18_AFB48_13.d	11,451	9,026	0,399
01-08 S91	30,90	2019_07_25_AFB48_13.d	9,913	7,814	0,253
01-08 S92	21,55	2019_08_06_AFB48_15.d	28,925	22,799	1,058
01-08 S93	26,80	2019_08_14_AFB48_05.d	0,843	0,664	0,025
01-08 S94	21,50	2019_07_16_AFB48_13.d	17,132	13,504	0,628
01-08 S95	20,70	2019_07_31_AFB48_07.d	12,814	10,101	0,488
01-09 S91	23,90	2019_08_07_AFB48_07.d	21,919	17,277	0,723
01-09 S92	18,75	2019_07_10_AFB48_15.d	12,400	9,774	0,521
01-09 S93	22,26	2019_08_02_AFB48_06.d	15,527	12,239	0,550
01-09 S94	25,67	2019_08_13_AFB48_14.d	7,577	5,973	0,233
01-09 S95	23,87	2019_08_08_AFB48_15.d	26,089	20,564	0,861
01-10 S91	21,99	2019_07_09_AFB48_06.d	11,348	8,945	0,407
01-10 S92	22,02	2019_07_17_AFB48_11.d	4,574	3,606	0,164

01-10 S93	19,78	2019_08_06_AFB48_09.d	20,846	16,432	0,831
01-10 S94	19,20	2019_07_24_AFB48_06.d	6,732	5,306	0,276
01-10 S95	20,50	2019_07_30_AFB48_13.d	9,937	7,833	0,382
01-11 S91	21,58	2019_07_31_AFB48_09.d	16,406	12,932	0,599
01-11 S92	18,59	2019_08_06_AFB48_11.d	9,144	7,207	0,388
01-11 S93	18,35	2019_07_18_AFB48_16.d	10,183	8,027	0,437
01-11 S94	17,12	2019_08_08_AFB48_07.d	36,608	28,855	1,685
01-11 S95	17,95	2019_07_26_AFB48_13.d	6,696	5,278	0,294
01-12 S91	19,66	2019_08_09_AFB48_15.d	6,255	4,931	0,251
01-12 S92	18,41	2019_07_30_AFB48_07.d	12,996	10,244	0,556
01-12 S93	20,64	2019_08_07_AFB48_09.d	14,146	11,150	0,540
01-12 S94	17,62	2019_07_09_AFB48_08.d	19,919	15,701	0,891
01-12 S95	16,46	2019_08_13_AFB48_10.d	8,851	6,977	0,424
01-13 S91	21,92	2019_08_21_AFB48_10.d	2,918	2,300	0,105
01-13 S92	20,28	2019_08_07_AFB48_04.d	31,015	24,447	1,205
01-13 S93	18,76	2019_07_12_AFB48_11.d	17,977	14,170	0,755
01-13 S94	21,18	2019_08_20_AFB48_14.d	12,334	9,722	0,459
01-14 S91	19,54	2019_08_09_AFB48_08.d	4,886	3,851	0,197
01-14 S92	19,80	2019_07_26_AFB48_11.d	9,464	7,460	0,377
01-14 S93	17,21	2019_08_20_AFB48_08.d	5,857	4,617	0,268
01-14 S94	18,05	2019_07_10_AFB48_07.d	15,213	11,991	0,664
01-14 S95	18,40	2019_07_17_AFB48_05.d	8,626	6,799	0,370
01-15 S91	20,63	2019_08_01_AFB48_09.d	18,338	14,455	0,701
01-15 S92	20,81	2019_07_09_AFB48_04.d	7,413	5,843	0,281
01-15 S93	17,73	2019_08_21_AFB48_12.d	5,884	4,638	0,262
01-15 S94	16,71	2019_07_26_AFB48_07.d	20,691	16,309	0,976
01-15 S95	19,11	2019_08_09_AFB48_11.d	16,416	12,940	0,677
01-16 S91	20,43	2019_07_30_AFB48_05.d	21,313	16,800	0,822
01-16 S92	20,24	2019_08_02_AFB48_12.d	14,390	11,342	0,560
01-16 S93	18,91	2019_07_10_AFB48_14.d	9,916	7,816	0,413
01-16 S94	17,82	2019_08_08_AFB48_16.d	11,772	9,279	0,521
01-16 S95	17,78	2019_07_31_AFB48_06.d	5,711	4,501	0,253
01-17 S91	19,12	2019_08_08_AFB48_14.d	16,431	12,951	0,677
01-17 S92	22,11	2019_07_17_AFB48_13.d	6,033	4,756	0,215
01-17 S93	27,01	2019_08_13_AFB48_16.d	13,725	10,818	0,401
01-17 S94	19,77	2019_07_31_AFB48_04.d	3,238	2,553	0,129
01-17 S95	18,46	2019_08_07_AFB48_05.d	1,932	1,523	0,082
01-18 S91	14,86	2019_07_18_AFB48_07.d	8,570	6,756	0,455
01-18 S92	20,25	2019_08_09_AFB48_06.d	8,173	6,442	0,318
01-18 S93	20,63	2019_07_25_AFB48_14.d	9,680	7,630	0,370
01-18 S94	20,62	2019_08_21_AFB48_06.d	7,376	5,814	0,282
01-18 S95	15,74	2019_07_04_AFB48_09.d	42,079	33,168	2,107

01-19 S91	16,62	2019_08_20_AFB48_11.d	9,415	7,421	0,447
01-19 S92	21,76	2019_07_25_AFB48_15.d	13,917	10,970	0,504
01-19 S93	17,86	2019_07_09_AFB48_12.d	9,994	7,877	0,441
01-19 S94	19,44	2019_08_14_AFB48_16.d	14,566	11,482	0,591
01-19 S95	17,32	2019_07_17_AFB48_06.d	7,174	5,655	0,326
01-20 S91	18,74	2019_07_24_AFB48_11.d	11,708	9,229	0,492
01-20 S92	21,96	2019_08_13_AFB48_06.d	5,437	4,285	0,195
01-20 S93	22,24	2019_07_12_AFB48_08.d	7,702	6,071	0,273
01-20 S94	23,55	2019_08_01_AFB48_14.d	25,396	20,018	0,850
01-20 S95	18,10	2019_07_16_AFB48_14.d	7,127	5,618	0,310
01-21 S91	28,33	2019_07_26_AFB48_15.d	5,206	4,104	0,145
01-21 S92	20,67	2019_07_12_AFB48_14.d	9,705	7,650	0,370
01-21 S93	25,89	2019_08_09_AFB48_13.d	14,213	11,203	0,433
01-21 S94	24,40	2019_07_11_AFB48_17.d	9,383	7,396	0,303
01-21 S95	20,66	2019_08_06_AFB48_07.d	16,483	12,992	0,629
01-22 S91	21,10	2019_07_09_AFB48_05.d	7,246	5,711	0,271
01-22 S92	19,09	2019_08_07_AFB48_08.d	8,684	6,845	0,359
01-22 S93	19,34	2019_07_18_AFB48_11.d	1,552	1,223	0,063
01-22 S94	18,81	2019_08_01_AFB48_07.d	9,450	7,448	0,396
01-22 S95	13,68	2019_08_13_AFB48_13.d	2,759	2,175	0,159
01-23 S91	20,38	2019_08_21_AFB48_13.d	8,854	6,979	0,342
01-23 S92	21,42	2019_07_26_AFB48_08.d	9,436	7,438	0,347
01-23 S93	18,89	2019_08_20_AFB48_06.d	2,314	1,824	0,097
01-23 S94	23,05	2019_08_02_AFB48_07.d	3,734	2,943	0,128
01-23 S95	17,53	2019_07_25_AFB48_11.d	2,745	2,164	0,123
01-24 S91	19,87	2019_07_16_AFB48_12.d	10,086	7,950	0,400
01-24 S92	23,65	2019_07_31_AFB48_11.d	1,155	0,911	0,039
01-24 S93	19,88	2019_08_09_AFB48_07.d	5,376	4,238	0,213
01-24 S94	22,20	2019_08_20_AFB48_16.d	4,968	3,916	0,176
01-24 S95	19,12	2019_08_13_AFB48_08.d	3,302	2,603	0,136
01-25 S91	22,80	2019_08_06_AFB48_12.d	24,519	19,326	0,848
01-25 S92	23,90	2019_07_18_AFB48_09.d	12,617	9,945	0,416
01-25 S93	24,40	2019_08_01_AFB48_12.d	16,056	12,656	0,519
01-25 S94	25,02	2019_08_14_AFB48_07.d	12,237	9,646	0,386
01-25 S95	21,95	2019_07_11_AFB48_18.d	9,484	7,476	0,341
01-26 S91	25,85	2019_07_16_AFB48_04.d	16,928	13,343	0,516
01-26 S92	24,08	2019_07_26_AFB48_10.d	17,831	14,055	0,584
01-26 S93	20,32	2019_08_21_AFB48_04.d	11,217	8,841	0,435
01-26 S94	19,30	2019_07_31_AFB48_05.d	17,566	13,846	0,717
01-26 S95	26,00	2019_08_06_AFB48_16.d	16,578	13,068	0,503
01-27 S91	18,27	2019_08_01_AFB48_04.d	4,128	3,254	0,178
01-27 S92	22,06	2019_07_11_AFB48_20.d	7,336	5,782	0,262

01-27 S93	21,74	2019_07_04_AFB48_08.d	21,942	17,295	0,796
01-27 S94	16,96	2019_07_12_AFB48_12.d	18,406	14,508	0,855
01-27 S95	19,52	2019_07_25_AFB48_04.d	16,076	12,672	0,649
01-28 S91	19,26	2019_07_12_AFB48_15.d	14,811	11,675	0,606
01-28 S92	16,60	2019_07_24_AFB48_16.d	13,146	10,362	0,624
01-28 S93	19,01	2019_08_14_AFB48_13.d	7,762	6,118	0,322
01-28 S94	19,54	2019_07_30_AFB48_14.d	11,553	9,106	0,466
01-28 S95	17,12	2019_08_02_AFB48_14.d	4,422	3,485	0,204
01-30 S91	19,91	2019_08_14_AFB48_09.d	4,403	3,471	0,174
01-30 S92	17,35	2019_07_17_AFB48_15.d	10,001	7,883	0,454
01-30 S93	18,54	2019_08_20_AFB48_05.d	4,534	3,574	0,193
01-30 S94	17,48	2019_07_24_AFB48_13.d	13,167	10,379	0,594
01-30 S95	18,19	2019_07_31_AFB48_13.d	23,675	18,661	1,026
01-31 S91	19,38	2019_08_01_AFB48_06.d	8,275	6,523	0,337
01-31 S92	16,38	2019_07_11_AFB48_13.d	3,847	3,032	0,185
01-31 S93	16,91	2019_08_02_AFB48_04.d	14,280	11,256	0,666
01-31 S94	17,41	2019_07_24_AFB48_09.d	17,513	13,804	0,793
01-31 S95	20,79	2019_07_26_AFB48_12.d	14,349	11,311	0,544
01-33 S91	21,84	2019_07_16_AFB48_10.d	10,105	7,965	0,365
01-33 S92	18,24	2019_08_08_AFB48_11.d	8,878	6,998	0,384
01-33 S93	22,80	2019_08_21_AFB48_14.d	4,434	3,495	0,153
01-33 S94	20,53	2019_07_04_AFB48_06.d	8,666	6,831	0,333
01-33 S95	16,34	2019_08_02_AFB48_05.d	3,809	3,002	0,184
01-34 S91	27,38	2019_07_04_AFB48_17.d	16,543	13,040	0,476
01-34 S92	20,95	2019_07_25_AFB48_08.d	11,375	8,966	0,428
01-34 S93	22,81	2019_07_16_AFB48_05.d	5,183	4,085	0,179
01-34 S95	23,82	2019_07_10_AFB48_12.d	9,826	7,745	0,325
01-35 S91	21,41	2019_08_20_AFB48_15.d	28,308	22,314	1,042
01-35 S92	19,20	2019_07_26_AFB48_06.d	5,974	4,709	0,245
01-35 S93	20,71	2019_07_09_AFB48_14.d	10,187	8,029	0,388
01-35 S94	20,39	2019_08_09_AFB48_09.d	5,764	4,543	0,223
01-35 S95	18,52	2019_07_10_AFB48_04.d	10,962	8,640	0,467
01-36 S91	22,01	2019_07_30_AFB48_16.d	9,072	7,151	0,325
01-36 S92	21,38	2019_07_24_AFB48_15.d	21,672	17,083	0,799
01-36 S93	18,78	2019_07_16_AFB48_08.d	2,532	1,996	0,106
01-36 S94	22,27	2019_08_14_AFB48_08.d	4,503	3,549	0,159
01-36 S95	22,40	2019_07_11_AFB48_11.d	25,899	20,415	0,911
01-37 S91	22,06	2019_07_17_AFB48_07.d	9,261	7,300	0,331
01-37 S92	25,25	2019_07_24_AFB48_05.d	28,065	22,122	0,876
01-37 S93	14,88	2019_07_04_AFB48_14.d	15,423	12,157	0,817
01-37 S94	17,08	2019_07_26_AFB48_14.d	3,568	2,812	0,165
01-37 S95	14,89	2019_08_21_AFB48_09.d	6,382	5,031	0,338

01-38 S91	17,24	2019_07_17_AFB48_14.d	6,601	5,203	0,302
01-38 S92	21,39	2019_08_02_AFB48_15.d	22,754	17,935	0,838
01-38 S93	20,82	2019_07_11_AFB48_15.d	13,671	10,776	0,518
01-38 S94	16,39	2019_07_30_AFB48_10.d	0,939	0,740	0,045
01-38 S95	21,38	2019_07_12_AFB48_06.d	22,893	18,045	0,844
01-41 S91	22,90	2019_07_31_AFB48_12.d	11,058	8,716	0,381
01-41 S92	19,75	2019_07_18_AFB48_12.d	8,204	6,467	0,327
01-41 S93	15,72	2019_07_10_AFB48_13.d	20,092	15,837	1,007
01-41 S94	20,99	2019_08_07_AFB48_14.d	10,284	8,106	0,386
01-41 S95	20,72	2019_07_16_AFB48_09.d	24,998	19,704	0,951
01-42 S91	18,11	2019_08_09_AFB48_10.d	5,402	4,258	0,235
01-42 S92	21,20	2019_07_11_AFB48_16.d	10,730	8,458	0,399
01-42 S93	20,13	2019_08_08_AFB48_13.d	15,438	12,169	0,604
01-42 S94	21,46	2019_07_18_AFB48_05.d	6,906	5,444	0,254
01-42 S95	22,42	2019_07_31_AFB48_14.d	9,642	7,600	0,339
01-43 S91	15,88	2019_07_09_AFB48_09.d	14,247	11,230	0,707
01-43 S92	17,18	2019_07_11_AFB48_21.d	7,281	5,739	0,334
01-43 S93	24,20	2019_08_20_AFB48_10.d	6,960	5,486	0,227
01-43 S94	25,28	2019_08_02_AFB48_13.d	20,892	16,468	0,651
01-43 S95	23,70	2019_07_10_AFB48_08.d	9,684	7,633	0,322
01-44 S91	22,79	2019_07_16_AFB48_11.d	9,753	7,688	0,337
01-44 S92	19,35	2019_08_13_AFB48_11.d	5,067	3,994	0,206
01-44 S93	18,82	2019_07_26_AFB48_09.d	9,249	7,291	0,387
01-44 S94	20,31	2019_07_04_AFB48_10.d	11,265	8,880	0,437
01-44 S95	23,05	2019_08_08_AFB48_05.d	21,313	16,799	0,729
01-45 S91	23,92	2019_08_14_AFB48_14.d	8,047	6,343	0,265
01-45 S92	25,00	2019_07_12_AFB48_04.d	8,889	7,006	0,280
01-45 S93	24,96	2019_08_06_AFB48_13.d	13,448	10,600	0,425
01-45 S94	18,35	2019_08_09_AFB48_12.d	7,306	5,759	0,314
01-45 S95	19,28	2019_07_09_AFB48_13.d	20,475	16,139	0,837
01-46 S91	20,75	2019_07_30_AFB48_11.d	21,807	17,189	0,828
01-46 S92	21,29	2019_08_01_AFB48_10.d	6,009	4,737	0,222
01-46 S93	21,88	2019_07_18_AFB48_08.d	9,787	7,714	0,353
01-46 S94	21,36	2019_08_02_AFB48_11.d	29,612	23,341	1,093
01-46 S95	22,11	2019_07_04_AFB48_16.d	8,181	6,449	0,292
01-47 S91	21,00	2019_08_07_AFB48_10.d	8,512	6,709	0,319
01-47 S92	20,48	2019_07_25_AFB48_06.d	14,149	11,153	0,545
01-47 S93	20,02	2019_07_12_AFB48_13.d	10,490	8,268	0,413
01-47 S94	20,84	2019_07_17_AFB48_08.d	4,529	3,570	0,171
01-47 S95	20,52	2019_07_11_AFB48_19.d	10,028	7,905	0,385
01-48 S91	22,92	2019_08_06_AFB48_14.d	11,132	8,774	0,383
01-48 S92	23,92	2019_07_18_AFB48_15.d	21,078	16,614	0,695

01-48 S93	22,15	2019_07_12_AFB48_09.d	13,952	10,997	0,496
01-48 S94	26,36	2019_08_08_AFB48_12.d	1,585	1,250	0,047
01-48 S95	21,33	2019_07_09_AFB48_15.d	26,250	20,691	0,970
02-01 S91	18,66	2019_07_30_AFB48_06.d	12,491	9,846	0,528
02-01 S92	23,27	2019_08_20_AFB48_13.d	36,484	28,758	1,236
02-01 S93	19,66	2019_07_09_AFB48_11.d	13,715	10,811	0,550
02-01 S94	17,15	2019_08_09_AFB48_04.d	3,907	3,079	0,180
02-01 S95	20,95	2019_07_26_AFB48_04.d	26,555	20,932	0,999
02-02 S91	22,52	2019_08_01_AFB48_05.d	12,375	9,754	0,433
02-02 S92	20,41	2019_07_11_AFB48_10.d	21,821	17,200	0,843
02-02 S93	22,68	2019_08_13_AFB48_12.d	10,080	7,946	0,350
02-02 S94	22,20	2019_07_04_AFB48_12.d	23,321	18,382	0,828
02-02 S95	20,26	2019_08_06_AFB48_10.d	20,750	16,355	0,807
02-03 S91	19,75	2019_07_24_AFB48_10.d	7,431	5,857	0,297
02-03 S92	21,30	2019_08_02_AFB48_09.d	11,105	8,753	0,411
02-03 S93	18,90	2019_07_16_AFB48_07.d	11,773	9,280	0,491
02-03 S94	26,15	2019_08_21_AFB48_05.d	20,181	15,907	0,608
02-03 S95	25,30	2019_08_13_AFB48_15.d	9,852	7,765	0,307
02-05 S91	20,51	2019_07_11_AFB48_14.d	15,694	12,370	0,603
02-05 S92	53,27	2019_08_07_AFB48_12.d	15,789	12,445	0,234
02-05 S93	18,80	2019_07_25_AFB48_07.d	5,570	4,391	0,234
02-05 S94	20,06	2019_08_14_AFB48_10.d	2,089	1,647	0,082
02-05 S95	20,89	2019_07_18_AFB48_14.d	5,890	4,643	0,222
02-06 S91	20,33	2019_08_08_AFB48_08.d	7,272	5,732	0,282
02-06 S92	19,86	2019_07_10_AFB48_05.d	19,993	15,759	0,794
02-06 S93	21,50	2019_07_18_AFB48_06.d	16,036	12,640	0,588
02-06 S94	21,15	2019_08_09_AFB48_14.d	12,374	9,753	0,461
02-06 S95	21,07	2019_07_17_AFB48_04.d	12,848	10,128	0,481
02-07 S91	22,70	2019_08_14_AFB48_12.d	10,670	8,411	0,371
02-07 S92	24,31	2019_07_31_AFB48_15.d	5,469	4,311	0,177
02-07 S93	21,39	2019_07_09_AFB48_07.d	10,231	8,064	0,377
02-07 S94	21,31	2019_08_06_AFB48_08.d	12,753	10,052	0,472
02-07 S95	17,22	2019_07_30_AFB48_12.d	12,471	9,830	0,571
02-08 S91	21,69	2019_07_25_AFB48_09.d	8,496	6,697	0,309
02-08 S92	21,15	2019_08_20_AFB48_12.d	8,122	6,402	0,303
02-08 S93	17,62	2019_08_01_AFB48_08.d	14,507	11,435	0,649
02-08 S94	20,40	2019_07_17_AFB48_12.d	7,191	5,668	0,278
02-08 S95	20,07	2019_08_07_AFB48_11.d	18,075	14,247	0,710
02-09 S91	23,56	2019_07_26_AFB48_05.d	18,552	14,623	0,621
02-09 S92	22,17	2019_08_20_AFB48_07.d	16,426	12,948	0,584
02-09 S93	20,28	2019_08_08_AFB48_09.d	10,945	8,627	0,425
02-09 S94	22,93	2019_07_10_AFB48_10.d	8,859	6,983	0,305

02-09 S95	18,90	2019_08_21_AFB48_08.d	8,414	6,632	0,351
02-10 S91	23,60	2019_07_30_AFB48_15.d	8,874	6,995	0,296
02-10 S92	22,02	2019_07_24_AFB48_12.d	6,091	4,801	0,218
02-10 S93	20,56	2019_08_14_AFB48_11.d	4,472	3,525	0,171
02-10 S94	21,89	2019_07_16_AFB48_06.d	10,164	8,012	0,366
02-10 S95	17,48	2019_08_21_AFB48_07.d	21,598	17,024	0,974
02-11 S91	18,24	2019_07_04_AFB48_07.d	7,984	6,293	0,345
02-11 S92	17,22	2019_08_13_AFB48_09.d	35,844	28,253	1,641
02-11 S93	17,30	2019_07_24_AFB48_08.d	9,610	7,575	0,438
02-11 S94	22,06	2019_08_02_AFB48_08.d	5,936	4,679	0,212
02-11 S95	20,58	2019_08_06_AFB48_05.d	8,606	6,783	0,330
02-12 S91	20,20	2019_07_04_AFB48_13.d	17,201	13,558	0,671
02-12 S92	21,07	2019_08_02_AFB48_10.d	19,504	15,374	0,730
02-12 S93	19,31	2019_07_18_AFB48_10.d	5,801	4,573	0,237
02-12 S94	18,77	2019_08_01_AFB48_15.d	11,711	9,231	0,492
02-12 S95	19,33	2019_07_31_AFB48_08.d	8,205	6,468	0,335
02-13 S91	20,44	2019_07_25_AFB48_10.d	7,152	5,637	0,276
02-13 S92	21,91	2019_08_09_AFB48_05.d	9,692	7,639	0,349
02-13 S93	14,09	2019_07_12_AFB48_07.d	4,576	3,607	0,256
02-13 S94	21,56	2019_07_30_AFB48_08.d	15,545	12,253	0,568
02-13 S95	20,53	2019_08_08_AFB48_06.d	7,515	5,924	0,289
02-14 S91	23,33	2019_07_12_AFB48_05.d	9,038	7,124	0,305
02-14 S92	19,10	2019_08_07_AFB48_13.d	12,834	10,116	0,530
02-14 S93	25,28	2019_07_17_AFB48_09.d	9,335	7,358	0,291
02-14 S94	19,77	2019_07_10_AFB48_06.d	9,018	7,108	0,360
02-14 S95	22,87	2019_07_31_AFB48_10.d	27,703	21,836	0,955

Tableau représentant la quantification du peptide ADPALGQAIQER en fonction de l'échantillon DIADEM :

			ADPALGQAIQER (MM=1268,6593 g/mol)		
Name	Masse gammare (mg)	Data File	Quantité en ng	Quantité en pmol	Quantité en pmol/mg de gammare
BOU1-1	19,20	2019_06_20_echantillons_DIADEM_13.d	5,016	3,954	0,206
BOU1-10	15,20	2019_06_19_echantillons_DIADEM_14.d	7,920	6,243	0,411
BOU1-2	21,20	2019_06_25_echantillons_DIADEM_09.d	4,259	3,357	0,158
BOU1-3	16,20	2019_06_26_echantillons_DIADEM_09.d	9,253	7,294	0,450
BOU1-4	20,60	2019_06_19_echantillons_DIADEM_12.d	3,577	2,820	0,137
BOU1-5	25,20	2019_06_25_echantillons_DIADEM_13.d	7,497	5,909	0,235
BOU1-6	16,50	2019_06_19_echantillons_DIADEM_07.d	8,064	6,356	0,385
BOU1-7	14,90	2019_06_20_echantillons_DIADEM_08.d	7,593	5,985	0,402
BOU1-8	19,70	2019_06_25_echantillons_DIADEM_10.d	8,528	6,722	0,341
BOU1-9	19,80	2019_06_26_echantillons_DIADEM_14.d	12,167	9,590	0,484

BOU2-1	22,20	2019_06_19_echantillons_DIADEM_06.d	10,204	8,043	0,362
BOU2-10	13,10	2019_06_19_echantillons_DIADEM_17.d	34,297	27,034	2,064
BOU2-2	18,60	2019_06_26_echantillons_DIADEM_15.d	9,614	7,578	0,407
BOU2-3	24,70	2019_06_25_echantillons_DIADEM_17.d	11,522	9,082	0,368
BOU2-4	23,20	2019_06_20_echantillons_DIADEM_15.d	10,093	7,956	0,343
BOU2-5	17,10	2019_06_26_echantillons_DIADEM_17.d	6,979	5,501	0,322
BOU2-6	21,90	2019_06_20_echantillons_DIADEM_12.d	7,999	6,305	0,288
BOU2-7	19,10	2019_06_25_echantillons_DIADEM_06.d	3,491	2,752	0,144
BOU2-8	19,30	2019_06_26_echantillons_DIADEM_10.d	4,580	3,610	0,187
BOU2-9	20,00	2019_06_19_echantillons_DIADEM_10.d	6,751	5,321	0,266
NAM1-1	18,70	2019_06_26_echantillons_DIADEM_06.d	9,338	7,361	0,394
NAM1-10	24,10	2019_06_19_echantillons_DIADEM_09.d	15,333	12,086	0,502
NAM1-2	20,70	2019_06_25_echantillons_DIADEM_15.d	9,631	7,592	0,367
NAM1-3	16,20	2019_06_20_echantillons_DIADEM_14.d	9,490	7,481	0,462
NAM1-4	20,80	2019_06_19_echantillons_DIADEM_15.d	20,263	15,972	0,768
NAM1-5	19,50	2019_06_26_echantillons_DIADEM_12.d	9,682	7,631	0,391
NAM1-6	19,30	2019_06_20_echantillons_DIADEM_11.d	11,113	8,759	0,454
NAM1-7	23,90	2019_06_26_echantillons_DIADEM_08.d	16,173	12,748	0,533
NAM1-8	20,80	2019_06_20_echantillons_DIADEM_07.d	3,660	2,885	0,139
NAM1-9	19,80	2019_06_25_echantillons_DIADEM_12.d	4,893	3,856	0,195
NAM2-1	25,10	2019_06_25_echantillons_DIADEM_08.d	8,088	6,375	0,254
NAM2-10	13,70	2019_06_20_echantillons_DIADEM_10.d	3,897	3,071	0,224
NAM2-2	12,90	2019_06_27_echantillons_DIADEM_06.d	3,623	2,856	0,221
NAM2-3	24,00	2019_06_20_echantillons_DIADEM_17.d	6,407	5,050	0,210
NAM2-4	16,50	2019_06_26_echantillons_DIADEM_13.d	8,762	6,907	0,419
NAM2-5	14,40	2019_06_26_echantillons_DIADEM_11.d	2,886	2,275	0,158
NAM2-6	22,20	2019_06_25_echantillons_DIADEM_14.d	3,753	2,959	0,133
NAM2-7	22,90	2019_06_20_echantillons_DIADEM_16.d	9,058	7,140	0,312
NAM2-8	19,90	2019_06_19_echantillons_DIADEM_13.d	8,106	6,390	0,321
NAM2-9	16,60	2019_06_19_echantillons_DIADEM_11.d	5,059	3,987	0,240
NAM3-1	18,30	2019_06_20_echantillons_DIADEM_09.d	7,032	5,543	0,303
NAM3-10	21,60	2019_06_26_echantillons_DIADEM_07.d	17,203	13,560	0,628
NAM3-2	17,20	2019_06_19_echantillons_DIADEM_16.d	3,114	2,455	0,143
NAM3-3	22,30	2019_06_25_echantillons_DIADEM_07.d	6,000	4,730	0,212
NAM3-4	20,20	2019_06_26_echantillons_DIADEM_16.d	10,673	8,413	0,416
NAM3-5	15,90	2019_06_25_echantillons_DIADEM_16.d	6,076	4,790	0,301
NAM3-6	24,60	2019_06_19_echantillons_DIADEM_08.d	9,790	7,717	0,314
NAM3-7	18,80	2019_06_20_echantillons_DIADEM_06.d	5,585	4,402	0,234
NAM3-8	20,40	2019_06_25_echantillons_DIADEM_11.d	15,704	12,379	0,607
NAM3-9	17,90	2019_06_27_echantillons_DIADEM_07.d	9,120	7,189	0,402