



**HAL**  
open science

# Quantification de protéines dans des matrices complexes par spectrométrie de masse : nouveaux outils et applications

Blandine Rougemont

► **To cite this version:**

Blandine Rougemont. Quantification de protéines dans des matrices complexes par spectrométrie de masse : nouveaux outils et applications. Chimie analytique. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1084 . tel-01555659

**HAL Id: tel-01555659**

**<https://theses.hal.science/tel-01555659>**

Submitted on 4 Jul 2017

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

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



Numéro d'ordre : 2016LYSE1084

Année 2016

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE – ED n° 206

**DIPLOME DE DOCTORAT**

**Spécialité Sciences Analytiques**

**Soutenue publiquement le 01 / 07 / 2016, par :**

**Blandine ROUGEMONT**

---

**QUANTIFICATION DE PROTEINES DANS DES  
MATRICES COMPLEXES PAR SPECTROMETRIE  
DE MASSE, NOUVEAUX OUTILS ET  
APPLICATIONS**

---

**Devant le jury composé de :**

M. Jérôme LEMOINE	Directeur de thèse
M. Arnaud SALVADOR	Co-encadrant de thèse
Mme Virginie BRUN	Rapporteur
M. Olivier LAPREVOTE	Rapporteur
Mme Christine CARAPITO	Examineur
Mme Catherine MANIN	Examineur
M. Jérôme RANDON	Président du Jury



*A tous ceux qui m'ont soutenue,*

« La découverte d'un nouveau problème est presque aussi utile (et souvent plus intéressante) que la résolution d'un autre »

Stephen Jay Gould



## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

### **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite tout d'abord adresser mes plus vifs remerciements à Jérôme Lemoine, pour m'avoir donnée la chance de réaliser cette thèse au sein de son équipe dans un laboratoire aux équipements de pointe, mais surtout pour m'avoir transmis son savoir et avoir su m'encourager à aller toujours plus loin. Un très grand merci également à Arnaud Salvador pour m'avoir transmis sa passion de la spectrométrie de masse, aussi bien à travers ses enseignements en master que jusqu'à la fin de ma thèse. Encore une fois merci à tous les deux, pour toutes les discussions passionnantes que nous avons pu avoir et la confiance que vous m'avez accordée.

Je remercie les membres du jury d'avoir étudié ce manuscrit ; Madame Virginie Brun et Monsieur Olivier Laprèvote pour avoir accepté d'être rapporteurs de travail de thèse, Madame Christine Carapito, Madame Catherine Manin et Monsieur Jérôme Randon, pour avoir accepté d'être présents en tant qu'examineurs.

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer, en particulier les membres de l'équipe CBB, Yves Bérard, Céline Huillet, Mathieu Trauchessec, Fabien Martial, Fabienne Barrière, Olivier Adam, Olivier Pitiot et Catherine Manin pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir. Merci également à Jean-Marie Lacroix pour m'avoir fait partager ses connaissances en microbiologie, à Sébastien Bontemps-Gallo pour l'analyse biologique des données sur *Dickeya dadantii*. Merci aussi à Florence Lagarde et Joëlle Saulnier pour leur aide à la préparation des cultures biologiques et au dosage des protéines. Enfin, merci à Yves LeBlanc et Dave Cox pour les échanges que nous avons eu afin de mener à bien le projet Scout.

Ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans la gentillesse, l'humour et le soutien de toutes les personnes qui m'ont entourée au sein de l'ISA, alors à tous ceux qui ont été là à un moment ou un autre, Merci !



Parmi ceux-ci, certains méritent une attention particulière...

En effet, s'il y en a un qui a été là au quotidien et sans qui ce travail n'aurait pas été possible, c'est bien Romain Le Chateau. Vraiment un immense merci pour ton implication dans les travaux décrits dans ce manuscrit, mais aussi pour le reste : ton super coaching au badminton (Vive les chamettes, tu seras toujours mon idole !), tes analyses footballistiques (Paris est magique !), tes tartes au citron, t'avoir vu faire le barbecue en costume, essayer de faire du skate... Tout ça comble largement tes grognements et énervements contre l'informatique.

Merci aussi à Cathy, pour tout ce que tu accomplis au laboratoire, mais aussi pour le partage de ton savoir et de tes expériences scientifiques. Merci pour ces journées moroses sauvées par ta bienveillance, ta patience et ta malice (oui oui, je le sais maintenant qu'il faut se méfier un peu de toi !).

Un grand merci également à Marion pour le temps passé sur les corrections de ce manuscrit, pour les encouragements qui font bien plaisir sur la fin et aussi pour ses incroyables chocolats à la guimauve.

Un très grand merci aussi à Sophie, pour son soutien sur la fin de la thèse, les corrections, l'aide sur les publications... la découverte du sud-ouest : des super produits et un sacré caractère !

Je souhaite remercier aussi Yacine, Ahlem, Mynel et Sophie qui, à travers leurs stages, ont tous les 4 contribué à ce travail.

Merci à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau, Aurore, Supansa et les nombreux stagiaires, avec une pensée plus particulière pour ceux qui ont survécu aux lancers réguliers de peluche, Céline et Benoît... J'ajoute une mention particulière à Leny à qui je souhaite que tout glisse pour sa dernière année de thèse. Ainsi qu'un immense merci au Jedi, pour sa bonne humeur, son amitié, mais aussi pour m'avoir fait découvrir son passe-temps favori que je suis obligée de taire ici... J'en profite pour remercier les anciens doctorants du laboratoire qui m'ont accueillie à bras ouverts, Quentin et Aurore, et plus particulièrement Romain pour m'avoir formée à ses projets.

J'ai également une pensée pour les membres d'Anaquant, merci à Jordane pour ses conseils et sa bonne humeur permanente, merci à Tanguy pour m'avoir initiée à la spectrométrie de masse et m'avoir donné l'envie de continuer dans cette voie. Et enfin un immense merci à Chloé qui a été tour à tour compagne cycliste, joggeuse, collègue, psychologue, mais surtout une excellente amie.

Merci aussi à toutes les autres personnes que j'ai eu la joie de côtoyer pendant ces 3 ans : Luke, Momo du 30, Yohann, Fabien, Françoise, Maryline, Lucille, Didier, Carole, et ceux que j'oublie certainement...

D'un point de vue plus personnel j'adresse mes plus affectueux remerciements à tous les membres de la dream-team (merci Alex d'avoir baptisé cette équipe), pour leur amitié et tous les moments passés ensemble, souvent autour de gâteaux d'ailleurs... En plus de ceux déjà cités plus haut, qui je l'espère se reconnaîtront, je pense en particulier à Alex la reine des cannelés, Manon la sportive, Jessica la suisse, Mickaël le musicien, Florian le BG, Walid, Valérian et Maxime que je mets tous les trois dans la catégorie des gourmands.

Merci évidemment à mes colocataires Florent et Maryam, pour leur soutien quotidien et leur bonne humeur qui m'a aidée à tenir jusqu'au bout.

Merci à tous mes amis, qui m'ont toujours encouragée le long de ce parcours universitaire... quoique plus pour boire l'apéro que pour travailler...

Enfin, merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents qui ont toujours eu confiance en mes choix et qui m'ont toujours soutenue, vraiment Merci !



# TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
LISTE DES FIGURES.....	16
LISTE DES TABLEAUX.....	19
LISTE DES EQUATIONS.....	20
INTRODUCTION GENERALE : Présentation des travaux de recherche.....	22
CHAPITRE 1 : Analyse protéomique par spectrométrie de masse, état de l'art.....	26
1.1. L'analyse protéomique, objectifs et mise en œuvre.....	28
1.1.1. Définitions et contexte.....	28
1.1.2. Les outils et l'apport de la spectrométrie de masse.....	30
1.2. Analyse sans <i>a priori</i> : Spectre centrée.....	36
1.2.1. Le séquençage peptidique et la recherche dans les bases de données.....	36
1.2.2. Le mode DDA : Data Dependant Analysis.....	37
1.2.3. Les stratégies de quantification principalement utilisées lors d'une analyse sans <i>a priori</i> .....	39
1.2.4. Les limites de l'approche spectre centrée.....	41
1.3. Analyse avec <i>a priori</i> : Peptide centrée.....	43
1.3.1. Principe et utilisation des modes ciblés : SRM (Selected Reaction Monitoring) et PRM (Parallel Reaction Monitoring).....	43
1.3.2. Choix de la cible protéique et peptidique.....	46
1.3.3. Les stratégies de quantification de peptides en mode ciblé.....	48
1.3.4. Apports et limites des modes ciblés.....	50
1.3.5. Le mode DIA : Data Independant Acquisition, une alternative ?.....	53
1.4. Synthèse.....	55
CHAPITRE 2 : Développement d'une méthode alternative de contrôle des lots de production du virus candidat vaccin contre la dengue.....	58
2.1. Contexte de l'étude.....	60
2.1.1. Etiologie de la dengue.....	60
2.1.2. Structure du virus de la dengue.....	62
2.1.3. Historique du candidat vaccin développé par Sanofi Pasteur.....	65
2.1.4. Les méthodes de dosage de virus, applicabilité au virus CYD ?.....	68
2.2. Méthodologie suivie pour le dosage du virus CYD candidat vaccin par spectrométrie de masse en tandem.....	70
2.3. Résultats.....	72

2.3.1.	La spectrométrie de masse en mode ciblé pour le développement d'une méthode de quantification absolue du virus CYD4, candidat vaccin contre la dengue ...	72
2.3.2.	L'impact d'un choix limité de peptides pour la quantification, illustré par le dosage de différents lots de production des virus CYD1- 4, candidats vaccins contre la dengue.....	85
2.4.	Compléments et perspectives d'amélioration .....	122
2.4.1.	Le dosage des peptides à Méthionines .....	122
2.4.2.	La problématique du conditionnement des étalons internes AQUA .....	125
2.4.3.	Recommandations pour la stratégie d'étalonnage AQUA.....	127
2.4.4.	Transfert des méthodes à l'équipe CBB .....	129
2.5.	Conclusions sur la méthode de quantification absolue des protéines des 4 virus chimères CYD candidats vaccins contre la dengue .....	131
CHAPITRE 3 : « Scout-SRM », ou comment augmenter la portabilité d'un multiplex SRM ?.		134
3.1.	La problématique du multiplexage en mode ciblé.....	136
3.1.1.	L'analyse multiplexée, objectifs et contraintes .....	136
3.1.2.	Les outils basés sur le temps de rétention des analytes et leurs limites .....	138
3.1.3.	Les stratégies développées pour améliorer la robustesse de la détection face aux variations de temps de rétention .....	140
3.2.	Présentation de l'outil « Scout-SRM » .....	143
3.2.1.	Objectifs .....	143
3.2.2.	Principe de fonctionnement.....	143
3.2.3.	Le pilotage de l'instrument.....	145
3.2.4.	Le choix des « Scouts » .....	148
3.3.	Premières données obtenues en « Scout-SRM » .....	149
3.3.1.	Matériel et méthodes.....	149
3.3.2.	Résultats .....	151
3.3.3.	Conclusions sur les données préliminaires obtenues en mode « Scout-SRM » .....	154
3.4.	Application de l'utilisation de l'outil « Scout-SRM » à la cinétique et l'analyse protéomique différentielle associée à l'infection par <i>Dickeya dadantii</i> d'un modèle végétal .....	156
3.4.1.	Contexte biologique.....	156
3.4.2.	Matériel et méthodes.....	158
3.4.3.	Présentation de l'organisation des résultats .....	164
3.4.4.	Etablissement de la liste de protéines cibles .....	165
3.4.5.	Construction de la méthode « Scout-MRM » .....	168
3.4.6.	Etude des performances de la méthode « Scout-SRM » développée .....	173
3.4.7.	Résultats de quantification différentielle des protéines de la cinétique d'infection et interprétation biologique .....	179

3.4.8.	Conclusions et perspectives sur la preuve de concept réalisée .....	192
3.5.	Discussion : apports du mode d'acquisition « Scout-SRM » et perspectives .....	194
3.5.1.	Un transfert de méthode facilité.....	194
3.5.2.	Un gain en robustesse, mais pas seulement .....	196
3.5.3.	Critères de choix des peptides « Scouts ».....	198
3.5.4.	Applications au dosage de pesticides.....	198
3.5.5.	Améliorations à apporter au logiciel.....	199
3.6.	Conclusions sur l'analyse en mode « Scout-SRM » et sur sa portabilité.....	201
CONCLUSION GENERALE.....		204
ANNEXES.....		210
1.	Oxydation des peptides contenant des résidus Méthionines sélectionnés pour la quantification du virus CYD candidat vaccin, exemple du peptide SVALPHVGMGLDTR dosant CYD3-M .....	212
2.	Choix du solvant et du contenant utilisé pour la préparation et conservation des solutions mères des étalons du projet dosage du virus CYD.....	214
3.	Matériels et méthodes, données préliminaires « Scout-SRM » (3.3.1) .....	217
4.	Paramètres de la méthode « Scout-SRM » utilisée pour l'analyse de la cinétique de croissance de <i>Dickeya dadantii</i> (3.3) .....	219
5.	Liste des 45 peptides de synthèse utilisés dans la sélection des « Scouts » (3.4.5) .....	254
6.	Autres résultats publiés.....	255
COMMUNICATIONS .....		264
I.	Publications dans des journaux à comité de relecture.....	266
II.	Posters .....	267
III.	Communications orales .....	269
BIBLIOGRAPHIE.....		270

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

AA	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Desoxy Nucléique
AF	Acide Formique
AQUA	<i>Absolute QUAntification</i>
ARN	Acide Ribo Nucléique
ARNm	Acide Ribo Nucléique messenger
CE	<i>Collision Energy</i>
CID / CAD	Dissociation induite par collision ou dissociation activée par collision
CV	Coefficient de variation
CXP	<i>Cell eXit Potential</i>
CYD	<i>Chimeric Yellow fever Dengue</i> , virus chimère dengue-fièvre jaune
CYD TDV	<i>Tetravalent Chimeric Yellow fever Dengue virus</i>
DDA	<i>Data Dependant Analysis</i>
DENV	Virus de la dengue
DENV1-4	Virus de la dengue sérotypes 1 à 4
DIA	<i>Data Independant Acquisition</i>
DP	<i>Declustering Potential</i>
DTT	Dithiotreitol
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	Source d'ionisation Electrospray ou Electronébulisation
FC	<i>Fold-Change</i>
Geq	Génome Equivalent
H <sub>2</sub> O	Eau
HCD	<i>Higher energy Collisional Dissociation</i>
HLB	<i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IAM	Iodoacétamide
InVS	Instut de Veille Sanitaire
IRT	<i>indexed Retention Time</i>
KOL	<i>Key Opinion Leaders</i>
LB	Milieu de culture Luteria-Bertani
LC-ESI-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LIT	Trappe à ions linéaire
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
M	mol/L
m/z	rapport masse sur charge
MALDI	Source d'ionisation / désorption Laser Assistée par Matrice
MeOH	Méthanol
min	minute

mL	millitre
MPT	Modifications Post Traductionnelles
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MS <sup>2</sup>	Spectre de fragmentation
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NS proteins	Protéines non structurales
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
opgG	Glycanes périplasmiques osmorégulés
PRISM	<i>High Pressure High Resolution separations coupled with Intelligent Selection and Multiplexing</i>
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PSAQ	<i>Protein Standard Absolute Quantification</i>
QCAT	<i>Quantification conCATamer</i>
qTOF	Analyseur hybride quadripôle - temps de vol
Q-Trap	Quadripole - Trappe à ions
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
s	seconde
SILAC	<i>Stable isotope labelling by Amino acids in cell culture</i>
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SISCAPA	<i>Stable Isotope Standards and Capture by Anti Peptide Antibodies</i>
sMRM / sSRM	<i>Scheduled - Multiple Reaction Monitoring</i>
SPE	Extraction sur Phase Solide
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SWATH	<i>Sequential Windows Acquisition of all THEoretic mass spectra</i>
TDV	<i>Tetravalent Dengue Virus</i>
Th	Thomson
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
TOF	Analyseur temps de vol
Tr	Temps de rétention
UA	Unité Arbitraire



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La place de l'analyse protéomique, d'après Patterson et Aebersold, 2003.....	28
Figure 2 : Principaux problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'anticorps, d'après Baker M, 2015.....	30
Figure 3 : Représentation du processus d'ionisation des composés au sein de la source électrospray.....	32
Figure 4 : Illustration des différences entre les approches "Top-down" ou "Bottom-up", d'après Gregorich et al, 2014 <sup>22</sup> .....	32
Figure 5 : Principe général de la préparation des échantillons par l'approche "Bottom-up" ...	33
Figure 6 : Nomenclature de la fragmentation peptidique, d'après Biemann, 1990 .....	36
Figure 7 : Principe de l'analyse DDA sur un Q Exactive, d'après Scheltema et al, 2014.....	38
Figure 8 : Principe de la stratégie de quantification SILAC, d'après Ong et al, 2002.....	40
Figure 9 : Résumé de la mise en œuvre d'une analyse spectre centrée.....	41
Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SRM.....	43
Figure 11 : Schéma du principe de fonctionnement du mode PRM, d'après Rauniyar <sup>58</sup> , 2015.....	44
Figure 12 : Illustration du plan de travail réalisable à partir du consortium CPTAC, d'après Ellis et al, 2013.....	46
Figure 13 : Principe de l'analyse PRISM, d'après Shi et al, 2012.....	51
Figure 14 : Principe de la MRM3, d'après Fortin et al <sup>68</sup> , 2009.....	52
Figure 15 : Principe du mode DIA par la méthode SWATH-MS, d'après Gillet et al, 2012 ....	53
Figure 16 : Photographies des espèces <i>A. aegypti</i> et <i>A. albopictus</i> responsables de la transmission de la dengue.....	60
Figure 17 : Carte des régions à risque de transmission de la dengue en 2011, d'après l'Institut de Veille Sanitaire.....	62
Figure 18 : Schéma de la structure et de la réplication du virus de la dengue, d'après Perera et Kuhn, 2008.....	63
Figure 19 : Schéma du principe de la vaccination.....	65
Figure 20 : Schéma du principe de la construction du virus chimère fièvre jaune dengue (CYD), d'après Guy et al, 2011.....	66
Figure 21 : Stratégie de développement du Dengvaxia®, d'après Guy et al, 2011 .....	67
Figure 22 : Plan de travail suivi pour le développement de la méthode de quantification ciblée des protéines des virus CYD candidats vaccin .....	70
Figure 23 : Structure de la Méthionine et de ses formes mono et doublement oxydées.....	122
Figure 24 : concentration du peptide SVALPHVGMGLETR et de sa forme oxydée au cours du temps .....	125
Figure 25 : comparaison du signal des solutions de travail d'étalons, issue de pesées différentes ou non.....	126
Figure 26 : Proposition de plan de travail pour le contrôle de la stabilité des étalons internes AQUA.....	127

Figure 27 : Résultats des dosages des protéines du virus CYD2 à partir de différents matériels et laboratoires .....	130
Figure 28 : Considérations à prendre en compte lors de l'augmentation d'un multiplex SRM, d'après une note technique Sciex, C.Hunter, 2010 <sup>115</sup> .....	137
Figure 29 : Maximisation du <i>dwell time</i> et optimisation du temps de cycle lors du fenêtrage en temps de rétention d'une méthode SRM.....	139
Figure 30 : Etapes de la normalisation des temps de rétention par la méthode iRT, d'après C.Escher et al, 2012.....	140
Figure 31 : Correction dynamique du fenêtrage de temps de rétention dans une expérience en mode PRM, d'après S.Gallien, 2014.....	142
Figure 32 : Principe de fonctionnement de l'analyse "Scout-SRM" .....	144
Figure 33 : Définition des différents types de transitions utilisables dans les méthodes "Scout-SRM" .....	145
Figure 34 : Chromatogramme SRM du mélange de 18 peptides synthétiques et définition de 6 peptides « Scouts » .....	151
Figure 35 : Détection des 18 peptides ciblés par la méthode "Scout-SRM" lors d'une augmentation de la pente du gradient chromatographique .....	153
Figure 36 : Importance de la conservation de l'ordre d'élution des composés par rapport aux « Scouts » lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM" .....	154
Figure 37 : Maladie de la pourriture molle sur un tubercule et photographie des échantillons d'endives étudiés.....	157
Figure 38 : Schéma récapitulatif de la méthodologie suivie lors du développement de la méthode "Scout-SRM" pour la quantification des protéines de <i>Dickeya dadantii</i> .....	164
Figure 39 : Résultats d'identification de protéines après analyse DDA, et sélection des protéines d'intérêt.....	165
Figure 40 : Quantification différentielle de 473 protéines de <i>Dickeya dadantii</i> identifiées dans une analyse non ciblée, entre une culture en milieu liquide et une culture exposée 48H sur endives.....	167
Figure 41 : Schéma de la méthodologie utilisée via Skyline 3.0 ®, pour la sélection des peptides et transitions rapporteurs des protéines d'intérêt.....	169
Figure 42 : Répartition chromatographique des 19 peptides "Scouts" sélectionnés.....	170
Figure 43 : Chromatogramme "Scout-SRM" de l'échantillon 48H .....	172
Figure 44 : Gamme dynamique des peptides identifiés lors de l'analyse "Scout-SRM" de la cinétique de croissance sur endives de <i>Dickeya dadantii</i> .....	174
Figure 45 : Evaluation de la répétabilité de la méthode par le calcul des CV des aires mesurées de l'ensemble de 2565 peptides identifiés (n=3) .....	175
Figure 46 : Chromatogrammes illustrant la problématique des peptides chevauchants .....	176
Figure 47 : <i>Heat map</i> représentant l'abondance de 202 protéines de <i>Dickeya dadantii</i> pendant l'infection d'une plante, mesurée par "Scout-SRM" .....	192
Figure 48 : Comparaison de la méthodologie de construction d'une méthode sMRM ou "Scout-SRM" à partir de bibliothèques obtenues lors d'une analyse DDA.....	195
Figure 49 : Etude de l'oxydation d'un peptide étalon marqué, contenant un résidu Méthionine .....	212

Figure 50 : Pourcentage restant de l'aire des peptides étalons du virus CYD2 en fonctions des solvants et contenants de préparation testés .....216

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Comparaison des approches d'analyses protéomiques par spectrométrie de masse en tandem.....	56
Tableau 2 : Synthèse des différentes techniques de quantification de virus .....	68
Tableau 3 : Critères de validation de méthodes, définitions et tests effectués pour la validation du dosage des 4 virus CYD candidats vaccins .....	71
Tableau 4 : Détails des étalons et des calculs utilisés pour la quantification d'un peptide à Méthionine, à travers l'exemple du dosage de la protéine M du virus CYD3.....	124
Tableau 5 : Différences entre le matériel utilisé à l'Université et celui utilisé à l'équipe CBB pour le dosage des virus CYD candidats vaccins .....	129
Tableau 6 : Exemple de capacités de multiplexage d'une méthode "Scout-SRM" .....	148
Tableau 7 : Liste des paramètres SRM utilisés pour l'analyse des 18 peptides de synthèse .....	150
Tableau 8 : Exemple d'une liste de transition et des paramètres à remplir pour l'utilisation d'une méthode "Scout-SRM" .....	152
Tableau 9 : Mesure des concentrations en protéines totales des échantillons après lyse des bactéries.....	159
Tableau 10 : Liste de protéines codées par des gènes de virulence de <i>Dickeya dadantii</i> , et résultat de leur recherche dans la culture 0H et la culture 48H.....	167
Tableau 11 : Récapitulatif des groupes de transitions et des Scouts sélectionnés dans la méthode "Scout-SRM".....	171
Tableau 12 : Synthèse du nombre de peptides détectés et du nombre de mesures effectuées par l'analyse en mode "Scout-SRM" de la cinétique de croissance de <i>Dickeya dadantii</i> .....	173
Tableau 13 : Résultats de l'analyse SRM des 40 peptides non détectés lors de l'analyse "Scout-SRM" .....	178
Tableau 14 : Classification par fonction biologique des 361 protéines de <i>Dickeya-dadantii</i> quantifiées par la méthode "Scout-SRM" .....	188
Tableau 15 : Méthode "Scout-MRM" développée pour l'analyse des 18 peptides de synthèse .....	218
Tableau 16 : Liste des transitions et paramètres utilisés dans la méthode "Scout-SRM" ciblant 445 protéines de <i>Dickeya dadantii</i> .....	219
Tableau 17 : Liste des 45 peptides de synthèse utilisés pour le choix des "Scouts", et mesure de leurs temps de rétention .....	254

## LISTE DES EQUATIONS

---

Équation 1 : calcul de la concentration en analyte par étalonnage externe.....	48
Équation 2 : calcul de la concentration d'un analyte par étalonnage interne .....	48
Équation 3 : Expression du <i>duty cycle</i> au sein de chaque expérience SRM lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM" .....	146
Équation 4 : Expression du <i>dwell time</i> lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM" .....	147
Équation 5 : Expression du <i>dwell time</i> lors de l'acquisition en mode "Scheduled-MRM" .....	147
Équation 6 : Equation de la droite représentant la gamme d'étalonnage de BSA, pour la mesure de la quantité de protéines totales des échantillons bactériens lysés.....	159
Équation 7 : Optimisation de l'énergie de collision réalisée à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ® .....	163
Équation 8 : Optimisation du DP réalisé à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ®.....	163
Équation 9 : calcul du Fold-change.....	163
Équation 10 : calcul de l'intensité relative des peptides étalons selon leur condition de conservation.....	214



# INTRODUCTION GENERALE : Présentation des travaux de recherche

---





La compréhension du fonctionnement d'un organisme, d'un tissu ou d'une cellule associé à des régulations biologiques fines et complexes, est un défi majeur de la biologie des systèmes. Au sein des cellules, ces régulations biologiques sont induites par les protéines qui peuvent notamment interagir sous la forme de complexes protéiques. Comprendre le rôle et la fonction des protéines dans l'organisation cellulaire afin de mettre en évidence un processus normal ou non, est tout l'enjeu de l'analyse protéomique.

L'étude à grande échelle des protéines exprimées au sein d'un organisme a été rendue possible grâce au séquençage génomique. Ainsi, les génomes de l'Homme, de quelques mammifères mais aussi de nombreux micro-organismes sont désormais entièrement séquencés et référencés dans les bases de données. L'analyse protéomique doit aussi son avancée aux développements instrumentaux de plus en plus performants, et notamment des spectromètres de masse (résolution, sensibilité, vitesse d'acquisition). Ces outils toujours plus rapides et plus sensibles, ont permis de générer un très grand nombre de données, notamment par l'identification de listes de protéines caractéristiques d'un état physiologique. Néanmoins, la mise en évidence de phénomènes physiologiques, de voies de signalisation ou de biomarqueurs d'une pathologie, ne peut se faire qu'à partir de données quantitatives, qu'elles soient relatives ou absolues.

Différentes stratégies ont été mises en place pour l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Si les objectifs sont l'identification exhaustive ou la quantification de protéines, les approches de type « bottom-up » sont privilégiées. Dans ce type d'approche, les protéines sont fragmentées en chaînes peptidiques plus courtes. Les protéines sont alors identifiées puis quantifiées *via* leurs peptides protéotypiques, définis comme expérimentalement observés et spécifiques d'une isoforme protéique donnée <sup>1</sup>. Si ces approches ont permis d'identifier plusieurs centaines de protéines dans différents organismes, ou de proposer plusieurs candidats biomarqueurs, la quantification à proprement parler des protéines reste un challenge.

L'approche de type ciblée, et plus particulièrement l'analyse en mode SRM (Selected-  
Reaction Monitoring, SRM), a été décrite en 2012 comme la méthode de l'année <sup>2</sup>. L'approche est dite ciblée puisqu'elle part d'un postulat biologique sur les protéines d'intérêt. La robustesse du mode SRM, sa sensibilité et ses capacités de multiplexage en font une possible alternative aux dosages immunologiques pour la quantification des protéines dans des matrices biologiques <sup>3</sup>. Ceci est démontré par de récentes études utilisant la SRM pour l'étude des systèmes biologiques ainsi que sur l'évaluation de candidats biomarqueurs.

Cependant, des revues soulèvent des interrogations quant à la pertinence et la validation des données récoltées, mettant en regard le nombre de protéines identifiées par spectrométrie de masse contre le nombre de biomarqueurs validés cliniquement. De plus, le manque de standardisation des données rend très difficile la comparaison et la validation des résultats entre laboratoires, ainsi que la diffusion des méthodes d'analyses.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit mon travail de thèse. En effet, je me suis focalisée sur l'élaboration de stratégies analytiques afin d'améliorer la méthodologie de quantification « ciblée » de protéines par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, je me suis particulièrement attachée à la quantification absolue de protéines en apportant une réflexion sur la méthodologie de travail à adopter lors de la quantification de protéines par la stratégie AQUA<sup>4</sup>. En effet, un soin particulier a été apporté sur le choix des peptides rapporteurs et sur l'optimisation de préparation d'échantillons (digestion enzymatique). Dans un deuxième temps, je me suis intéressée au développement d'une analyse multiplexée de plusieurs centaines de protéines d'un phytopathogène ; en particulier, comment rendre plus robuste les méthodes SRM hautement multiplexées et ainsi favoriser les transferts de méthodes intra et inter-laboratoires.

Ce travail de thèse est organisé en trois chapitres :

Le premier chapitre est une étude bibliographique des différentes stratégies employées pour la quantification de protéines par spectrométrie de masse. Outre la description des différentes stratégies couramment utilisées, cette étude bibliographique met en exergue les avantages et les inconvénients de la quantification des protéines à partir d'approches globales (non-ciblées) et ciblées.

Le deuxième chapitre est consacré au développement d'une méthode de quantification absolue des protéines des 4 virus chimères du vaccin candidat contre la dengue. Le choix très limité des peptides rapporteurs, les difficultés rencontrées au cours du développement de la méthode, ainsi que son transfert au sein d'une équipe industrielle, nous ont amené à réfléchir sur la méthodologie de travail à adopter lors d'une quantification par la stratégie AQUA. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le laboratoire Sanofi Pasteur.

Le troisième chapitre décrit le développement d'un nouvel outil de pilotage des instruments de type triple quadripôle opérant en mode SRM avec la société Sciex. Cet outil vise à pallier les limites des méthodes multiplexées actuelles qui utilisent un fenêtrage autour du temps de rétention des composés ciblés. Ce nouveau développement a permis la création d'un multiplex SRM de 445 protéines, nécessaire pour la caractérisation et la quantification du protéome du phytopathogène, *Dickeya dadantii*, au cours de l'infection d'une plante. Cette application a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Professeur J.M. Lacroix (UMR CNRS 8576). Ce travail est la première étude de l'expression du protéome de ce phytopathogène pendant l'infection d'un modèle végétal.

En annexe, des travaux publiés ont été ajoutés ; ceux-ci concernent le dosage dans le sang total d'un polyacide, l'acide phytique aux potentielles propriétés anti-cancéreuses (Rougemont *et al.*, 2016). Ce travail n'a pas été détaillé dans ce manuscrit de thèse.

# CHAPITRE 1 :

## Analyse protéomique par spectrométrie de masse, état de l'art

---



## 1.1. L'analyse protéomique, objectifs et mise en œuvre

Deux génomes identiques peuvent donner deux organismes pourtant très différents, l'exemple de la chenille et du papillon est ainsi souvent évoqué <sup>5</sup>. C'est l'expression différentielle des gènes en protéines qui permet à cet organisme d'adapter ses fonctions biologiques à ses besoins. Cet exemple illustre bien à quel point l'étude des protéines, appelée protéomique, est essentielle pour comprendre le fonctionnement d'un organisme.

### 1.1.1. Définitions et contexte

Le protéome est l'ensemble des protéines d'un organisme, d'une cellule, d'un tissu observé à un moment donné et dans des conditions bien particulières. Le protéome est une entité plus complexe que le génome. En effet, des réarrangements au niveau des gènes, la maturation des ARNm, responsable de l'épissage alternatif, font qu'un même gène peut conduire à l'expression de plusieurs isoformes protéines. A cela s'ajoute la complexité liée aux modifications post-traductionnelles qui ont lieu au niveau protéique, telles que des phosphorylations ou des glycosylations.

La protéomique est la discipline qui s'attache à identifier mais aussi quantifier les taux d'expression des protéines d'un organisme en fonction de son environnement, de son état physiologique ou pathologique (Figure 1). La protéomique est une étude dynamique des systèmes qui peut permettre de mieux comprendre les fonctions cellulaires impliquées dans l'apparition de maladies.

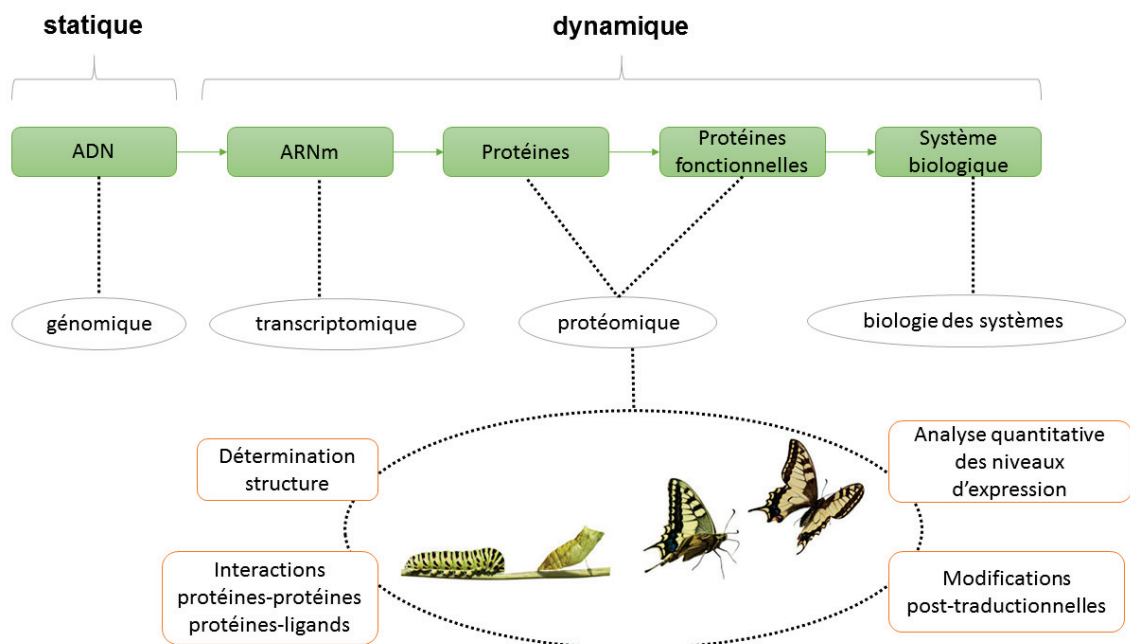


Figure 1 : La place de l'analyse protéomique, d'après Patterson et Aebersold, 2003

L'étude de la structure primaire, secondaire ou tertiaire des protéines est un grand champ de l'analyse protéomique. Mais ici seront décrits uniquement deux grands types d'études protéomiques qui concernent plus particulièrement ce travail de thèse. Il s'agit de la découverte et la validation de biomarqueurs ainsi que de l'étude des systèmes biologiques par des analyses quantitatives.

Les biomarqueurs correspondent à des paramètres biologiques qui permettent de caractériser un état physiologique ou un état pathologique<sup>6</sup>. Dans le domaine de la santé, le biomarqueur peut-être un métabolite ou une protéine (enzyme ou hormone par exemple...) et pourra permettre de dépister ou suivre l'évolution d'une maladie, mais aussi de suivre l'efficacité ou la toxicité d'un traitement. L'antigène spécifique de la prostate (PSA), découvert en 1980<sup>7</sup>, est l'exemple type du biomarqueur protéique, permettant de dépister le cancer de la prostate. Plus récemment, c'est l'association de plusieurs biomarqueurs entre eux qui est de plus en plus recherchée. En effet, une étude a révélé que l'association de 5 biomarqueurs sanguins pourrait permettre de prédire les stades de développement du cancer ovarien<sup>8</sup>.

La biologie des systèmes a été définie par le consortium européen ERASysBio comme la compréhension des interactions dynamiques entre les composants d'un système vivant mais aussi des interactions des organismes avec leur environnement. Dans ce contexte, l'étude du protéome prend tout son sens puisque les protéines sont impliquées dans la plupart des grandes fonctions biologiques<sup>9</sup>. La protéomique permet ainsi d'obtenir des informations de type fonctionnelles sur les interactions protéines-ligands, sur la formation de complexes protéiques. De plus, des informations structurales ou sur la localisation permettent de classer les protéines en grandes familles (kinases, protéases) permettant une meilleure compréhension de leur fonction. Enfin, l'étude des modifications post-traductionnelles (nature de la modification chimique et positionnement au niveau des acides aminés de la séquence primaire) peut donner accès aux fonctions biologiques des protéines, et permet aussi d'appréhender les régulations cellulaires. Avec l'intégration de ces différents résultats, la protéomique permet d'étudier les voies de signalisation impliquées dans des processus biologiques ou bien dans l'apparition de perturbations métaboliques induisant des maladies.

Pour répondre aux problématiques de quantification de protéines soulevées par la recherche de biomarqueurs ou par la biologie des systèmes, il est nécessaire de disposer d'outils fiables et sensibles afin de mesurer ces variations biologiques.

### 1.1.2. Les outils et l'apport de la spectrométrie de masse

Traditionnellement, l'analyse protéomique différentielle était réalisée à partir de gels de polyacrylamide en deux dimensions (gels 2D) <sup>10</sup> avec une révélation colorimétrique ou par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt. Cette technique est toujours utilisée, en particulier pour la séparation d'isoformes protéiques <sup>11,12</sup>. Cependant, le dosage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt, ou ELISA pour « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » <sup>13,14</sup>, reste la méthode de référence pour la quantification absolue de protéines de par sa spécificité et sa sensibilité (limite de quantification inférieure au ng/mL). Il existe trois méthodes de dosage par ELISA, (i) ELISA indirect, la protéine est ciblée par un premier anticorps, lui-même ciblé par un second anticorps (ii) ELISA en sandwich, un premier anticorps cible de la protéine est fixé sur une plaque. Lorsque la protéine d'intérêt s'est liée, un second anticorps spécifique de cette protéine est ajouté, (iii) ELISA par compétition, les anticorps sont fixés sur une plaque et il y a compétition pour la liaison entre une protéine marquée et la protéine cible.

En revanche, ces méthodes présentent quelques inconvénients. La plus grande difficulté intervient lorsque l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt n'est pas disponible. Dans ce cas, le développement d'un test est très coûteux et peut durer au minimum un an pour le dosage d'une seule protéine. De plus, des interactions non spécifiques entre une protéine et l'anticorps peuvent se produire induisant des différences de dosage pour un même échantillon. Dans le cas de la méthode ELISA en sandwich, une forte concentration en analyte peut conduire à la saturation des anticorps fixés sur le support. Le signal va diminuer alors que la concentration en analyte augmente ; c'est l'effet hameçon ou « hook effect ». Une revue de 2015 décrit les différents problèmes qui peuvent survenir lors des dosages ELISA et leurs principales causes <sup>15</sup> (Figure 2).

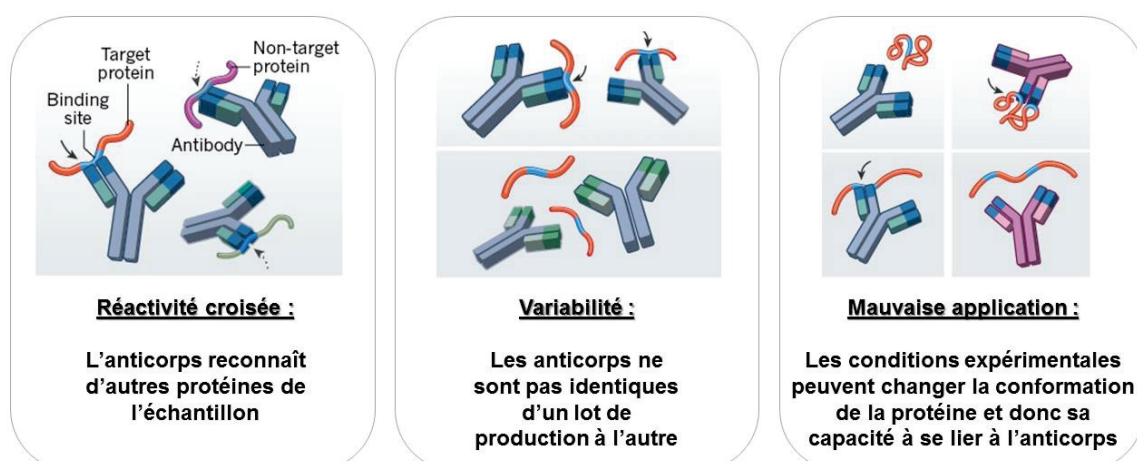


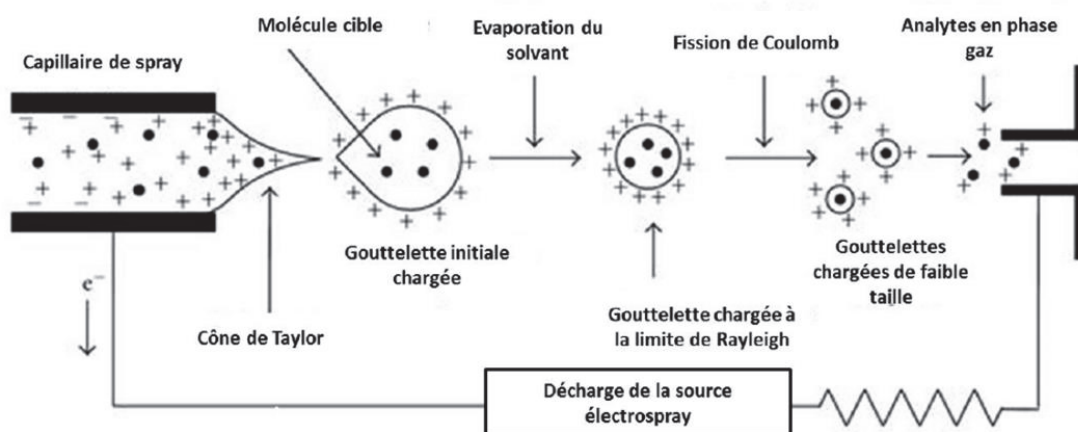
Figure 2 : Principaux problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'anticorps, d'après Baker M, 2015

Une autre limitation du test ELISA est due à la difficulté de réaliser des dosages multiplexés. En effet, les anticorps sont spécifiques d'une seule protéine. Il est donc nécessaire de redévelopper un anticorps pour chaque nouvelle protéine d'intérêt. Ces limitations ont conduit au développement de méthodes analytiques performantes comme la spectrométrie de masse, technique de choix pour l'identification et la quantification de protéines.

A partir de la fin des années 1980, la spectrométrie de masse a permis de nouvelles avancées en protéomique, en particulier grâce aux travaux de John Bennett Fenn et Koichi Tanaka sur l'ionisation douce de macromolécules, qui leur a valu le prix Nobel de chimie en 2002.

Les travaux de Koichi Tanaka ont conduit au développement de la source d'ionisation par désorption laser assistée par matrice ou source MALDI. La source MALDI couplée généralement à un analyseur de type temps de vol (TOF pour Time Of Flight), est très utilisée en imagerie ou pour réaliser rapidement des profils protéiques comme par exemple celui de cellules cancéreuses. Ainsi, des travaux ont permis de révéler 15 protéines comme potentiels biomarqueurs <sup>16</sup> du cancer du poumon. De plus, la technologie MALDI-TOF est désormais utilisée en routine dans le milieu hospitalier, en diagnostic clinique pour l'identification de bactéries <sup>17</sup>.

Les travaux de John Bennett Fenn ont quant à eux permis l'avènement de l'électrospray ou « Electrospray Ionization » (ESI). La technique ESI est une méthode d'ionisation douce, permettant le passage en phase gazeuse des analytes intacts présents en solution par l'application d'un champ électrique. La désolvatation des analytes passe tout d'abord par la formation de gouttelettes multichargées. La taille des gouttes diminue ensuite par évaporation du solvant ce qui augmente la concentration des charges dans la goutte. Lorsque les répulsions coulombiennes entre les charges dépassent la tension de surface du solvant (limite de Rayleigh), la goutte se décompose et des ions multichargés sont obtenus. La génération des espèces chargées en phase gazeuse s'effectue par la formation d'adduits (par exemple entre l'analyte et un cation  $\text{Na}^+$  du solvant) ou par protonation  $[\text{M}+\text{H}]^+$  /



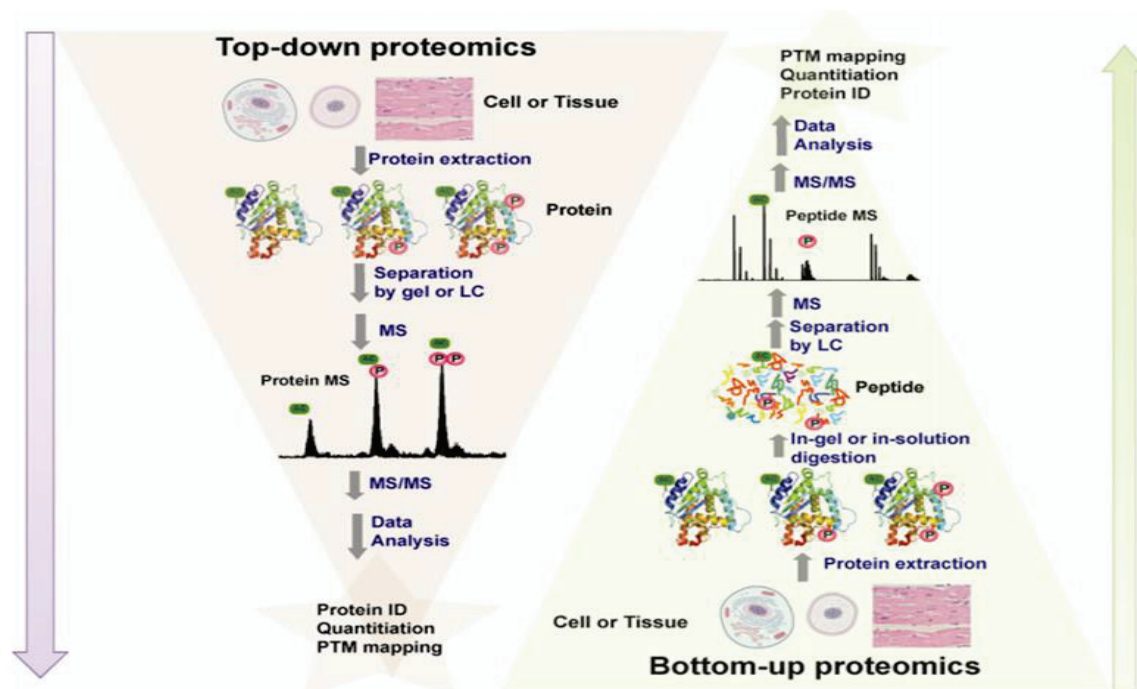
déprotonation  $[\text{M}-\text{H}]^-$  de l'analyte directement ionisé dans la goutte (Figure 3).



Figure 3 : Représentation du processus d'ionisation des composés au sein de la source électrospray

Les deux avantages principaux de l'ESI sont, premièrement, sa capacité à former des espèces multichargées et secondement, sa capacité à être facilement couplée avec un flux continu (par exemple, éluat d'une colonne chromatographique).

Ce travail de thèse décrit les différentes stratégies utilisées pour le dosage de protéines à partir d'un couplage chromatographie liquide – électrospray – spectrométrie de masse (LC-ESI-MS). Deux stratégies coexistent dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Elles possèdent chacune des avantages et inconvénients selon le but recherché, à savoir (i) l'identification ou la quantification de protéines (ii) la recherche d'interaction entre protéines ou (iii) l'analyse de modifications post-traductionnelles. Leur mise en place est fondamentalement différente. Ainsi, par une approche « Top-down », les protéines sont extraites puis séparées et enfin identifiées, intactes, dans le but d'obtenir une vue globale de leurs éventuelles modifications (Figure 4), alors que l'approche « Bottom-up »



identifie et quantifie des fragments de protéines, nommés peptides qui sont rapporteurs de la protéine d'intérêt.

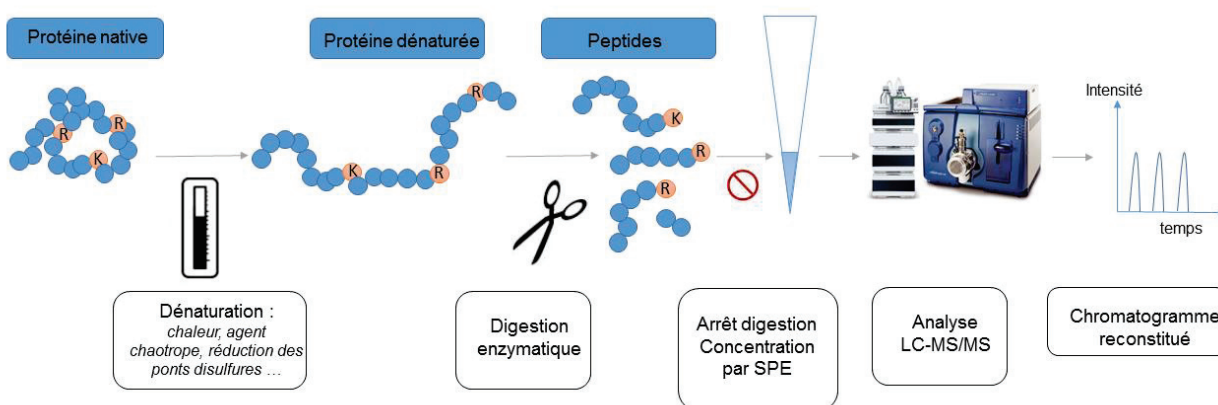
Figure 4 : Illustration des différences entre les approches "Top-down" ou "Bottom-up", d'après Gregorich et al, 2014 <sup>18</sup>

Pour la caractérisation et l'identification de processus cellulaires, certains groupes comme celui de N.L. Kelleher, se sont spécialisés dans l'approche « Top-down ». Dans une étude de 2013 sur le vieillissement des cellules humaines, Kelleher et ses collaborateurs ont identifié plus de 1000 protéines ; certaines des protéines étudiées présentaient des modifications

post traductionnelles telles que des méthylations ou des phosphorylations <sup>19</sup>. Ce même groupe a montré la complémentarité des approches « Top-down » et « Bottom-up » dans la caractérisation de cellules de cancer du sein <sup>20</sup>. La stratégie « Bottom-up » leur a permis d'identifier 7,4 fois plus de protéines que la stratégie « Top-down », cependant cette dernière leur a permis d'accéder à plus d'informations sur les modifications post-traductionnelles comme par exemple sur les différents degrés de phosphorylation d'une même protéine. Cependant, un inconvénient majeur de l'approche « Top-down » est d'être semi-quantitative. De plus, la sensibilité de ces approches est affectée par la possibilité de former de nombreux états de charge sur les protéines et ainsi « diluer » le signal observé.

L'approche « Bottom-up », illustrée sur la Figure 4, a pour principale caractéristique d'utiliser une étape de protéolyse par digestion enzymatique. Cette étape fractionne les protéines en chaînes peptidiques plus courtes. Les peptides ainsi générés, sont définis comme protéotypiques lorsqu'ils sont spécifiques de la protéine à doser et détectés expérimentalement en spectrométrie de masse <sup>1</sup>. Ils sont alors sélectionnés comme rapporteurs de la protéine à doser.

Le principe général de la préparation des protéines pour la quantification par l'approche « Bottom-up » est décrit sur la Figure 5 ci-dessous. Les protéines sont tout d'abord dénaturées et réduites en milieu salin afin de détruire leurs structures secondaire et tertiaire. Cela consiste à les déplier et à rompre leurs ponts disulfures. Une enzyme, généralement la trypsine, est ensuite utilisée pour couper la liaison peptidique en C-terminal de la lysine ou



de l'arginine. Généralement le mélange de peptides ainsi généré, est purifié par extraction en phase solide (SPE), concentré, puis séparé par chromatographie liquide avant d'être analysé par spectrométrie de masse.

Figure 5 : Principe général de la préparation des échantillons par l'approche "Bottom-up"

L'étape de digestion enzymatique complexifie l'échantillon. C'est pourquoi, une séparation des peptides en amont de l'analyse est souvent effectuée par chromatographie liquide. Les peptides sont élués et introduits successivement dans le spectromètre de masse, permettant

ainsi de réduire l'effet matrice (suppression d'ionisation)<sup>21</sup>. L'analyse MS est réalisée en continu. En représentant le signal détecté en fonction du temps de rétention, il est possible d'obtenir un chromatogramme reconstitué. La mesure se fait par l'intégration du pic chromatographique proportionnel à la concentration de l'analyte. Les peptides ainsi détectés permettront alors de remonter à la structure primaire de la protéine ainsi qu'à sa concentration dans l'échantillon de départ.

Un des avantages d'analyser des peptides plutôt que des protéines entières vient du fait que leur ionisation par ESI se fera sous forme d'un ou deux états de charges seulement. De plus, la gamme de masse des spectromètres de masse est plus adaptée aux peptides (masse moléculaire d'environ 1 000 Da) qu'aux protéines (masse moléculaire de 10 000 Da à 1000 000 Da). Cependant, l'analyse MS simple (SIM pour Single Ion Monitoring) du peptide chargé est généralement trop peu spécifique et trop peu sensible pour l'analyse de protéines dans des matrices complexes. C'est pourquoi, l'étude des protéines est généralement réalisée par spectrométrie de masse en tandem.

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est généralement réalisée en couplant deux analyseurs. Le premier analyseur joue un rôle de filtre en sélectionnant un ion stable défini (représentant le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) d'un peptide). Cet ion est appelé « ion parent » ou « ion précurseur ». Le second analyseur balaie les rapports  $m/z$  de tous les « ions fils » ou « ions produits » issus de la fragmentation de l'ion parent. Entre les deux analyseurs, une cellule de collision permet l'excitation de l'ion précurseur, conduisant à sa fragmentation. Il existe différents moyens d'activation des ions mais le plus utilisé dans l'étude des protéines par spectrométrie de masse en tandem est la Dissociation Induite par Collision aussi appelée Dissociation Activée par Collision (CID ou CAD). L'énergie permettant la fragmentation est apportée par la collision entre l'ion parent et des molécules de gaz neutre (azote, argon...). La spectrométrie de masse en tandem présente l'avantage de donner des informations à la fois sur la masse d'un peptide mais aussi sur sa structure à partir des masses des ions fils issus de la fragmentation.

L'approche « Bottom-up », combinée au couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), est désormais une technique de choix pour la quantification de protéines à la fois pour la recherche et la validation de protéines biomarqueurs que pour l'étude de la biologie des systèmes. Cette stratégie a entre autre permis à Iwasaki et ses collaborateurs, en 2010, d'observer le protéome complet de la bactérie *E.coli*. En effet, ils ont identifié dans le même échantillon autant de protéines que de gènes observés après analyse transcriptomique<sup>22</sup>.

Selon le contexte de l'étude ou la stratégie utilisée, l'analyse peut être réalisée avec ou sans *a priori*. Dans la première approche, le peptide rapporteur d'une protéine est recherché de manière spécifique dans l'échantillon alors que dans la seconde approche, les spectres MS/MS générés permettent d'identifier le peptide puis la protéine. La revue du groupe de M.J MacCoss en 2015 décrit l'analyse avec *a priori*, l'analyse « peptide centrée » et l'analyse sans *a priori*, l'analyse « spectre centrée »<sup>23</sup>. Les parties suivantes expliciteront

ces deux types d'approches en décrivant de manière la plus exhaustive possible leurs avantages et inconvénients dans différents contextes.

## 1.2. Analyse sans *a priori* : Spectre centrée

L'analyse sans *a priori* est une analyse en aveugle dont l'objectif est de donner une cartographie du protéome d'un échantillon. C'est une analyse non ciblée où seuls les ions précurseurs les plus intenses d'un scan de surveillance sont sélectionnés pour être fragmentés. Elle est aussi appelée « shotgun proteomics ». Les peptides identifiés à partir des spectres MS/MS sont validés par des modèles statistiques et quantifiés de manière différentielle à l'aide d'outils dédiés. Le principe et la méthodologie de l'analyse sans *a priori* sont décrits dans les paragraphes suivants.

### 1.2.1. Le séquençage peptidique et la recherche dans les bases de données

Le séquençage peptidique est la détermination de la structure en acides aminés d'un peptide. Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines sont digérées en peptides par une hydrolyse enzymatique, souvent réalisée par de la trypsine. Cette enzyme clive préférentiellement en position C-terminale de deux acides aminés basiques : la Lysine (K) et l'Arginine (R). La fragmentation des peptides a lieu le long de la liaison peptidique (Figure 6). Ce qui a donné lieu à l'établissement d'une nomenclature par Roepstorff et Fohlman en 1984<sup>24</sup>, qui a été ensuite simplifiée par Biemann en 1990<sup>25</sup> (Figure 6).

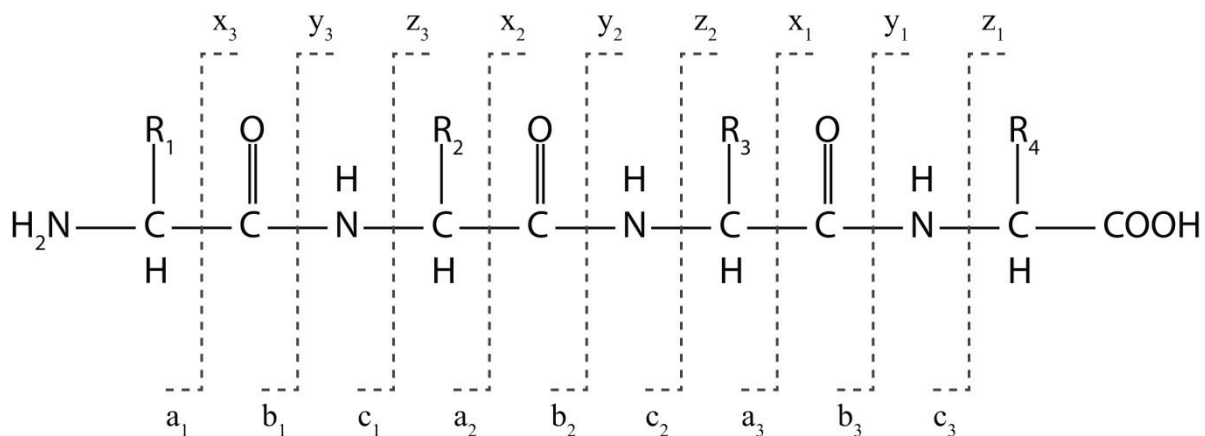


Figure 6 : Nomenclature de la fragmentation peptidique, d'après Biemann, 1990

Dans ce contexte, les fragmentations se déroulent à basse énergie de collision et suivent le modèle du « proton mobile » décrit par Dongré *et al.* en 1996<sup>26</sup>; celui-ci montre la fragmentation initiée par le proton au niveau des liaisons peptidiques. Dans le cas de peptides tryptiques, l'état de charge principal est  $z=+2$ . Il est intéressant de noter qu'une charge est souvent portée par l'acide aminé basique en position C-terminale et que l'autre

est portée par l'extrémité N-terminale du peptide. L'énergie pour transférer cette charge le long de la chaîne peptidique est faible et favorise l'obtention d'ions de type y ou b<sup>27</sup> facilitant la lecture des spectres MS/MS et la prédiction de la séquence en acides aminés.

A partir du spectre MS/MS d'un peptide, l'utilisation des bases de données permet de déterminer sa séquence en acides aminés. Le peptide ainsi reconstitué permet d'identifier la protéine d'intérêt. Si l'organisme d'intérêt n'est pas séquencé et donc non référencé dans les bases de données, la séquence du peptide doit être déterminée *de novo* à partir des spectres MS/MS obtenus ou bien par homologie de séquence.

Les bases de données dans lesquelles sont effectuées ces recherches, sont appelées banques protéiques. Elles sont construites à partir des données de génomiques triées, révisées et annotées. La banque de données Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) est probablement la plus utilisée de par son exhaustivité et sa qualité au niveau de l'annotation. La recherche dans ces bases de données s'effectue par alignement entre les spectres MS/MS théoriques et les spectres MS/MS mesurés. Cette approche est appelée « Peptide Fragment Fingerprinting »<sup>28</sup>. Différents algorithmes de recherche ont été développés<sup>29</sup>, fonctionnant globalement de la même façon mais ayant une approche différente dans l'attribution du score donné à l'alignement entre le spectre théorique et le spectre expérimental. Protein Prospector, utilisé au cours de de travail de thèse, a été développé par l'université de San Francisco et est fondé sur un score calculé à partir de la significativité des correspondances entre spectres obtenus et spectres théoriques<sup>30,31</sup>.

La recherche dans les bases de données nécessite une mesure précise des masses issues de spectres MS/MS. C'est pourquoi ces spectres sont acquis sur des appareillages dont le couplage implique des analyseurs avec une grande capacité de résolution, dits de haute résolution. Ceux-ci étant principalement utilisés en mode d'acquisition d'information dépendante.

### 1.2.2. Le mode DDA : Data Dependant Analysis

L'acquisition dépendante d'information en mode DDA (« Data Dependant Analysis »), est la méthode de choix pour réaliser une analyse protéomique sans *a priori*. L'acquisition se déroule en deux temps. Dans un premier temps, l'acquisition d'un scan de surveillance est réalisée. Dans un deuxième temps, l'acquisition de spectres MS/MS sur les ions précurseurs sélectionnés est générée selon les données récoltées lors du premier scan.

Les appareillages mis en jeu impliquent le plus souvent un premier analyseur de type quadripôle ou trappe linéaire et un second analyseur haute résolution de type Orbitrap ou Temps de vol. Deux publications du groupe de Matthias Mann illustrent le potentiel du couplage quadripôle Orbitrap en identifiant plusieurs milliers de protéines (2500 puis 5000) dans des lysats cellulaires<sup>32,33</sup>. La Figure 7-A montre le schéma du QExactive HF commercialisé par la société Thermo Scientific, spectromètre de masse hybride avec un

couplage quadripôle-Orbitrap. Typiquement, une analyse DDA sur ce type d'instrument est nommée expérience TopN (N est le nombre d'ions précurseurs sélectionnés) dont le principe est le suivant (Figure 7-B) :

- Scan de surveillance : le quadripôle fonctionne comme un guide d'ion et les ions sont analysés dans l'Orbitrap à haute résolution (typiquement 70 000 pour  $m/z=200$ )
- Sélection : Les N ions les plus intenses (entre 10 et 20 selon la complexité de la matrice) sont filtrés dans le quadripôle
- Fragmentation des ions sélectionnés dans la cellule de collision HCD (Higher-energy collisional dissociation)
- Analyse des fragments dans l'Orbitrap (typiquement à une résolution de 17 500 pour  $m/z=200$ )

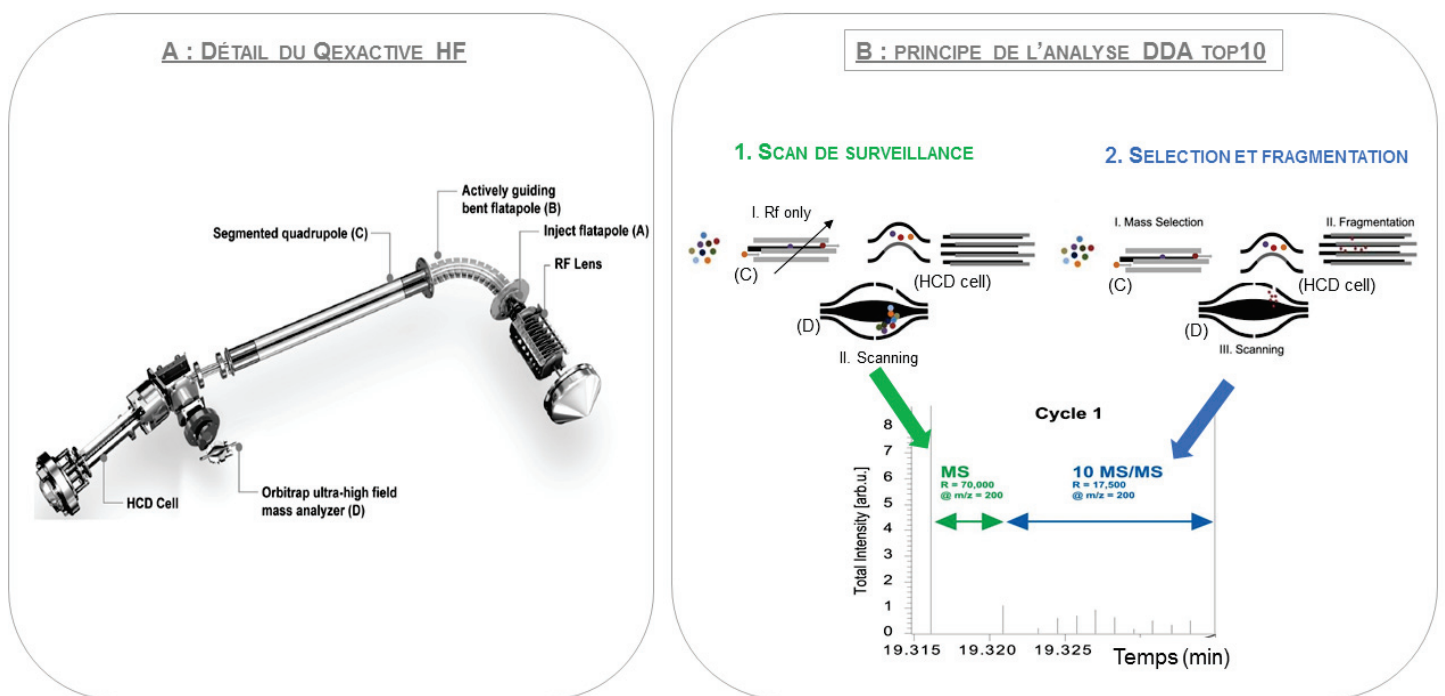


Figure 7 : Principe de l'analyse DDA sur un Q Exactive, d'après Scheltema et al, 2014

Dans un instrument de type qTOF, l'analyse DDA est conduite selon le même principe<sup>34</sup>. Cependant, bien que le pouvoir de résolution du TOF soit moins élevé que celui de l'Orbitrap, ce couplage a l'avantage d'être plus rapide (jusqu'à 50 MS/MS par secondes) et d'avoir une gamme dynamique plus importante.

Quel que soit l'instrument, la sélection des ions est basée sur leur intensité mesurée lors du scan de surveillance. Systématiquement ce sont les ions les plus abondants qui sont sélectionnés pour être fragmentés. C'est pourquoi, pour permettre d'accéder aux ions les moins abondants, le principe d'exclusion dynamique a été adopté. Celui-ci permet de ne pas

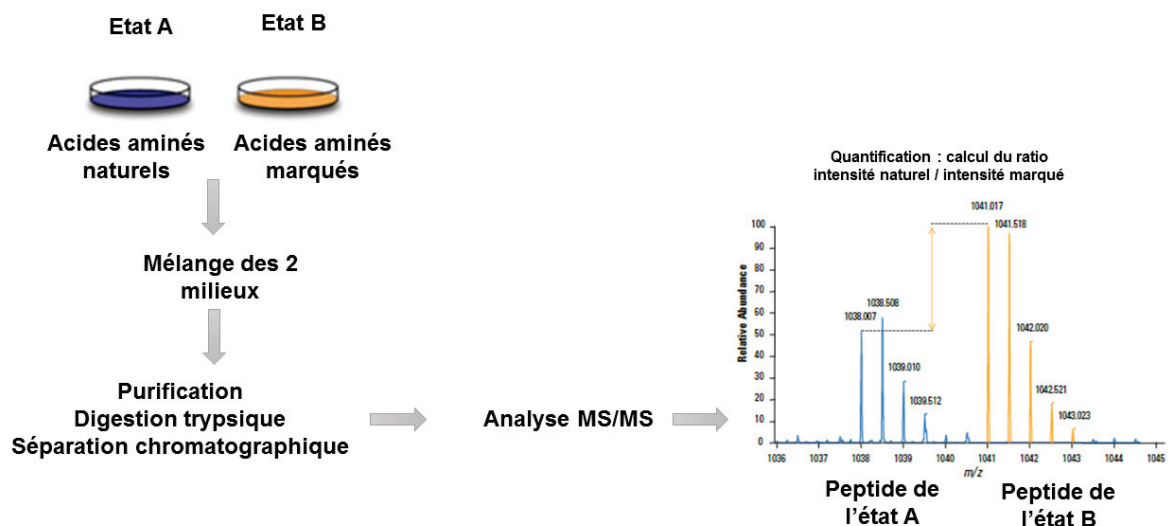
sélectionner à nouveau le même rapport  $m/z$  pendant un temps donné afin d'aller sélectionner des ions moins intenses qui pourraient correspondre à des peptides co-élués avec un peptide très concentré. Ce principe a permis d'augmenter considérablement la profondeur des indentifications du protéome lors d'une analyse conduite en utilisant le mode DDA.

L'acquisition DDA est une méthode très puissante pour l'identification de protéines. De plus de nombreuses approches ont été développées afin de pouvoir quantifier les protéines identifiées.

### 1.2.3. Les stratégies de quantification principalement utilisées lors d'une analyse sans *a priori*

Dans une stratégie d'approche spectre centrée, la quantification des protéines est principalement réalisée de façon relative. Cela consiste à comparer le taux d'expression des protéines entre plusieurs conditions, généralement grâce à un marquage isotopique différent pour chaque condition. Le marquage métabolique et le marquage chimique sont les plus utilisés.

Le marquage métabolique est basé sur l'incorporation, aux protéines, d'azote 15 ou d'acides aminés marqués par des isotopes stables ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ). Cette approche, appelée SILAC pour Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture <sup>35</sup>, consiste à comparer deux échantillons : l'un cultivé dans un milieu « marqué » comportant des acides aminés marqués et l'autre cultivé dans un autre milieu sans marquage isotopique. Les acides aminés marqués sont ainsi incorporés au sein des protéines lors de leur synthèse. Les deux échantillons, marqué et non marqué, sont ensuite mélangés et traités ensemble. Une quantification relative d'un échantillon par rapport à l'autre peut être effectuée (Figure 8). Cette stratégie a été utilisée dans le screening de biomarqueurs du cancer pancréatique <sup>36</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont ajouté des acides aminés marqués à une culture de cellules saines. Cette culture est ensuite comparée à une culture de cellules cancéreuses. Ils ont ainsi pu quantifier 195 protéines parmi lesquelles 145 étaient différenciellement





exprimées.

Figure 8 : Principe de la stratégie de quantification SILAC, d'après Ong et al, 2002

De nombreux types de marquages chimiques sont possibles. Ils peuvent se faire sur les différentes fonctions réactives d'une protéine, comme les amines (en N-terminal de la protéine ou des peptides, sur la chaîne latérale des lysines), les acides carboxyliques (en C-terminal, sur les chaînes latérales des acides aspartique et glutamique) ou encore sur les thiols des chaînes latérales des cystéines. A titre d'exemple, le réactif Tandem Mass Tag®<sup>37</sup> (ou TMT®) est commercialisé par la société Thermo Scientific et permet une quantification multiplexée jusqu'à 10 conditions différentes. Comme pour l'approche précédente, les différents échantillons sont mélangés et analysés simultanément. En revanche, le marquage est constitué d'un groupe rapporteur et d'une balance dont la somme donne une masse fixe. Le premier analyseur va donc laisser passer simultanément les 10 peptides isobariques marqués permettant de gagner en temps de cycle par rapport à l'approche SILAC. La liaison entre la balance et le groupe rapporteur étant rompue lors de la fragmentation, la quantification est réalisée à partir des fragments marqués différenciellement.

Cependant, de nombreuses revues relatent qu'une grande partie des études de protéomique globale liées à la compréhension des systèmes biologiques est réalisée sans marquage, par la méthode dite « label free »<sup>38-41</sup>. Cette méthode est en effet applicable à tous types d'échantillons, facile à mettre en place et moins onéreuse. Elle nécessite en revanche des outils parfois complexes d'analyse et de validation des résultats. La quantification peut se faire à partir de l'intensité ou de l'aire du pic mesuré ou bien par décompte de spectres. Cependant, plusieurs entités peuvent représenter une protéine, (i) les ions précurseurs différenciellement chargés pour un même peptide ou (ii) plusieurs peptides pour une même protéine. Il est nécessaire de synthétiser ces données en un seul résultat représentant le niveau d'expression de la protéine afin de répondre aux problématiques de recherche de biomarqueurs ou de biologie des systèmes. Des modèles probabilistes n'ont cessé d'être introduits dans les analyses protéomiques quantitatives et ont permis d'améliorer la précision et la sensibilité des résultats. Ces modèles ainsi que les différents outils pour le traitement des données sont détaillés dans un certain nombre de revues<sup>42,43</sup>. Récemment, le logiciel *open source* Skyline 3.0®<sup>44</sup>, permet la mise en place à l'aide du package R MSstat®, d'une approche statistique<sup>45</sup> qui a été utilisée dans ce travail de thèse et explicitée dans le chapitre 3.

Quelle que soit la stratégie de quantification choisie, celle-ci reste relative et ne permet pas de répondre à toutes les problématiques posées par l'analyse protéomique. De plus, le principe même de l'acquisition en mode DDA peut engendrer des biais analytiques dont la description est donnée dans le paragraphe suivant.

### 1.2.4. Les limites de l'approche spectre centrée

Garantir à la fois l'acquisition d'un grand nombre de spectres MS/MS et leur excellente qualité est l'enjeu majeur de l'approche spectre centrée. La Figure 9 synthétise la mise en œuvre de cette stratégie afin de mieux comprendre et appréhender les étapes limitantes dans une analyse en aveugle.

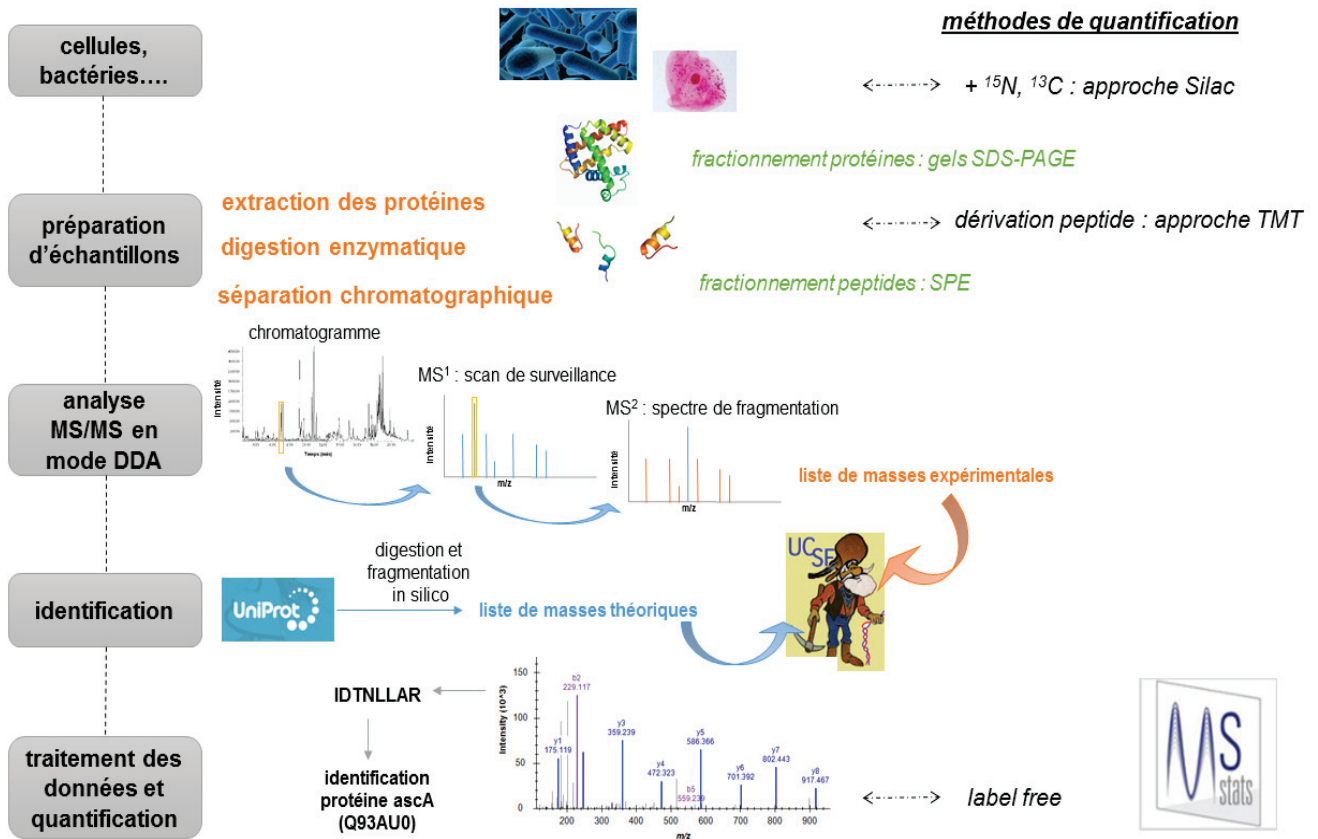


Figure 9 : Résumé de la mise en œuvre d'une analyse spectre centrée

La qualité des spectres MS/MS peut être altérée à cause de phénomènes de co-fragmentation. Ces phénomènes observés résultent de la fragmentation simultanée de deux ions isolés dans la même fenêtre du quadripôle (en général de 0.7 Th) conduisant à un seul spectre MS<sup>2</sup> pour deux ions correspondants probablement à deux peptides différents. Ce phénomène explicité dans une étude du groupe de Matthias Mann<sup>46</sup> peut être largement atténué si un soin particulier est apporté à la préparation des échantillons. Il est possible de simplifier l'échantillon soit à l'étape protéique (par exemple par séparation sur gels SDS-PAGE<sup>47</sup>) soit à l'étape peptidique par fractionnement (par exemple par Extraction sur Phase Solide, SPE<sup>48</sup>) ou en optimisant la séparation chromatographique<sup>22</sup>. La préparation d'échantillon ne sera pas détaillée ici.

Le biais majeur dans l'analyse DDA est le sous-échantillonnage, en particulier dans des matrices complexes où l'abondance des protéines est sur une gamme dynamique de plusieurs ordres de magnitude. Des études montrent la façon dont les peptides les moins abondants sont parfois sélectionnés de manière aléatoire voire jamais sélectionnés, créant ainsi le phénomène des « missing-values » (valeurs-manquantes) alors que les ions les plus abondants sont parfois sélectionnés de manière redondante<sup>49-51</sup>. Une simplification de la matrice par fractionnement avec une séparation chromatographique optimisée et une répétition systématique des analyses permet de diminuer ce phénomène et d'améliorer la reproductibilité des analyses. Cependant, le manque de sensibilité de l'analyse MS lors du scan de surveillance restera une limitation dans l'analyse DDA.

L'analyse spectre centrée est tout de même une méthode de choix pour identifier en première intention un très grand nombre de protéines dans un échantillon comme dans le cadre de la phase de découverte de biomarqueurs. En revanche, pour répondre à des problématiques de quantification, ce type d'analyse n'est pas le plus optimal. D'autres modes d'acquisition de données ont été développés pour pallier ces limitations. Cependant, ceux-ci partent d'un *a priori* ; c'est-à-dire d'un choix de la protéine à rechercher et à quantifier. Dans une stratégie « Bottom-up », cette approche a logiquement été appelée « peptide-centrée ».

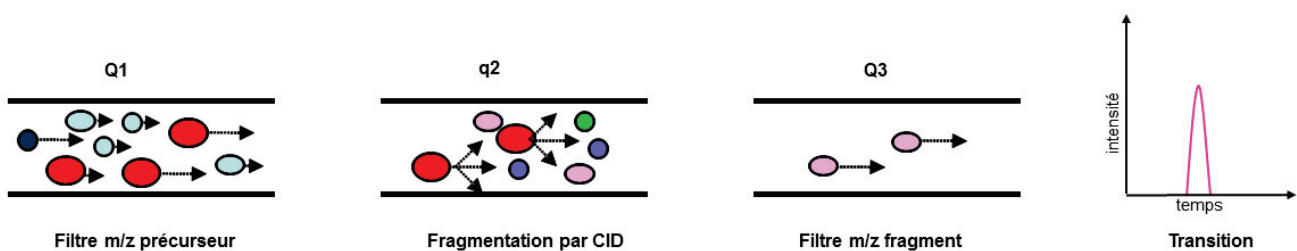
### 1.3. Analyse avec *a priori* : Peptide centrée

Dans cette stratégie, une liste des protéines est établie à partir de données bibliographiques, de leaders d'opinion, d'éventuelles expériences préalables (transcriptomiques, protéomiques ou protéogénomiques). La préparation d'échantillon ainsi que les paramètres instrumentaux peuvent être spécialement optimisés pour les protéines et peptides ciblés, augmentant la sensibilité de cette approche.

#### 1.3.1. Principe et utilisation des modes ciblés : SRM (Selected Reaction Monitoring) et PRM (Parallel Reaction Monitoring)

L'analyse ciblée par spectrométrie de masse en tandem est principalement réalisée en mode SRM « Selected Reaction Monitoring », aussi appelé MRM « Multiple Reaction Monitoring ». En 2013, une revue de MA. Gillette et S. Carr cite l'analyse en mode SRM comme méthode de référence pour la quantification des peptides et protéines<sup>2</sup>, en particulier dans le domaine clinique, pour la validation de biomarqueurs.

Le mode SRM est réalisé sur des appareillages de type triples quadripôles, ou bien sur des appareillages hybrides quadripôle-trappe ionique (Q-Trap). Comme décrit dans la partie précédente, le premier analyseur quadripolaire (Q1) est un filtre qui sélectionne l'ion précurseur d'intérêt. Le précurseur est fragmenté dans la cellule de collision pour former des ions fils provenant spécifiquement de l'ion parent. Le deuxième analyseur (Q3) de type quadripôle, sélectionne un ion fils. Cette double sélection ion parent/ion fils, est appelée une transition (Figure 10). Dans le cas d'un analyseur hybride Q-Trap, la trappe ionique linéaire



fonctionne comme un quadripôle.

Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SRM

Il est possible de suivre simultanément plusieurs transitions SRM pour réaliser une analyse multiplexée, ainsi dans une seule méthode, différents peptides et/ou différentes protéines pourront être ciblés.

D'autres appareillages hybrides de type Q-TOF ou Q-Orbitrap permettent aussi de travailler en mode ciblé mais seul un filtrage sur l'ion précurseur est opéré. Ce principe est principalement développé par le groupe de B. Domon sous le nom de PRM « Parallel Reaction Monitoring »<sup>52,53</sup>. Ce mode est aussi appelé MRM Haute Résolution ou MRM-HR. Dans ce mode, un ion précurseur est tout d'abord sélectionné dans le quadripôle puis fragmenté. Ensuite un analyseur haute résolution analyse la quasi-totalité de ce qui a été fragmenté (Figure 11).

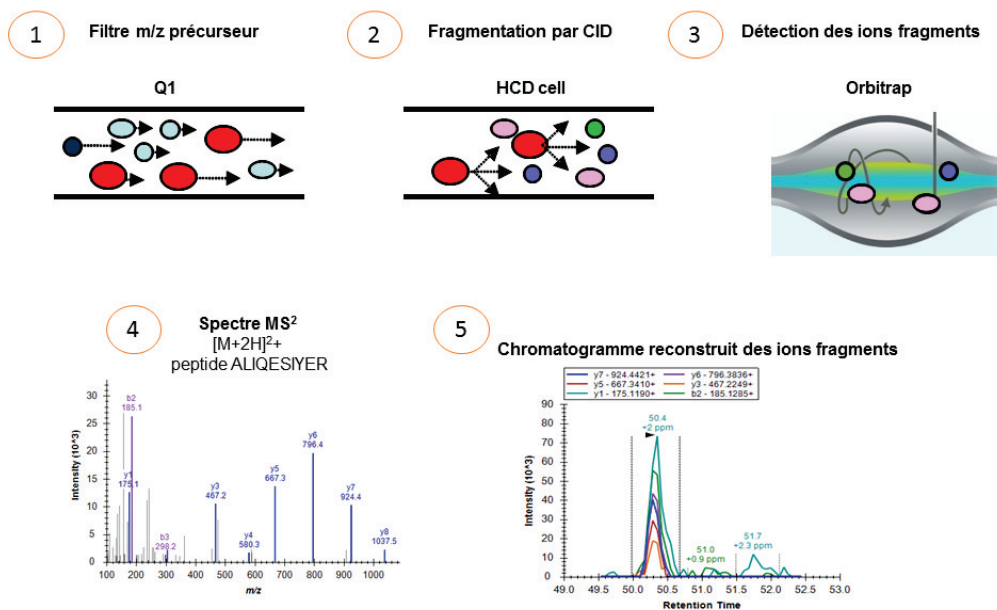


Figure 11 : Schéma du principe de fonctionnement du mode PRM, d'après Rauniyar<sup>54</sup>, 2015

Alors que la SRM utilise un double filtrage en masse pour simplifier tout ce qui arrive au niveau du détecteur, la PRM utilise la haute résolution pour distinguer parfaitement deux valeurs de rapports m/z proches et s'assurer que seul le peptide d'intérêt est quantifié.

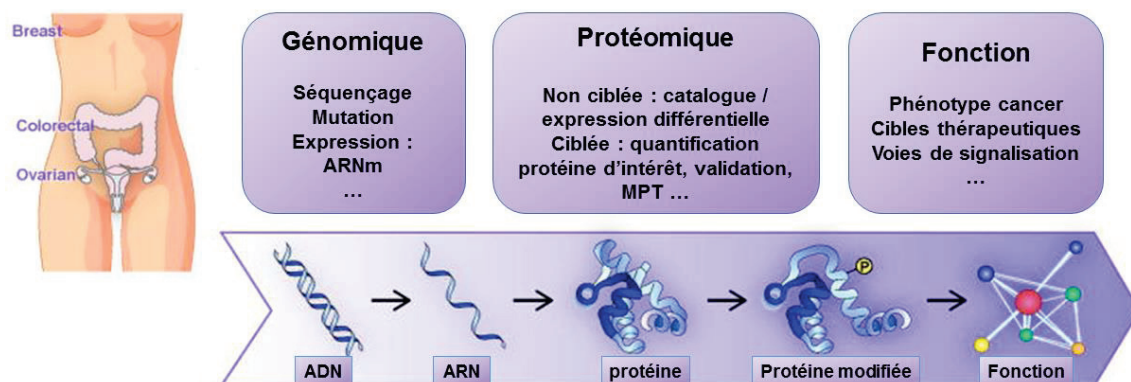
Quelques applications biologiques ont été réalisées par d'autres groupes en PRM<sup>55,56</sup>. A ce jour le mode PRM reste bien moins répandu que le mode SRM. Historiquement, le mode PRM a été développé sur un QExactive. Récemment, une étude a montré son utilisation sur un triple TOF<sup>57</sup>. L'utilisation d'un analyseur de type TOF aura l'avantage d'être plus rapide car les temps de cycles plus courts, augmentant ainsi la capacité de multiplexage. Ce développement permettrait une utilisation plus large du mode PRM.

Il a été démontré que les performances analytiques pour la quantification de protéines étaient équivalentes entre la SRM et la PRM<sup>58</sup>. Cependant, il est important de souligner que

ces performances dépendent grandement du choix du peptide cible ainsi que de la matrice analysée.

### 1.3.2. Choix de la cible protéique et peptidique

Comme évoqué précédemment, il est nécessaire de lister en premier lieu les protéines d'intérêt. Cela peut se réaliser à partir d'informations retrouvées dans la littérature ou bien à partir d'avis d'experts (chercheurs et/ou médecins, ...), appelés aussi Key Opinion Leaders (KOL). Cette recherche de cibles peut aussi s'effectuer à partir de données issues de recherches génomiques et transcriptomiques. C'est dans cette optique qu'en 2006 a été créé le consortium CPTAC, Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, par le National Cancer Institute (NCI) <sup>59</sup>. A titre d'exemple, l'étude de mutations génétiques, dont les séquences ont été déterminées par transcriptomique, pourront être spécifiquement ciblées en SRM. Il sera ainsi possible de quantifier leur expression au niveau protéique pour apporter des informations sur les différents phénotypes de cancer observés. Ce consortium recense aussi des données MS/MS de quantification relative issues d'analyses en aveugle sous la forme d'un catalogue étant une librairie de spectres. Ainsi il sera possible d'en ressortir une liste de protéines différentiellement exprimées à cibler. La Figure 12 illustre un



plan de travail global génomique/protéomique à partir du CPTAC.

Figure 12 : Illustration du plan de travail réalisable à partir du consortium CPTAC, d'après Ellis et al, 2013

Lorsque cela est possible, il est en effet intéressant de partir de données issues d'expériences non ciblées car celles-ci vont apporter une information sur les peptides les plus sensibles à cibler ainsi que sur leurs fragmentations. Des sites internet tels que PeptideAtlas ([www.peptideatlas.org](http://www.peptideatlas.org)) ou MRMAid (<http://138.250.31.29/mrmaid/>) proposent à partir de données non ciblées déposées par la communauté scientifique, de ressortir les meilleurs peptides protéotypiques et les transitions d'une protéine d'intérêt. Cependant les données déposées sont principalement celles de protéines humaines ou de la levure. Si aucune information n'est disponible sur l'organisme d'intérêt, il est alors possible d'extraire assez facilement les peptides et transitions à cibler à partir de bibliothèques issues d'expériences si des expériences DDA ont été déjà menées. Cela peut se faire à l'aide de logiciels comme Skyline 3.0® <sup>44</sup>.

Dans le cas où aucune expérience de masse ne permet d'apporter des informations sur la protéine d'intérêt, celle-ci est digérée *in silico*. Cependant, des précautions sont à prendre dans le choix des peptides à cibler, dans le but d'obtenir un peptide le plus sensible possible et qui soit protéotypique (c'est à dire spécifique de la protéine à doser). La notion de « best responding peptide » est ainsi souvent évoquée. Quelques outils de prédiction de ces peptides<sup>60,61</sup> ont été introduits, mais sont peu utilisés par la communauté probablement à cause de leur manque de fiabilité.

Un certain nombre de règles a été établi pour la sélection de peptides rapporteurs<sup>62-64</sup> :

- La spécificité de la séquence en acides aminés du peptide vis-à-vis de la protéine à doser doit être vérifiée ; cela peut être effectué à l'aide de l'algorithme BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Dans certains cas, il est nécessaire de vérifier la spécificité du peptide vis-à-vis de l'organisme étudié.
- Idéalement, le peptide doit être assez long pour que l'enchaînement d'acides aminés soit le plus spécifique possible (> 8 AA). En revanche, il ne doit pas non plus être trop long car sa fragmentation sera difficile (< 20 AA).
- Il faut éviter de cibler un site de clivage manqué, le peptide ne doit pas contenir de résidus K ou R dans sa séquence ni d'enchaînements qui peuvent induire une digestion aléatoire (K-K, R-R, K-R, R-K, K-P, R-P)
- Les peptides contenant des acides aminés susceptibles de se modifier doivent être évités ; les modifications les plus fréquentes étant l'oxydation sur les résidus Méthionines (M) et les Tryptophanes (W), ainsi que la cyclisation des résidus Glutamines (Q) ou Acide Glutamiques (E) en position N-terminale pour former des pyroglutamates.
- Les motifs pouvant être affectés par des modifications post traductionnelles doivent être évités, c'est notamment le cas des enchainements N-x-T ou N-x-S, susceptibles d'être des sites de glycosylation.

Le panel de peptides disponibles et respectant ces règles dépendra de la protéine ciblée et de sa taille. Il est préconisé de sélectionner au moins deux peptides pour quantifier une protéine, pour noter d'éventuels biais dus à une digestion incomplète de la protéine.

Les séquences des peptides protéotypiques sélectionnés vont ensuite être fragmentées *in silico* pour obtenir une liste de transitions associées suivies en mode SRM. Plusieurs logiciels permettent cette fragmentation *in silico* tels que Skyline 3.0®, MRMPilote, gpmaw.

Une fois la méthode SRM construite, les peptides sélectionnés pourront être identifiés et quantifiés.



### 1.3.3. Les stratégies de quantification de peptides en mode ciblé

Toutes les méthodes de quantification relative décrites dans la partie 1.2.3 peuvent s'appliquer au mode de quantification ciblé. L'avantage de la stratégie peptide centrée est la possibilité de quantifier de manière absolue les protéines d'intérêt *via* leurs peptides rapporteurs. Le dosage absolu d'un analyte, ici le peptide ciblé, est effectué à partir d'un étalonnage externe ou interne.

L'étalonnage externe se réalise à partir d'une gamme de concentration connue en analyte en utilisant une matrice blanche, dans laquelle l'analyte n'est pas présent de façon endogène. Il en résulte une relation linéaire liant la réponse observée à la concentration de l'analyte.

$$\text{concentration de l'analyte} = \frac{\text{signal mesuré} - \text{ordonnée à l'origine de la gamme}}{\text{pente de la gamme}}$$

Équation 1 : calcul de la concentration en analyte par étalonnage externe

Par cette méthode, la protéine PSA, biomarqueur tumoral du cancer de la prostate, cité précédemment, a été quantifiée. Les auteurs ont obtenu une très bonne corrélation avec les tests ELISA de référence ( $r^2=0.96$ )<sup>65</sup>. Dans cet exemple, du plasma de femme a été utilisé comme matrice blanche, c'est un des rares cas où la protéine à doser est spécifique du genre. L'obtention de la matrice blanche est la principale limitation de ce mode d'étalonnage. Il est possible d'utiliser du plasma de rat, proche de celui de l'homme, ou de reconstituer une matrice synthétique. Cependant, les effets matrices subis par l'analyte seront différents de ceux subits dans les conditions endogènes. Pour pallier ces limitations, des méthodes d'étalonnage interne ont été développées.

L'étalonnage interne est la méthode de quantification absolue la plus utilisée. Celle-ci consiste à ajouter un étalon marqué de concentration connue dans l'échantillon. A condition de se trouver dans la zone de linéarité de la réponse, la concentration de l'analyte est calculée d'après la réponse de l'étalon marqué.

$$\text{concentration de l'analyte} = \text{concentration de l'étalon} \times \frac{\text{signal de l'analyte}}{\text{signal de l'étalon}}$$

Équation 2 : calcul de la concentration d'un analyte par étalonnage interne

L'étalon interne est le peptide ciblé, marqué par des isotopes stables ( $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ ). Ses propriétés physico-chimiques sont conservées, mais il comporte une masse plus élevée et sera donc facilement distingué du peptide endogène. Cette méthode est aussi appelée quantification par dilution isotopique.

Trois outils ont été développés pour quantifier une protéine par dilution isotopique, ils sont nommés AQUA, QCAT, PSAQ.

En 2003, Gerber et al <sup>4</sup> décrivent la méthode AQUA pour Absolute QUAntification. Celle-ci consiste à marquer par des isotopes lourds ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), un ou plusieurs acides aminés d'un peptide ayant la même séquence que le peptide rapporteur choisi. Le peptide marqué a ainsi les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide naturel et il pourra ainsi corriger les biais analytiques encourus en aval de la digestion enzymatique. Ce mode d'étalonnage est très utilisé de par le coût et la simplicité d'obtention des peptides marqués. En effet, les délais de synthèse sont relativement courts (de 4 à 6 semaines), de plus le produit peut être obtenu avec une pureté proche de 100%, et enfin le produit peut être facilement mesurable par pesée. En revanche cette stratégie ne corrige les biais qu'au niveau peptidique. Les pertes éventuellement encourues avant la digestion enzymatique (étape de déplétion des protéines majoritaires, purification de la protéine d'intérêt), ou l'obtention d'un mauvais rendement de digestion ne sont pas corrigés par la stratégie d'étalonnage AQUA.

Pour corriger les pertes au niveau protéique, Beynon et al <sup>66</sup>, proposent en 2005 une méthode alternative appelée QCAT, pour Quantification conCATamer, où l'étalon est une protéine recombinante chimérique lourde, contenant l'ensemble des peptides à doser. En pratique cette stratégie ne corrige ni les pertes avant la digestion ni le rendement de digestion puisque ces biais dépendent des propriétés physico-chimiques de la protéine ; c'est-à-dire de sa séquence en acides aminés (structure primaire) et de sa conformation (structures secondaire et tertiaire).

L'approche PSAQ pour Protein Standard Absolute Quantification développée par Brun et al en 2007 <sup>67</sup>, propose un étalonnage à l'aide d'une protéine recombinante de même séquence que la protéine naturelle mais ayant incorporé des acides aminés marqués par des isotopes stables. Cet étalon ajouté dès le début de la préparation d'échantillon permet de corriger les pertes liées à la purification de la protéine cible mais aussi de corriger le rendement de digestion. En revanche, l'obtention des étalons PSAQ est coûteuse et leur purification est parfois difficile <sup>68</sup>.

Il semble tout de même important d'ajouter que quelle que soit la méthode de quantification choisie, de mauvais rendements de digestion sont préjudiciables à la reproductibilité et à la sensibilité de la méthode.

### 1.3.4. Apports et limites des modes ciblés

Le mode PRM est actuellement bien moins utilisé que le mode SRM. Ceci est certainement en partie dû aux limitations engendrées par l'appareillage utilisé (TOF ou Orbitrap), moins rapide que celui utilisé pour travailler en mode SRM (jusqu'à 50 MS/MS par seconde avec un QTOF contre 100 transitions par seconde avec un triple quadripôle) limitant ainsi la capacité de multiplexage du mode PRM. De plus, intrinsèquement, le triple quadripôle est l'appareillage le plus sensible et le plus robuste. En revanche, la faible résolution du triple quadripôle (de l'ordre de 0.7 Th) peut être une limite en termes de spécificité d'analyse. Ainsi, par l'apparition d'interférences diminuant le rapport signal/bruit, la sensibilité attendue peut être affaiblie. Pour pallier cette limitation, des améliorations dans la préparation des échantillons ainsi que des développements instrumentaux ont été proposés.

Le fractionnement des échantillons déjà cité dans la partie précédente peut être une bonne stratégie. Cependant, dans une approche ciblée, il peut être intéressant de réaliser de l'immuno-enrichissement au niveau peptidique par la technologie SISCAPA (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies), développée par N. Anderson et A. Paulovich<sup>69,70</sup>. Cette technique utilise des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre des peptides cibles rapporteurs de protéines humaines d'intérêt. Après digestion du plasma humain, l'échantillon est déposé sur un support solide contenant les anticorps. Ceux-ci fixent alors les peptides d'intérêt ainsi que leurs étalons internes. Le support est ensuite rincé pour éliminer les interférents et ne conserver que les peptides ciblés. Cette technique n'est actuellement disponible que pour cibler des protéines humaines et reste très coûteuse. Les problématiques liées à l'utilisation des anticorps sont les mêmes que celles recensées pour les tests ELISA.

Pour s'affranchir des méthodes utilisant des anticorps, en 2013, Shi *et al.* ont développé une approche intéressante dénommée PRISM « High Pressure, High Resolution separations coupled with Intelligent Selection and Multiplexing »<sup>71,72</sup> dont le principe est décrit Figure 13.

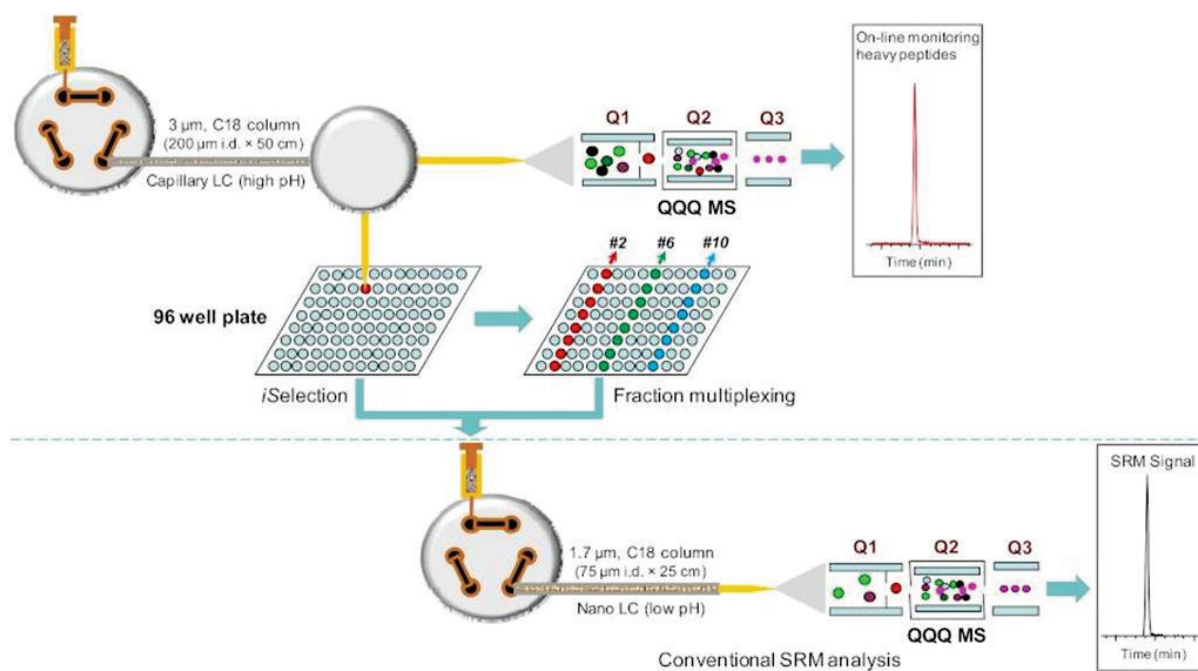


Figure 13 : Principe de l'analyse PRISM, d'après Shi et al, 2012

La stratégie PRISM utilise une première longue séparation sur une phase de polarité inversée de type C18 à pH basique pour fractionner fortement l'échantillon dans lequel des peptides marqués isotopiquement ont été ajoutés. Environ 10% de l'éluat est continuellement analysé par un spectromètre de masse ciblant uniquement les peptides lourds alors que le reste de l'éluat est collecté toutes les minutes dans un puit différent. Une fois le puits ciblé, son contenu est séparé sur une phase de polarité inversée de type C18 à pH acide et analysé par SRM. L'orthogonalité des deux méthodes chromatographiques simplifie grandement la matrice et permet d'abaisser grandement la limite de détection.

Quel que soit la stratégie de préparation d'échantillon utilisée, plus celle-ci sera spécifique d'une protéine ou d'un peptide, plus le développement de grands multiplexages ciblant de nombreuses protéines ou peptides sera difficile.

Des développements instrumentaux tels que celui la MRM<sup>3</sup> introduit en 2009 par l'équipe de J. Lemoine ont permis aux méthodes SRM de gagner en spécificité <sup>73</sup>. Le principe utilise la capacité des appareils hybrides Q-Trap à piéger les ions fragments dans la trappe linéaire (LIT) pour les re-fragmenter. Un balayage des ions fragments générés par cette seconde fragmentation est effectué (Figure 14). Le rapport signal/bruit est alors considérablement amélioré et peut permettre d'abaisser ainsi les limites de quantification.

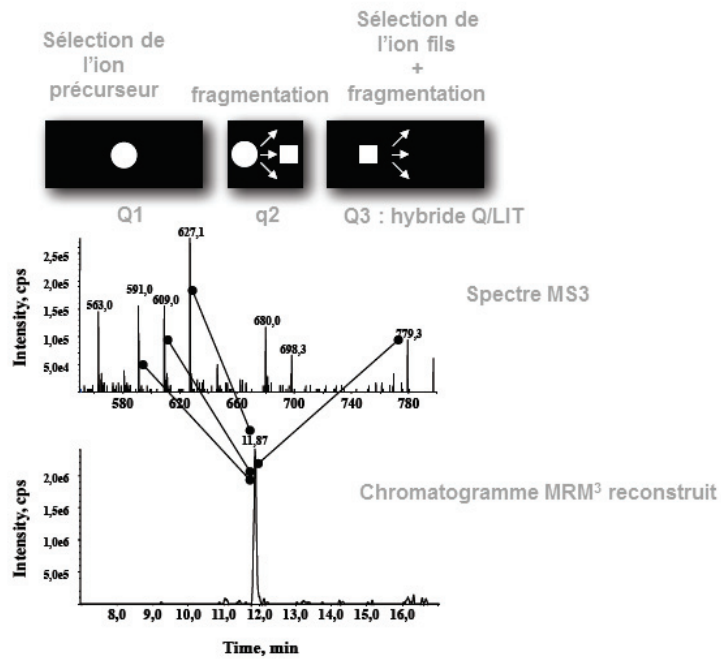


Figure 14 : Principe de la MRM3, d'après Fortin et al <sup>65</sup>, 2009

En revanche, les temps de cycles en MRM<sup>3</sup> sont plus longs qu'en SRM à cause du temps d'accumulation dans la trappe (pour une expérience : environ 200 ms en MRM<sup>3</sup> contre 10 ms en SRM). Il est donc difficile à l'heure actuelle de réaliser des multiplexages importants en MRM<sup>3</sup>.

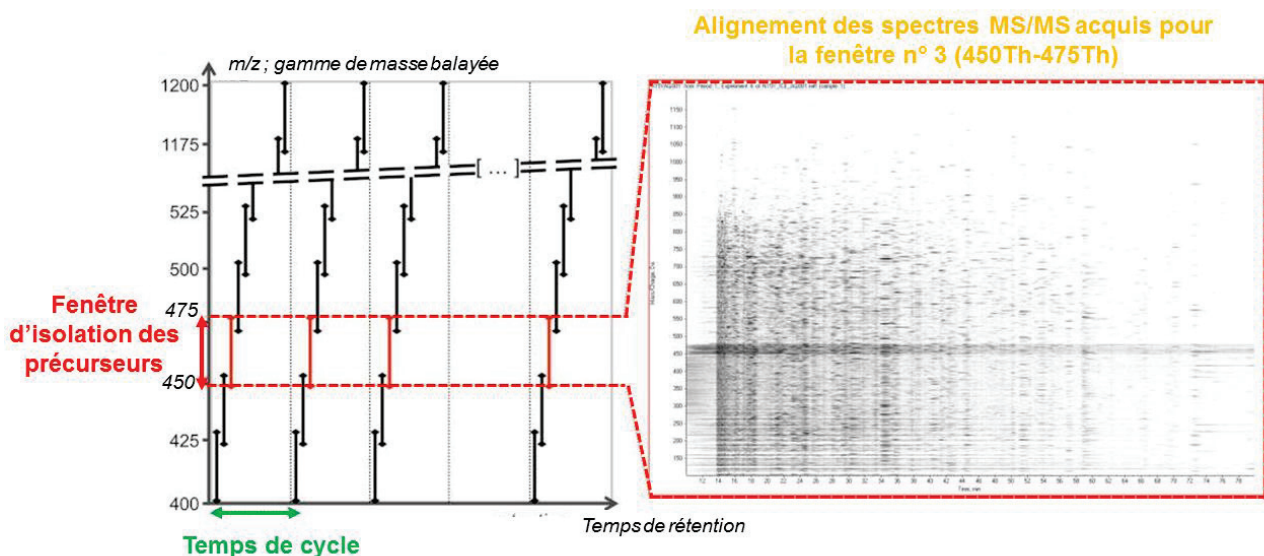
La capacité de multiplexage du mode SRM, c'est-à-dire la capacité à cibler dans une même méthode, différentes protéines d'intérêt, apparaît comme un enjeu majeur de la stratégie d'analyse peptidique ciblée. Ces approches n'ont cessé d'être améliorées par l'arrivée d'instruments plus rapides et par le développement du mode Scheduled-SRM. Le mode Scheduled-SRM permet de suivre un analyte seulement pendant un temps donné (fenêtre autour de son temps de rétention) et permet le développement d'analyses multiplexées <sup>64</sup>. L'augmentation de la capacité de multiplexage apportée entre autre par le mode Scheduled-MRM sera détaillée en introduction du chapitre 3 de cette thèse.

Cependant les données acquises en mode ciblé (mode SRM ou PRM confondus) ne donnent des informations que sur le panel de peptides choisis au début de l'expérience. Si une nouvelle protéine apparaît comme intéressante, une nouvelle méthode doit être développée. L'échantillon ou la cohorte d'échantillons doivent être à nouveau analysés, allongeant ainsi le temps de l'expérience et des analyses. Ces questionnements ont conduit au développement d'un mode d'acquisition indépendant des données, appelé DIA (Data Independent Acquisition), qui est décrit dans le paragraphe suivant.

### 1.3.5. Le mode DIA : Data Independant Acquisition, une alternative ?

L'acquisition indépendante de données combine les avantages des approches ciblées et non ciblées : le mode DDA pour la caractérisation et l'analyse protéomique en profondeur et le mode SRM pour sa robustesse au niveau quantitatif. Le principe majeur de l'analyse en mode DIA est l'acquisition systématique de spectres MS/MS quel que soit le contenu du scan de surveillance. Ce mode d'analyse est défini comme peptide centré de par la manière dont sont analysées les données. En effet, la présence d'un peptide donné est vérifiée de manière directe dans l'échantillon par rapport à une hypothèse de départ et non estimée par une approche statistique comme c'est le cas dans l'approche spectre centrée<sup>23</sup>.

La notion d'acquisition indépendante des données a été introduite en 2004 par une équipe travaillant sur une approche automatique de quantification de protéines dans des échantillons complexes<sup>74</sup>. Leur méthode est basée sur l'isolation et la fragmentation séquentielle de précurseurs compris dans une fenêtre de 10 Th à l'intérieur d'une trappe à ions, jusqu'à l'obtention de la masse désirée. Cette méthode a donné naissance à la méthode SWATH-MS développée par le groupe de R. Aebersold<sup>75</sup>, dont le principe est illustré par la Figure 15. Dans cet exemple, l'acquisition séquentielle des ions fragments est réalisée par des fenêtres d'isolation de précurseurs de 25 Th qui se recouvrent. La gamme balayée va de 400 à 1200 Th par 32 pas de 25 Th. A droite, est représenté un alignement de tous les spectres acquis tout au long du gradient chromatographique, pour la fenêtre



d'isolation n° 3 sur 32.

Figure 15 : Principe du mode DIA par la méthode SWATH-MS, d'après Gillet et al, 2012

L'analyse DIA est menée sur le même type d'appareillage que l'analyse DDA. Typiquement un quadripôle filtre les précurseurs selon une fenêtre de masse définie (25 Th dans

l'exemple de la Figure 13), l'ensemble de ces précurseurs est fragmenté dans la cellule de collision et les fragments sont analysés par un analyseur haute résolution (TOF ou Orbitrap). Ceci permet de générer une carte en trois dimensions : temps de rétention – rapport  $m/z$  des ions fragments – intensité, pour chacune des fenêtres de sélection des ions précurseurs (Figure 15, droite).

Les données générées par l'analyse DIA par la méthode SWATH-MS sont très informatives et sont quantitatives. Ainsi, l'équipe d'Aebersold a montré la quantification de 342 protéines plasmatiques par 1904 peptides dans une population de jumeaux <sup>76</sup>. L'analyse DIA peut aussi être conduite sur un appareillage de type Q-Orbitrap, comme le montre des travaux de Bruderer *et al.* en 2015 comparant la qualité des données récoltées entre une analyse en mode DDA et une analyse en mode DIA pour la quantification de protéines dans des tissus de foie <sup>51</sup>.

D'autres équipes utilisent une méthode DIA appelée MS<sup>E</sup>, au départ développée pour l'analyse de petites molécules <sup>77</sup> mais maintenant utilisée en protéomique <sup>78</sup>. Le principe de cette méthode est une alternance dans un même cycle de scans MS et MS/MS de la totalité des précurseurs présents. Dans cette méthode le lien entre le précurseur et les spectres MS/MS est encore plus difficile à faire et ceux-ci sont potentiellement plus « bruités » <sup>75</sup>.

Comme il a déjà été cité précédemment, l'avantage majeur des méthodes DIA est la possibilité d'interroger les données *a posteriori*. En revanche, l'analyse de ce type de données est beaucoup plus fastidieuse et difficile à appréhender que celles générées par les modes ciblés (SRM et PRM). De plus, l'identification correcte des spectres générés est dépendante de la qualité des données de la librairie DDA initiale.

L'approche DIA apparaît comme une réelle alternative dans la quantification relative par rapport au mode DDA. Cependant, au vue de la complexité des données générées, cette approche devient une analyse avec *a priori* où une liste de protéines d'intérêt sera recherchée parmi l'ensemble des données récoltées. De ce fait, les modes ciblés sont actuellement des méthodes de choix pour la quantification absolue de protéines. Ceci est dû à la fois à la sensibilité et la reproductibilité de ces analyses, mais aussi au traitement simple et rapide des données.

## 1.4. Synthèse

Cette synthèse est illustrée sous forme d'un tableau proposant un résumé des performances des différentes méthodes d'analyse protéomique par spectrométrie de masse (Tableau 1). Pour obtenir la plus grande couverture du protéome, l'idéal serait d'utiliser une combinaison des modes DDA, DIA et ciblés (PRM / SRM). En première intention une analyse non ciblée en mode DDA apparaît très exhaustive et permet d'établir un catalogue de protéines d'intérêt potentiel. Cette liste de protéines pourra être recherchée dans les données générées par une analyse DIA, qui apportera une information quantitative de meilleure qualité. Puis, les cibles différentiellement exprimées seront quantifiées de manière absolue et validées par une analyse SRM. L'intérêt de la combinaison de méthodes (DDA et SRM) est décrit dans différentes revues<sup>79,80</sup>.

L'axe principal de ce travail de thèse s'est orienté sur les aspects de quantification de protéines dans des matrices complexes. Dans ce contexte, l'analyse ciblée, en particulier en mode SRM, est à ce jour la stratégie la plus avantageuse (sensible, robuste, analyse simple des résultats). Les travaux de recherche présentés dans les chapitres 2 et 3 décrivent les capacités de ce mode d'analyse, tout en proposant des perspectives d'amélioration aux stratégies existantes. Tout d'abord, une première méthode de quantification absolue de la polyprotéine du virus chimère candidat vaccin contre la dengue a été développée. Cela nous a permis de nous pencher sur l'amélioration de la méthodologie complète de quantification par un étalonnage interne de type AQUA. Ensuite, c'est une méthode de quantification relative sans marquage du protéome d'un phytophage, *Dickeya dadantii*, qui a été développée. Pour y parvenir, nous avons développé un nouvel outil de pilotage des instruments de type triple quadripôles afin d'améliorer la portabilité des analyses SRM hautement multiplexées.





STRATÉGIE	PEPTIDE CENTRÉE	
Mode d'acquisition	DIA	Ciblé : SRM ou PRM
Contexte le plus favorable	Identification et quantification à partir d'un catalogue de protéines d'intérêt	Vérification d'une hypothèse Quantification absolue Validation de biomarqueurs
Méthodologie		
Aspects quantitatifs	Principalement quantification relative	Quantification relative et absolue (PSAQ, QCAT, AQUA)
Apports principaux	Quantification multiplexée >100 protéines Reproductibilité Ré-interrogation a posteriori	Quantification absolue Reproductibilité Sensibilité
Inconvénient majeur	Traitement des données fastidieux	Capacité de multiplexage

Tableau 1 : Comparaison des approches d'analyses protéomiques par spectrométrie de masse en tandem



## CHAPITRE 2 :

# Développement d'une méthode alternative de contrôle des lots de production du virus candidat vaccin contre la dengue

---

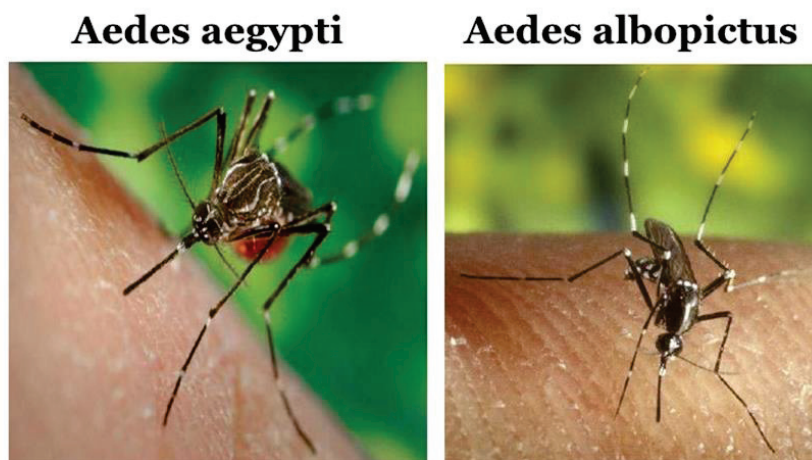


## 2.1. Contexte de l'étude

Cette étude a été réalisée pour le compte de Sanofi Pasteur, plus particulièrement pour la plateforme Caractérisation Biophysique et Biochimique (CBB), du pôle Recherche et Développement du site de Marcy l'Etoile. L'objectif de ce projet était dans un premier temps de développer un dosage par spectrométrie de masse des protéines du virus chimère du candidat vaccin contre la dengue ; puis, dans un second temps, de transférer la méthode à l'équipe partenaire, dirigée par Catherine Manin, responsable d'unité de recherche.

### 2.1.1. Etiologie de la dengue

La dengue est une maladie virale transmise à l'homme par les piqûres de moustiques tigres femelles infectées. La transmission se fait principalement par les moustiques de l'espèce *Aedes aegypti* et dans une moindre mesure par ceux de l'espèce *Aedes albopictus* (Figure 16). L'être humain est le principal porteur du virus et permet sa prolifération en contaminant les moustiques non infectés, jusqu'à une dizaine de jours



après l'apparition des premiers symptômes.

Figure 16 : Photographies des espèces *A. aegypti* et *A. albopictus* responsables de la transmission de la dengue

L'infection par le virus de la dengue provoque dans la majorité des cas un symptôme grippal apparaissant brutalement après une période d'incubation de 2 à 7 jours. La personne infectée développe une forte fièvre accompagnée de céphalées, de nausées, d'éruptions cutanées et de douleurs articulaires et musculaires. Les symptômes régressent rapidement au bout d'une semaine. En revanche, chez certains patients la maladie évolue

vers des complications potentiellement mortelles. Cette forme est appelée dengue hémorragique ou dengue sévère.

La dengue sévère peut être détectée entre 3 à 7 jours après l'apparition des premiers signes. Les symptômes s'accroissent : douleurs abdominales sévères, vomissements persistants contenant parfois du sang, saignements de gencives et détresse respiratoire. Le patient est alors en état de choc et sa mort peut survenir dans les 24 à 48 heures suivant cette phase critique <sup>81,82</sup>.

En 2015, les données de l'OMS, Organisation Mondiale de la Santé, recensent environ 390 millions de cas de dengue par an, dont autour de 96 millions présentant des manifestations cliniques, quelle qu'en soit la gravité. La dengue est surtout répandue dans les pays tropicaux, mais l'incidence de cette maladie a progressé dans le monde entier au cours de ces dernières décennies. Dorénavant, 128 pays sont exposés à l'infection par le virus de la dengue (Figure 17). La dengue est maintenant endémique dans plus de 100 pays situés principalement en Afrique, en Amérique Centrale, en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental <sup>83-87</sup>. De plus en plus de nouvelles zones sont touchées par la dengue, en Europe par exemple l'InVS, Institut de Veille Sanitaire, précise que des cas de transmission locaux ont été rapportés en France, en Croatie et au Portugal. Cette expansion est due d'une part au réchauffement climatique, mais aussi à la capacité du moustique tigre de l'espèce *Aedes albopictus* à survivre à des températures plus froides, voire à hiberner <sup>88,89</sup>.

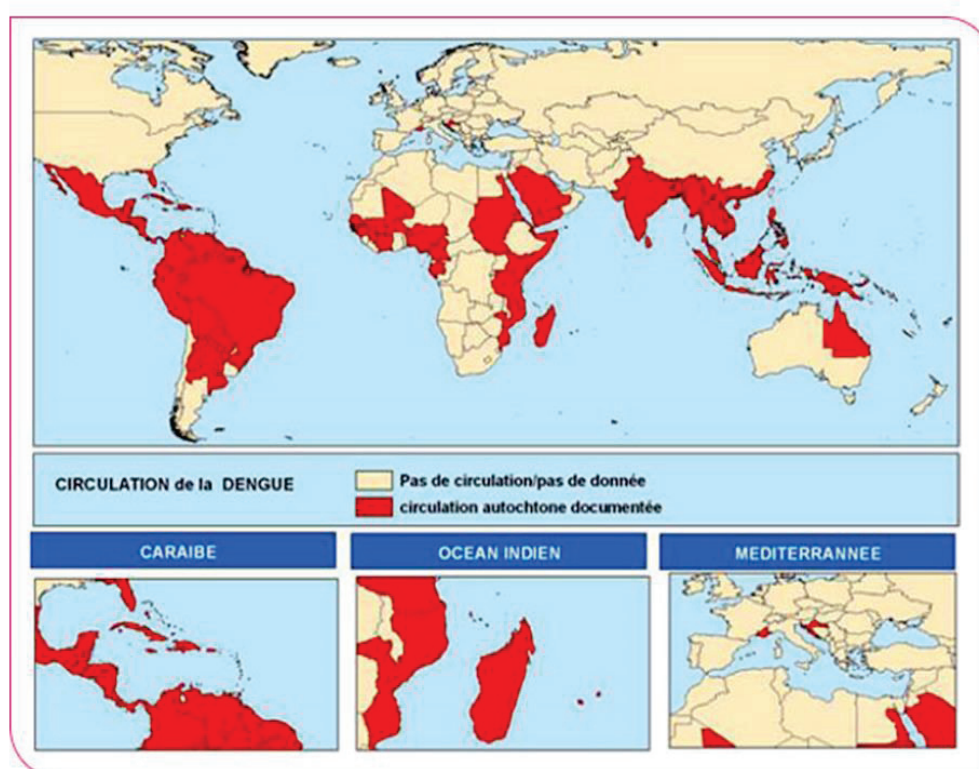


Figure 17 : Carte des régions à risque de transmission de la dengue en 2011, d'après l'Institut de Veille Sanitaire

Toujours selon l'OMS, la dengue sévère cause l'hospitalisation chaque année de 500 000 personnes, dont une majorité d'enfants. Malheureusement, environ 2.5% d'entre eux en meurent.

En effet, il n'existe actuellement aucun traitement anti-viral spécifique de la dengue. De ce fait, le meilleur moyen de diminuer le taux de mortalité est une prise en charge médicale adaptée des personnes infectées <sup>81</sup>.

Il est donc important de lutter contre la propagation du virus. Cette lutte préventive passe par la protection individuelle contre les piqûres de moustiques (port de vêtements longs, moustiquaires, insecticides...) et par le contrôle du développement des moustiques vecteurs (élimination des déchets, nettoyage des conteneurs d'eau, gestion des gîtes larvaires...).

La prévention par vaccination est une méthode de lutte très efficace contre la propagation des virus mais malgré de nombreuses études, aucun vaccin contre la dengue n'était disponible jusqu'à présent. Au mois de décembre 2015, le vaccin contre la dengue, développé par Sanofi Pasteur a été autorisé au Mexique. Celui-ci a ensuite été également enregistré au Brésil, au Salvador et aux Philippines, pays où la dengue est endémique et une question de santé publique prioritaire.

### 2.1.2. Structure du virus de la dengue

Le virus de la dengue (Dengue virus, DENV) fait partie de la famille des Flavivirus, dans laquelle sont retrouvés principalement d'autres virus transmis par les moustiques. Outre le virus de la dengue, ce groupe contient le virus de la fièvre jaune (Yellow fever virus, YFV), celui du Nil occidental (West Nile Virus, WNV) et le virus Zika (Zika virus, ZIKV).

Le DENV existe sous quatre sérotypes différents appelés DENV1-4 <sup>90</sup>. Ces différents sérotypes possèdent entre 60 et 80% d'homologie de séquence avec des variations en particulier sur l'expression de leurs protéines de surface. La guérison d'un individu entraîne une immunité à vie uniquement contre le sérotype à l'origine de l'infection alors que l'immunité contre les autres sérotypes est partielle et temporaire. De plus, des infections ultérieures par d'autres sérotypes accroissent le risque de complication en dengue hémorragique.

Les Flavivirus possèdent une structure identique. Ainsi, le génome du DENV est un ARN simple brin d'environ 11000 bases, codant pour une polyprotéine unique, dont la structure est représentée sur la Figure 18-A. La polyprotéine est divisée en trois protéines de structure ainsi qu'en sept protéines non structurales (appelées NS proteins). Les protéines

de structure sont la protéine de la capside (C), la protéine de l'enveloppe (E) ainsi que la protéine de la membrane (M) <sup>91</sup>. Cette dernière est issue du clivage d'une protéine précurseur appelée pré-membrane (prM). Le clivage est réalisé lors de la maturation du virus dans la cellule hôte, par une enzyme appelée Furine <sup>91</sup> (Figure 18-A).

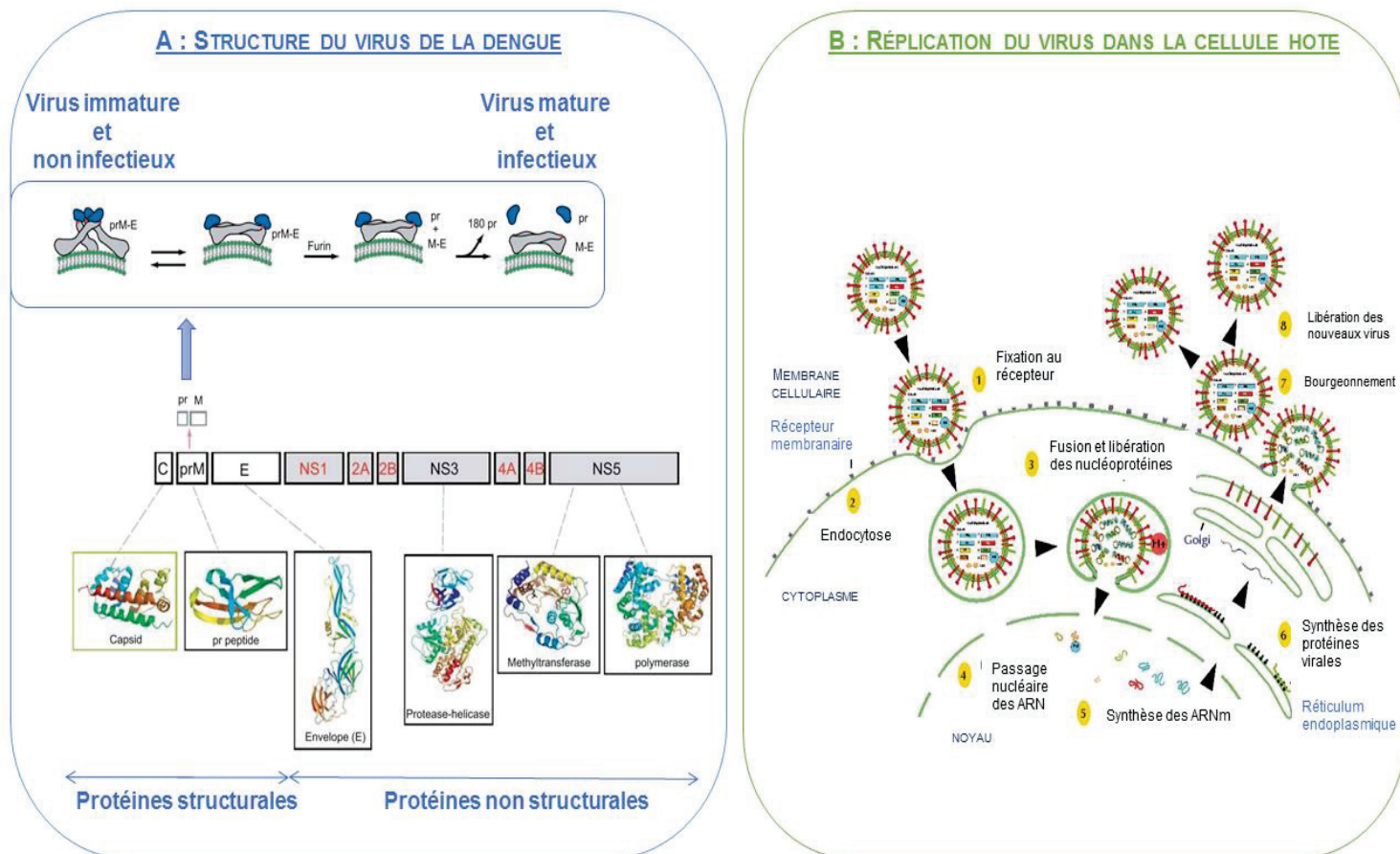


Figure 18 : Schéma de la structure et de la répllication du virus de la dengue, d'après Perera et Kuhn, 2008

La particularité du virus à synthétiser une polyprotéine unique fait que toutes les protéines qui en dérivent seront à la même concentration molaire. Cela signifie que si les particules virales sont intactes et bien formées, une mole de polyprotéine donne une mole de protéine E, une mole de protéine C, une mole de protéine M, une mole de protéine pr.

La protéine E permet l'entrée du virus dans la cellule cible en se liant aux récepteurs membranaires. Le virus entre alors en fusion avec une vésicule endosomiale et son génome se libère dans le cytosol. Celui-ci est traduit en la polyprotéine décrite ci-dessus puis répliqué par les ARN-polymérase de la cellule cible. Ces « virus » immatures vont subir différentes étapes de maturation dans les compartiments cellulaires de la cellule hôte, ce qui leur donnera leur conformation finale. Une fois matures, les virus sont à



nouveaux transportés par des vésicules et passent dans le milieu extracellulaire, où ils pourront ainsi infecter de nouvelles cellules (Figure 18-B).

### 2.1.3. Historique du candidat vaccin développé par Sanofi Pasteur

L'OMS estime que plus de 2 à 3 millions de décès par ans sont évités grâce à la vaccination. C'est un excellent moyen de lutte préventive contre des maladies infectieuses potentiellement mortelles telles que la dengue.

L'objectif de la vaccination préventive est de stimuler les défenses immunitaires naturelles d'un individu contre les antigènes d'un agent pathogène donné. L'intérêt vient du fait que le système immunitaire est capable de le garder en mémoire, ce qui protégera l'organisme d'une nouvelle infection par ce même pathogène. La vaccination est le procédé par lequel un antigène, dont la pathogénicité est atténuée, est injecté à l'organisme et induit une réponse immunitaire positive et spécifique dont l'explication est illustrée par la Figure 19.

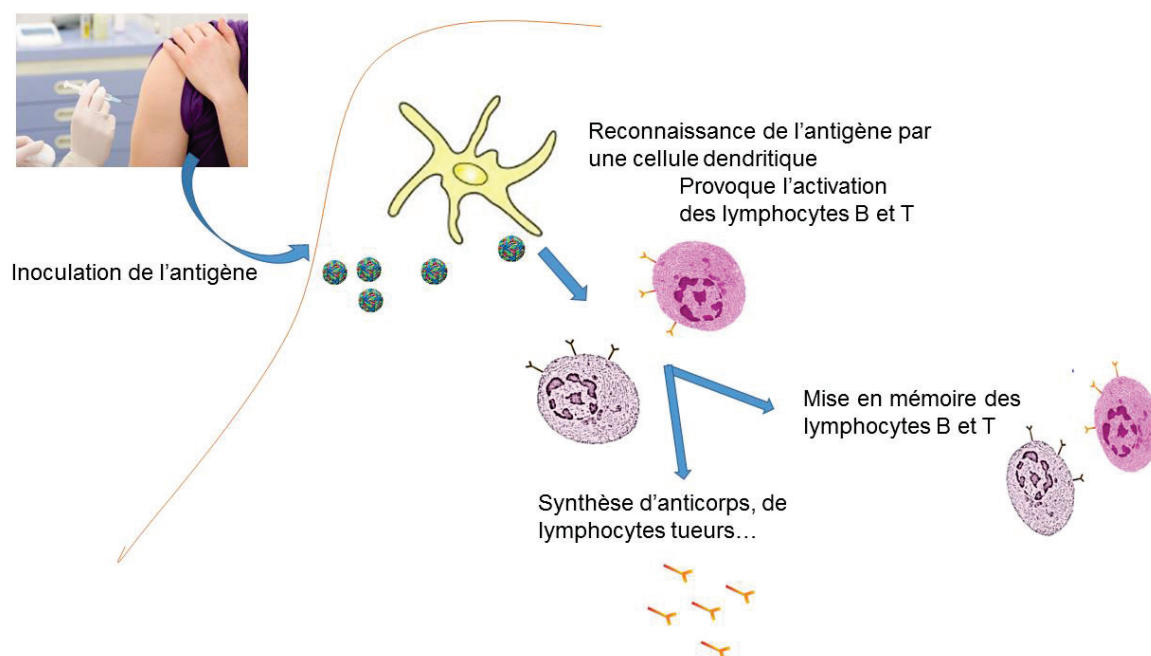
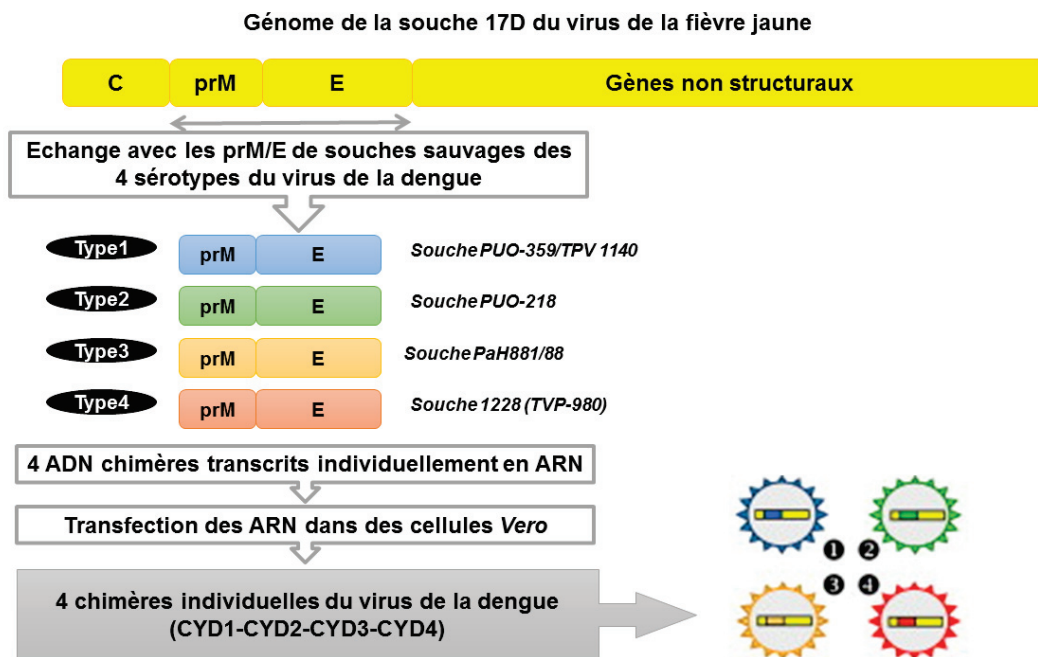


Figure 19 : Schéma du principe de la vaccination

Brièvement, l'antigène inoculé à l'organisme est capté par les cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes. Ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques afin de présenter l'antigène aux lymphocytes. Ceci provoque l'activation de lymphocytes T, tueurs et de lymphocytes B, producteurs d'anticorps. Ceux-ci vont permettre l'élimination de l'antigène, c'est la réponse immunitaire innée. De plus, quelques lymphocytes B et T mémoires ainsi que des anticorps spécifiques de l'antigène sont conservés dans l'organisme, c'est l'immunité acquise. Une nouvelle infection impliquant le même pathogène entraînera une réponse plus forte et plus rapide de l'organisme.

Différentes stratégies de vaccinations sont employées, le vaccin contre le tétanos est ainsi une anatoxine (toxine inactivée), celui contre la peste est un virus inactivé, celui contre la fièvre jaune est un virus vivant atténué... Ces différentes stratégies ont été testées pour la recherche d'un vaccin contre la dengue. Mais la plus prometteuse est celle utilisant le principe de la production d'un virus recombinant, aussi appelé chimère fièvre jaune dengue, ou encore CYD pour Chimeric Yellow fever Dengue <sup>92</sup>.

Un de ces candidats CYD est développé depuis 20 ans par Sanofi Pasteur, ce qui a permis de créer un candidat vaccin tétravalent de la dengue (TDV), ayant pour objectif d'induire une réponse immunitaire contre les quatre sérotypes du virus. Ce candidat vaccin est appelé CYD-TDV, pour Chimeric Yellow-fever-DENV Tetravalent <sup>93</sup>. Le candidat vaccin CYD-TDV est un virus vivant atténué composé de quatre virus CYD exprimant chacun des gènes de structure des quatre sérotypes du virus de la dengue, codant pour (i) la protéine d'enveloppe (E), (ii) la protéine pré-membrane (prM) (Figure 20). Ces gènes ont été prélevés dans des souches sauvages du virus de la dengue et placés dans le génome de la souche 17D du virus de la fièvre jaune (YFV17D) dont l'immunogénicité et l'innocuité sur la santé humaine sont connues <sup>94</sup>. Les protéines E et prM des quatre sérotypes de la dengue sont exprimées à la surface du CYD et sont les antigènes spécifiquement reconnus



par le système immunitaire.

Figure 20 : Schéma du principe de la construction du virus chimère fièvre jaune dengue (CYD), d'après Guy et al, 2011

La production de chaque sérotype de CYD est réalisée de manière indépendante par réplication des virus chimères dans des cellules de singes d'une lignée appelée cellules Vero. Les cultures sont ensuite centrifugées et filtrées afin d'enlever les débris cellulaires. A

cette étape, les lots obtenus sont appelés « virus partiellement purifiés » ou « vrac ». Pour former le vaccin final, des adjuvants et des stabilisateurs sont ajoutés.

Le candidat vaccin, nommé Dengvaxia®, est désormais disponible sur le marché dans quelques pays tel que le Brésil, le Mexique, le Salvador... Le développement du vaccin a nécessité entre autre un vaste programme de tests cliniques, effectué sur 40 000 personnes d'âges, de sexes, de contextes épidémiologiques, de milieux socio-économiques différents, et qui vivent dans 15 pays de zones géographiques éparses. La Figure 21 représente de manière synthétique la stratégie de développement du vaccin jusqu'aux phases de tests cliniques puis de mise sur le marché du Dengvaxia®.

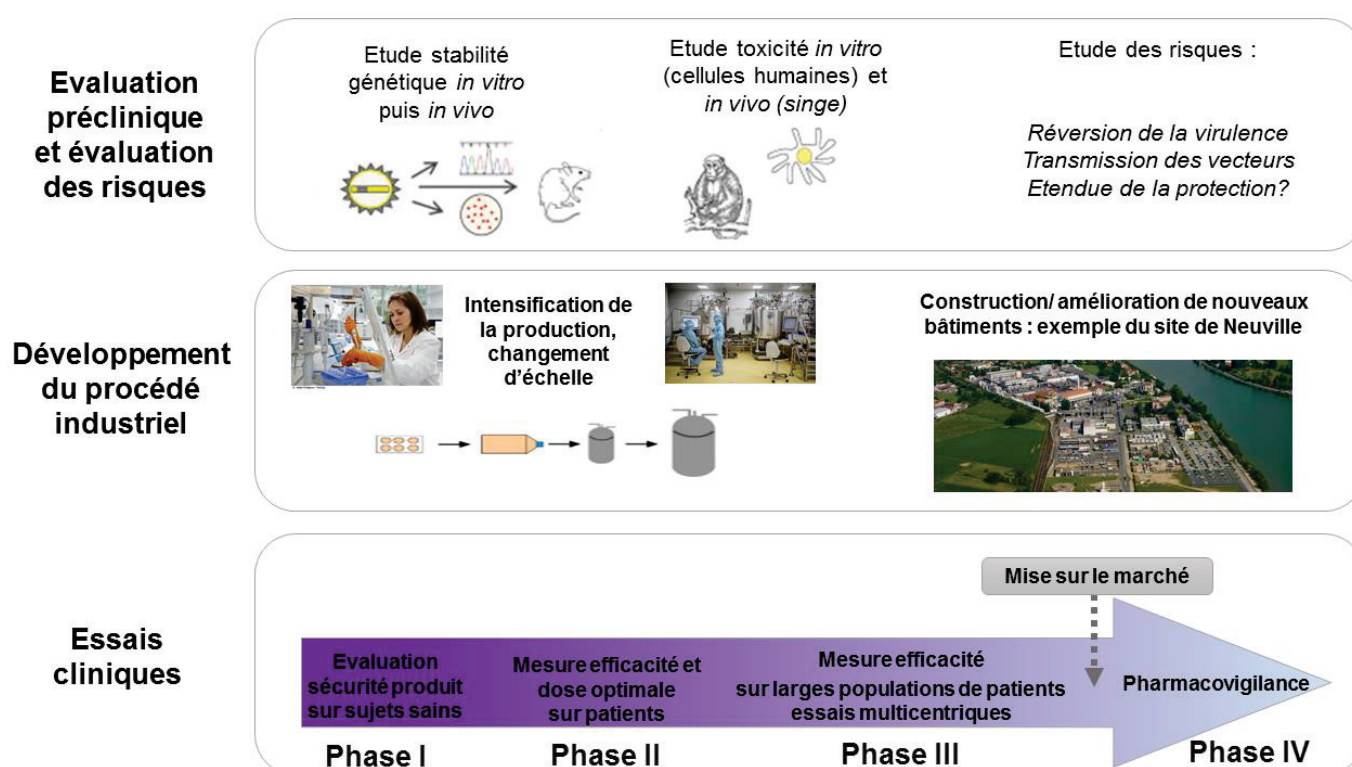


Figure 21 : Stratégie de développement du Dengvaxia®, d'après Guy et al, 2011

L'optimisation et le contrôle du procédé industriel sont nécessaires dès les premières phases de développement clinique, au cours desquelles les premiers lots de vaccins sont produits. En effet, le vaccin doit avoir une concentration constante et connue des quatre virus CYD.

La croissance des virus chimères dans les cellules est difficilement contrôlable en temps réel. Or, il est important de pouvoir mesurer la quantité et la qualité des particules virales à cette étape, puisqu'ensuite les cultures sont mixées entre elles pour obtenir le candidat vaccin CYD-TDV.

### 2.1.4. Les méthodes de dosage de virus, applicabilité au virus CYD ?

La majorité des méthodes de dosage de virus est réalisée par des dosages immuno-enzymatiques ou par biologie moléculaire. Un récapitulatif des principales techniques de quantification de virus est donné dans le Tableau 2 avec des exemples de travaux sur le dosage du virus de la dengue ou des revues générales sur la technique.

« TECHNIQUE »	EXEMPLES DE METHODES	ENTITE MESUREE	PRINCIPE	INCONVENIENT	REVUES OU PUBLICATIONS
<b>INFECTION DE CELLULES</b>	Dosage sur plaques virales	Titre infectieux	Comptage des plaques formées par les cellules lysées	Comptage manuel : reproductibilité et temps	Dulbecco R, 1952 <sup>95</sup> LaBarre D et al, 2001 <sup>96</sup>
<b>ANTICORPS</b>	ELISA	Protéine virale	Capture du virus par un anticorps spécifique, révélation enzymatique	Disponibilité de l'anticorps	Puttikhunt C et al, 2011 <sup>97</sup> Youg PR et al, 2000 <sup>98</sup>
<b>BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>	RT-qPCR	Acides nucléiques viraux	Amplification des ARN viraux, révélation fluorescence	Précision et reproductibilité	Menting S et al, 2011 <sup>99</sup>
<b>IMAGERIE</b>	MET (Microscope Electronique à Transmission)	Particule virale	Comptage du nombre de particules observées	Echantillonnage : Semi quantitatif, temps et reproductibilité	Weidmann M et al, 2011 <sup>100</sup>
<b>OPTIQUE</b>	Cytométrie de Flux		Comptage du nombre de particules passant devant laser		Kraus A et al, 2007 <sup>101</sup>
<b>SPECTROMETRIE DE MASSE</b>	ESI-MS/MS	Protéine virale	Mesure masse/charge de peptides protéotypiques	Main d'œuvre qualifiée, coût, <u>très peu utilisée</u>	Santana WI et al, 2014 <sup>102</sup> Williams TL et al, 2008 <sup>103</sup>

Tableau 2 : Synthèse des différentes techniques de quantification de virus

Pour doser le virus de la dengue, les méthodes ELISA utilisent des anticorps spécifiques d'une des protéines non structurale (NS1) du virus. Cependant, le candidat vaccin est un virus chimère et aucun anticorps n'est actuellement disponible pour le doser. Pour doser les quatre CYD par ELISA il aurait fallu développer quatre anticorps différents ; pour les raisons déjà évoquées dans le Chapitre 1, cette stratégie n'a pas été retenue.

Par le développement d'amorces spécifiques des quatre sérotypes du CYD, un dosage par RT-qPCR est actuellement utilisé à Sanofi Pasteur. Cependant, la précision ainsi que la reproductibilité de ces dosages sont assez faibles. Ainsi, l'incertitude de la mesure est de l'ordre de 0.2 à 0.3 Geq/mL (Génome Equivalent par millilitre). Comme cette unité est logarithmique, en valeur absolue, la variation peut être d'un facteur 2 à 3 entre deux

dosages. La mesure du titre génomique est en revanche actuellement la méthode de dosage demandée par les normes pour la validation de lots de production de vaccin.

Des mesures de microscopies électroniques sont également utilisées à Sanofi Pasteur, principalement pour vérifier la bonne conformation des virus.

Le dosage par spectrométrie de masse en tandem des différentes protéines des quatre CYD apporterait des informations complémentaires au dosage du titre génomique mais aussi aux analyses de conformation des virus. En effet, la mesure de la concentration de chaque protéine du virus CYD donnera accès à la dose de la polyprotéine. De plus, la vérification de la bonne équimolarité entre les différentes protéines C, E et M permet de vérifier que le virus CYD est bien assemblé.

## 2.2. Méthodologie suivie pour le dosage du virus CYD candidat vaccin par spectrométrie de masse en tandem

L'objectif de ce projet est de doser les protéines C, E, pr et M du virus CYD candidat vaccin. Puisque les protéines d'intérêt sont connues, il a été choisi de travailler selon la stratégie « peptide centrée ». De ce fait, une méthode de dosage ciblée par SRM a été développée. Ce mode a été choisi pour sa reproductibilité mais aussi pour sa facilité de transfert.

Nous avons vu dans le Chapitre 1 la mise en œuvre générale d'une analyse en mode ciblé. La méthodologie suivie pour cette étude suit ce plan et est décrite sur la Figure 22.

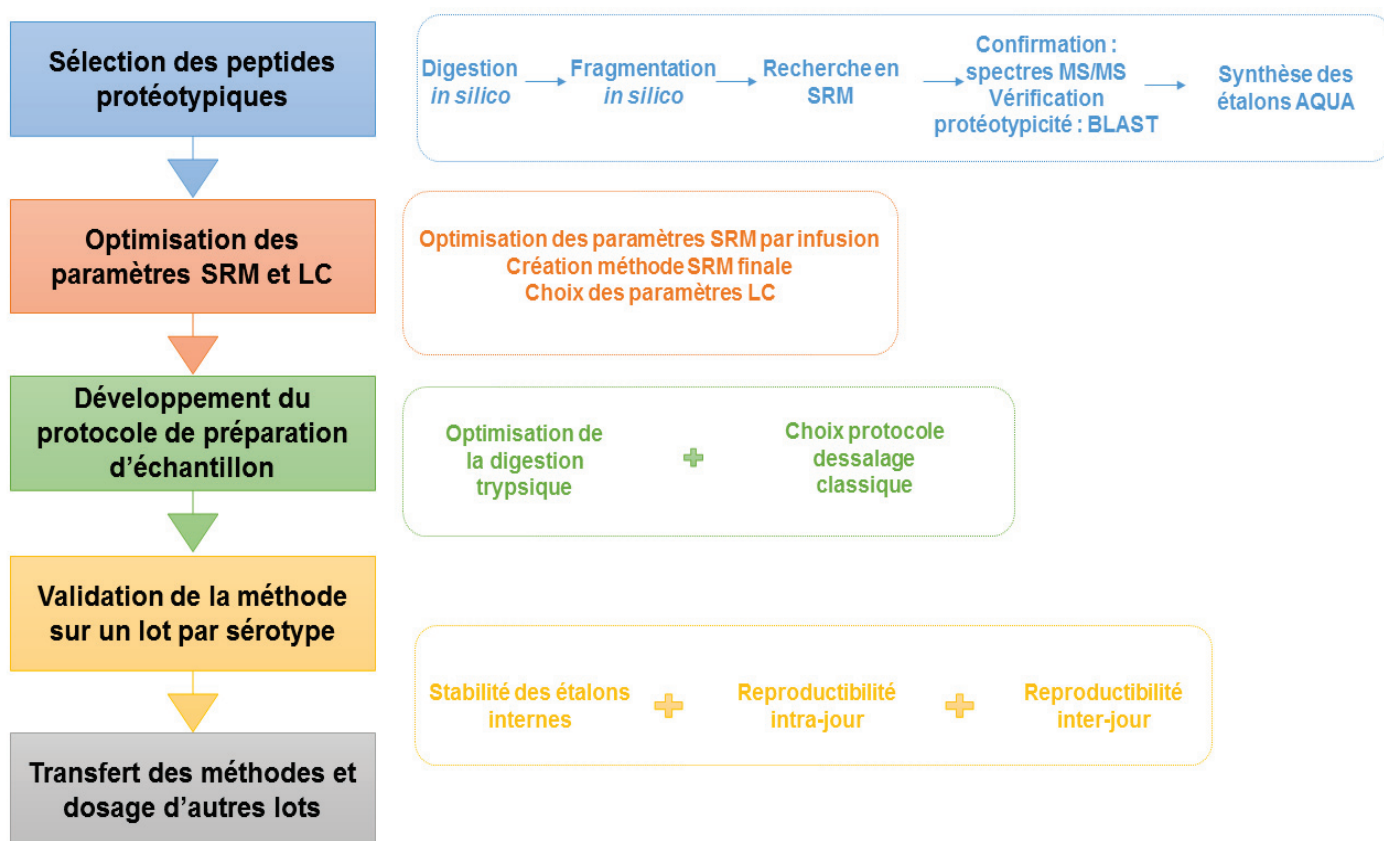


Figure 22 : Plan de travail suivi pour le développement de la méthode de quantification ciblée des protéines des virus CYD candidats vaccin

Le génome du virus CYD candidat vaccin est traduit en une seule polyprotéine, qui après maturation, donnera en proportion équivalente les protéines E, C et M. Cela signifie que si la méthode de dosage développée est exacte, les concentrations molaires des protéines cibles, et donc de leurs peptides rapporteurs, seront égales. En revanche, le cas de la protéine pr est plus complexe, car son devenir après le clivage de la protéine M est difficilement prévisible (accrochée à l'enveloppe, relarguée dans le milieu, en partie éliminée lors de la centrifugation-filtration avec les débris cellulaires...). Ainsi, l'optimisation

du protocole s'est faite avec la recherche de l'équimolarité entre les doses des protéines C, M et E, donc de l'équimolarité entre leurs différents peptides rapporteurs.

Dans un premier temps, cela nous a conduits à rechercher le meilleur rendement de digestion trypsique (optimisation de la quantité d'enzyme et de son temps d'hydrolyse). Mais, à travers ces analyses, nous avons aussi vérifié le comportement des peptides endogènes et de leurs étalons.

Les méthodes développées sont ensuite validées, pour chacun des quatre virus CYD candidats vaccins ; cela revient à définir un domaine dans lequel le dosage peut être effectué, mais aussi à définir un intervalle de confiance sur la mesure. Cette validation a été faite par une étude de la stabilité des étalons marqués AQUA ainsi que par une étude de linéarité ainsi qu'une étude de reproductibilité intra-jour et inter-jours.

Les paramètres testés dans un contexte de validation de méthode et leurs définitions, ainsi que la manière dont ils ont été vérifiés dans le cadre du projet du dosage des virus CYD, sont donnés dans le Tableau 3.

PARAMETRE	DEFINITION	TEST EFFECTUE (CADRE DU PROJET)
<b>SPECIFICITE</b>	Mesure non équivoque de l'analyte	Vérification en matrice blanche + réalisation de gammes
<b>LINEARITE</b>	Vérification dans un intervalle donné, qu'il y a bien une relation linéaire entre le signal et la concentration de l'analyte	Réalisation de gammes de concentrations croissantes en analytes : mesure du $r^2$ (coefficient de corrélation)
<b>JUSTESSE (EXACTITUDE/ ACCURACY)</b>	Etroitesse de l'accord entre la valeur calculée et la valeur « vraie » ou de référence	Mesures d'échantillons de concentrations connues (contrôles qualités, QC et points de gamme)
<b>FIDELITE / PRECISION</b>	Etroitesse de l'accord entre une série de mesures d'un même échantillon dans des conditions données	Injections répétées de QC
<b>LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION (LOD ET LOQ)</b>	LOD : plus petite quantité assurément détectée mais pas nécessairement quantifiée LOQ : plus petite quantité d'analyte quantifiée dans l'intervalle « validé » (exactitude / précision/ linéarité)	LOD : non déterminée LOQ : plus petite quantité respectant des CV<20% et des exactitudes entre 80-120%
<b>FIDELITE INTERMEDIAIRE ICI : REPRODUCTIBILITE</b>	Variabilité intra-laboratoire : différents jours / équipements, analystes, sur la mesure d'un même échantillon	Calculs variabilité mesure intra-jour et inter-jour
<b>ROBUSTESSE</b>	Variabilité inter-laboratoire sur la mesure d'un même échantillon	Transfert de la méthode à l'équipe CBB

Tableau 3 : Critères de validation de méthodes, définitions et tests effectués pour la validation du dosage des 4 virus CYD candidats vaccins

Dans un premier temps, une preuve de concept du dosage a été réalisée et publiée sur le sérotype CYD4. Ensuite, le dosage des trois autres sérotypes (CYD1, CYD2 et CYD3) a été développé selon la même méthodologie. Le dosage de ces quatre sérotypes a été transféré avec succès à l'équipe CBB. Ainsi, des essais inter-laboratoires ont été conduits et plusieurs lots de production ont été dosés, attestant d'autant plus la reproductibilité de la méthode développée.



## 2.3. Résultats

Cette partie résultat est présentée à travers les deux publications issues de ce projet. Une première a été publiée en septembre 2015 dans *Proteomics* et une seconde est en cours de correction et sera probablement soumise à *Journal of Proteome Research*.

### 2.3.1. La spectrométrie de masse en mode ciblé pour le développement d'une méthode de quantification absolue du virus CYD4, candidat vaccin contre la dengue

Cette première publication est une preuve de concept de la faisabilité du dosage du virus CYD candidat vaccin, réalisée sur le sérotype CYD4. Elle décrit la méthodologie suivie pour le développement de la méthode de quantification du virus CYD4. Ainsi la première partie détaille le choix des peptides protéotypiques, une seconde décrit l'optimisation du protocole de digestion trypsique, et une troisième partie est dédiée à la validation de la méthode.

Les performances analytiques ont été évaluées pendant un mois et montrent une variabilité comprise entre 8 et 17% et une exactitude comprise entre 80 et 120%, selon les peptides quantifiés. De plus, la linéarité de la méthode a été vérifiée entre 6.25 et 200 nmol/L.

Dans le lot de virus CYD4 utilisé pour le développement de cette méthode, la concentration de la polyprotéine a pu être calculée à partir de la moyenne des concentrations « jugées équimolaires » de six des sept peptides ciblés (un peptide est exclu car issu d'une digestion incomplète). Ainsi la polyprotéine de ce lot de virus CYD4 est estimée à 48 nmol/L et la variabilité entre les mesures des six peptides dosés est de 21%.

## RESEARCH ARTICLE

# Absolute quantification of dengue virus serotype 4 chimera vaccine candidate in Vero cell culture by targeted mass spectrometry

Blandine Rougemont<sup>1\*</sup>, Romain Simon<sup>1\*</sup>, Romain Carrière<sup>1</sup>, Jordane Biarc<sup>1</sup>, Catherine Fonbonne<sup>1</sup>, Arnaud Salvador<sup>1</sup>, Céline Huillet<sup>2</sup>, Yves Berard<sup>2</sup>, Olivier Adam<sup>2</sup>, Catherine Manin<sup>2</sup> and Jérôme Lemoine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280 CNRS Université Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Sanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, Marcy l'étoile, France

Infection by dengue flavivirus is transmitted by mosquitoes and affects tens to hundreds of millions people around the world each year. Four serotypes have been described, all of which cause similar disease. Currently, there no approved vaccines or specific therapeutics for dengue, although several vaccine prototypes are in different stages of clinical development. Among them, a chimeric vaccine, built from the replication machinery of the yellow fever 17D virus, has shown promising results in phase III trials. Accurate quantitation of expressed viral particles in alive attenuated viral antigen vaccine is essential and determination of infectious titer is usually the method of choice. The current paper describes an alternative or orthogonal strategy, namely, a multiplexed and absolute assay of four proteins of the chimera yellow fever/dengue serotype 4 virus using targeted MS in SRM mode. Over 1 month, variability of the assay using a partially purified Vero cell extract was between 8 and 17%, and accuracy was between 80 and 120%. In addition, the assay was linear between 6.25 and 200 nmol/L and could therefore be used in the near future to quantify dengue virus type 4 during production and purification from Vero cells.

Received: March 13, 2015

Revised: June 1, 2015

Accepted: July 17, 2015

**Keywords:**

Dengue fever / Enzymatic digestion / LC-MS / Microbiology / MRM



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## 1 Introduction

Dengue fever is a mosquito-borne disease caused by four distinct dengue virus serotypes (DENV1-4) [1]. The clinical symptoms observed include nonspecific fever as well as more severe manifestations, such as hemorrhagic fever and shock, which can be fatal [2, 3]. Dengue infection has spread dramatically over the last decades, primarily in tropical and sub-

tropical areas, and represents a growing worldwide health problem. Dengue disease is now epidemic in more than 100 countries, most of which are in Asia, the Caribbean, Central America, South America and Africa.

Currently, no specific treatment is available for dengue. However, many vaccine prototypes are at different stages of clinical development. Various strategies have been adopted to induce immune responses, including recombinant subunit vaccines, inactivated viruses, live attenuated viruses, and chimeric yellow fever (CYD) viruses [4]. Among these vaccine candidates, CYD-tetravalent dengue vaccine (TDV) (Sanofi Pasteur, Lyon, France) has entered phase III trials [5, 6]. Two phase III efficacy trials have been completed for CYD-TDV, one in Latin America [7], where vaccine efficacy was 64.7%, and one in Asia [8], where vaccine efficacy was 56.5%. These studies showed that dengue vaccine is effective against virologically

**Correspondence:** Professor Jerome Lemoine, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280 CNRS Université Lyon 1, Université de Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France  
**E-mail:** jerome.lemoine@univ-lyon1.fr

**Abbreviations:** CYD, chimeric yellow fever dengue virus; DTT, dithiothreitol; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; PCR, polymerase chain reaction; SRM, selected-reaction monitoring; TDV, tetravalent dengue vaccine

\*Both authors contributed equally to this work.

## Significance of the study

A chimeric vaccine, built from the replication machinery of the yellow fever 17D virus is currently evaluated and has shown promising results in phase III trials. This chimeric vaccine is produced and purified from a Vero cell culture. A tool for accurate quantitation of expressed viral particles in alive attenuated viral antigen vaccine is essential in order to streamline vaccine production and control. Since no immunoassay was available for quantifying CYD4 particles, a

robust strategy allowing a multiplexed and absolute quantification of four proteins of the chimera yellow fever/dengue serotype 4 has been developed using targeted MS in SRM mode. Thanks to isotope-dilution standardization, metric performances of the assay, i.e. CV < 25% and accuracies in the 80–120% range, are sufficient to consider further validation according to international guidelines and method transfer on to a quality control platform.

confirmed dengue and that it could reduce the incidence of symptomatic infection and hospital admission.

CYD-TDV is an attenuated TDV built from the replication machinery of the yellow fever 17D virus [9, 10] combined with proteins from each of the four dengue virus serotypes (CYD1–4). Four different CYD constructs were designed, in which the sequences encoding the premembrane (prM) and membrane (E) protein of the yellow fever virus were replaced by the corresponding protein sequences of each dengue virus isoforms. The CYD viruses are grown in Vero cells, purified, and combined to produce the CYD-TDV vaccine. Although many techniques including RT-qPCR [11–13], ELISA [14, 15], and electron microscopy [16], have been used to detect and quantify dengue virus in biological matrices, an immunoassay is not available for quantifying CYD4.

Targeted MS in the so-called SRM mode has recently emerged as an alternative to immunoassay for accurately quantifying proteins in biological matrices [17–22]. SRM, named method of the year 2012 [23], is a hypothesis-driven method offering outstanding multiplexing capabilities, as demonstrated recently for systems biology studies and the clinical evaluation of biomarker candidates [24]. SRM-based assays are developed on a hyphenated LC-triple quadrupole platform, and consist in monitoring at least three precursor-fragment ion pairs and one or more peptides per enzymatically digested protein, those being selected among the “best flyer” and proteotypic peptide sequences [25, 26]. Heavy labeled isotopologs of the targeted peptides are concomitantly monitored to ensure precise and accurate measurements [27, 28]. Although not as sensitive as the most sensitive ELISAs, SRM routinely detects concentrations in the low to sub-nanogram/milliliter range after target peptide or protein enrichment or after extensive sample fractionation to reduce co-eluted interferences to reduce the likelihood of co-eluted interferences [29–34].

Beside selectivity, robustness should also be given priority consideration when hundreds of assays are carried out over a long period. If sufficient amount of sample is available, recent studies attempt to show that conventional flow is a more judicious choice than nanoflow to meet this expectation [35, 36]. Moreover, the accuracy, selectivity, and multiplexing capability of SRM were recently demonstrated as suitable

to quantify viral proteins of Avian H7 Subtype of Influenza virus in order to streamline and speed-up vaccine production [37]. Herein, we describe the development and application of an SRM-based quantification method for quantifying a combination of four proteins (pr, M, E from dengue virus and C protein from Yellow fever virus) for monitoring levels of CYD4 viral particles during production and purification from Vero cells. We also describe the precision, accuracy, linearity, and reproducibility of the method.

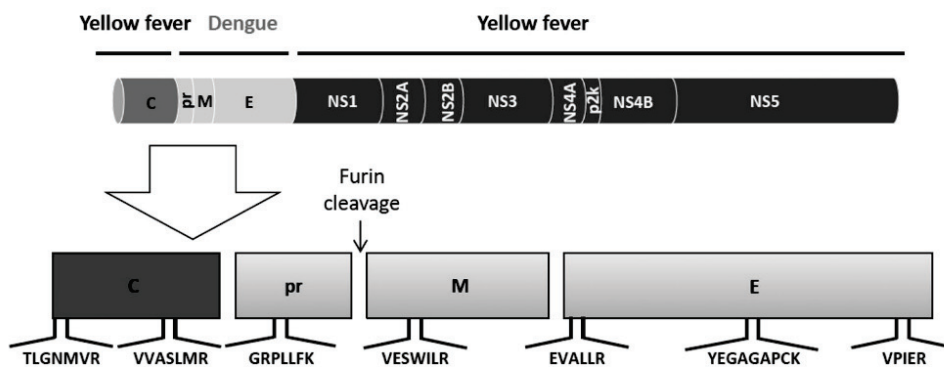
## 2 Materials and methods

### 2.1 Reagents and chemicals

ACN, methanol, and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). DTT, iodoacetamide, ammonium bicarbonate, sodium deoxycholate, formic acid, and trypsin (type IX-S, from porcine pancreas) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Heavy isotope-labeled standard peptides E(<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>V)ALLR (purity = 98.6%), (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>V)PIEIR (purity = 99.1%), YEG(<sup>13</sup>C<sub>3</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>A)GAPCK (purity = 98.9%), (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>V)ESWILR (purity = 98.4%), and GRPL(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>L)FK (purity = 98.3%) were synthesized by Proteogenix (Oberhausbergen, France). Heavy isotope-labeled peptides TLGVNMV(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>R) (purity > 98%), T(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>L)GVNMoxV(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>R) (purity > 98%), VVASLM(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>R) (purity > 98%), and VVAS(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>1</sub>L)Mox(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>R) (purity > 98%) were synthesized by Thermo Fisher Scientific (ULM, Deutschland).

### 2.2 Samples

Partially purified virus was obtained from a Vero cell culture of CYD4 after clarification by centrifugation to remove cells and cell debris and filtration through a 0.22 μm filter. The corresponding mock sample was obtained following the same procedure performed on a noninfected Vero cell culture. Partially purified virus samples contained between 100 and 300 μg/mL total protein as determined by microBCA assay. The virus concentration was determined through genome-equivalent measurement by reverse



**Figure 1.** Protein structure of the CYD4 vaccine strain polyprotein. The seven selected peptide sequences used for quantitation are indicated below each protein.

transcription-quantitative PCR to be approximately  $10^{11}$  particles/milliliter [38].

### 2.3 Preparation of standard and quality control samples

Stock solutions of each heavy isotope-labeled peptide at 0.2 mg/mL were prepared in 90:10 (v/v) water/methanol containing 0.5% formic acid. Working solutions containing 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 nmol/L for standard samples and 10, 60, and 150 nmol/L (in duplicate) for quality control samples were prepared by diluting the stock solutions in the same diluent. One hundred microliters of each standard or quality control solution are spiked in the mock samples before the incubation at 60°C. Samples are then processed as described in the enzymatic digestion paragraph.

### 2.4 Enzymatic digestion

Samples (100  $\mu$ L) of partially purified virus or mock solution were thawed and denatured by mixing with 400  $\mu$ L of 2% (w/v) sodium deoxycholate and 55  $\mu$ L of 150 mmol/L DTT. Next, 100  $\mu$ L of a mixture containing the seven internal standards at 28.6 ng/mL were added to each solution. After incubating at 60°C for 40 min, samples were alkylated by adding 170  $\mu$ L of 150 mmol/L iodoacetamide and incubating at room temperature in the dark for 40 min. Samples were digested overnight at 37°C by adding 40  $\mu$ g of trypsin (final method) or 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, or 100  $\mu$ g of trypsin (during optimization). Digestion was stopped by adding formic acid to a final concentration of 0.5% (v/v). Samples were centrifuged for 15 min at  $15\,000 \times g$  to remove the precipitated deoxycholate.

### 2.5 Solid-phase extraction

Digested samples were extracted using Oasis<sup>TM</sup> HLB 3 cc (60 mg) cartridges (Waters, Milford, MA, USA). Cartridges were conditioned with 1 mL of methanol, followed by 1 mL of water containing 0.5% formic acid. After loading samples, the cartridges were washed with 1 mL of 95:5 (v/v) wa-

ter/methanol containing 0.5% formic acid and then eluted with 1 mL of methanol containing 0.5% formic acid. Eluted samples were evaporated to dryness and resuspended in 100  $\mu$ L of water containing 0.5% formic acid.

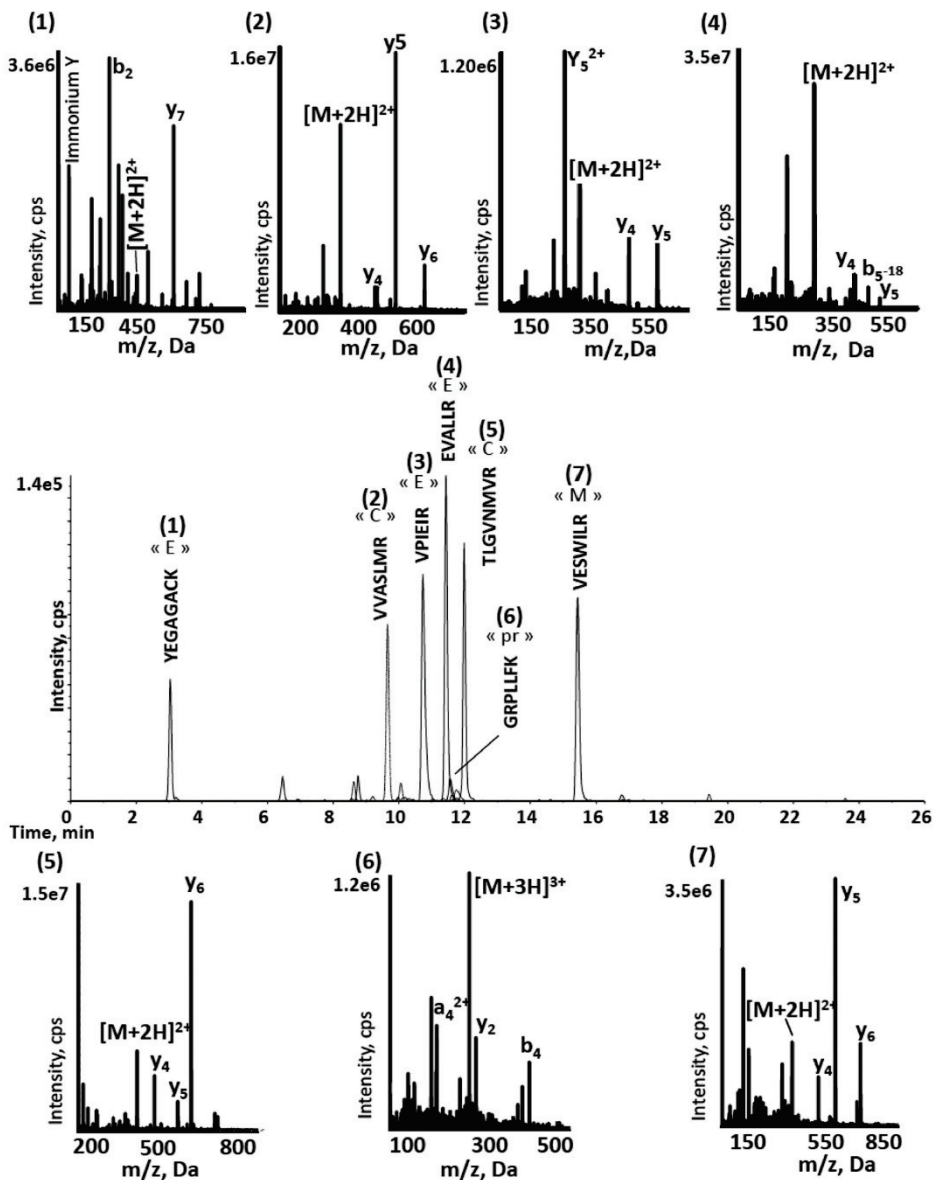
### 2.6 Liquid chromatography (LC)-MS/MS

LC-MS/MS analysis was performed using a 275 series Flexar HPLC system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) coupled to a QTRAP<sup>®</sup> 6500 LC-MS/MS hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer equipped with a Turbo V<sup>TM</sup> ion source (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition, and processing were performed using the associated Analyst 1.6.2 software as described previously [39]. The HPLC separation was carried out on an XBridge C<sub>18</sub> column (100 mm  $\times$  2.1 mm; particle size = 3.5  $\mu$ m; Waters). Elution was performed at a flow rate of 300  $\mu$ L/min with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and ACN containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B. The elution sequence was composed of a 3-min plateau at 5% B, a linear gradient from 5% to 26% B over 15 min and, finally, a 3.5-min plateau at 100% B. The column was re-equilibrated for 4.5 min, and the overall injection duty cycle was 26 min. The column temperature was set to 25°C.

To identify the proteotypic and “best flyer” peptides, MRMPilot<sup>TM</sup> 2.0 software (AB Sciex, Foster City, CA, USA) was used to predict three SRM transitions for all tryptic peptides containing 5–20 amino acids. A method was built to monitor all putative transitions for the doubly and triply charged molecular ions in the partially purified virus extract submitted to trypsin digestion. To confirm the peptide identity, the information dependent acquisition mode (IDA) was used to automatically register MS/MS spectra (SRM-triggered MS/MS spectrum) once an SRM transition was detected above 1000 counts/s. MS2 spectra were acquired from 100 to 1000 Th, with a collision energy of 30 eV and with a fill time of 100 ms.

### 2.7 Data analysis

All SRM data were processed using MultiQuant<sup>TM</sup> 2.1 (AB Sciex) with the MQ4 algorithm for peak integration. A



**Figure 2.** (A) Reconstructed ion chromatograms of the seven proteotypic peptides selected for quantifying the four chains of the polyprotein and the MS/MS spectra of each peptide: (1) YEGAGACK (protein E), (2) VVASLMR (protein C), (3) VPIEIR (protein E), (4) EVALLR (protein E), (5) TLGVNMVVR (protein C), (6) GRPLLFK (Pr peptide), and (7) VESWILR (protein M). Inserts 1–7 show the SRM-triggered MS<sup>2</sup> spectra of the seven best-flyer and proteotypic peptides detected in the partially purified virus sample.

two-point smooth with a peak splitting factor of 1 and a 30-s retention time window were used. All data were manually inspected to ensure correct peak detection and integration by assessing same retention times and relative intensities between transitions for the light endogenous peptides and heavy stable isotope-labeled standards. Three transitions were monitored per peptide, with the most intense one being used as the quantifier and the two others being used to verify retention times and to assess the lack of interference owing to consistent relative ratios. For linearity response study, quantitation was accomplished through linear regression analysis of heavy peptide standard curves (relative response versus relative concentration,  $1/\times$  weighting). To qualify for quantitation, precision (CV) below 20% and accuracies between 80 and 120% were required for the low, medium, and high

concentration levels of QC samples. The lowest QC concentration level satisfying these criteria was considered as the LOQ of the method.

### 3 Results and discussion

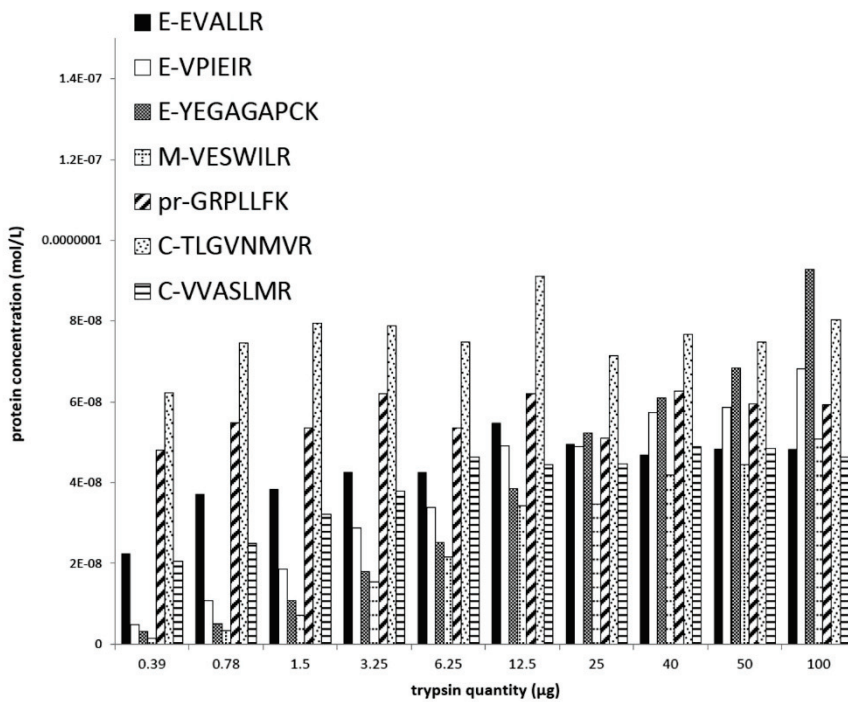
#### 3.1 Identification and selection of proteotypic peptides

CYD-TDV is a tetravalent live attenuated chimeric vaccine based on the yellow fever 17D vaccine, wherein several protein genes are replaced by the corresponding genes of each dengue serotype [5]. The polyprotein sequence of each CYD construct is composed of seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, p2k, NS4B, NS5) and the capsid protein C

**Table 1.** SRM parameters for the seven proteotypic peptides and their corresponding internal standards

Protein	Peptide	Precursor ion	Product ion	DP	EP	CE	CXP
C	TLGVNMVR	445.3	519.3	45	12	23	16
		445.3	618.3	45	12	25	19
		445.3	675.4	45	12	22	20
	TLGVNMVR* (IS)	450.3	529.3	45	12	23	16
		450.3	628.3	45	12	25	19
		450.3	685.4	45	12	22	20
	TLGVNM(ox)VR	453.3	535.3	45	12	22	19
		453.3	691.4	45	12	23	23
		453.3	627.4	45	12	31	18
	TL*GVNM(ox)VR* (IS)	461.3	545.3	45	12	22	19
		461.3	701.4	45	12	23	23
		461.3	637.4	45	12	31	18
	TLGVNM(ox)VR*	458.3	545.3	45	12	22	19
		458.3	701.4	45	12	23	23
		458.3	644.4	45	12	31	18
	VVASLMR	388.2	676.4	50	9	15	20
		388.2	577.3	50	9	15	20
		388.2	199.1	50	9	15	20
	VVASLMR* (IS)	393.3	686.4	50	9	15	20
		393.3	587.4	50	9	15	20
		393.3	199.1	50	9	15	20
	VVASLM(ox)R	396.2	593.3	70	9	15	20
		396.2	522.3	70	9	15	20
		396.2	199.1	70	9	15	20
	VVASL*M(ox)R*(IS)	404.8	610.5	70	9	15	20
		404.8	539.3	70	9	15	20
		404.8	199.1	70	9	15	20
	VVASLM(ox)R*	401.3	603.4	70	9	15	20
		401.3	532.3	70	9	15	20
		401.3	199.1	70	9	15	20
E	EVALLR	350.7	571.4	35	13.5	21	16
		350.7	472.3	35	13.5	19	13
		350.7	508.3	35	13.5	11	14
	EVALLR (IS)	353.7	577.4	35	13.5	21	16
		353.7	472.3	35	13.5	19	13
		353.7	514.4	35	13.5	11	14
	VPIEIR	363.7	627.4	40	12.5	18	18
		363.7	530.3	40	12.5	21	15
		363.7	314.2	40	12.5	19	4
	VPIEIR (IS)	366.8	627.4	40	12.5	18	18
		366.8	530.3	40	12.5	21	15
		366.8	314.2	40	12.5	19	4
	YEGAGAPCK	476.7	660.3	40	13	23	20
		476.7	293.1	40	13	22	19
		476.7	136.1	40	13	47	10
	YEGAGAPCK (IS)	478.7	664.3	40	13	23	20
		478.7	293.1	40	13	22	19
		478.7	136.1	40	13	47	10
Pr	GRPLLFK	277.5	198.6	25	13	13	5
		277.5	424.2	25	13	13	13
		277.5	294.2	25	13	12	13
	GRPLLFK (IS)	279.8	202.1	25	13	13	5
		279.8	431.2	25	13	13	13
		279.8	294.2	25	13	12	13
M	VESWILR	451.8	401.3	55	9	26	15
		451.8	587.4	55	9	22	16
		451.8	803.4	55	9	23	22
	VESWILR (IS)	454.8	401.3	55	9	26	15
		454.8	587.4	55	9	22	16
		454.8	803.4	55	9	23	22

CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential; DP: declustering potential; EP: entrance potential.



**Figure 3.** Concentration of each protein calculated based on the seven selected peptides as a function of the amount of trypsin added. Trypsin was added at an enzyme-to-substrate ratio ranging from 1:50 to 5:1, corresponding to 0.39 to 100 µg of trypsin. From left to right: EVALLR, VPIEIR, YEGAGAPCK for the protein E, VESWILR for the protein M, GRPLLFK for the protein pr, TLGVNMVR and VVASLMR for the protein C.

from yellow fever virus genome, along with peptide Pr, small envelope protein M, and envelope protein E from the dengue virus genome, as shown on Fig. 1. During maturation of the virus, furin cleaves the prM polypeptide between the Pr and M sequences, releasing the Pr peptide from the virus. If maturation is incomplete, some prM protein remains in the virus [39–41].

In this study, to help streamline production of CYD4 viral particles from Vero cell culture, we developed a multiplexed SRM-based MS assay targeting pr, M, and E from dengue virus and C protein from Yellow fever virus. As a first step in developing this assay, we used in silico analysis to generate a list of SRM transitions corresponding to all putative 5- to 20-amino acid tryptic peptides using MRMPilot™ 2.0 software.

We then monitored these transitions in a trypsin digest of partially purified CYD4 samples. We identified nine peptides from protein E, two from protein C, and one each from Pr and protein M (data not shown).

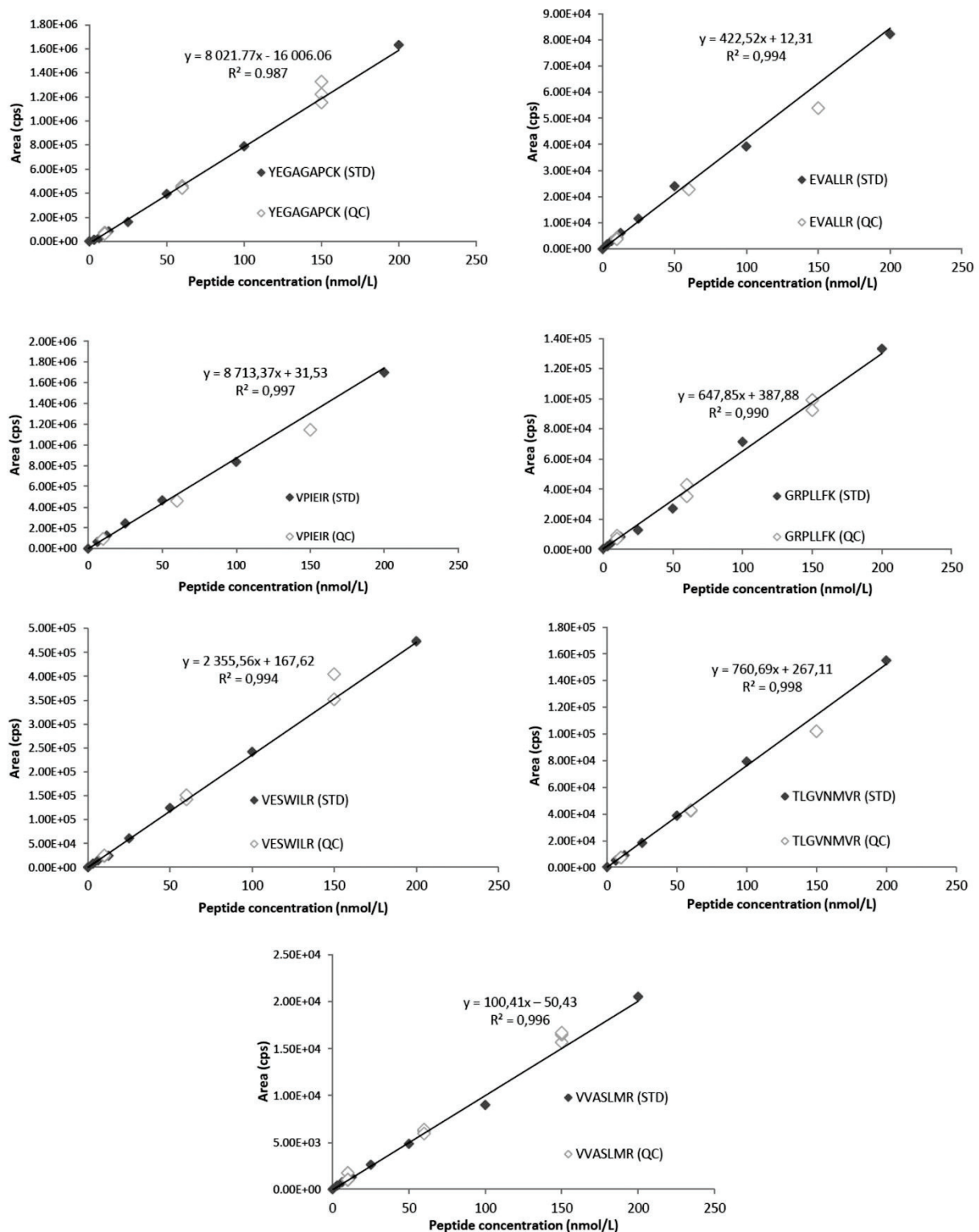
It is usually recommended to avoid methionine-containing peptides owing to their oxidation susceptibility [42–44], and to monitor at least two peptides per protein, however, the small size of protein C, peptide Pr, and protein M (i.e. about 100 amino acids) dramatically reduces the putative peptide sequences that can be targeted. We therefore built a multiplexed LC-MS/MS assay targeting seven peptides, including the three best peptides for tracking protein E (YEGAGAPCK, EVALLR, and VPIEIR), two methionine-containing peptides for tracking protein C (TLGVNMVR and VVASLMR), and

**Table 2.** Analytical performance levels (precision and accuracy) calculated for the calibration curves of the seven heavy isotope-labeled peptides spiked in mock

Sample type	Nominal concentration (nmol/L)	E_EVALLR		E_YEGAGAPCK		E_VPIEIR		pr_GRPLLFK		M_VESWILR		C_TLGVNMVR		C_VVASLMR	
		Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
Standard	6.25	117.3		85.7		117.1		105.3		98.8		112.0		98.5	
	12.5	116.5		97.9		114.7		98.7		82.7		91.0		103.5	
	25	110.1		88.5		111.3		77.1		102.6		16.1 <sup>a)</sup>		104.8	
	50	113.6		102.6		106.7		82.6		105.6		93.7		98.0	
	100	92.9		101.1		96.1		109.7		102.6		103.0		91.1	
	200	97.3		115.7		97.4		102.4		100.4		100.3		104.2	
Quality control	10	95.4	10.6	101.4	7.6	98.7	10.2	119.1	18.8	101.4	4.4	90.5	15.7	90.7	9.6
	60	82.2	13.1	97.5	2.7	86.1	2.8	99.4	13.8	103.5	4.2	94.7	5	104.4	7.7
	150	80.0	8.9	104.9	9.8	81.1	11.4	98.1	5.1	106.9	9.9	97.1	2.3	102.4	11.0

a) Sample was excluded.

CV expressed as: (standard deviation/mean) × 100. Accuracy expressed as: (determined concentration/nominal concentration) × 100.



**Figure 4.** Calibration curves of the seven heavy isotope-labeled peptides spiked in the mock blank matrix at a range of 6.25–200 nmol/L. The filled diamonds represent standards and the empty diamonds represent quality control samples for all peptides: (1) YEGAGAPCK for the protein E, (2) EVALLR for the protein E, (3) VPIEIR for the protein E, (4) GRPLLFK for the protein pr, (5) VESWILR for the protein M, (6) TLGVNMVR for the protein C, and (7) VVASLMR for the protein C.



a single peptide each for Pr (GRPLLFK) and protein M (VESWILR). It has to be noticed that peptides allowing quantifying Pr or M protein will also take into account prM protein if present in the virus.

The superimposed ion chromatograms reconstructed from the most intense SRM transitions of the seven selected peptides are shown in Fig. 2 (middle panel). MS/MS spectra were recorded as soon as an SRM signal was detected above the threshold of 1000 counts/s. All peptides could be assigned based on the series of predominant b and y fragment ions observed in each spectrum (upper and lower panels of Fig. 2).

We synthesized heavy isotope-labeled peptides as internal standards and used them to tune the mass spectrometer parameters (Table 1) and to evaluate the performance metrics. It has been largely reported that quantification with methionine containing peptides should be avoided due to unpredictable methionine oxidation [42–44]. We previously developed a method to avoid this problem of natural (or artificially induced) oxidation by fully oxidizing the methionines with performic acid [45]. In this study, to quantify the oxidized form of the endogenous peptide, we added oxidized labeled internal standards (TLGVNM(ox)VR\* and VVASLM(ox)R\*), while we added the nonoxidized labeled internal standard to quantify the nonoxidized form. In addition, to measure the extent of oxidation of the nonoxidized standard, we added a second oxidized labeled internal standard labeled at two different sites (TL\*GVNM(ox)VR\* and VVASL\*M(ox)R\*). Finally, to fully quantify the four targeted proteins, we selected the three best transitions per peptide, so that the final method simultaneously monitored 60 SRM transitions.

### 3.2 Optimization of tryptic digestion

In proteomic studies, optimal tryptic digestion is typically accomplished at a trypsin-to-protein ratio of approximately 1:20 (w/w). For the current study, this was equivalent to approximately 1.2  $\mu\text{g}$  of trypsin for 100  $\mu\text{l}$  of partially purified sample (containing 24.5  $\mu\text{g}$  of protein). At this ratio, the final concentrations of several peptides from proteins E and C were inconsistent, suggesting incomplete digestion (data not shown). We therefore examined various trypsin-to-protein ratios (1:50 to 5:1) (Fig. 3). To assess the consistency of the assay, we measured not only the concentrations of each peptide but also the molar ratio of proteins E and C because these proteins should be produced in an equimolar ratio as other objective criteria to assess the consistency of the assay. Indeed, each protein is equimolar and each selected peptide measurement should lead to the same final polyprotein concentration. Therefore, the influence of trypsin concentration on the digestion yield was investigated for enzyme to substrate ratio ranging from 1/50 to 5/1. The concentrations of each protein calculated with the different peptides are presented in Fig. 3.

In these experiments, varying quantities of trypsin have been used to digest 100  $\mu\text{l}$  of partially purified sample. The resulting curves show a similar pattern with a rapid increase in

the determined concentration of each protein as the trypsin-to-protein ratio increased. The dose-responses plateaued between 5 and 50  $\mu\text{g}$  of trypsin for all proteins except that optimal production of peptide YEGAGAPCK (protein E) required at least 100  $\mu\text{g}$  of trypsin, which is nearly a 5:1 trypsin-to-protein ratio. Nonetheless, we selected 40  $\mu\text{g}$  of trypsin for following experiments because it provided equimolar protein concentrations and the most consistent concentrations for most peptides.

### 3.3 Linearity and limits of quantitation

We next examined the range in which the assay is linear for each peptide to ensure that manufactured samples are tested at the appropriate concentration. First, blank samples (mock matrix) were verified and no interference was noticed within the light and heavy quantitation transition channels (Supporting Information).

Calibration curves were generated by spiking mock sample with each of the labeled standards between 6.25 and 200 nmol/L, a range bracketing the expected viral protein concentration range corresponding to the measured genomic titer. We also prepared three quality control samples, each in duplicate: a low-concentration sample (10 nmol/L); a medium-concentration sample, approximating the concentration of the polyprotein in the final sample (60 nmol/L); and a high-concentration sample (150 nmol/L). Calibration curves were obtained by plotting the peak area for each standard peptide versus the spiked concentration, and best-fit equations were determined by a simple  $1/\times$  linear regression (Fig. 4). Between 6.25 and 200 nmol/L, correlation coefficients were close to 0.99 and accuracies were between 80 and 120% for 95% of the standard and quality control samples, indicating good linearity for most peptides (Table 2). CVs for quality control samples were below 15% for the medium- and high-concentration samples levels and below 20% for the low-concentration sample, indicating good repeatability. The low-concentration level, i.e. 6.25 nmol/L was considered the LOQ of the method.

### 3.4 Reproducibility and accuracy of SRM quantitation

The reproducibility of the whole sample workflow was evaluated by performing the assay 20 times over 1 month using the same partially purified single production batch (four samples/day  $\times$  5 days). Each protein concentration (in mol/mL) was calculated from each peptide measurement. The intraday (four replicates) and interday (20 replicates) variability was  $< 20\%$ , indicating good reproducibility of digestion, sample preparation, and MS analysis. CVs were not higher for the two methionine-containing peptides, and less than 10% of the endogenous peptides for the peptides TLGVNMVR and VVASLMR

**Table 3.** Concentrations of each protein in the partially purified virus calculated using the seven selected peptides during a reproducibility experiment carried out on one single purified virus sample.

Protein	CYD4-E		CYD4-M		CYD4-pr	CYD4-C		Polyprotein		
	EVALLR	VPIEIR	YEGAGAPCK	VESWILR	GRPLLFK	TLGVNMVR	VVASLMR	Mean (mol/L)	Standard deviation (mol/L)	CV %
N	20	20	20	20	20	20	20			
Mean concentration (mol/L)	$3.54 \times 10^{-08}$	$4.09 \times 10^{-08}$	$2.00 \times 10^{-08a}$	$4.27 \times 10^{-08}$	$3.72 \times 10^{-08}$	$5.80 \times 10^{-08}$	$3.74 \times 10^{-08}$			
Standard deviation (mol/L)	$2.94 \times 10^{-09}$	$4.45 \times 10^{-09}$	$2.96 \times 10^{-09}$	$3.49 \times 10^{-09}$	$6.41 \times 10^{-09}$	$7.14 \times 10^{-09}$	$6.23 \times 10^{-09}$	$4.78 \times 10^{-08}$	$8.91 \times 10^{-09}$	21
Intradays CV (%) (n = 5/5)	5	4	6	6	7	7	9			
Interdays CV (%) (n = 20/20)	8	11	15	8	17	12	17			

a) The YEGAGAPCK peptide was excluded due to incomplete digestion.

were of the oxidized form. Although oxidation of the methionine, which occurs mainly during sample preparation or storage, cannot be controlled, these two peptides could be accurately quantified and the same reproducibility was attained by adding the two different oxidized labeled internal standards.

Similar concentrations (Table 3) were obtained for all proteins from the different peptides, from  $3.5 \times 10^{-8}$  mol/L for protein E (based on the EVALLR peptide) to  $5.8 \times 10^{-8}$  mol/L for protein C (based on the TLGVNMVR peptide). The average concentration of the polyprotein, determined from all peptides excluding YEGAGAPCK (due to incomplete digestion) was  $4.8 \times 10^{-8}$  mol/L, with a CV of 21%, confirming the accuracy of this method. Furthermore, based on a molecular weight of the protein E of 53,904 Da and a molar concentration of  $5 \times 10^{-8}$  mol/L for the EVALLR peptide, the sample contained 2.1 µg/mL protein E. This is close to the concentration (1.4 µg/mL) estimated from a theoretical average of 180 protein E monomers per viral particle [46] and  $10^{11}$  viral particles/mL in the partially purified sample as determined by genome-equivalent measurement.

#### 4 Concluding remarks

Because of the urgent need to develop vaccines against dengue fever, analytical tools are needed to assess and characterize viral production and purification. In particular, the ability to accurately quantify the structural proteins of the viral particle is essential. We developed an accurate, reproducible method for quantifying CYD4 by LC-MS/MS in SRM mode. The method includes an optimized tryptic digestion and allows absolute quantitation of four proteins from the chimeric construct (protein C of yellow fever virus and peptide Pr, protein M, protein E of dengue virus) with a lower LOQ at 6.25 nmol/L. We are currently investigating the use

of this method to allow quantification of all serotypes in a single sample.

B.R. and R.S. thank Phillip Leventhal, 4Clinics, Paris, France for scientific editing assistance.

Potential conflict of interest: Sanofi Pasteur funded the study and C. Huillet, Y. Bérard, C. Manin and O. Adam work at Sanofi Pasteur.

#### 5 References

- [1] Halstead, S. B., Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988, 239, 476–481.
- [2] Sam, S.-S., Omar, S. F. S., Teoh, B.-T., Abd-Jamil, J., AbuBakar, S., Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2013, 7, e2194.
- [3] Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Nimmannitya, S., Green, S. et al., Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J. Infect. Dis.* 1997, 176, 313–321.
- [4] Wallace, D., Canouet, V., Garbes, P., Wartel, T. A., Challenges in the clinical development of a dengue vaccine. *Curr. Opin. Virol.* 2013, 3, 352–356.
- [5] Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M. et al., From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2011, 29, 7229–7241.
- [6] Guy, B., Almond, J., Lang, J., Dengue vaccine prospects: a step forward. *Lancet* 2011, 377, 381–382.
- [7] Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M. et al., Efficacy of a tetravalent Dengue vaccine in children in Latin America. *N. Engl. J. Med* 2014, 141103114505002.
- [8] Capeding, M. R., Tran, N. H., Hadinegoro, S. R. S., Ismail, H. I. H. M. et al., Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent

- dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014, *384*, 1358–1365.
- [9] Guy, B., Saville, M., Lang, J., Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum. Vaccin.* 2010, *6*. doi: 10.4161/hv.6.9.12739
- [10] Guy, B., Immunogenicity of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. *J. Clin. Virol.* 2009, *46*, S16–S19.
- [11] Poloni, T. R., Oliveira, A. S., Alfonso, H. L., Galvão, L. R. et al., Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Viol. J.* 2010, *7*, 22.
- [12] Menting, S., Thai, K. T. D., Nga, T. T. T., Phuong, H. L. et al., Internally controlled, generic real-time PCR for quantification and multiplex real-time PCR with serotype-specific probes for serotyping of dengue virus infections. *Adv. Virol* 2011, *2011*, 514–681.
- [13] Anwar, A., Wan, G., Chua, K.-B., August, J. T., Too, H.-P., Evaluation of pre-analytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 2009, *11*, 537–542.
- [14] Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., Halloran, W., An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 2000, *38*, 1053–1057.
- [15] Puttikhunt, C., Prommool, T., U-thainual, N., Ongajchaowlerd, P. et al., The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. *J. Clin. Virol.* 2011, *50*, 314–319.
- [16] Weidmann, M., Sall, A. A., Manuguerra, J.-C., Koivogui, L. et al., Quantitative analysis of particles, genomes and infectious particles in supernatants of haemorrhagic fever virus cell cultures. *Viol. J.* 2011, *8*, 81.
- [17] Addona, T. A., Shi, X., Keshishian, H., Mani, D. R. et al., A pipeline that integrates the discovery and verification of plasma protein biomarkers reveals candidate markers for cardiovascular disease. *Nat. Biotechnol.* 2011, *29*, 635–643.
- [18] Anderson, L., Hunter, C. L., Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, *5*, 573–588.
- [19] Hüttenhain, R., Malmström, J., Picotti, P., Aebersold, R., Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, *13*, 518–525.
- [20] Fortin, T., Salvador, A., Charrier, J. P., Lenz, C. et al., Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. *Mol. Cell. Proteomics* 2009, *8*, 1006–1015.
- [21] Fernández Ocaña, M., James, I. T., Kabir, M., Grace, C. et al., Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2012, *84*, 5959–5967.
- [22] Percy, A. J., Chambers, A. G., Yang, J., Hardie, D. B., Borchers, C. H., Advances in multiplexed MRM-based protein biomarker quantitation toward clinical utility. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, *1844*, 917–926.
- [23] Gillette, M. A., Carr, S. A., Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat. Methods* 2013, *10*, 28–34.
- [24] Surinova, S., Schiess, R., Hüttenhain, R., Cerciello, F. et al., On the development of plasma protein biomarkers. *J. Proteome Res.* 2011, *10*, 5–16.
- [25] Shi, T., Gao, Y., Quek, S. I., Fillmore, T. L. et al., A highly sensitive targeted mass spectrometric assay for quantification of AGR2 protein in human urine and serum. *J. Proteome Res.* 2014, *13*, 875–882.
- [26] Kuzyk, M. A., Parker, C. E., Domanski, D., Borchers, C. H., Development of MRM-based assays for the absolute quantitation of plasma proteins. *Methods Mol. Biol.* 2013, *1023*, 53–82.
- [27] Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M. et al., Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, *6*, 2139–2149.
- [28] Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. et al., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 6940–6945.
- [29] Whiteaker, J. R., Lin, C., Kennedy, J., Hou, L. et al., A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat. Biotechnol.* 2011, *29*, 625–634.
- [30] Whiteaker, J. R., Zhao, L., Anderson, L., Paulovich, A. G., An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics* 2010, *9*, 184–196.
- [31] Shi, T., Fillmore, T. L., Gao, Y., Zhao, R. et al., Long-gradient separations coupled with selected reaction monitoring for highly sensitive, large scale targeted protein quantification in a single analysis. *Anal. Chem.* 2013, *85*, 9196–9203.
- [32] Qian, W. J., Kaleta, D. T., Petritis, B. O., Jiang, H. et al., Enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity separation strategy. *Mol. Cell. Proteomics* 2008, *7*, 1963–1973.
- [33] Dubois, M., Becher, F., Herbet, A., Ezan, E., Immuno-mass spectrometry assay of EPI-HNE4, a recombinant protein inhibitor of human elastase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, *21*, 352–358.
- [34] Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Mani, D. R. et al., Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell. Proteomics* 2009, *8*, 2339–2349.
- [35] Simon, R., Enjalbert, Q., Biarc, J., Lemoine, J., Salvador, A., Evaluation of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) versus C<sub>18</sub> reversed-phase chromatography for targeted quantification of peptides by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2012, *1264*, 31–39.
- [36] Percy, A. J., Chambers, A. G., Yang, J., Domanski, D., Borchers, C. H., Comparison of standard- and nano-flow liquid chromatography platforms for MRM-based quantitation of putative plasma biomarker proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *404*, 1089–1101.

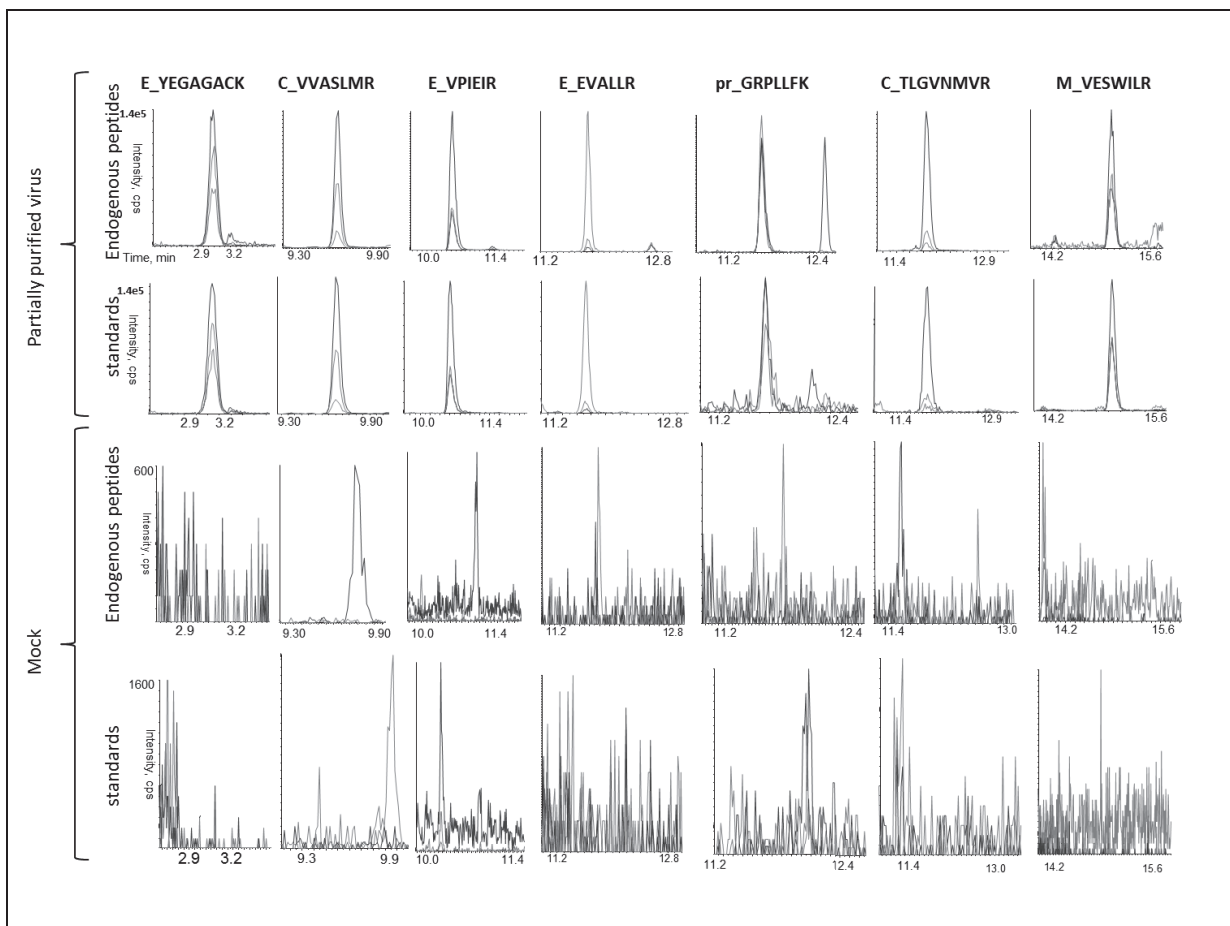
- [37] Santana, W. I., Williams, T. L., Winne, E. K., Pirkle, J. L., Barr, J. R., Quantification of viral proteins of the avian H7 subtype of influenza virus: an isotope dilution mass spectrometry method applicable for producing more rapid vaccines in the case of an influenza pandemic. *Anal. Chem* 2014, *86*, 4088–4095.
- [38] Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Girerd-Chambaz, Y. et al., Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J. Virol. Methods* 2008, *151*, 40–46.
- [39] Li, L., Lok, S.-M., Yu, I.-M., Zhang, Y. et al., The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 2008, *319*, 1830–1834.
- [40] Plevka, P., Battisti, A. J., Sheng, J., Rossmann, M. G., Mechanism for maturation-related reorganization of flavivirus glycoproteins. *J. Struct. Biol.* 2014, *185*, 27–31.
- [41] Zheng, A., Yuan, F., Kleinfelter, L. M., Kielian, M., A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. *Nat. Commun.* 2014, *5*, 3877.
- [42] Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.*, *32*, 307–326.
- [43] Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J. et al., Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 787–797.
- [44] Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R., Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 2008, *4*, 222.
- [45] Simon, R., Girod, M., Fonbonne, C., Salvador, A. et al., Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry (n=669): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides. *Mol. Cell. Proteomics* 2012, *11*, 1389–1403.
- [46] Perera, R., Kuhn, R. J., Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, *11*, 369–377.

# Absolute quantification of Dengue virus serotype 4 chimera vaccine candidate in Vero cell culture by targeted mass spectrometry

Rougemont Blandine<sup>1\*</sup>, Simon Romain<sup>1\*</sup>, Carrière Romain<sup>1</sup>, Biarc Jordane<sup>1</sup>, Fonbonne Catherine<sup>1</sup>, Salvador Arnaud<sup>1</sup>, Huillet Céline<sup>2</sup>, Berard Yves<sup>2</sup>, Adam Olivier<sup>2</sup>, Manin Catherine<sup>2</sup> and Lemoine Jérôme<sup>1,3</sup>

## Supplementary information

Figure 1: reconstructed ion chromatograms on the three transitions recorded for each of the seven light (endogenous) peptides tracking E, C, pr\_ and M proteins in the partially purified virus and in the mock sample and for their heavy (standards) peptides. Note the lack of interference at their corresponding retention times.



### 2.3.2. L'impact d'un choix limité de peptides pour la quantification, illustré par le dosage de différents lots de production des virus CYD1- 4, candidats vaccins contre la dengue.

Cette seconde publication étend aux 3 autres variants du virus chimère candidat vaccin la méthode de dosage développée sur le variant CYD4. Nous y apportons en plus des informations supplémentaires sur la difficulté du choix des peptides rapporteurs dans cette étude ainsi que sur les points de contrôles mis en place pour réussir cette transposition de méthode à d'autres variants.

La polyprotéine virale est dosée à partir des peptides rapporteurs des protéines C, M, pr et E la constituant de manière équimolaire. La petite taille ainsi que la particularité des séquences de ces protéines d'intérêts a conduit à la sélection de peptides rapporteurs ne respectant pas les critères de choix recommandés habituellement. Dans l'objectif d'obtenir une dose équimolaire entre les 6 à 7 peptides mesurés par virus CYD, une grande attention a été apportée à l'optimisation du protocole d'hydrolyse enzymatique.

Ainsi, 4 méthodes de dosages ont été développées et validées. Les méthodes finales dosent chacune des polyprotéines virales avec un écart type de 15 à 30% entre les peptides rapporteurs. Néanmoins, leur reproductibilité est satisfaisante puisque les coefficients de variation inter-jours et intra-jours sont inférieurs à 20%.

Ces méthodes, validées, ont permis de doser trois lots de productions différents, pour chacun des quatre virus CYD1- 4. Quel que soit le lot mesuré, nous avons observé que les déviations entre les doses des différents peptides d'une même polyprotéine sont très reproductibles. C'est pourquoi il a été proposé d'utiliser cette déviation pour tracer des cartes de contrôles, et ainsi aider à la validation du dosage d'un lot de production inconnu.

## Selecting peptides for MRM-based assay: what we should do and what we can do as exemplified by the CYD1, CYD2, CYD3 and CYD4 variants of chimeric Dengue virus vaccine.

Rougemont Blandine<sup>1</sup>, Carrière Romain<sup>1</sup>, Simon Romain<sup>1</sup>, Biarc Jordane<sup>1</sup>, Fonbonne Catherine<sup>1</sup>, Salvador Arnaud<sup>1</sup>, Huillet Céline<sup>2</sup>, Berard Yves<sup>2</sup>, Martial Fabien<sup>2</sup>, Barrière Fabienne<sup>2</sup>, Trauchessec Matthieu<sup>2</sup>, Manin Catherine<sup>2</sup> and Lemoine Jérôme<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, Université Lyon 1, ENS Lyon - 5, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Sanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'étoile

<sup>3</sup> corresponding author: [jerome.lemoine@univ-lyon1.fr](mailto:jerome.lemoine@univ-lyon1.fr)

### Abstract

Quantitative proteomics analysis by targeted mass spectrometry made by a typical bottom-up approach, namely a peptide based analysis given the quantification of a measured protein, is a complex workflow. To guarantee accuracy of the quantified protein, guidelines insist on several points from the peptide choice to the data validation. Concerning peptide choice, small length of targeted dengue proteins leads us to not follow the guidelines. Nevertheless, by developing a method to quantify the four constructs of chimeric dengue vaccine we developed check points to assess the accuracy of the quantification. By carrying out tryptic hydrolysis kinetics, we verified behavior of the surrogate peptide and its isotope labeled standard. Perfect situation was not reached for each peptide but a compromise was made by keeping an overnight tryptic digestion and by spiking isotope labeled before this step. These compromise could affect the accuracy of the protein measurement. However, the developed method was very reproducible (inter-day CV<20%). The 4 developed methods were used to accurately quantify the chimera vaccine candidate in 12 different production batches.

## 1. Introduction

Targeted proteomics illustrated by selected/ multiple reaction monitoring (SRM, MRM) mass spectrometry approaches have been the gold standard for protein quantitation in systems biology and clinical studies<sup>104–106</sup>. In order to streamline MRM method development and validation, numerous guidelines were published<sup>63,67,107–110</sup>. Some recommendations pinpoint the choice of surrogate peptides size. To monitor high-responding peptides, one criteria widely used is to keep peptides between 8 and 20 amino-acids<sup>111</sup>. Then, to improve reproducibility of the complete process, peptides containing methionine in their amino-acid sequence, prone to oxidation are discarded<sup>112,113</sup>. More than one peptide per protein is required<sup>114,115</sup> to ensure accuracy of the quantification. However, depending on the amino acid sequence, the choice of the peptide can be rather complex and limited.

We previously described the development and application of a SRM-based method for the quantitation of CYD4 dengue vaccine<sup>116</sup>. We quantified a combination of 4 proteins (pr, M, E from dengue virus and C protein from Yellow fever virus) for monitoring levels of CYD4 viral particles. In our particular study, we encountered difficulties to follow the guidelines and to develop the quantification of dengue protein in the chimeric dengue/yellow fever virus.

The chimeric yellow fever virus (CYD)<sup>92</sup> was the strategy chosen by Sanofi Pasteur (Lyon, France) to developed the CYD-tetravalent dengue vaccine (TDV). The vaccine has entered phase III trials in Asia and Latin America<sup>93,117–119</sup>. The active phase of these two trials is complete; efficiency against virologically-confirmed dengue is 56.5% for Asia and 60.8% for Latin America and efficiency against dengue hemorrhagic fever is 80% and 95.5% respectively<sup>120</sup>. Dengue fever is a growing worldwide health problem leading into hemorrhagic fever and causes approximately 1 million symptomatic cases per year<sup>81,83,84,86,87,121</sup>. Validated analytical tools are needed to assess and characterize chimeric dengue virus vaccine production and purification.

The goal here is to describe the checkpoints for method validation, by extending our previous work to the three other vaccine constructs named CYD1, CYD2 and CYD3. The specificity of dengue fever proteins and its short length constrained us during the development process to make compromises in particular for peptide choice and tryptic digestion optimization. We focused our attention on these critical points. Despite the encountered difficulties, the developed method has been validated for all 4 CYD constructs. For the first time, this study shows the quantification of the 4 chimeric dengue virus vaccines in production batches.



## 2. Experimental section

### 2.1. Reagents and chemicals

Acetonitrile, methanol, and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Dithiothreitol, iodoacetamide, ammonium bicarbonate, sodium deoxycholate, formic acid, and trypsin (type IX-S, from porcine pancreas) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). High-purity (>95%) synthetic isotopically labeled peptides (AQUA™ peptides) with <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C-labeled, as described in the corresponding supplementary data information (Supplementary data, Table 1), were provided by Proteogenix (Oberhausbergen, France) or Thermo Fisher Scientific (ULM, Deutschland).

### 2.2. Samples

Partially purified virus was obtained from a Vero cell culture of CYD1, CYD2, CYD3 or CYD4 after clarification by centrifugation to remove cells and cell debris and filtration through a 0.22 µm filter. For each construct, 3 production batches were quantified. They are named: 1-A, 1-B, 1-C for CYD1's construct, 2-A, 2-B, 2-C for CYD2's construct, 3-A, 3-B, 3-C for CYD3's construct and 4-A, 4-B, 4-C for CYD4's construct. The corresponding mock sample was obtained following the same procedure performed on a non-infected Vero cell culture. Partially purified virus samples contained between 100 and 300 µg/mL total protein as determined by microBCA assay. The virus concentration was determined through genome-equivalent measurement by reverse transcription-quantitative PCR to be approximately 10<sup>10</sup> to 10<sup>12</sup> particles/mL<sup>122</sup>.

### 2.3. Preparation of internal standard

Stock solutions of each heavy isotope-labeled peptide at 0.2 mg/mL were prepared in 90:10 (v/v) water/methanol containing 0.5% formic acid. For each construct a mixture containing the selected peptides for the measurement was prepared. The 3 mixtures were prepared at 200 ng/mL in 90:10 (v/v) water/methanol containing 0.5% formic acid. The mixtures were then divided in 100 µL aliquots and stocked at -20°C. Each day of measurement one aliquot per construct was diluted at 20 ng/mL and spiked in the samples. The diluted solution was analyzed by LC-MS/MS to check its stability.

### 2.4. Preparation of standard and quality control samples

A stock solution for each construct containing the synthetic peptides at 840 nmol/L was prepared in 90:10 (v/v) water/methanol containing 0.5% formic acid. Working solutions were prepared at 3.28, 6.56, 13.1, 26.3, 52.5, 105, 210 and 420 nmol/L for standard sample and at 23.1, and 280 nmol/L for quality control sample. 100 µL of each standard or quality control solution were spiked in the partially purified virus, in triplicates. Samples were then processed as described below in the enzymatic digestion section.

## 2.5. Enzymatic digestion

Samples (100  $\mu$ L) of partially purified virus were thawed and denatured by mixing with 400  $\mu$ L of 2% (w/v) sodium deoxycholate and 55  $\mu$ L of 150 mmol/L dithiothreitol. Next, 100  $\mu$ L of a mixture containing the internal standards at 20 ng/mL were added to each solution. After incubating at 60°C for 40 min, samples were alkylated by adding 170  $\mu$ L of 150 mmol/L iodoacetamide and incubating at room temperature in the dark for 40 min. Samples were digested overnight at 37°C by adding 40  $\mu$ g of trypsin. Digestion was stopped by adding formic acid to a final concentration of 0.5% (v/v). Samples were centrifuged for 15 min at  $15,000 \times g$  to remove the precipitation of deoxycholate.

## 2.6. Solid-phase extraction

Digested samples were extracted using Oasis<sup>TM</sup> HLB 3 cc (60 mg) cartridges (Waters, Milford, MA, USA). Cartridges were conditioned with 1 mL of methanol, followed by 1 mL of water containing 0.5% formic acid. After loading samples, the cartridges were washed with 1 mL of 95:5 (v/v) water/methanol containing 0.5% formic acid and then eluted with 1 mL of methanol containing 0.5% formic acid. Eluted samples were evaporated to dryness and resuspended in 100  $\mu$ L of water containing 0.5% formic acid.

## 2.7. Liquid chromatography (LC)-MS/MS

LC-MS/MS analysis was performed using a HP 1290 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTRAP<sup>®</sup> 6500 LC-MS/MS hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer equipped with a Turbo V<sup>TM</sup> ion source (Sciex, Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition, and processing were performed using the associated Analyst 1.6.2 software as described previously<sup>116</sup>. The HPLC separation was carried out on an XBridge BEH C<sub>18</sub> column (100 mm  $\times$  2.1 mm; particle size = 3.5  $\mu$ m; Waters). Elution was performed at a flow rate of 300  $\mu$ L/min with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B. The elution sequence was composed of a 3-min plateau at 5% B, a linear gradient from 5% to 40% B over 18 min and, finally, a 3.5-min plateau at 100% B. The column was re-equilibrated for 4.5 min. The column temperature was set to 25°C.

Skyline 3.0 software was used to identify the proteotypic peptides and the peptides with high-ionization efficiency by an *in silico* digestion of the polyproteins. 3 SRM transitions were also predicted for all tryptic peptides containing 5 to 20 amino acids (<https://skyline.gs.washington.edu>). To confirm the peptide identity, the information dependent acquisition mode (IDA) was used to automatically register MS/MS spectra once a SRM transition was detected of  $> 1000$  counts/s.

## 2.8. Data analysis

All SRM data were processed using MultiQuant<sup>TM</sup> 2.1 (Sciex) with the MQ4 algorithm for peak integration. A 2-points smooth with a peak splitting factor of 1 and a 30s retention time window were used. All data were manually inspected to ensure correct peak detection and integration.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selection of the viral surrogate peptides

As described in our previous work, CYD-TDV is a tetravalent live attenuated chimeric vaccine derived from the 17D vaccine strain of yellow fever, in which several protein genes are replaced by the corresponding genes of each dengue construct<sup>93</sup>. The polyprotein sequence of each CYD construct is composed of 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, p2k, NS4B, NS5) and the capsid protein C from yellow fever virus genome, along with peptide Pr, small envelope protein M, and envelope protein E from the dengue virus genome. The capsid protein C from yellow fever virus genome is identical in each CYD construct (Figure 1). We previously developed a multiplexed SRM-based MS assay targeting pr, M, and E from dengue virus and C protein from Yellow fever virus for CYD4 construct. The goal here is, first to extend the developed method to CYD1, CYD2 and CYD3 constructs. Then, to quantify 3 production batches per construct and to show the accuracy and the robustness of the method, and the possibility of applying it in an industrial context.

As we have discussed previously, the small size of protein C (160 AA), protein Pr, (120 AA) and protein M (100 AA) reduces the putative peptide sequences that can be targeted. Furthermore, these proteins sequences are very particular. First, they contain a high number of lysine and arginine residues (i.e. about 30/160 for C protein), often consecutives, potentially leading to multiple missed-cleavage sites. Likewise, C and M proteins contain a lot of methionine residues, preferentially avoiding, due to their oxidation susceptibility<sup>112,113,123,124</sup>. Due to these considerations, the *in silico* digestion of proteins C, M and pr using common advised criteria<sup>63,67,107–110</sup> failed to generate potential surrogate peptides. Thereby, we generated *in silico* a list of all putative 5- to 20-amino acid tryptic peptides using the open-source Skyline 3.0 software<sup>44</sup>. For C and M proteins, we manually kept methionine containing peptides and peptides near potential missed-cleavage sites as [K-K], [K-R], [R-R], or [R-K]. Depending of the CYD constructs, a list from 13 to 18 surrogates' peptides was established. Then, using Skyline 3.0 software, doubly-charged and triply-charged precursor ions were selected as well as y-ions comprised between 350 and 900 m/z range. Afterward, one MRM method was built for each construct, monitoring from 80 to 100 transitions, in order to identify best responding peptides in digests of partially purified CYD samples. Depending of the CYD constructs, 2 or 3 peptides were identified for E protein, 2 for C protein, and 1 peptide for M as well as pr proteins. Then, all identified peptides were confirmed by recording MS/MS spectra as soon as a SRM signal was detected above the threshold of 1000 counts/s. All peptides could be assigned based on the series of predominant b and y fragment ions observed in each spectrum (data not shown). Finally, we synthesized heavy isotope-labeled peptides as internal standards for all identified proteotypic peptides and used them to optimize the mass spectrometer parameters (Supplementary data, Table 1).

The final SRM method targets 2 peptides for protein E of CYD1 and 3 for E proteins of CYD2, CYD3 and CYD4 (Figure 1). Only 1 surrogate's peptide of M protein has been monitored for each CYD construct, as well as for protein pr. For protein C, 2 peptides were monitored, both containing methionine. However, in a previous work, we demonstrated that we could accurately quantify these peptides by adding fully oxidized labeled internal standards. For example, for the peptide VVASLMR of protein C, to quantify the oxidized form of the endogenous peptide, we added oxidized labeled internal standards, (VVASLM (ox)R\*), while we added the non-oxidized labeled internal standard (VVASL\*MR) to quantify the non-oxidized form. In addition, to measure the extent

of oxidation of the non-oxidized standard, we added a second oxidized labeled internal standard labeled at two different sites (VVASL\*M(ox)R\*).

Finally, for a full quantification of the 4 targeted proteins, we selected the 3 best transitions per peptide and we built 3 multiplex SRM assay, one for each CYD construct (Supp data, Part 2). In the final SRM method, 6 peptides were monitored for CYD1; 7 peptides were monitored for CYD2 and CYD3. For CYD4 constructs, the SRM method was described in our previous publication <sup>116</sup>.

### 3.2. Optimization of enzymatic hydrolysis

The development of the digestion protocol was based on our previous work. Typically, the optimal tryptic digestion occurred at a trypsin-to-protein ratio of approximately 1:20 (w/w). Nonetheless, a complete digestion of the CYD4 polyprotein was obtained for a 5:1 trypsin-to-protein ratio corresponding to 40 µg trypsin. According to this observation, 2 other trypsin quantities (20 and 80 µg) were tested for CYD1, CYD2 and CYD3 constructs and led to similar protein concentrations (data not shown). In the perspective of a future work consisting in quantify all constructs in a single sample, 40µg of trypsin were used for CYD 1- 3 constructs, as well as for CYD4.

Though, accurate equimolarity between peptides measuring the same CYD viral polyprotein was not reached. Therefore, the enzymatic hydrolysis step was further studied. Tryptic digestion time was evaluated to monitor the relative digestion efficiency for all quantified peptides. To ensure accuracy of the method, internal standards should be stable during the digestion step, or at least they should be impacted in the same way as the endogenous peptide. Indeed, after enzymatic digestion, a tryptic peptide is more prone to degradation, chemical modification or adsorption <sup>125</sup>. To avoid these drawbacks, the use of isotope-labeled protein standards is highly recommended <sup>67</sup>. However, fully labeled proteins could not be used for this project. Indeed, a recombinant protein couldn't have the same conformation of the native protein in the viral lipid envelope that will impact the enzymatic digestion. Furthermore, the synthesis and the purification of recombinant protein are not suitable with the industrial process in terms of costs. To monitor analytical behaviors of both internal standard and endogenous peptides, measurements of their corresponding signals were monitored during overnight digestion (Figure 2). Incubation time of complete digestion was defined when peptide signal reached maximum height. For the 3 constructs, we observed that digestion time was particularly different depending on the protein. For example, peptides belonging to protein E exhibited a long incubation time where the signal of endogenous peptide plateaued after 8h (Figure 2). Internal standards signals were stable during the entire digestion step. In contrast, protein M, Pr and C were digested rapidly, and signals of endogenous peptides were falling as well as their corresponding internal standards (Figure 2). So the ratio endogenous / heavy remained stable, showing that AQUA peptide accurately corrected endogenous peptide loss. In some studies internal standards are added after digestion step <sup>126,127</sup>. In our case, these experiments showed that adding internal standard before digestion are crucial. To ensure maximum tryptic digestion efficiency, an overnight digestion was chosen.

The Figure 3 shows the superimposed chromatograms reconstructed from the most intense SRM transition obtained for endogenous peptides with the final protocol.

### 3.3. Method validation

#### 3.3.1. Internal standards stability

To ensure quantitation accuracy and reproducibility, an important attention should be given to internal standard stability. Indeed, degradation of internal standards could result in an over quantitation of targeted peptides. We observed that degradation of standards occurs principally during freezing/thawing cycles. To avoid this phenomenon, aliquots of a stock solution were prepared and thawing extemporaneously. The stability of the 4 mixtures of standards was tested before each day of measurements (n=12) throughout the validation step (Figure 4). The coefficient of variation (CV) mean is 8%, showing no degradation or oxidation of the standards during the period of the study.

#### 3.3.2. Linearity and limits of quantification

The whole process was also validated by linearity and reproducibility studies described in supplementary data (part 3). Briefly, the linearity range could be validated between 3.38-840.0 nmol/L for 10 peptides and between 6.56-840 nmol/L for 6 other peptides. For the 4 last peptides the linearity was validated between 13.1 and 840 nmol/L. All correlation coefficients were > 0.99. Moreover, CVs on quality control samples were below 15% indicating good repeatability (supp data part 3).

#### 3.3.3. Reproducibility of the entire workflow

The developed assay was then tested for each constructs on 3 different batches of partially purified virus. The reproducibility of the full process was evaluated by performing the assay 9 times (3 samples /days x 3 days) one each samples. The intra-day (3 replicates) and inter-day (9 replicates) variability was < 20% for all measured peptides, indicating good reproducibility of digestion, sample preparation, and MS analysis (Table 1). As we noticed in our previous work, coefficients of variation were not higher for peptides containing methionines and less than 10% of the endogenous peptides were of the oxidized form.

### 3.4. Inter-batches measurements validation and quality control charts

To ensure accuracy of SRM quantitation, a critical point was to obtain both, equimolar ratio between peptides measuring the same protein and equimolar ratio between proteins E and C. For proteins M and pr, this ratio should not necessarily be respected because prM protein is cleaved by furin during virus maturation, releasing the pr protein from the virus. Moreover, if maturation is incomplete, some prM protein remains in the virus<sup>128-130</sup>.

Through the measurement of 3 different batches per constructs (Table 1), we noticed that not all peptide measurements lead to exactly the same final polyprotein concentration. In particular, peptide TLGVNMVR specific for C protein measurement for all constructs is over-estimated compared to peptide VVASLMR. But this over-estimation was very stable and reproducible. We tested some hypotheses to explain this over-concentration including degradation during overnight digestion due to trypsin or adsorption, other standards suppliers, integrity of C protein, some empty viral particles. None could explain this over estimation (sup data part 4).

Based on these considerations, peptide TLGVNMVR was not kept to estimate the mean CYD polyprotein concentration for all constructs. Likewise, peptides used for pr quantification were

excluded for polyprotein concentration estimation due to the doubt about pr protein release during maturation. Then, we determined the polyprotein level by averaging the concentration given by the 5 other peptides for CYD2, CYD3 and CYD4 constructs or the 4 other peptides for CYD1 construct. The variation coefficients between peptides measuring respectively CYD1, CYD3 and CYD4 constructs were  $< 17\%$ , indicating the accuracy of the developed method. However, the variation coefficient between peptides measuring the CYD2 construct is higher ( $< 28\%$ ), due to systematic under-estimation of ETLVFK peptide.

To develop a method to control an industrial process, the question raised was: which criteria could be used to validate the result of the assay. Some studies demonstrate where bias errors could occur when a protein is quantified by a typical bottom-up workflow<sup>131,132</sup>. Despite our final method leads on average concordance between individual peptide concentrations, here we propose another point to assess the accuracy of the developed method. Even if not all measured peptides didn't lead exactly to the same polyprotein concentration, each of them are quantified with quite a high reproducibility ( $CV < 20\%$ ). Moreover, we noticed that the deviation between a measured peptide and the mean polyprotein concentration was constant. The reproducibility of the deviation between peptide could become a criterion to validate the assay in case where an unknown batch is quantified. We built quality control charts as followed. For each peptide a mean deviation to the polyprotein concentration was calculated through the 3 quantified batches per CYD construct. Then, individual deviation from this mean was represented (Figure 5). For all CYD construct, the deviation didn't exceed  $\pm 10\%$  from the mean (Figure 5). Herein high reproducible deviation between peptides measuring the polyprotein could become a benchmark to verify the accuracy of the assay.

The polyprotein concentration was also measured by the genome-equivalent method and gave us the number of viral particles/mL. For one viral particle, the theoretical average of protein E monomers is  $180^{91}$ , so the concentration of this protein could be estimated (sup data part 5). The genome equivalent method estimates the E protein concentration from  $8\mu\text{g/mL}$  (for the most concentrated batch CYD2-A) to  $0.2\mu\text{g/mL}$  (for the less concentrated batch CYD3-A), while the E protein concentration was estimated from  $19\mu\text{g/mL}$ , to  $0.6\mu\text{g/mL}$  by the developed MS method. These values were in the same order of magnitude considering the quite high uncertainty of the genome equivalent method (0.2-0.3log).

### 3.6. Concluding remarks

This study was conducted in order to extend our previous work on the determination of CYD4 virus chimera dengue vaccine, to the measurement of the 3 others variants CYD chimeric virus. In these works, the focus has been made on the difficulty of selecting and quantifying proteins whose small size and the particularity of the sequences does not allow to follow the guidelines of peptides choices.

A particular attention was given to the study of enzymatic hydrolysis protocol, studying both the behavior of the endogenous peptide and its corresponding AQUA standard. The study was validated between  $6.56 - 840 \text{ nmol / L}$ , and  $13.1 - 840 \text{ nmol / L}$  depending of the peptides. The developed method was able to quantify the viral CYD polyprotein in 3 production batches per serotypes, with a good reproducibility ( $CV < 20\%$ ).

## Acknowledgements

We thank Sophie Aycirix and Marion Girod for carefully reading this work and scientific support.

## References

- (1) Kuster, B.; Schirle, M.; Mallick, P.; Aebersold, R. Scoring Proteomes with Proteotypic Peptide Probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (7), 577–583.
- (2) Gillette, M. A.; Carr, S. A. Quantitative Analysis of Peptides and Proteins in Biomedicine by Targeted Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2013**, *10* (1), 28–34.
- (3) Surinova, S.; Schiess, R.; Hüttenhain, R.; Cerciello, F.; Wollscheid, B.; Aebersold, R. On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (1), 5–16.
- (4) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (12), 6940–6945.
- (5) Lottspeich, F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38* (17), 2476–2492.
- (6) De Gruttola, V. G.; Clax, P.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Ellenberg, S. S.; Friedman, L.; Gail, M. H.; Prentice, R.; Wittes, J.; Zeger, S. L. Considerations in the Evaluation of Surrogate Endpoints in Clinical Trials. Summary of a National Institutes of Health Workshop. *Control. Clin. Trials* **2001**, *22* (5), 485–502.
- (7) Papsidero, L. D.; Wang, M. C.; Valenzuela, L. A.; Murphy, G. P.; Chu, T. M. A Prostate Antigen in Sera of Prostatic Cancer Patients. *Cancer Res.* **1980**, *40* (7), 2428–2432.
- (8) Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A.; Levine, P. J.; Fusaro, V. A.; Steinberg, S. M.; Mills, G. B.; Simone, C.; Fishman, D. A.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A. Use of Proteomic Patterns in Serum to Identify Ovarian Cancer. *Lancet (London, England)* **2002**, *359* (9306), 572–577.
- (9) Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: The First Decade and Beyond. *Nat. Genet.* **2003**, *33* Suppl, 311–323.
- (10) O’Farrell, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (10), 4007–4021.
- (11) Jackson, D.; Craven, R. A.; Hutson, R. C.; Graze, I.; Lueth, P.; Tonge, R. P.; Hartley, J. L.; Nickson, J. A.; Rayner, S. J.; Johnston, C.; Dieplinger, B.; Hubalek, M.; Wilkinson, N.; Perren, T. J.; Kehoe, S.; Hall, G. D.; Daxenbichler, G.; Dieplinger, H.; Selby, P. J.; Banks, R. E. Proteomic Profiling Identifies Afamin as a Potential Biomarker for Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (24), 7370–7379.
- (12) Arentz, G.; Weiland, F.; Oehler, M. K.; Hoffmann, P. State of the Art of 2D DIGE. *Proteomics. Clin. Appl.* **2015**, *9* (3-4), 277–288.
- (13) van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. Immunoassay Using Hapten--Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1972**, *24* (1), 77–81.
- (14) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871–874.

- (15) Baker, M. Reproducibility Crisis: Blame It on the Antibodies. *Nature* **2015**, *521* (7552), 274–276.
- (16) Pastor, M. D.; Nogal, A.; Molina-Pinelo, S.; Meléndez, R.; Romero-Romero, B.; Mediano, M. D.; López-Campos, J. L.; García-Carbonero, R.; Sanchez-Gastaldo, A.; Carnero, A.; Paz-Ares, L. Identification of Oxidative Stress Related Proteins as Biomarkers for Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Bronchoalveolar Lavage. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (2), 3440–3455.
- (17) Deak, E.; Charlton, C. L.; Bobenchik, A. M.; Miller, S. A.; Pollett, S.; McHardy, I. H.; Wu, M. T.; Garner, O. B. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS Platforms for Routine Identification of Commonly Isolated Bacteria and Yeast in the Clinical Microbiology Laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *81* (1), 27–33.
- (18) Gregorich, Z. R.; Chang, Y.-H.; Ge, Y. Proteomics in Heart Failure: Top-down or Bottom-Up? *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2014**, *466* (6), 1199–1209.
- (19) Catherman, A. D.; Durbin, K. R.; Ahlf, D. R.; Early, B. P.; Fellers, R. T.; Tran, J. C.; Thomas, P. M.; Kelleher, N. L. Large-Scale Top-down Proteomics of the Human Proteome: Membrane Proteins, Mitochondria, and Senescence. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (12), 3465–3473.
- (20) Ntai, I.; LeDuc, R. D.; Fellers, R. T.; Erdmann-Gilmore, P.; Davies, S. R.; Rumsey, J.; Early, B. P.; Thomas, P. M.; Li, S.; Compton, P. D.; Ellis, M. J. C.; Ruggles, K. V.; Fenyo, D.; Boja, E. S.; Rodriguez, H.; Townsend, R. R.; Kelleher, N. L. Integrated Bottom-up and Top-down Proteomics of Patient-Derived Breast Tumor Xenografts. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *15* (1), 45–56.
- (21) Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution Is Needed? *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1474–1482.
- (22) Iwasaki, M.; Miwa, S.; Ikegami, T.; Tomita, M.; Tanaka, N.; Ishihama, Y. One-Dimensional Capillary Liquid Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the Escherichia Coli Proteome on a Microarray Scale. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2616–2620.
- (23) Ting, Y. S.; Egertson, J. D.; Payne, S. H.; Kim, S.; MacLean, B.; Käll, L.; Aebersold, R.; Smith, R. D.; Noble, W. S.; MacCoss, M. J. Peptide-Centric Proteome Analysis: An Alternative Strategy for the Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (9), 2301–2307.
- (24) Roepstorff, P.; Fohlman, J. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11* (11), 601.
- (25) Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive Ions). *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 886–887.
- (26) Dongré, A. R.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H. Surface-Induced Dissociation: An Effective Tool to Probe Structure, Energetics and Fragmentation Mechanisms of Protonated Peptides. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31* (4), 339–350.
- (27) Tabb, D. L.; Huang, Y.; Wysocki, V. H.; Yates, J. R. Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 1243–1248.
- (28) Blueggel, M.; Chamrad, D.; Meyer, H. E. Bioinformatics in Proteomics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5* (1), 79–88.
- (29) Palagi, P. M.; Hernandez, P.; Walther, D.; Appel, R. D. Proteome Informatics I: Bioinformatics Tools for Processing Experimental Data. *Proteomics* **2006**, *6* (20), 5435–5444.



- (30) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Huang, L.; Hansen, K. C.; Allen, N. P.; Rexach, M.; Burlingame, A. L. Comprehensive Analysis of a Multidimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Dataset Acquired on a Quadrupole Selecting, Quadrupole Collision Cell, Time-of-Flight Mass Spectrometer: II. New Developments in Protein Prospector Allow for Reliable and. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (8), 1194–1204.
- (31) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Medzihradsky, K. F.; Lynn, A. J.; Burlingame, A. L. In-Depth Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data from Disparate Instrument Types. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (12), 2386–2398.
- (32) Michalski, A.; Damoc, E.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Wieghaus, A.; Makarov, A.; Nagaraj, N.; Cox, J.; Mann, M.; Horning, S. Mass Spectrometry-Based Proteomics Using Q Exactive, a High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (9), M111.011015.
- (33) Scheltema, R. A.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Hornburg, D.; Denisov, E.; Damoc, E.; Kuehn, A.; Makarov, A.; Mann, M. The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-Filter, High-Performance Quadrupole and an Ultra-High-Field Orbitrap Analyzer. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (12), 3698–3708.
- (34) Andrews, G. L.; Simons, B. L.; Young, J. B.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal. Chem.* **2011**, *83* (13), 5442–5446.
- (35) Ong, S.-E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (5), 376–386.
- (36) Grønberg, M.; Kristiansen, T. Z.; Iwahori, A.; Chang, R.; Reddy, R.; Sato, N.; Molina, H.; Jensen, O. N.; Hruban, R. H.; Goggins, M. G.; Maitra, A.; Pandey, A. Biomarker Discovery from Pancreatic Cancer Secretome Using a Differential Proteomic Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (1), 157–171.
- (37) Thompson, A.; Schäfer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Johnstone, R.; Mohammed, A. K. A.; Hamon, C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (8), 1895–1904.
- (38) Moulder, R.; Goo, Y. A.; Goodlett, D. R. Label-Free Quantitation for Clinical Proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1410*, 65–76.
- (39) Schulze, W. X.; Usadel, B. Quantitation in Mass-Spectrometry-Based Proteomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 491–516.
- (40) Zhang, A.; Sun, H.; Yan, G.; Han, Y.; Wang, X. Serum Proteomics in Biomedical Research: A Systematic Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *170* (4), 774–786.
- (41) Van Oudenhove, L.; Devreese, B. A Review on Recent Developments in Mass Spectrometry Instrumentation and Quantitative Tools Advancing Bacterial Proteomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (11), 4749–4762.
- (42) Mueller, L. N.; Brusniak, M.-Y.; Mani, D. R.; Aebersold, R. An Assessment of Software Solutions for the Analysis of Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics Data. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (1), 51–61.
- (43) Neilson, K. A.; Ali, N. A.; Muralidharan, S.; Mirzaei, M.; Mariani, M.; Assadourian, G.; Lee, A.; van Sluyter, S. C.; Haynes, P. A. Less Label, More Free: Approaches in Label-Free Quantitative Mass Spectrometry. *Proteomics* **2011**, *11* (4), 535–553.
- (44) MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G. L.; Frewen, B.; Kern,

- R.; Tabb, D. L.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics* **2010**, *26* (7), 966–968.
- (45) Clough, T.; Thaminy, S.; Ragg, S.; Aebersold, R.; Vitek, O. Statistical Protein Quantification and Significance Analysis in Label-Free LC-MS Experiments with Complex Designs. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13 Suppl 1* (16), S6.
- (46) Michalski, A.; Cox, J.; Mann, M. More than 100,000 Detectable Peptide Species Elute in Single Shotgun Proteomics Runs but the Majority Is Inaccessible to Data-Dependent LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (4), 1785–1793.
- (47) Gautier, V.; Mouton-Barbosa, E.; Bouyssié, D.; Delcourt, N.; Beau, M.; Girard, J.-P.; Cayrol, C.; Burlet-Schiltz, O.; Monsarrat, B.; Gonzalez de Peredo, A. Label-Free Quantification and Shotgun Analysis of Complex Proteomes by One-Dimensional SDS-PAGE/NanoLC-MS: Evaluation for the Large Scale Analysis of Inflammatory Human Endothelial Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (8), 527–539.
- (48) Biarc, J.; Gonzalo, P.; Mikaelian, I.; Fattet, L.; Deygas, M.; Gillet, G.; Lemoine, J.; Rimokh, R. Combination of a Discovery LC-MS/MS Analysis and a Label-Free Quantification for the Characterization of an Epithelial-mesenchymal Transition Signature. *J. Proteomics* **2014**, *110*, 183–194.
- (49) Panchaud, A.; Scherl, A.; Shaffer, S. A.; von Haller, P. D.; Kulasekara, H. D.; Miller, S. I.; Goodlett, D. R. Precursor Acquisition Independent from Ion Count: How to Dive Deeper into the Proteomics Ocean. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (15), 6481–6488.
- (50) Röst, H. L.; Malmström, L.; Aebersold, R. Reproducible Quantitative Proteotype Data Matrices for Systems Biology. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26* (22), 3926–3931.
- (51) Bruderer, R.; Bernhardt, O. M.; Gandhi, T.; Miladinović, S. M.; Cheng, L.-Y.; Messner, S.; Ehrenberger, T.; Zanotelli, V.; Butscheid, Y.; Escher, C.; Vitek, O.; Rinner, O.; Reiter, L. Extending the Limits of Quantitative Proteome Profiling with Data-Independent Acquisition and Application to Acetaminophen-Treated Three-Dimensional Liver Microtissues. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (5), 1400–1410.
- (52) Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (12), 1709–1723.
- (53) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.
- (54) Rauniyar, N. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (12), 28566–28581.
- (55) Tang, H.; Fang, H.; Yin, E.; Brasier, A. R.; Sowers, L. C.; Zhang, K. Multiplexed Parallel Reaction Monitoring Targeting Histone Modifications on the QExactive Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (11), 5526–5534.
- (56) Tsuchiya, H.; Tanaka, K.; Saeki, Y. The Parallel Reaction Monitoring Method Contributes to a Highly Sensitive Polyubiquitin Chain Quantification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *436* (2), 223–229.
- (57) Schilling, B.; MacLean, B.; Held, J. M.; Sahu, A. K.; Rardin, M. J.; Sorensen, D. J.; Peters, T.; Wolfe, A. J.; Hunter, C. L.; MacCoss, M. J.; Gibson, B. W. Multiplexed, Scheduled High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Anal. Chem.* **2015**.

- (58) Schiffmann, C.; Hansen, R.; Baumann, S.; Kublik, A.; Nielsen, P. H.; Adrian, L.; von Bergen, M.; Jehmlich, N.; Seifert, J. Comparison of Targeted Peptide Quantification Assays for Reductive Dehalogenases by Selective Reaction Monitoring (SRM) and Precursor Reaction Monitoring (PRM). *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (1), 283–291.
- (59) Ellis, M. J.; Gillette, M.; Carr, S. A.; Paulovich, A. G.; Smith, R. D.; Rodland, K. K.; Townsend, R. R.; Kinsinger, C.; Mesri, M.; Rodriguez, H.; Liebler, D. C. Connecting Genomic Alterations to Cancer Biology with Proteomics: The NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. *Cancer Discov.* **2013**, *3* (10), 1108–1112.
- (60) Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Ranish, J.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R. Computational Prediction of Proteotypic Peptides for Quantitative Proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (1), 125–131.
- (61) Fusaro, V. A.; Mani, D. R.; Mesirov, J. P.; Carr, S. A. Prediction of High-Responding Peptides for Targeted Protein Assays by Mass Spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (2), 190–198.
- (62) Brönstrup, M. Absolute Quantification Strategies in Proteomics Based on Mass Spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1* (4), 503–512.
- (63) Carr, S. A.; Abbatiello, S. E.; Ackermann, B. L.; Borchers, C.; Domon, B.; Deutsch, E. W.; Grant, R. P.; Hoofnagle, A. N.; Hüttenhain, R.; Koomen, J. M.; Liebler, D. C.; Liu, T.; MacLean, B.; Mani, D. R.; Mansfield, E.; Neubert, H.; Paulovich, A. G.; Reiter, L.; Vitek, O.; Aebersold, R.; Anderson, L.; Bethem, R.; Blonder, J.; Boja, E.; Botelho, J.; Boyne, M.; Bradshaw, R. A.; Burlingame, A. L.; Chan, D.; Keshishian, H.; Kuhn, E.; Kinsinger, C.; Lee, J. S. H.; Lee, S.-W.; Moritz, R.; Oses-Prieto, J.; Rifai, N.; Ritchie, J.; Rodriguez, H.; Srinivas, P. R.; Townsend, R. R.; Van Eyk, J.; Whiteley, G.; Wiita, A.; Weintraub, S. Targeted Peptide Measurements in Biology and Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-Based Assay Development Using a Fit-for-Purpose Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (3), 907–917.
- (64) Picotti, P.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring-Based Proteomics: Workflows, Potential, Pitfalls and Future Directions. *Nat. Methods* **2012**, *9* (6), 555–566.
- (65) Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Lacoux, X.; Morla, A.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J. Clinical Quantitation of Prostate-Specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (5), 1006–1015.
- (66) Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed Absolute Quantification in Proteomics Using Artificial QCAT Proteins of Concatenated Signature Peptides. *Nat. Methods* **2005**, *2* (8), 587–589.
- (67) Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J. Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (12), 2139–2149.
- (68) Gallien, S.; Duriez, E.; Domon, B. Selected Reaction Monitoring Applied to Proteomics. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (3), 298–312.
- (69) Zhao, L.; Whiteaker, J. R.; Pope, M. E.; Kuhn, E.; Jackson, A.; Anderson, N. L.; Pearson, T. W.; Carr, S. A.; Paulovich, A. G. Quantification of Proteins Using Peptide Immunoaffinity Enrichment Coupled with Mass Spectrometry. *J. Vis. Exp.* **2011**, No. 53.
- (70) Anderson, N. L.; Anderson, N. G.; Haines, L. R.; Hardie, D. B.; Olafson, R. W.; Pearson, T. W. Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* **3** (2), 235–244.
- (71) Shi, T.; Fillmore, T. L.; Sun, X.; Zhao, R.; Schepmoes, A. A.; Hossain, M.; Xie, F.; Wu, S.; Kim, J.-S.; Jones, N.; Moore, R. J.; Pasa-Tolić, L.; Kagan, J.; Rodland, K. D.; Liu, T.; Tang,

- K.; Camp, D. G.; Smith, R. D.; Qian, W.-J. Antibody-Free, Targeted Mass-Spectrometric Approach for Quantification of Proteins at Low Picogram per Milliliter Levels in Human Plasma/serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (38), 15395–15400.
- (72) Shi, T.; Qian, W.-J. Antibody-Free PRISM-SRM for Multiplexed Protein Quantification: Is This the New Competition for Immunoassays in Bioanalysis? *Bioanalysis* **2013**, *5* (3), 267–269.
- (73) Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Bettsworth, F.; Lacoux, X.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J. Multiple Reaction Monitoring Cubed for Protein Quantification at the Low Nanogram/milliliter Level in Nondepleted Human Serum. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (22), 9343–9352.
- (74) Venable, J. D.; Dong, M.-Q.; Wohlschlegel, J.; Dillin, A.; Yates, J. R. Automated Approach for Quantitative Analysis of Complex Peptide Mixtures from Tandem Mass Spectra. *Nat. Methods* **2004**, *1* (1), 39–45.
- (75) Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (6), O111.016717.
- (76) Liu, Y.; Buil, A.; Collins, B. C.; Gillet, L. C. J.; Blum, L. C.; Cheng, L.-Y.; Vitek, O.; Mouritsen, J.; Lachance, G.; Spector, T. D.; Dermitzakis, E. T.; Aebersold, R. Quantitative Variability of 342 Plasma Proteins in a Human Twin Population. *Mol. Syst. Biol.* **2015**, *11* (1), 786.
- (77) Plumb, R. S.; Johnson, K. A.; Rainville, P.; Smith, B. W.; Wilson, I. D.; Castro-Perez, J. M.; Nicholson, J. K. UPLC/MS(E); a New Approach for Generating Molecular Fragment Information for Biomarker Structure Elucidation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (13), 1989–1994.
- (78) Helm, S.; Dobritzsch, D.; Rödiger, A.; Agne, B.; Baginsky, S. Protein Identification and Quantification by Data-Independent Acquisition and Multi-Parallel Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry (MS(E)) in the Chloroplast Stroma Proteome. *J. Proteomics* **2014**, *98*, 79–89.
- (79) Domon, B.; Aebersold, R. Options and Considerations When Selecting a Quantitative Proteomics Strategy. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (7), 710–721.
- (80) Ebhardt, H. A.; Root, A.; Sander, C.; Aebersold, R. Applications of Targeted Proteomics in Systems Biology and Translational Medicine. *Proteomics* **2015**, *15* (18), 3193–3208.
- (81) Sam, S.-S.; Omar, S. F. S.; Teoh, B.-T.; Abd-Jamil, J.; AbuBakar, S. Review of Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases Seen among Adults: A Retrospective Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7* (5), e2194.
- (82) Kalayanarooj, S.; Vaughn, D. W.; Nimmannitya, S.; Green, S.; Suntayakorn, S.; Kunentrasai, N.; Viramitrachai, W.; Ratanachu-ek, S.; Kiatpolpoj, S.; Innis, B. L.; Rothman, A. L.; Nisalak, A.; Ennis, F. A. Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176* (2), 313–321.
- (83) Alera, M. T.; Srikiatkachorn, A.; Velasco, J. M.; Tac-An, I. A.; Lago, C. B.; Clapham, H. E.; Fernandez, S.; Levy, J. W.; Thaisomboonsuk, B.; Klungthong, C.; Macareo, L. R.; Nisalak, A.; Hermann, L.; Villa, D.; Yoon, I.-K. Incidence of Dengue Virus Infection in Adults and Children in a Prospective Longitudinal Cohort in the Philippines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (2), e0004337.
- (84) Bhatt, S.; Gething, P. W.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Farlow, A. W.; Moyes, C. L.; Drake, J. M.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Sankoh, O.; Myers, M. F.; George, D. B.; Jaenisch, T.;

- Wint, G. R. W.; Simmons, C. P.; Scott, T. W.; Farrar, J. J.; Hay, S. I. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* **2013**, *496* (7446), 504–507.
- (85) Brady, O. J.; Gething, P. W.; Bhatt, S.; Messina, J. P.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Moyes, C. L.; Farlow, A. W.; Scott, T. W.; Hay, S. I. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (8), e1760.
- (86) Guzman, M. G.; Halstead, S. B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H. S.; Martínez, E.; Nathan, M. B.; Pelegrino, J. L.; Simmons, C.; Yoksan, S.; Peeling, R. W. Dengue: A Continuing Global Threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (12 Suppl), S7–S16.
- (87) Telle, O.; Vaguet, A.; Yadav, N. K.; Lefebvre, B.; Daudé, E.; Paul, R. E.; Cebeillac, A.; Nagpal, B. N. The Spread of Dengue in an Endemic Urban Milieu-The Case of Delhi, India. *PLoS One* **2016**, *11* (1), e0146539.
- (88) Schaffner, F.; Mathis, A. Dengue and Dengue Vectors in the WHO European Region: Past, Present, and Scenarios for the Future. *Lancet. Infect. Dis.* **2014**, *14* (12), 1271–1280.
- (89) Kraemer, M. U. G.; Sinka, M. E.; Duda, K. A.; Mylne, A.; Shearer, F. M.; Barker, C. M.; Moore, C. G.; Carvalho, R. G.; Coelho, G. E.; Van Bortel, W.; Hendrickx, G.; Schaffner, F.; Elyazar, I. R.; Teng, H.-J.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Pigott, D. M.; Scott, T. W.; Smith, D. L.; Wint, G. W.; Golding, N.; Hay, S. I. The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* **2015**, *4*, e08347.
- (90) Halstead, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* **1988**, *239* (4839), 476–481.
- (91) Perera, R.; Kuhn, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11* (4), 369–377.
- (92) Wallace, D.; Canouet, V.; Garbes, P.; Wartel, T. A. Challenges in the Clinical Development of a Dengue Vaccine. *Curr. Opin. Virol.* **2013**, *3* (3), 352–356.
- (93) Guy, B.; Barrere, B.; Malinowski, C.; Saville, M.; Teyssou, R.; Lang, J. From Research to Phase III: Preclinical, Industrial and Clinical Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine. *Vaccine* **2011**, *29* (42), 7229–7241.
- (94) Fernandez, S.; Thomas, S. J.; De La Barrera, R.; Im-Erbsin, R.; Jarman, R. G.; Baras, B.; Toussaint, J.-F.; Mossman, S.; Innis, B. L.; Schmidt, A.; Malice, M.-P.; Festracts, P.; Warter, L.; Putnak, J. R.; Eckels, K. H. An Adjuvanted, Tetravalent Dengue Virus Purified Inactivated Vaccine Candidate Induces Long-Lasting and Protective Antibody Responses against Dengue Challenge in Rhesus Macaques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92* (4), 698–708.
- (95) Dulbecco, R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1952**, *38* (8), 747–752.
- (96) LaBarre, D. D.; Lowy, R. J. Improvements in Methods for Calculating Virus Titer Estimates from TCID<sub>50</sub> and Plaque Assays. *J. Virol. Methods* **2001**, *96* (2), 107–126.
- (97) Puttikhunt, C.; Prommool, T.; U-thainual, N.; Ong-ajchaowlerd, P.; Yoosook, K.; Tawilert, C.; Duangchinda, T.; Jairangsri, A.; Tangthawornchaikul, N.; Malasit, P.; Kasinrer, W. The Development of a Novel Serotyping-NS1-ELISA to Identify Serotypes of Dengue Virus. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50* (4), 314–319.
- (98) Young, P. R.; Hilditch, P. A.; Bletchly, C.; Halloran, W. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38* (3), 1053–1057.
- (99) Menting, S.; Thai, K. T. D.; Nga, T. T. T.; Phuong, H. L.; Klatser, P.; Wolthers, K. C.; Binh, T.

- Q.; de Vries, P. J.; Beld, M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* **2011**, *2011*, 514681.
- (100) Weidmann, M.; Sall, A. A.; Manuguerra, J.-C.; Koivogui, L.; Adjami, A.; Traoré, F. F.; Hedlund, K.-O.; Lindegren, G.; Mirazimi, A. Quantitative Analysis of Particles, Genomes and Infectious Particles in Supernatants of Haemorrhagic Fever Virus Cell Cultures. *Viol. J.* **2011**, *8*, 81.
- (101) Kraus, A. A.; Messer, W.; Haymore, L. B.; de Silva, A. M. Comparison of Plaque- and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (11), 3777–3780.
- (102) Santana, W. I.; Williams, T. L.; Winne, E. K.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. Quantification of Viral Proteins of the Avian H7 Subtype of Influenza Virus: An Isotope Dilution Mass Spectrometry Method Applicable for Producing More Rapid Vaccines in the Case of an Influenza Pandemic. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4088–4095.
- (103) Williams, T. L.; Luna, L.; Guo, Z.; Cox, N. J.; Pirkle, J. L.; Donis, R. O.; Barr, J. R. Quantification of Influenza Virus Hemagglutinins in Complex Mixtures Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Vaccine* **2008**, *26* (20), 2510–2520.
- (104) Simon, R.; Lemoine, J.; Fonbonne, C.; Jaffuel, A.; Léonard, J.-F.; Gautier, J.-C.; Pasquier, O.; Salvador, A. Absolute Quantification of Podocin, a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Human Urine, by Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Cubed Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *94*, 84–91.
- (105) Percy, A. J.; Yang, J.; Chambers, A. G.; Simon, R.; Hardie, D. B.; Borchers, C. H. Multiplexed MRM with Internal Standards for Cerebrospinal Fluid Candidate Protein Biomarker Quantitation. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (8), 3733–3747.
- (106) Huillet, C.; Adrait, A.; Lebert, D.; Picard, G.; Trauchessec, M.; Louwagie, M.; Dupuis, A.; Hittinger, L.; Ghaleh, B.; Le Corvoisier, P.; Jaquinod, M.; Garin, J.; Bruley, C.; Brun, V. Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ<sup>TM</sup>) and Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (2), M111.008235.
- (107) Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A. Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 787–797.
- (108) Whiteaker, J. R.; Lin, C.; Kennedy, J.; Hou, L.; Trute, M.; Sokal, I.; Yan, P.; Schoenherr, R. M.; Zhao, L.; Voytovich, U. J.; Kelly-Spratt, K. S.; Krasnoselsky, A.; Gafken, P. R.; Hogan, J. M.; Jones, L. A.; Wang, P.; Amon, L.; Chodosh, L. A.; Nelson, P. S.; McIntosh, M. W.; Kemp, C. J.; Paulovich, A. G. A Targeted Proteomics-Based Pipeline for Verification of Biomarkers in Plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (7), 625–634.
- (109) Martínez-Bartolomé, S.; Deutsch, E. W.; Binz, P.-A.; Jones, A. R.; Eisenacher, M.; Mayer, G.; Campos, A.; Canals, F.; Bech-Serra, J.-J.; Carrascal, M.; Gay, M.; Paradela, A.; Navajas, R.; Marcilla, M.; Hernández, M. L.; Gutiérrez-Blázquez, M. D.; Velarde, L. F. C.; Aloria, K.; Beaskoetxea, J.; Medina-Aunon, J. A.; Albar, J. P. Guidelines for Reporting Quantitative Mass Spectrometry Based Experiments in Proteomics. *J. Proteomics* **2013**, *95*, 84–88.
- (110) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
- (111) Bereman, M. S.; MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. The Development of Selected Reaction Monitoring Methods for Targeted Proteomics via Empirical Refinement. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1134–1141.

- (112) Percy, A. J.; Parker, C. E.; Borchers, C. H. Pre-Analytical and Analytical Variability in Absolute Quantitative MRM-Based Plasma Proteomic Studies. *Bioanalysis* **2013**, *5* (22), 2837–2856.
- (113) Mo, W.; Ma, Y.; Takao, T.; Neubert, T. A. Sequencing of Oxidized Methionine-Containing Peptides for Protein Identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (21), 2080–2081.
- (114) Whiteaker, J. R.; Lin, C.; Kennedy, J.; Hou, L.; Trute, M.; Sokal, I.; Yan, P.; Schoenherr, R. M.; Zhao, L.; Voytovich, U. J.; Kelly-Spratt, K. S.; Krasnoselsky, A.; Gafken, P. R.; Hogan, J. M.; Jones, L. A.; Wang, P.; Amon, L.; Chodosh, L. A.; Nelson, P. S.; McIntosh, M. W.; Kemp, C. J.; Paulovich, A. G. A Targeted Proteomics-Based Pipeline for Verification of Biomarkers in Plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (7), 625–634.
- (115) Domanski, D.; Percy, A. J.; Yang, J.; Chambers, A. G.; Hill, J. S.; Freue, G. V. C.; Borchers, C. H. MRM-Based Multiplexed Quantitation of 67 Putative Cardiovascular Disease Biomarkers in Human Plasma. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1222–1243.
- (116) Rougemont, B.; Simon, R.; Carrière, R.; Biarc, J.; Fonbonne, C.; Salvador, A.; Huillet, C.; Berard, Y.; Adam, O.; Manin, C.; Lemoine, J. Absolute Quantification of Dengue Virus Serotype 4 Chimera Vaccine Candidate in Vero Cell Culture by Targeted Mass Spectrometry. *Proteomics* **2015**, *15* (19), 3320–3330.
- (117) Guy, B.; Almond, J.; Lang, J. Dengue Vaccine Prospects: A Step Forward. *Lancet* **2011**, *377* (9763), 381–382.
- (118) Villar, L.; Dayan, G. H.; Arredondo-García, J. L.; Rivera, D. M.; Cunha, R.; Deseda, C.; Reynales, H.; Costa, M. S.; Morales-Ramírez, J. O.; Carrasquilla, G.; Rey, L. C.; Dietze, R.; Luz, K.; Rivas, E.; Montoya, M. C. M.; Supelano, M. C.; Zambrano, B.; Langevin, E.; Boaz, M.; Tornieporth, N.; Saville, M.; Noriega, F. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 141103114505002.
- (119) Capeding, M. R.; Tran, N. H.; Hadinegoro, S. R. S.; Ismail, H. I. H. M.; Chotpitayasunondh, T.; Chua, M. N.; Luong, C. Q.; Rusmil, K.; Wirawan, D. N.; Nallusamy, R.; Pitisuttithum, P.; Thisyakorn, U.; Yoon, I.-K.; van der Vliet, D.; Langevin, E.; Laot, T.; Hutagalung, Y.; Frago, C.; Boaz, M.; Wartel, T. A.; Tornieporth, N. G.; Saville, M.; Bouckennooghe, A. Clinical Efficacy and Safety of a Novel Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children in Asia: A Phase 3, Randomised, Observer-Masked, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2014**, *384* (9951), 1358–1365.
- (120) Guy, B.; Briand, O.; Lang, J.; Saville, M.; Jackson, N. Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine: One More Step Forward. *Vaccine* **2015**, *33* (50), 7100–7111.
- (121) Hamer, D.; Lichtveld, M. Spatial Distribution of Epidemiological Cases of Dengue Fever in Suriname, 2001-2012. *West Indian Med. J.* **2015**, *64* (4).
- (122) Mantel, N.; Aguirre, M.; Gulia, S.; Girerd-Chambaz, Y.; Colombani, S.; Moste, C.; Barban, V. Standardized Quantitative RT-PCR Assays for Quantitation of Yellow Fever and Chimeric Yellow Fever-Dengue Vaccines. *J. Virol. Methods* **2008**, *151* (1), 40–46.
- (123) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
- (124) Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A. Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 787–797.
- (125) Arsene, C. G.; Ohlendorf, R.; Burkitt, W.; Pritchard, C.; Henrion, A.; O'Connor, G.; Bunk, D. M.; Güttler, B. Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (11), 4154–4160.

- (126) Percy, A. J.; Yang, J.; Hardie, D. B.; Chambers, A. G.; Tamura-Wells, J.; Borchers, C. H. Precise Quantitation of 136 Urinary Proteins by LC/MRM-MS Using Stable Isotope Labeled Peptides as Internal Standards for Biomarker Discovery And/or Verification Studies. *Methods* **2015**, *81*, 24–33.
- (127) Sturm, R.; Sheynkman, G.; Booth, C.; Smith, L. M.; Pedersen, J. A.; Li, L. Absolute Quantification of Prion Protein (90-231) Using Stable Isotope-Labeled Chymotryptic Peptide Standards in a LC-MRM AQUA Workflow. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (9), 1522–1533.
- (128) Li, L.; Lok, S.-M.; Yu, I.-M.; Zhang, Y.; Kuhn, R. J.; Chen, J.; Rossmann, M. G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* **2008**, *319* (5871), 1830–1834.
- (129) Plevka, P.; Battisti, A. J.; Sheng, J.; Rossmann, M. G. Mechanism for Maturation-Related Reorganization of Flavivirus Glycoproteins. *J. Struct. Biol.* **2014**, *185* (1), 27–31.
- (130) Zheng, A.; Yuan, F.; Kleinfelter, L. M.; Kielian, M. A Toggle Switch Controls the Low pH-Triggered Rearrangement and Maturation of the Dengue Virus Envelope Proteins. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3877.
- (131) van den Broek, I.; Romijn, F. P. H. T. M.; Smit, N. P. M.; van der Laarse, A.; Drijfhout, J. W.; van der Burgt, Y. E. M.; Cobbaert, C. M. Quantifying Protein Measurands by Peptide Measurements: Where Do Errors Arise? *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (2), 928–942.
- (132) van den Broek, I.; Smit, N. P. M.; Romijn, F. P. H. T. M.; van der Laarse, A.; Deelder, A. M.; van der Burgt, Y. E. M.; Cobbaert, C. M. Evaluation of Interspecimen Trypsin Digestion Efficiency prior to Multiple Reaction Monitoring-Based Absolute Protein Quantification with Native Protein Calibrators. *J. Proteome Res.* **2013**, *12* (12), 5760–5774.
- (133) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.; Cojocaru, L.; Dufield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; Xu, K.; Yang, Z.; Yu, J.; Zhang, Y. J.; Vazvaei, F. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *AAPS J.* **2014**, *17* (1), 1–16.
- (134) Simon, R.; Girod, M.; Fonbonne, C.; Salvador, A.; Clément, Y.; Lantéri, P.; Amouyel, P.; Lambert, J. C.; Lemoine, J. Total ApoE and ApoE4 Isoform Assays in an Alzheimer's Disease Case-Control Study by Targeted Mass Spectrometry (n=669): A Pilot Assay for Methionine-Containing Proteotypic Peptides. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (11), 1389–1403.
- (135) Dai, J.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, X.; Lu, Z.; Cai, Y.; Qian, X. Identification of Degradation Products Formed during Performic Oxidation of Peptides and Proteins by High-Performance Liquid Chromatography with Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization and Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (9), 1130–1138.
- (136) Bordeerat, N. K.; Georgieva, N. I.; Klapper, D. G.; Collins, L. B.; Cross, T. J.; Borchers, C. H.; Swenberg, J. A.; Boysen, G. Accurate Quantitation of Standard Peptides Used for Quantitative Proteomics. *Proteomics* **2009**, *9* (15), 3939–3944.
- (137) Kato, M.; Kato, H.; Eyama, S.; Takatsu, A. Application of Amino Acid Analysis Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Isotope Dilution Mass Spectrometry for Peptide and Protein Quantification. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (27), 3059–3064.
- (138) Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Dupierris, V.; Couté, Y.; Bruley, C.; Garin, J.; Dupuis, A.; Jaquinod, M.; Brun, V. Introducing AAA-MS, a Rapid and Sensitive Method for Amino Acid Analysis Using Isotope Dilution and High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (7), 3929–3936.
- (139) Keil-Dlouhá, V.; Zylber, N.; Imhoff, J.-M.; Tong, N.-T.; Keil, B. Proteolytic Activity of



- Pseudotrypsin. *FEBS Lett.* **1971**, *16* (4), 291–295.
- (140) Research, C. for D. E. and. Guidances (Drugs) - Biopharmaceutics. Center for Drug Evaluation and Research.
- (141) Hunter, Christie L; Simons, B. The Scheduled MRM™ Algorithm Enables Intelligent Use of Retention Time During Multiple Reaction Monitoring. *Sciex Tech. Note* **2010**.
- (142) Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K. Applications of Liquid Chromatography–mass Spectrometry for Food Analysis. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 74–85.
- (143) Martínez-Domínguez, G.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A. Analytical Approaches for the Determination of Pesticide Residues in Nutraceutical Products and Related Matrices by Chromatographic Techniques Coupled to Mass Spectrometry. *Talanta* **2014**, *118*, 277–291.
- (144) Boja, E. S.; Fehniger, T. E.; Baker, M. S.; Marko-Varga, G.; Rodriguez, H. Analytical Validation Considerations of Multiplex Mass-Spectrometry-Based Proteomic Platforms for Measuring Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (12), 5325–5332.
- (145) Escher, C.; Reiter, L.; MacLean, B.; Ossola, R.; Herzog, F.; Chilton, J.; MacCoss, M. J.; Rinner, O. Using iRT, a Normalized Retention Time for More Targeted Measurement of Peptides. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1111–1121.
- (146) Reiter, L.; Rinner, O.; Picotti, P.; Hüttenhain, R.; Beck, M.; Brusniak, M.-Y.; Hengartner, M. O.; Aebersold, R. mProphet: Automated Data Processing and Statistical Validation for Large-Scale SRM Experiments. *Nat. Methods* **2011**, *8* (5), 430–435.
- (147) Lawrence, R. T.; Searle, B. C.; Llovet, A.; Villén, J. Plug-and-Play Analysis of the Human Phosphoproteome by Targeted High-Resolution Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2016**.
- (148) Abbatiello, S. E.; Mani, D. R.; Schilling, B.; Maclean, B.; Zimmerman, L. J.; Feng, X.; Cusack, M. P.; Sedransk, N.; Hall, S. C.; Addona, T.; Allen, S.; Dodder, N. G.; Ghosh, M.; Held, J. M.; Hedrick, V.; Inerowicz, H. D.; Jackson, A.; Keshishian, H.; Kim, J. W.; Lyssand, J. S.; Riley, C. P.; Rudnick, P.; Sadowski, P.; Shaddock, K.; Smith, D.; Tomazela, D.; Wahlander, A.; Waldemarson, S.; Whitwell, C. A.; You, J.; Zhang, S.; Kinsinger, C. R.; Mesri, M.; Rodriguez, H.; Borchers, C. H.; Buck, C.; Fisher, S. J.; Gibson, B. W.; Liebler, D.; MacCoss, M.; Neubert, T. A.; Paulovich, A.; Regnier, F.; Skates, S. J.; Tempst, P.; Wang, M.; Carr, S. A. Design, Implementation and Multisite Evaluation of a System Suitability Protocol for the Quantitative Assessment of Instrument Performance in Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS). *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (9), 2623–2639.
- (149) Chambers, A. G.; Percy, A. J.; Yang, J.; Borchers, C. H. Multiple Reaction Monitoring Enables Precise Quantification of 97 Proteins in Dried Blood Spots. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (11), 3094–3104.
- (150) Soste, M.; Hrabakova, R.; Wanka, S.; Melnik, A.; Boersema, P.; Maiolica, A.; Wernas, T.; Tognetti, M.; von Mering, C.; Picotti, P. A Sentinel Protein Assay for Simultaneously Quantifying Cellular Processes. *Nat. Methods* **2014**, *11* (10), 1045–1048.
- (151) Surinova, S.; Choi, M.; Tao, S.; Schöffler, P. J.; Chang, C.-Y.; Clough, T.; Vysloužil, K.; Khoylou, M.; Srovnal, J.; Liu, Y.; Matondo, M.; Hüttenhain, R.; Weisser, H.; Buhmann, J. M.; Hajdúch, M.; Brenner, H.; Vitek, O.; Aebersold, R. Prediction of Colorectal Cancer Diagnosis Based on Circulating Plasma Proteins. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7* (9), 1166–1178.
- (152) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.
- (153) Gallien, S.; Kim, S. Y.; Domon, B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard

- Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (6), 1630–1644.
- (154) Kiyonami, R.; Schoen, A.; Prakash, A.; Peterman, S.; Zabrouskov, V.; Picotti, P.; Aebersold, R.; Huhmer, A.; Domon, B. Increased Selectivity, Analytical Precision, and Throughput in Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (2), M110.002931.
- (155) Toth, I. K.; van der Wolf, J. M.; Saddler, G.; Lojkowska, E.; Hélias, V.; Pirhonen, M.; Tsrör Lahkim, L.; Elphinstone, J. G. Dickeya Species: An Emerging Problem for Potato Production in Europe. *Plant Pathol.* **2011**, *60* (3), 385–399.
- (156) Reverchon, S.; Nasser, W. Dickeya Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5* (5), 622–636.
- (157) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Lacroix, J.-M. The Two-Component System CpxAR Is Essential for Virulence in the Phytopathogen Bacteria Dickeya Dadantii EC3937. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17* (11), 4415–4428.
- (158) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Lacroix, J.-M. Inactivation of pecS Restores the Virulence of Mutants Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans in the Phytopathogenic Bacterium Dickeya Dadantii. *Microbiology* **2014**, *160* (Pt 4), 766–777.
- (159) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Dondeyne, J.; Delrue, B.; Robbe-Masselot, C.; Vidal, O.; Prouvost, A.-F.; Boussebart, G.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. Concentration of Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPGs) Modulates the Activation Level of the RcsCD RcsB Phosphorelay in the Phytopathogen Bacteria Dickeya Dadantii. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (3), 881–894.
- (160) Bouchart, F.; Delangle, A.; Lemoine, J.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. Proteomic Analysis of a Non-Virulent Mutant of the Phytopathogenic Bacterium Erwinia Chrysanthemi Deficient in Osmoregulated Periplasmic Glucans: Change in Protein Expression Is Not Restricted to the Envelope, but Affects General Metabolism. *Microbiology* **2007**, *153* (Pt 3), 760–767.
- (161) Bouchart, F.; Boussebart, G.; Prouvost, A.-F.; Cogez, V.; Madec, E.; Vidal, O.; Delrue, B.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. The Virulence of a Dickeya Dadantii 3937 Mutant Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans Is Restored by Inactivation of the RcsCD-RcsB Phosphorelay. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (13), 3484–3490.
- (162) Delangle, A.; Prouvost, A.-F.; Cogez, V.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M.; Cotte-Pattat, N. H. Characterization of the Erwinia Chrysanthemi Gan Locus, Involved in Galactan Catabolism. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (19), 7053–7061.
- (163) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Medzihradszky, K. F.; Lynn, A. J.; Burlingame, A. L. In-Depth Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data from Disparate Instrument Types. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (12), 2386–2398.
- (164) Schilling, B.; Rardin, M. J.; MacLean, B. X.; Zawadzka, A. M.; Frewen, B. E.; Cusack, M. P.; Sorensen, D. J.; Bereman, M. S.; Jing, E.; Wu, C. C.; Verdin, E.; Kahn, C. R.; Maccoss, M. J.; Gibson, B. W. Platform-Independent and Label-Free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline: Application to Protein Acetylation and Phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (5), 202–214.
- (165) Choi, M.; Chang, C.-Y.; Clough, T.; Broudy, D.; Killeen, T.; MacLean, B.; Vitek, O. MSstats: An R Package for Statistical Analysis of Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomic Experiments. *Bioinformatics* **2014**, *30* (17), 2524–2526.
- (166) Klipper-Aurbach, Y.; Wasserman, M.; Braunsiegel-Weintrob, N.; Borstein, D.; Peleg, S.; Assa, S.; Karp, M.; Benjamini, Y.; Hochberg, Y.; Laron, Z. Mathematical Formulae for the Prediction of the Residual Beta Cell Function during the First Two Years of Disease in Children and Adolescents with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Med. Hypotheses* **1995**, *45* (5), 486–490.

- (167) Kanehisa, M.; Goto, S.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Hirakawa, M. KEGG for Representation and Analysis of Molecular Networks Involving Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (Database issue), D355–D360.
- (168) Reverchon, S.; Nasser, W. Dickeya Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5* (5), 622–636.
- (169) Effantin, G.; Rivasseau, C.; Gromova, M.; Bligny, R.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Massive Production of Butanediol during Plant Infection by Phytopathogenic Bacteria of the Genera Dickeya and Pectobacterium. *Mol. Microbiol.* **2011**, *82* (4), 988–997.
- (170) Fagard, M.; Dellagi, A.; Roux, C.; Périno, C.; Rigault, M.; Boucher, V.; Shevchik, V. E.; Expert, D. Arabidopsis Thaliana Expresses Multiple Lines of Defense to Counterattack Erwinia Chrysanthemi. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **2007**, *20* (7), 794–805.
- (171) Biarc, J.; Gonzalo, P.; Mikaelian, I.; Fattet, L.; Deygas, M.; Gillet, G.; Lemoine, J.; Rimokh, R. Combination of a Discovery LC–MS/MS Analysis and a Label-Free Quantification for the Characterization of an Epithelial–mesenchymal Transition Signature. *J. Proteomics* **2014**, *110*, 183–194.
- (172) Sjöström, M.; Ossola, R.; Breslin, T.; Rinner, O.; Malmström, L.; Schmidt, A.; Aebersold, R.; Malmström, J.; Niméus, E. A Combined Shotgun and Targeted Mass Spectrometry Strategy for Breast Cancer Biomarker Discovery. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (7), 2807–2818.
- (173) Picotti, P.; Clément-Ziza, M.; Lam, H.; Campbell, D. S.; Schmidt, A.; Deutsch, E. W.; Röst, H.; Sun, Z.; Rinner, O.; Reiter, L.; Shen, Q.; Michaelson, J. J.; Frei, A.; Alberti, S.; Kusebauch, U.; Wollscheid, B.; Moritz, R. L.; Beyer, A.; Aebersold, R. A Complete Mass-Spectrometric Map of the Yeast Proteome Applied to Quantitative Trait Analysis. *Nature* **2013**, *494* (7436), 266–270.
- (174) Hüttenhain, R.; Surinova, S.; Ossola, R.; Sun, Z.; Campbell, D.; Cerciello, F.; Schiess, R.; Bausch-Fluck, D.; Rosenberger, G.; Chen, J.; Rinner, O.; Kusebauch, U.; Hajdúch, M.; Moritz, R. L.; Wollscheid, B.; Aebersold, R. N-Glycoprotein SRMATlas: A Resource of Mass Spectrometric Assays for N-Glycosites Enabling Consistent and Multiplexed Protein Quantification for Clinical Applications. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (4), 1005–1016.
- (175) Whiteaker, J. R.; Halusa, G. N.; Hoofnagle, A. N.; Sharma, V.; MacLean, B.; Yan, P.; Wrobel, J. A.; Kennedy, J.; Mani, D. R.; Zimmerman, L. J.; Meyer, M. R.; Mesri, M.; Boja, E.; Carr, S. A.; Chan, D. W.; Chen, X.; Chen, J.; Davies, S. R.; Ellis, M. J. C.; Fenyő, D.; Hiltke, T.; Ketchum, K. A.; Kinsinger, C.; Kuhn, E.; Liebler, D. C.; Liu, T.; Loss, M.; MacCoss, M. J.; Qian, W.-J.; Rivers, R.; Rodland, K. D.; Ruggles, K. V.; Scott, M. G.; Smith, R. D.; Thomas, S.; Townsend, R. R.; Whiteley, G.; Wu, C.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Rodriguez, H.; Paulovich, A. G. Using the CPTAC Assay Portal to Identify and Implement Highly Characterized Targeted Proteomics Assays. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1410*, 223–236.
- (176) Burgess, M. W.; Keshishian, H.; Mani, D. R.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. Simplified and Efficient Quantification of Low-Abundance Proteins at Very High Multiplex via Targeted Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (4), 1137–1149.
- (177) Selevsek, N.; Chang, C.-Y.; Gillet, L. C.; Navarro, P.; Bernhardt, O. M.; Reiter, L.; Cheng, L.-Y.; Vitek, O.; Aebersold, R. Reproducible and Consistent Quantification of the Saccharomyces Cerevisiae Proteome by SWATH-Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (3), 739–749.
- (178) Lebert, D.; Louwagie, M.; Goetze, S.; Picard, G.; Ossola, R.; Duquesne, C.; Basler, K.; Ferro, M.; Rinner, O.; Aebersold, R.; Garin, J.; Mouz, N.; Brunner, E.; Brun, V. DIGESTIF: A Universal Quality Standard for the Control of Bottom-up Proteomics Experiments. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (2), 787–803.

- (179) BOURGEAUX, V.; GODFRIN, Y. METHOD FOR ASSAYING INOSITOL HEXAPHOSPHATE (IHP). October 15, 2010.

**Table 1: Reproducibility of the developed method for CYD1, CYD2, CYD3 and CYD4 constructs CV%: n=9, 3 samples /days x 3 days**

(a) : Polyprotein CV by excluding TLGVMNMR and Pr peptides measurements

		CYD1-E		CYD1-PR		CYD1-M		CYD1-C		Polyprotein		
		TEVTNPAVL R	VITANPIVTDK	FHLTTR	SVALAPHVGLGLETR	VVASLMR	TLGVMNMR					
1-A	Mean nmol/L	159.75	235.94	185.29	228.52	194.98	404.80	Mean nmol/L	204.80			
	Inter-day CV %	7	5	9	9	12	11	CV % <sup>(a)</sup>	17			
	Intra-day CV %	6	6	8	8	8	5					
1-B	Mean nmol/L	277.36	400.95	334.10	412.05	377.91	718.45	Mean nmol/L	367.07			
	Inter-day CV %	0.3	0.5	18	18	9	9	CV % <sup>(a)</sup>	17			
	Intra-day CV %	3	4	2	2	8	4					
1-C	Mean nmol/L	99.56	144.95	113.77	140.31	119.55	249.45	Mean nmol/L	126.09			
	Inter-day CV %	1	3	4	4	10	10	CV % <sup>(a)</sup>	17			
	Intra-day CV %	3	2	3	3	6	6					
		CYD2-E			CYD2-PR		CYD2-M		CYD2-C		Polyprotein	
		AWLVHR	ETLVTFK	LITVNPVTEK	SLVFK	SVALVPHVGMGLETR	VVASLMR	TLGVMNMR				
2-A	Mean nmol/L	226.06	113.54	237.36	163.82	234.63	276.88	489.71	Mean nmol/L	259.49		
	Inter-day CV %	4	2	8	10	26	10	4	CV % <sup>(a)</sup>	28		
	Intra-day CV %	4	4	5	10	8	2	6				
2-B	Mean nmol/L	206.01	109.57	219.39	156.21	199.31	235.39	425.05	Mean nmol/L	232.41		
	Inter-day CV %	9	3	9	6	17	12	15	CV % <sup>(a)</sup>	25		
	Intra-day CV %	7	4	4	10	6	10	12				
2-C	Mean nmol/L	194.97	99.81	214.50	142.67	211.98	211.16	421.39	Mean nmol/L	231.72		
	Inter-day CV %	12	5	2	8	7	4	8	CV % <sup>(a)</sup>	26		
	Intra-day CV %	17	3	6	10	8	9	21				
		CYD3-E			CYD3-PR		CYD3-M		CYD3-C		Polyprotein	
		GSLVCAK	LITANPVVTK	TEATQLATLR	FHLTSR	SVALAPHVGMGLDTR	VVASLMR	TLGVMNMR				
3-A	Mean nmol/L	11.65	11.47	10.56	2.70	14.60	10.74	21.64	Mean nmol/L	11.80		
	Inter-day CV %	5	4	2	6	1	5	1	CV % <sup>(a)</sup>	14		
	Intra-day CV %	10	3	6	9	6	9	4				
3-B	Mean nmol/L	75.52	69.91	62.34	30.50	94.49	61.95	131.92	Mean nmol/L	72.84		
	Inter-day CV %	2	4	5	0	4	4	2	CV % <sup>(a)</sup>	18		
	Intra-day CV %	6	3	3	5	9	3	10				
3-C	Mean nmol/L	21.07	20.14	18.76	6.33	27.21	19.08	40.47	Mean nmol/L	21.25		
	Inter-day CV %	4	2	3	7	4	2	1	CV % <sup>(a)</sup>	16		
	Intra-day CV %	10	10	9	6	10	7	10				
		CYD4-E			CYD4-PR		CYD4-M		CYD4-C		Polyprotein	
		EVALLR	YEGAGAPCK	VPIEIR	GRPLLFK	VESWILR	VVASLMR	TLGVMNMR				
4-A	Mean nmol/L	52.37	56.11	48.84	44.71	38.78	42.07	73.76	Mean nmol/L	47.63		
	Inter-day CV %	4	6	7	7	3	8	9	CV % <sup>(a)</sup>	15		
4-B	Mean nmol/L	27.92	32.63	29.32	11.10	22.36	22.78	37.90	Mean nmol/L	27.00		
	Inter-day CV %	9	9	3	13	9	7	5	CV % <sup>(a)</sup>	16		
4-C	Mean nmol/L	42.45	47.42	44.29	34.99	33.72	32.99	63.84	Mean nmol/L	40.17		
	Inter-day CV %	3	5	6	8	8	5	2	CV % <sup>(a)</sup>	16		

**Figures caption:**

Figure 1: Structure of the Chimeric yellow fever dengue vaccine polyprotein. Under, locations of targeted proteins and peptides for the 4 constructs.

Figure 2: Kinetic of trypsin hydrolysis time for targeted peptides and their corresponding internal standards. Curves show the proportion of total peptide area in function of the time of trypsin hydrolysis time

Figure 3: Reconstructed ion chromatograms of the endogenous targeted peptides for each constructs after method development.

Figure 4: Stability of internal standards in stock solution during method validation, n = 12 days of measurements.

**Supplementary data:**

Part 1: Used Internal standards used and their providers.

Part 2: MRM parameters used for CYD1, CYD2, CYD3 proteins quantification.

Part 3: Linearity and limits of quantification of the developed quantification method for CYD1, CYD2 and CYD4 constructs.

Part 4: Experiences to verify hypothesis concerning TLGVNMVR over estimation.

(A): study of potential trypsin degradation.

(B): study of potential loss during sample preparation.

(C): SDS-PAGE gel showing no degradation of C protein.

Part 5: Correlation of MS and Genome equivalent measurements for protein E in each quantified batches of the 4 CYD virus

**Figure 1**

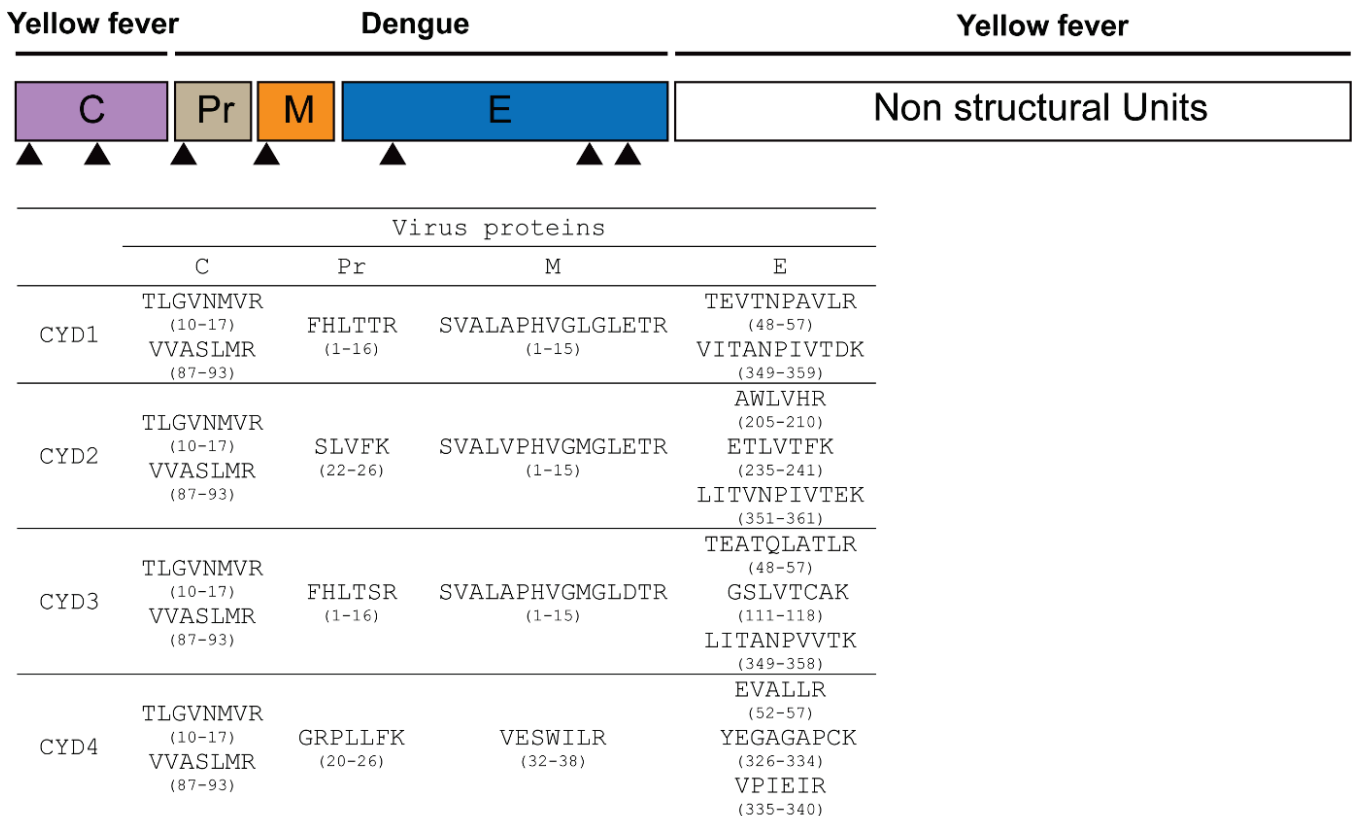


Figure 2

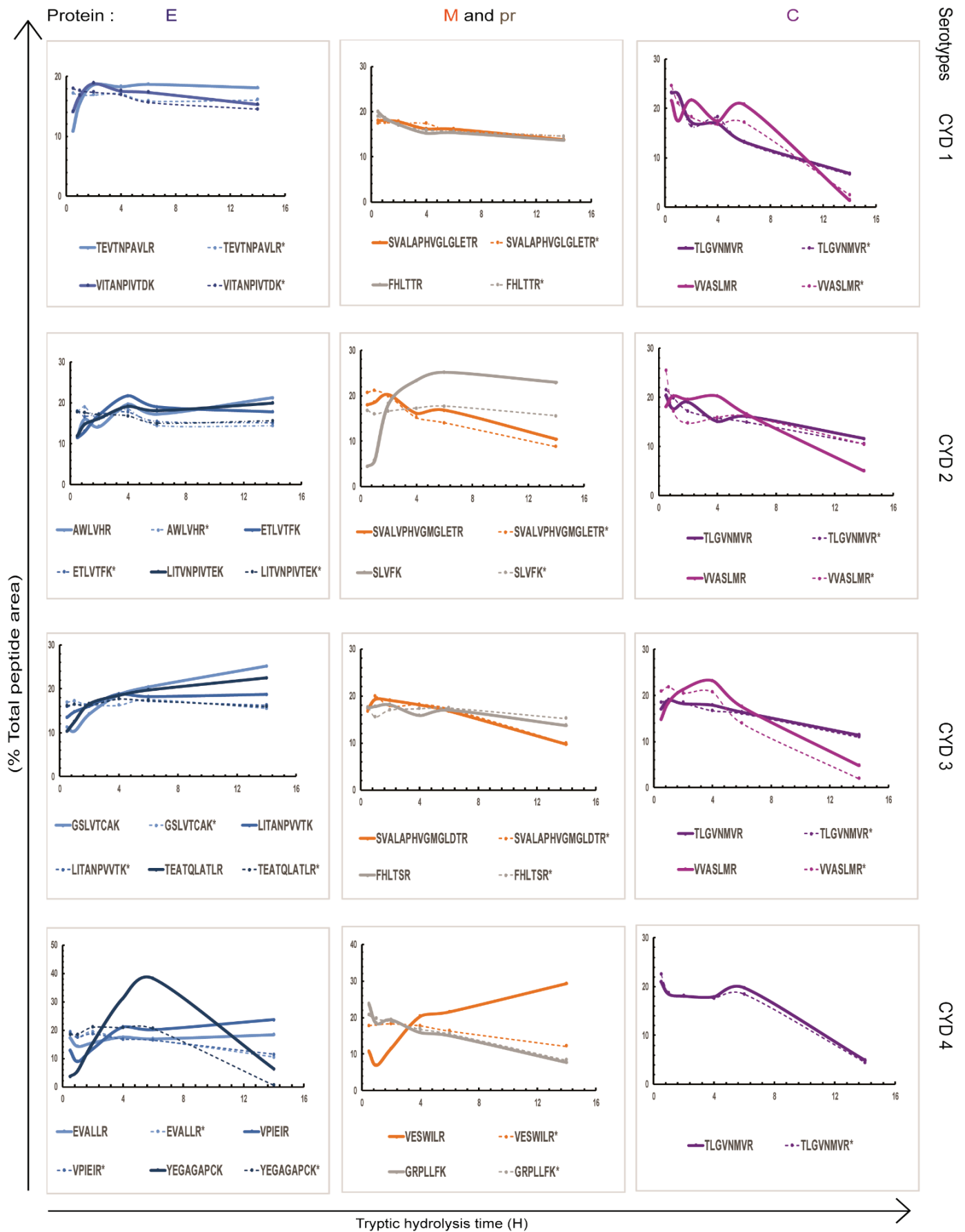




Figure 3

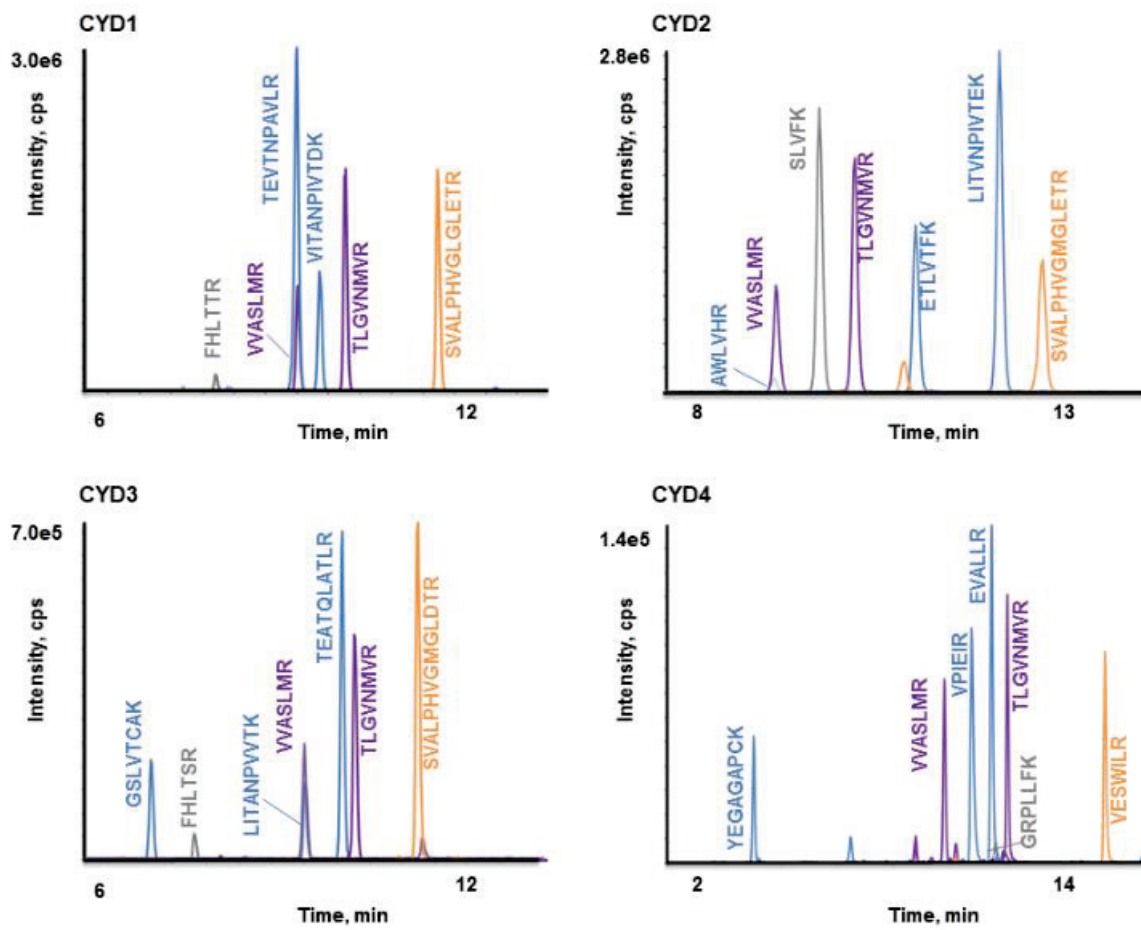
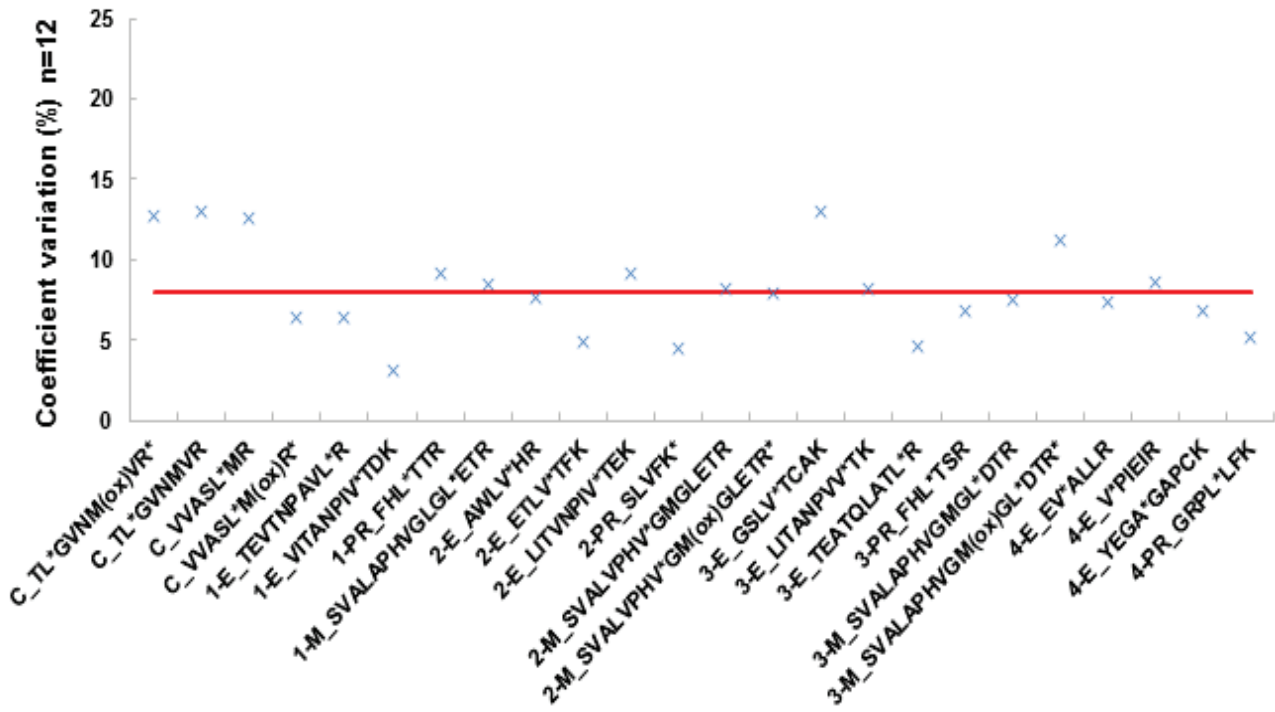
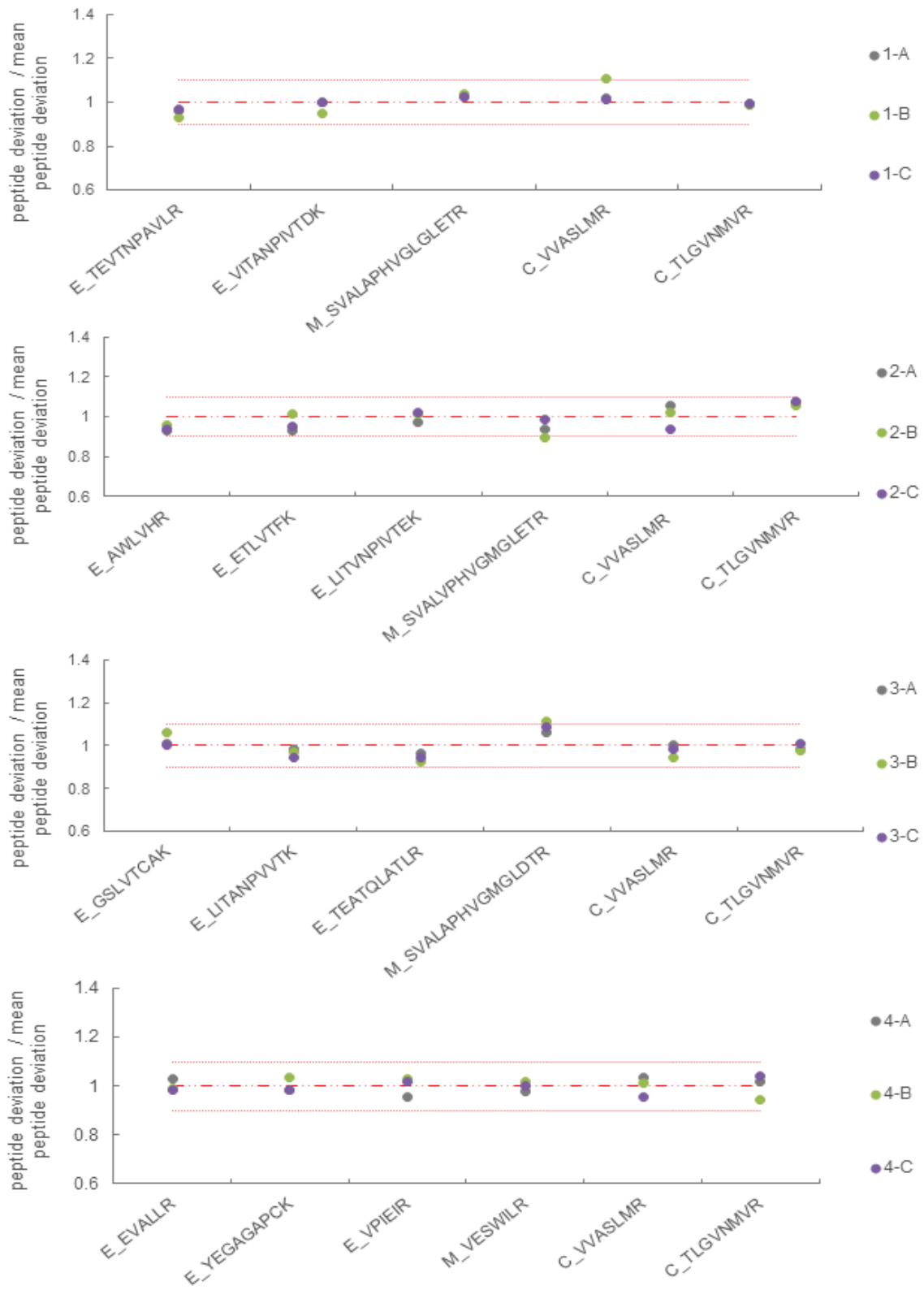


Figure 4



**Figure 5**



## Supplementary data – Part 1

Virus serotype	Protein	Peptide sequence	Provider
1, 2, 3	C	VVASL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)MR	Thermo Fisher Scientific
1, 2, 3	C	VVASL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)M(ox)R( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	Thermo Fisher Scientific
1, 2, 3	C	TLGVNMV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	Thermo Fisher Scientific
1, 2, 3	C	TL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GVNM(ox)VR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	Thermo Fisher Scientific
1	E	TEVTNPAVL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	Proteogenix
1	E	VITANPIV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TDK	Proteogenix
1	pr	FHL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TTR	Proteogenix
1	M	SVALAPHVGLGL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)ETR	Proteogenix
2	E	AWLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)HR	Proteogenix
2	E	ETLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TFK	Proteogenix
2	E	LITVNPIV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TEK	Proteogenix
2	pr	SLVFK( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	Thermo Fisher Scientific
2	M	SVALVPHV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GMGLETR	Proteogenix
2	M	SVALVPHV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GM(ox)GLETR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	Thermo Fisher Scientific
3	E	TEATQLATL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	Proteogenix
3	E	GSLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TCAK	Proteogenix
3	E	LITANPVV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TK	Proteogenix
3	pr	FHL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TSR	Proteogenix
3	M	SVALAPHVGMGL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)DTR	Proteogenix
3	M	SVALAPHVGM(ox)GL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)DTR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	Thermo Fisher Scientific

Supplementary data – Part 2

CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential; DP: declustering potential; EP: entrance potential

Serotype	Protein	Peptide sequence	Internal standard (IS)	Fragment ion	Precursor ion	Product ion	DP	EP	CE	CXP	
CYD1,2 and 3	C	TLGVNMV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	IS	2y4	448.3	525.3	45	12	23	24	
				2y6	448.3	681.4	45	12	22	28	
		TLGVNM VR	endogenous	2y4	445.3	519.3	45	12	23	24	
				2y5	445.3	618.3	45	12	25	24	
		2y6	445.3	675.4	45	12	22	28			
		TL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GVNM (ox)VR	Oxydation of IS	2y5	456.3	640.4	45	12	25	24	
	2y6			456.3	697.4	45	12	22	28		
	TL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GVNM (ox)VR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	IS	2y4	461.8	545.3	45	12	23	24		
			2y6	461.8	701.4	45	12	25	24		
	CYD1	E	TEVTNPAVL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	IS	2y4	393.3	618.3	30	6	22.8	12
					2y5	393.2	587.3	30	6	22.8	12
			2y6	393.2	686.4	30	6	22.8	12		
TEVTNPAVLR			endogenous	2y4	388.2	506.3	30	6	22.8	12	
				2y5	388.2	577.3	30	6	22.8	12	
2y6			388.2	676.4	30	6	22.8	12			
VITANPIV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TDK		IS	2y4	401.2	532.3	30	6	23.1	12		
			2y5	401.2	603.3	30	6	23.1	12		
2y6		401.2	702.4	30	6	23.1	12				
VITANPIVTDK		endogenous	2y4	404.7	539.3	30	6	23.1	12		
			2y5	404.7	610.3	30	6	23.1	12		
2y6		404.7	709.4	30	6	23.1	12				
PR	FHL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TTR	IS	2y4	398.2	522.3	30	6	23.1	12		
			2y5	398.2	593.3	30	6	23.1	12		
	2y6	398.2	692.4	30	6	23.1	12				
	FHLTTR	endogenous	2y4	393.3	519.3	30	6	23.1	12		
			2y5	393.2	587.3	30	6	23.1	12		
	2y6	393.2	686.4	30	6	23.1	12				
M	SVALAPHVGLGL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)ETR	IS	3y7	509.64	752.4	50	13	26	19		
			3y10++	509.64	543.3	50	13	26	19		
	SVALAPHVGLGLETR	endogenous	3y13++	507.3	667.4	50	13	26	19		
			3y10++	507.3	539.3	50	13	26	19		
	3y7	507.3	745.4	50	13	30	30				
	CYD2	E	AWLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)HR	IS	2y5	394.25	716.45	35	12.5	21.2	30
2y3					394.25	417.2	35	12.5	22	20	
2y2			394.25	258.1	35	12.5	22	17			
AWLVHR			endogenous	2y3	391.47	411.2	35	12.5	22	20	
				2y2	391.47	258.1	35	12.5	22	17	
ETLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TFK			IS	2y3	422.26	395.23	40	13	17	14	
		2y4		422.26	500.34	40	13	21	20		
2y5		422.26	613.43	40	13	21	20				
ETLVTFK		endogenous	2y3	419.2	395.2	40	13	17	14		
			2y4	419.2	494.3	40	13	21	20		
2y5		419.2	607.4	40	13	21	20				
LITVNPV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TEK		IS	2y6	616.89	692.46	60	5	25	20		
	2y7		616.89	806.49	60	5	25	33			
2y9	616.89	1006.6	60	5	25	20					
LITVNPVTEK	endogenous	2y6	613.9	686.4	60	5	25	33			
		2y7	613.9	800.5	60	5	25	33			
2y9	613.9	1000.6	60	5	25	20					
PR	SLVFK( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	IS	2y3	301.186	401.25	30	6	19.6	12		
			2y4	301.186	514.334	30	6	19.6	12		
	2y4++	301.186	257.67	30	6	19.6	12				
	SLVFK	endogenous	2y4	297.186	392.25	30	6	19.6	12		
			2y4++	297.186	253.67	30	6	19.6	12		
	M	SVALVPHV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GM GLETR	IS	3y13++	524.64	693.4	50	6	19	14	
3y7				524.64	763.37	50	6	32	23		
3y10++		524.64	543.3	50	6	25	16				
SVALVPHVGM GLETR		endogenous	3y13++	522.6	690.4	50	6	19	20		
			3y7	522.6	763.4	50	6	32	23		
3y10++		522.6	548.8	50	6	25	16				
SVALVPHV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GM (ox)GLETR	Oxydation of IS	3y13++	528	701.4	50	6	19	20			
		3y10++	528	559.8	50	6	25	16			
CYD3	E	SVALVPHV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)GM (ox)GLETR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	IS	3y12++	533.3	670.9	50	6	32	20	
				3y10++	533.3	556.8	50	6	25	16	
	SVALVPHVGM (ox)GLETR	endogenous	3y13++	528	698.4	50	6	19	22		
			3y12++	528	662.9	50	6	32	20		
	3y10++	528	556.8	50	6	25	16				
	CYD1	E	GSLV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TCAK	IS	2y6	421.2	697.4	70	13	16	25
2y5					421.2	584.3	70	13	19	25	
2y4			421.2	479.2	70	13	19	25			
GSLVTCAK			endogenous	2y6	418.2	691.4	60	13	22.7	36	
				2y5	418.2	578.3	60	13	26	32	
2y4			418.2	479.2	60	13	22.7	36			
LITANPVV( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TK		IS	2y8	531.35	835.5	60	13	22.7	36		
			2y7	531.35	734.4	60	13	26	32		
2y2		531.35	227.3	60	13	22	21				
LITANPVVTK		endogenous	2y8	528.3	829.5	65	12	26.3	16.5		
			2y7	528.3	728.4	65	12	30	36		
2y2		528.3	227.3	65	12	30	36				
PR	TEATQLATL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)R	IS	2y8	555.8	880.4	65	12	26.3	16.5		
			2y7	555.8	809.5	65	12	30	36		
	2y2	555.8	231.1	65	12	30	36				
	TEATQLATLR	endogenous	2y7	552.3	833.5	65	14	19.5	13		
			2y7	552.3	802.5	60	14	19.3	19		
	2y2	552.3	231.1	60	14	34.5	19				
FHL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)TSR	IS	2y4	384.24	483.5	60	13	23	22			
		2y2	384.24	285.1	60	13	22	25			
2y5++	384.24	310.5	60	13	22	25					
M	FHLTSR	endogenous	2y4	380.7	476.3	60	13	23	22		
			2b2	380.7	285.1	60	13	22	25		
	2y5++	380.7	307.2	60	13	22	25				
	SVALAPHVGM GL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)DTR	IS	3y13++	510.9	672.3	60	14	19.5	13		
			3y10++	510.9	545.3	60	14	19.3	19		
	3y7	510.9	756.4	60	14	34.5	19				
SVALAPHVGM GLDTR	endogenous	3y13++	508.6	669.4	60	14	19.5	13			
		3y10++	508.6	547.6	60	14	19.3	19			
3y7	508.6	749.4	60	14	34.5	19					
CYD2	E	SVALAPHVGM (ox)GL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)DTR	Oxydation of IS	3y13++	516.3	680.8	60	14	19.5	13	
				3y10++	516.3	553.3	60	14	19.3	19	
	3y7	516.3	772.4	60	14	34.5	19				
	SVALAPHVGM (ox)GL( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)DTR( <sup>15</sup> N <sup>13</sup> C)	IS	3y13++	519.3	685.4	60	14	19.5	13		
			3y10++	519.3	557.8	60	14	19.3	19		
	3y7	519.3	775.4	60	14	34.5	19				
SVALAPHVGM (ox)GLDTR	endogenous	3y13++	513.9	677.3	60	14	19.5	13			
		3y10++	513.9	549.8	60	14	19.3	19			
3y7	513.9	765.3	60	14	34.5	19					

### Supplementary data – Part 3

The linearity of the method was evaluated by performing the developed method on 3 separate digests. Labeled peptides spiked in partially purified virus were used to generate calibration curves and to study the linearity range of the assay from 3.38 to 840 nmol/L. We also prepared quality control samples at low and high concentration (23.1 and 280.0 nmol/L, respectively). The peak area of standard peptides was used as the assay variable and was plotted against nominal concentration. To determine the best weighting factor, concentrations were back calculated and the residual plot was examined. The model with the lowest bias and the most constant variance across the concentration range was considered as the best model. Calibration curves were obtained from weighted ( $1/x$ ) linear regression analysis of the data ( $y = ax + b$ ), where  $y$  is the peak area and  $x$  the nominal concentration. The linearity was typically validated when the range of accuracies were between 80-120% and CV were below <20% and if the correlation coefficient ( $r$ ) was higher than 0.990<sup>63,133</sup>. The LOQ was defined at the lowest analyte concentration which can be measured both with 80% < accuracies < 120% or CV <20%. We measured across the 3 separate runs the parameters described above for the 20 peptides of the study (Table1). The linearity range could be validated between 3.38-840.0 nmol/L for 10 peptides and between 6.56-840 nmol/L for 6 other peptides. For the 4 last peptides the linearity was validated between 13.1 and 840 nmol/L (Table2). All correlation coefficients were > 0.99 (Table2). Moreover, CVs on quality control samples were below 15% indicating good repeatability. Blank samples were verified and no interference was noticed (data not shown).

## Supplementary data – Part 3 (next)

Serotype	Protein	Peptide	Fragment ion	Linearity			Assay reproducibility		
				correlation coefficient ( r )	linear concentration	LOQ (nmol/L)	QC concentration	accuracy	% CV
					range	(nmol/L)			
1, 2, 3	C	VVASLMR	2y6	0.995	13.1-840.0	13.1	23.1	118.6	9.8
							280.0	105.3	7.1
1, 2, 3	C	VVASLM(ox)R	2y6	0.999	13.1-840.0	13.1	23.1	90.1	14.4
							280.0	105.3	1.8
1, 2, 3	C	TLGVNMVR	2y6	0.996	3.38-840.0	3.38	23.1	96.6	8.5
							280.0	103.3	6.6
1, 2, 3	C	TLGVNM(ox)VR	2y6	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	101.9	8.4
							280.0	100.4	2.1
1	E	TEVTNPAVLR	2b2	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	100.9	3.1
							280.0	99.6	6.5
1	E	VITANPIVTDK	2y9	0.998	3.38-840.0	3.38	23.1	95.8	9.1
							280.0	101.0	2.6
1	pr	FHLTTR	2b2	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	92.0	4.2
							280.0	101.1	1.2
1	M	SVALAPHVGLGLETR	3y7	0.994	6.56-840.0	6.56	23.1	118.4	2.0
							280.0	97.9	0.7
2	E	AWLVHR	2b2	0.996	13.1-840.0	13.1	23.1	118.3	8.9
							280.0	103.3	11.2
2	E	ETLVTFK	2y3	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	99.2	6.7
							280.0	96.7	3.2
2	E	LITVNPIVTEK	2y9	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	107.1	3.2
							280.0	97.1	4.0
2	pr	SLVFK	2y3	0.999	6.56-840.0	6.56	23.1	88.8	2.7
							280.0	96.2	6.8
2	M	SVALVPHVGMGLETR	3y7	0.996	6.56-840.0	6.56	23.1	115.6	7.6
							280.0	110.6	5.4
2	M	SVALVPHVGM(ox)GLETR	3y7	0.997	6.56-840.0	6.56	23.1	105.6	1.8
							280.0	98.9	4.7
3	E	TEATQLATLR	2y8	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	104.4	5.3
							280.0	98.5	1.1
3	E	GSLVCAK	2y5	0.998	6.56-840.0	6.56	23.1	112.8	15.6
							280.0	98.8	5.0
3	E	LITANPVVTK	2b2	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	100.1	6.4
							280.0	100.1	2.8
3	pr	FHLTSR	2y5	0.999	6.56-840.0	6.56	23.1	95.6	7.53
							280.0	104.0	2.4
3	M	SVALAPHVGMGLDTR	3y13 <sup>++</sup>	0.997	13.1-840.0	13.1	23.1	110.2	5.6
							280.0	101.4	7.6
3	M	SVALAPHVGM(ox)GLDTR	3y13 <sup>++</sup>	0.999	3.38-840.0	3.38	23.1	105.9	2.7
							280.0	99.0	3.5

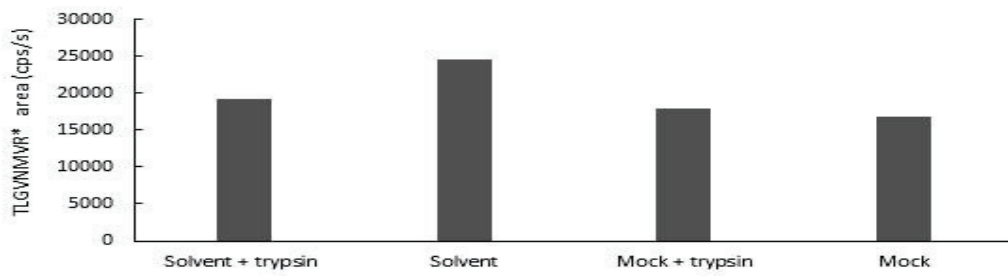
**Supplementary data – Part 4**

The peptide TLGVNMVR, measuring C protein for all constructs, gave a molar concentration around 1.8 times higher than the second peptide (VVASLMR) which measured the C protein but it was very reproducible. Hypotheses to explain this over-concentration were first based on suppositions of standard degradation, as we already observed this standard was degraded during the overnight digestion (Figure 2). Even though endogenous and standard peptide seemed identically impacted, we verified a potential degradation by trypsin by letting TLGVNMVR standard 12h at 37°C with or without trypsin, results showed that this peptide was not degraded by trypsin (sup data figure A part 4). On top of that, there was no potential adsorption or degradation during denaturation or reduction steps (sup data figure B part 4). We also verified the integrity of C protein by analyzing purified virus of each construct by SDS-page (sup data figure C part 4). No protein C degradation was observed. Moreover, 2 other standards suppliers were tested but led to the same results (data not shown). An error on the real spiked standard's concentration is the best hypothesis.

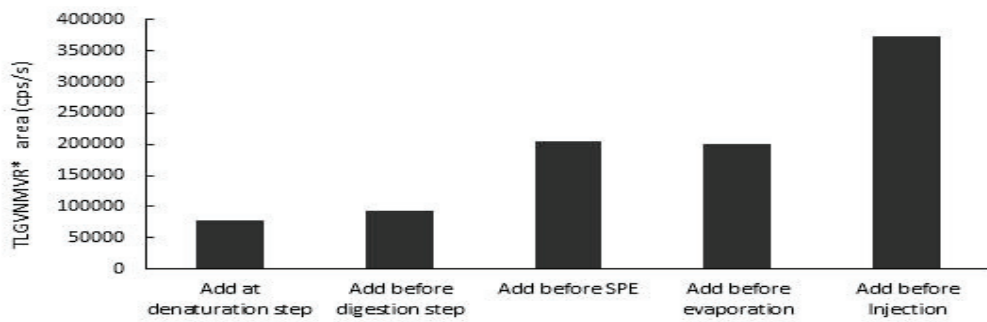


Supplementary data – Part 4 (next)

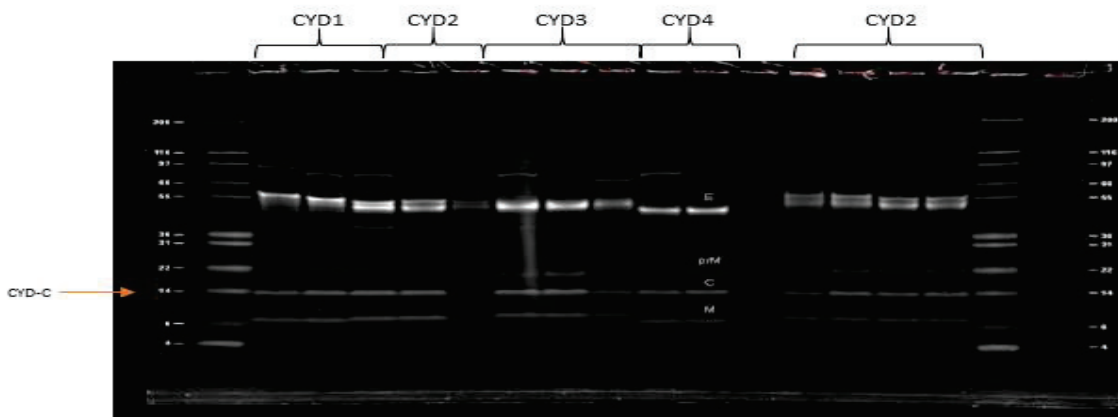
A)



B)



C)



## Supplementary data – Part 5

CONSTRUCT	BATCH NAME	MW PROTEIN E G/MOL	MS ASSAYS		GENOME EQUIVALENT ASSAYS	
			MS dose nmol/L	Concentration E protein µg/mL	Geq/mL	Estimation E µg/mL
CYD1	1-A	53480	205	11.0	$10^{11.1}$	1.9
	1-B		368	19.7	$10^{11.6}$	6.0
	1-C		126	6.7	$10^{11.5}$	4.7
CYD2	2-A	54238	260	14.1	$10^{11.7}$	7.5
	2-B		232	12.6	$10^{11.5}$	4.7
	2-C		232	12.6	$10^{11.4}$	3.8
CYD3	3-A	53393	12	0.6	$10^{10.2}$	0.2
	3-B		73	3.9	$10^{11}$	1.5
	3-C		21	1.1	$10^{10.4}$	0.4
CYD4	4-A		48	2.6	$10^{10.9}$	1.8
	4-B		27	1.5	NA	NA
	4-C		40	2.2	$10^{10.8}$	0.9

## 2.4. Compléments et perspectives d'amélioration

L'objectif de cette étude était de développer puis transférer une méthode ciblée pour la quantification absolue des quatre sérotypes des virus chimères CYD1- 4 candidats vaccin. Dans cet objectif de transfert, une grande attention a été portée à tous les points de variations analytiques, pouvant engendrer une dérive des mesures. A travers cette étude, deux points « clés » du développement d'une méthode de quantification par la stratégie AQUA peuvent être cités : l'importance de la stabilité des étalons internes au cours du processus analytique ainsi que la difficulté d'obtenir un rendement de digestion trypsique de 100%. Cette partie revient sur les points soulevés dans la problématique du transfert de méthode.

### 2.4.1. Le dosage des peptides à Méthionines

Comme nous l'avons vu dans la partie résultats (2.4), la petite taille ainsi que la particularité des séquences des protéines d'intérêt nous ont conduits à choisir des peptides rapporteurs ne respectant les critères recommandés dans les standards. De ce fait, des peptides contenant des résidus Méthionines ont été sélectionnés.

Les Méthionines contiennent un atome de soufre ayant la possibilité de s'oxyder une ou deux fois, pour donner respectivement les formes Méthionines sulfoxyde et Méthionines sulfones (Figure 23). Seule la forme Méthionine sulfoxyde est retrouvée de manière endogène, la forme Méthionine sulfone peut être obtenue par une réaction d'oxydation chimique.

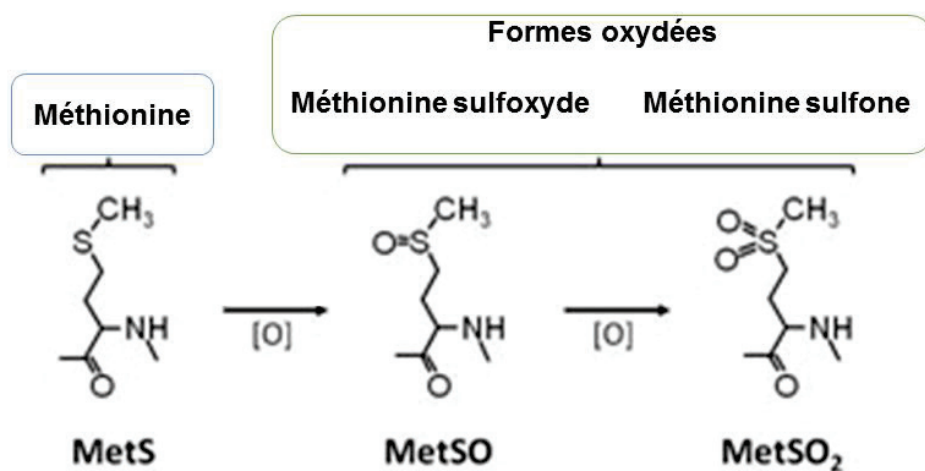


Figure 23 : Structure de la Méthionine et de ses formes mono et doublement oxydées

L'oxydation change les propriétés physico-chimiques de la Méthionine et de ce fait celles du peptide cible, entraînant une modification du temps de rétention chromatographique. De plus, le peptide contenant une Méthionine mono-oxydée aura un incrément de masse de 16 Daltons par rapport au peptide contenant une Méthionine non modifiée. Ces deux formes du peptide ne subiront pas le même effet matrice et s'ioniseront différemment dans la source ESI. Il sera donc nécessaire d'avoir un étalon pour doser le peptide non oxydé et un autre étalon pour doser la forme mono-oxydée.

Au laboratoire, une précédente méthode de dosage de peptides à Méthionine a été développée lors de la thèse de Romain Simon. Ainsi, par une oxydation totale des Méthionines (forme di-oxydée) à l'acide performique, il a pu doser un peptide spécifique de l'isoforme ApoE4 dans du plasma de patients atteints de la maladie d'Alzheimer<sup>134</sup>. Cependant, la réaction d'oxydation est longue (24 heures) et peut engendrer des modifications sur les peptides contenant des résidus Tyrosine ou Tryptophane<sup>135</sup>. Dans le cadre du dosage du CYD, nous avons cherché une alternative à cette méthode, afin principalement de simplifier la préparation des échantillons, mais aussi de ne pas réduire plus le choix des peptides cibles.

L'oxydation peut se produire naturellement sur la protéine endogène lors de modifications post-traductionnelles. Mais, elle peut aussi être induite par le processus analytique, c'est le cas par exemple lors de la préparation et la conservation des échantillons (de virus CYD, des poudres ou solutions mères des étalons AQUA) ; ou encore lors de la concentration de l'échantillon par évaporation. Afin d'éviter les biais lors du dosage, il est nécessaire de disposer d'un moyen de quantification du taux d'oxydation du peptide endogène mais aussi d'un moyen de contrôler l'oxydation des étalons marqués AQUA.

L'idée développée pour ce projet utilise un « triple étalonnage », (i) le peptide endogène non oxydé est dosé par un premier étalon non oxydé, (ii) le peptide endogène oxydé est dosé par un second étalon synthétisé 100% oxydé marqué différemment du premier étalon, (iii) l'oxydation au cours du temps de l'étalon au départ non oxydé est mesurée par le second étalon (synthétisé 100% oxydé). Le détail des étalons utilisés pour ce « triple étalonnage » est donné avec l'exemple du dosage du peptide rapporteur de la protéine M du virus CYD3 (Tableau 4).

ENTITÉ DOSÉE	SÉQUENCE PEPTIDE	ENDOGENE / ÉTALON	[M+3H] <sup>3+</sup> (Da)	TEMPS DE RÉTENTION	FORMULES UTILISÉES POUR LE CALCUL DES CONCENTRATIONS
Protéine M non oxydée CYD3	SVALPHVGMGLDTR	Endogène	508.6	10.5 min	[peptide endogène] = ([étalon 1 corrigée] x aire endogène) / aire étalon1
	SVALPHVGMGL <sup>*</sup> DTR	Étalon 1	510.9	10.5 min	
Protéine M CYD3 Oxydée (protocole ou MPT)	SVALPHVGM(ox)GLDTR	Endogène oxydé	513.9	9.6 min	[peptide endogène oxydé] = ([étalon 2] x aire endogène oxydé) / aire étalon2
	SVALPHVGM(ox)GL <sup>*</sup> DTR <sup>*</sup>	Étalon 2	519.3	9.6 min	
Oxydation de l'étalon 1	SVALPHVGM(ox)GL <sup>*</sup> DTR	Étalon 1 oxydé	516.3	9.6 min	[étalon 1 oxydé] = ([étalon 2] x aire étalon 1 oxydé) / aire étalon2
	SVALPHVGM(ox)GL <sup>*</sup> DTR <sup>*</sup>	Étalon 2	519.3	9.6 min	[étalon 1 corrigée] = [étalon 1 initiale] – [étalon 1 oxydé]
Protéine M totale	-	-	-	-	[ totale ] = [peptide endogène] + [peptide endogène oxydé]

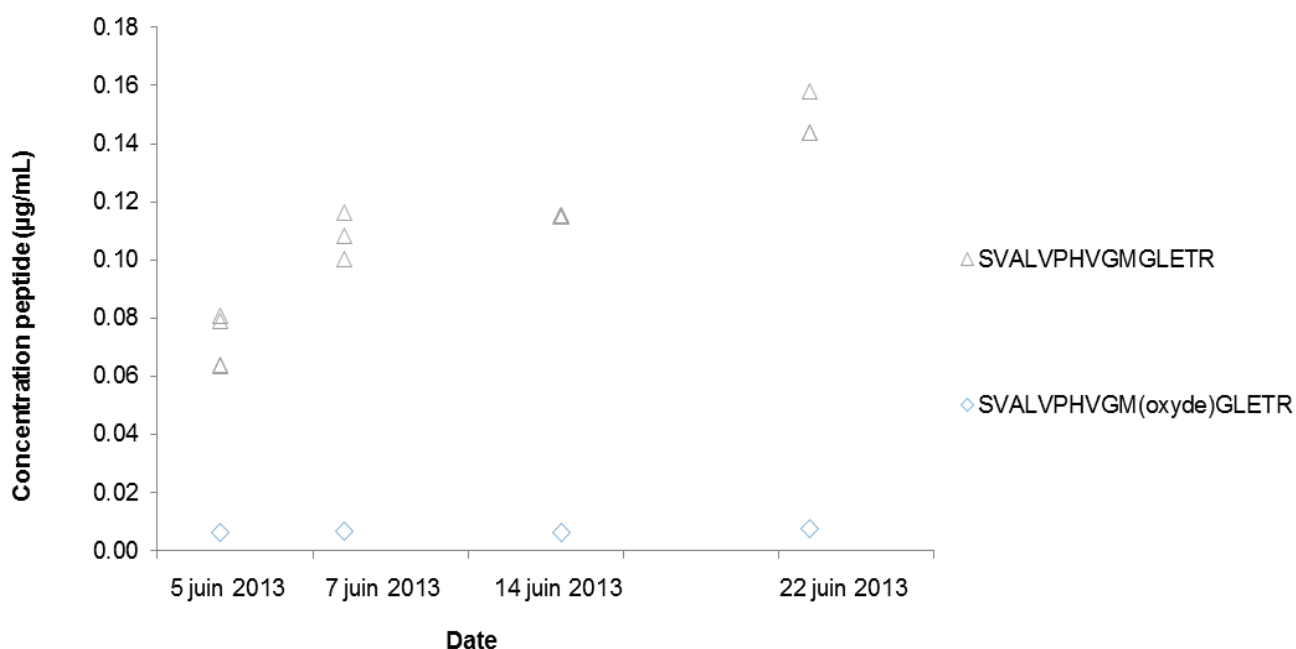
Tableau 4 : Détails des étalons et des calculs utilisés pour la quantification d'un peptide à Méthionine, à travers l'exemple du dosage de la protéine M du virus CYD3

De plus, nous avons vérifié que le protocole développé oxydait de manière équivalente le peptide endogène et son étalon, ceci, principalement lors de l'étape d'évaporation (Exemple en Annexe 1). En revanche la correction de l'oxydation naturelle de l'étalon, principalement due à sa conservation, est nécessaire.

Par cette stratégie, nous avons pu quantifier les peptides à Méthionines avec des performances équivalentes à celles des autres peptides ciblés.

## 2.4.2. La problématique du conditionnement des étalons internes AQUA

Le choix de la stratégie d'étalonnage AQUA a été expliqué dans la partie résultats, mais le choix de la forme de ces étalons, leur conservation, ou tout ce qui peut impacter leur stabilité, peut être discuté. Les étalons peuvent être synthétisés puis après purification, repris pour être utilisés en solution, ou lyophilisés pour être utilisés à partir de poudres. Ces étapes sont réalisées par le fournisseur qui garantit une quantité fixe d'étalons et un degré de pureté > 95%. Quel que soit le format initial, la stabilité des étalons dans la solution utilisée pour le dosage final doit être systématiquement vérifiée car une dégradation / adsorption de l'étalon va conduire à une surestimation de la concentration du peptide cible. C'est ce que nous avons observé par exemple sur les premiers dosages du peptide SVALPHVGMGLETR,



rapporteur de la protéine E du virus CYD2 (Figure 24).

Figure 24 : concentration du peptide SVALPHVGMGLETR et de sa forme oxydée au cours du temps

Dans ces expériences préliminaires, les étalons étaient conditionnés sous forme liquide et la solution mère a subi plusieurs cycles de congélation / décongélation, favorisant ces phénomènes d'adsorption.

Pour éviter ce phénomène d'adsorption, les étalons ont été conditionnés sous forme lyophilisée. Dans ce cas, les étalons sont pesés (200 µg environs), repris dans une solution de H<sub>2</sub>O/MeOH (90 :10) + 0,5% FA et conservés dans des vials ambrés à - 20°C. Le contenant et le solvant de préparation ont été déterminés à partir de tests effectués sur les étalons du CYD2 (Annexe 2).

La stabilité des solutions de travail doit aussi être vérifiée. Dans cette étude, des solutions filles contenant l'ensemble des peptides étalons d'un virus CYD, ont été préparées à 200 ng/mL, puis aliquotées pour usage unique, le jour du dosage (cf 2.3.2).

En revanche, dans cette méthode de travail, deux problèmes ont pu être constatés. Le premier concerne la difficulté de réaliser des pesées reproductibles de si petites quantités et la seconde est l'hydratation possible des poudres. Cela a pour conséquences des variabilités importantes dans les concentrations réelles des étalons issus de différentes pesées. La Figure 25 montre la variabilité des signaux des étalons injectés à chaque jour de dosage, sur un an ou sur six semaines (*NB* : l'aire de chaque peptide a été normalisée par l'aire totale pour s'affranchir des variations du système LC-MS/MS).

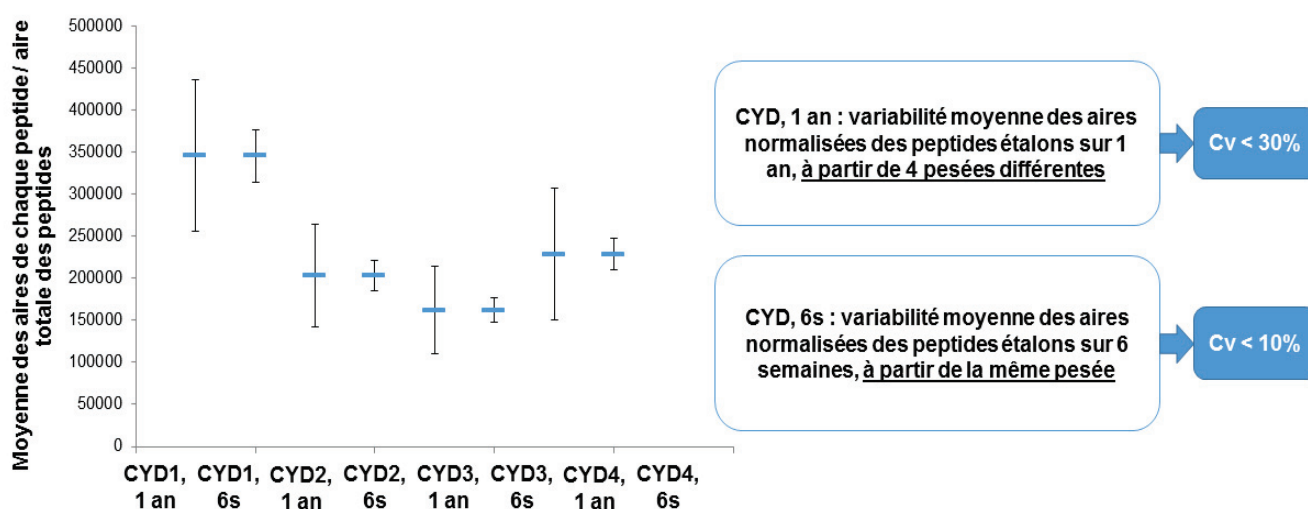


Figure 25 : comparaison du signal des solutions de travail d'étalons, issue de pesées différentes ou non

Peser de si faibles quantités induit un biais trop important dans le processus analytique et n'est pas compatible avec une utilisation en routine validée par l'assurance qualité de Sanofi Pasteur.

C'est pourquoi, dans un premier temps, les études de reproductibilité au laboratoire de l'université ont été réalisées à partir de solutions d'étalons issues de mêmes pesées. En revanche, les dosages transférés à Sanofi Pasteur sont effectués avec des étalons sous forme de solutions, format jugé plus pratiques par les utilisateurs. Ceux-ci ont alors mis en place des contrôles stricts de stabilité dès la réception de l'étalon. De plus, les peptides pour lesquels des phénomènes d'adsorption avaient été rencontrés, sont désormais conditionnés dans des contenants « basse adsorption » ou vials low bind.

Les méthodes développées ci-dessus permettent d'assurer la stabilité des solutions, donc de garantir une meilleure reproductibilité de la méthode. En revanche, elles ne permettent pas de contrôler la quantité exacte d'étalon au départ, ou la quantité réellement solubilisée ce qui peut alors affecter la justesse de la méthode.

### 2.4.3. Recommandations pour la stratégie d'étalonnage AQUA

Les moyens développés ici pour assurer et vérifier la stabilité des étalons internes conviennent bien pour des phases de développement de méthodes pour lesquelles les choix de peptides ne sont pas encore définitifs, et qui comprennent une validation « courte ». Cependant, une alternative doit être proposée pour une future utilisation en routine dans un laboratoire de contrôle de la méthode développée.

La stabilité des étalons lyophilisés reste meilleure et plus facile à contrôler que celle d'étalons en solution. C'est pourquoi, nous proposons de travailler à partir de poudres, mais en apportant des points de contrôles et un plan de travail qui sont décrits sur la Figure 26.

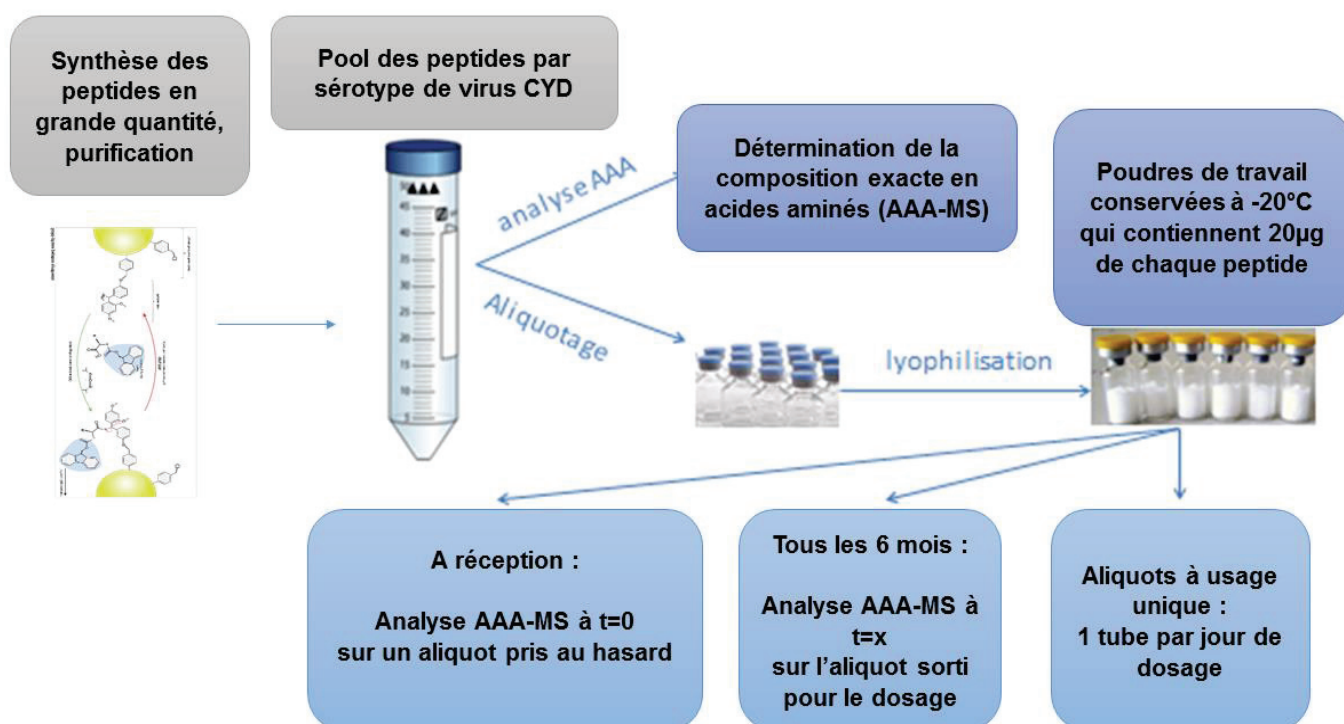


Figure 26 : Proposition de plan de travail pour le contrôle de la stabilité des étalons internes AQUA

Dans cette méthodologie, le fournisseur se charge tout d'abord de caractériser la quantité initiale d'étalons, par Analyse en Acides Aminés couplée à la Spectrométrie de Masse, ou AAA-MS (Amino Acid Analysis using Mass Spectrometry)<sup>136-138</sup>. Cette technique d'hydrolyse totale des peptides en acides aminés permet une quantification exacte des ces derniers à l'aide de standards NIST. Les dernières méthodes développées utilisent de faibles quantités de peptides et sont rapides. Elles sont donc compatibles avec l'objectif recherché ici, y compris pour un contrôle dans le temps des étalons.

A réception le laboratoire effectue le même contrôle que le fournisseur. Ensuite, l'avantage ici est que les aliquots en poudre restants sont à usage unique, évitant ainsi les problèmes de reproductibilité des pesées et d'hydratation cités ci-dessus. De plus, cette méthode de



travail est, au quotidien, très simple pour l'expérimentateur. Un point de vérification supplémentaire de quantification AAA-MS peut être effectué tous les 6 mois, sur une partie de l'aliquot d'étalons utilisé pour le dosage de ce jour j, afin de vérifier la bonne conservation des lyophilisats.

Outre l'étude de la stabilité des étalons pendant leur stockage, nous avons pu constater qu'il était important de vérifier leur stabilité pendant la préparation des échantillons. Ceci en particulier pendant la digestion trypsique, car la stratégie d'étalonnage AQUA ne corrige les biais qu'à l'étape peptide.

Dans cette étude, c'est la recherche de l'équimolarité entre les doses des différents peptides qui nous a permis de mettre en évidence des biais potentiels dans la méthode en cours de développement. Deux points de contrôles ont été proposés et discutés dans les publications :

- L'atteinte du maximum de rendement de digestion pour les peptides endogènes : atteinte d'un signal « plateau » lors de la réalisation de gammes de concentration en trypsine croissantes (cf 2.3.1) et lors de cinétiques de digestion (cf 2.3.2)
- La vérification systématique du comportement de l'étalon AQUA pendant l'optimisation du protocole afin de s'assurer qu'il est stable ou bien qu'il est dégradé / adsorbé de la même manière que le peptide endogène.

Dans le cadre du développement du dosage du virus CYD, nous avons pu par exemple, mettre en évidence des phénomènes d'adsorption pendant la digestion enzymatique ainsi qu'une dégradation des peptides par l'activité chymotrypsine de la trypsine s'auto-lysant. Puisque les peptides endogènes et les étalons étaient impactés de manière similaire par ces phénomènes, il a été choisi d'ajouter les étalons au plus tôt dans le protocole.

### 2.4.4. Transfert des méthodes à l'équipe CBB

Les méthodes développées puis validées ont été transférées à l'équipe CBB, celles-ci sont réalisées avec du matériel différent (Tableau 5). Le conditionnement des étalons internes AQUA ainsi que la qualité de la trypsine sont susceptibles d'impacter les résultats de dosage.

	UNIVERSITE	CBB	
MANIPULATEURS	Equipe université	Equipe CBB	
SYSTEME LC-MS/MS	LC : Agilent 1290 MS : 6500QT (Sciex)	LC : Agilent 1290 MS : 6490 Agilent	LC : micro Eksigent MS : 4500QT (Sciex)
FOURNISSEURS ET CONDITIONNEMENT DES ETALONS AQUA	Fournisseurs : Proteogenix/ Thermo Fisher Conditionnement : lyophilisé	Fournisseur : Thermo Fisher Conditionnement : en solution	
FOURNISSEUR ET QUALITE TRYPSINE	Sigma Aldrich Trypsine (issue pancréas de porc) non modifiée, qui peut s'auto-lyser	Promega mélange LysC/Trypsine Avec trypsine modifiée (méthylée) qui ne s'autolyse pas	

Tableau 5 : Différences entre le matériel utilisé à l'Université et celui utilisé à l'équipe CBB pour le dosage des virus CYD candidats vaccins

Comme nous l'avons vu précédemment, les phénomènes impactant la stabilité des étalons sont différents en fonction du conditionnement de départ. De plus, nous n'avons pas eu l'occasion de vérifier les quantités initiales d'étalons dans les tubes par AAA-MS, et il est possible d'imaginer que selon les fournisseurs il puisse y avoir des différences.

Ensuite, la qualité de l'enzyme utilisée peut impacter le dosage. En effet, la trypsine « classique », issue du pancréas de porc, peut s'auto-lyser et développer une activité semblable à celle de la chymotrypsine, appelée aussi « chymotrypsin-like ». C'est-à-dire que la pseudo-trypsine ainsi générée peut potentiellement couper en C-terminal d'acides aminés aromatiques (résidus W, F, Y) <sup>139,140</sup>.

Si le peptide endogène est libéré tard au cours de la digestion, il est possible que l'étalon AQUA soit dégradé plus vite que le peptide endogène par l'activité « chymotrypsin-like ». Cela va conduire à une surestimation de la concentration du peptide cible. Pour des questions de coûts et puisque le comportement des étalons au cours de la digestion a été vérifié, au laboratoire nous avons travaillé avec la Trypsine Sigma classique.

En revanche, l'équipe CBB, a choisi de travailler avec une trypsine modifiée par méthylation des résidus de Lysine, la rendant résistante à l'autolyse. L'activité de la Trypsine modifiée (Promega) seule étant moins efficace que la trypsine classique, l'équipe CBB a choisi de travailler avec un mélange LysC/Trypsine (Promega).

Sur un même lot de production de virus CYD2, ces deux enzymes avaient été testées à l'université (cf matériel et méthodes en 2.3.2). La Figure 27 montre les résultats obtenus ainsi que les valeurs de dosage obtenues par l'équipe CBB avec leur matériel.

(NB : dans ces expériences les peptides VVASLMR et SVLFK n'étaient pas ciblés)

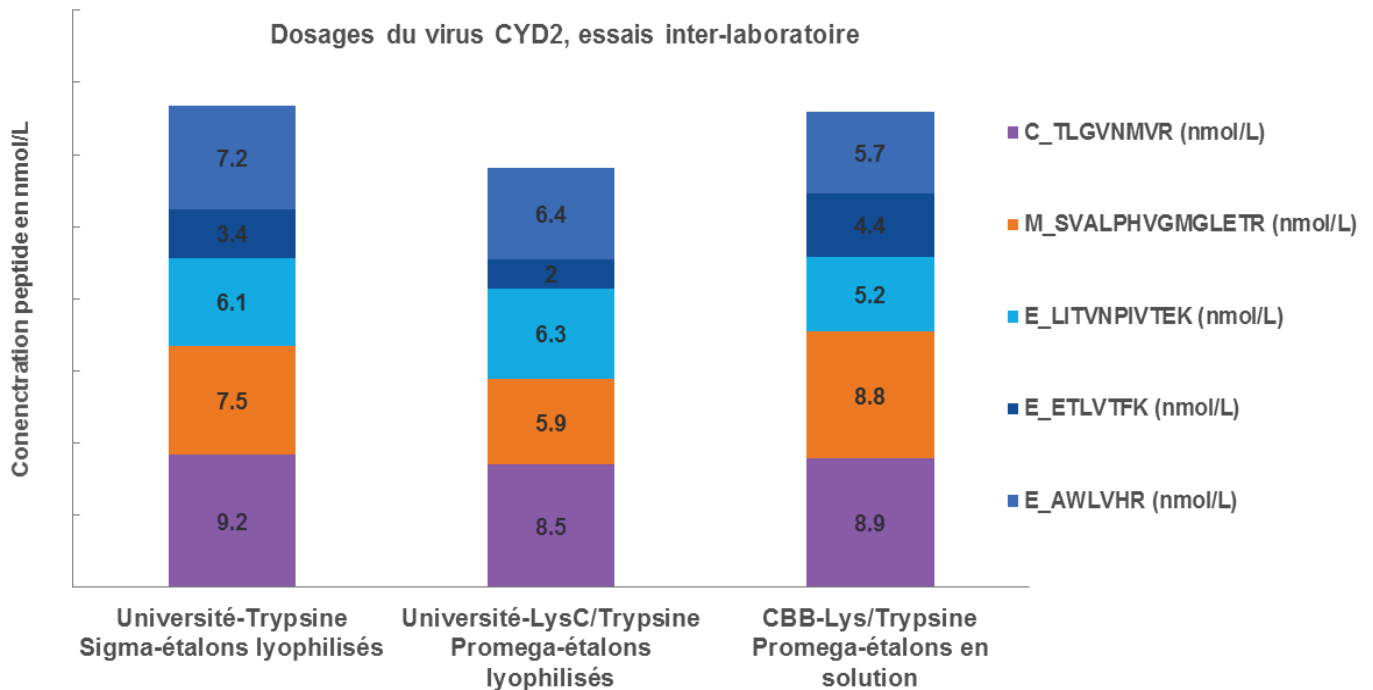


Figure 27 : Résultats des dosages des protéines du virus CYD2 à partir de différents matériels et laboratoires

Les méthodes de dosage des quatre sérotypes CYD ont été transférées à l'équipe CBB. Les dosages obtenus sur les mêmes lots sont similaires. Ils sont dans l'ordre de grandeur de la variabilité du dosage avec environ +/- 20% sur la moyenne de la polyprotéine.

La méthode de dosage développée pour le sérotype 4 du virus CYD a d'ores et déjà été transférée en qualification, où une validation poussée de la méthode est effectuée et documentée selon les BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire).

## 2.5. Conclusions sur la méthode de quantification absolue des protéines des 4 virus chimères CYD candidats vaccins contre la dengue

L'objectif de cette étude était, dans un premier temps, de développer une méthode de dosage ciblée des protéines pr, M, E et C, constituant la polyprotéine des quatre variants du virus CYD candidat vaccin contre la dengue. Puis, dans un second temps, de valider et transférer ces méthodes à l'équipe partenaire du projet, de la plateforme CBB de Sanofi Pasteur. L'accent a été mis sur l'obtention d'une méthode robuste et facilement transférable, éventuellement utilisable à plus haute cadence dans un laboratoire de contrôle.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons suivi une stratégie de quantification « classique » de protéines par SRM, telle que décrite dans le chapitre 1. Dans celle-ci, l'ensemble de l'échantillon est digéré à la trypsine. Les peptides rapporteurs des protéines d'intérêt sont ensuite ciblés par SRM et quantifiés par leurs étalons internes de type AQUA.

La petite taille et la particularité des séquences des protéines C et M en particulier, nous ont conduits à choisir des peptides courts (< 8 AA), ainsi que des peptides contenant des résidus méthionines. Afin de quantifier ces derniers, nous avons choisi de corriger l'oxydation de l'étalon interne ainsi que du peptide endogène à l'aide d'un étalon totalement oxydé et doublement marqué.

Des difficultés ont été rencontrées lors de la recherche de l'obtention d'une mesure équimolaire entre les différents peptides mesurant les protéines virales des 4 variants des virus chimères candidats vaccins, CYD 1- 4. C'est pourquoi, une grande partie de cette étude a consisté en l'optimisation du protocole de digestion enzymatique, dans le but d'obtenir le meilleur rendement de digestion possible. Nous avons ainsi montré l'importance de vérifier le comportement des étalons internes pendant la durée de l'hydrolyse enzymatique afin qu'ils corrigent les pertes éventuelles des peptides endogènes. Quelques biais impactant la justesse du dosage subsistent puisque les doses mesurées des différents peptides ne sont pas parfaitement équimolaires.

Néanmoins, les 4 méthodes de dosage des virus chimères candidats vaccins CYD 1- 4 ont pu être validées. De plus, les 4 variants des polyprotéines virales CYD peuvent être quantifiées par au moins 5 peptides. Bien que 1 peptide soit exclu dans le calcul de la dose finale de la polyprotéine, nous proposons tout de même de conserver l'ensemble des peptides mesurés, car si les doses ne sont pas équimolaires, elles sont en revanche très reproductibles. Il en est de même pour l'écart de la dose des peptides à la moyenne de la polyprotéine. C'est pourquoi, nous proposons de tracer des cartes de contrôles, représentant la constance de ces écarts. Les dosages de lots inconnus pourront alors être ajoutés à ces cartes, pouvant apporter un point de validation supplémentaire à la mesure.

Ce projet de recherche nous a permis de souligner quelques points du protocole de préparation d'échantillon pouvant induire des biais dans la justesse d'un dosage des protéines ciblées par une stratégie d'étalonnage AQUA. C'est en partie grâce à cela que

l'ensemble des méthodes développées ont pu être transférées avec succès à Sanofi Pasteur, dans un premier temps à l'équipe CBB, plateforme de recherche, puis dans un second temps à une équipe de la plateforme qualification.

La méthodologie mise en place pour la quantification par SRM, des protéines des virus chimères candidats vaccins contre la dengue, peut tout à fait être reproduite et étendue à d'autres chimères candidat vaccin ou virus atténués, en cours d'étude par Sanofi Pasteur.

Les méthodes développées ici montrent comment un dosage de protéines par spectrométrie de masse pourrait devenir une méthode de contrôle dans le milieu industriel. Il apparaît clairement que la reproductibilité et la facilité du transfert des méthodes analytiques seront alors un enjeu de taille. Ainsi, après une grande attention donnée à l'hydrolyse enzymatique des protéines, nous nous sommes donc intéressés plus précisément au paramètre spectrométrie de masse. C'est dans cette optique que nous avons développé un nouvel d'acquisition de données SRM. Celui-ci permet la réalisation d'analyses multiplexées indépendantes des temps de rétention, augmentant la robustesse face aux variations chromatographiques et facilitant ainsi les transferts de méthodes.



# CHAPITRE 3 :

## « Scout-SRM », ou comment augmenter la portabilité d'un multiplex SRM ?

---





## 3.1. La problématique du multiplexage en mode ciblé

Il est désormais acquis que la robustesse et la sensibilité des méthodes ciblées en font une technique de choix dans de nombreuses applications d'identification ou de quantification de molécules. C'est le cas par exemple en protéomique ou en métabolomique, mais aussi dans le cas de screening toxicologiques, alimentaires ou environnementaux. Dans ces domaines, la recherche de la méthode la plus exhaustive possible est perpétuelle. Nous nous sommes penchés sur les problématiques liées au multiplexage des analyses en mode ciblé, en particulier en mode SRM, à l'aide d'exemples issus du domaine de la protéomique. Cependant, les problématiques décrites ici sont communes à différents champs d'applications ainsi qu'au mode ciblé de type PRM.

### 3.1.1. L'analyse multiplexée, objectifs et contraintes

Dans le contexte du couplage LC-MS/MS, le multiplexage est le fait de mesurer simultanément plusieurs composés dans une même analyse. Ainsi, dans un même cycle d'acquisition, le spectromètre de masse va suivre successivement des signaux correspondant à différentes molécules d'intérêt. Celui-ci est programmé de sorte à suivre une liste de travail, qui correspond, dans le cas d'une méthode de type SRM, à une liste de transitions. Il est important de noter ici, que plus le spectromètre de masse passe du temps à suivre une transition, plus le signal qui lui est associé, sera intense. Un cycle d'analyse est la somme du temps passé sur chacune des transitions de la liste de travail, et est appelé temps de cycle.

Dans la construction d'une méthode multiplexée, les paramètres temps d'observation de la transition, *dwell time*, ainsi que le temps de cycle sont à optimiser ; ceci, afin de maximiser la sensibilité tout en veillant à conserver un nombre de points d'acquisition suffisants pour définir la forme d'un pic chromatographique. Typiquement, un minimum de 10 points par pic est requis dans une analyse à but quantitatif.

La Figure 28 illustre l'impact d'une augmentation par trois du nombre de transitions suivies dans une méthode SRM multiplexée classique. Dans une première expérience, le temps de cycle total est gardé constant, mais le *dwell time* associé à chaque transition est diminué. Ici, le nombre de points par pic chromatographique est satisfaisant. Cependant, si le *dwell time* devient trop faible, la sensibilité peut alors être impactée. Dans un second temps, c'est le *dwell time* qui est gardé constant, ayant pour conséquence une augmentation du temps de cycle d'un facteur 3. La forme du pic chromatographique est alors mal définie, et ce sous-échantillonnage peut engendrer des variations lors de la mesure de l'aire.

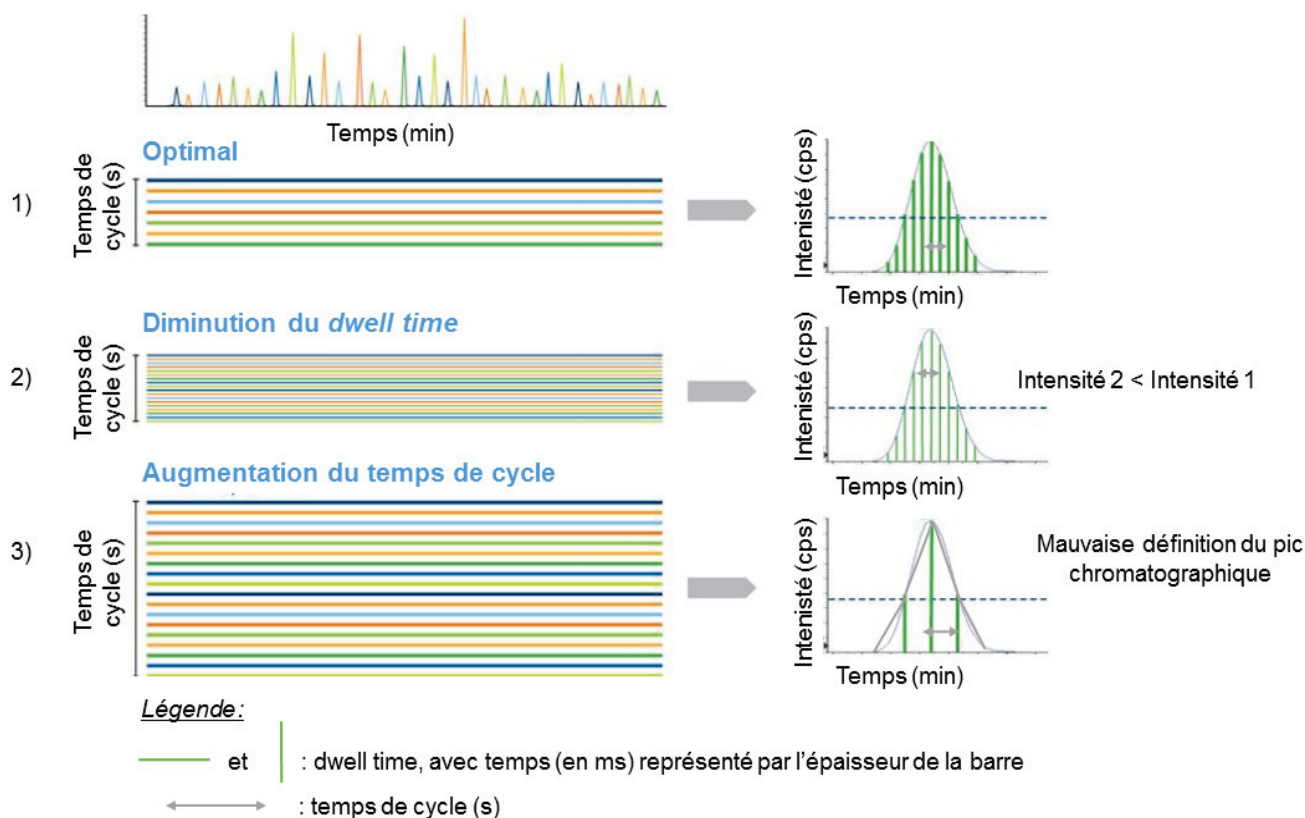


Figure 28 : Considérations à prendre en compte lors de l'augmentation d'un multiplex SRM, d'après une note technique Sciex, C.Hunter, 2010<sup>141</sup>

Ces considérations impactent drastiquement les capacités de multiplexage d'une méthode ciblée. Par exemple, si l'expérimentateur souhaite 10 points d'acquisition pour définir un pic chromatographique d'une largeur de 10 secondes, le temps de cycle devra être de 1 seconde. Ainsi, si l'utilisateur souhaite multiplexer 100 transitions, il devra consacrer 10 ms de *dwell time* à chacune d'entre elle. Si deux transitions par molécules sont suivies, la capacité maximale du multiplexage est de 50 composés.

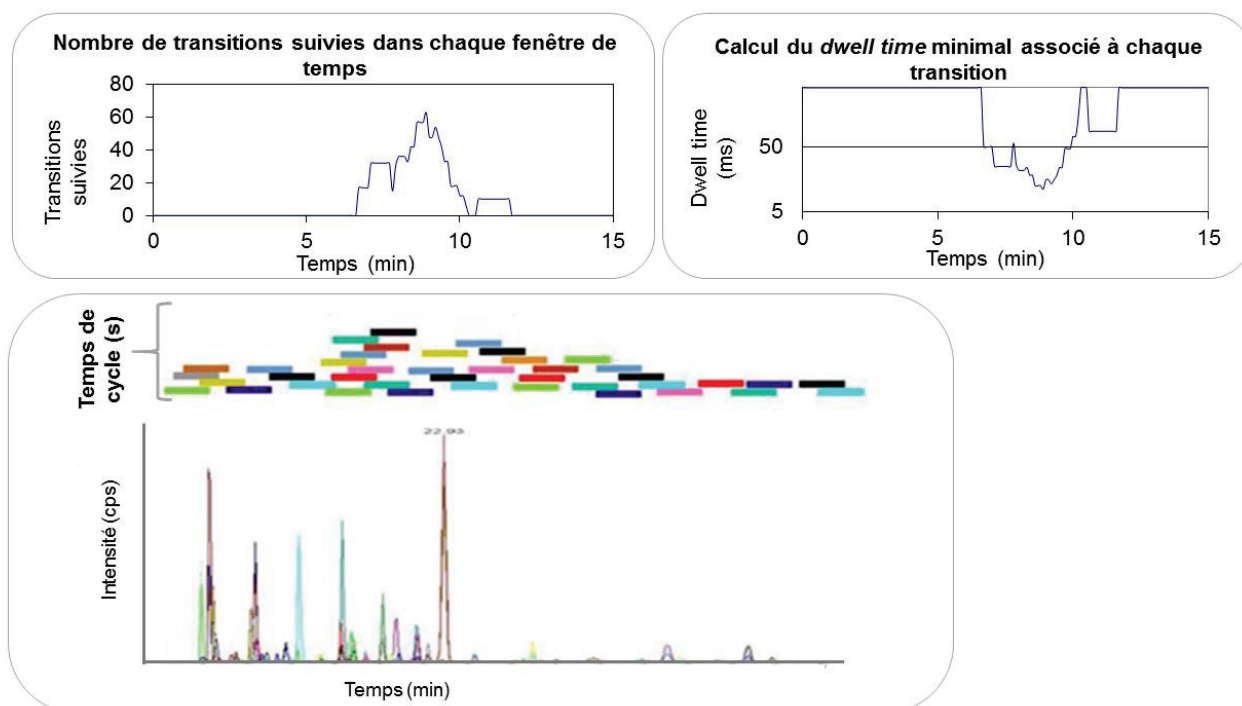
Cependant, dans de nombreuses applications il est intéressant de suivre plusieurs centaines de composés. C'est notamment le cas de la recherche de pesticides dans diverses matrices telles que l'eau, le sol, ou encore les aliments<sup>142,143</sup>. C'est aussi le cas en protéomique, où l'analyse multiplexée de plusieurs centaines de peptides est notamment très utilisée dans des recherches de candidats biomarqueurs<sup>144</sup>, ainsi que dans le contexte plus fondamental qu'est la biologie des systèmes<sup>80</sup>.

### 3.1.2. Les outils basés sur le temps de rétention des analytes et leurs limites

Afin de pallier la limite imposée par le nombre minimal de points de mesure pour définir correctement la forme d'un pic chromatographique, il a été proposé de réduire le temps d'analyse pendant lequel les transitions sont suivies. Ainsi, au lieu de programmer l'enregistrement d'une transition pendant toute la durée de la séparation chromatographique, celle-ci n'est suivie que dans une fenêtre temporelle limitée. Cette fenêtre de temps d'observation peut être relativement importante et peut permettre de suivre les transitions de plusieurs molécules différentes. Cependant la stratégie la communément plus utilisée est d'enregistrer les transitions spécifiques d'un composé uniquement dans une fenêtre autour de son temps de rétention.

Les constructeurs de spectromètres de masse ont chacun développé ce procédé, sous différentes appellations : « Scheduled Multiple Monitoring », pour Sciex ; « Timed MRM », pour Thermo ; ou encore « Dynamic MRM » pour Agilent.

Dans ce type de méthodes, le temps de cycle est constant pendant toute la durée de l'analyse. Celui-ci est défini par l'utilisateur en fonction du nombre de points souhaité par pic chromatographique. L'optimisation est faite automatiquement par le logiciel, au niveau du *dwell time*, qui est ajusté à chaque fenêtre de temps de rétention. Ainsi, moins il y a de transitions concourantes dans une même fenêtre, plus le *dwell time* qui leur est associé sera élevé (Figure 29). Dans une méthode sSRM (Scheduled SRM), les transitions des composés sont suivies successivement, selon un ordre défini par leur temps de rétention



(Figure 29).

Figure 29 : Maximisation du *dwell time* et optimisation du temps de cycle lors du fenêtrage en temps de rétention d'une méthode SRM

Cependant, le fenêtrage du suivi des transitions de composés uniquement autour de leur temps de rétention présente quelques désavantages. En effet, de multiples causes peuvent conduire à une dérive du temps de rétention de l'analyte ciblé.

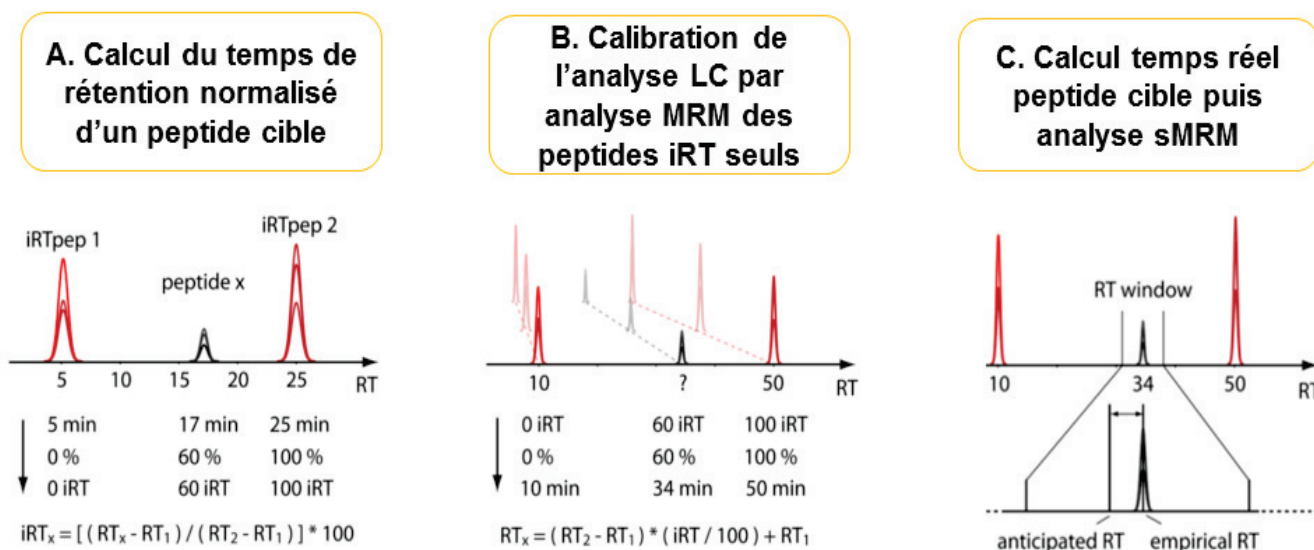
Certaines causes dues à des variations chromatographiques peuvent être volontaires. C'est le cas lors d'un changement de la colonne chromatographique (type de phase stationnaire, longueur...), lors d'un changement de la composition des phases mobiles, ou lors d'un transfert sur un autre système chromatographique ayant des volumes morts différents du premier. Mais d'autres causes sont indépendantes de la volonté de l'expérimentateur, par exemple une surcharge ou un blocage partiel de la colonne, ou encore des variations de températures de la phase mobile. De plus, dans le cas de matrices biologiques telles que l'urine ou le plasma, la variabilité inter-individus conduit aussi à de légers décalages de temps de rétention.

Une variation de temps de rétention entraîne le risque que le composé ne soit pas détecté dans la fenêtre de temps de rétention programmée. Ainsi, pour tenir compte des potentielles variations chromatographiques (involontaires), la largeur de la fenêtre d'observation est classiquement deux à trois fois plus large que la largeur du pic d'élution de la molécule, soit de 30 s à 45 s, pour un pic de 15 s en HPLC conventionnelle. L'inconvénient de cette précaution est de réduire la capacité de multiplexage de la méthode.

Malgré l'utilisation de fenêtres plus larges, le transfert de méthodes intra site comme inter sites, reste difficile. Dans une revue publiée en 2012, P. Picotti et R. Aebersold mettent en évidence l'importance de la normalisation du temps de rétention des peptides afin de faciliter les transferts de méthodes et la comparaison de résultats entre différents laboratoires <sup>64</sup>.

### 3.1.3. Les stratégies développées pour améliorer la robustesse de la détection face aux variations de temps de rétention

En 2012, une première stratégie a été proposée dans le but de faciliter les transferts de méthodes entre différents sites. Celle-ci a été publiée par C.Escher et al, et repose sur une indexation des temps de rétention de peptides cibles par rapport à un mélange de peptides standards <sup>145</sup>. Ce concept est appelé iRT pour indexed Retention Time, et a conduit à la commercialisation de ces peptides standards par la société Biognosys. L'indexation est faite à l'aide d'une transformation linéaire du temps de rétention d'un peptide cible à partir de ceux de 11 peptides de référence. La Figure 30 illustre ce processus de détermination de l'iRT d'un composé d'intérêt. Pour plus de lisibilité, seulement 2 peptides iRT sont représentés sur cette figure. Dans un premier temps (Figure 30-A), le peptide cible ainsi que les peptides iRT sont analysés par SRM afin de déterminer leurs temps de rétention dans des conditions chromatographiques données. Le temps de rétention du peptide cible est normalisé, c'est-à-dire transformé en iRT selon les temps de rétention des deux iRT peptides adjacents. Lorsque la méthode doit être transférée sur un nouveau système chromatographique, seul le mélange des 11 peptides iRT est analysé en SRM, (Figure 30-B). Le temps attendu du peptide cible sur le nouveau système LC est calculé à partir des temps mesurés des 2 peptides iRT de référence adjacents au peptide cible. Ensuite, la méthode sSRM peut être créée en utilisant le temps recalculé du peptide cible comme centre



de la fenêtre de suivi (Figure 30-C).

Figure 30 : Etapes de la normalisation des temps de rétention par la méthode iRT, d'après C.Escher et al, 2012

Cette stratégie a rencontré un certain succès dans le domaine de la protéomique, favorisée par son utilisation simple *via* des outils libre d'accès tels que Skyline et mProphet<sup>44,146</sup>.

D'autres mélanges de peptides ont été utilisés afin d'indexer les temps de rétention de composés cibles<sup>147,148</sup>. Chaque laboratoire peut d'ailleurs travailler avec son propre mélange tant qu'il est représentatif des conditions d'éluion des peptides ciblés ; en revanche, cela réduit la facilité de la diffusion des méthodes entre laboratoires.

Néanmoins, cette stratégie d'indexation des temps de rétention ne résout pas toutes les limitations précédemment citées puisqu'un fenêtrage en temps de rétention du suivi des transitions est toujours effectué. De plus, le transfert d'une méthode vers un nouveau système chromatographique requiert une étape de calibration des temps de rétention par une analyse SRM des peptides iRT. Ce système de calibration des temps de rétention est seulement compatible avec l'utilisation de gradients linéaires, et ne permet pas de résoudre d'éventuels dérives des temps de rétention au cours de l'analyse chromatographique. Ainsi, des fenêtres de temps de rétention de 3 fois la largeur du pic chromatographique (45 s) sont toujours nécessaires. En pratique, en particulier pour des études en matrices complexes, les fenêtres utilisées en sSRM vont de 1,5 à 5 minutes autour du temps de rétention du composé ciblé<sup>149-151</sup>.

En 2014, une seconde stratégie a été publiée par le groupe de B. Domon. Celle-ci consiste en une nouvelle méthode PRM, qui propose une re-calibration en temps réel des fenêtres de temps de rétention<sup>152,153</sup>. Dans ce procédé, plusieurs peptides sont utilisés comme points d'ancrage et répartis uniformément le long du gradient chromatographique afin de détecter d'éventuelles dérives du temps de rétention. Deux « ancrés » élués successivement sont utilisés pour recalculer une éventuelle correction du fenêtrage. Le principe de cette méthode est une comparaison en temps réel entre le temps de rétention mesuré des peptides ancrés et leur temps de rétention de référence, il est illustré par la

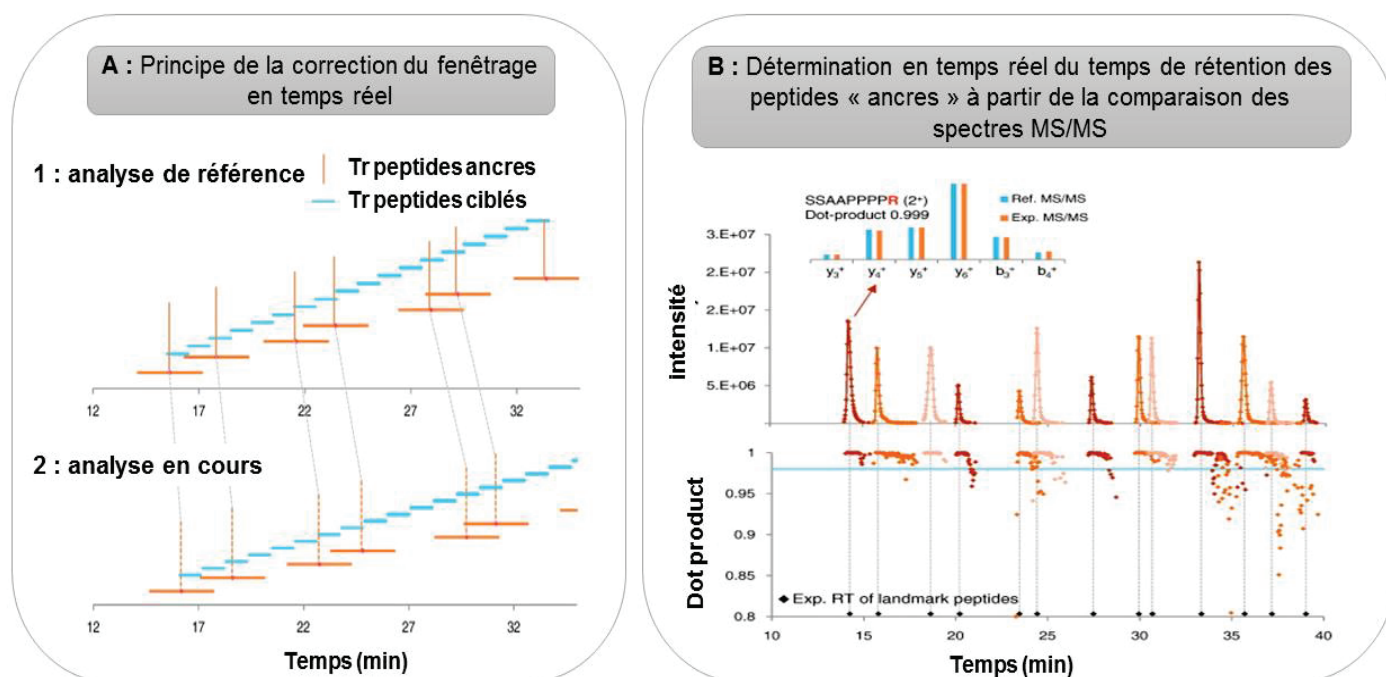


Figure 31.

Figure 31 : Correction dynamique du fenêtrage de temps de rétention dans une expérience en mode PRM, d'après S.Gallien, 2014

Une analyse de référence est réalisée afin d'enregistrer les temps de rétention des peptides « ancrés » ainsi que ceux des peptides cibles. Au cours d'une seconde analyse en mode PRM, le temps de rétention des peptides ancrés est détecté en temps réel. Si un décalage est observé entre deux « ancrés », la fenêtre de temps de rétention des composés ciblés non encore élués peut alors être ajustée (Figure 31-A). L'identification et la mesure du temps de rétention des peptides « ancrés » est faite par la comparaison en temps réel des spectres MS/MS expérimentaux, aux spectres de référence des peptides ancrés (Figure 31-B).

Cette stratégie permet d'éviter des décalages de temps de rétention dus à un changement de gradient volontaire ou à une augmentation du volume mort du système par exemple. Cependant, cette méthode ne peut pas être appliquée dans le cas d'une distorsion non linéaire du gradient qui serait due par exemple à une augmentation transitoire de la pression. De plus, comme la correction ne se produit qu'une fois que la seconde ancre est détectée, la fenêtre de temps de composés élués entre les deux ancrés ne sera pas corrigée. Les problèmes liés à l'utilisation de fenêtrage en temps de rétention persistent, et de larges fenêtrages sont toujours utilisés. Ainsi dans cette étude de S.Gallien et al <sup>153</sup>, ils sont de 1,5 minutes.

Ces deux stratégies, bien que permettant d'améliorer la robustesse et le transfert de méthodes hautement multiplexées, sont dépendantes d'un fenêtrage du temps de rétention des composés cibles. Ceci engendre deux désavantages majeurs :

- La réduction de la capacité théorique du multiplex
- La difficulté de transférer des méthodes à d'autres laboratoires.

De ces limitations est née l'idée de développer un nouvel outil d'acquisition SRM n'utilisant aucun fenêtrage en temps de rétention.

## 3.2. Présentation de l'outil « Scout-SRM »

L'idée d'un outil permettant l'analyse multiplexée de plusieurs centaines d'analytes, de façon reproductible et facilement transférable, a été déposée dans le brevet suivant : *sentinel signal for adaptive retention time in targeted method*, déposé par Jérôme Lemoine, le 1<sup>er</sup> décembre 2015. De cette idée, est né l'outil « Scout-SRM », que nous avons développé conjointement avec Yves LeBlanc et Dave Cox de l'équipe R&D de Sciex, à Toronto (ON).

### 3.2.1. Objectifs

L'objectif principal de l'acquisition « Scout-SRM » est de résoudre les limitations des analyses multiplexées en mode ciblé, dues au fenêtrage en temps de rétention de composés d'intérêt. Une méthode « Scout-SRM » aurait une portabilité sans précédent, grâce à son indépendance totale vis-à-vis de la dimension chromatographique. La nouveauté réside en la détection d'un premier composé que nous avons dénommé « Scout », pour éclairer ou veilleur. Lorsque le signal de ce dernier dépasse un seuil défini par l'utilisateur, cela déclenche un groupe de transitions non-ordonnées d'un ensemble de composés cibles, ainsi qu'une nouvelle transition « Scout ». Une fois détecté, ce second « Scout » déclenche un nouveau groupe de molécules ciblées et ainsi de suite.

Un avantage de la non utilisation du fenêtrage des temps de rétention est la possibilité d'employer au maximum les capacités réelles de multiplexage des méthodes SRM. Plus encore, la totale transparence envers les temps de rétention augmente la robustesse des analyses et facilite les transferts de méthodes.

### 3.2.2. Principe de fonctionnement

Au début de l'analyse, le spectromètre de masse est programmé de sorte à ne suivre qu'un signal « Scout » **s**. Ce signal **s** peut être une seule transition ou un groupe de transitions, auquel est associé un seuil de détection qui est déterminé par l'expérimentateur. Lorsque le signal « Scout » **s**, dépasse le seuil de détection, le suivi d'un nouveau groupe de transitions est programmé. Ce groupe contient les transitions caractéristiques de composés d'intérêt ainsi qu'un « Scout » **s+1**. La détection de ce signal « Scout » **s+1**, entraînera :

- L'arrêt du suivi du groupe de transitions précédent
- Le suivi d'un nouveau de groupe de transition, dans lequel sera le « Scout » **s+2**, et ainsi de suite.

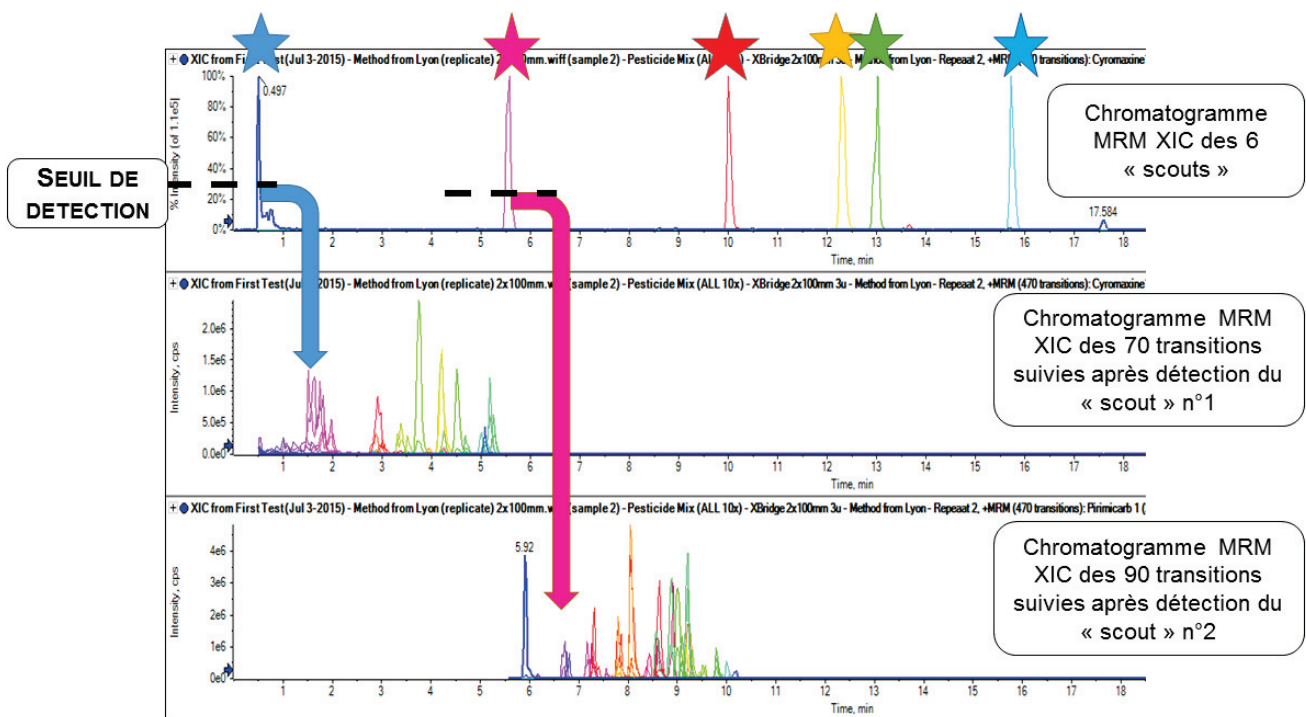
Ce processus de déclenchement se poursuit tout au long de l'élution chromatographique des composés.



Un groupe est défini comme l'ensemble des transitions encadrées par deux « Scouts ». Celui-ci est conditionné uniquement par l'intervalle de temps d'élution entre deux signaux « Scouts ». De ce fait, à l'intérieur d'un groupe, les transitions peuvent être arrangées de manière totalement aléatoire.

L'acquisition en mode « Scout-SRM » est une succession d'expériences SRM déclenchées par des signaux dont seul les seuils sont définis par l'utilisateur. Le mode « Scout » se distingue des méthodes conventionnelles dans lesquelles des fenêtres de temps sont fixées ou corrigées en temps réel, dans le sens où aucune fenêtre de temps de rétention n'est fixée à l'appareil.

Le principe de déclenchement lors de l'utilisation d'une méthode « Scout-SRM » est illustré



par la Figure 32.

Figure 32 : Principe de fonctionnement de l'analyse "Scout-SRM"

Dans cet exemple, un groupe de 6 « Scouts » a été utilisé et suivi tout au long du gradient chromatographique, sans aucun temps de rétention associé. Chaque « Scout » encadre un groupe de transition d'intérêt qui n'est déclenché que lorsque le signal du « Scout » suivant est détecté.

### 3.2.3. Le pilotage de l'instrument

Implémenter l'outil « Scout-SRM » dans le logiciel Analyst 1.6.2 ®, a nécessité des développements informatiques réalisés au laboratoire R&D de Sciex, par David Cox.

Dans la version *bêta-test* qui a été développée dans un premier temps, le code permettant l'utilisation en mode « Scout-SRM » est une amélioration du code existant du mode « Advanced sMRM » déjà disponible dans le logiciel Analyst 1.6.2 ®. Cette approche a aussi été développée par Thermo Fisher Scientific, sous le nom de « iSRM »<sup>154</sup>.

Brièvement, dans le mode, « Advanced sMRM », à chaque transition est associé une fenêtre de temps de rétention. En revanche, pour un même composé, un seuil est associé à une transition dite **primaire**, seuil qui, lorsqu'il est dépassé, déclenche le suivi des autres transitions, dites **secondaires**, suivies seulement le temps de l'élution de la transition primaire. L'avantage principal de ce mode est d'augmenter la capacité de multiplexage en raccourcissant les temps de cycles. Ceci est intéressant pour les applications en matrice complexes où les fenêtrages utilisés sont particulièrement larges afin de pallier les dérives des temps de rétention.

Le logiciel actuel, c'est-à-dire dans sa version *bêta-test*, utilise ce principe du déclenchement à partir d'une transition dite **primaire**, ainsi que trois autres catégories de transitions qui sont décrites sur la Figure 33). La nouveauté réside dans le fait qu'aucun temps de rétention n'est associé à ces catégories de transitions.

#### Type 1

Transition principale suivie dès le début de l'analyse, sans conditions de temps de rétention = signal "scout"

#### Type 2

Suivie pendant que Type 1 dépasse le seuil qui lui est associé

#### Type 3

Suivie si Type 1 dépasse le seuil qui lui est associé et ce, jusqu'à la fin de l'analyse

#### Type 4

Suivie si Type 1 dépasse le seuil qui lui est associé et ce, jusqu'à ce que la transition de Type 1 suivante dépasse son propre seuil

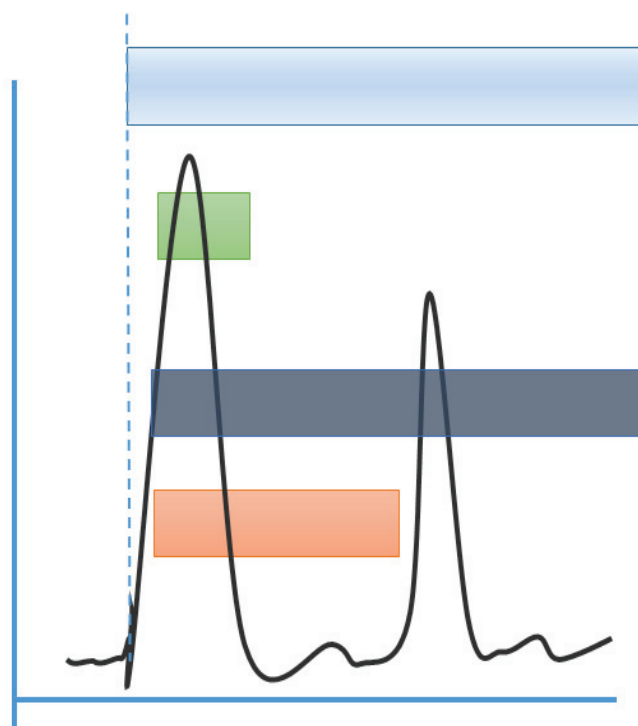


Figure 33 : Définition des différents types de transitions utilisables dans les méthodes "Scout-SRM"

Si la transition de type 1 dépasse le seuil de détection qui lui a été donné par l'expérimentateur, les transitions types 2 et 3 ou 2 et 4 sont alors suivies.

Dans le cas d'une méthode utilisant des transitions de type 1 et 3, les transitions de type 1 sont suivies pendant toute la durée de l'analyse. Dès qu'une transition de type 1 dépasse son seuil de détection, elle déclenche le suivi du groupe de transitions de type 3 qui lui est associé. Si plusieurs transitions de type 1 sont détectées, plusieurs groupes de transitions de type 3 sont alors suivies simultanément. Les groupes déclenchés de transitions de type 3 sont suivis jusqu'à la fin de l'analyse. Cette méthode peut être intéressante dans des problématiques de criblage. Par exemple, un composé marqueur d'une pathologie est détecté par sa transition de type 1, cela déclenche le suivi d'un groupe de transitions de type 3. Les transitions de ce groupe correspondraient à des composés confirmant la maladie ou apportant d'autres niveaux d'informations (étendue, gravité, ou pronostic par exemple).

Dans le cas d'une méthode utilisant des transitions de type 1 et 4, seule la première transition « Scout » de type 1 est suivie au début de l'analyse. Lorsque celle-ci dépasse son seuil de détection, cela déclenche le suivi du groupe de transitions de type 4 ainsi que le suivi d'une transition de type 1 qui est le « Scout » suivant. Lorsque cette dernière dépasse le seuil de détection qui lui est associé, le suivi du groupe de transition de type 4 est arrêté et un nouveau groupe de transition est alors déclenché (Figure 32). Les applications qui seront détaillées dans la suite de ce travail de thèse ont été réalisées selon ce mode d'utilisation (1 → 4) de l'outil « Scout-SRM ».

Cependant, il est important de noter que la version *bêta-test* actuelle utilise un principe de déclenchement légèrement différent de celui que nous souhaitons au départ, ceci car elle dérive du mode « Advanced sMRM ». En effet, dans la version utilisée, toutes les transitions de type 1 sont suivies tout au long de l'analyse. A chaque transition de type 1 est associé un groupe de transition de composés d'intérêt. Ce groupe est suivi dès que le « Scout » dépasse son seuil de détection et ce, jusqu'à la détection du « Scout » suivant.

Enfin, dans cette version *bêta-test*, les transitions de type 2 sont un reliquat de la version classique du logiciel. En effet, bien que devant être écrites dans la méthode, elles ne participent pas au déclenchement des transitions des composés d'intérêt.

L'acquisition en mode « Scout-SRM » peut être vue comme une succession d'expériences SRM indépendantes. Au sein de chaque expérience, le spectromètre de masse a un cycle de travail, *duty cycle*, qui lui est propre et qui est défini comme la liste de transitions à suivre. Dans la version *bêta-test* utilisée, le *duty cycle* au sein de chaque expérience est défini selon l'Equation 3 :

$$\text{Duty cycle} = \text{transitions de type 1} + \text{transitions de type 4}$$

Équation 3 : Expression du *duty cycle* au sein de chaque expérience SRM lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM"

Cependant, il est important de garder en tête que dans cette version, les premiers cycles de chaque expérience comprennent en plus le suivi d'une transition de type 2. Celle-ci est suivie en général 8 à 10 cycles, durant l'élution de la transition de type 1. De plus, au début de l'analyse, tant qu'aucune transition de type 1 n'a dépassé son seuil de détection, le *duty cycle* est uniquement la liste des transitions de type 1.

Ainsi, en mode « Scout-SRM », le temps d'observation de chaque transition, *dwell time*, est constant au sein de la même expérience et est calculé de la même façon que dans le mode SRM classique (Equation 4).

$$Dwell\ time = \frac{\textit{temps de cycle souhaité}}{\textit{nombre de transitions dans l'expérience}} - \textit{temps de repos}$$

Équation 4 : Expression du *dwell time* lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM"

En cela l'acquisition en mode « Scout-SRM » diffère du mode « sMRM », dans lequel le *dwell time* est différent pour chaque composé, puisqu'il dépend du nombre de transitions concourantes dans la fenêtre de temps de rétention du composé (Equation 5).

$$Dwell\ time = \frac{\textit{temps de cycle souhaité}}{\textit{nombre de transitions dans la fenêtre de temps}} - \textit{temps de repos}$$

Équation 5 : Expression du *dwell time* lors de l'acquisition en mode "Scheduled-MRM"

Comme énoncé précédemment, le temps d'acquisition consacré à chaque transition est un paramètre important, impactant la sensibilité de la méthode. En effet, plus le *dwell time* est élevé, meilleure sera la sensibilité de la transition mesurée (relation non linéaire). En revanche, l'augmentation du *dwell time* entraîne l'augmentation du temps de cycle. Or, comme nous l'avons exposé précédemment, cette augmentation va impacter le nombre de points d'acquisition par pic chromatographique. Ce paramètre est à prendre en compte lors de la construction de la méthode « Scout-SRM ».

### 3.2.4. Le choix des « Scouts »

La première étape dans la construction de la méthode est le choix des « Scouts ». En effet un certain nombre de « Scouts » seront choisis selon le nombre de transitions à suivre, ainsi que selon la répartition chromatographique de celles-ci. Dès lors, entre chaque « Scout », il est important de veiller à ce que le nombre de transitions suivies soit compatible avec le nombre de points d'acquisition désiré. En ajustant le *dwell time* et le temps cycle de la même manière que dans une méthode SRM classique, il est possible de définir la capacité maximale de multiplexage du mode « Scout-SRM » et donc des limites de travail (exemples donnés dans le Tableau 6, calculs effectués d'après l'Equation 4 ci-dessus).

TEMPS DE GRADIENT	LARGEUR DU PIC CHROMATOGRAPHIQUE	NOMBRE POINTS PAR PICS	TEMPS DE CYCLE	DWELL TIME	NOMBRE DE TRANSITIONS MAX / SCOUT	TEMPS ENTRE CHAQUE SCOUT	NOMBRE DE SCOUTS	TOTAL TRANSITIONS SUIVIES
60 min	12 s	10	1,2 s	5 ms	120	1,5 min	40	4800
60 min	12 s	10	1,2 s	10 ms	60	1,5 min	40	2400
60 min	12 s	10	1,2 s	5 ms	120	4 min	15	1800

Tableau 6 : Exemple de capacités de multiplexage d'une méthode "Scout-SRM"

A travers cet exemple, il apparaît clairement qu'augmenter le nombre de « Scouts » permet d'augmenter le nombre total de transitions suivies dans la méthode. Ainsi, une grande partie du développement de la méthode va consister à choisir les « Scouts ».

En théorie, les « Scouts » peuvent être tout type de molécules, dès lors qu'elles permettent de partager équitablement les composés d'intérêt le long du gradient chromatographique. De même, les « Scouts » peuvent être des composés endogènes ou exogènes. C'est cette dernière stratégie que nous avons choisi de développer dans ce travail de thèse, en ajoutant les « Scouts » juste avant l'analyse LC-MS/MS. Un des avantages de cette stratégie est de maîtriser leur concentration, et de ce fait, faciliter le choix du seuil de détection. De plus, cela permet d'avoir une même méthode d'analyse pour différentes préparations d'échantillons. Enfin, il peut être intéressant d'utiliser des molécules identiques aux composés d'intérêt, mais marquées par des isotopes lourds, les « Scouts » pourront alors être également utilisés comme étalons internes.

### 3.3. Premières données obtenues en « Scout-SRM »

De la première modification du code d'Analyst 1.6.2 ® à la version *bêta-test* actuelle, nous avons participé à l'amélioration du logiciel. Les tests ont consisté en l'analyse d'un mélange de peptides dans de l'eau dans le but de vérifier les points suivants :

- Déclencher des groupes de transitions à partir d'un signal d'une transition dite primaire ou « Scout »
- Arrêter le suivi d'un groupe de transition à partir d'un signal d'une transition dite primaire ou « Scout »
- Ne rentrer aucune information sur le temps de rétention
- Détecter tous les composés ciblés lors de variations chromatographiques.

Ces critères ont été validés sur la dernière version à notre disposition et les résultats sont donnés ci-dessous.

#### 3.3.1. Matériel et méthodes

Une solution contenant un mélange de 18 peptides de synthèse à 50 ng/mL dans H<sub>2</sub>O/MeOH (90 :10) +0,5% AF (Acide Formique) (Tableau 7) a été utilisée.

Le mélange est analysé sur un système LC-MS/MS composé d'une chaîne 1290 series (Agilent Technologies, Massy, France) couplée à un QTRAP 6500 (Sciex, Foster City, CA). Le contrôle de l'instrument ainsi que l'acquisition des données ont été réalisés à l'aide d'une version modifiée du logiciel Analyst 1.6.2 ®, appelée ici version *bêta-test*. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne BEH peptide C18, 100 mm x 2,1 mm ; 3,5 µm (Waters, Milford, MA, USA). Les phases mobiles utilisées sont constituées de H<sub>2</sub>O + 0,1% AF (phase A) et de ACN + 0,1% AF (phase B). La méthode employée utilise un gradient linéaire de 5 à 40% de phase B en 15 minutes, suivi d'une phase de lavage et d'équilibrage soit un temps total d'analyse de 20 minutes, avec un débit de phase mobile de 300 µL/min. Le volume d'injection est 10 µL. L'analyse MS a été menée en mode d'ions positifs, avec une tension de spray de 5500 V. Le gaz de nébulisation est fixé à 70 Psi, le gaz auxiliaire est fixé à 60 Psi et le gaz rideau à 50 Psi et sont tous trois de l'azote. La source Turbo V est utilisée avec un capillaire de spray de 100 µm de diamètre interne et opère à 550°C.

Chaque peptide a été suivi par deux transitions soit un total de 36 transitions, dont les paramètres SRM sont donnés dans le Tableau 7. Dans l'analyse SRM, le *dwell time* a été fixé à 10 ms. Les paramètres utilisés dans la méthode « Scout-SRM » développée ici sont donnés en Annexe 3.

SEQUENCE PEPTIDE	TRANSITION	ION PRECURSEUR	ION PRODUIT	DP	EP	CE	CXP
HPQLQR	2y4	389.72	544.32	45	10	23	28
HPQLQR	2y5	389.72	641.37	45	10	21	34
VHSITGDR	2y6	442.73	648.33	81	10	25	34
VHSITGDR	3y3	295.49	347.16	76	10	13	16
ITAHLK	2y4	341.71	468.29	50	10	17	14
ITAHLK	2y5	341.71	569.34	50	10	17	15
YEGAGAPCK	2a1	448.20	136.07	30	4	47	10
YEGAGAPCK	2y7	448.20	603.29	30	4	23	20
SSSHPIFHR	3y5	356.51	669.38	40	7	20.5	18.5
SSSHPIFHR	3y7++	356.51	447.24	40	7	14	14
APLTKPLK	3y6	289.86	350.24	36	10	13	22
APLTKPLK	3y7++	289.86	398.76	36	10	13	22
EANYIGSDK	2y4	498.73	406.19	56	10	23	20
EANYIGSDK	2y5	498.73	519.27	56	10	23	26
LYYPSQDNDR	2y7	635.78	831.35	71	10	29	44
LYYPSQDNDR	2y8++	635.78	497.71	71	10	27	26
ESDTSYVSLK	2y3	564.77	347.22	71	10	23	18
ESDTSYVSLK	2y6	564.77	696.39	71	10	27	34
VPIEIR	2y4	363.72	530.33	30	3	18	18
VPIEIR	2y5	363.72	627.38	40	5	13	13
AEIEYLEK	2b2	497.75	201.08	61	10	21	12
AEIEYLEK	2y6	497.75	794.42	61	10	21	42
VPSVYPLDR	2y7	523.28	849.44	66	10	31	46
VPSVYPLDR	2y8++	523.28	473.75	66	10	27	27
GFQALGDAADIR	2y7	617.31	717.35	26	10	23	38
GFQALGDAADIR	2y8	617.31	830.43	26	10	27	44
VESWILR	2y4	451.75	587.36	40	3	22	16
VESWILR	2y6	451.75	803.44	40	3	23	15
SYWIGIR	2y4	529.27	458.30	41	10	27	24
SYWIGIR	2y6	529.27	807.45	41	10	21	44
DDVALEGVSHFFR	3y10++	497.91	581.80	41	10	19	34
DDVALEGVSHFFR	3y92	497.91	546.28	41	10	19	32
YPLVVFHSHGLGAFR	3y11++	521.62	595.32	56	10	25	32
YPLVVFHSHGLGAFR	3y12++	521.62	651.8	56	10	23	34
SLGPALLLLQK	2y8++	576.87	448.30	76	10	27	24
SLGPALLLLQK	2y9++	576.87	476.81	76	10	23	24

Tableau 7 : Liste des paramètres SRM utilisés pour l'analyse des 18 peptides de synthèse

### 3.3.2. Résultats

Ces résultats visent à montrer comment la méthode « Scout-SRM » a été construite. Dans un premier temps, une analyse en mode SRM classique a été réalisée sur ce mélange afin de définir les temps de rétention et l'ordre d'élution des 18 peptides (Figure 35).

Les 18 peptides ont alors été répartis en 6 groupes de 3 peptides selon leur ordre d'élution. Le premier peptide élué de chaque groupe a été défini comme le « Scout » qui déclenchera le suivi des autres transitions du groupe (Figure 34).

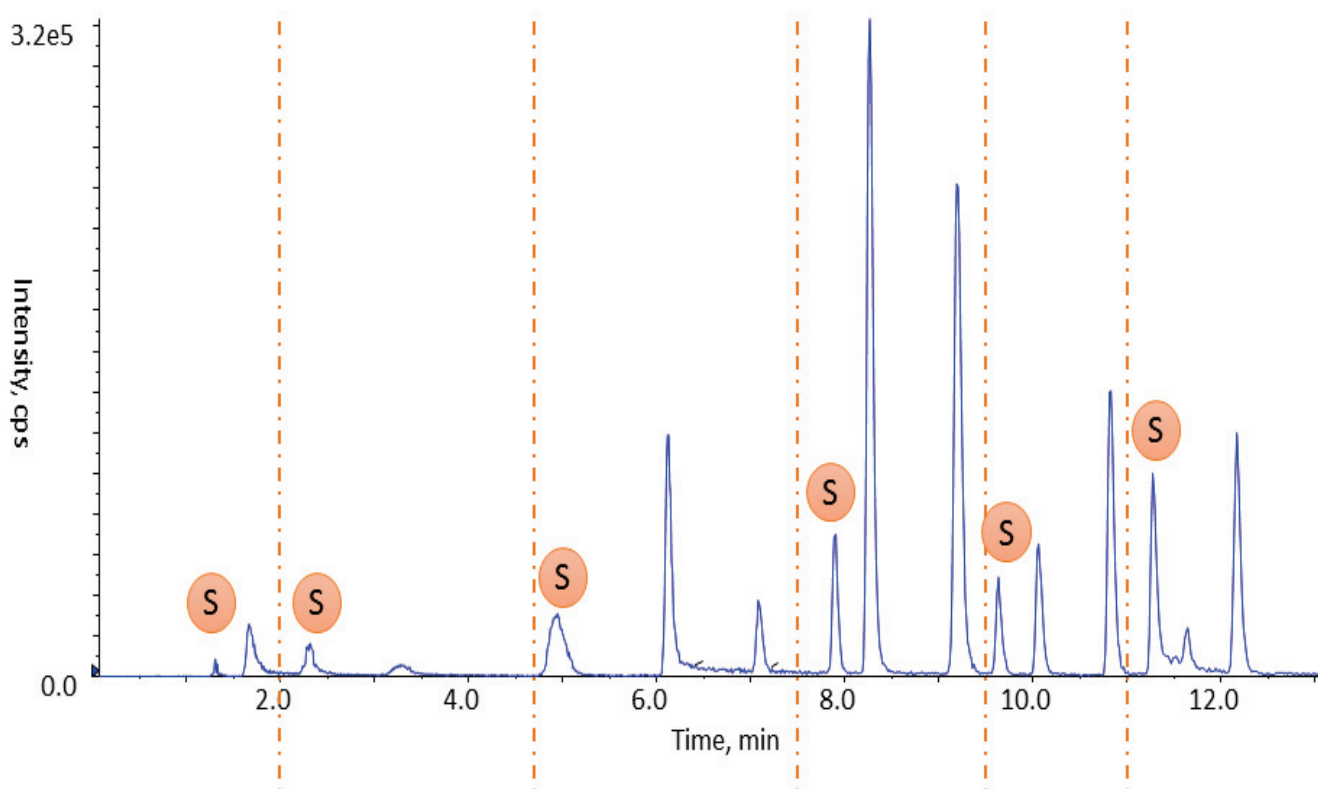


Figure 34 : Chromatogramme SRM du mélange de 18 peptides synthétiques et définition de 6 peptides « Scouts »

La méthode « Scout-SRM » a alors pu être construite, en établissant une liste de transitions pour les 18 peptides à cibler. Dans la version actuelle du logiciel, cette liste contient les paramètres d'une méthode sMRM classique, ainsi qu'une colonne dans laquelle le type de transition (1, 2 ou 4) est rentré (cf 3.2.3).

Ces paramètres sont donnés dans le Tableau 8, avec pour exemple les premières lignes de la méthode ainsi créée. La méthode « Scout-SRM » finale ciblant les 18 peptides est donnée dans l'Annexe 3.



ION PRECURSEUR	ION PRODUIT	TEMPS	IDENTIFIANT	GROUPE	FENETRE DE DETECTION	TYPE DE TRANSITION	SEUIL DE DETECTION	DP	EP	CE	CXP
389.7	544.3	0	HPQLQR.+2y4	A		1	500	45	10	23	28
389.7	641.3	0	HPQLQR.+2y5	A		2		45	10	21	34
442.7	648.3	0	VHSITGDR.+2y6	A		4		81	10	25	34
295.4	347.1	0	VHSITGDR.+3y3	A		4		76	10	13	16
341.7	468.2	0	ITAHLK.+2y4	A		4		50	10	17	14
341.7	569.3	0	ITAHLK.+2y5	A		4		50	10	17	15
448.2	136.0	0	YEGAGAPCK.+2a1	B		1	5000	30	4	47	10
448.2	603.2	0	YEGAGAPCK.+2y7	B		2		30	4	23	20
356.5	669.3	0	SSSHPIFHR.+3y5	B		4		40	7	20.5	18.5
356.5	447.2	0	SSSHPIFHR.+3y7+2	B		4		40	7	14	14
289.8	350.2	0	APLTKPLK.+3y6+2	B		4		36	10	13	22
289.8	398.7	0	APLTKPLK.+3y7+2	B		4		36	10	13	22

Tableau 8 : Exemple d'une liste de transition et des paramètres à remplir pour l'utilisation d'une méthode "Scout-SRM"

Cet exemple montre bien qu'aucune fenêtre de temps n'est associée aux transitions ciblées dans une méthode « Scout-SRM ». Les transitions d'intérêt, de type 4, sont rassemblées dans un groupe comprenant le « Scout » déclencheur, qui correspond à la transition de type 1. A cette dernière est associé un seuil de déclenchement qui est défini à partir du signal obtenu lors de l'expérience SRM classique précédente.

Comme nous l'avons expliqué plus haut il est nécessaire de remplir une ligne correspondant à une transition de type 2 bien qu'elle ne participe pas au déclenchement des transitions de type 4. Nous avons choisi simplement d'y suivre une seconde transition du peptide « Scout ».

Enfin, les groupes, et donc les « Scouts » qui leurs sont associés doivent être rentrés selon leur ordre d'élution chromatographique. En revanche, à l'intérieur d'un groupe, les transitions peuvent être arrangées de manière totalement aléatoire.

Les critères de déclenchement du suivi et de l'arrêt des groupes de transitions de type 4 ont été validés sur la dernière version à notre disposition, que nous avons appelé *bêta-test*.

Nous avons ensuite cherché à montrer l'indépendance de la méthode vis-à-vis des temps de rétention des composés cibles. Pour cela, la même méthode « Scout-SRM » a été testée en effectuant des changements délibérés de gradients LC. Les chromatogrammes résultants sont montrés sur la Figure 35.

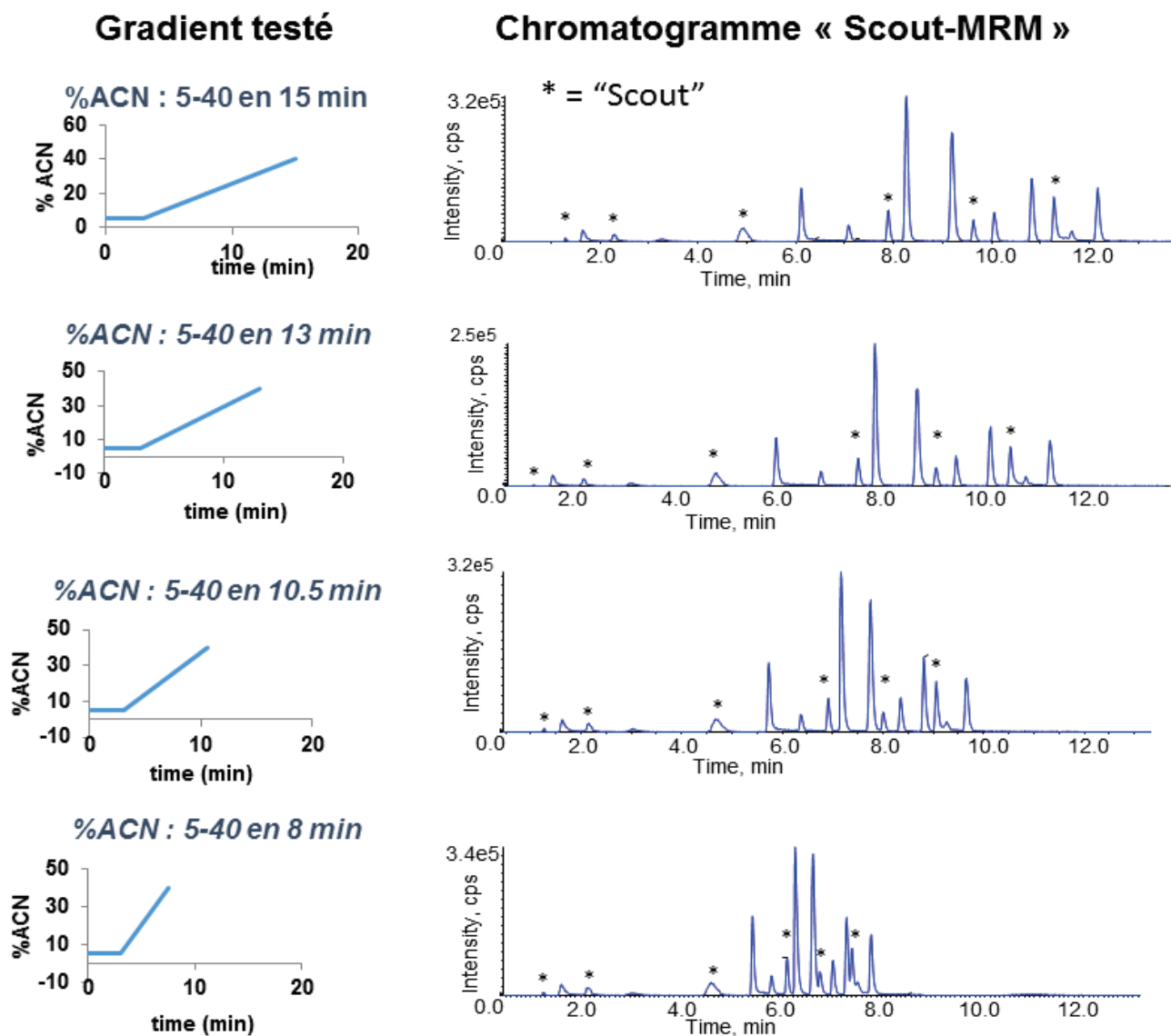


Figure 35 : Détection des 18 peptides ciblés par la méthode "Scout-SRM" lors d'une augmentation de la pente du gradient chromatographique

Les changements de gradients opérés ont modifié les temps de rétention des peptides ciblés. Pourtant, grâce au principe du déclenchement lié à la détection d'un signal « Scout », les peptides ont tout de même été suivis au moment de leur élution. Les 18 peptides d'intérêts ont été détectés dans les 4 conditions testées.

### 3.3.3. Conclusions sur les données préliminaires obtenues en mode « Scout-SRM »

Les résultats préliminaires obtenus nous ont permis de démontrer la faisabilité du concept « Scout-SRM » ainsi que de la version *bêta-test* à notre disposition.

Cependant, si l'indépendance de la méthode vis-à-vis des temps de rétention est démontrée, il est important de garder en tête que les temps de rétention relatifs des composés cibles par rapport aux « Scouts » doivent, eux, être connus. La détermination de ces temps relatifs se fait dans des conditions chromatographiques données, notamment de phase stationnaire et de phase mobile. En effet, si l'ordre d'éluion des composés varie jusqu'à provoquer une inversion de pic entre un « Scout » et un composé d'intérêt, ce dernier ne sera pas suivi au bon moment et ne pourra pas être détecté. La Figure 36 illustre ce phénomène par l'exemple de deux composés définis comme élués entre les « Scouts » S1 et S2. Dans le cas 1, un changement dans les temps de rétention est observé mais l'ordre d'éluion des composés est conservé et ceux-ci sont alors bien détectés. Dans le cas 2, l'ordre d'éluion est modifié puisqu'un composé est élué après le « Scout » S2. Dans ce cas, ce composé préalablement défini comme appartenant au groupe déclenché par le « Scout » S1, ne sera pas détecté puisque la détection du « Scout » S2 entraîne l'arrêt du suivi des transitions appartenant au groupe précédent.

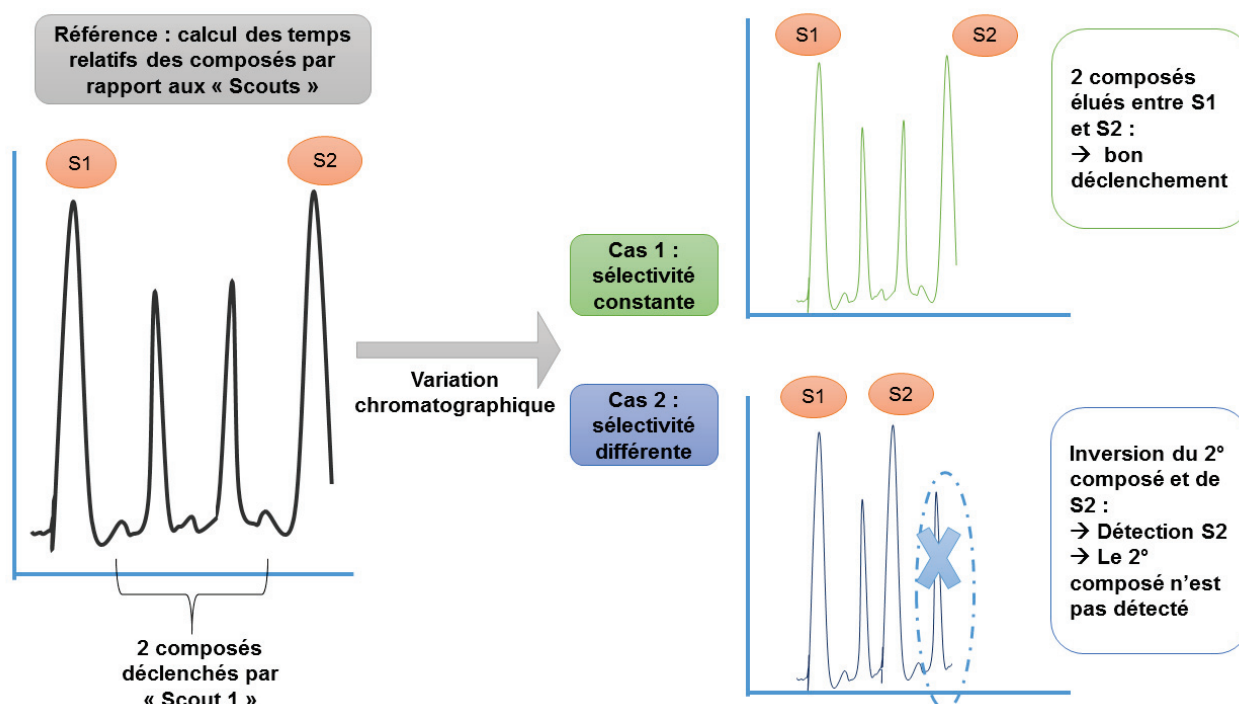


Figure 36 : Importance de la conservation de l'ordre d'éluion des composés par rapport aux « Scouts » lors de l'acquisition en mode "Scout-SRM"

Lors de l'utilisation de méthodes LC en mode gradient, la sélectivité de la séparation est conservée si le produit de la pente du gradient par le temps mort du système reste constant. En pratique, le mode d'acquisition « Scout-SRM » peut supporter des changements de sélectivité tant qu'ils n'entraînent pas d'inversion dans l'ordre d'élution des composés, c'est ce qui a d'ailleurs été démontré par la Figure 35.

Le mode « Scout-SRM » n'a pas pour vocation principale de supporter ces changements délibérés de pente de gradient. En revanche, il est particulièrement intéressant pour rendre plus robustes les méthodes multiplexées face à des variations de temps de rétention dues à des changements de matrices, à des bouchages de colonne, à des transferts de méthode sur différents sites, etc.

Enfin, nous avons imaginé comment l'utilisation de peptides « Scouts » pouvait faciliter les développements de méthodes ciblées à partir de données obtenues en analyse protéomique non ciblée.

### 3.4. Application de l'utilisation de l'outil « Scout-SRM » à la cinétique et l'analyse protéomique différentielle associée à l'infection par *Dickeya dadantii* d'un modèle végétal

La preuve de la faisabilité de l'acquisition en mode « Scout-SRM » a été réalisée sur un projet visant à caractériser le protéome d'un phytopathogène, *Dickeya dadantii*, pendant l'infection d'une plante. L'idée était de démontrer comment l'outil « Scout-SRM » pouvait faciliter le développement d'une méthode ciblée multiplexant plusieurs centaines de protéines, à partir de bibliothèques obtenues lors d'une analyse non ciblée (DDA).

#### 3.4.1. Contexte biologique

La caractérisation du protéome de *Dickeya dadantii* pendant l'infection d'une plante modèle, ici l'endive, est un projet réalisé en partenariat avec l'équipe du Professeur Jean-Marie Lacroix de l'Université Lille 1.

*Dickeya dadantii*, autrefois appelée *Erwinia chrysantemi*, appartient à la famille des Entérobactéries. C'est un phytopathogène allongé, de type bacille, classifié Gram négatif. *Dickeya dadantii* cause la maladie de la pourriture molle de différentes plantes d'intérêt agronomique telles que la pomme de terre, la carotte, la betterave, ou encore l'endive (Figure 37). Les enjeux économiques et sanitaires sont particulièrement importants en Europe par exemple, où le développement de cette maladie provoque jusqu'à 25 % de la perte des récoltes annuelles de pommes de terre<sup>155</sup>. La maladie de la pourriture molle est due à la capacité de la bactérie de sécréter des enzymes de dégradation (pectinases, cellulases) qui vont détruire la paroi des cellules végétales. Mais la réussite de l'infection de la plante implique la mise en place de mécanismes permettant (i) la colonisation de la plante (motilité : pénétration et adhésion), (ii) l'adaptation de la croissance à l'environnement de l'hôte (voies de synthèses de nutriments), (iii) la résistance aux systèmes de défense de la plante (stress oxydatif, peptides antimicrobiens)<sup>156</sup>. Ces mécanismes complexes de survie et de virulence de *Dickeya dadantii* ont été décrits par des approches génomiques et transcriptomiques<sup>157-159</sup>. Par délétion de gènes cibles, celles-ci ont mis, entre autres, en évidence l'importance de la régulation par un système à deux composants (*CpxAR*), impliquant un senseur (membranaire) et un récepteur qui va ensuite, par une cascade de phosphorylations, contrôler le niveau d'expression de gènes cibles. Ce type d'études a aussi montré l'importance des glycanes périplasmiques osmorégulés (*opgG*), oligosaccharides de la membrane bactérienne, régulant l'osmolarité du milieu. Par une régulation des gènes impliqués dans ces deux mécanismes, *Dickeya dadantii* adapte l'ensemble de son métabolisme à son environnement, ce qui lui permet de survivre et de poursuivre l'infection de la plante.

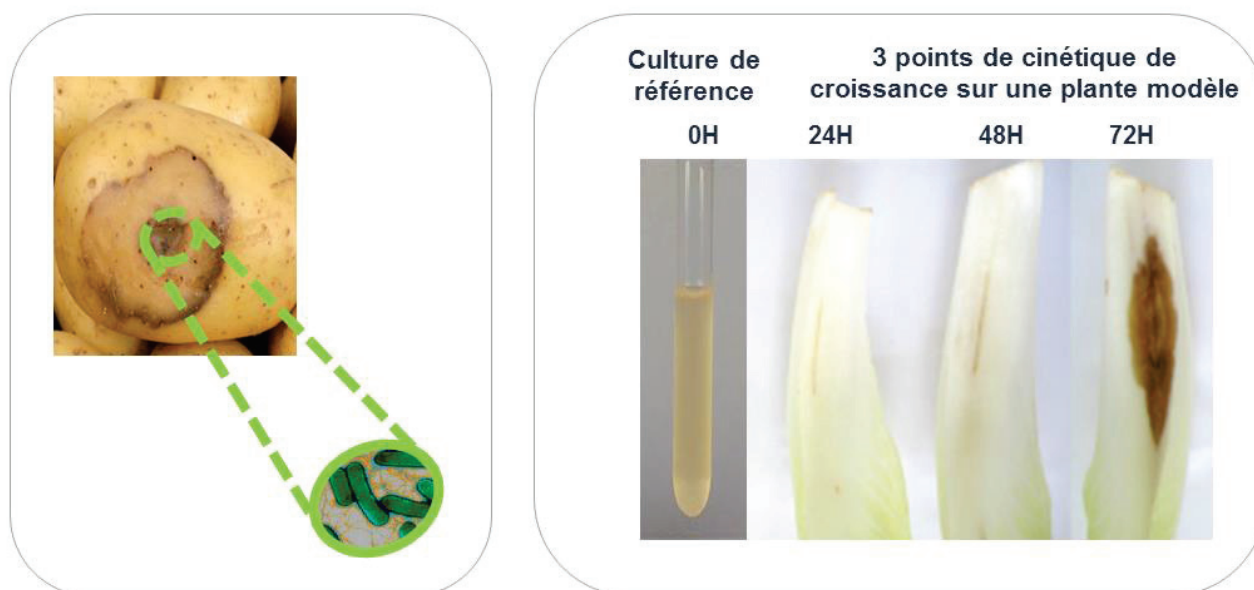


Figure 37 : Maladie de la pourriture molle sur un tubercule et photographie des échantillons d'endives étudiés

Cependant, peu d'études protéomiques ont été menées afin de connaître les niveaux d'expression des protéines impliquées dans ces mécanismes. En 2004, une étude de Bouchart et al, identifie, par une analyse MALDI-TOF-MS, 55 protéines du métabolisme différemment exprimées entre une souche sauvage de *Dickeya dadantii* et une souche mutante, délétée des gènes *opgG*<sup>160</sup>. A notre connaissance, aucune étude de protéomique globale par LC-MS/MS n'a été menée sur cette bactérie, que ce soit en matrice simple (milieu de culture), ou en conditions réelles d'infection d'une plante.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une analyse protéomique quantitative sans marquage par une acquisition de données en mode « Scout-SRM », afin d'étudier l'expression différentielle de 445 protéines entre une culture en milieu liquide et une cinétique d'infection de feuilles d'endive à respectivement 24H, 48H et 72H après inoculation (Figure 37).

Dans un premier temps, une analyse de protéomique globale en aveugle en mode DDA a été conduite. La quantification différentielle des protéines identifiées a permis d'établir une liste de protéines d'intérêt. Dans un objectif quantitatif, construire une analyse hautement multiplexée en mode ciblé prend tout son sens au regard des inconvénients de l'analyse en mode DDA décrits dans le chapitre 1.

Les peptides « Scouts » ayant été placés dès le début de la phase de découverte, une méthode ciblée hautement multiplexée, (445 protéines) a pu être construite sans réajustement des temps de rétention. Les performances de la méthode développée ont été vérifiées, puis la quantification différentielle des protéines dans les 4 conditions de croissance a été effectuée.

### 3.4.2. Matériel et méthodes

#### *i. Préparation des échantillons*

- **Croissance et exposition des bactéries**

Les bactéries, préparées à l'Université Lille 1 par Jean-Marie Lacroix et Sébastien Bontemps-Gallo, sont issues de la souche *Dickeya dadantii* **3937**. La préparation de l'échantillon de référence ainsi que des endives inoculées a été décrite dans différentes publications<sup>161,162</sup>.

L'échantillon de référence est réalisé à partir d'une croissance bactérienne d'une nuit, à 30°C, dans du milieu de culture Luria-Bertani (LB medium). Puis, 50 mL de milieu de culture sont centrifugés, le culot bactérien est alors récolté, puis lyophilisé, et sera nommé 0H. Le reste du milieu de culture est centrifugé, les culots bactériens récoltés sont dilués dans du milieu minimum (M63 medium) et inoculeront les feuilles d'endives.

Les feuilles d'endives sont légèrement coupées en leurs centres et infectées par 10<sup>7</sup> bactéries par feuille. Les feuilles sont alors laissées 24, 48 ou 72H à 30°C, la pathogénicité de la bactérie est mesurée par la taille de la tâche de pourriture. Afin de standardiser au mieux les quantités de bactéries récoltées, 20 feuilles d'endives ont été inoculées 24H, 12 feuilles ont été inoculées 48H et 8 feuilles ont été inoculées 72H.

Les bactéries sont récupérées par simple grattage de la pourriture. Les extraits récoltés sont ensuite lavés et filtrés sur un filtre à café laissant passer les bactéries. Les culots bactériens sont récoltés après centrifugation, puis lyophilisés.

- **Lyse des bactéries**

A réception, les culots bactériens lyophilisés sont lysés par l'ajout de 15 mL d'une solution de Guanidine, Tris-HCL 6 M puis par un passage de 30 minutes aux ultrasons.

- **Dosage des protéines totales**

Une estimation de la concentration en protéines totales des échantillons a été déterminée par un dosage Bradford, selon le protocole *Rothi®-quant*, afin d'ajuster les quantités de réactifs de digestion.

20 mL du réactif de Bradford (Roth ®, Karlsruhe, Allemagne), sont dilués dans 100 mL d'H<sub>2</sub>O, puis filtrés sur papier filtre.

Une solution mère de BSA (Bovine Serum Albumine A7906, Sigma, France) à 1,01 mg/mL est préparée dans 10 mL d'H<sub>2</sub>O. Une gamme de concentrations croissante de BSA de 0 à 100 µg de BSA est réalisée, par dilutions successives à partir de la solution mère, dans 100 µL d'H<sub>2</sub>O. Ensuite, à chaque échantillon, 5 mL de réactif de Bradford dilué sont ajoutés.

Après une minute d'incubation à température ambiante, l'absorbance de la solution est lue à 595 nm sur un spectromètre UV-visible. La droite d'étalonnage représentant l'absorbance de la solution en fonction de la quantité de BSA a alors pu être tracée ( $R^2 = 0,9946$ ) et la relation linéaire en résultant est la suivante :

$$\text{Absorbance de la solution} = 0.0079 \times \text{quantité de protéine } (\mu\text{g}) + 0.0296$$

Équation 6 : Equation de la droite représentant la gamme d'étalonnage de BSA, pour la mesure de la quantité de protéines totales des échantillons bactériens lysés

L'absorbance des culots bactériens lysés ainsi que la solution de Guanidine, Tris-HCL 6 M est mesurée à 595 nm, après ajout de 5 mL de réactif de Bradford dilué, dans les échantillons purs et dilués 10 fois. L'absorbance de la solution de Guanidine Tris-HCL 6 M est retirée à l'absorbance des échantillons.

Les résultats des mesures effectuées sont donnés dans le Tableau 9 ci-dessous.

ECHANTILLONS	CONCENTRATION (G/L)
0H	1,10
24H	0,38
48H	1,03
72H	0,83

Tableau 9 : Mesure des concentrations en protéines totales des échantillons après lyse des bactéries

Pour la suite des manipulations, les prises d'essais sont de 500  $\mu\text{L}$  d'échantillon, soit environ 500  $\mu\text{g}$  de protéines totales, sauf pour l'échantillon 24H, moins concentré que les autres.

- **Hydrolyse enzymatique**

Après avoir prélevé 500  $\mu\text{L}$  de culot bactérien lysé, 55  $\mu\text{L}$  de DTT (dithiothréitol) 150 mM sont ajoutés. L'échantillon est alors placé dans un bain thermostaté à 60°C pendant 40 minutes. Après retour à température ambiante, 170  $\mu\text{L}$  d'IAM (iodoacétamide) 150 mM sont ajoutés et l'échantillon est placé à l'obscurité pendant 40 minutes. Puis, 4 mL d'une solution de Bicarbonate d'Ammonium 50 mM, pH 7,8 sont ajoutés afin de diminuer la concentration de dénaturant avant l'introduction de l'enzyme. La digestion a été réalisée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de trypsine à 200  $\mu\text{g/mL}$ , préparée dans une solution de Bicarbonate d'Ammonium 50 mM, pH 7,8. L'échantillon est ensuite incubé dans un bain thermostaté à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, la digestion enzymatique est stoppée par l'ajout de 35  $\mu\text{L}$  d'acide



formique. Ensuite, l'échantillon est placé 15 minutes aux ultrasons puis centrifugé 15 minutes à 15000 g avant son dessalage par SPE.

- **Dessalage et concentration par SPE**

L'échantillon est dessalé sur une cartouche d'extraction en phase solide Oasis HLB 3 cc (60 mg), selon un mécanisme de phase inverse (Waters, Milford, MA, USA). La cartouche est tout d'abord conditionnée avec 1 mL de MeOH puis 1 mL d'H<sub>2</sub>O + 0,5% AF, avant de déposer l'échantillon. Après le dépôt, l'échantillon retenu sur la cartouche est lavé par 1 mL d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH : 95/5 + 0,5% AF. Enfin, l'échantillon est élué par 1 mL de MeOH + 0,5% AF.

Un volume de 100 µL d'une solution de glycérol à 10% dans du MeOH est ajouté, avant de placer l'échantillon sous un flux d'azote à 40°C jusqu'à évaporation. Enfin, l'échantillon est repris par 190 µL d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH : 90/10 + 0,5% AF. Avant l'analyse LC-MS/MS, les échantillons ont été divisés en aliquots de 30 µL, auxquels 5 µL d'une solution contenant un mélange de peptides « Scouts » à 500 ng/mL sont ajoutés.

ii. *Analyses LC-MS/MS*

- **Analyses en mode DDA**

L'analyse a été réalisée sur un Qexactive (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). La séparation chromatographique a été conduite sur un système HPLC Surveyor MS pompe (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), sur deux colonnes chromatographiques disposées en série XB-C18 Aeris<sup>TM</sup> Peptide, 150 mm x 2,1 mm, particules de 3,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA). L'éluion a été obtenue à un débit de 300 µl/min avec, comme éluant A, de l'eau contenant 0,1% d'acide formique et, comme éluant B, de l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique. Après un palier isocratique de 5 minutes, un gradient linéaire de 5% à 25% d'éluant B a été effectué en 115 minutes. Un volume de 15 µL d'échantillon est injecté sur le système. Les analyses DDA ont été réalisées en combinant l'acquisition d'un premier scan MS dans l'Orbitrap sur une gamme de rapports m/z de 400 à 1250 Th, à une résolution de 35000 (au rapport m/z 200 Th), avec l'acquisition de spectres MS/MS issus de la fragmentation des 10 ions multichargés les plus intenses, à une résolution de 17500 (au rapport m/z 200 Th), sur une gamme de masse de rapports m/z de 200 à 1250 Th. L'énergie de collision normalisée appliquée dans la cellule HCD est de 28. Le temps maximum d'accumulation des ions avant injection dans l'Orbitrap est de 250 ms pour l'acquisition de spectres MS et de 150 ms pour l'acquisition de spectres MS/MS. L'analyse a été menée en mode d'ions positifs, à une tension de 4000 V, la température de source est réglée à 550°C, le gaz de nébulisation, le gaz rideau et le gaz chauffant ont été fixés respectivement à une pression de 50, 5, 10 UA.

Le contrôle de l'instrument et l'acquisition des données ont été effectués à l'aide du logiciel Xcalibur 2.4 ®.

- **Analyses en mode « Scout-SRM »**

L'analyse a été réalisée sur un système LC-MS/MS composé d'une chaîne 1290 series (Agilent Technologies, Massy, France) couplée à un QTRAP 6500 (Sciex, Foster City, CA). Le contrôle de l'instrument ainsi que l'acquisition des données ont été réalisés à l'aide d'une version modifiée du logiciel Analyst 1.6.2 ®, appelée ici version *bêta-test*. Les paramètres chromatographiques (gradient et colonne) utilisés, sont les mêmes que ceux utilisés pour l'analyse en mode DDA décrite ci-dessus. Le volume d'injection est de 15 µL, soit un équivalent de 60 µg de protéines totales. L'analyse a été menée en mode d'ions positifs, avec une tension de spray de 5500 V. Le gaz de nébulisation est fixé à 70 Psi, le gaz auxiliaire est fixé à 60 Psi et le gaz rideau à 50 Psi. La source Turbo V est utilisée avec un capillaire de spray de 100 µm de diamètre interne et opère à 550°C.

La méthode « Scout-SRM » développée cible 2384 transitions, réparties en 19 groupes déclenchés par 19 peptides « Scouts ». La liste des transitions ainsi que les paramètres SRM utilisés sont donnés en Annexe 4.

### *iii. Retraitement des données*

- **Interrogation sur les bases de données**

Les spectres MS/MS générés lors de l'analyse DDA ont été convertis en listes de pics à l'aide d'un script basé sur l'outil Raw-Extract du logiciel Xcalibur 2.4 ® (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), avant d'être interrogés à l'aide du logiciel Protein Prospector 5.16.0 ®<sup>163</sup>. La recherche a été effectuée contre la base de données UniProtKB, sur la souche *Dickeya dadantii* 3937 seulement, comprenant 4500 entrées non revues. Toutes les recherches ont utilisé les paramètres suivants :

- Digestion *in silico* à la trypsine, en ne tolérant aucun site de clivage manqué
- Tolérance sur la masse molaire du peptide de 20 ppm et de 0,2 Da sur la masse molaire de l'ion fragment
- La carbamidométhylation est précisée comme modification fixe
- L'oxydation des méthionines, l'acétylation N-terminale ainsi que la conversion en pyroglutamate de la glutamine en N-terminale sont précisées en tant que modifications variables.

Les résultats obtenus sont donnés avec un FDR <1% (False Discovery Rate).

- **Quantification différentielle des données obtenues en DDA**

La quantification relative sans marquage des protéines identifiées lors de l'analyse DDA, a été réalisée à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ®<sup>164</sup>.

Les données sont tout d'abord extraites comme décrit ci-après. Les bibliothèques contenant les spectres MS/MS et les temps de rétention des peptides rapporteurs des protéines identifiées précédemment sont créées à partir des fichiers de recherches « pepXML » de Protein Prospector. L'algorithme « MS1 filtering » de Skyline 3.0 ® associe ces bibliothèques aux données brutes préalablement converties en fichiers « mzXML » par l'outil MassMatrix Mass Spectrometric Data File conversion Tool version 3.9. Les paramètres d'association des données au protéome de *Dickeya dadantii* 3937, sont les mêmes que ceux utilisés pour l'interrogation par Protein Prospector (détails ci-dessus).

L'algorithme « MS1 filtering » est paramétré de sorte à extraire le signal des ions précurseurs 2, 3 et 4 fois chargés, ainsi que de leurs isotopes. Les signaux sont extraits sur 5 minutes autour du temps de rétention où a eu lieu l'identification MS/MS, avec une tolérance de 0,05 Th.

Une sélection des protéines à quantifier est ensuite effectuée à l'aide de critères de tri, disponibles dans Skyline 3.0 ®. Toutes les informations redondantes sont supprimées au niveau protéique puis au niveau peptidique. Enfin, seules les protéines identifiées avec au moins deux peptides sont conservées pour être quantifiées.

La quantification différentielle des données est réalisée à l'aide d'un script R nommé MSTATS développé à l'université de Purdue (Indiana, USA) <sup>165</sup>, dont le modèle de calcul statistique est décrit par Clough et al <sup>45</sup>. Le script est paramétré pour effectuer une normalisation des signaux entre les données, par la méthode « equalize medians », où toutes les intensités mesurées dans une analyse sont normalisées par une constante afin d'égaliser les intensités entre les différents échantillons.

#### • **Export des listes de transitions pour la construction de la méthode ciblée**

La liste des transitions associées aux peptides à suivre a été créée à partir des bibliothèques de spectres MS/MS et des données brutes importées dans Skyline 3.0 ®.

Pour chaque protéine d'intérêt, les deux peptides les plus intenses ont été sélectionnés d'après leur intensité mesurée sur le spectre MS1. Pour chacun des peptides, seul le meilleur ion précurseur 2 ou 3 fois chargé est conservé. Ensuite, les 3 meilleurs ions fragments par peptide ont été sélectionnés, d'après les spectres MS/MS des bibliothèques, et selon les critères suivants :

- Choix parmi les fragments de type « y » et « b »
- Ions fragments mono-chargés
- Dans une gamme de rapports m/z compris entre 250 et 1000.

L'énergie de collision a été optimisée *via* Skyline, qui utilise l'une des deux relations suivantes, selon le rapport m/z du peptide :

$$[M + 2H]^{2+} : CE = m/z \times 0,036 + 8,857 \text{ ou } [M + 3H]^{3+} : CE = m/z \times 0,0544 - 2,409$$

Équation 7 : Optimisation de l'énergie de collision réalisée à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ®

Il en est de même pour le paramètre DP, *Declustering Potential*, calculé selon la relation suivante :

$$DP = (m/z \times 0,0729 + 31,117) - 30$$

Équation 8 : Optimisation du DP réalisé à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ®

Le temps de rétention exporté dans la liste de transition, est celui mesuré par l'algorithme « MS1 filtering » sur les expériences DDA.

Un fichier Skyline 3.0 ® est créé afin d'extraire spécifiquement les rapports m/z des peptides « Scouts » et d'exporter une liste de transition comportant la mesure de leur temps de rétention.

Les deux listes sont alors compilées et un tri est effectué par ordre de temps de rétention croissant, ceci afin d'encadrer les peptides d'intérêt par les peptides « Scouts », et de définir les groupes de déclenchement.

- **Retraitement des données « Scout-SRM »**

Les données « Scout-SRM » ont été retraitées à l'aide du logiciel Skyline 3.0 ®. L'intégration des peptides d'intérêt a été vérifiée manuellement. L'aire totale mesurée par peptide est la somme des aires des 3 transitions suivies par peptide. Une normalisation de l'intensité des signaux de chaque peptide selon l'intensité totale des signaux de l'échantillon a ensuite été effectuée. L'abondance de la protéine a été déterminée à partir de la moyenne de l'abondance de ces deux peptides rapporteurs. La quantification différentielle a été effectuée par mesure du ratio de l'abondance de la protéine dans l'échantillon exposé sur l'abondance de la protéine dans l'échantillon de référence, défini comme le Fold-Change (FC), dont le calcul est donné ci-dessous.

$$FC = \frac{\text{abondance de la protéine dans l'échantillon exposé}}{\text{abondance de la protéine dans l'échantillon de référence (0H)}} - 1$$

Équation 9 : calcul du Fold-change

### 3.4.3. Présentation de l'organisation des résultats

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme de la méthodologie que nous avons développée afin de quantifier le protéome de *Dickeya dadantii* au cours de l'infection d'une plante, par une analyse ciblée de type « Scout-SRM ». Chaque phase, de la découverte et de la génération de bibliothèques, à la quantification de protéines d'intérêt dans les 4 points de la cinétique d'infection, va être détaillée. Tout d'abord, pour plus de clarté, la Figure 38 propose un schéma général des différentes étapes suivies.

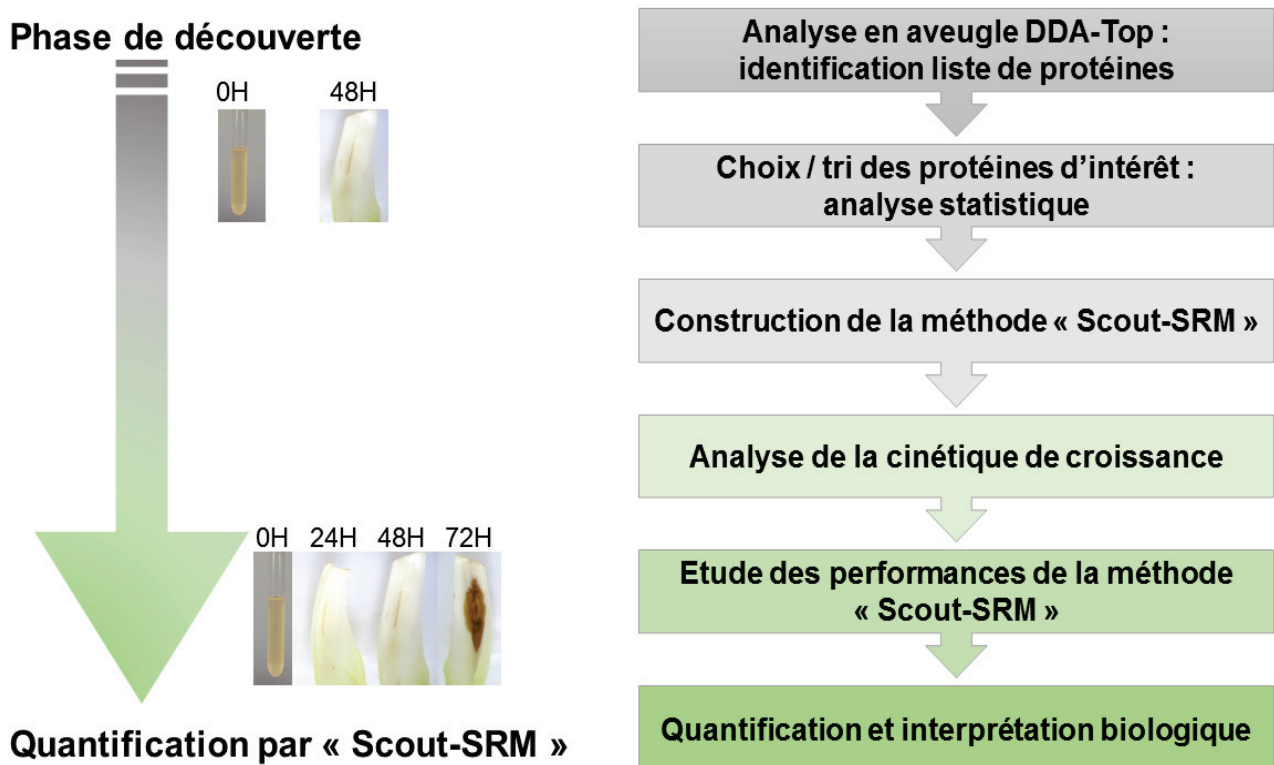


Figure 38 : Schéma récapitulatif de la méthodologie suivie lors du développement de la méthode "Scout-SRM" pour la quantification des protéines de *Dickeya dadantii*

### 3.4.4. Etablissement de la liste de protéines cibles

Puisque le génome de *Dickeya dadantii* 3937 est entièrement séquencé, une liste de protéines a été établie grâce à la comparaison entre les spectres MS/MS générés dans une analyse de type DDA Top 10, et des spectres théoriques issus de la digestion et de la fragmentation *in silico* de la base de données UniprotKB, <http://www.uniprot.org/>.

Dans un objectif de rapidité, cette analyse a été menée uniquement sur deux conditions extrêmes afin de déterminer une liste de protéines très différenciantes. L'échantillon 0H est donc analysé, ainsi que l'échantillon 48H qui est le plus concentré des 3 points de la cinétique d'infection. Afin de palier au mieux le sous-échantillonnage dû aux analyses DDA, chaque échantillon a été préparé en triplicat, chacun eux-mêmes analysés 2 fois.

A partir de la liste de protéines identifiées selon la méthode décrite en 3.4.2, une liste plus restreinte de protéines d'intérêt a été établie. Les différentes étapes de sélection des protéines, ainsi que les résultats sont résumés sur la Figure 39.

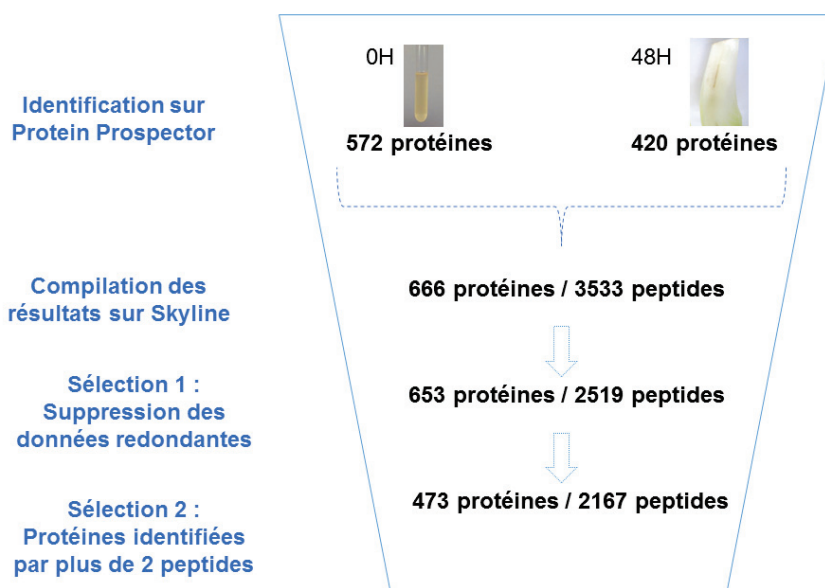


Figure 39 : Résultats d'identification de protéines après analyse DDA, et sélection des protéines d'intérêt

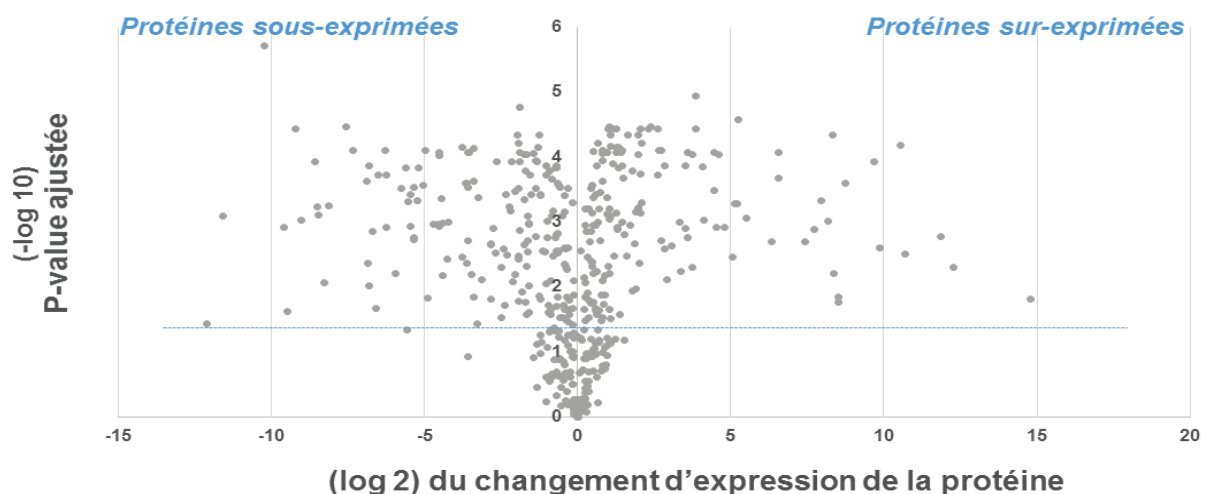
Les listes de peptides et protéines, issues de l'identification des spectres MS/MS des échantillons 0H et 48H, sont compilées et intégrées dans le logiciel Skyline 3.0 ® afin de retraiter les résultats. Cette analyse a permis l'identification de 3533 peptides rapporteurs de 666 protéines. L'identification étant faite sur une base de données non revue, les informations redondantes sont nombreuses, notamment au niveau des protéines homologues. Ainsi, une première étape de tri a consisté en la suppression des informations redondantes au niveau peptidique. Ensuite, seules les protéines identifiées avec au moins deux peptides ont été conservées pour la liste finale. Suite à cela, 473 protéines identifiées par 2167 peptides rapporteurs, sont définies comme la liste de protéines d'intérêt. En

moyenne, la librairie contient 5 peptides par protéines, avec au minimum 2 peptides par protéines et un maximum de 27 peptides.

Afin d'obtenir une première visualisation de la variation de l'expression du protéome de *Dickeya dadantii*, une seconde étape a consisté en la quantification différentielle sans marquage, de ces 473 protéines. Celles-ci sont représentées par un nombre variable de peptides, or il est important de synthétiser les informations de tous les peptides identifiés pour permettre une conclusion au niveau de la protéine. De plus, il est difficile de contrôler toutes les variabilités qui peuvent survenir sur l'intensité du signal d'un peptide, par exemple les interférences, la capacité d'ionisation, une mauvaise intégration de l'aire du peptide, l'effet matrice, la quantité de matériel injecté. Le code MSStats utilisé à travers Skyline 3.0®, applique un modèle permettant de caractériser ces sources de variations en analysant l'ensemble des données conjointement pour toutes les conditions disponibles. L'intensité observée pour tous les peptides dans chacune des conditions va subir une normalisation par la totalité des signaux observés dans la même condition pour le même réplicat. Les intensités de pics MS1 qui varient pour un même peptide entre les réplicats vont avoir un poids moins important dans la conclusion au niveau de la quantification de la protéine. Au final, MSStat suit une procédure standard de tests statistiques en calculant le ratio de la différence estimée sur l'erreur standard pour chaque protéine, en comparant le test statistique à la distribution de Student (avec comme hypothèse nulle que la différence de la moyenne de l'abondance de la protéine entre deux conditions est nulle) avec un degré de liberté approprié pour obtenir une p.value, et en ajustant la p.value comme il est nécessaire pour des comparaisons multiples selon la méthode de Benjamini et Hochberg<sup>166</sup>.

Cette méthode nous a permis de réaliser l'analyse de l'expression de 473 protéines de *Dickeya dadantii* entre une culture réalisée en milieu liquide et une culture après 48H de

#### Comparaison de l'expression des protéines entre la culture de référence (0H) et une culture exposée 48H sur feuilles d'endives



croissance sur endives (Figure 40).

Figure 40 : Quantification différentielle de 473 protéines de *Dickeya dadantii* identifiées dans une analyse non ciblée, entre une culture en milieu liquide et une culture exposée 48H sur endives

La Figure 40, représente les protéines différentiellement exprimées entre une culture en milieu riche de *Dickeya dadantii* et une culture de 48H sur des feuilles d'endives. La ligne horizontale (en bleu, à  $-\log_{10} p\text{-value} = 1,3$ ), sépare les résultats significatifs, c'est-à-dire de p-value ajustée inférieure ou égale à 0,05, des résultats non significatifs. Sur les 473 protéines quantifiées, 142 apparaissent comme différentiellement exprimées de manière significative ( $p\text{-value ajustée} \leq 0,05$  et  $1 \leq \log_2 FC \leq -1$ ). Parmi celles-ci, 84 protéines sont sous-exprimées ( $p\text{-value ajustée} \leq 0,05$  et  $\log_2 FC \leq -1$ ) et 58 sont sur-exprimées ( $p\text{-value ajustée} \leq 0,05$  et  $1 \leq \log_2 FC$ ).

Cette méthode de quantification différentielle faiblement robuste, a tout de même permis d'observer une vue d'ensemble de la régulation de l'expression des protéines de *Dickeya dadantii* lors de la mise en place de sa virulence, ainsi que d'effectuer un premier tri des protéines à quantifier dans la méthode ciblée.

En parallèle, une liste de protéines codées par des gènes connus pour être impliqués dans la virulence de *Dickeya dadantii* a été établie par Jean-Marie Lacroix. Cette liste a été comparée à la liste d'identification obtenue par l'analyse protéomique globale (Tableau 10).

GENE	N° ACCESSION PROTEINE	VUE DANS ANALYSE DDA	VUE APRES RECHERCHE SRM
<b>degP</b>	E0SBJ4	oui	NA
<b>degQ</b>	E0SHD8	oui	NA
<b>sodA</b>	E0SN84	non	oui
<b>fliT</b>	Q8RST2	non	non
<b>flhC</b>	E0SIM9	oui	NA
<b>flhD</b>	E0SIN0	non	non
<b>opgG</b>	Q9F496	oui	NA
<b>opgH</b>	Q9F495	non	oui
<b>rcsB</b>	E0SDZ3	oui	NA
<b>rcsC</b>	E0SDZ2	non	non

Tableau 10 : Liste de protéines codées par des gènes de virulence de *Dickeya dadantii*, et résultat de leur recherche dans la culture 0H et la culture 48H

Parmi cette liste, 5 protéines n'ont pas été détectées dans l'analyse non ciblée. Celles-ci ont alors été recherchées en SRM dans les échantillons 0H et 48H. La liste de peptides et de transitions a été établie comme décrit dans le Chapitre 2, par digestion et fragmentation *in silico* des protéines *via* Skyline 3.0 ®. Seules les protéines codées par les gènes *sodA* et *opgH* ont pu être détectées, par respectivement 4 et 2 peptides. Les 6 peptides détectés ont été ajoutés à la liste d'intérêt.



Nous avons ainsi établi une liste de 475 protéines d'intérêt, identifiées par 2173 peptides rapporteurs, avec une moyenne de 5 peptides par protéines.

### 3.4.5. Construction de la méthode « Scout-MRM »

La construction de la méthode « Scout-SRM » développée ici peut se diviser en 3 étapes qui sont : (i) l'export des transitions et peptides à cibler, rapporteurs des protéines d'intérêt, (ii) définition des groupes de transitions, c'est-à-dire l'encadrement des peptides cibles par les « Scouts », (iii) la détermination des seuils de déclenchement des « Scouts ».

#### i. Export des transitions et des peptides rapporteurs des protéines d'intérêt

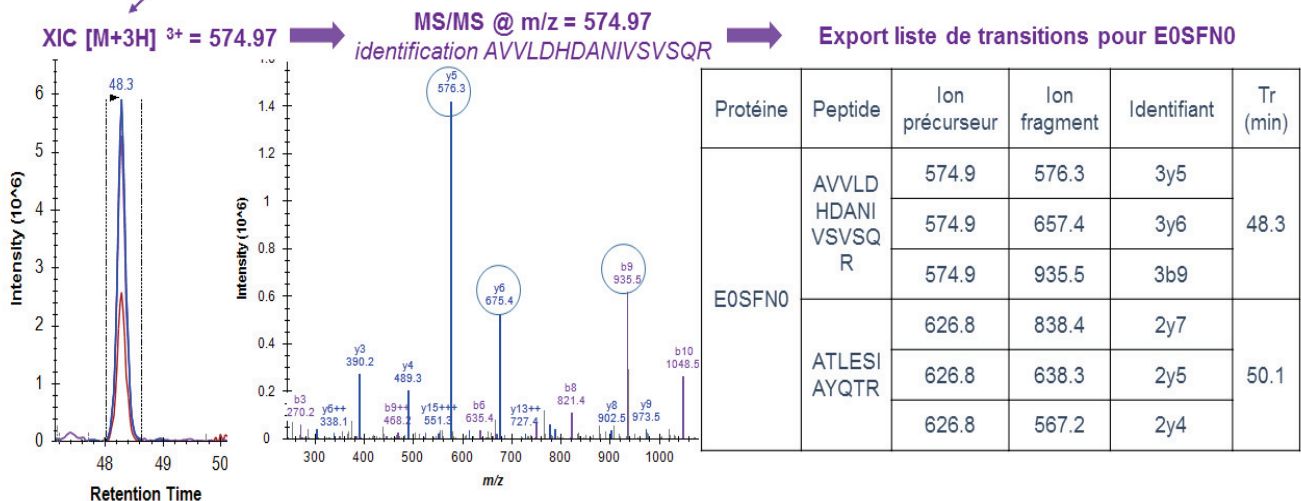
Nous avons établi une liste de 475 protéines d'intérêt pour la quantification de l'expression du protéome de *Dickeya dadantii* au cours de l'infection d'une plante. En moyenne, nous avons identifié 5 peptides rapporteurs de ces protéines. Quantifier en une seule méthode ciblée les 2173 peptides identifiés n'est pas envisageable. De plus, quantifier 15 peptides pour la même protéine n'est pas pertinent. C'est pourquoi, à partir des bibliothèques générées, nous avons gardé uniquement les précurseurs 2 ou 3 fois chargés des deux peptides les plus intenses par protéine. Les mêmes bibliothèques ont aussi permis d'exporter les trois ions fragments les plus intenses par peptides sélectionnés. Ces tris ont été effectués à l'aide du logiciel Skyline 3.0®, comme décrit dans la partie Matériel et méthodes (3.4.2-iii),

**Exemple protéine E0SFN0, glycérol kinase  
Identifiée par 22 peptides**

MNQEKKYIVALDQGGTSSRAVLDHDANIVSVSQREFQTQYPKAGWVEHDPMEIWASQSSTLVEALAKAGISSDEVAGIGITNQRETAVVWEKDTGKPIY  
NAIVWQCRRSADICEK LKKDGLÉYIRANTGLVVDPYFSGTKVKWILDHVEGSRERARRGELLFGTIDTWLIWKMTQGRVHVTDYTNASRTMLFNIHKL  
DWDERMLEVLDIPRAMLPQVRFPSSEIYGQTNIGGKGGTRIPIAGIAGDQQAALYQQLCVHPGMAKNTYGTGCFLLMNTGTEAVRSRHGLLTTIACGPRG  
EVNYALEGAVFIGGASIQWLRDELKLIKDAMDSEYFATKVKDSDNGVYVPAFTGLGAPYWDYPYARGAIFGLTRGVNANHIRATLESIA YQTRDVLDMQA  
DADTRLQSLRV DGGAVANNFLMQFQSDILGTRVERPQVREESTALGAAFLAGLATGFWNLDLDEVKSKTAIEREFRPSIETVERNFRYRIGWQKAVERARA  
WEEHDE

Rang 1

Rang 2



un schéma d'exemple est donné par la Figure 41.

Figure 41 : Schéma de la méthodologie utilisée via Skyline 3.0®, pour la sélection des peptides et transitions rapporteurs des protéines d'intérêt

Par cette méthode, une liste comportant 2838 transitions ciblant 946 peptides rapporteurs des 473 protéines identifiées lors de l'analyse de protéomique globale a été obtenue.

Pour les deux protéines ajoutées suite à l'expérience supplémentaire menée en SRM, les deux peptides les plus sensibles ont été conservés, avec chacun leurs 3 meilleures transitions.

Ainsi, une liste de 2850 transitions ciblant 950 peptides rapporteurs de 475 protéines a été obtenue. Celle-ci se présente sous la forme d'un tableau Excel, comportant les informations suivantes :

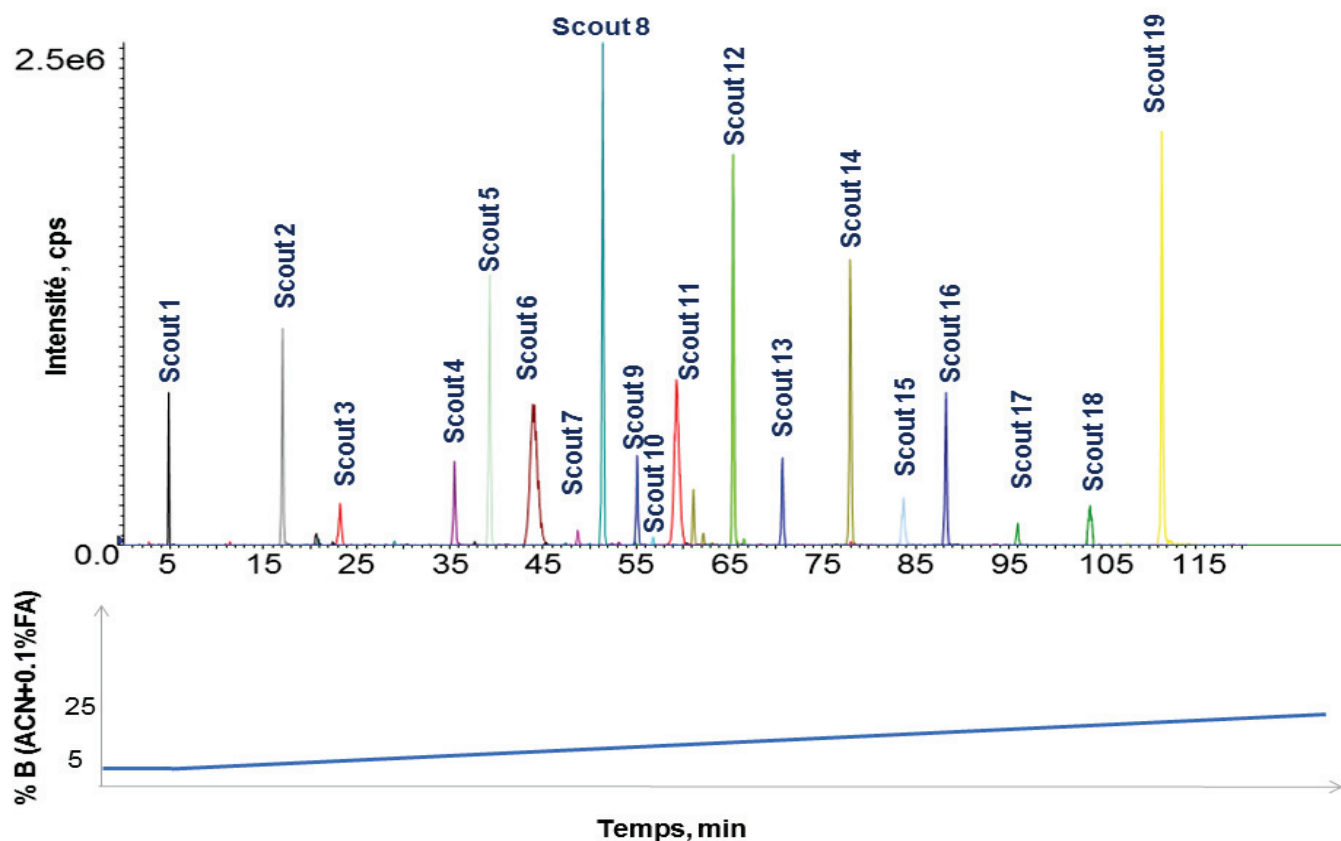
- Nom de la protéine
- Le résultat de quantification différentielle (Fold change et p-value)
- Séquence du peptide
- Nom de la transition
- Rapport m/z de l'ion précurseur
- Rapport m/z de l'ion fragment
- Un identifiant défini comme suit : nom de la protéine\_3 premières lettres du peptide\_nom de la transition ; par exemple : E0SFN0\_AVV\_3y5 pour une transition d'un peptide de la glycérol kinase (Figure 42)
- Les paramètres SRM spécifiques du spectromètre de masse 6500 QT (DP, CE)
- Le temps de rétention du peptide, mesuré lors de l'analyse DDA.

## ii. Définition des groupes de transitions, encadrés par les peptides « Scouts »

Dans un premier temps, un mélange contenant 45 peptides de synthèse, dont les paramètres SRM sont connus, a été utilisé avant de sélectionner les peptides « Scouts » utilisés dans la méthode finale. Un BLAST a été réalisé afin de s'assurer que les séquences de ces peptides ne soient pas retrouvées dans les protéines de *Dickeya dadantii*. Le mélange a été ajouté aux échantillons avant l'analyse DDA, puis leurs temps de rétention ont été mesurés à partir de bibliothèques Skyline réalisées spécifiquement pour ces 45 peptides. Les séquences de ces peptides ainsi que leurs temps de rétention sont donnés dans en Annexe 5.

Dans un second temps, la liste des peptides de synthèse a été introduite dans la liste de composés cibles, et un tri par ordre de temps de rétention croissant a été établi. L'objectif est de déterminer quels peptides de synthèse permettent d'encadrer des groupes de transitions de composés d'intérêt de manière homogène le long du chromatogramme. Dans le cas où plusieurs peptides répondaient à ces critères, le plus sensible a été sélectionné. De plus, les groupes contenant 100 transitions ont été privilégiés.

Ceci nous a permis de sélectionner un ensemble de 19 peptides « Scouts », dont la



répartition chromatographique est illustrée sur la Figure 42.

Figure 42 : Répartition chromatographique des 19 peptides "Scouts" sélectionnés

Cependant, dans certaines zones chromatographiques, il n'a pas été possible de constituer des groupes de moins de 150 transitions. Or, cette limite est le maximum acceptable si nous souhaitons avoir un temps de cycle maximum de 1,2s et un *dwell time* supérieur à 5 ms par transition.

Dans ces groupes, il a alors été fait le choix de ne conserver que les peptides rapporteurs de protéines régulées significativement ( $p$ -value ajustée  $\leq 0,05$  et  $1 \leq \log_2FC \leq -1$ ). Cela a eu pour conséquence d'une part, de réduire la liste de protéines cibles, d'autre part, certaines protéines non significatives, ne sont plus suivies qu'avec un seul peptide.

La méthode « Scout-SRM » cible alors 445 protéines, par 782 peptides rapporteurs. Ces derniers sont suivis par 3 transitions chacun, soit un total de 2346 transitions ciblant des composés d'intérêt. La méthode suit également 19 peptides « Scouts », chacun par 2 transitions. Au final la méthode « Scout-SRM » construite suit 2384 transitions, réparties en 19 groupes, définis par les 19 « Scouts », comme décrit dans le Tableau 11.

GRUPE N°	SEQUENCE PEPTIDE SCOUT	SCOUT : ION PRECURSEUR	SCOUT : ION PRODUIT	TEMPS DE RETENTION	NOMBRE DE TRANSITIONS SUIVIES
1	VHSITGDR	442.7	561.3	4.7	93
2	EANYIGSDK	498.7	519.3	16.7	83
3	ATFNPAQDK	496.2	672.3	22.8	134
4	LYYPSQDNDR	635.8	831.4	35.2	116
5	SLAPAVVTGK	471.8	671.4	38.8	113
6	TLPF SR	360.7	506.3	43.5	150
7	GPIVHTDHS DLVLEEK	597.0	711.8	48.3	131
8	LSPLGEEMR	516.3	621.3	51.1	128
9	APAATVVDVDEVR	671.4	831.4	54.8	107
10	NYTPQLSEAEVER	768.4	819.4	56.6	95
11	VPSVYPLDR	523.3	500.3	58.9	152
12	SVALAPHVGMGL*DTR	510.9	672.9	65.0	98
13	VNEPSILEMSR	637.8	635.3	70.4	146
14	VDPEVLHSLQTQLK	536.3	696.9	77.6	146
15	EVELIIQVTPK	634.9	798.5	83.2	155
16	SYWIGIR	529.3	807.5	87.9	148
17	DRVYIHPFHLVI	503.6	569.8	95.5	125
18	YPLVVF SHGLGAFR	521.6	595.3	103.3	151
19	QDNEILIFWSK	696.9	793.5	111.1	113
		<b>NOMBRE DE PROTEINES</b>	<b>NOMBRE DE PEPTIDES</b>	<b>NOMBRE TRANSITIONS PEPTIDES INTERET</b>	<b>NOMBRE TOTAL TRANSITIONS</b>
		445	782	2346	2384

Tableau 11 : Récapitulatif des groupes de transitions et des Scouts sélectionnés dans la méthode "Scout-SRM"

### iii. Détermination des seuils de détection des peptides « Scouts »

Une dernière étape de la construction de la méthode « Scout-SRM », consiste à déterminer les seuils de déclenchements des peptides « Scouts ». Pour cela, les échantillons 0H et 48H (contenant les peptides « Scouts »), sont analysés par une acquisition en mode SRM ciblant uniquement les 19 peptides « Scouts ». Le seuil est défini selon la plus faible intensité mesurée au-dessus des interférences éventuelles.

La méthode complète est donnée en Annexe 4, le chromatogramme de l'analyse en mode « Scout-SRM » de l'échantillon exposé 48H sur endive, est donné sur la Figure 43.

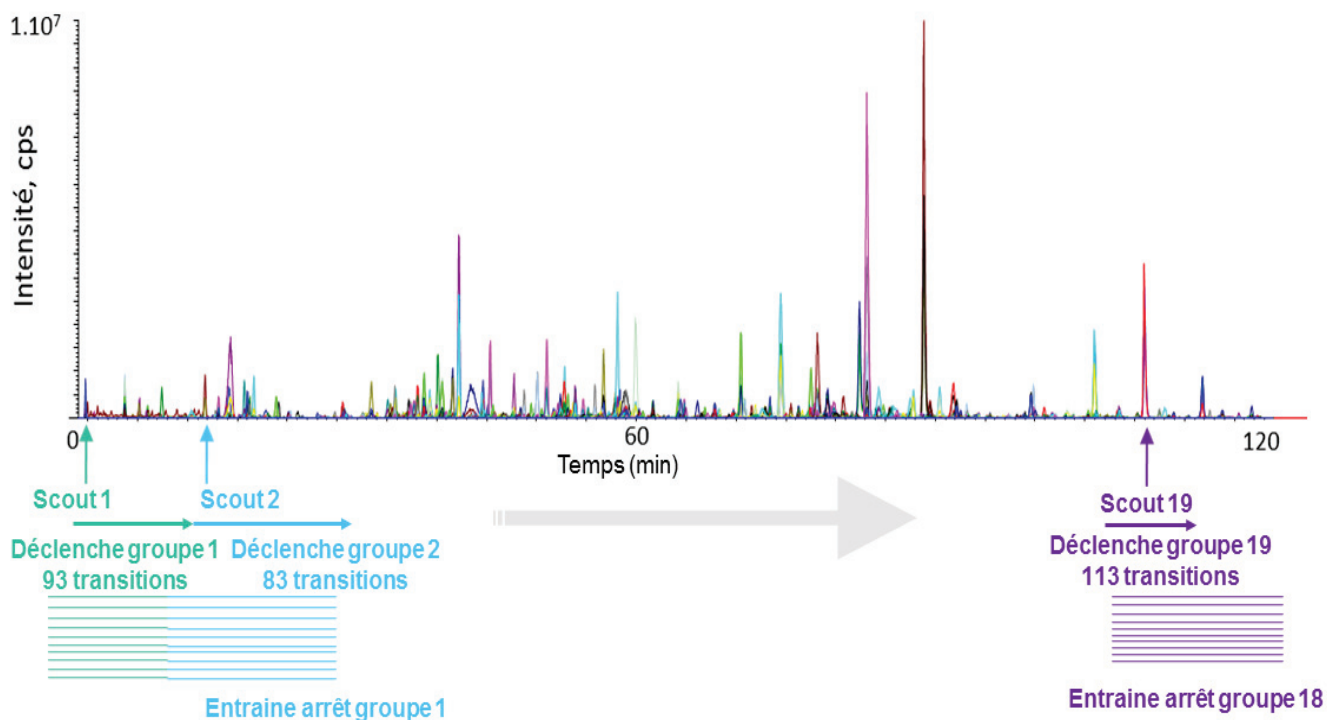


Figure 43 : Chromatogramme "Scout-SRM" de l'échantillon 48H

Ainsi, sans aucun réajustement sur les temps de rétention, une méthode ciblée de type « Scout-SRM » a pu être développée. Celle-ci cible 782 peptides, par 2384 transitions sans aucun fenêtrage en temps de rétention. Le développement a principalement consisté à définir la liste de protéines d'intérêt à partir d'une analyse de protéomique globale, réalisée sur un premier système LC-MS/MS. Il est important de noter que les peptides « Scouts » sont ajoutés à l'échantillon dès cette phase de découverte. Ensuite, les peptides rapporteurs des protéines d'intérêt sont triés selon leurs temps de rétention. Ceci, dans le but de les placer au sein de groupes encadrés par des peptides « Scouts ». Une injection en mode SRM, ciblant les 19 peptides « Scouts », sur le second système LS-MS/MS est nécessaire afin de déterminer leurs seuils de déclenchement.

### 3.4.6. Etude des performances de la méthode « Scout-SRM » développée

Les 4 échantillons de la cinétique de croissance de *Dickeya dadantii* ont ensuite été analysés par la méthode développée. Chaque échantillon a été injecté 3 fois.

Les résultats ont été retraités par le logiciel Skyline 3.0 ®.

#### i. Synthèse du nombre de peptides détectés

Après export des données brutes, seuls les peptides répondant aux critères suivants ont été considérés comme détectés :

- Somme des aires des transitions d'un peptide > 2000
- Conservation des ratios entre les transitions d'un même peptide, entre les différentes injections (CV < 5%).

Le Tableau 12, donne une synthèse des résultats du nombre de peptides mesurés dans chacun des 4 échantillons.

ECHANTILLONS	NOMBRE DE PEPTIDES DETECTES	NOMBRE TOTAL DE MESURES	NOMBRE TOTAL DE PEPTIDES DETECTES
0H	701	7695	742
24H	603		
48H	632		
72H	629		

Tableau 12 : Synthèse du nombre de peptides détectés et du nombre de mesures effectuées par l'analyse en mode "Scout-SRM" de la cinétique de croissance de *Dickeya dadantii*

Sur les 782 peptides suivis dans la méthode, 742 d'entre eux ont été identifiés par la méthode « Scout-SRM » développée, soit 94% des peptides initialement ciblés. Entre 701 et 603 peptides ont été mesurés par échantillons. Le plus grand nombre de peptide a été détecté dans l'échantillon de référence 0H, cela est dû d'une part au fait que cet échantillon est le plus concentré et d'autre part au fait que la matrice de cet échantillon est beaucoup plus simple (bouillon de culture) que la matrice des échantillons exposés sur feuilles d'endives.

Au total, 2565 peptides ont été mesurés (somme de tous les peptides détectés dans les 4 échantillons), puisque chaque analyse a été réalisée 3 fois, ceci représente 7695 points de mesures.

Avant de quantifier les peptides identifiés, la qualité des mesures effectuées par la méthode « Scout-SRM » a été vérifiée.

## ii. Gamme dynamique des aires des peptides détectés

Dans un premier temps, la gamme dynamique du signal des 2565 peptides identifiés a été tracée pour l'ensemble des peptides identifiés, à la fois dans l'échantillon de référence, et dans les 3 points de la cinétique d'infection. La Figure 44 représente l'aire des peptides mesurés dans l'échantillon de référence ainsi que dans les 3 points de la cinétique de croissance sur feuilles d'endives.

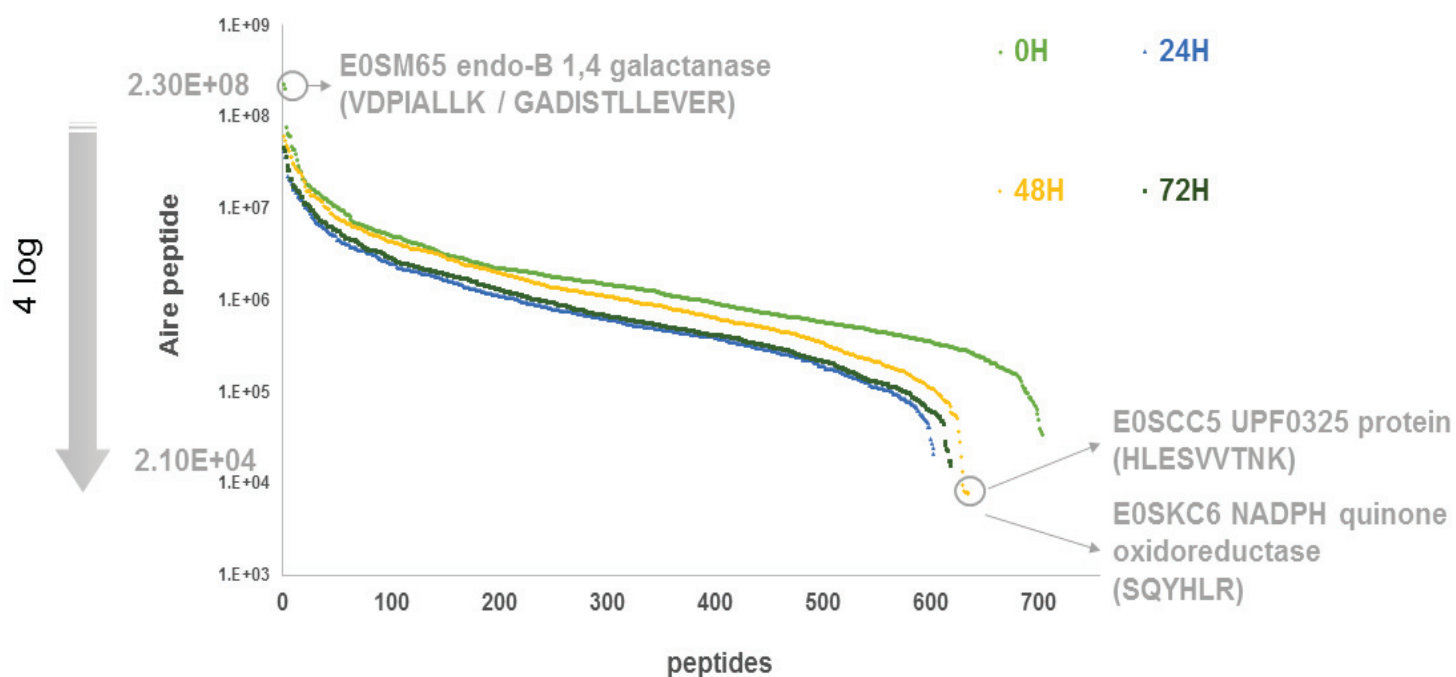


Figure 44 : Gamme dynamique des peptides identifiés lors de l'analyse "Scout-SRM" de la cinétique de croissance sur endives de *Dickeya dadantii*

Une différence de 4 log est observée entre l'aire des peptides les plus intenses et l'aire des peptides les moins intenses. Cette gamme dynamique, tracée à partir de données endogènes et en matrice complexe, montre que les performances de la méthode « Scout-SRM » sont celles classiquement obtenues en SRM.

### iii. Evaluation de la répétabilité de la méthode

Dans un second temps, la répétabilité de la méthode a été évaluée par la mesure du coefficient de variation de l'aire mesurée entre les 3 triplicats injection, soit à partir de 7695 points de mesures. La Figure 45 représente la répartition de cette variabilité, par le CV entre les 3 injections successives des échantillons, en fonction de l'aire (en log 10) des 2565 peptides mesurés, entre les 4 échantillons.

Le calcul de la médiane des CV des aires mesurées des triplicats injection est de 7%. Ceux-ci sont répartis de manière homogène entre les 4 conditions. De plus, la médiane des CV des aires des triplicats analytiques de l'échantillon de référence ainsi que de l'échantillon exposé 24H est de 8%, et celles des échantillons exposés 48H et 72H sont respectivement de 6% et 5%. La répétabilité de la méthode est satisfaisante puisque 75% des mesures sont réalisées avec un CV injection inférieur à 11%.

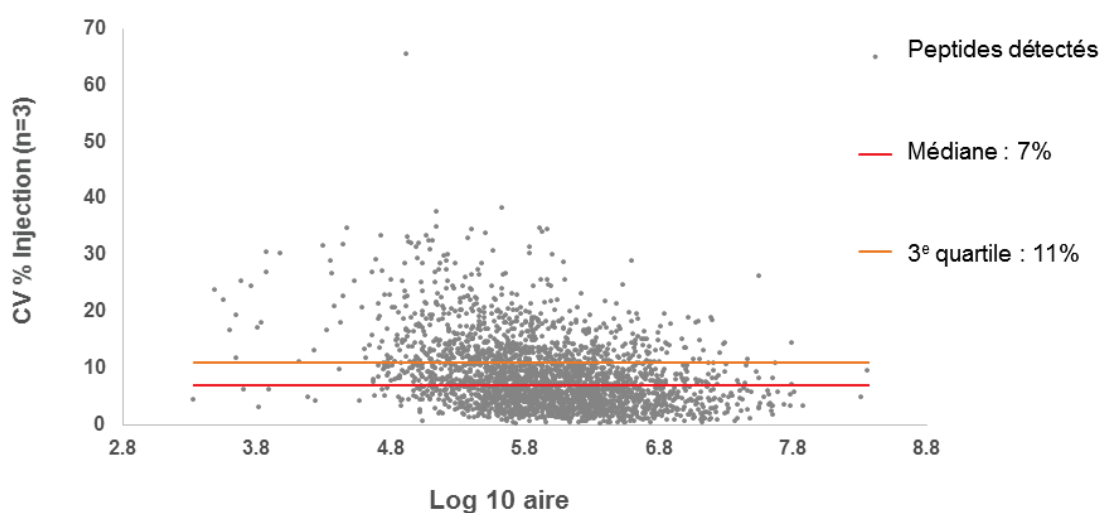


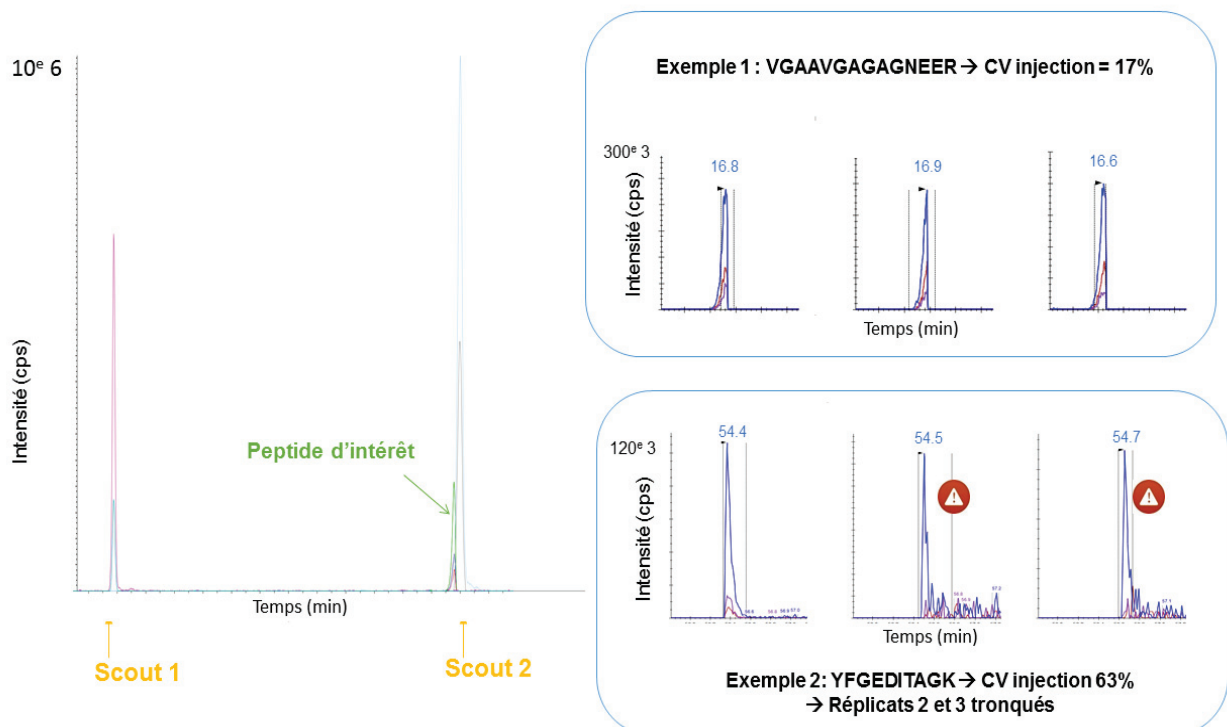
Figure 45 : Evaluation de la répétabilité de la méthode par le calcul des CV des aires mesurées de l'ensemble de 2565 peptides identifiés (n=3)

Cependant, 6% des mesures (soit 143) ont des coefficients de variation élevés, >20%. Ces résultats ont été vérifiés manuellement. Dans la majorité des cas, il s'agit de peptides en limite de détection dans l'un des 4 échantillons mais dont la présence est avérée. Ces peptides sont conservés comme détectés, mais ne seront pas quantifiés.

En revanche, dans d'autres cas, et notamment ceux des 3 points de la Figure 45 où les CV injections sont supérieurs à 35%, il s'agit de peptides très proches, voire co-élués avec un peptide « Scout ». Nous avons appelé ces peptides, « chevauchants », car à l'intervalle entre deux groupes.



Ce phénomène est illustré par la Figure 46. La partie gauche de la Figure 46 montre l'exemple d'un peptide suivi dans le groupe 1, proche du « Scout » déclenchant le suivi du groupe 2 ainsi que l'arrêt du groupe 1. De ce fait, le peptide n'est pas suivi pendant toute la durée de son élution chromatographique, entraînant l'observation de pics « tronqués ». La mesure de l'aire de pics chromatographiques tronqués est alors très variable et explique ces CV élevés. La partie droite de la Figure 46, montre deux exemples de peptides adjacents à des peptides « Scouts ». Dans les deux exemples, les pics chromatographiques des peptides sont tronqués. En revanche, dans l'exemple 1, la répétabilité de l'injection reste correcte (CV injection = 17%), contrairement à l'exemple 2 où le peptide est déclenché trop



tardivement et n'est pas mesurable dans 2 des 3 réplicats injection.

Figure 46 : Chromatogrammes illustrant la problématique des peptides chevauchants

Comme explicité précédemment, tous les peptides aux CV supérieurs à 20% sont considérés comme détectés, mais ne seront pas quantifiés.

#### iv. Vérification par SRM des peptides non détectés

L'ensemble des peptides non détectés (soit 40 peptides) a été suivi par une méthode SRM classique afin de déterminer si leur absence de détection était due à un biais dans la méthode « Scout-SRM ». Ces peptides ont été ciblés à partir des mêmes transitions que celles suivies dans la méthode « Scout-SRM », et un *dwell time* de 5 ms a été choisi de sorte à être cohérent avec celui de la méthode « Scout-SRM ». Seuls les échantillons 0H et 48H ont été analysés. Les résultats ont été analysés dans Skyline 3.0 ® et sont résumés dans le Tableau 13.

Parmi les 40 peptides suivis, 24 ont pu être détectés en SRM classique. Cette expérience nous permet de déterminer les limites de la méthodologie développée ici.

La moitié des peptides non détectés en « Scout-SRM » mais détectés en SRM classique concerne des peptides co-élus aux peptides « Scouts » du groupe auquel ils appartiennent. Ce cas rejoint la problématique des peptides chevauchants, décrite ci-dessus, et le fait qu'il aurait fallu suivre ces peptides dans deux groupes adjacents.

L'autre partie des peptides non détectés en « Scout-SRM » est due à une mauvaise détermination du groupe de transitions auquel est associé le peptide. L'export de la valeur temps de rétention des peptides cibles dépend du temps de rétention auquel a eu lieu l'identification du peptide sur la base de données. Selon si celle-ci a eu lieu au sommet du pic chromatographique ou non, la valeur de temps de rétention peut varier de quelques dizaines de secondes. Or, dans la méthodologie développée ici, si la fragmentation d'un peptide d'intérêt a eu lieu au début du pic, son temps de rétention réel risque d'être anticipé. Cela pose un problème pour les cas où le peptide d'intérêt est proche d'un « Scout », le risque est d'assigner le peptide au « Scout n-1 » qui le précède. Ce peptide ne sera donc pas suivi au moment de son élution chromatographique. Il est tout de même important de noter que ce cas ne concerne que des peptides élués à quelques dizaines de secondes d'un « Scout », soit 6 peptides du Tableau 13. De même que précédemment, cela pourrait être résolu en suivant ces peptides dans deux groupes adjacents.

Cependant, 6 autres peptides n'ont pas été suivis dans le bon groupe, et de ce fait n'ont pas été détectés en « Scout-SRM ». En moyenne, ceux-ci ont été identifiés à 1 minute du peptide « Scout » le plus proche, l'erreur d'assignation n'est donc pas due aux temps de rétention exportés *via* les bibliothèques de fragmentations. En revanche, comme nous l'avons évoqué dans la partie 3.3.3, pour conserver une qualité et un ordre de séparation identique lors d'un transfert de méthode LC utilisant un gradient, le produit de la pente du gradient par le temps mort du système doit être constant. Or, dans le transfert réalisé ici, aucun ajustement n'a été effectué alors que les temps morts des deux systèmes sont différents. De ce fait, les 6 peptides concernés ont subi une inversion de pics avec le « Scout » suivant le groupe auquel ils avaient été initialement attribués et n'ont pas été suivi au moment de leur élution.

Le transfert entre l'étape de découverte et l'étape ciblée, à l'aide des peptides « Scouts », a tout de même permis la détection de 94% des peptides ciblés initialement, ces peptides sont rapporteurs de 438 protéines, soit 98% des protéines d'intérêt.

PROTÉINE	PEPTIDE	DÉTECTÉ EN SRM	TR (MIN)	INTENSITÉ	REMARQUE
E0SDS4	AAFDFAVENQALDR	non			
E0SBL0	AAQEEEFSLRLR	oui	77.5	5000	co-élué avec scout 14
E0SAU3	ADFEFATDAGR	oui	70	8000	co-élué avec scout 13
E0SDS5	AEAQVIEQASK	oui	53.9	50000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
Q93KB7	AEYTGWDGHLRSR	non			
E0SG26	AIDFYTK	oui	47.7	200000	co-élué avec scout 7
E0SC00	ALIVALAQTK	oui	66.2	150000	mauvaise assignation de groupe
E0SGW4	APDYTITDIALDFDLHPEQTR	non			
E0SEN8	AVSMARPYDAK	non			
E0SJX0	DGWTLSGFISSQQMATGAVK	non			
E0SGD2	DLEYLVALAEHR	oui	111	3000	co-élué avec scout 19
E0SKI2	EALEWGVGTGAGLR	oui	82.7	20000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SHE2	EATFEEMIR	oui	76.7	10000	mauvaise assignation de groupe
Q9F495-OPGH	ELVATDEYFR	non			
E0SEZ3	EQDPTLAFR	oui	53.8		proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SI38	EWVEAEFAAGK	oui	54	10000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SB15	FAGEMLPVIDNLER	non			
E0SLP9	FLLVLDAQR	oui	88.5	20000	mauvaise assignation de groupe
E0SLC3	FVFIGAGGAALQLLQK	non			
E0SGF0	GALSAVVADSR	oui	48	400000	co-élué avec scout 7
E0SDV4	GGYFPVPPVDSAQDLR	non			
E0SJ78	IAAEGPWWER	oui	77.5	20000	co-élué avec scout 14
E0SK30	IEEDLLGTR	oui	54.2	400000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SIX1	IFTEDGVSIPVTVIEIANR	non			
E0SIA5	LELEISR	oui	54.2	30000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SLP9	LFHYGDGLAYLER	oui	88	15000	mauvaise assignation de groupe
E0SGF3	LLDLAAPDIIVR	oui	103.3	60000	co-élué avec scout 18
E0SKK2	LLITGGTGLIGR	oui	80.2	30000	mauvaise assignation de groupe
E0SFH2	LLTLQITLPADNLQQAQADAGK	non			
E0SKS4	LVAEQIEAAGGVAK	oui	58.9	6000	co-élué avec scout 11
E0SAY1	NIGSGLLPGASGFVSLK	non			
E0SJA9	NILLVTEYAR	oui	82.6	10000	proche scout : mauvaise assignation de groupe
E0SMZ2	NVGPAGLTLVIVR	oui	95.7	20000	co-élué avec scout 10
E0SFK8	SNWTDQQQAGEASAPTIEVDALR	non			
E0SEW8	SSQAALDLLK	non			
E0SFR7	TPQAAVFK	non			
E0SIE8	TTIDILLR	oui	81.1	150000	mauvaise assignation de groupe
E0SHF6	TVGTQVDDGTLEVR	oui	51.2	20000	co-élué avec scout 8
E0SKH9	VDVIVQALAGAR	oui	87.2	15000	co-élué avec scout 16
E0SH81	VGDVIVAVDPR	oui	59	8000	co-élué avec scout 11
	<b>Somme des peptides détectés</b>	<b>24</b>			

Tableau 13 : Résultats de l'analyse SRM des 40 peptides non détectés lors de l'analyse "Scout-SRM"

### 3.4.7. Résultats de quantification différentielle des protéines de la cinétique d'infection et interprétation biologique

Après avoir étudié les performances de la méthode ainsi que la qualité des données récoltées, nous avons réalisé une quantification différentielle de l'expression des protéines entre l'échantillon de référence (0H) et chacun des 3 jours de la cinétique d'infection (échantillons 24H, 48H et 72H). L'interprétation biologique des résultats a été réalisée, avec l'aide de Sébastien Bontemps-Gallo de l'Université Lille 1.

Seuls les peptides dont les CV entre les 3 réplicats techniques sont inférieurs à 20%, ont été sélectionnés pour la quantification. Dans l'objectif d'avoir une vue de l'expression des protéines entre les 4 conditions, la quantification différentielle finale a été réalisée sur les 361 protéines détectées par au moins un peptide à la fois dans l'échantillon de référence (0H) et dans les 3 points de cinétique d'infection (24H, 48H, 72H). Cela représente 81% des protéines initialement ciblées. La quantification a été réalisée comme décrit dans la partie 3.4.2 iii (Equation 9).

Les résultats de la quantification différentielle des 361 protéines, sont listés dans le Tableau 14. Les trois colonnes de droite donnent la mesure du ratio de l'abondance de la protéine dans l'échantillon sur l'abondance de la protéine dans l'échantillon de référence. Celui-ci représente variation de l'expression de la protéine entre la culture de référence et les 3 points de la cinétique d'infection, de l'inoculation (jour 1) à la visualisation des symptômes (jour 3).

Chaque protéine a ensuite été associée à son gène codant. Une annotation fonctionnelle a alors été effectuée, et a permis la mise en forme du Tableau 14. Ainsi, les 361 protéines quantifiées ont été ordonnées par fonctions biologiques. Pour cela, une classification biologique des protéines a été réalisée sur la base de leurs fonctions biologiques. Cette analyse bio-informatique, a été réalisée selon les voies KEEG<sup>167</sup> (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), <http://www.genome.jp/kegg/>. Les résultats montrent que 41% des protéines identifiées sont associées au métabolisme, 34% sont impliquées dans le traitement de l'information génétique, et 11% dans le transport.

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
Cellular Processes	Cell division & shape control	E0SB52	zipA	Cell division protein ZipA homolog	-0.7	-0.7	-0.6
		E0SG71	FtsZ	Cell division protein FtsZ	0.2	0.7	0.7
		E0SN74	yfgA	Cytoskeleton protein RodZ	0.4	0.7	0.3
		E0SD99	minD	Site-determining protein	-0.6	-0.6	-0.6
	Motility	G5DC24	fliC	Flagellin (Fragment)	8.9	12.5	10.8
	Chemotaxis	E0SIM0	cheZ	Protein phosphatase CheZ	0.1	0.2	0.0
		E0SIM2	cheB	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	0.1	0.8	0.2
		E0SIM5	cheW	Positive regulator of CheA protein activity (CheW)	2.5	1.7	2.4
		E0SIM6	cheA	Histidine kinase	0.2	0.8	0.3
		E0SIN3	Dda3937_02787	Methyl-accepting chemotaxis protein III (Ribose and galactose chemoreceptor protein)	-0.9	-0.9	-0.9
	Quorum sensing	E0SC68	luxS	S-ribosylhomocysteine lyase OS	-0.1	-0.4	-0.4
Regulatory protein	Response regulator	E0SMX5	lrp	DNA-binding protein transcriptional dual regulator, leucine-binding protein	0.8	0.6	0.6
		E0SH32	arcA	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with ArcB or CpxA	-0.2	-0.2	-0.3
		E0SDZ3	RscB	Transcriptional regulatory protein RcsB	-0.3	-0.3	-0.4
		E0SJT3	ompR	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with EnvZ	-0.3	-0.3	-0.5
	Others	E0SDE6	kdgR	DNA-binding transcriptional regulatory protein KdgR	0.0	-0.1	-0.2
		E0SFZ2	pspA	Regulatory protein for phage-shock-protein operon	-0.6	-0.5	-0.6
		E0SK68	Dda3937_00054	DNA-binding protein	1.4	2.0	1.4
		P42195	PecS	HTH-type transcriptional regulator PecS	1.9	2.2	1.8
		O53007	hns	DNA-binding protein OS=Dickeya chrysanthemi	-0.3	-0.2	-0.2
		E0SAK1	Dda3937_01751	DNA-binding protein	0.8	1.1	0.7
		E0SD72	hupB	HU, DNA-binding transcriptional regulator, beta subunit	-0.1	-0.3	-0.1
	E0SE41	cspE	DNA-binding transcriptional repressor	2.5	2.4	2.3	
	Carbohydrate metabolism	Glycolysis/gluc oneogenesis	E0SI38	pgi	Glucose-6-phosphate isomerase	1.5	1.7
E0SFM1			pfkA	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	0.1	0.2	0.3
E0SH50			fbaA	Fructose-bisphosphate aldolase, class II	-0.6	-0.5	-0.5
E0SFM5			tpiA	Triosephosphate isomerase	0.1	-0.2	-0.1
E0SBC1			gapA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.2	1.0	1.3
E0SH51			pgk	Phosphoglycerate kinase	0.4	0.2	0.3
E0SFQ4			gpmA	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	0.9	1.2	0.5
E0SDL4			eno	Enolase	0.5	1.2	0.6
E0SGT4			pykF	Pyruvate kinase	-0.1	0.0	-0.2
E0SB87			pykA	Pyruvate kinase	0.4	0.6	0.4
E0SG52			aceE	Pyruvate dehydrogenase E1 component	0.7	0.7	0.5
E0SG51			aceF	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	0.4	0.2	0.4
E0SG50			lpd	Dihydrolipoyl dehydrogenase	-0.3	-0.5	-0.3
E0SBD8			adhE	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	-0.8	-0.8	-0.8
E0SM26			adhC	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	2.2	2.2	2.1

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)			
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3	
Energy metabolism	TCA cycle	E0SEB2	yiaY	Alcohol dehydrogenase	2.0	4.2	2.5	
		E0SEY9	gltA	Citrate synthase	-0.1	-0.3	-0.1	
		E0SG17	acnA	Aconitate hydratase	-0.5	-0.7	-0.5	
		E0SFF8	acnB	Aconitate hydratase B	-0.4	-0.5	-0.5	
		E0SDF2	icd	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	-0.2	0.0	0.0	
		E0SEZ4	sucA	2-oxoglutarate decarboxylase, thiamin-requiring	-0.2	-0.2	-0.2	
		E0SEZ5	sucB	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	-0.2	-0.1	-0.3	
		E0SEZ6	sucC	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	0.0	0.0	-0.2	
		E0SEZ7	sucD	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	0.1	0.4	0.0	
		E0SC00	fumC	Fumarate hydratase class II	0.8	1.7	1.2	
		E0SKW1	mdh	Malate dehydrogenase	0.1	0.2	0.0	
	Pentose phosphate pathway	E0SNB0	tkrA	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	-0.1	0.0	-0.1	
		E0SFS1	ybhE	6-phosphogluconolactonase	-0.3	-0.3	-0.3	
		E0SKZ6	deoB	Phosphopentomutase	-0.7	-0.6	-0.6	
		E0SFV4	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1.7	1.6	1.6	
		E0SCL7	prsA	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	-0.3	-0.1	-0.1	
		E0SB19	talA	Transaldolase	-0.2	-0.2	-0.3	
		E0SH26	talB	Transaldolase	0.6	0.6	0.6	
	Pyruvate metabolism	E0SMY9	pflB	Pyruvate formate lyase I	1.3	1.7	1.2	
		E0SB20	maeB	NADP-linked malic enzyme	-0.7	-0.6	-0.7	
		E0SG26	gloA	Lactoylglutathione lyase	-0.6	-0.6	-0.6	
		E0SKJ7	pta	Phosphate acetyltransferase	2.6	3.6	2.3	
	Others	E0SJ78	tam	Trans-aconitate 2-methyltransferase	0.0	-0.2	-0.2	
		E0SI61	dkgA	2,5-diketo-D-gluconate reductase A	-0.9	-0.9	-0.9	
		E0SCV4	lpcA	Phosphoheptose isomerase	-0.3	-0.5	-0.3	
	Energy metabolism	Oxidative phosphorylation	E0SKC6	Dda3937_01851	NADPH:quinone oxidoreductase	-0.8	-0.8	-0.7
			E0SKH9	nuoG	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain G	-0.4	-0.5	-0.5
E0SKI2			nuoC	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	0.2	0.2	0.1	
E0SEZ2			sdhA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-0.2	-0.1	-0.2	
E0SEZ3			sdhB	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-0.5	-0.4	-0.5	
E0SDS1			atpD	ATP synthase subunit beta	-0.2	-0.3	-0.2	
E0SDS2			atpG	ATP synthase gamma chain	-0.3	-0.3	-0.3	
E0SDS3			atpA	ATP synthase subunit alpha	-0.5	-0.5	-0.6	
E0SDS4			atpH	ATP synthase subunit delta	-0.6	-0.6	-0.7	
E0SDS5			atpF	ATP synthase subunit b	-0.7	-0.6	-0.7	
E0SDP5			ppa	Inorganic pyrophosphatase	0.4	0.2	0.6	
E0SIN8			cybC	Soluble cytochrome b562	-0.9	-0.9	-0.9	
E0SAT2			Dda3937_00011	FMN oxidoreductase	8.9	12.9	7.6	
E0SCK7			pntA	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	2.3	2.5	3.0	
Lipid metabolism	Fatty acid metabolism	E0SLG7	fadB	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	-1.0	-1.0	-1.0	
		E0SHQ1	fabD	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	0.1	0.4	0.1	
		E0SLA1	fabB	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	0.1	0.0	0.0	

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
		E0SL89	accD	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	-0.2	0.1	-0.2
		E0SCE5	accA	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	0.2	0.3	0.2
		E0SH95	accC	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	0.5	0.4	0.4
		E0SH96	accB	Acetyl CoA carboxylase, BCCP subunit	0.0	0.2	-0.1
		E0SHP8	fabF	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	-0.1	-0.3	-0.2
		E0SHQ0	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	0.9	1.0	0.8
		E0SHT4	fabA	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	0.0	-0.2	-0.2
		E0SG00	fabI	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	-0.1	0.5	0.0
		E0SHP9	acpP	Acyl carrier protein	0.2	0.1	0.1
Nucleotide metabolism		Q93KA5	galU	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-0.3	-0.2	-0.3
		E0SHP0	hinT	Purine nucleoside phosphoramidase	0.4	0.3	0.3
		E0SDL5	pyrG	CTP synthase	0.1	0.0	-0.1
		E0SGD3	sthA	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	-0.6	-0.7	-0.5
		E0SN63	guaA	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	-0.2	0.0	-0.4
		E0SN64	guaB	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2.6	2.6	2.5
		E0SKP1	Dda3937_00284	Adenylosuccinate lyase	2.8	3.2	3.6
		E0SN77	ndk	Nucleoside diphosphate kinase	-0.4	-0.6	-0.4
		E0SMZ4	cmk	Cytidylate kinase	0.0	0.3	0.0
		E0SLJ0	udp	Uridine phosphorylase	-0.8	-0.8	-0.6
		E0SCU8	gpt	Xanthine phosphoribosyltransferase	1.5	0.8	1.5
		E0SDX1	adk	Adenylate kinase	-0.4	-0.3	-0.4
		E0SE21	upp	Uracil phosphoribosyltransferase	-0.4	-0.5	-0.6
Amino acid metabolism		E0SG93	leuA	2-isopropylmalate synthase	17.4	19.3	20.2
		E0SG94	leuB	3-isopropylmalate dehydrogenase	3.6	7.7	4.0
		E0SG95	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	2.5	3.6	2.8
		E0SG96	leuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	1.3	3.6	2.2
		E0SGX4	aspC	Aspartate transaminase	3.9	4.3	3.9
		E0SB50	cysK	Cysteine synthase	2.8	4.2	4.1
		E0SE30	purC	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	1.3	1.6	1.9
		E0SH66	purA	Adenylosuccinate synthetase	0.0	0.0	0.0
		E0SLI5	argB	Acetylglutamate kinase	0.5	0.3	0.3
		P0C1A1	agrG	Argininosuccinate synthase	0.2	0.3	0.3
		E0SDR7	glmS	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	0.2	0.2	0.3
		E0SH07	carB	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)	1.9	1.3	2.0
		E0SLJ2	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	7.2	8.3	7.5
		E0SK30	aspA	Aspartate ammonia-lyase	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SJW2	asd	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	1.8	2.1	1.9
		E0SKR9	ilvC	Ketol-acid reductoisomerase	1.8	2.0	2.4
		E0SKS4	ilvD	Dihydroxy-acid dehydratase	4.6	4.9	4.3
E0SKS5	ilvE	Branched-chain amino-acid aminotransferase	3.3	4.5	3.4		

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)			
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3	
		E0SH09	dapB	4-hydroxy-tetrahydronicotinate reductase	-0.1	-0.2	-0.1	
		E0SG89	ilvH	Acetolactate synthase III, thiamin-dependent, small subunit	1.6	1.4	1.2	
		E0SG98	tnaA	Tryptophanase	0.1	-0.1	0.1	
		E0SAY8	glyA	Serine hydroxymethyltransferase	2.1	3.2	1.9	
		E0SCC6	dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	0.4	0.4	0.7	
		E0SDV4	glnA	Glutamine synthetase	5.5	3.0	4.3	
		E0SDJ7	cysN	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	12.2	11.4	11.8	
		E0SDK2	cysJ	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	11.4	11.3	10.7	
Glycan metabolism	Lipopolysaccharide biosynthesis	E0SLK4	rfaD	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	-0.6	-0.5	-0.5	
		E0SEU6	rlpB	LPS-assembly lipoprotein LptE	0.0	0.0	-0.2	
	Peptidoglycan biosynthesis	E0SET8	dacA	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	0.3	0.2	0.2	
		E0SMT7	dacC	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	-0.7	-0.6	-0.7	
		E0SGT5	lpp	Murein lipoprotein	0.6	0.3	0.5	
	Periplasmic Glucans biosynthesis	Q9F495	opgH	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H	0.2	0.2	0.5	
		Q9F496	opgG	Glucans biosynthesis protein G	-0.1	-0.1	0.0	
	Others	E0SFV2	galF	Predicted regulatory subunit of UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase, with GalU	-0.6	-0.6	-0.6	
		E0SM64	ganB	Beta-galactosidase	-0.9	-0.9	-0.9	
		E0SM65	ganA	Arabinogalactan endo-beta-1,4-galactanase	-1.0	-1.0	-1.0	
		E0SFR1	galK	Galactokinase	0.0	-0.3	-0.2	
		E0SJV3	glpD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.2	0.1	0.1	
		Q05528	kduD	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase	1.9	2.1	1.7	
		P38448	eda	KHG/KDPG aldolase	1.2	0.9	0.6	
		E0SNF0	prlC	Oligopeptidase A	1.0	0.8	0.6	
		E0SHT8	spiX	Galactose-6-phosphate isomerase LacB subunit	1.5	1.0	1.2	
		E0SH80	cpsG	Phosphomannomutase	1.8	2.0	2.3	
		E0SH81	gmd	GDP-mannose 4,6-dehydratase	0.3	0.5	0.3	
Others metabolism		Vitamins metabolism	E0SLH5	Dda3937_02069	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	1.7	2.0	2.0
			E0SMZ2	serC	Phosphoserine aminotransferase	1.3	1.2	2.2
	Others	E0SD43	ribE	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	0.3	0.3	0.3	
		E0SDD5	nadE	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	0.3	0.7	0.6	
		E0SN66	prt1	Extracellular metalloprotease	-0.2	-0.4	-0.3	
		E0SDN6	rfaE	Bifunctional protein HldE	-0.5	-0.3	-0.5	
		E0SJU0	gntY	Fe/S biogenesis protein NfuA	0.4	0.4	0.3	
		E0SLP5	gcvP	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	-0.6	-0.6	-0.6	
		E0SH53	tktA	Transketolase	0.4	0.5	0.4	
		E0SC83	Dda3937_03162	2,3-butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (R)-acetoin-specific / Acetoin (Diacetyl) reductase	15.3	21.3	17.1	
		E0SFN0	glpk	Glycerol kinase	-0.8	-0.8	-0.9	
		E0SDM1	garR	Tartronate semialdehyde reductase (TSAR)	-0.7	-0.4	-0.4	
		E0SD29	Dda3937_01942	Methionine synthase II (Cobalamin-independent)	41.1	49.5	39.7	
Info	Transcription	E0SGF2	rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	-0.1	0.2	-0.1	



Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
Translation		E0SGF3	rpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0.1	-0.4	-0.3
		E0SIU6	ropA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0.5	0.3	0.5
		E0SKV6	rpoD	RNA polymerase sigma factor RpoD	-0.4	-0.4	-0.5
		E0SD44	nusB	N utilization substance protein B homolog	0.4	0.1	0.1
		E0SKQ8	rho	Transcription termination factor Rho	0.2	0.1	0.3
		E0SKY0	nusA	Transcription termination/antitermination protein NusA	0.0	-0.4	0.0
		E0SKY1	infB	Translation initiation factor IF-2	0.7	0.0	0.4
		E0SKX1	greA	Transcription elongation factor GreA	0.1	0.2	0.1
		E0SKY5	pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	-0.2	0.2	-0.1
		Q93KA9	yfiF	YfiF protein	-0.5	-0.5	-0.5
		E0SD22	yaiD	Recombination-associated protein RdgC	0.0	0.0	0.1
		E0SAU9	argS	Arginine--tRNA ligase	-0.5	-0.3	-0.3
		E0SAW1	aspS	Aspartyl-tRNA synthetase	0.1	0.2	0.2
		E0SBI6	gltX	Glutamate--tRNA ligase	1.0	0.5	1.2
		P37984	pheT	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	1.3	1.3	1.3
		E0SDE0	pheS	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	-0.1	0.4	0.0
		E0SEU7	leuS	Leucine--tRNA ligase	0.4	0.8	0.5
		E0SFS5	metG	Methionine--tRNA ligase	1.4	1.5	1.3
		E0SG20	tyrS	Tyrosine--tRNA ligase	-0.3	0.4	0.0
		E0SGW7	asnS	Asparagine--tRNA ligase	1.4	1.6	1.5
		E0SH14	ileS	Isoleucine--tRNA ligase	0.3	0.4	0.4
		E0SIA5	valS	Valine--tRNA ligase	-0.2	0.0	-0.1
		E0SJR1	trpS	Tryptophan--tRNA ligase	-0.2	-0.2	-0.2
		E0SLQ9	lysS	Lysine--tRNA ligase	0.6	0.6	0.5
		E0SC61	rplS	50S ribosomal protein L19	2.0	1.9	1.8
		E0SC64	rpsP	30S ribosomal protein S16	1.8	1.3	1.8
		E0SCC9	rpsB	30S ribosomal protein S2	-0.3	-0.2	-0.4
		E0SDE1	rplT	50S ribosomal protein L20	2.1	1.1	2.0
		E0SED6	rplI	50S ribosomal protein L9	0.0	0.2	0.1
		E0SED7	rpsR	30S ribosomal protein S18	-0.1	-0.1	-0.1
		E0SED9	rpsF	30S ribosomal protein S6	0.8	0.4	1.0
		E0SGE8	rplK	50S ribosomal protein L11	0.5	0.8	0.8
		E0SGE9	rplA	50S ribosomal protein L1	0.1	0.6	0.0
	E0SGF0	rplJ	50S ribosomal protein L10	0.6	0.8	0.6	
	E0SGF1	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	0.1	0.3	0.0	
	E0SHQ4	rpmF	50S ribosomal protein L32	0.4	-0.2	0.9	
	E0SIU5	rplQ	50S ribosomal protein L17	2.5	1.7	2.4	
	E0SIU7	rpsD	30S ribosomal protein S4	1.1	0.6	1.2	
	E0SIU8	rpsK	30S ribosomal protein S11	0.3	0.4	0.3	
	E0SIU9	rpsM	30S ribosomal protein S13	0.8	0.9	1.0	
	E0SIV2	rplO	50S ribosomal protein L15	1.4	1.1	1.1	
	E0SIV4	rpsE	30S ribosomal protein S5	0.4	0.1	0.3	

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
		E0SIV5	rplR	50S ribosomal protein L18	0.8	0.6	0.9
		E0SIV6	rplF	50S ribosomal protein L6	0.6	0.3	0.2
		E0SIW4	rplP	50S ribosomal protein L16	1.0	1.0	0.9
		E0SIW7	rpsS	30S ribosomal protein S19	1.0	0.4	0.9
		E0SIW0	rplX	50S ribosomal protein L24	2.1	1.0	2.2
		E0SIW1	rplN	50S ribosomal protein L14	1.0	0.7	1.2
		E0SIW3	rpmC	50S ribosomal protein L29	0.6	0.5	0.8
		E0SIW5	rpsC	30S ribosomal protein S3	0.2	0.2	0.0
		E0SIW6	rplV	50S ribosomal protein L22	0.2	0.1	0.3
		E0SIW9	rplW	50S ribosomal protein L23	0.6	1.0	1.0
		E0SIX0	rplD	50S ribosomal protein L4	2.1	1.3	1.9
		E0SIX2	rpsJ	30S ribosomal protein S10	1.1	0.8	0.9
		E0SIX7	rpsG	30S ribosomal protein S7	0.5	-0.1	0.3
		E0SKV8	rpsU	30S ribosomal protein S21	0.4	0.5	0.2
		P37985	rpsA	30S ribosomal protein S1	0.3	0.2	0.0
		E0SCM3	ychF	Ribosome-binding ATPase YchF	0.2	0.1	0.0
		E0SKY2	rbfA	Ribosome-binding factor A	0.8	0.6	0.4
		E0SGE5	tufB	Elongation factor Tu	-0.4	-0.5	-0.4
		E0SCD0	tsf	Elongation factor Ts	0.5	0.5	0.5
		E0SIX6	fusA	Elongation factor G	-0.1	-0.2	-0.2
		E0SHQ9	rne	Ribonuclease E	-0.1	0.2	-0.2
		E0SEE7	mrn	Ribonuclease R	-0.2	0.0	-0.2
		E0SLQ8	prfB	Peptide chain release factor 2	-0.1	0.0	-0.1
		E0SKR0	rhlB	ATP-dependent RNA helicase RhlB	-0.3	-0.3	-0.3
		E0SLM4	rplH	Ribonuclease PH	-0.4	-0.4	-0.5
		E0SFN4	rraA	Regulator of ribonuclease activity A	0.9	0.5	0.9
		E0SDE3	infC	Translation initiation factor IF-3	0.3	-0.2	-0.1
	Folding, sorting and degradation	E0SC47	clpB	Chaperone protein ClpB	2.6	2.8	2.4
		E0SCD8	hlpA	Chaperone protein skp	0.8	0.8	0.8
		E0SDX0	htpG	Chaperone protein HtpG	1.6	2.3	1.3
		E0SEQ4	ibpB	Heat shock chaperone	3.8	4.6	3.8
		E0SB15	grpE	Protein GrpE	-0.2	0.4	-0.1
		E0SH19	dnaJ	Chaperone protein DnaJ	1.0	1.5	0.9
		E0SH20	dnaK	Chaperone protein DnaK	0.4	0.4	0.4
		E0SK32	groS	10 kDa chaperonin	0.9	1.3	0.9
		E0SK33	groL	60 kDa chaperonin	0.8	0.7	0.9
		E0SMW9	clpA	ATPase and specificity subunit of ClpA-ClpP ATP-dependent serine protease, chaperone activity	2.6	2.6	3.1
		E0SL49	Dda3937_02464	Small heat shock protein	15.9	12.2	14.9
		E0SD68	tig	Trigger factor	1.1	1.0	0.7
		E0SF07	proQ	RNA chaperone ProQ	0.8	0.5	0.7
		E0SD70	clpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	2.6	2.9	2.7
		E0SHD8	degQ	Protease	-0.4	-0.5	-0.3

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
al Infor mati on		E0SFN6	hslU	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	1.2	1.7	1.5
		E0SD71	lon	Lon protease	1.1	1.2	1.0
		E0SLG6	pepQ	Xaa-Pro dipeptidase	-0.1	0.1	0.2
		E0SKK1	yfcG	Maleylacetoacetate isomerase / Glutathione S-transferase	0.4	0.5	0.6
		E0SJ70	pepP	Proline aminopeptidase P II	0.6	0.7	0.6
		E0SIY6	fkpA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-0.4	-0.1	-0.1
		E0SIA7	pepA	Probable cytosol aminopeptidase	-0.7	-0.7	-0.6
		E0SI88	yjgF	Ketoacid-binding protein	0.6	0.3	0.5
		E0SH68	hflC	Protein HflC	-0.6	-0.6	-0.5
		E0SH69	hflK	Modulator for HflB protease specific for phage lambda cII repressor	0.0	-0.3	0.0
	Detoxification	Q937L1	sodA	Superoxide dismutase (Fragment)	1.8	1.8	1.7
		P52234	dsbA	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	-0.4	-0.6	-0.4
		E0SN31	yajO	Oxidoreductase	0.4	0.2	0.0
		E0SMX4	trxB	Thioredoxin reductase	0.4	0.0	0.7
		E0SN84	sodA	Superoxide dismutase	0.8	1.2	1.2
		E0SL75	Dda3937_01236	Oxidoreductase	-0.1	0.1	-0.3
		A5JMQ6	icdA	Isocitrate dehydrogenase (Fragment)	-0.2	-0.2	-0.4
		E0SL36	dps	DNA protection during starvation protein	0.8	0.1	1.1
		E0SKU6	spy	Putative periplasmic spheroblast formation protein	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SJY7	ahpC	Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit	37.2	55.6	53.2
		E0SI62	yqhD	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	0.4	0.8	0.3
		E0SHH0	katG	Catalase-peroxidase	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SH44	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	5.4	6.3	5.1
		E0SGY3	btuE	Glutathione peroxidase	0.0	0.4	0.2
		E0SGJ9	Dda3937_00844	Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase	-0.1	-0.4	-0.1
		E0SGJ3	yahK	Predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding protein	-0.5	-0.4	-0.4
		E0SFX4	tpx	Probable thiol peroxidase	0.2	0.1	0.2
		E0SG28	grxD	Glutaredoxin	-0.3	0.0	-0.1
		E0SBC7	ydjA	Predicted oxidoreductase	-0.6	-0.5	-0.6
		E0SBZ2	ydjJ	Predicted oxidoreductase	-0.9	-0.8	-0.9
		E0SC08	ydfG	NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	1.2	0.8	1.5
		E0SC36	ytfG	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	-0.3	-0.1	-0.4
		E0SD32	tsaA	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein	0.3	0.0	0.5
E0SEA5	Dda3937_04603	Glutathione S-transferase	-0.3	-0.5	-0.4		
Replication and repair	P37982	ihfA	Integration host factor subunit alpha	-0.5	-0.5	-0.5	
	E0SC75	recA	Protein RecA	-0.1	0.2	-0.1	
	E0SDZ1	gyrA	DNA gyrase subunit A	0.1	0.0	0.1	
	E0SFA5	ssb	Single-stranded DNA-binding protein	-0.1	-0.1	0.0	
transport	E0SB46	crr	Glucose-specific enzyme IIA component of PTS	-0.3	-0.3	-0.4	
	E0SB47	ptsl	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	-0.4	-0.2	-0.5	

Classification	Rôle	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
		E0SD92	acrA	Acridine resistance protein A Probable RND efflux membrane fusion protein	0.4	0.4	0.7
		E0SEU9	gltL	ATP-binding component of an ABC superfamily glutamate/aspartate transporter	-0.8	-0.9	-0.9
		E0SFR7	modA	Molybdate transporter subunit periplasmic-binding component of ABC superfamily	5.4	6.5	6.3
		E0SM05	fruB	IIA and HPr components of fructose-specific PTS enzyme	0.1	-0.1	-0.1
		E0SN89	mtlA	PTS system, mannitol-specific IIC component / PTS system, mannitol-specific IIB component / PTS system, mannitol-specific IIA component	-0.6	-0.7	-0.7
		E0SBJ2	sbp	Sulfate transporter subunit periplasmic-binding component of ABC superfamily	4.6	5.4	6.0
		E0SDU0	rbsB	Periplasmic-binding component of an ABC superfamily D-ribose transporter	-0.6	-0.5	-0.6
		E0SEQ9	dppA	Dipeptide ABC transporter, periplasmic component	-0.7	-0.7	-0.7
		E0SEV2	gltI	Periplasmic-binding component of an ABC superfamily glutamate/aspartate transporter	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SFS3	Dda3937_03937	Putative sugar ABC transporter	47.1	41.8	43.8
		E0SH40	yjyK	ABC transporter ATP-binding protein yjyK	-0.8	-0.8	-0.8
		E0SJ64	Dda3937_03671	ABC-type transporter, periplasmic component	11.5	8.7	14.6
		E0SKB0	sfuA	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein	0.3	-0.3	0.0
		E0SKB2	sfuC	Fe(3+) ions import ATP-binding protein FbpC	0.0	-0.2	-0.2
		E0SKN9	Dda3937_00286	Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding portion	2.0	2.1	1.9
		E0SL34	glnH	Glutamine transporter subunit periplasmic binding component of ABC superfamily	-0.8	-0.8	-0.8
		E0SMT2	Dda3937_03491	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	3.0	2.4	3.1
		E0SBE2	oppA	Oligopeptide transport periplasmic binding protein	-0.7	-0.7	-0.6
		E0SGQ2	efeO	Component of a tripartite ferrous iron transporter	5.4	5.5	6.5
		E0SI50	tolC	Transport channel	2.0	1.6	2.3
		E0SM68	ganE	Periplasmic binding protein of galactan transport system	-1.0	-1.0	-1.0
		E0SM69	ganK	ATP-binding component of transport system for galactan	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SMU7	potF	Putrescine-binding periplasmic protein	-0.7	-0.7	-0.8
		E0SLT6	Dda3937_02266	Molybdate-binding domain of ModE	1.9	1.5	2.0
		E0SIE9	acr	TonB-dependent receptor	7.9	9.0	10.8
		Q93KB7	togB	Periplasmic binding protein	-0.8	-0.9	-0.8
		E0SG67	secA	Protein translocase subunit SecA	-0.3	-0.1	0.1
		E0SDP8	Dda3937_01092	Cystine-binding protein	22.8	33.9	29.0
		E0SDQ3	pstS	Phosphate-binding protein PstS	-0.8	-0.8	-0.8
	Outer membrane protein	E0SCD7	yaeT	Outer membrane protein assembly factor BamA	0.2	0.2	0.0
		E0SG23	slyB	Outer membrane lipoprotein	-0.2	-0.4	-0.4
		E0SGW8	ompF	Outer membrane porin 1a (labF)	-0.7	-0.7	-0.6
		E0SN28	ompA	Outer membrane protein A (3all*Gd)	0.2	-0.1	0.0
		E0SN70	yfgL	Outer membrane protein assembly factor BamB	0.4	0.2	0.4
		Q934G6	tolB	Protein TolB	0.2	0.6	0.3
	Iron binding	E0SIT8	def	Peptide deformylase	-0.2	-0.2	-0.4

Classification	Rôle and storage	N° Accession	Gène	Nom de la protéine	Fold Change (FC)		
					24 H jour 1	48 H jour 2	72 H jour 3
Unknown function		E0SAX8	iscR	HTH-type transcriptional regulator IscR	-0.4	-0.4	-0.3
		E0SIX3	bfr	Bacterioferritin	-0.9	-0.9	-0.9
		E0SB54	yqiC	Conserved protein	-0.1	-0.1	-0.1
		E0SBB7	yeaG	Conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	-0.4	-0.6	-0.5
		E0SBC0	yeaD	Conserved protein	1.0	1.4	1.0
		E0SCC0	ygdH	Conserved protein	0.0	0.1	-0.1
		Q934G5	pal	Peptidoglycan-associated lipoprotein	0.5	0.4	0.4
		Q84EZ6	meh	Metallo hydrolase	-0.8	-0.9	-0.8
		E0SMZ1	ycaO	Conserved protein	0.2	-0.1	0.5
		E0SLG1	yifE	Conserved protein	-0.6	-0.5	-0.5
		E0SMC8	yicC	Conserved protein	-0.2	-0.1	-0.2
		E0SLC4	vacJ	Predicted lipoprotein	-0.5	-0.5	-0.5
		E0SL29	Dda3937_02890	Putative phosphatase	-0.7	-0.8	-0.7
		E0SJW8	yhhW	Uncharacterized protein, gene yhhW	0.2	0.4	0.1
		E0SH47	yggE	Conserved protein	-0.3	-0.3	-0.5
		E0SE86	Dda3937_00633	Predicted hydrolase	-0.2	-0.4	-0.2
		E0SHF6	yraP	Uncharacterized protein	-0.8	-0.8	-0.8
		E0SHR0	yneC	Uncharacterized protein	3.9	3.1	3.6
		E0SHR5	yceI	UPF0312 protein	3.8	4.6	4.6
		E0SKI8	yfbQ	Predicted aminotransferase	0.6	0.8	0.8
		E0SKN4	hemX	Predicted uroporphyrinogen III methylase	0.0	-0.2	0.0
		E0SKN5	hemY	Predicted protoheme IX synthesis protein	-0.5	-0.5	-0.5
		E0SBZ4	Dda3937_00605	Putative exported protein	-0.7	-0.7	-0.7
		E0SCK5	uspE	Stress-induced protein	-0.4	-0.4	-0.4
		E0SED3	fkIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-0.1	0.0	0.0
		E0SET0	yhjJ	Predicted zinc-dependent peptidase	-0.7	-0.8	-0.7
		E0SKJ2	yfbU	UPF0304 protein Dda3937_04023	-0.8	-0.8	-0.8
		E0SHW9	wbeA	WbeA	-0.1	-0.4	0.1
		E0SHE6	sspA	Stringent starvation protein A	0.0	0.0	-0.1
		E0SHB6	yjgA	UPF0307 protein	0.4	0.2	0.2
		E0SHB7	pmbA	Predicted peptidase required for the maturation and secretion of the antibiotic peptide MccB17	-0.3	0.0	0.2
		E0SFF7	yacl	UPF0231 protein	-0.5	-0.7	-0.5
		E0SF05	Dda3937_03784	Peptide chain release factor RF-3	2.4	4.3	3.7
		E0SED0	cpdB	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	0.0	-0.2	-0.2
		E0SDX4	ushA	UDP-sugar hydrolase 5'-nucleotidase	0.3	0.0	0.3
		E0SDV6	yihX	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	0.5	0.5	0.8
	E0SDV5	bipA	GTP-binding protein	1.2	0.9	1.1	
	E0SDN8	ygiF	Predicted adenylate cyclase	-0.4	-0.5	-0.5	
	E0SDI4	metQ	Lipoprotein	1.8	2.0	2.2	
	E0SD74	ppiD	Peptidylprolyl isomerase	0.4	0.6	0.5	
	E0SCC5	yaeH	UPF0325 protein	-0.4	-0.6	-0.3	

Tableau 14 : Classification par fonction biologique des 361 protéines de *Dickeya-dadantii* quantifiées par la méthode "Scout-SRM"

Nous avons ainsi pu déterminer une liste de 120 protéines régulées ( $FC \geq 1$  ou  $FC \leq -0,5$ ), dont 56 d'entre elles sont sous-exprimées ( $FC \leq -0,5$ ) et 64 d'entre elles sont sur-exprimées ( $FC \geq 1$ ).

Le nombre de protéines régulées est du même ordre de grandeur que celui mesuré à partir de l'analyse non ciblée, mettant en évidence les mêmes voies biologiques. Les résultats de quantification ciblée ont globalement permis d'homogénéiser les fluctuations au sein des catégories fonctionnelles.

De plus, toujours par rapport à l'analyse de protéomique globale, la quantification différentielle réalisée à partir des données ciblées a permis de mettre en évidence 2 protéines sur-exprimées de manière très importante ( $FC > 2$ ). Il s'agit des protéines codées par les gènes *PecS* et *fliC*. Le premier est un gène régulateur majeur de la transcription de gènes de virulence, alors que le second est impliqué dans la motilité de la bactérie.

L'analyse ciblée a en revanche mis en évidence un nombre moins important de protéines sous-exprimées durant la cinétique d'infection, que par l'analyse DDA. Pour certaines protéines, cela peut s'expliquer par le fait qu'elles n'ont été identifiées que dans l'échantillon de référence, rendant difficile l'intégration de leurs peptides rapporteur dans les échantillons exposés sur endives.

Afin de survivre aux défenses de la plante et de s'adapter au changement des conditions environnementales, *Dickeya dadantii* modifie son métabolisme pour tenir compte, par exemple, des variations de la disponibilité des nutriments. Beaucoup d'études *in vitro* ont été menées afin de mettre en évidence les gènes impliqués au cours du processus infectieux et de la virulence. Nous avons donc choisi de représenter une vue plus spécifique des variations de l'expression des protéines codées par ces gènes, 202 protéines ont alors été conservées. La Figure 47, représente l'abondance de ces protéines, durant la cinétique d'infection des feuilles d'endives. Les protéines sont représentées par fonctions biologiques, de même que dans le Tableau 14.

L'interprétation des données biologiques proposée met en relation les résultats obtenus avec des études génomiques et transcriptomiques.

De précédentes études ont montré que le chemotaxis (processus cellulaire qui perçoit les concentrations de certaines molécules et contrôle les déplacements de la bactéries vers les nutriments) et la motilité sont deux fonctions nécessaires au pathogène afin de détecter les sites d'entrée dans la plante, y pénétrer et s'y propager<sup>168</sup>. Les résultats montrent que les protéines impliquées dans la chimiotaxie et la mobilité sont sur-exprimées au cours du cycle infectieux. Seule une partie du complexe formant le senseur (protéine codée par le gène *Chew*), est fortement régulée dès le jour 1. L'histidine kinase ainsi que le régulateur de transcription, respectivement codés par les gènes *CheA* et *CheB*, sont eux sur-exprimés à partir de 48H d'infection. L'augmentation de la flagelline, codée par le gène *fliC*, confirme l'importance de la motilité dans la virulence de *Dickeya dadantii*<sup>168</sup>.

Pour soutenir le processus d'infection et la division cellulaire, le transport des nutriments est restructuré au sein de la bactérie. Les protéines transporteurs de peptides sont sur-exprimées afin de permettre l'augmentation des processus de traduction, tout au long du cycle infectieux. En revanche, seules quelques protéines transporteur d'acides aminés sont régulées.

Le métabolisme des acides aminés a, quant à lui, été fortement activé du premier au troisième jour.

Le transport des sucres n'est pas induit au cours du processus d'infection. Le glucose étant abondant dans la plante, la bactérie l'utilise comme source de carbones principale, et ne modifie pas son métabolisme des sucres<sup>169</sup>. Les enzymes glycolytiques ont été partiellement sur-exprimées, c'est le cas des protéines codées par les gènes *Pgi*, *GaPa*, *GPMA* et *Eno*. Ceci, alors que la protéine codée par le gène *FabA* a été sous-exprimée au cours du processus d'infection. Ces résultats suivent des tendances observées dans des études sur l'effet du stress oxydatif sur le métabolisme central de la bactérie<sup>170</sup>.

Le métabolisme du pyruvate, observable *via* l'enzyme codée par le gène *Pta*, a lui été modifié dans le but de synthétiser un composé retrouvé dans les tissus macérés (sur-expression de la protéine codée par le gène *BudC*).

Enfin, une réponse complexe globale a lieu pour répondre au stress général subi par la bactérie et protéger la synthèse de nouvelles protéines. Cela s'observe notamment par la sur-expression de protéines chaperonnes, (entre autres celles codées par les gènes *ABF-18307*, *HtpG*, *IbpB*), ainsi que des protéases dégradant les protéines mal repliées (protéines codées par *ClpX* et *ClpA*).

L'ADN bactérien ne semble pas s'être endommagé au cours du cycle d'infection, les protéines marqueurs de ces dommages ne sont pas régulées. Néanmoins, une réponse spécifique au stress oxydatif a également été observée par la forte augmentation de l'expression de la protéine réductase (codée par le gène *AhpCF*), impliquée dans la dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène. Enfin, un système de pompe à efflux a également été sur-exprimé (protéine codée par le gène *TolC*), afin que la bactérie puisse résister aux toxines végétales.

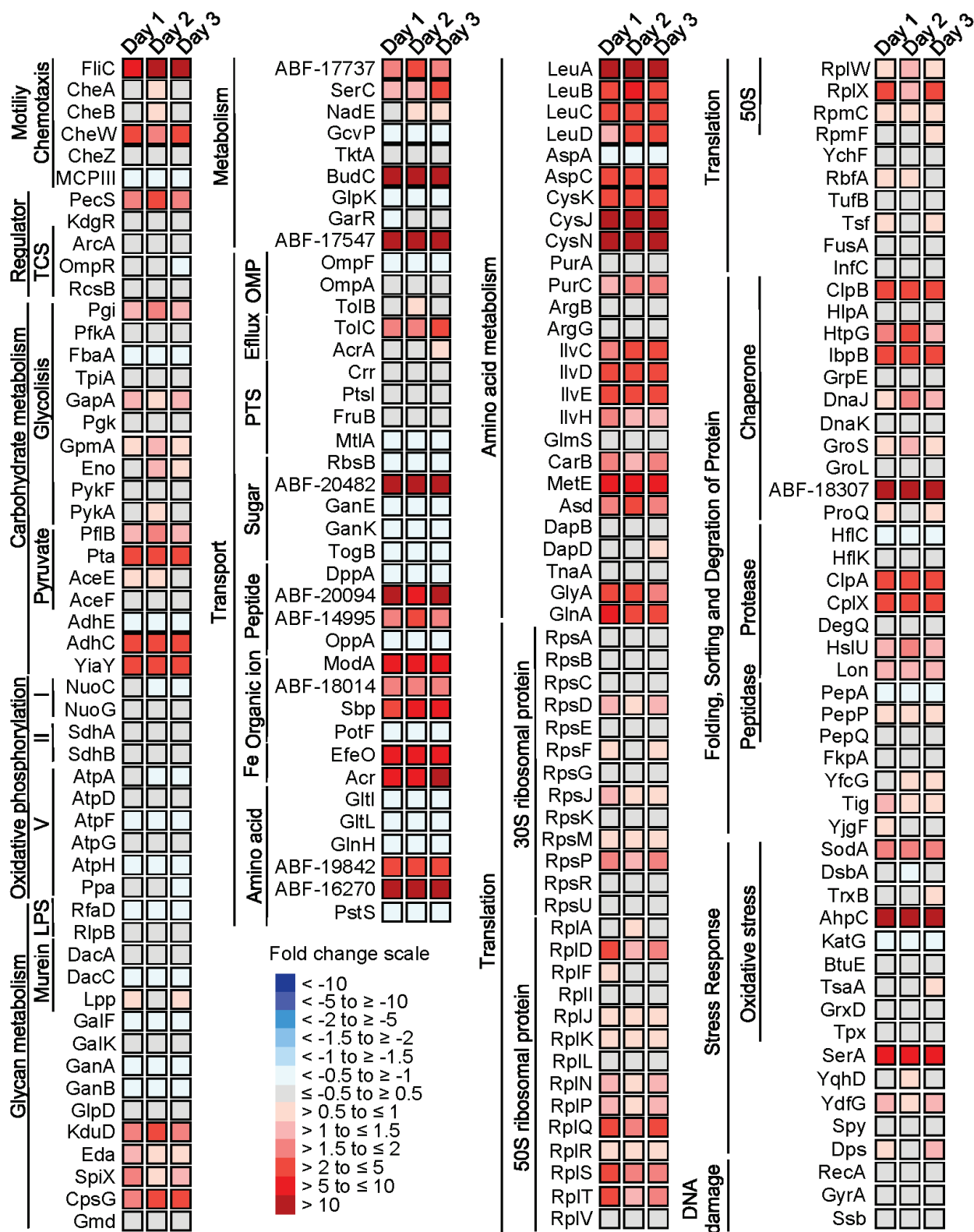




Figure 47 : Heat map représentant l'abondance de 202 protéines de *Dickeya dadantii* pendant l'infection d'une plante, mesurée par "Scout-SRM"

Légende : TCS: two-component system, OMP: Outer membrane protein, PTS: Phosphotransferase system, Fe: Fer.

### 3.4.8. Conclusions et perspectives sur la preuve de concept réalisée

Ce travail est la première preuve de faisabilité du concept « Scout-SRM » pour l'analyse multiplexée de plusieurs centaines de protéines en matrice complexe. Celui-ci a pu être réalisé grâce au développement d'une méthodologie de travail permettant de construire une méthode « Scout-SRM » à partir de bibliothèques de peptides et protéines générées sur un système LC-MS/MS différent. Celle-ci utilise un ensemble de 19 peptides « Scouts », ajoutés aux échantillons dès la phase de découverte permettant un transfert, sans réajustements des temps de rétention, vers une méthode ciblée, utilisée pour la phase de quantification.

Nous avons ainsi étudié le protéome d'un phytopathogène, *Dickeya dadantii*, au cours de son processus d'infection d'une plante. Des endives ont été inoculées par la bactérie, et récoltées 24H, 48H, et 72H après, celles-ci ont été comparées à une culture en milieu liquide, utilisée comme point de référence.

Dans le but d'établir une liste de protéines d'intérêt, une première phase a consisté à réaliser une rapide analyse de protéomique globale, menée sur l'échantillon de référence et le deuxième jour d'infection. Ceci a conduit à l'établissement d'une liste de 475 protéines cibles.

Les deux peptides les plus sensibles de ces protéines ont ensuite été placés dans les 19 groupes de transitions encadrés par les 19 peptides « Scouts » sélectionnés. Cela a permis de construire une méthode « Scout-SRM », ciblant 445 protéines, par 782 peptides, soit par 2346 transitions.

Les 3 points de la cinétique d'infection ainsi que l'échantillon de référence ont ensuite été analysés, en triplicats, par la méthode « Scout-SRM » développée. Ces données ont permis d'évaluer les performances ainsi que les limites de l'approche développée sur les 742 peptides détectés. La gamme dynamique de l'aire des peptides détectés s'étend sur 4 log. Ces mesures, réalisées sur des peptides endogènes en matrice complexes, sont très satisfaisantes et montrent la même étendue de signal qu'une méthode SRM classique. La répétabilité de la méthode est elle aussi très satisfaisante, puisque la médiane des CV mesurés sur l'aire des peptides détectés est de 7%, et le 3<sup>e</sup> quartile à 11%, assurant que 75% des mesures sont effectuées en dessous de cette valeur.

Les 361 protéines dont les peptides rapporteurs ont été mesurés avec un CV inférieur à 20% ont été quantifiées. L'interprétation biologique des résultats a été effectuée après la classification fonctionnelle de ces protéines. Les voies les plus représentées sont le métabolisme, le traitement de l'information génétique et la mobilité, avec respectivement 41%, 34% et 11% des protéines identifiées. En accord avec d'autres études, les résultats montrent que l'expression des protéines impliquées dans la mobilité est augmentée au cours de l'infection, montrant l'importance de ces protéines dans la capacité de la bactérie à

pénétrer et se propager dans la plante. Le métabolisme global de la bactérie s'adapte pour répondre aux variations environnementales ainsi qu'au stress global que subit la bactérie. Cela est observé par la sur-expression de protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, le transport de peptides, ou encore dans la résistance aux peptides antimicrobiens synthétisés par la plante.

Il serait intéressant de comparer les performances ainsi que les résultats de quantification du protéome de *Dickeya dadantii* par l'analyse en mode « Scout-SRM » à d'autres modes, en particulier les modes PRM et DIA. Outre les résultats de quantification, cette comparaison serait intéressante sur le processus global et notamment la facilité de création de la méthode ainsi que le retraitement des résultats.

Néanmoins, des limites à la méthode développée ont pu être soulevées par cette étude. Tout d'abord, nous avons évoqué le problème des peptides « chevauchants », c'est-à-dire, à l'interface entre deux groupes car co-élués avec un peptide « Scout ». Ce problème engendre des pics chromatographiques tronqués, mais aussi des erreurs dans l'assignement des groupes, conduisant à la non détection de ces peptides. Pour éviter ce phénomène, il serait envisageable de suivre dans deux groupes adjacents tous ces peptides chevauchants. En revanche, cela se ferait au détriment de la capacité du multiplexage.

Nous avons aussi mis en évidence des inversions de pics chromatographique entre un « Scout » et un peptide d'intérêt, conduisant malheureusement à la non détection de celui-ci. Dans l'analyse réalisée ici, cela n'impacte que 6 des 742 peptides ciblés ici et il serait possible, *a posteriori* de réattribuer ces peptides au bon groupe suite à la vérification en mode SRM et d'analyser à nouveau en « Scout-SRM » l'ensemble de la cinétique.

En perspective, il est envisagé d'évaluer la facilité de transfert inter-laboratoire de la méthode « Scout-SRM » développée pour la quantification du protéome de *Dickeya dadantii* au cours de son processus d'infection. La méthode sera tout d'abord testée sans aucun réajustement sur un autre système LC-MS/MS du laboratoire puis sera simplement envoyée par e-mail dans deux laboratoires partenaires, le laboratoire R&D Sciex à Toronto ainsi que le laboratoire de Paola Picotti de l'ETH de Zurich.

Les résultats de ces travaux donneront lieu à une publication, actuellement en cours de rédaction.

## 3.5. Discussion : apports du mode d'acquisition « Scout-SRM » et perspectives

L'outil « Scout-SRM » a été développé dans le but d'améliorer la robustesse des analyses hautement multiplexées en supprimant le fenêtrage en temps de rétention des composés ciblés. L'originalité est dans le déclenchement d'un groupe de transition d'intérêt seulement après la détection d'un signal « Scout », rendant la méthode robuste aux dérives des temps de rétention.

### 3.5.1. Un transfert de méthode facilité

L'application décrite dans ce chapitre a permis de faire une première preuve de concept des apports de l'outil « Scout-SRM », en particulier dans la simplification du développement de méthodes SRM à partir de bibliothèques générées lors d'analyses DDA. Ces bibliothèques peuvent contenir plusieurs milliers de peptides, rapporteurs de plusieurs centaines de protéines. Bien souvent, deux peptides par protéines sont conservés, et chaque peptide est suivi par au moins 3 transitions. A partir des données quantitatives issues de l'analyse DDA, l'utilisateur établit une liste plus réduite de protéines d'intérêt, mais le multiplex SRM à construire est tout de même conséquent.

La Figure 48 compare la méthodologie de construction d'une méthode ciblée entre le mode « Scout-SRM » et le mode sSRM classique à partir d'une liste de transitions d'intérêt issues d'une bibliothèque obtenue suite à une analyse DDA.

Bien souvent, les étapes phase de découverte et phase ciblée sont effectuées sur deux systèmes LC-MS/MS différents, il est alors nécessaire de réajuster, ou de recalculer les temps de rétention de composés d'intérêt. La Figure 48 illustre la différence entre le développement d'une méthode sSRM classique et la méthodologie « Scout-SRM » développée dans ce chapitre.

Dans le cas du développement d'une méthode sSRM classique, les temps de rétention des composés sont réajustés à l'aide d'une transformation linéaire calculée à partir d'un certain nombre de composés d'intérêt dont les temps de rétention sont répartis le long du gradient chromatographique. Une première analyse de ces composés est réalisée en SRM, afin de mesurer leurs temps de rétention sur le second système LC-MS/MS. Il est important de noter ici que le nombre de composés utilisés pour calculer cette relation est limité par le fait qu'un maximum de 150 transitions est typiquement suivi en mode SRM. Ce type de transformation est également effectué dans le cas de l'utilisation de la stratégie peptides iRT. La relation linéaire établie entre les temps de rétention de ces peptides mesurés sur les systèmes LC-MS/MS 1 et 2, permet ensuite d'estimer les temps de rétention des autres peptides de la liste d'intérêt. Ce temps de rétention est utilisé comme centre de la fenêtre de temps suivie dans la méthode sSRM. En pratique, le risque qu'elle ne soit pas centrée autour du composé ciblé

est élevé, de ce fait, les fenêtres de temps utilisées sont larges, jusqu'à 5 min<sup>171,172</sup>, ce qui limite la capacité de multiplexage de la méthode.

La méthodologie de développement d'une méthode « Scout-SRM » résumée sur la Figure 48, utilise des « Scouts-peptides » ajoutés à l'échantillon avant l'analyse DDA. De ce fait, la liste de transitions obtenue contient les peptides d'intérêt, encadrés entre deux « Scouts ». La liste de transitions est alors directement sous la forme finale des « groupes » utilisés dans la méthode « Scout-SRM ». Une injection SRM ciblant uniquement les « Scouts-peptides » est tout de même nécessaire, mais ne sert qu'à déterminer leurs seuils de déclenchement.

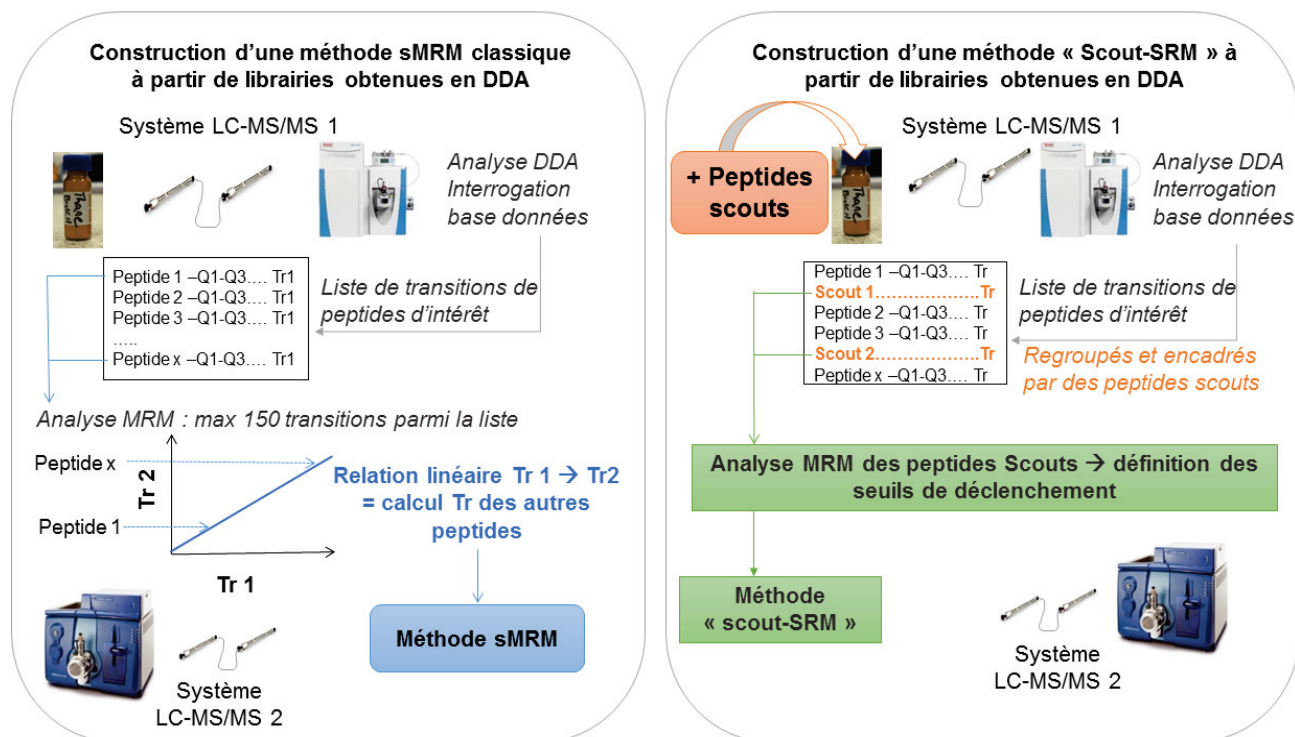


Figure 48 : Comparaison de la méthodologie de construction d'une méthode sMRM ou "Scout-SRM" à partir de bibliothèques obtenues lors d'une analyse DDA

L'avantage de la méthode « Scout-SRM » développée ici, est de faciliter ce processus de transfert de méthode ainsi que d'augmenter la capacité de multiplexage par la non utilisation du fenêtrage en temps de rétention.

Quelques limites à la méthodologie développée ont tout de même été mises en évidence, en particulier le cas de peptides d'intérêt élués à des temps de rétentions proches de ceux des peptides « Scouts ». Nous avons par exemple soulevé la problématique des peptides « chevauchants », qu'il serait préférable de suivre dans deux groupes adjacents afin de pouvoir définir l'intégralité du pic chromatographique. Cependant, cela réduit la capacité de multiplexage de la méthode. En outre, nous avons noté que le transfert de méthodes en mode gradient sur un autre système LC-MS/MS sans optimiser la pente du gradient, engendre une variation de la sélectivité. Or, si cette différence conduit à une inversion de

l'ordre d'éluion entre un « Scout » et un composé d'intérêt, ce dernier ne sera pas détecté. Dans l'exemple de l'analyse multiplexée de 782 peptides développée dans ce chapitre, 6 peptides sont non détectés à cause de ce phénomène.

Dans une perspective de partage de données inter-laboratoires, la méthodologie « Scout-SRM » décrite ici s'intègre et est complémentaire des bases de dépôt de données telles que *SRM atlas* ou *CPTAC assay portal*, à partir desquelles de récentes publications ont montré leur intérêt dans le transfert de méthodes de la phase de découverte à la phase validation réalisée en mode SRM<sup>173-175</sup>. En revanche, les bibliothèques utilisant des peptides « Scouts » devront alors être réalisées avec des paramètres LC bien définis et renseignés en particulier sur le gradient et la colonne chromatographique utilisés.

Dans cette optique, des travaux de Kiyonami et al en 2011<sup>154</sup>, ont permis de cibler 757 peptides protéotypiques de levure dont les paramètres étaient disponibles dans SRMatlas. Les auteurs ont choisi d'aligner le temps des peptides cibles à l'aide d'un mélange de 10 peptides de synthèse, comme décrit sur la partie gauche de la figure 48, et l'acquisition a été faite selon le mode iSRM.

### 3.5.2. Un gain en robustesse, mais pas seulement

Comme nous l'avons expliqué, l'outil « Scout-SRM » permet de pallier les dérives des temps de rétention qui peuvent être problématiques si la dérive est importante au point que le composé sorte de sa fenêtre de suivi. Ainsi, l'outil « Scout-SRM » permet de gagner en robustesse lors de l'analyse de longues séries d'échantillons pendant lesquelles peuvent avoir lieu des surcharges de la colonne, de faibles variations de température des phases mobiles, de volume mort ou de pression.

Ce gain en robustesse est d'autant plus intéressant dans les cas où la matrice analysée diffère entre les échantillons, ce qui arrive fréquemment pour des matrices biologiques (tumeurs, urines, etc, de différents patients). Selon la complexité de la matrice ou si une surcharge de la colonne chromatographique est observée, une dérive des temps de rétention a lieu. Ce phénomène est également observé dans le cas où différentes préparations d'échantillons sont testées, même si la matrice de départ est identique. C'est dans ce dernier contexte que l'acquisition en mode « Scout-SRM » est actuellement utilisée dans une start-up partenaire du laboratoire, qui recherche un panel de plusieurs centaines de peptides d'intérêt dans du plasma fractionné par différents protocoles SPE.

La non utilisation du fenêtrage en temps de rétention apporté par la méthode « Scout-SRM » pourrait en théorie augmenter les capacités de multiplexage par rapport à une méthode sMRM classique. A titre d'exemple, une des analyses multiplexées les plus importantes en nombre de peptides a été publiée par Burgess et al en 2014<sup>176</sup>. Les auteurs

ont établi une analyse multiplexée (800-plex MRM), suivant 400 peptides légers (dont 262 sont des peptides de synthèses ajoutés à l'échantillon) ainsi que leurs 400 étalons marqués dans une méthode sSRM utilisant un fenêtrage de 8 minutes autour de leurs composés cibles et un temps d'analyse de 180 minutes. Les auteurs ont ainsi détecté 98% de leurs paires de peptides lourds et légers (257/262) avec une bonne répétabilité puisque la médiane des CV injection est de 10.9%. La preuve de concept « Scout-SRM » développée dans ce chapitre, ciblant uniquement des peptides endogènes, est comparable en terme de performances, à la fois, de multiplexage, de détection et de répétabilité. Dans une méthode « Scout-SRM » plus optimale possédant un « Scout » toutes les 1,5 minutes, qui déclencherai systématiquement 150 transitions, un multiplex de 2000 peptides (6000 transitions) serait envisageable, pour un gradient de 60minutes.

En revanche, les capacités de multiplexage d'une méthode d'acquisition de type ciblée reste en deçà de celles d'une analyse en mode DIA. Cette technique a ainsi permis à Selevsek et al, en 2015 <sup>177</sup>, de quantifier 2500 protéines de *Saccharomyces cerevisiae* avec une excellente reproductibilité, puisque 76% d'entre elles sont quantifiées avec un CV inférieur à 10%. Cependant, si le transfert de la méthode d'acquisition ne nécessite pas d'ajustement des temps de rétention, les auteurs ont calculé le temps de rétention relatif de chacun des peptides à l'aide de la stratégie iRT, afin de faciliter la recherche dans les bibliothèques et de confirmer l'identification des peptides.

Enfin, les peptides « Scouts », ajoutés à chaque échantillon, peuvent aussi être utilisés comme moyen de contrôle de l'état du système LC-MS/MS. Ainsi, si une baisse de signal sur des composés cibles est observée, il sera possible de déterminer si cela provient :

- Du système LC-MS/MS, si une diminution de signal est également observée sur les peptides « scouts »
- De la préparation d'échantillon ou de l'échantillon lui-même, dans le cas contraire.

Utiliser des peptides exogènes comme contrôle du bon déroulement du protocole classique d'une stratégie « bottom-up » a été proposé par Lebert et al, en 2015 <sup>178</sup>. Le mélange de peptides iRT est assemblé dans une protéine recombinante, où les clivages entre les peptides sont optimisés de manière à être plus ou moins accessibles à la protéase. Les peptides iRT sont alors référence du bon déroulement de l'intégralité du protocole. A notre connaissance, il serait difficilement envisageable de proposer ce même contrôle à partir d'une protéine recombinante contenant les peptides « Scouts ». En effet, les peptides doivent être présents dans chaque échantillon puisque c'est leur bonne détection, à un seuil donné, qui permet de déclencher le suivi des composés cibles. Or, si un fractionnement de peptides par SPE a lieu, les « Scouts » ne seront plus présents dans chaque échantillon et ne pourront plus déclencher le groupe de composés cibles qui leur est associé. De même, si le rendement de digestion de la protéine recombinante est faible, le seuil de déclenchement peut ne pas être atteint.

### 3.5.3. Critères de choix des peptides « Scouts »

Les peptides « Scouts » utilisés dans les exemples présentés dans ce chapitre de thèse ont été choisis parmi 45 peptides de synthèse disponibles au laboratoire. Leurs synthèses avaient été réalisées pour les besoins de projets bien spécifiques et non pas à propos de propriétés physico-chimiques particulières. Le critère de choix principal a été la répartition chromatographique de ces peptides le long du gradient d'élution, afin d'obtenir le mélange permettant d'encadrer des groupes homogènes en nombre de transitions de composés d'intérêt. Dans le cas où différentes possibilités menaient au même résultat, les peptides les plus sensibles ont été retenus.

La preuve de concept réalisée à travers ces travaux de thèse n'a pas été faite à partir de « Scouts » optimaux, mais a permis d'en définir quelques critères de choix. Les « Scouts » idéaux sont :

- Des composés ayant une forte réponse SRM, c'est-à-dire qu'ils s'ionisent et se fragmentent bien, afin de pouvoir les ajouter en quantités très faibles dans l'échantillon ; ceci afin d'une part de limiter les coûts ainsi que les compétitions à l'ionisation éventuelles.
- Elués le long du gradient chromatographique.
- Stables.
- Non présents dans l'échantillon de manière endogène. Dans le cas de peptide, la spécificité des séquences devra être vérifiée par BLAST.
- Des composés qui sont peu interférés dans la matrice analysée, afin d'éviter qu'une interférence atteigne le seuil de détection et déclenche au mauvais moment le groupe de transition associé au « Scout ». Ceci s'avère très difficile à prédire et devra être vérifié lors de l'analyse SRM des « Scouts » et de la détermination des seuils de détection.

Dans le cas de peptides, un projet va débuter au laboratoire afin de déterminer un ensemble de peptides « Scouts » répondant à ces critères.

Dans le cas de petites molécules, il pourra être envisagé d'utiliser comme « Scout » des analogues structuraux, ou des molécules deutérées par exemple.

### 3.5.4. Applications au dosage de pesticides

Une première preuve de concept de la faisabilité de l'analyse « Scout-SRM » de petites molécules a été réalisée au laboratoire avec l'aide de Romain Carrière, assistant ingénieur. Une analyse « Scout-SRM » ciblant 215 pesticides a été développée. Deux transitions par pesticides sont suivies, soit un total de 430 transitions divisées en 5 groupes

d'environ 90 transitions. Ces groupes sont déclenchés par 5 « Scouts », qui sont des pesticides deutérés.

La répétabilité de la méthode a été évaluée (CV de l'ordre de 3%) et montre des performances équivalentes à celles obtenues en sSRM.

La méthode « Scout-SRM » développée a été transférée sur un autre système LC-MS/MS à la R&D Sciex. L'ensemble des 215 pesticides ciblés a pu être détecté, sans qu'aucune optimisation de méthode ne soit nécessaire.

Dans un dernier temps, les 215 pesticides ciblés seront recherchés et dosés dans des eaux de surface, les résultats obtenus seront comparés à des résultats obtenus en sMRM.

Ces résultats feront l'objet d'un poster qui sera présenté à l'ASMS en juin 2016, ainsi que d'une publication.

### 3.5.5. Améliorations à apporter au logiciel

Bien que la version *bêta-test* actuelle de l'outil « Scout-SRM » soit utilisable et d'ores et déjà diffusable, au moins à des équipes de recherche, des discussions sont toujours en cours avec Dave Cox et Yves Leblanc de la société Sciex afin de proposer des améliorations pour la version finale du logiciel.

Tout d'abord, la version finale du logiciel devra fonctionner comme décrit dans la partie 3.2. Pour rappel, au début de l'analyse un premier groupe de transition sera suivi, contenant un signal « Scout », qui lorsqu'il dépassera un signal seuil, déclenchera le suivi d'un nouveau groupe de transition, contenant le « Scout » suivant, et ainsi de suite.

Ensuite, au travers des développements de méthode décrits dans ce chapitre, nous avons pu constater que déterminer les seuils de déclenchements des composés « Scouts » pouvait s'avérer difficile. Cela renforce l'importance d'étudier plus précisément la façon de choisir les « Scouts ». Afin d'éviter qu'une interférence ne déclenche de manière prématurée un groupe de transitions, nous proposons d'ajouter un seuil de détection à une deuxième transition du composé « Scout ». Ainsi les transitions de type 2, inutilisées dans la version actuelle, seraient une deuxième condition de déclenchement, permettant d'éviter que celui-ci soit dû à une interférence.

En outre, l'implémentation d'une partie du mode « sSRM advanced », actuellement disponible dans Analyst 1.6.2, au mode « Scout-SRM » pourrait permettre d'encore accroître la capacité de multiplexage, en particulier dans une analyse quantitative utilisant des étalons internes. Sans utiliser le fenêtrage en temps de rétention, l'idée est simplement, au sein d'un groupe encadré par deux « Scouts », de ne suivre dans un premier temps qu'une seule transition par composé. Celle-ci serait par exemple la transition la plus intense de l'étalon interne. Sa détection déclencherait ensuite le suivi des autres transitions de l'étalon et du composé, pendant la largeur d'un pic chromatographique.



Enfin, nous avons pu constater d'après les résultats obtenus, que les paramètres temps de cycle et *dwell-time* mesurés par l'expérience, sont plus courts que ceux définis dans la méthode de pilotage de l'instrument. En effet, d'après le nombre de points par pic observé, les *dwell time* mesurés sont de l'ordre de 3 ms. Cette valeur trop faible explique pourquoi les pics chromatographiques issus d'une analyse en mode « Scout-SRM » sont plus hachurés. De plus, cela engendre probablement une perte de sensibilité bien que cela n'ait pas été vérifié ici. Ce problème informatique sera résolu dans la version définitive du logiciel.

### 3.6. Conclusions sur l'analyse en mode « Scout-SRM » et sur sa portabilité

Ce chapitre propose un nouveau mode d'acquisition d'analyses hautement multiplexées par l'apport d'un outil baptisé « Scout-SRM ». Les applications développées dans ce travail de thèse, ont permis de réaliser la première preuve de faisabilité de cet outil, d'en définir les limites ainsi que des perspectives d'améliorations.

L'objectif de l'analyse en mode « Scout-SRM » est d'apporter une solution aux problématiques rencontrées par les logiciels actuels, qui suivent les composés d'intérêt uniquement dans une fenêtre autour de leurs temps de rétention.

L'acquisition en mode « Scout-SRM » s'affranchit entièrement de ce fenêtrage, en réalisant des analyses SRM successives, de groupes de transitions, déclenchés seulement si un signal spécifique est détecté. Ce signal est celui de molécules exogènes, ajoutées à l'échantillon en quantités connues, et encadrant les groupes de transitions de composés cibles.

L'avantage de la non-utilisation de fenêtrage en temps de rétention, permet de rendre la méthode d'analyse plus robuste aux variations de temps de rétention subies par les composés et ainsi faciliter le transfert de méthodes intra ou inter-laboratoire.

C'est cette capacité de transfert de méthode qui a été étudiée à travers le développement d'une méthode « Scout-SRM » ciblant 445 protéines d'un phytopathogène, lors de son processus d'infection d'une plante.

La méthode « Scout-SRM » a été créée à partir de librairies de protéines d'intérêt générées par une analyse de protéomique globale, 445 protéines suivies par 782 peptides soit par 2346 transitions ont été ciblées par la méthode « Scout-SRM ». Aucun réajustement des temps de rétention n'a été nécessaire pour la construction de la méthode. Les peptides d'intérêt ont simplement été classés en groupes de temps de rétention encadrés par des « Scouts ». L'analyse des échantillons a permis de montrer les bonnes performances de la méthode puisque 94% des peptides initialement ciblés ( $n=742/782$ ) ont été détectés avec une bonne répétabilité ( $CV < 11\%$  pour 75 % des mesures). Ce projet illustre la simplification du transfert de méthode de la phase de découverte à la phase de quantification réalisée en mode « Scout-SRM ».

La capacité de transfert de la méthode est limitée par le fait que l'ordre d'élution des composés cibles par rapport aux « Scout » doit rester constant. Dans l'exemple développé ici, une correction de l'assignation des groupes dans la méthode « Scout-SRM » aurait pu être effectuée, après la vérification SRM des peptides non détectés.

C'est dans ce contexte qu'il a été proposé à deux laboratoires (Sciex, Toronto et ETH, Zurich) de transférer la méthode développée ici afin d'obtenir l'avis d'experts sur la facilité d'utilisation du mode « Scout-SRM » ainsi que de son apport au regard d'une stratégie de

transfert classique (alignement linéaire des temps de rétention), ou encore par la stratégie iRT.



# CONCLUSION GENERALE

---



La spectrométrie de masse a depuis quelques années, révolutionné l'analyse protéomique. La quantification de protéines par des méthodes ciblées telles que la SRM, a permis de répondre à certaines problématiques biologiques aussi bien dans le domaine de la validation de biomarqueurs que dans la biologie des systèmes. Cependant, cette technique reste principalement utilisée à des fins de recherches, aussi bien dans le milieu académique que dans le milieu industriel. Pourtant, les dosages en routine et souvent à très hauts débits de petites molécules (métabolites, pesticides, médicaments) par spectrométrie de masse sont plébiscités par les laboratoires d'analyses hospitaliers, de contrôles ou encore de prestations analytiques.

L'objectif de ces travaux de thèse était de souligner les verrous analytiques des méthodologies actuelles de quantification de protéines par spectrométrie de masse en mode SRM, ainsi que de proposer des perspectives d'amélioration.

Une première partie de ce manuscrit a permis de dresser un état de l'art des différentes stratégies couramment utilisées dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Cette étude bibliographique replace l'analyse ciblée de type SRM parmi les autres approches existantes (DDA, DIA) tout en dressant un bilan des avantages et inconvénients de ces différentes techniques. Ainsi, l'analyse de type spectre centrée, réalisée à partir d'expériences DDA, est particulièrement intéressante dans un objectif d'identification globale des protéines présentes dans un échantillon dans des conditions bien précises. Néanmoins, la répétabilité de ces analyses est affectée par le mode d'échantillonnage et peut être une limite de son utilisation dans un objectif quantitatif. La robustesse et la sensibilité des analyses sont en revanche le point fort des approches ciblées de type PRM et SRM. Ces méthodes ciblent les protéines à quantifier, *via* les transitions de leurs peptides protéotypiques. Bien qu'il soit possible de multiplexer le suivi de plusieurs centaines de transitions en une seule analyse SRM, le nombre de protéines quantifiées est conditionné par les choix de l'utilisateur, nombre de peptides et de transitions, pouvant eux affecter la qualité de la mesure quantitative. Ainsi, par rapport aux approches globales, une des limites principales du mode SRM est sa capacité de multiplexage.

De plus, le manque de standardisation des méthodes, allant du développement à la validation du résultat biologique, est un frein à leur diffusion. Le croisement et la validation de données inter-laboratoires est ainsi rendu difficile, ainsi que l'implantation de méthodes de quantification absolue de protéines pour des contrôles analytiques de routine.

Les résultats de ces travaux de thèse, ont permis de soulever deux points pouvant, à notre avis, être un frein à la diffusion vers l'analyse en routine des méthodes de quantification de protéines par spectrométrie de masse. Le premier verrou identifié porte sur l'impact de la digestion enzymatique ainsi que de la stratégie de quantification choisie sur la justesse du résultat de quantification de la protéine. Le second verrou concerne la portabilité des analyses, et en particulier le transfert ou le développement de méthodes SRM ciblant plusieurs centaines de protéines.

Des solutions ont pu être proposées et évaluées à travers des applications concrètes, sur des projets réalisés en partenariat, notamment avec Sanofi Pasteur, l'Université Lille 1 et la société Sciex. Ainsi, les méthodes et méthodologies développées dans ce travail de thèse ont été transférées et éprouvées par des utilisateurs issus du milieu industriel. De plus, les résultats obtenus ont été confrontés à des données biologiques provenant d'autres méthodes d'analyses. Les discussions scientifiques et le partage des travaux effectués avec ces utilisateurs extérieurs, ont permis une évaluation critique de ces travaux et des méthodologies de travail proposées.

Le développement d'une méthode de quantification des 4 sérotypes des virus chimères candidats vaccins contre la dengue a été décrit dans le deuxième chapitre de ce manuscrit. Le plan de travail mis en place, propose tout d'abord une digestion trypsique de la totalité de l'échantillon. Ensuite, un dosage par LC-MS/MS en mode SRM des peptides protéotypiques des protéines C, E, pr et M de la polyprotéine chimère a été effectué selon la stratégie AQUA. Pour rappel, cette stratégie utilise des étalons internes marqués, et ne corrige les biais analytiques qu'au niveau peptidique. La petite taille des protéines à cibler ainsi que la particularité de leur séquence a été un réel challenge dans le choix des peptides protéotypiques. Nous avons développé une méthode de double étalonnage des peptides contenant des résidus d'acides aminés méthionines, afin de quantifier l'oxydation du peptide endogène, comme l'oxydation du peptide étalon. Ces travaux mettent en évidence l'importance de la maîtrise de la préparation d'échantillon et en particulier de la digestion enzymatique afin de garantir la justesse des mesures. Or, lors du développement d'une analyse multiplexée de plusieurs protéines, ces travaux de recherche ont montré qu'il était difficile d'obtenir des conditions idéales pour chacune d'entre elles. Cela peut conduire à des biais dans l'exactitude de la mesure des peptides, particulièrement observables dans cette étude, où 6 à 7 peptides mesurent une même polyprotéine.

Ce projet a mis en exergue l'importance du contrôle de la qualité des étalons utilisés tout au long du processus analytique (conservation, digestion enzymatique, analyse LC-MS/MS). Si cela a été montré à partir de l'étalonnage de type AQUA, ces critères sont à vérifier dans toutes les stratégies de quantification par dilution isotopique où l'objectif premier est la quantification absolue d'une protéine. La méthode finale développée est reproductible et représente une des premières méthodes de quantification de virus dans un lot de vaccin par spectrométrie de masse. La mise en évidence des limites d'utilisation de la méthode, et en particulier des points susceptibles d'engendrer des biais dans la mesure de la dose de la polyprotéine, ont permis d'assurer le transfert vers notre partenaire industriel. En effet, la méthode a été transférée avec succès à Sanofi Pasteur, dans un premier temps à l'équipe de recherche partenaire, puis ensuite transférée à une équipe de qualification de méthodes.



Le troisième chapitre de ce manuscrit s'est aussi axé sur le transfert de méthodes LC-MS/MS, dans le contexte plus général des analyses SRM multiplexant plusieurs centaines de composés. Les méthodes actuelles permettant d'acquérir ce type de données utilisent toutes un fenêtrage en temps de rétention des composés cibles. Les méthodes sont donc moins robustes aux variations chromatographiques engendrant des décalages dans le temps de rétention des composés. En matrice complexe, les utilisateurs sont souvent contraints d'utiliser de larges fenêtres d'acquisition, diminuant la capacité de multiplexage de ces méthodes. De plus, le transfert inter-laboratoire de ces méthodes nécessite à nouveau un calcul complet des temps de rétention des composés cibles. En partenariat avec la société Sciex, nous avons développé un nouvel outil d'acquisition de données SRM, n'utilisant aucune mesure de temps de rétention. Les composés d'intérêt sont encadrés par des « Scouts », composés exogènes ajoutés en quantité connue à l'échantillon. Le suivi des composés cibles n'est effectué qu'après la détection du « Scout » qui lui est associé. Ceci a pour objectif de rendre la méthode plus robuste aux variations de temps de rétention et plus facilement transférable. L'intérêt de ce nouvel outil a été démontré dans la création d'une méthode d'analyse multiplexée de 445 protéines d'un phytopathogène, *Dickeya dadantii*, à partir de bibliothèques de spectres MS/MS générés par une analyse de protéomique globale. Cette étude réalisée en partenariat avec l'Université Lille 1 a permis la première étude de l'expression du protéome de *Dickeya dadantii* en conditions réelles d'infection d'une plante.

L'acquisition en mode « Scout-SRM » a permis de réaliser un transfert de la phase de découverte à une phase de quantification ciblée en une seule étape d'optimisation. Celle-ci consiste uniquement en la détermination par SRM des seuils de déclenchements des peptides « Scouts ». Nous avons ainsi pu détecter, 742 des 782 peptides initialement ciblés. A notre connaissance, il s'agit d'un des plus importants multiplexes SRM réalisés pour la quantification de peptides endogènes en matrice complexe.

Les limites de portabilité de la méthodologie développée sont rencontrées lorsque des changements de sélectivités sont suffisamment importants pour entraîner l'inversion de l'ordre d'élution entre un peptide « Scout » et le peptide d'intérêt. Les autres stratégies de correction des temps de rétention, par iRT par exemple, rencontrent ces mêmes limites.

A travers ces deux études, il apparaît clairement que la diffusion des méthodes de dosage de protéines par spectrométrie de masse ne peut s'effectuer qu'en apportant un soin particulier à la maîtrise de l'ensemble du protocole. La prise en compte du seul paramètre « spectrométrie de masse » par le transfert de bibliothèques de spectres MS/MS n'est pas suffisant. Nous avons ainsi montré l'importance de la maîtrise de la préparation des échantillons, de la qualité des étalons internes, mais aussi des paramètres chromatographiques. C'est à travers la connaissance et la gestion de tous ces points de variations analytiques que pourra s'effectuer une standardisation des résultats inter-laboratoires.

Le potentiel de la spectrométrie de masse en mode SRM pour la quantification de protéines n'est plus à démontrer. Cependant, pour une diffusion de cette technique en routine dans des domaines industriels, cliniques ou hospitaliers, un effort de standardisation des méthodes doit être effectué. Cela est d'autant plus pertinent que le développement de nouveaux médicaments est désormais tourné vers les biomolécules telles que les anticorps thérapeutiques. Le dosage par spectrométrie de masse en mode SRM de ces nouvelles cibles thérapeutiques, en contrôle industriel tout comme en laboratoire hospitalier, est voué à se développer dans les prochaines années, et nécessitera le développement de méthodes multiplexées robustes et transférables. C'est aux utilisateurs d'aujourd'hui de proposer de lever les verrous analytiques qu'ils rencontrent, afin de démocratiser le dosage de protéines par spectrométrie de masse.

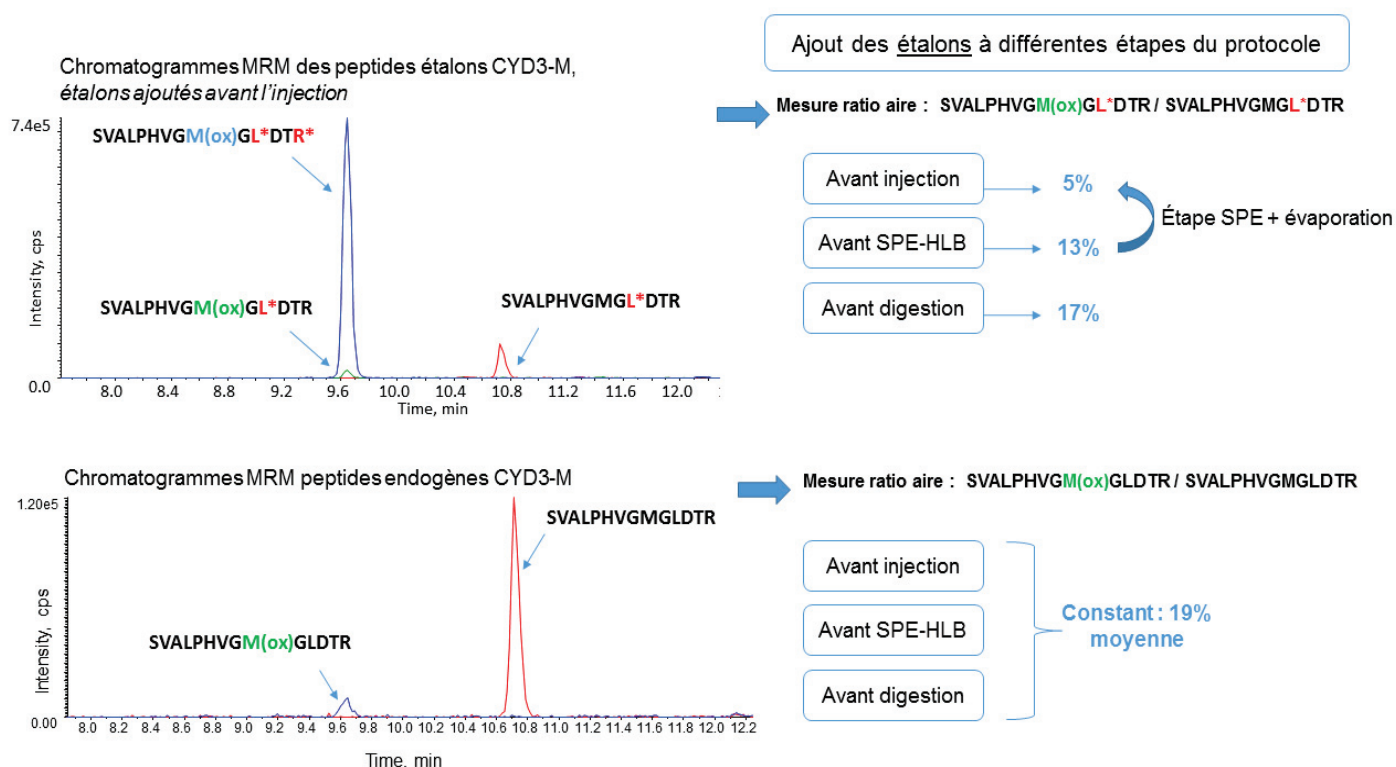
# ANNEXES

---



# 1. Oxydation des peptides contenant des résidus Méthionines sélectionnés pour la quantification du virus CYD candidat vaccin, exemple du peptide SVALPHVGMGLDTR dosant CYD3-M

L'impact du protocole de préparation d'échantillon sur l'oxydation des peptides lourds a été étudié en ajoutant les étalons aux différentes étapes du protocole par le calcul du ratio peptide oxydé / peptide non oxydé. L'exemple donné sur la Figure 49 est celui du peptide rapporteur de la protéine M du virus CYD3, où les deux étalons marqués différemment, SVALAPHVGMGL\*DTR, SVALAPHVGMGL\*DTR\*, ont été ajoutés à 20 ng/mL soit (i) au début du protocole « avant digestion », (ii), après l'arrêt de la digestion, avant l'étape de dessalage « avant SPE-HLB », (iii) après évaporation des échantillons et reprise « avant



injection ».

Figure 49 : Etude de l'oxydation d'un peptide étalon marqué, contenant un résidu Méthionine

Les résultats montrent que l'oxydation durant la préparation des échantillons est principalement due aux étapes de dessalage et de concentration par évaporation. De plus, le ratio d'oxydation du peptide endogène est proche de celui du peptide étalon qui a subi toutes les étapes du protocole.

De par la forte différence de réponse entre la forme oxydée et la forme non oxydée (Figure 49, chromatogramme en haut, à gauche), ces résultats ne représentent pas une mesure du taux d'oxydation endogène, puisqu'ils ont été obtenus à partir des aires brutes mesurées. D'après les valeurs obtenues lors des dosages, la concentration de la forme oxydée représente moins de 10% de la concentration de la forme non oxydée du peptide.

## 2. Choix du solvant et du contenant utilisé pour la préparation et conservation des solutions mères des étalons du projet dosage du virus CYD

Dans l'historique du projet, les premiers étalons ont été commandés sous forme de poudre lyophilisée pour le dosage des protéines E et M du virus CYD4. Ensuite, dans l'objectif d'une utilisation en industrie où les pesées inférieures au mg sont difficiles à valider, nous avons testé des étalons en solution du fournisseur Thermo Fisher. Ces tests ont été effectués sur les étalons utilisés pour le dosage du virus CYD2, conduisant à l'observation de problèmes de stabilité, en particulier pour le peptide SVALPHVGMGLETR (cf 2.4.2). Les étalons ont été à nouveau commandés sous forme de poudre lyophilisée et le choix du contenant ainsi que du solvant de reprise a été testé sur ces étalons, puis appliqué aux futures commandes.

Que les étalons soient utilisés sous forme lyophilisée ou en solution, la stabilité peut être impactée par :

- La concentration initiale des solutions
- La température de conservation
- Le contenant
- Le solvant
- Les propriétés intrinsèques du peptide (séquence en acides aminés).

Nous avons travaillé sur six étalons sous forme lyophilisée, utilisés pour le dosage des protéines du virus CYD2 et nous avons testé deux solvants de reprise et trois contenants.

Les étalons sont pesés (200 µg) dans des flacons de type verre ambré puis dilués dans 1 mL de solvant, soit celui habituellement utilisé au laboratoire (H<sub>2</sub>O/MeOH, 90 :10 + 0,5 % FA), soit dans celui conseillé par défaut par la société Thermo Fisher (H<sub>2</sub>O/ACN, 95 :5), dans les contenants suivants : (i) un flacon en polypropylène, (ii) un flacon en verre appelée ici « simple », (iii) un flacon en verre de type ambré.

Pour chaque condition (un solvant et un contenant), une solution fille à 20 ng/mL a été réalisée et analysée après 48H (à -20°C), selon la méthode LC-MSMS décrite en 2.3.2.

Les résultats sont présentés sur la Figure 50, montrant pour chaque condition le pourcentage restant de peptides par rapport à la meilleure condition. L'intensité du peptide est représentée sous la forme d'un pourcentage, calculé selon l'équation 10.

$$\% \text{ signal du peptide, condition } (a) = \frac{\text{aire mesurée dans la condition } (a)}{\text{aire maximale parmi toutes les conditions}} \times 100$$

Équation 10 : calcul de l'intensité relative des peptides étalons selon leur condition de conservation







Figure 50 : Pourcentage restant de l'aire des peptides étalons du virus CYD2 en fonctions des solvants et contenus de préparation testés

Les conditions en solvant H<sub>2</sub>O/ACN (95 :5) sont celles pour lesquelles nous observons les intensités les plus basses, montrant que la solubilité des peptides dans ce mélange est moins bonne. En revanche, cette étude ne permet pas de définir si cette différence est due à l'acétonitrile ou à l'acide formique. Concernant l'apport de l'utilisation de verre « ambré », il peut être dû à la différence de qualité de verre entre les deux flacons testés, ou au traitement ambré lui-même. Nous ne sommes pas allés plus loin dans ces recherches.

La condition H<sub>2</sub>O/MeOH (90 :10) + 0,5% FA en flacon en verre de type ambré donne systématiquement le signal maximal pour chaque peptide. C'est cette condition qui a été retenue pour la suite des expériences.

### 3. Matériels et méthodes, données préliminaires « Scout-SRM » (3.3.1)

ION PRECURSEUR	ION PRODUIT	TEMPS	IDENTIFIANT	GROUPE	FENETRE DE DETECTION	TYPE DE TRANSITION	SEUIL DE DETECTION	DP	EP	CE	CXP
-------------------	----------------	-------	-------------	--------	----------------------------	-----------------------	-----------------------	----	----	----	-----

389.7	544.3	0	HPQLQR.+2y4	A	1	500	45	10	23	28
389.7	641.4	0	HPQLQR.+2y5	A	2		45	10	21	34
442.7	648.3	0	VHSITGDR.+2y6	A	4		81	10	25	34
295.5	347.2	0	VHSITGDR.+3y3	A	4		76	10	13	16
341.7	468.3	0	ITAHLK.+2y4	A	4		50	10	17	14
341.7	569.3	0	ITAHLK.+2y5	A	4		50	10	17	15
448.2	136.1	0	YEGAGAPCK.+2a1	B	1	5000	30	4	47	10
448.2	603.3	0	YEGAGAPCK.+2y7	B	2		30	4	23	20
356.5	669.4	0	SSSHPIFHR.+3y5	B	4		40	7	20.5	18.5
356.5	447.2	0	SSSHPIFHR.+3y7+2	B	4		40	7	14	14
289.9	350.2	0	APLTKPLK.+3y6+2	B	4		36	10	13	22
289.9	398.8	0	APLTKPLK.+3y7+2	B	4		36	10	13	22
498.7	406.2	0	EANYIGSDK.+2y4	C	1	5000	56	10	23	20
498.7	519.3	0	EANYIGSDK.+2y5	C	2		56	10	23	26
635.8	831.4	0	LYYPSQDNDR.+2y7	C	4		71	10	29	44
635.8	497.7	0	LYYPSQDNDR.+2y8+2	C	4		71	10	27	26
564.8	347.2	0	ESDTSYVSLK.+2y3	C	4		71	10	23	18
564.8	696.4	0	ESDTSYVSLK.+2y6	C	4		71	10	27	34
363.7	530.3	0	VPIEIR_2y4	D	1	5000	30	3	18	18
363.7	627.4	0	VPIEIR_2y5	D	2		40	5	13	13
497.8	201.1	0	AEIEYLEK.+2b2	D	4		61	10	21	12
497.8	794.4	0	AEIEYLEK.+2y6	D	4		61	10	21	42
523.3	849.4	0	VPSVYPLDR.+2y7	D	4		66	10	31	46
523.3	473.8	0	VPSVYPLDR.+2y8+2	D	4		66	10	27	27
617.3	717.4	0	GFQALGDAADIR.+2y7	E	1	5000	26	10	23	38
617.3	830.4	0	GFQALGDAADIR.+2y8	E	2		26	10	27	44
451.8	587.4	0	VESWILR.+2y4	E	4		40	3	22	16
451.8	803.4	0	VESWILR.+2y6	E	4		40	3	23	15
529.3	458.3	0	SYWIGIR.+2y4	E	4		41	10	27	24
529.3	807.5	0	SYWIGIR.+2y6	E	4		41	10	21	44
497.9	581.8	0	DDVALEGVSHFFR.+3y10+2	F	1	5000	41	10	19	34
497.9	546.3	0	DDVALEGVSHFFR.+3y9+2	F	2		41	10	19	32
521.6	595.3	0	YPLVVFHGLGAFR.+3y11+2	F	4		56	10	25	32
521.6	651.9	0	YPLVVFHGLGAFR.+3y12+2	F	4		56	10	23	34
576.9	448.3	0	SLGPALLLQK.+2y8+2	F	4		76	10	27	24
576.9	476.8	0	SLGPALLLQK.+2y9+2	F	4		76	10	23	24

Tableau 15 : Méthode "Scout-MRM" développée pour l'analyse des 18 peptides de synthèse

#### 4. Paramètres de la méthode « Scout-SRM » utilisée pour l'analyse de la cinétique de croissance de *Dickeya dadantii* (3.3)

Ion précurseur	Ion fragment	identifiant	groupe	Type	seuil	DP	CE	Protéine	peptide
----------------	--------------	-------------	--------	------	-------	----	----	----------	---------

Tableau 16 : Liste des transitions et paramètres utilisés dans la méthode "Scout-SRM" ciblant 445 protéines de *Dickeya dadantii*

442.73	393.20	scout_VHSITGDR_2y5	VHSI	1	30000	23.4	24.8		VHSITGDR
442.73	561.30	scout_VHSITGDR_2y7d	VHSI	2		23.4	24.8		VHSITGDR
465.74	560.28	E0SIE9_EQI_2y4	VHSI	4		35.1	25.6	E0SIE9	EQIEQQR
465.74	431.24	E0SIE9_EQI_2y3	VHSI	4		35.1	25.6	E0SIE9	EQIEQQR
465.74	303.18	E0SIE9_EQI_2y2	VHSI	4		35.1	25.6	E0SIE9	EQIEQQR
416.22	646.35	E0SCE5_GQS_2y6	VHSI	4		31.5	23.8	E0SCE5	GQSEAIAR
416.22	430.28	E0SCE5_GQS_2y4	VHSI	4		31.5	23.8	E0SCE5	GQSEAIAR
416.22	359.24	E0SCE5_GQS_2y3	VHSI	4		31.5	23.8	E0SCE5	GQSEAIAR
480.74	574.33	E0SJU0_QEE_2y5	VHSI	4		36.2	26.2	E0SJU0	QEEGTQIR
480.74	416.26	E0SJU0_QEE_2y3	VHSI	4		36.2	26.2	E0SJU0	QEEGTQIR
480.74	288.20	E0SJU0_QEE_2y2	VHSI	4		36.2	26.2	E0SJU0	QEEGTQIR
409.23	546.30	E0SC83_GLT_2y5	VHSI	4		30.9	23.6	E0SC83	GLTQTAAR
409.23	418.24	E0SC83_GLT_2y4	VHSI	4		30.9	23.6	E0SC83	GLTQTAAR
409.23	317.19	E0SC83_GLT_2y3	VHSI	4		30.9	23.6	E0SC83	GLTQTAAR
445.23	619.33	E0SLG1_AAQ_2y5	VHSI	4		33.6	24.9	E0SLG1	AAQTELEK
445.23	518.28	E0SLG1_AAQ_2y4	VHSI	4		33.6	24.9	E0SLG1	AAQTELEK
445.23	276.16	E0SLG1_AAQ_2y2	VHSI	4		33.6	24.9	E0SLG1	AAQTELEK
452.21	531.29	E0SJY7_EDQ_2y5	VHSI	4		34.1	25.1	E0SJY7	EDQGLADR
452.21	361.18	E0SJY7_EDQ_2y3	VHSI	4		34.1	25.1	E0SJY7	EDQGLADR
452.21	290.15	E0SJY7_EDQ_2y2	VHSI	4		34.1	25.1	E0SJY7	EDQGLADR
447.23	617.34	Q937L1_FEQ_2y6	VHSI	4		33.7	25	Q937L1	FEQAAATR
447.23	489.28	Q937L1_FEQ_2y5	VHSI	4		33.7	25	Q937L1	FEQAAATR
447.23	418.24	Q937L1_FEQ_2y4	VHSI	4		33.7	25	Q937L1	FEQAAATR
442.73	641.37	E0SJR1_QDP_2y5	VHSI	4		33.4	24.8	E0SJR1	QDPQQLR
442.73	416.26	E0SJR1_QDP_2y3	VHSI	4		33.4	24.8	E0SJR1	QDPQQLR
442.73	321.19	E0SJR1_QDP_2y5d	VHSI	4		33.4	24.8	E0SJR1	QDPQQLR
447.23	617.34	E0SN84_FEQ_2y6	VHSI	4		33.7	25	E0SN84	FEQAAATR
447.23	489.28	E0SN84_FEQ_2y5	VHSI	4		33.7	25	E0SN84	FEQAAATR
447.23	418.24	E0SN84_FEQ_2y4	VHSI	4		33.7	25	E0SN84	FEQAAATR
447.23	347.20	E0SN84_FEQ_2y3	VHSI	4		33.7	25	E0SN84	FEQAAATR
402.21	588.33	E0SKC6_SQY_2y4	VHSI	4		30.4	23.3	E0SKC6	SQYHLR
402.21	425.26	E0SKC6_SQY_2y3	VHSI	4		30.4	23.3	E0SKC6	SQYHLR
402.21	288.20	E0SKC6_SQY_2y2	VHSI	4		30.4	23.3	E0SKC6	SQYHLR
477.73	796.38	E0SB16_SAS_2y7	VHSI	4		35.9	26.1	E0SB16	SASAFNTEK
477.73	638.31	E0SB16_SAS_2y5	VHSI	4		35.9	26.1	E0SB16	SASAFNTEK
477.73	491.25	E0SB16_SAS_2y4	VHSI	4		35.9	26.1	E0SB16	SASAFNTEK
487.26	557.34	E0SLC2_GTS_2y5	VHSI	4		36.6	26.4	E0SLC2	GTSNGTIPAR
487.26	456.29	E0SLC2_GTS_2y4	VHSI	4		36.6	26.4	E0SLC2	GTSNGTIPAR
487.26	343.21	E0SLC2_GTS_2y3	VHSI	4		36.6	26.4	E0SLC2	GTSNGTIPAR
403.20	518.27	O53007_TWT_2y5	VHSI	4		30.5	23.4	O53007	TWTGQGR
403.20	417.22	O53007_TWT_2y4	VHSI	4		30.5	23.4	O53007	TWTGQGR
403.20	360.20	O53007_TWT_2y3	VHSI	4		30.5	23.4	O53007	TWTGQGR
488.74	531.29	E0SGW8_SET_2y5	VHSI	4		36.7	26.5	E0SGW8	SETQIADGR
488.74	418.20	E0SGW8_SET_2y4	VHSI	4		36.7	26.5	E0SGW8	SETQIADGR
488.74	347.17	E0SGW8_SET_2y3	VHSI	4		36.7	26.5	E0SGW8	SETQIADGR
404.54	404.23	E0SGD3_HAD_3y3	VHSI	4		30.6	19.6	E0SGD3	HADSVIGQQR
404.54	589.31	E0SGD3_HAD_3y5	VHSI	4		30.6	19.6	E0SGD3	HADSVIGQQR
404.54	532.28	E0SGD3_HAD_3y4	VHSI	4		30.6	19.6	E0SGD3	HADSVIGQQR
492.74	595.31	E0SL34_SGT_2y5	VHSI	4		37	26.6	E0SL34	SGTGSVDYAK
492.74	496.24	E0SL34_SGT_2y4	VHSI	4		37	26.6	E0SL34	SGTGSVDYAK
492.74	381.21	E0SL34_SGT_2y3	VHSI	4		37	26.6	E0SL34	SGTGSVDYAK
404.70	404.21	E0SHR5_AGF_2y4	VHSI	4		30.6	23.4	E0SHR5	AGFEAEGK
404.70	533.26	E0SHR5_AGF_2y5	VHSI	4		30.6	23.4	E0SHR5	AGFEAEGK
404.70	340.67	E0SHR5_AGF_2y6d	VHSI	4		30.6	23.4	E0SHR5	AGFEAEGK
30.22	512.26	E0SN66_FTV_2y4	VHSI	4		32.5	24.3	E0SN66	FTVEHAR
430.22	383.21	E0SN66_FTV_2y3	VHSI	4		32.5	24.3	E0SN66	FTVEHAR
430.22	356.69	E0SN66_FTV_2y6d	VHSI	4		32.5	24.3	E0SN66	FTVEHAR
406.86	673.29	E0SHQ4_HHV_3y5	VHSI	4		30.8	19.7	E0SHQ4	HHVTADGYRR
406.86	558.27	E0SHQ4_HHV_3y4	VHSI	4		30.8	19.7	E0SHQ4	HHVTADGYRR
406.86	338.18	E0SHQ4_HHV_3y2	VHSI	4		30.8	19.7	E0SHQ4	HHVTADGYRR
513.78	776.41	E0SCC5_HLE_2y7	VHSI	4		38.6	27.4	E0SCC5	HLESVVTNK
513.78	362.20	E0SCC5_HLE_2y3	VHSI	4		38.6	27.4	E0SCC5	HLESVVTNK
513.78	261.16	E0SCC5_HLE_2y2	VHSI	4		38.6	27.4	E0SCC5	HLESVVTNK
433.21	647.34	E0SHP9_MST_2y5	VHSI	4		32.7	24.5	E0SHP9	MSTIEER
433.21	546.29	E0SHP9_MST_2y4	VHSI	4		32.7	24.5	E0SHP9	MSTIEER
433.21	304.16	E0SHP9_MST_2y2	VHSI	4		32.7	24.5	E0SHP9	MSTIEER
415.73	589.32	E0SKX1_IQE_2y5	VHSI	4		31.4	23.8	E0SKX1	IQEIEAK
415.73	460.28	E0SKX1_IQE_2y4	VHSI	4		31.4	23.8	E0SKX1	IQEIEAK
415.73	347.19	E0SKX1_IQE_2y3	VHSI	4		31.4	23.8	E0SKX1	IQEIEAK
476.23	660.32	E0SIV5_SGF_2y5	VHSI	4		35.8	26	E0SIV5	SGFQYHGR
476.23	532.26	E0SIV5_SGF_2y4	VHSI	4		35.8	26	E0SIV5	SGFQYHGR

476.23	369.20	E0SIV5_SGF_2y3	VHSI	4		35.8	26	E0SIV5	SGFQYHGR
442.72	655.32	Q84EZ6_TQP_2y5	VHSI	4		33.4	24.8	Q84EZ6	TQPGYYR
442.72	558.27	Q84EZ6_TQP_2y4	VHSI	4		33.4	24.8	Q84EZ6	TQPGYYR
442.72	328.16	Q84EZ6_TQP_2y5d	VHSI	4		33.4	24.8	Q84EZ6	TQPGYYR
666.33	801.41	E0SIY6_TTD_2y9	VHSI	4		49.7	32.8	E0SIY6	TTDAAAASAPADAAK
666.33	730.37	E0SIY6_TTD_2y8	VHSI	4		49.7	32.8	E0SIY6	TTDAAAASAPADAAK
666.33	572.30	E0SIY6_TTD_2y6	VHSI	4		49.7	32.8	E0SIY6	TTDAAAASAPADAAK
451.77	702.41	E0SGJ3_VTA_2y8	VHSI	4		34.1	25.1	E0SGJ3	VTAVGAGVTK
451.77	631.38	E0SGJ3_VTA_2y7	VHSI	4		34.1	25.1	E0SGJ3	VTAVGAGVTK
451.77	532.31	E0SGJ3_VTA_2y6	VHSI	4		34.1	25.1	E0SGJ3	VTAVGAGVTK
629.31	860.39	E0SN64_VGA_2y9	VHSI	4		47	31.5	E0SN64	VGAAVGAGAGNEER
629.31	803.36	E0SN64_VGA_2y8	VHSI	4		47	31.5	E0SN64	VGAAVGAGAGNEER
629.31	732.33	E0SN64_VGA_2y7	VHSI	4		47	31.5	E0SN64	VGAAVGAGAGNEER
417.22	492.24	E0SIM0_ELV_2y4	VHSI	4		31.5	23.9	E0SIM0	ELVTDTR
417.22	391.19	E0SIM0_ELV_2y3	VHSI	4		31.5	23.9	E0SIM0	ELVTDTR
417.22	276.17	E0SIM0_ELV_2y2	VHSI	4		31.5	23.9	E0SIM0	ELVTDTR
459.24	733.35	E0SE21_LAS_2y6	VHSI	4		34.6	25.4	E0SE21	LASNIDER
459.24	419.19	E0SE21_LAS_2y3	VHSI	4		34.6	25.4	E0SE21	LASNIDER
459.24	304.16	E0SE21_LAS_2y2	VHSI	4		34.6	25.4	E0SE21	LASNIDER
484.58	442.28	E0SIU6_IHT_3y4	VHSI	4		36.4	24	E0SIU6	IHTEEDERPIGR
484.58	601.29	E0SIU6_IHT_3y10d	VHSI	4		36.4	24	E0SIU6	IHTEEDERPIGR
484.58	364.21	E0SIU6_IHT_3y6d	VHSI	4		36.4	24	E0SIU6	IHTEEDERPIGR
498.74	406.19	scout_EANYIGSDK_2y5	EANY	1	80000	27.5	26.8		EANYIGSDK
498.74	519.28	scout_EANYIGSDK_2y4	EANY	2		27.5	26.8		EANYIGSDK
473.26	703.41	E0SLT6_NQL_2y7	EANY	4		35.6	25.9	E0SLT6	NQLSGTVAR
473.26	590.33	E0SLT6_NQL_2y6	EANY	4		35.6	25.9	E0SLT6	NQLSGTVAR
473.26	503.29	E0SLT6_NQL_2y5	EANY	4		35.6	25.9	E0SLT6	NQLSGTVAR
445.73	589.29	E0SB19_IST_2y5	EANY	4		33.6	24.9	E0SB19	ISTEVDAR
445.73	460.25	E0SB19_IST_2y4	EANY	4		33.6	24.9	E0SB19	ISTEVDAR
445.73	361.18	E0SB19_IST_2y3	EANY	4		33.6	24.9	E0SB19	ISTEVDAR
450.75	574.29	E0SBD8_AAA_2y6	EANY	4		34	25.1	E0SBD8	AAALAAADAR
450.75	503.26	E0SBD8_AAA_2y5	EANY	4		34	25.1	E0SBD8	AAALAAADAR
450.75	432.22	E0SBD8_AAA_2y4	EANY	4		34	25.1	E0SBD8	AAALAAADAR
430.73	619.30	E0SLQ8_IQD_2y5	EANY	4		32.5	24.4	E0SLQ8	IQDLSER
430.73	391.19	E0SLQ8_IQD_2y3	EANY	4		32.5	24.4	E0SLQ8	IQDLSER
430.73	304.16	E0SLQ8_IQD_2y2	EANY	4		32.5	24.4	E0SLQ8	IQDLSER
558.29	815.44	E0SGX4_TAQ_2y9	EANY	4		41.8	29	E0SGX4	TAQTPGGTGGLR
558.29	714.39	E0SGX4_TAQ_2y8	EANY	4		41.8	29	E0SGX4	TAQTPGGTGGLR
558.29	357.70	E0SGX4_TAQ_2y8d	EANY	4		41.8	29	E0SGX4	TAQTPGGTGGLR
428.25	530.33	E0SIV4_EVP_2y5	EANY	4		32.3	24.3	E0SIV4	EVPAAIQK
428.25	459.29	E0SIV4_EVP_2y4	EANY	4		32.3	24.3	E0SIV4	EVPAAIQK
428.25	314.19	E0SIV4_EVP_2y6d	EANY	4		32.3	24.3	E0SIV4	EVPAAIQK
497.78	596.33	E0SK32_GEV_2y6	EANY	4		37.4	26.8	E0SK32	GEVLAVGHGR
497.78	525.29	E0SK32_GEV_2y5	EANY	4		37.4	26.8	E0SK32	GEVLAVGHGR
497.78	426.22	E0SK32_GEV_2y4	EANY	4		37.4	26.8	E0SK32	GEVLAVGHGR
422.55	646.35	E0SEY9_HTM_3y5	EANY	4		31.9	20.6	E0SEY9	HTMIHEQITR
422.55	517.31	E0SEY9_HTM_3y4	EANY	4		31.9	20.6	E0SEY9	HTMIHEQITR
422.55	392.21	E0SEY9_HTM_3y6d	EANY	4		31.9	20.6	E0SEY9	HTMIHEQITR
463.77	629.33	E0SDF2_VVV_2y6	EANY	4		34.9	25.6	E0SDF2	VVVPAGEQK
463.77	332.19	E0SDF2_VVV_2y3	EANY	4		34.9	25.6	E0SDF2	VVVPAGEQK
463.77	315.17	E0SDF2_VVV_2y6d	EANY	4		34.9	25.6	E0SDF2	VVVPAGEQK
585.30	862.43	E0SED9_HAV_2y8	EANY	4		43.8	29.9	E0SED9	HAVTEASPMVK
585.30	632.34	E0SED9_HAV_2y6	EANY	4		43.8	29.9	E0SED9	HAVTEASPMVK
585.30	474.27	E0SED9_HAV_2y4	EANY	4		43.8	29.9	E0SED9	HAVTEASPMVK
472.25	743.40	E0SHQ1_AES_2y7	EANY	4		35.5	25.9	E0SHQ1	AESAPEAIR
472.25	585.34	E0SHQ1_AES_2y5	EANY	4		35.5	25.9	E0SHQ1	AESAPEAIR
472.25	293.17	E0SHQ1_AES_2y5d	EANY	4		35.5	25.9	E0SHQ1	AESAPEAIR
515.76	893.45	E0SBE2_HQG_2y8	EANY	4		38.7	27.4	E0SBE2	HQGTFDVAR
515.76	765.39	E0SBE2_HQG_2y7	EANY	4		38.7	27.4	E0SBE2	HQGTFDVAR
515.76	345.22	E0SBE2_HQG_2y3	EANY	4		38.7	27.4	E0SBE2	HQGTFDVAR
478.76	746.38	Q934G6-TOLB_LPA_2y7	EANY	4		36	26.1	Q934G6	LPATDGGQVR
478.76	675.34	Q934G6-TOLB_LPA_2y6	EANY	4		36	26.1	Q934G6	LPATDGGQVR
478.76	422.22	Q934G6-TOLB_LPA_2y8d	EANY	4		36	26.1	Q934G6	LPATDGGQVR
452.24	719.36	E0SD72_IAA_2y7	EANY	4		34.1	25.1	E0SD72	IAADADISK
452.24	533.29	E0SD72_IAA_2y5	EANY	4		34.1	25.1	E0SD72	IAADADISK
452.24	347.23	E0SD72_IAA_2y3	EANY	4		34.1	25.1	E0SD72	IAADADISK
412.75	529.31	E0SCC6_VVP_2y5	EANY	4		31.2	23.7	E0SCC6	VVPPASVR
412.75	313.68	E0SCC6_VVP_2y6d	EANY	4		31.2	23.7	E0SCC6	VVPPASVR
412.75	265.16	E0SCC6_VVP_2y5d	EANY	4		31.2	23.7	E0SCC6	VVPPASVR
407.74	543.32	E0SD92_VTA_2y5	EANY	4		30.8	23.5	E0SD92	VTAPITGR
407.74	333.19	E0SD92_VTA_2y3	EANY	4		30.8	23.5	E0SD92	VTAPITGR

407.74	272.17	E0SD92_VTA_2y5d	EANY	4		30.8	23.5	E0SD92	VTAPITGR
459.74	662.37	E0SH50_AQG_2y6	EANY	4		34.6	25.4	E0SH50	AGQVSMVAR
459.74	563.30	E0SH50_AQG_2y5	EANY	4		34.6	25.4	E0SH50	AGQVSMVAR
459.74	345.22	E0SH50_AQG_2y3	EANY	4		34.6	25.4	E0SH50	AGQVSMVAR
430.24	588.31	E0SG00_ASL_2y5	EANY	4		32.5	24.3	E0SG00	ASLEANVR
430.24	459.27	E0SG00_ASL_2y4	EANY	4		32.5	24.3	E0SG00	ASLEANVR
430.24	388.23	E0SG00_ASL_2y3	EANY	4		32.5	24.3	E0SG00	ASLEANVR
559.79	717.41	E0SHB7_AGS_2y7	EANY	4		41.9	29	E0SHB7	AGSDAAEVAVTK
559.79	646.38	E0SHB7_AGS_2y6	EANY	4		41.9	29	E0SHB7	AGSDAAEVAVTK
559.79	418.27	E0SHB7_AGS_2y4	EANY	4		41.9	29	E0SHB7	AGSDAAEVAVTK
457.76	687.38	E0SIV5_VQA_2y7	EANY	4		34.5	25.3	E0SIV5	VQALADAAR
457.76	503.26	E0SIV5_VQA_2y5	EANY	4		34.5	25.3	E0SIV5	VQALADAAR
457.76	317.19	E0SIV5_VQA_2y3	EANY	4		34.5	25.3	E0SIV5	VQALADAAR
463.77	685.40	E0SMN7_IQQ_2y6	EANY	4		34.9	25.6	E0SMN7	IQQITPAR
463.77	557.34	E0SMN7_IQQ_2y5	EANY	4		34.9	25.6	E0SMN7	IQQITPAR
463.77	343.21	E0SMN7_IQQ_2y3	EANY	4		34.9	25.6	E0SMN7	IQQITPAR
459.73	503.26	E0SEA5_TGA_2y5	EANY	4		34.6	25.4	E0SEA5	TGAWAAGER
459.73	432.22	E0SEA5_TGA_2y4	EANY	4		34.6	25.4	E0SEA5	TGAWAAGER
459.73	361.18	E0SEA5_TGA_2y3	EANY	4		34.6	25.4	E0SEA5	TGAWAAGER
404.20	565.27	E0SE30_IEQ_2y4	EANY	4		30.6	23.4	E0SE30	IEQFDR
404.20	437.21	E0SE30_IEQ_2y3	EANY	4		30.6	23.4	E0SE30	IEQFDR
404.20	290.15	E0SE30_IEQ_2y2	EANY	4		30.6	23.4	E0SE30	IEQFDR
523.28	632.34	E0SL89_LTN_3y6	EANY	4		39.3	26.1	E0SL89	LTNRPEPQESAVAR
523.28	503.29	E0SL89_LTN_3y5	EANY	4		39.3	26.1	E0SL89	LTNRPEPQESAVAR
523.28	727.87	E0SL89_LTN_3y13d	EANY	4		39.3	26.1	E0SL89	LTNRPEPQESAVAR
498.24	667.34	E0SH68_AAA_2y5	EANY	4		37.4	26.8	E0SH68	AAADYEVTR
498.24	504.28	E0SH68_AAA_2y4	EANY	4		37.4	26.8	E0SH68	AAADYEVTR
498.24	375.24	E0SH68_AAA_2y3	EANY	4		37.4	26.8	E0SH68	AAADYEVTR
479.28	629.37	E0SM68_ASA_2y6	EANY	4		36.1	26.1	E0SM68	ASAVAQAAR
479.28	558.34	E0SM68_ASA_2y5	EANY	4		36.1	26.1	E0SM68	ASAVAQAAR
479.28	445.25	E0SM68_ASA_2y4	EANY	4		36.1	26.1	E0SM68	ASAVAQAAR
400.73	588.31	E0SAY1_IVL_2y5	EANY	4		30.3	23.3	E0SAY1	IVLQDGR
400.73	475.23	E0SAY1_IVL_2y4	EANY	4		30.3	23.3	E0SAY1	IVLQDGR
400.73	347.17	E0SAY1_IVL_2y3	EANY	4		30.3	23.3	E0SAY1	IVLQDGR
496.25	558.29	scout_ATFNPAQDK_2y6	ATFN	1	25000	27.3	26.7		ATFNPAQDK
496.25	672.33	scout_ATFNPAQDK_2y5	ATFN	2		27.3	26.7		ATFNPAQDK
423.22	617.33	E0SGJ9_IDE_2y5	ATFN	4		32	24.1	E0SGJ9	IDELAER
423.22	488.28	E0SGJ9_IDE_2y4	ATFN	4		32	24.1	E0SGJ9	IDELAER
423.22	375.20	E0SGJ9_IDE_2y3	ATFN	4		32	24.1	E0SGJ9	IDELAER
498.24	553.32	E0SKL9_HDT_3y4	ATFN	4		37.4	24.7	E0SKL9	HDTLSEQELHQR
498.24	440.24	E0SKL9_HDT_3y3	ATFN	4		37.4	24.7	E0SKL9	HDTLSEQELHQR
498.24	303.18	E0SKL9_HDT_3y2	ATFN	4		37.4	24.7	E0SKL9	HDTLSEQELHQR
447.73	646.34	E0SDZ3_FTP_2y6	ATFN	4		33.8	25	E0SDZ3	FTPESVSK
447.73	549.29	E0SDZ3_FTP_2y5	ATFN	4		33.8	25	E0SDZ3	FTPESVSK
447.73	323.67	E0SDZ3_FTP_2y6d	ATFN	4		33.8	25	E0SDZ3	FTPESVSK
565.81	830.46	E0SBC7_ASA_2y8	ATFN	4		42.4	29.2	E0SBC7	ASAAITPVDSAK
565.81	717.38	E0SBC7_ASA_2y7	ATFN	4		42.4	29.2	E0SBC7	ASAAITPVDSAK
565.81	616.33	E0SBC7_ASA_2y6	ATFN	4		42.4	29.2	E0SBC7	ASAAITPVDSAK
451.26	602.33	E0SH80_TVV_2y6	ATFN	4		34	25.1	E0SH80	TVVGGDVR
451.26	503.26	E0SH80_TVV_2y5	ATFN	4		34	25.1	E0SH80	TVVGGDVR
451.26	274.19	E0SH80_TVV_2y2	ATFN	4		34	25.1	E0SH80	TVVGGDVR
443.26	629.40	E0SKR9_QQL_2y6	ATFN	4		33.4	24.8	E0SKR9	QQLAQLGK
443.26	516.31	E0SKR9_QQL_2y5	ATFN	4		33.4	24.8	E0SKR9	QQLAQLGK
443.26	317.22	E0SKR9_QQL_2y3	ATFN	4		33.4	24.8	E0SKR9	QQLAQLGK
412.22	561.30	E0SCV4_YVE_2y5	ATFN	4		31.2	23.7	E0SCV4	YVESLGR
412.22	432.26	E0SCV4_YVE_2y4	ATFN	4		31.2	23.7	E0SCV4	YVESLGR
412.22	345.22	E0SCV4_YVE_2y3	ATFN	4		31.2	23.7	E0SCV4	YVESLGR
528.81	701.42	E0SKS5_VAA_2y7	ATFN	4		39.7	27.9	E0SKS5	VAANTIPTAAK
528.81	600.37	E0SKS5_VAA_2y6	ATFN	4		39.7	27.9	E0SKS5	VAANTIPTAAK
528.81	487.29	E0SKS5_VAA_2y5	ATFN	4		39.7	27.9	E0SKS5	VAANTIPTAAK
464.76	645.33	E0SFR1_AVI_2y7	ATFN	4		35	25.6	E0SFR1	AVIGAEGGVR
464.76	517.27	E0SFR1_AVI_2y5	ATFN	4		35	25.6	E0SFR1	AVIGAEGGVR
464.76	388.23	E0SFR1_AVI_2y4	ATFN	4		35	25.6	E0SFR1	AVIGAEGGVR
403.54	820.43	E0SEN8_AVS_3y7	ATFN	4		30.5	19.5	E0SEN8	AVSMARPYDAK
403.54	593.29	E0SEN8_AVS_3y5	ATFN	4		30.5	19.5	E0SEN8	AVSMARPYDAK
403.54	519.76	E0SEN8_AVS_3y9d	ATFN	4		30.5	19.5	E0SEN8	AVSMARPYDAK
508.29	803.43	E0SC00_VLQ_2y7	ATFN	4		38.2	27.2	E0SC00	VLQQTLDK
508.29	547.31	E0SC00_VLQ_2y5	ATFN	4		38.2	27.2	E0SC00	VLQQTLDK
508.29	333.18	E0SC00_VLQ_2y3	ATFN	4		38.2	27.2	E0SC00	VLQQTLDK
429.74	545.30	E0SDK2_LAE_2y5	ATFN	4		32.4	24.3	E0SDK2	LAELGAER
429.74	432.22	E0SDK2_LAE_2y4	ATFN	4		32.4	24.3	E0SDK2	LAELGAER

429.74	375.20	E0SDK2_LAE_2y3	ATFN	4		32.4	24.3	E0SDK2	LAELGAER
569.74	575.28	E0SN89_FGD_2y5	ATFN	4		42.7	29.4	E0SN89	FGDDEDDVAR
569.74	460.25	E0SN89_FGD_2y4	ATFN	4		42.7	29.4	E0SN89	FGDDEDDVAR
569.74	345.22	E0SN89_FGD_2y3	ATFN	4		42.7	29.4	E0SN89	FGDDEDDVAR
450.25	671.37	E0SN84_LDQ_2y6	ATFN	4		33.9	25.1	E0SN84	LDQLPADK
450.25	543.31	E0SN84_LDQ_2y5	ATFN	4		33.9	25.1	E0SN84	LDQLPADK
450.25	430.23	E0SN84_LDQ_2y4	ATFN	4		33.9	25.1	E0SN84	LDQLPADK
450.25	333.18	E0SN84_LDQ_2y3	ATFN	4		33.9	25.1	E0SN84	LDQLPADK
555.32	901.55	E0SN12_HAQ_2y8	ATFN	4		41.6	28.8	E0SN12	HAQTSVLVVR
555.32	773.49	E0SN12_HAQ_2y7	ATFN	4		41.6	28.8	E0SN12	HAQTSVLVVR
555.32	672.44	E0SN12_HAQ_2y6	ATFN	4		41.6	28.8	E0SN12	HAQTSVLVVR
426.71	666.32	E0SHP8_SVF_2y6	ATFN	4		32.2	24.2	E0SHP8	SVFGADTR
426.71	519.25	E0SHP8_SVF_2y5	ATFN	4		32.2	24.2	E0SHP8	SVFGADTR
426.71	276.17	E0SHP8_SVF_2y2	ATFN	4		32.2	24.2	E0SHP8	SVFGADTR
498.23	518.26	E0SLK4_TDN_2y4	ATFN	4		37.4	26.8	E0SLK4	TDNFVEDR
498.23	419.19	E0SLK4_TDN_2y3	ATFN	4		37.4	26.8	E0SLK4	TDNFVEDR
498.23	290.15	E0SLK4_TDN_2y2	ATFN	4		37.4	26.8	E0SLK4	TDNFVEDR
579.79	503.28	E0SB15_SPD_2y4	ATFN	4		43.4	29.7	E0SB15	SPDEQVLDQK
579.79	390.20	E0SB15_SPD_2y3	ATFN	4		43.4	29.7	E0SB15	SPDEQVLDQK
579.79	275.17	E0SB15_SPD_2y2	ATFN	4		43.4	29.7	E0SB15	SPDEQVLDQK
421.76	616.34	E0SGG5_III_2y5	ATFN	4		31.9	24	E0SGG5	IIIEQAR
421.76	503.26	E0SGG5_III_2y4	ATFN	4		31.9	24	E0SGG5	IIIEQAR
421.76	374.21	E0SGG5_III_2y3	ATFN	4		31.9	24	E0SGG5	IIIEQAR
473.76	702.39	E0SB52_LML_2y6	ATFN	4		35.7	25.9	E0SB52	LMLQSAQR
473.76	589.31	E0SB52_LML_2y5	ATFN	4		35.7	25.9	E0SB52	LMLQSAQR
473.76	461.25	E0SB52_LML_2y4	ATFN	4		35.7	25.9	E0SB52	LMLQSAQR
428.75	486.30	E0SK30_ELQ_2y4	ATFN	4		32.4	24.3	E0SK30	ELQTIPR
428.75	385.26	E0SK30_ELQ_2y3	ATFN	4		32.4	24.3	E0SK30	ELQTIPR
428.75	272.17	E0SK30_ELQ_2y2	ATFN	4		32.4	24.3	E0SK30	ELQTIPR
451.26	673.40	E0SI62_IDA_2y7	ATFN	4		34	25.1	E0SI62	IDAAIAATR
451.26	531.32	E0SI62_IDA_2y5	ATFN	4		34	25.1	E0SI62	IDAAIAATR
451.26	418.24	E0SI62_IDA_2y4	ATFN	4		34	25.1	E0SI62	IDAAIAATR
405.22	575.31	E0SIW6_TSH_3y5	ATFN	4		30.7	19.6	E0SIW6	TSHITVVVSDR
405.22	476.25	E0SIW6_TSH_3y4	ATFN	4		30.7	19.6	E0SIW6	TSHITVVVSDR
405.22	377.18	E0SIW6_TSH_3y3	ATFN	4		30.7	19.6	E0SIW6	TSHITVVVSDR
421.26	543.35	E0SG98_AIN_2y5	ATFN	4		31.8	24	E0SG98	AINVVTPK
421.26	345.21	E0SG98_AIN_2y3	ATFN	4		31.8	24	E0SG98	AINVVTPK
523.29	760.39	G5DC24_TAI_2y6	ATFN	4		39.3	27.7	G5DC24	TAIQTEINR
523.29	632.34	G5DC24_TAI_2y5	ATFN	4		39.3	27.7	G5DC24	TAIQTEINR
523.29	531.29	G5DC24_TAI_2y4	ATFN	4		39.3	27.7	G5DC24	TAIQTEINR
468.25	644.37	Q93AT5_YQL_2y5	ATFN	4		35.3	25.7	Q93AT5	YQLVEQR
468.25	531.29	Q93AT5_YQL_2y4	ATFN	4		35.3	25.7	Q93AT5	YQLVEQR
468.25	303.18	Q93AT5_YQL_2y2	ATFN	4		35.3	25.7	Q93AT5	YQLVEQR
540.28	714.41	E0SBA4_HQA_3y6	ATFN	4		40.5	27	E0SBA4	HQAGAAPSNAPEVIR
540.28	617.36	E0SBA4_HQA_3y5	ATFN	4		40.5	27	E0SBA4	HQAGAAPSNAPEVIR
540.28	357.71	E0SBA4_HQA_3y6d	ATFN	4		40.5	27	E0SBA4	HQAGAAPSNAPEVIR
600.32	573.32	E0SHE0_ELQ_2y5	ATFN	4		44.9	30.5	E0SHE0	ELQQQIDPTK
600.32	460.24	E0SHE0_ELQ_2y4	ATFN	4		44.9	30.5	E0SHE0	ELQQQIDPTK
600.32	345.21	E0SHE0_ELQ_2y3	ATFN	4		44.9	30.5	E0SHE0	ELQQQIDPTK
525.75	763.38	E0SCD8_ASE_2y6	ATFN	4		39.4	27.8	E0SCD8	ASELQSMER
525.75	650.29	E0SCD8_ASE_2y5	ATFN	4		39.4	27.8	E0SCD8	ASELQSMER
525.75	522.23	E0SCD8_ASE_2y4	ATFN	4		39.4	27.8	E0SCD8	ASELQSMER
486.78	758.45	E0SFF7_DVT_2y7	ATFN	4		36.6	26.4	E0SFF7	DVTGQVVVR
486.78	657.40	E0SFF7_DVT_2y6	ATFN	4		36.6	26.4	E0SFF7	DVTGQVVVR
486.78	472.32	E0SFF7_DVT_2y4	ATFN	4		36.6	26.4	E0SFF7	DVTGQVVVR
472.73	715.39	E0SH20_NDP_2y6	ATFN	4		35.6	25.9	E0SH20	NDPLAMQR
472.73	505.26	E0SH20_NDP_2y4	ATFN	4		35.6	25.9	E0SH20	NDPLAMQR
472.73	358.20	E0SH20_NDP_2y6d	ATFN	4		35.6	25.9	E0SH20	NDPLAMQR
408.75	573.37	E0SGG8_AAT_2y5	ATFN	4		30.9	23.6	E0SGG8	AATATLLR
408.75	502.33	E0SGG8_AAT_2y4	ATFN	4		30.9	23.6	E0SGG8	AATATLLR
408.75	401.29	E0SGG8_AAT_2y3	ATFN	4		30.9	23.6	E0SGG8	AATATLLR
408.24	600.38	E0SEU9_TNL_2y5	ATFN	4		30.9	23.6	E0SEU9	TNLAQLR
408.24	487.30	E0SEU9_TNL_2y4	ATFN	4		30.9	23.6	E0SEU9	TNLAQLR
408.24	416.26	E0SEU9_TNL_2y3	ATFN	4		30.9	23.6	E0SEU9	TNLAQLR
465.77	746.40	E0SK68_AIA_2y8	ATFN	4		35.1	25.6	E0SK68	AIAAALES GK
465.77	675.37	E0SK68_AIA_2y7	ATFN	4		35.1	25.6	E0SK68	AIAAALES GK
465.77	291.17	E0SK68_AIA_2y3	ATFN	4		35.1	25.6	E0SK68	AIAAALES GK
428.20	579.29	E0SFZ2_FEQ_2y4	ATFN	4		32.3	24.3	E0SFZ2	FEQFER
428.20	451.23	E0SFZ2_FEQ_2y3	ATFN	4		32.3	24.3	E0SFZ2	FEQFER
428.20	304.16	E0SFZ2_FEQ_2y2	ATFN	4		32.3	24.3	E0SFZ2	FEQFER
465.77	558.34	E0SED0_TAS_2y5	ATFN	4		35.1	25.6	E0SED0	TASLIQAAR



465.77	445.25	E0SED0_TAS_2y4	ATFN	4		35.1	25.6	E0SED0	TASLIQAAR
465.77	317.19	E0SED0_TAS_2y3	ATFN	4		35.1	25.6	E0SED0	TASLIQAAR
501.25	613.37	E0SEZ2_SGE_2y5	ATFN	4		37.7	26.9	E0SEZ2	SGEDPVEIR
501.25	288.20	E0SEZ2_SGE_2y2	ATFN	4		37.7	26.9	E0SEZ2	SGEDPVEIR
501.25	307.19	E0SEZ2_SGE_2y5d	ATFN	4		37.7	26.9	E0SEZ2	SGEDPVEIR
458.76	702.38	E0SK68_LTA_2y6	ATFN	4		34.6	25.4	E0SK68	LTAIVEDR
458.76	631.34	E0SK68_LTA_2y5	ATFN	4		34.6	25.4	E0SK68	LTAIVEDR
458.76	518.26	E0SK68_LTA_2y4	ATFN	4		34.6	25.4	E0SK68	LTAIVEDR
473.25	633.32	E0SI61_QAL_2y5	ATFN	4		35.6	25.9	E0SI61	QALEESLR
473.25	504.28	E0SI61_QAL_2y4	ATFN	4		35.6	25.9	E0SI61	QALEESLR
473.25	375.24	E0SI61_QAL_2y3	ATFN	4		35.6	25.9	E0SI61	QALEESLR
521.29	601.33	E0SI61_ALQ_2y5	ATFN	4		39.1	27.6	E0SI61	ALQQTDIR
521.29	385.26	E0SI61_ALQ_2y3	ATFN	4		39.1	27.6	E0SI61	ALQQTDIR
521.29	272.17	E0SI61_ALQ_2y2	ATFN	4		39.1	27.6	E0SI61	ALQQTDIR
472.24	547.31	E0SHQ4_AHD_3y5	ATFN	4		35.5	23.3	E0SHQ4	AHDALTTSAVSDK
472.24	448.24	E0SHQ4_AHD_3y4	ATFN	4		35.5	23.3	E0SHQ4	AHDALTTSAVSDK
472.24	262.14	E0SHQ4_AHD_3y2	ATFN	4		35.5	23.3	E0SHQ4	AHDALTTSAVSDK
570.31	760.42	E0SFK8_EHL_2y7	ATFN	4		42.7	29.4	E0SFK8	EHLSQEVLGK
570.31	317.22	E0SFK8_EHL_2y3	ATFN	4		42.7	29.4	E0SFK8	EHLSQEVLGK
570.31	505.79	E0SFK8_EHL_2y9d	ATFN	4		42.7	29.4	E0SFK8	EHLSQEVLGK
499.90	824.38	E0SDE3_FRP_3y7	ATFN	4		37.6	24.8	E0SDE3	FRPGTDDGDYQVK
499.90	709.35	E0SDE3_FRP_3y6	ATFN	4		37.6	24.8	E0SDE3	FRPGTDDGDYQVK
499.90	537.30	E0SDE3_FRP_3y4	ATFN	4		37.6	24.8	E0SDE3	FRPGTDDGDYQVK
576.31	937.47	E0SB60_TLS_2y8	ATFN	4		43.1	29.6	E0SB60	TLSQYPVSTR
576.31	722.38	E0SB60_TLS_2y6	ATFN	4		43.1	29.6	E0SB60	TLSQYPVSTR
576.31	559.32	E0SB60_TLS_2y5	ATFN	4		43.1	29.6	E0SB60	TLSQYPVSTR
635.79	831.36	scout_LLYPSQDNDR_2y7	LYYP	1	80000	37.5	31.7		LYYPSQDNDR
635.79	416.18	scout_LLYPSQDNDR_2y7d	LYYP	2		37.5	31.7		LYYPSQDNDR
526.80	694.44	E0SEV2_DSG_2y6	LYYP	4		39.5	27.8	E0SEV2	DSGVIVIGHR
526.80	581.35	E0SEV2_DSG_2y5	LYYP	4		39.5	27.8	E0SEV2	DSGVIVIGHR
526.80	482.28	E0SEV2_DSG_2y4	LYYP	4		39.5	27.8	E0SEV2	DSGVIVIGHR
465.77	716.39	E0SAK1_LTA_2y6	LYYP	4		35.1	25.6	E0SAK1	LTAIVEER
465.77	532.27	E0SAK1_LTA_2y4	LYYP	4		35.1	25.6	E0SAK1	LTAIVEER
465.77	433.20	E0SAK1_LTA_2y3	LYYP	4		35.1	25.6	E0SAK1	LTAIVEER
523.27	648.29	E0SKU6_GLN_2y5	LYYP	4		39.3	27.7	E0SKU6	GLNLTDQQR
523.27	547.25	E0SKU6_GLN_2y4	LYYP	4		39.3	27.7	E0SKU6	GLNLTDQQR
523.27	303.18	E0SKU6_GLN_2y2	LYYP	4		39.3	27.7	E0SKU6	GLNLTDQQR
445.27	766.46	E0SCI6_IQA_3y7	LYYP	4		33.6	21.8	E0SCI6	IQAALATPPKPR
445.27	594.37	E0SCI6_IQA_3y5	LYYP	4		33.6	21.8	E0SCI6	IQAALATPPKPR
445.27	297.69	E0SCI6_IQA_3y5d	LYYP	4		33.6	21.8	E0SCI6	IQAALATPPKPR
442.26	657.35	E0SG26_L LH_2y5	LYYP	4		33.4	24.8	E0SG26	LLHTMLR
442.26	520.29	E0SG26_L LH_2y4	LYYP	4		33.4	24.8	E0SG26	LLHTMLR
442.26	329.18	E0SG26_L LH_2y5d	LYYP	4		33.4	24.8	E0SG26	LLHTMLR
652.32	847.41	E0SFV2_TQQ_2y8	LYYP	4		48.7	32.3	E0SFV2	TQQVDAVQ MAGR
652.32	732.38	E0SFV2_TQQ_2y7	LYYP	4		48.7	32.3	E0SFV2	TQQVDAVQ MAGR
652.32	661.35	E0SFV2_TQQ_2y6	LYYP	4		48.7	32.3	E0SFV2	TQQVDAVQ MAGR
417.23	613.37	E0SEQ9_GYV_2y5	LYYP	4		31.5	23.9	E0SEQ9	GYVIEPR
417.23	514.30	E0SEQ9_GYV_2y4	LYYP	4		31.5	23.9	E0SEQ9	GYVIEPR
417.23	272.17	E0SEQ9_GYV_2y2	LYYP	4		31.5	23.9	E0SEQ9	GYVIEPR
403.71	549.31	E0SIW3_EQF_2y4	LYYP	4		30.5	23.4	E0SIW3	EQFNLR
403.71	402.25	E0SIW3_EQF_2y3	LYYP	4		30.5	23.4	E0SIW3	EQFNLR
403.71	288.20	E0SIW3_EQF_2y2	LYYP	4		30.5	23.4	E0SIW3	EQFNLR
480.28	685.40	E0SB20_IQV_3y6	LYYP	4		36.1	23.7	E0SB20	IQVSPTKPLATQR
480.28	549.82	E0SB20_IQV_3y10d	LYYP	4		36.1	23.7	E0SB20	IQVSPTKPLATQR
480.28	506.30	E0SB20_IQV_3y9d	LYYP	4		36.1	23.7	E0SB20	IQVSPTKPLATQR
438.72	649.30	E0SD32_NID_2y5	LYYP	4		33.1	24.7	E0SD32	NIDEMVR
438.72	534.27	E0SD32_NID_2y4	LYYP	4		33.1	24.7	E0SD32	NIDEMVR
438.72	405.23	E0SD32_NID_2y3	LYYP	4		33.1	24.7	E0SD32	NIDEMVR
474.24	720.35	P0C1A1-ASSY_NLD_2y6	LYYP	4		35.7	25.9	P0C1A1	NLDITDTR
474.24	605.33	P0C1A1-ASSY_NLD_2y5	LYYP	4		35.7	25.9	P0C1A1	NLDITDTR
474.24	276.17	P0C1A1-ASSY_NLD_2y2	LYYP	4		35.7	25.9	P0C1A1	NLDITDTR
431.74	602.33	E0SL75_LFV_2y6	LYYP	4		32.6	24.4	E0SL75	LFVAEGAR
431.74	503.26	E0SL75_LFV_2y5	LYYP	4		32.6	24.4	E0SL75	LFVAEGAR
431.74	303.18	E0SL75_LFV_2y3	LYYP	4		32.6	24.4	E0SL75	LFVAEGAR
410.23	521.28	E0SIU8_ALN_2y5	LYYP	4		31	23.6	E0SIU8	ALNAAGFR
410.23	450.25	E0SIU8_ALN_2y4	LYYP	4		31	23.6	E0SIU8	ALNAAGFR
410.23	379.21	E0SIU8_ALN_2y3	LYYP	4		31	23.6	E0SIU8	ALNAAGFR
492.30	757.43	E0SB87_IIA_2y8	LYYP	4		37	26.6	E0SB87	IIAAGANVVR
492.30	686.39	E0SB87_IIA_2y7	LYYP	4		37	26.6	E0SB87	IIAAGANVVR
492.30	615.36	E0SB87_IIA_2y6	LYYP	4		37	26.6	E0SB87	IIAAGANVVR
487.27	761.38	E0SJV3_LVG_2y7	LYYP	4		36.6	26.4	E0SJV3	LVGEALSER

487.27	575.31	E0SJV3_LVG_2y5	LYYP	4		36.6	26.4	E0SJV3	LVGEALSER
487.27	504.28	E0SJV3_LVG_2y4	LYYP	4		36.6	26.4	E0SJV3	LVGEALSER
521.80	786.47	E0SLN0_QQL_2y7	LYYP	4		39.2	27.6	E0SLN0	QQLEQVGIK
521.80	673.39	E0SLN0_QQL_2y6	LYYP	4		39.2	27.6	E0SLN0	QQLEQVGIK
521.80	317.22	E0SLN0_QQL_2y3	LYYP	4		39.2	27.6	E0SLN0	QQLEQVGIK
558.29	814.41	E0SDD5_STI_2y7	LYYP	4		41.8	29	E0SDD5	STIDPAQEV
558.29	699.38	E0SDD5_STI_2y6	LYYP	4		41.8	29	E0SDD5	STIDPAQEV
558.29	350.19	E0SDD5_STI_2y6d	LYYP	4		41.8	29	E0SDD5	STIDPAQEV
528.79	761.38	P37984-SYFB_VVP_2y7	LYYP	4		39.7	27.9	P37984	VVPEAADISR
528.79	632.34	P37984-SYFB_VVP_2y6	LYYP	4		39.7	27.9	P37984	VVPEAADISR
528.79	429.72	P37984-SYFB_VVP_2y8d	LYYP	4		39.7	27.9	P37984	VVPEAADISR
401.73	558.34	E0SDF0_MIA_2y5	LYYP	4		30.4	23.3	E0SDF0	MIAALQR
401.73	487.30	E0SDF0_MIA_2y4	LYYP	4		30.4	23.3	E0SDF0	MIAALQR
401.73	303.18	E0SDF0_MIA_2y2	LYYP	4		30.4	23.3	E0SDF0	MIAALQR
481.27	733.42	E0SCE5_IDS_2y7	LYYP	4		36.2	26.2	E0SCE5	IDSLTAVSR
481.27	533.30	E0SCE5_IDS_2y5	LYYP	4		36.2	26.2	E0SCE5	IDSLTAVSR
481.27	432.26	E0SCE5_IDS_2y4	LYYP	4		36.2	26.2	E0SCE5	IDSLTAVSR
459.26	604.34	E0SMN0_ALE_2y6	LYYP	4		34.6	25.4	E0SMN0	ALESLATGR
459.26	404.23	E0SMN0_ALE_2y4	LYYP	4		34.6	25.4	E0SMN0	ALESLATGR
459.26	333.19	E0SMN0_ALE_2y3	LYYP	4		34.6	25.4	E0SMN0	ALESLATGR
703.35	904.47	E0SKW1_AGG_2y9	LYYP	4		52.4	34.2	E0SKW1	AGGGSATLSMGQAAAR
703.35	791.38	E0SKW1_AGG_2y8	LYYP	4		52.4	34.2	E0SKW1	AGGGSATLSMGQAAAR
703.35	573.31	E0SKW1_AGG_2y6	LYYP	4		52.4	34.2	E0SKW1	AGGGSATLSMGQAAAR
408.75	517.31	E0SI50_SVI_2y4	LYYP	4		30.9	23.6	E0SI50	SVIQTLR
408.75	389.25	E0SI50_SVI_2y3	LYYP	4		30.9	23.6	E0SI50	SVIQTLR
408.75	315.70	E0SI50_SVI_2y5d	LYYP	4		30.9	23.6	E0SI50	SVIQTLR
488.25	791.38	E0SCM3_ALD_2y7	LYYP	4		36.7	26.4	E0SCM3	ALDLSAEK
488.25	563.27	E0SCM3_ALD_2y5	LYYP	4		36.7	26.4	E0SCM3	ALDLSAEK
488.25	276.16	E0SCM3_ALD_2y2	LYYP	4		36.7	26.4	E0SCM3	ALDLSAEK
438.73	517.30	E0SGJ7_MEV_2y5	LYYP	4		33.1	24.7	E0SGJ7	MEVELAGK
438.73	388.26	E0SGJ7_MEV_2y4	LYYP	4		33.1	24.7	E0SGJ7	MEVELAGK
438.73	275.17	E0SGJ7_MEV_2y3	LYYP	4		33.1	24.7	E0SGJ7	MEVELAGK
445.74	591.32	E0SIW7_LGE_2y5	LYYP	4		33.6	24.9	E0SIW7	LGEFAPTR
445.74	444.26	E0SIW7_LGE_2y4	LYYP	4		33.6	24.9	E0SIW7	LGEFAPTR
445.74	373.22	E0SIW7_LGE_2y3	LYYP	4		33.6	24.9	E0SIW7	LGEFAPTR
485.93	744.44	E0SC08_FIQ_3y7	LYYP	4		36.5	24	E0SC08	FIQEGHQVIATGR
485.93	517.31	E0SC08_FIQ_3y5	LYYP	4		36.5	24	E0SC08	FIQEGHQVIATGR
485.93	404.23	E0SC08_FIQ_3y4	LYYP	4		36.5	24	E0SC08	FIQEGHQVIATGR
576.31	712.41	E0SEQ4_DVP_2y6	LYYP	4		43.1	29.6	E0SEQ4	DVPQALQPQR
576.31	400.23	E0SEQ4_DVP_2y3	LYYP	4		43.1	29.6	E0SEQ4	DVPQALQPQR
576.31	469.26	E0SEQ4_DVP_2y8d	LYYP	4		43.1	29.6	E0SEQ4	DVPQALQPQR
414.26	544.32	E0SNB0_IGL_2y5	LYYP	4		31.3	23.8	E0SNB0	IGLAVAQR
414.26	473.28	E0SNB0_IGL_2y4	LYYP	4		31.3	23.8	E0SNB0	IGLAVAQR
414.26	374.21	E0SNB0_IGL_2y3	LYYP	4		31.3	23.8	E0SNB0	IGLAVAQR
473.25	702.40	E0SCC5_DQV_2y6	LYYP	4		35.6	25.9	E0SCC5	DQVEVDLK
473.25	375.22	E0SCC5_DQV_2y3	LYYP	4		35.6	25.9	E0SCC5	DQVEVDLK
473.25	260.20	E0SCC5_DQV_2y2	LYYP	4		35.6	25.9	E0SCC5	DQVEVDLK
453.23	927.45	E0SHT4_VIS_3y9	LYYP	4		34.2	22.2	E0SHT4	VISMTEEGHLHGK
453.23	697.36	E0SHT4_VIS_3y7	LYYP	4		34.2	22.2	E0SHT4	VISMTEEGHLHGK
453.23	568.32	E0SHT4_VIS_3y6	LYYP	4		34.2	22.2	E0SHT4	VISMTEEGHLHGK
407.74	587.35	E0SKV8_AGV_2y5	LYYP	4		30.8	23.5	E0SKV8	AGVLAEVR
407.74	474.27	E0SKV8_AGV_2y4	LYYP	4		30.8	23.5	E0SKV8	AGVLAEVR
407.74	274.19	E0SKV8_AGV_2y2	LYYP	4		30.8	23.5	E0SKV8	AGVLAEVR
514.79	728.43	E0SH80_VSN_2y6	LYYP	4		38.6	27.4	E0SH80	VSNTPELLR
514.79	627.38	E0SH80_VSN_2y5	LYYP	4		38.6	27.4	E0SH80	VSNTPELLR
514.79	498.34	E0SH80_VSN_2y4	LYYP	4		38.6	27.4	E0SH80	VSNTPELLR
450.77	572.35	E0SGW7_TNL_2y6	LYYP	4		34	25.1	E0SGW7	TNLVGAVAR
450.77	473.28	E0SGW7_TNL_2y5	LYYP	4		34	25.1	E0SGW7	TNLVGAVAR
450.77	416.26	E0SGW7_TNL_2y4	LYYP	4		34	25.1	E0SGW7	TNLVGAVAR
507.80	773.45	E0SB54_QIL_2y7	LYYP	4		38.1	27.1	E0SB54	QILQSQLGK
507.80	532.31	E0SB54_QIL_2y5	LYYP	4		38.1	27.1	E0SB54	QILQSQLGK
507.80	317.22	E0SB54_QIL_2y3	LYYP	4		38.1	27.1	E0SB54	QILQSQLGK
479.27	715.41	O53007_LEV_2y6	LYYP	4		36.1	26.1	O53007	LEVVVNER
479.27	616.34	O53007_LEV_2y5	LYYP	4		36.1	26.1	O53007	LEVVVNER
479.27	517.27	O53007_LEV_2y4	LYYP	4		36.1	26.1	O53007	LEVVVNER
436.76	631.38	E0SKJ2_LQT_2y5	LYYP	4		33	24.6	E0SKJ2	LQTIER
436.76	417.25	E0SKJ2_LQT_2y3	LYYP	4		33	24.6	E0SKJ2	LQTIER
436.76	304.16	E0SKJ2_LQT_2y2	LYYP	4		33	24.6	E0SKJ2	LQTIER
606.34	770.42	E0SED3_VLT_2y8	LYYP	4		45.3	30.7	E0SED3	VLTQGEGAIPAR
606.34	584.35	E0SED3_VLT_2y6	LYYP	4		45.3	30.7	E0SED3	VLTQGEGAIPAR
606.34	343.21	E0SED3_VLT_2y3	LYYP	4		45.3	30.7	E0SED3	VLTQGEGAIPAR

471.78	671.41	scout_SLAPAVVTGK_2y7	SLAP	1	80000	25.5	25.8		SLAPAVVTGK
471.78	336.21	scout_SLAPAVVTGK_2y7d	SLAP	2		25.5	25.8		SLAPAVVTGK
548.32	885.49	E0SH44_LPL_2y8	SLAP	4		41.1	28.6	E0SH44	LPLGNAQQVR
548.32	772.41	E0SH44_LPL_2y7	SLAP	4		41.1	28.6	E0SH44	LPLGNAQQVR
548.32	491.78	E0SH44_LPL_2y9d	SLAP	4		41.1	28.6	E0SH44	LPLGNAQQVR
486.79	760.42	E0SMC8_LVG_2y8	SLAP	4		36.6	26.4	E0SMC8	LVGVSAEVAK
486.79	604.33	E0SMC8_LVG_2y6	SLAP	4		36.6	26.4	E0SMC8	LVGVSAEVAK
486.79	317.22	E0SMC8_LVG_2y3	SLAP	4		36.6	26.4	E0SMC8	LVGVSAEVAK
604.68	941.51	E0SIW0_HQK_3y9	SLAP	4		45.2	30.5	E0SIW0	HQKVPALNQP GGIVEK
604.68	699.40	E0SIW0_HQK_3y7	SLAP	4		45.2	30.5	E0SIW0	HQKVPALNQP GGIVEK
604.68	350.21	E0SIW0_HQK_3y7d	SLAP	4		45.2	30.5	E0SIW0	HQKVPALNQP GGIVEK
701.37	944.54	A5JMK3_GAS_2y10	SLAP	4		52.2	34.1	A5JMK3	GASQNIIPSTGAAK
701.37	831.46	A5JMK3_GAS_2y9	SLAP	4		52.2	34.1	A5JMK3	GASQNIIPSTGAAK
701.37	718.37	A5JMK3_GAS_2y8	SLAP	4		52.2	34.1	A5JMK3	GASQNIIPSTGAAK
474.26	489.30	E0SI38_ETD_2y5	SLAP	4		35.7	25.9	E0SI38	ETDLSAAIK
474.26	402.27	E0SI38_ETD_2y4	SLAP	4		35.7	25.9	E0SI38	ETDLSAAIK
474.26	260.20	E0SI38_ETD_2y2	SLAP	4		35.7	25.9	E0SI38	ETDLSAAIK
604.34	767.44	Q93AT7_LAQ_2y7	SLAP	4		45.2	30.6	Q93AT7	LAQQPDPIVR
604.34	555.36	Q93AT7_LAQ_2y5	SLAP	4		45.2	30.6	Q93AT7	LAQQPDPIVR
604.34	384.22	Q93AT7_LAQ_2y7d	SLAP	4		45.2	30.6	Q93AT7	LAQQPDPIVR
515.31	803.44	E0SG00_ILV_2y8	SLAP	4		38.7	27.4	E0SG00	ILVTGVASNR
515.31	704.37	E0SG00_ILV_2y7	SLAP	4		38.7	27.4	E0SG00	ILVTGVASNR
515.31	603.32	E0SG00_ILV_2y6	SLAP	4		38.7	27.4	E0SG00	ILVTGVASNR
474.26	674.38	E0SD74_TAT_2y6	SLAP	4		35.7	25.9	E0SD74	TATIDLSAR
474.26	561.30	E0SD74_TAT_2y5	SLAP	4		35.7	25.9	E0SD74	TATIDLSAR
474.26	446.27	E0SD74_TAT_2y4	SLAP	4		35.7	25.9	E0SD74	TATIDLSAR
451.28	588.35	E0SJY8_SII_2y6	SLAP	4		34	25.1	E0SJY8	SIITGAR
451.28	475.26	E0SJY8_SII_2y5	SLAP	4		34	25.1	E0SJY8	SIITGAR
451.28	404.23	E0SJY8_SII_2y4	SLAP	4		34	25.1	E0SJY8	SIITGAR
594.83	803.46	E0SK32_SAG_2y9	SLAP	4		44.5	30.3	E0SK32	SAGGIVLTGSAAGK
594.83	704.39	E0SK32_SAG_2y8	SLAP	4		44.5	30.3	E0SK32	SAGGIVLTGSAAGK
594.83	591.31	E0SK32_SAG_2y7	SLAP	4		44.5	30.3	E0SK32	SAGGIVLTGSAAGK
447.21	633.26	E0SKI8_FLE_2y5	SLAP	4		33.7	25	E0SKI8	FLEGYHQ
447.21	504.22	E0SKI8_FLE_2y4	SLAP	4		33.7	25	E0SKI8	FLEGYHQ
447.21	284.14	E0SKI8_FLE_2y2	SLAP	4		33.7	25	E0SKI8	FLEGYHQ
437.26	487.32	E0SCL0_TDA_2y4	SLAP	4		33	24.6	E0SCL0	TDAVINIK
437.26	374.24	E0SCL0_TDA_2y3	SLAP	4		33	24.6	E0SCL0	TDAVINIK
437.26	260.20	E0SCL0_TDA_2y2	SLAP	4		33	24.6	E0SCL0	TDAVINIK
536.79	670.42	P37982-IHFA_TGE_2y6	SLAP	4		40.2	28.2	P37982	TGEDIPITAR
536.79	557.34	P37982-IHFA_TGE_2y5	SLAP	4		40.2	28.2	P37982	TGEDIPITAR
536.79	279.17	P37982-IHFA_TGE_2y5d	SLAP	4		40.2	28.2	P37982	TGEDIPITAR
595.79	890.46	E0SBZ4_WNA_2y9	SLAP	4		44.6	30.3	E0SBZ4	WNASLQTGDAK
595.79	819.42	E0SBZ4_WNA_2y8	SLAP	4		44.6	30.3	E0SBZ4	WNASLQTGDAK
595.79	390.20	E0SBZ4_WNA_2y4	SLAP	4		44.6	30.3	E0SBZ4	WNASLQTGDAK
555.77	797.38	E0SIX3_EAI_2y7	SLAP	4		41.6	28.9	E0SIX3	EAI SYADSVR
555.77	710.35	E0SIX3_EAI_2y6	SLAP	4		41.6	28.9	E0SIX3	EAI SYADSVR
555.77	547.28	E0SIX3_EAI_2y5	SLAP	4		41.6	28.9	E0SIX3	EAI SYADSVR
498.80	826.48	E0SEV2_AVG_2y8	SLAP	4		37.5	26.8	E0SEV2	AVGAPNLQVK
498.80	698.42	E0SEV2_AVG_2y6	SLAP	4		37.5	26.8	E0SEV2	AVGAPNLQVK
498.80	349.71	E0SEV2_AVG_2y6d	SLAP	4		37.5	26.8	E0SEV2	AVGAPNLQVK
552.79	748.40	E0SGQ2_ENI_2y7	SLAP	4		41.4	28.8	E0SGQ2	ENIAPGFTQK
552.79	677.36	E0SGQ2_ENI_2y6	SLAP	4		41.4	28.8	E0SGQ2	ENIAPGFTQK
552.79	339.18	E0SGQ2_ENI_2y6d	SLAP	4		41.4	28.8	E0SGQ2	ENIAPGFTQK
482.92	941.48	E0SED9_YTG_3y9	SLAP	4		36.3	23.9	E0SED9	YTGAITGAEGTIHR
482.92	840.43	E0SED9_YTG_3y8	SLAP	4		36.3	23.9	E0SED9	YTGAITGAEGTIHR
482.92	583.33	E0SED9_YTG_3y5	SLAP	4		36.3	23.9	E0SED9	YTGAITGAEGTIHR
669.84	911.46	E0SIA7_QLA_2y8	SLAP	4		49.9	33	E0SIA7	QLADGYSQVTR
669.84	691.37	E0SIA7_QLA_2y6	SLAP	4		49.9	33	E0SIA7	QLADGYSQVTR
669.84	604.34	E0SIA7_QLA_2y5	SLAP	4		49.9	33	E0SIA7	QLADGYSQVTR
652.32	947.46	E0SKU6_AEG_2y9	SLAP	4		48.7	32.3	E0SKU6	AEGVVNQMAEAGK
652.32	848.39	E0SKU6_AEG_2y8	SLAP	4		48.7	32.3	E0SKU6	AEGVVNQMAEAGK
652.32	275.17	E0SKU6_AEG_2y3	SLAP	4		48.7	32.3	E0SKU6	AEGVVNQMAEAGK
672.84	671.42	E0SDZ1_TAE_2y6	SLAP	4		50.2	33.1	E0SDZ1	TAEDQVVG LQR
672.84	572.35	E0SDZ1_TAE_2y5	SLAP	4		50.2	33.1	E0SDZ1	TAEDQVVG LQR
672.84	473.28	E0SDZ1_TAE_2y4	SLAP	4		50.2	33.1	E0SDZ1	TAEDQVVG LQR
606.35	900.48	E0SIS7_VLV_2y8	SLAP	4		45.3	30.7	E0SIS7	VLVPTQEA VQK
606.35	803.43	E0SIS7_VLV_2y7	SLAP	4		45.3	30.7	E0SIS7	VLVPTQEA VQK
606.35	450.74	E0SIS7_VLV_2y8d	SLAP	4		45.3	30.7	E0SIS7	VLVPTQEA VQK
443.26	444.29	E0SDR7_SGS_2y4	SLAP	4		33.4	24.8	E0SDR7	SGSPLVIGR
443.26	345.22	E0SDR7_SGS_2y3	SLAP	4		33.4	24.8	E0SDR7	SGSPLVIGR
443.26	327.72	E0SDR7_SGS_2y6d	SLAP	4		33.4	24.8	E0SDR7	SGSPLVIGR

610.32	917.51	Q8RST5_SQS_2y8	SLAP	4		45.6	30.8	Q8RST5	SQSSLQTAIER
610.32	717.39	Q8RST5_SQS_2y6	SLAP	4		45.6	30.8	Q8RST5	SQSSLQTAIER
610.32	589.33	Q8RST5_SQS_2y5	SLAP	4		45.6	30.8	Q8RST5	SQSSLQTAIER
537.76	617.33	E0SDP5_VDG_2y7	SLAP	4		40.3	28.2	E0SDP5	VDGWADAAAAK
537.76	546.29	E0SDP5_VDG_2y6	SLAP	4		40.3	28.2	E0SDP5	VDGWADAAAAK
537.76	431.26	E0SDP5_VDG_2y5	SLAP	4		40.3	28.2	E0SDP5	VDGWADAAAAK
504.76	767.37	E0SMN4_GAI_2y6	SLAP	4		37.9	27	E0SMN4	GAISFTQER
504.76	680.34	E0SMN4_GAI_2y5	SLAP	4		37.9	27	E0SMN4	GAISFTQER
504.76	533.27	E0SMN4_GAI_2y4	SLAP	4		37.9	27	E0SMN4	GAISFTQER
466.75	618.34	Q9F496-OPGG_SNL_2y5	SLAP	4		35.1	25.7	Q9F496	SNLPAQFR
466.75	521.28	Q9F496-OPGG_SNL_2y4	SLAP	4		35.1	25.7	Q9F496	SNLPAQFR
466.75	309.67	Q9F496-OPGG_SNL_2y5d	SLAP	4		35.1	25.7	Q9F496	SNLPAQFR
508.75	602.33	E0SGX4_GLD_2y6	SLAP	4		38.2	27.2	E0SGX4	GLDEDAAGLR
508.75	487.30	E0SGX4_GLD_2y5	SLAP	4		38.2	27.2	E0SGX4	GLDEDAAGLR
508.75	416.26	E0SGX4_GLD_2y4	SLAP	4		38.2	27.2	E0SGX4	GLDEDAAGLR
468.76	660.37	Q93AU0_YLP_2y6	SLAP	4		35.3	25.7	Q93AU0	YLPTSSLR
468.76	563.31	Q93AU0_YLP_2y5	SLAP	4		35.3	25.7	Q93AU0	YLPTSSLR
468.76	330.69	Q93AU0_YLP_2y6d	SLAP	4		35.3	25.7	Q93AU0	YLPTSSLR
518.93	577.29	E0SC64_IH_3y5	SLAP	4		38.9	25.8	E0SC64	IEHWVGGATVSDR
518.93	476.25	E0SC64_IH_3y4	SLAP	4		38.9	25.8	E0SC64	IEHWVGGATVSDR
518.93	377.18	E0SC64_IH_3y3	SLAP	4		38.9	25.8	E0SC64	IEHWVGGATVSDR
601.32	803.43	E0SGT5_VDA_2y8	SLAP	4		45	30.5	E0SGT5	VDALATDVQAAK
601.32	732.39	E0SGT5_VDA_2y7	SLAP	4		45	30.5	E0SGT5	VDALATDVQAAK
601.32	516.31	E0SGT5_VDA_2y5	SLAP	4		45	30.5	E0SGT5	VDALATDVQAAK
654.33	879.43	E0SG89_VSE_2y8	SLAP	4		48.8	32.4	E0SG89	VSELGQGAYVER
654.33	822.41	E0SG89_VSE_2y7	SLAP	4		48.8	32.4	E0SG89	VSELGQGAYVER
654.33	694.35	E0SG89_VSE_2y6	SLAP	4		48.8	32.4	E0SG89	VSELGQGAYVER
542.79	721.44	E0SDK4_YAE_2y7	SLAP	4		40.7	28.4	E0SDK4	YAEPLAPPAR
542.79	511.30	E0SDK4_YAE_2y5	SLAP	4		40.7	28.4	E0SDK4	YAEPLAPPAR
542.79	440.26	E0SDK4_YAE_2y4	SLAP	4		40.7	28.4	E0SDK4	YAEPLAPPAR
486.78	744.44	E0SHD8_VEN_2y6	SLAP	4		36.6	26.4	E0SHD8	VENITQLR
486.78	517.31	E0SHD8_VEN_2y4	SLAP	4		36.6	26.4	E0SHD8	VENITQLR
486.78	416.26	E0SHD8_VEN_2y3	SLAP	4		36.6	26.4	E0SHD8	VENITQLR
568.81	687.41	E0SDJ7_GYA_2y7	SLAP	4		42.6	29.3	E0SDJ7	GYAGTVASGVVR
568.81	588.35	E0SDJ7_GYA_2y6	SLAP	4		42.6	29.3	E0SDJ7	GYAGTVASGVVR
568.81	517.31	E0SDJ7_GYA_2y5	SLAP	4		42.6	29.3	E0SDJ7	GYAGTVASGVVR
499.27	729.43	E0SNF0_ARP_3y6	SLAP	4		37.5	24.8	E0SNF0	ARPQGEQELAQLR
499.27	600.38	E0SNF0_ARP_3y5	SLAP	4		37.5	24.8	E0SNF0	ARPQGEQELAQLR
499.27	487.30	E0SNF0_ARP_3y4	SLAP	4		37.5	24.8	E0SNF0	ARPQGEQELAQLR
480.78	634.39	E0SFR7_TPQ_2y6	SLAP	4		36.2	26.2	E0SFR7	TPQAAVVFK
480.78	294.18	E0SFR7_TPQ_2y2	SLAP	4		36.2	26.2	E0SFR7	TPQAAVVFK
480.78	430.26	E0SFR7_TPQ_2y8d	SLAP	4		36.2	26.2	E0SFR7	TPQAAVVFK
360.71	506.27	scout_TLPS_2y4	TLPS	1	80000	17.4	21.8		TLPFSR
360.71	409.22	scout_TLPS_2y3	TLPS	2		17.4	21.8		TLPFSR
446.74	660.39	E0SJA9_TML_2y6	TLPS	4		33.7	24.9	E0SJA9	TMLETGLK
446.74	547.31	E0SJA9_TML_2y5	TLPS	4		33.7	24.9	E0SJA9	TMLETGLK
446.74	418.27	E0SJA9_TML_2y4	TLPS	4		33.7	24.9	E0SJA9	TMLETGLK
482.25	630.36	E0SJ78_FGE_2y5	TLPS	4		36.3	26.2	E0SJ78	FGEVDQIR
482.25	531.29	E0SJ78_FGE_2y4	TLPS	4		36.3	26.2	E0SJ78	FGEVDQIR
482.25	416.26	E0SJ78_FGE_2y3	TLPS	4		36.3	26.2	E0SJ78	FGEVDQIR
403.74	530.33	E0SKK1_LYG_2y5	TLPS	4		30.5	23.4	E0SKK1	LYGVLNK
403.74	374.24	E0SKK1_LYG_2y3	TLPS	4		30.5	23.4	E0SKK1	LYGVLNK
403.74	261.16	E0SKK1_LYG_2y2	TLPS	4		30.5	23.4	E0SKK1	LYGVLNK
457.28	701.39	E0SD71_VLV_2y6	TLPS	4		34.5	25.3	E0SD71	VLVEGLQR
457.28	602.33	E0SD71_VLV_2y5	TLPS	4		34.5	25.3	E0SD71	VLVEGLQR
457.28	473.28	E0SD71_VLV_2y4	TLPS	4		34.5	25.3	E0SD71	VLVEGLQR
436.75	575.30	E0SKR0_ALI_2y5	TLPS	4		33	24.6	E0SKR0	ALIMAPTR
436.75	444.26	E0SKR0_ALI_2y4	TLPS	4		33	24.6	E0SKR0	ALIMAPTR
436.75	373.22	E0SKR0_ALI_2y3	TLPS	4		33	24.6	E0SKR0	ALIMAPTR
499.79	658.35	E0SJW8_QLV_2y6	TLPS	4		37.6	26.8	E0SJW8	QLVSPDAR
499.79	545.27	E0SJW8_QLV_2y5	TLPS	4		37.6	26.8	E0SJW8	QLVSPDAR
499.79	458.24	E0SJW8_QLV_2y4	TLPS	4		37.6	26.8	E0SJW8	QLVSPDAR
500.81	830.50	E0SCD0_VAA_2y8	TLPS	4		37.6	26.9	E0SCD0	VAAEGVILTK
500.81	630.42	E0SCD0_VAA_2y6	TLPS	4		37.6	26.9	E0SCD0	VAAEGVILTK
500.81	361.24	E0SCD0_VAA_2y3	TLPS	4		37.6	26.9	E0SCD0	VAAEGVILTK
610.81	699.40	E0SF72_YTE_2y7	TLPS	4		45.6	30.8	E0SF72	YTEQGPEGLVK
610.81	642.38	E0SF72_YTE_2y6	TLPS	4		45.6	30.8	E0SF72	YTEQGPEGLVK
610.81	416.29	E0SF72_YTE_2y4	TLPS	4		45.6	30.8	E0SF72	YTEQGPEGLVK
406.26	585.34	E0SKF0_LIV_2y5	TLPS	4		30.7	23.5	E0SKF0	LIVV DPR
406.26	387.20	E0SKF0_LIV_2y3	TLPS	4		30.7	23.5	E0SKF0	LIVV DPR
406.26	272.17	E0SKF0_LIV_2y2	TLPS	4		30.7	23.5	E0SKF0	LIVV DPR

424.73	575.34	E0SC68_AAM_2y5	TLPS	4		32.1	24.1	E0SC68	AAMTDVLK
424.73	359.27	E0SC68_AAM_2y3	TLPS	4		32.1	24.1	E0SC68	AAMTDVLK
424.73	260.20	E0SC68_AAM_2y2	TLPS	4		32.1	24.1	E0SC68	AAMTDVLK
403.22	516.31	E0SKL9_MGT_2y4	TLPS	4		30.5	23.4	E0SKL9	MGTIDLR
403.22	288.20	E0SKL9_MGT_2y2	TLPS	4		30.5	23.4	E0SKL9	MGTIDLR
544.29	786.44	E0SB46_MVA_2y8	TLPS	4		40.8	28.5	E0SB46	MVAPVDGTIGK
544.29	590.31	E0SB46_MVA_2y6	TLPS	4		40.8	28.5	E0SB46	MVAPVDGTIGK
544.29	393.72	E0SB46_MVA_2y8d	TLPS	4		40.8	28.5	E0SB46	MVAPVDGTIGK
434.57	833.44	E0SJ64_AFL_3y9	TLPS	4		32.8	21.2	E0SJ64	AFLHAVDAASATK
434.57	406.23	E0SJ64_AFL_3y4	TLPS	4		32.8	21.2	E0SJ64	AFLHAVDAASATK
434.57	485.75	E0SJ64_AFL_3y10d	TLPS	4		32.8	21.2	E0SJ64	AFLHAVDAASATK
635.84	912.53	Q93KA5_ASE_2y9	TLPS	4		47.5	31.7	Q93KA5	ASEAPSNLAVVGR
635.84	501.31	Q93KA5_ASE_2y5	TLPS	4		47.5	31.7	Q93KA5	ASEAPSNLAVVGR
635.84	456.77	Q93KA5_ASE_2y9d	TLPS	4		47.5	31.7	Q93KA5	ASEAPSNLAVVGR
501.78	788.43	E0SFR1_TLA_2y8	TLPS	4		37.7	26.9	E0SFR1	TAAADALTR
501.78	717.39	E0SFR1_TLA_2y7	TLPS	4		37.7	26.9	E0SFR1	TAAADALTR
501.78	460.29	E0SFR1_TLA_2y4	TLPS	4		37.7	26.9	E0SFR1	TAAADALTR
612.82	817.42	E0SHQ9_APA_2y7	TLPS	4		45.8	30.9	E0SHQ9	APAPAYVPDAPR
612.82	555.29	E0SHQ9_APA_2y5	TLPS	4		45.8	30.9	E0SHQ9	APAPAYVPDAPR
612.82	343.21	E0SHQ9_APA_2y3	TLPS	4		45.8	30.9	E0SHQ9	APAPAYVPDAPR
461.75	646.35	E0SEU7_YLD_2y6	TLPS	4		34.8	25.5	E0SEU7	YLDGVTVR
461.75	531.32	E0SEU7_YLD_2y5	TLPS	4		34.8	25.5	E0SEU7	YLDGVTVR
461.75	375.24	E0SEU7_YLD_2y3	TLPS	4		34.8	25.5	E0SEU7	YLDGVTVR
464.28	713.43	E0SGJ7_TLA_2y7	TLPS	4		35	25.6	E0SGJ7	TLAITPGVR
464.28	529.31	E0SGJ7_TLA_2y5	TLPS	4		35	25.6	E0SGJ7	TLAITPGVR
464.28	428.26	E0SGJ7_TLA_2y4	TLPS	4		35	25.6	E0SGJ7	TLAITPGVR
630.82	931.47	E0SGF1_SLE_2y9	TLPS	4		47.1	31.6	E0SGF1	SLEEAGAEVEVK
630.82	802.43	E0SGF1_SLE_2y8	TLPS	4		47.1	31.6	E0SGF1	SLEEAGAEVEVK
630.82	731.39	E0SGF1_SLE_2y7	TLPS	4		47.1	31.6	E0SGF1	SLEEAGAEVEVK
499.29	669.40	E0SM26_SQL_2y6	TLPS	4		37.5	26.8	E0SM26	SQLPGIVQR
499.29	572.35	E0SM26_SQL_2y5	TLPS	4		37.5	26.8	E0SM26	SQLPGIVQR
499.29	335.21	E0SM26_SQL_2y6d	TLPS	4		37.5	26.8	E0SM26	SQLPGIVQR
552.81	787.43	E0SH96_AFV_2y7	TLPS	4		41.4	28.8	E0SH96	AFVEVGQVVK
552.81	658.39	E0SH96_AFV_2y6	TLPS	4		41.4	28.8	E0SH96	AFVEVGQVVK
552.81	559.32	E0SH96_AFV_2y5	TLPS	4		41.4	28.8	E0SH96	AFVEVGQVVK
524.79	531.31	E0SDK1_YSG_2y5	TLPS	4		39.4	27.7	E0SDK1	YSGPLVVEGK
524.79	432.25	E0SDK1_YSG_2y4	TLPS	4		39.4	27.7	E0SDK1	YSGPLVVEGK
524.79	371.23	E0SDK1_YSG_2y7d	TLPS	4		39.4	27.7	E0SDK1	YSGPLVVEGK
651.85	890.46	E0SG95_IEV_2y10	TLPS	4		48.6	32.3	E0SG95	IEVAGDAASGITAK
651.85	718.41	E0SG95_IEV_2y8	TLPS	4		48.6	32.3	E0SG95	IEVAGDAASGITAK
651.85	576.34	E0SG95_IEV_2y6	TLPS	4		48.6	32.3	E0SG95	IEVAGDAASGITAK
423.58	786.47	E0SHA3_TPG_3y7	TLPS	4		32	20.6	E0SHA3	TPGNIAAIRPMK
423.58	715.43	E0SHA3_TPG_3y6	TLPS	4		32	20.6	E0SHA3	TPGNIAAIRPMK
423.58	644.39	E0SHA3_TPG_3y5	TLPS	4		32	20.6	E0SHA3	TPGNIAAIRPMK
509.75	701.32	E0SBZ2_FGL_2y6	TLPS	4		38.3	27.2	E0SBZ2	FGLDPQEGR
509.75	586.29	E0SBZ2_FGL_2y5	TLPS	4		38.3	27.2	E0SBZ2	FGLDPQEGR
509.75	293.65	E0SBZ2_FGL_2y5d	TLPS	4		38.3	27.2	E0SBZ2	FGLDPQEGR
459.76	764.43	E0SAX8_GPG_2y8	TLPS	4		34.6	25.4	E0SAX8	GPGGGYLLGK
459.76	317.22	E0SAX8_GPG_2y3	TLPS	4		34.6	25.4	E0SAX8	GPGGGYLLGK
459.76	431.25	E0SAX8_GPG_2y9d	TLPS	4		34.6	25.4	E0SAX8	GPGGGYLLGK
452.26	677.34	E0SET8_LIS_2y7	TLPS	4		34.1	25.1	E0SET8	LISAVMGGR
452.26	519.27	E0SET8_LIS_2y5	TLPS	4		34.1	25.1	E0SET8	LISAVMGGR
452.26	420.20	E0SET8_LIS_2y4	TLPS	4		34.1	25.1	E0SET8	LISAVMGGR
478.78	673.36	E0SFN4_ALV_2y6	TLPS	4		36	26.1	E0SFN4	ALVNAELAR
478.78	559.32	E0SFN4_ALV_2y5	TLPS	4		36	26.1	E0SFN4	ALVNAELAR
478.78	488.28	E0SFN4_ALV_2y4	TLPS	4		36	26.1	E0SFN4	ALVNAELAR
479.94	689.38	E0SGE8_VTH_3y6	TLPS	4		36.1	23.7	E0SGE8	VTHAQVLEIAQTK
479.94	560.34	E0SGE8_VTH_3y5	TLPS	4		36.1	23.7	E0SGE8	VTHAQVLEIAQTK
479.94	447.26	E0SGE8_VTH_3y4	TLPS	4		36.1	23.7	E0SGE8	VTHAQVLEIAQTK
561.28	688.36	E0SDY6_QSA_2y6	TLPS	4		42	29.1	E0SDY6	QSAFLEAEAR
561.28	575.28	E0SDY6_QSA_2y5	TLPS	4		42	29.1	E0SDY6	QSAFLEAEAR
561.28	446.24	E0SDY6_QSA_2y4	TLPS	4		42	29.1	E0SDY6	QSAFLEAEAR
545.30	656.40	E0SHT4_FTG_2y6	TLPS	4		40.9	28.5	E0SHT4	FTGQVLPEAK
545.30	557.33	E0SHT4_FTG_2y5	TLPS	4		40.9	28.5	E0SHT4	FTGQVLPEAK
545.30	444.25	E0SHT4_FTG_2y4	TLPS	4		40.9	28.5	E0SHT4	FTGQVLPEAK
471.92	785.48	E0SN31_QHY_3y7	TLPS	4		35.5	23.3	E0SN31	QHYEATLEPVVK
471.92	684.43	E0SN31_QHY_3y6	TLPS	4		35.5	23.3	E0SN31	QHYEATLEPVVK
471.92	442.30	E0SN31_QHY_3y4	TLPS	4		35.5	23.3	E0SN31	QHYEATLEPVVK
595.64	646.35	E0SDM1_AMA_3y7	TLPS	4		44.5	30	E0SDM1	AMAGSVVHTGDIGAGNVTK
595.64	791.91	E0SDM1_AMA_3y17d	TLPS	4		44.5	30	E0SDM1	AMAGSVVHTGDIGAGNVTK
595.64	585.30	E0SDM1_AMA_3y12d	TLPS	4		44.5	30	E0SDM1	AMAGSVVHTGDIGAGNVTK

464.28	701.38	E0SH64_ILD_2y6	TLPS	4		35	25.6	E0SH64	ILDITPQK
464.28	473.27	E0SH64_ILD_2y4	TLPS	4		35	25.6	E0SH64	ILDITPQK
464.28	372.22	E0SH64_ILD_2y3	TLPS	4		35	25.6	E0SH64	ILDITPQK
505.27	638.40	E0SH47_YHV_3y6	TLPS	4		38	25.1	E0SH47	YHVANYQPVPVAR
505.27	442.28	E0SH47_YHV_3y4	TLPS	4		38	25.1	E0SH47	YHVANYQPVPVAR
478.78	673.36	E0SGG5_LAV_2y7	TLPS	4		36	26.1	E0SGG5	LAVDAGAIAR
478.78	558.34	E0SGG5_LAV_2y6	TLPS	4		36	26.1	E0SGG5	LAVDAGAIAR
478.78	487.30	E0SGG5_LAV_2y5	TLPS	4		36	26.1	E0SGG5	LAVDAGAIAR
528.27	773.44	E0SHW9_IVD_3y7	TLPS	4		39.6	26.3	E0SHW9	IVDESHETSPDLLK
528.27	735.36	E0SHW9_IVD_3y13d	TLPS	4		39.6	26.3	E0SHW9	IVDESHETSPDLLK
528.27	685.83	E0SHW9_IVD_3y12d	TLPS	4		39.6	26.3	E0SHW9	IVDESHETSPDLLK
529.30	772.43	E0SC47_TAI_2y7	TLPS	4		39.7	27.9	E0SC47	TAIVEGLAQR
529.30	673.36	E0SC47_TAI_2y6	TLPS	4		39.7	27.9	E0SC47	TAIVEGLAQR
529.30	544.32	E0SC47_TAI_2y5	TLPS	4		39.7	27.9	E0SC47	TAIVEGLAQR
464.78	744.43	E0SHR0_ALV_2y7	TLPS	4		35	25.6	E0SHR0	ALVAQLEGK
464.78	645.36	E0SHR0_ALV_2y6	TLPS	4		35	25.6	E0SHR0	ALVAQLEGK
464.78	446.26	E0SHR0_ALV_2y4	TLPS	4		35	25.6	E0SHR0	ALVAQLEGK
585.85	788.43	E0SC83_VAL_2y9	TLPS	4		43.8	29.9	E0SC83	VALVTGAGQGIGK
585.85	687.38	E0SC83_VAL_2y8	TLPS	4		43.8	29.9	E0SC83	VALVTGAGQGIGK
585.85	559.32	E0SC83_VAL_2y6	TLPS	4		43.8	29.9	E0SC83	VALVTGAGQGIGK
527.29	585.41	E0SM05_SDE_2y5	TLPS	4		39.6	27.8	E0SM05	SDEHLALLR
527.29	472.32	E0SM05_SDE_2y4	TLPS	4		39.6	27.8	E0SM05	SDEHLALLR
527.29	361.74	E0SM05_SDE_2y6d	TLPS	4		39.6	27.8	E0SM05	SDEHLALLR
542.31	671.38	E0SH53_EAV_2y7	TLPS	4		40.7	28.4	E0SH53	EAVLPSAVALR
542.31	574.33	E0SH53_EAV_2y6	TLPS	4		40.7	28.4	E0SH53	EAVLPSAVALR
542.31	336.20	E0SH53_EAV_2y7d	TLPS	4		40.7	28.4	E0SH53	EAVLPSAVALR
536.80	860.45	E0SLU3_LVV_2y8	TLPS	4		40.2	28.2	E0SLU3	LVVTADEGIR
536.80	761.38	E0SLU3_LVV_2y7	TLPS	4		40.2	28.2	E0SLU3	LVVTADEGIR
536.80	474.27	E0SLU3_LVV_2y4	TLPS	4		40.2	28.2	E0SLU3	LVVTADEGIR
487.30	661.92	Q93AU0_HLV_3y12d	TLPS	4		36.6	24.1	Q93AU0	HLVVALRPGITQR
487.30	605.37	Q93AU0_HLV_3y11d	TLPS	4		36.6	24.1	Q93AU0	HLVVALRPGITQR
487.30	555.84	Q93AU0_HLV_3y10d	TLPS	4		36.6	24.1	Q93AU0	HLVVALRPGITQR
482.27	779.44	E0SAY8_SPF_2y7	TLPS	4		36.3	26.2	E0SAY8	SPFVTSGIR
482.27	632.37	E0SAY8_SPF_2y6	TLPS	4		36.3	26.2	E0SAY8	SPFVTSGIR
482.27	533.30	E0SAY8_SPF_2y5	TLPS	4		36.3	26.2	E0SAY8	SPFVTSGIR
485.91	612.35	O07097_MLE_3y6	TLPS	4		36.5	24	O07097	MLEDQNLISAHGK
485.91	499.26	O07097_MLE_3y5	TLPS	4		36.5	24	O07097	MLEDQNLISAHGK
485.91	341.19	O07097_MLE_3y3	TLPS	4		36.5	24	O07097	MLEDQNLISAHGK
525.27	831.43	E0SKN9_AFA_2y8	TLPS	4		39.4	27.8	E0SKN9	AFADGVSNIAR
525.27	760.39	E0SKN9_AFA_2y7	TLPS	4		39.4	27.8	E0SKN9	AFADGVSNIAR
525.27	645.37	E0SKN9_AFA_2y6	TLPS	4		39.4	27.8	E0SKN9	AFADGVSNIAR
506.28	920.45	E0SE17_NLA_3y9	TLPS	4		38	25.1	E0SE17	NLALGKPAGEGTFNK
506.28	752.36	E0SE17_NLA_3y7	TLPS	4		38	25.1	E0SE17	NLALGKPAGEGTFNK
506.28	460.73	E0SE17_NLA_3y9d	TLPS	4		38	25.1	E0SE17	NLALGKPAGEGTFNK
653.34	895.42	E0SGM9_ITP_2y8	TLPS	4		48.7	32.4	E0SGM9	ITPVDEGYNVAK
653.34	780.39	E0SGM9_ITP_2y7	TLPS	4		48.7	32.4	E0SGM9	ITPVDEGYNVAK
653.34	546.27	E0SGM9_ITP_2y10d	TLPS	4		48.7	32.4	E0SGM9	ITPVDEGYNVAK
623.34	847.46	E0SNB0_VEG_2y9	TLPS	4		46.6	31.3	E0SNB0	VEGLIGSGATVSR
623.34	734.38	E0SNB0_VEG_2y8	TLPS	4		46.6	31.3	E0SNB0	VEGLIGSGATVSR
623.34	677.36	E0SNB0_VEG_2y7	TLPS	4		46.6	31.3	E0SNB0	VEGLIGSGATVSR
596.98	711.85	scout_GPIVH_2y12d	GPIVH	1	11000	34.6	30.1		GPIVHTDHSIDLVLEEK
596.98	643.32	scout_GPIVH_2y11d	GPIVH	2		34.6	30.1		GPIVHTDHSIDLVLEEK
429.22	673.32	E0SG26_AID_2y5	GPIVH	4		32.4	24.3	E0SG26	AIDFYTK
429.22	558.29	E0SG26_AID_2y4	GPIVH	4		32.4	24.3	E0SG26	AIDFYTK
429.22	411.22	E0SG26_AID_2y3	GPIVH	4		32.4	24.3	E0SG26	AIDFYTK
523.29	646.35	E0SGF0_GAL_2y6	GPIVH	4		39.3	27.7	E0SGF0	GALSAVVADSR
523.29	547.28	E0SGF0_GAL_2y5	GPIVH	4		39.3	27.7	E0SGF0	GALSAVVADSR
523.29	262.15	E0SGF0_GAL_2y2	GPIVH	4		39.3	27.7	E0SGF0	GALSAVVADSR
417.24	767.42	E0SKH9_AAN_3y6	GPIVH	4		31.5	20.3	E0SKH9	AANLIVLDHQR
417.24	668.35	E0SKH9_AAN_3y5	GPIVH	4		31.5	20.3	E0SKH9	AANLIVLDHQR
417.24	440.24	E0SKH9_AAN_3y3	GPIVH	4		31.5	20.3	E0SKH9	AANLIVLDHQR
562.80	799.36	E0SKJ7_IVL_2y7	GPIVH	4		42.1	29.1	E0SKJ7	IVLPEGDEPR
562.80	272.17	E0SKJ7_IVL_2y2	GPIVH	4		42.1	29.1	E0SKJ7	IVLPEGDEPR
562.80	400.18	E0SKJ7_IVL_2y7d	GPIVH	4		42.1	29.1	E0SKJ7	IVLPEGDEPR
551.96	867.50	E0SIW3_MQA_3y7	GPIVH	4		41.4	27.6	E0SIW3	MQAASGQLQQTLLK
551.96	739.45	E0SIW3_MQA_3y6	GPIVH	4		41.4	27.6	E0SIW3	MQAASGQLQQTLLK
551.96	611.39	E0SIW3_MQA_3y5	GPIVH	4		41.4	27.6	E0SIW3	MQAASGQLQQTLLK
461.94	613.37	E0SLM4_SAQ_3y10d	GPIVH	4		34.8	22.7	E0SLM4	SAQQIRPLTLTR
461.94	549.34	E0SLM4_SAQ_3y9d	GPIVH	4		34.8	22.7	E0SLM4	SAQQIRPLTLTR
461.94	485.31	E0SLM4_SAQ_3y8d	GPIVH	4		34.8	22.7	E0SLM4	SAQQIRPLTLTR
579.84	772.46	E0SLN0_SVT_2y7	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLN0	SVTVLSPTQVK

579.84	659.37	E0SLN0_SVT_2y6	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLN0	SVTVLSPTQVK
579.84	572.34	E0SLN0_SVT_2y5	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLN0	SVTVLSPTQVK
554.29	866.43	E0SBB7_LQE_2y8	GPIVH	4		41.5	28.8	E0SBB7	LQEFGGDITK
554.29	737.38	E0SBB7_LQE_2y7	GPIVH	4		41.5	28.8	E0SBB7	LQEFGGDITK
554.29	590.31	E0SBB7_LQE_2y6	GPIVH	4		41.5	28.8	E0SBB7	LQEFGGDITK
422.74	545.30	E0SIX7_WIV_2y5	GPIVH	4		31.9	24.1	E0SIX7	WIVEAAR
422.74	446.24	E0SIX7_WIV_2y4	GPIVH	4		31.9	24.1	E0SIX7	WIVEAAR
422.74	317.19	E0SIX7_WIV_2y3	GPIVH	4		31.9	24.1	E0SIX7	WIVEAAR
509.26	799.42	E0SDD4_IAG_3y7	GPIVH	4		38.2	25.3	E0SDD4	IAGPASTEATMIHAR
509.26	728.39	E0SDD4_IAG_3y6	GPIVH	4		38.2	25.3	E0SDD4	IAGPASTEATMIHAR
509.26	383.21	E0SDD4_IAG_3y3	GPIVH	4		38.2	25.3	E0SDD4	IAGPASTEATMIHAR
465.90	630.36	E0SG67_EGE_3y5	GPIVH	4		35.1	22.9	E0SG67	EGEAIEHPWVTK
465.90	384.21	E0SG67_EGE_3y6d	GPIVH	4		35.1	22.9	E0SG67	EGEAIEHPWVTK
465.90	267.16	E0SG67_EGE_3y4d	GPIVH	4		35.1	22.9	E0SG67	EGEAIEHPWVTK
593.81	945.46	E0SD44_QLD_2y8	GPIVH	4		44.4	30.2	E0SD44	QLDELGQVER
593.81	701.39	E0SD44_QLD_2y6	GPIVH	4		44.4	30.2	E0SD44	QLDELGQVER
593.81	588.31	E0SD44_QLD_2y5	GPIVH	4		44.4	30.2	E0SD44	QLDELGQVER
475.25	473.31	E0SIW4_EAF_2y5	GPIVH	4		35.8	26	E0SIW4	EAFELAAAK
475.25	360.22	E0SIW4_EAF_2y4	GPIVH	4		35.8	26	E0SIW4	EAFELAAAK
475.25	289.19	E0SIW4_EAF_2y3	GPIVH	4		35.8	26	E0SIW4	EAFELAAAK
665.36	927.49	E0SDX0_LFA_2y9	GPIVH	4		49.6	32.8	E0SDX0	LFAAAGQQAPEVK
665.36	856.45	E0SDX0_LFA_2y8	GPIVH	4		49.6	32.8	E0SDX0	LFAAAGQQAPEVK
665.36	472.28	E0SDX0_LFA_2y4	GPIVH	4		49.6	32.8	E0SDX0	LFAAAGQQAPEVK
616.31	659.35	E0SBI3_ELA_2y6	GPIVH	4		46	31	E0SBI3	ELAMQVADQAR
616.31	560.28	E0SBI3_ELA_2y5	GPIVH	4		46	31	E0SBI3	ELAMQVADQAR
616.31	374.21	E0SBI3_ELA_2y3	GPIVH	4		46	31	E0SBI3	ELAMQVADQAR
622.00	811.44	E0SDE0_ELP_3y16d	GPIVH	4		46.5	31.4	E0SDE0	ELPAEERPAAGAVINQAK
622.00	762.91	E0SDE0_ELP_3y15d	GPIVH	4		46.5	31.4	E0SDE0	ELPAEERPAAGAVINQAK
622.00	727.39	E0SDE0_ELP_3y14d	GPIVH	4		46.5	31.4	E0SDE0	ELPAEERPAAGAVINQAK
575.28	662.33	E0SET0_AST_2y5	GPIVH	4		43.1	29.6	E0SET0	ASTDILMDQR
575.28	549.24	E0SET0_AST_2y4	GPIVH	4		43.1	29.6	E0SET0	ASTDILMDQR
575.28	303.18	E0SET0_AST_2y2	GPIVH	4		43.1	29.6	E0SET0	ASTDILMDQR
568.78	860.41	E0SN70_IYL_2y7	GPIVH	4		42.6	29.3	E0SN70	IYLVDDQDR
568.78	747.33	E0SN70_IYL_2y6	GPIVH	4		42.6	29.3	E0SN70	IYLVDDQDR
568.78	533.23	E0SN70_IYL_2y4	GPIVH	4		42.6	29.3	E0SN70	IYLVDDQDR
642.86	928.51	E0SGE9_VGT_2y9	GPIVH	4		48	32	E0SGE9	VGTVTPNVAEAVK
642.86	827.46	E0SGE9_VGT_2y8	GPIVH	4		48	32	E0SGE9	VGTVTPNVAEAVK
642.86	414.23	E0SGE9_VGT_2y8d	GPIVH	4		48	32	E0SGE9	VGTVTPNVAEAVK
489.77	636.35	E0SBJ2_GAT_2y5	GPIVH	4		36.8	26.5	E0SBJ2	GATISFVQR
489.77	549.31	E0SBJ2_GAT_2y4	GPIVH	4		36.8	26.5	E0SBJ2	GATISFVQR
489.77	402.25	E0SBJ2_GAT_2y3	GPIVH	4		36.8	26.5	E0SBJ2	GATISFVQR
544.79	700.36	E0SHQ9_GIF_2y8	GPIVH	4		40.8	28.5	E0SHQ9	GIFAAPADAGAK
544.79	629.33	E0SHQ9_GIF_2y7	GPIVH	4		40.8	28.5	E0SHQ9	GIFAAPADAGAK
544.79	346.21	E0SHQ9_GIF_2y4	GPIVH	4		40.8	28.5	E0SHQ9	GIFAAPADAGAK
521.31	829.45	E0SIS8_VIE_2y7	GPIVH	4		39.1	27.6	E0SIS8	VIEGQINLR
521.31	700.41	E0SIS8_VIE_2y6	GPIVH	4		39.1	27.6	E0SIS8	VIEGQINLR
521.31	402.25	E0SIS8_VIE_2y3	GPIVH	4		39.1	27.6	E0SIS8	VIEGQINLR
415.91	784.53	E0SDD4_AEN_3y7	GPIVH	4		31.4	20.2	E0SDD4	AENFLTKPVVK
415.91	671.45	E0SDD4_AEN_3y6	GPIVH	4		31.4	20.2	E0SDD4	AENFLTKPVVK
415.91	442.30	E0SDD4_AEN_3y4	GPIVH	4		31.4	20.2	E0SDD4	AENFLTKPVVK
536.31	746.38	E0SFN4_VLL_2y8	GPIVH	4		40.2	28.2	E0SFN4	VLLVDGGGSVR
536.31	647.31	E0SFN4_VLL_2y7	GPIVH	4		40.2	28.2	E0SFN4	VLLVDGGGSVR
536.31	532.28	E0SFN4_VLL_2y6	GPIVH	4		40.2	28.2	E0SFN4	VLLVDGGGSVR
510.76	731.37	E0SH69_AAF_2y7	GPIVH	4		38.4	27.2	E0SH69	AAFDDAIAAR
510.76	616.34	E0SH69_AAF_2y6	GPIVH	4		38.4	27.2	E0SH69	AAFDDAIAAR
510.76	317.19	E0SH69_AAF_2y3	GPIVH	4		38.4	27.2	E0SH69	AAFDDAIAAR
460.92	674.36	E0SHH0_AAG_3y6	GPIVH	4		34.7	22.7	E0SHH0	AAGHAVTVPFTPGR
460.92	430.24	E0SHH0_AAG_3y4	GPIVH	4		34.7	22.7	E0SHH0	AAGHAVTVPFTPGR
460.92	329.19	E0SHH0_AAG_3y3	GPIVH	4		34.7	22.7	E0SHH0	AAGHAVTVPFTPGR
528.31	828.49	E0SKS4_VQA_2y8	GPIVH	4		39.6	27.9	E0SKS4	VQAGDVVIR
528.31	585.41	E0SKS4_VQA_2y5	GPIVH	4		39.6	27.9	E0SKS4	VQAGDVVIR
528.31	288.20	E0SKS4_VQA_2y2	GPIVH	4		39.6	27.9	E0SKS4	VQAGDVVIR
623.34	806.46	Q93AT7_VNP_2y8	GPIVH	4		46.6	31.3	Q93AT7	VNPELASSLTSK
623.34	693.38	Q93AT7_VNP_2y7	GPIVH	4		46.6	31.3	Q93AT7	VNPELASSLTSK
623.34	516.78	Q93AT7_VNP_2y10d	GPIVH	4		46.6	31.3	Q93AT7	VNPELASSLTSK
594.34	860.45	E0SFN6_ILT_2y8	GPIVH	4		44.4	30.3	E0SFN6	ILTEPSASLTR
594.34	731.40	E0SFN6_ILT_2y7	GPIVH	4		44.4	30.3	E0SFN6	ILTEPSASLTR
594.34	366.21	E0SFN6_ILT_2y7d	GPIVH	4		44.4	30.3	E0SFN6	ILTEPSASLTR
402.72	505.28	E0SIN8_ADL_2y4	GPIVH	4		30.5	23.4	E0SIN8	ADLLNMK
402.72	392.20	E0SIN8_ADL_2y3	GPIVH	4		30.5	23.4	E0SIN8	ADLLNMK
402.72	278.15	E0SIN8_ADL_2y2	GPIVH	4		30.5	23.4	E0SIN8	ADLLNMK

565.82	542.33	E0SLT6_SSV_2y6	GPIVH	4		42.4	29.2	E0SLT6	SSVTTTLGLAPGK
565.82	372.22	E0SLT6_SSV_2y4	GPIVH	4		42.4	29.2	E0SLT6	SSVTTTLGLAPGK
565.82	301.19	E0SLT6_SSV_2y3	GPIVH	4		42.4	29.2	E0SLT6	SSVTTTLGLAPGK
408.23	702.38	E0SAW1_ILG_2y6	GPIVH	4		30.9	23.6	E0SAW1	ILGIDER
408.23	589.29	E0SAW1_ILG_2y5	GPIVH	4		30.9	23.6	E0SAW1	ILGIDER
408.23	304.16	E0SAW1_ILG_2y2	GPIVH	4		30.9	23.6	E0SAW1	ILGIDER
516.80	587.35	E0SFS1_GQF_2y6	GPIVH	4		38.8	27.5	E0SFS1	GQFLIAAGQK
516.80	474.27	E0SFS1_GQF_2y5	GPIVH	4		38.8	27.5	E0SFS1	GQFLIAAGQK
516.80	403.23	E0SFS1_GQF_2y4	GPIVH	4		38.8	27.5	E0SFS1	GQFLIAAGQK
458.25	322.19	E0SFS1_HLY_3y2	GPIVH	4		34.5	22.5	E0SFS1	HLYVGVPRPEFR
458.25	618.35	E0SFS1_HLY_3y10d	GPIVH	4		34.5	22.5	E0SFS1	HLYVGVPRPEFR
458.25	561.81	E0SFS1_HLY_3y9d	GPIVH	4		34.5	22.5	E0SFS1	HLYVGVPRPEFR
482.28	666.38	E0SGU7_LYI_3y11d	GPIVH	4		36.3	23.8	E0SGU7	LYIVQARPETVR
482.28	584.84	E0SGU7_LYI_3y10d	GPIVH	4		36.3	23.8	E0SGU7	LYIVQARPETVR
482.28	528.30	E0SGU7_LYI_3y9d	GPIVH	4		36.3	23.8	E0SGU7	LYIVQARPETVR
426.92	588.37	E0SIA7_AIQ_3y6	GPIVH	4		32.2	20.8	E0SIA7	AIQHGLAIASGIK
426.92	475.29	E0SIA7_AIQ_3y5	GPIVH	4		32.2	20.8	E0SIA7	AIQHGLAIASGIK
426.92	404.25	E0SIA7_AIQ_3y4	GPIVH	4		32.2	20.8	E0SIA7	AIQHGLAIASGIK
515.26	792.36	E0SCI6_AIV_3y7	GPIVH	4		38.7	25.6	E0SCI6	AIVSHPPFGDNAYR
515.26	523.26	E0SCI6_AIV_3y4	GPIVH	4		38.7	25.6	E0SCI6	AIVSHPPFGDNAYR
515.26	680.33	E0SCI6_AIV_3y12d	GPIVH	4		38.7	25.6	E0SCI6	AIVSHPPFGDNAYR
450.77	673.40	A5JMW4_NLV_2y6	GPIVH	4		34	25.1	A5JMW4	NLVSQIAR
450.77	574.33	A5JMW4_NLV_2y5	GPIVH	4		34	25.1	A5JMW4	NLVSQIAR
450.77	359.24	A5JMW4_NLV_2y3	GPIVH	4		34	25.1	A5JMW4	NLVSQIAR
579.83	790.41	E0SLJ2_LAA_2y7	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLJ2	LAAITAQDSLRL
579.83	689.36	E0SLJ2_LAA_2y6	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLJ2	LAAITAQDSLRL
579.83	375.24	E0SLJ2_LAA_2y3	GPIVH	4		43.4	29.7	E0SLJ2	LAAITAQDSLRL
482.24	516.31	Q93KA9_AYH_3y4	GPIVH	4		36.3	23.8	Q93KA9	AYHVVEDDELVR
482.24	387.27	Q93KA9_AYH_3y3	GPIVH	4		36.3	23.8	Q93KA9	AYHVVEDDELVR
482.24	274.19	Q93KA9_AYH_3y2	GPIVH	4		36.3	23.8	Q93KA9	AYHVVEDDELVR
421.76	545.30	E0SB54_LAL_2y4	GPIVH	4		31.9	24	E0SB54	LALLEQR
421.76	432.22	E0SB54_LAL_2y3	GPIVH	4		31.9	24	E0SB54	LALLEQR
421.76	303.18	E0SB54_LAL_2y2	GPIVH	4		31.9	24	E0SB54	LALLEQR
442.73	636.34	E0SH07_TFA_2y6	GPIVH	4		33.4	24.8	E0SH07	TFAEAFK
442.73	436.26	E0SH07_TFA_2y4	GPIVH	4		33.4	24.8	E0SH07	TFAEAFK
442.73	365.22	E0SH07_TFA_2y3	GPIVH	4		33.4	24.8	E0SH07	TFAEAFK
745.38	904.44	E0SHF6_TVG_2y8	GPIVH	4		55.5	35.7	E0SHF6	TVGTQVDDGTLEVR
745.38	674.38	E0SHF6_TVG_2y6	GPIVH	4		55.5	35.7	E0SHF6	TVGTQVDDGTLEVR
745.38	274.19	E0SHF6_TVG_2y2	GPIVH	4		55.5	35.7	E0SHF6	TVGTQVDDGTLEVR
516.26	416.21	scout_LSPGGEEMR_2y5	LSPL	1	90000	28.8	27.4		LSPGGEEMR
516.26	621.23	scout_LSPGGEEMR_2y7d	LSPL	2		28.8	27.4		LSPGGEEMR
583.29	718.40	E0SJY7_DGQ_2y6	LSPL	4		43.6	29.9	E0SJY7	DGQFIEVTEK
583.29	605.31	E0SJY7_DGQ_2y5	LSPL	4		43.6	29.9	E0SJY7	DGQFIEVTEK
583.29	377.20	E0SJY7_DGQ_2y3	LSPL	4		43.6	29.9	E0SJY7	DGQFIEVTEK
454.91	633.32	E0SFN0_EFR_3y5	LSPL	4		34.3	22.3	E0SFN0	EFRPSIETVER
454.91	504.28	E0SFN0_EFR_3y4	LSPL	4		34.3	22.3	E0SFN0	EFRPSIETVER
454.91	304.16	E0SFN0_EFR_3y2	LSPL	4		34.3	22.3	E0SFN0	EFRPSIETVER
464.55	464.23	Q93KB7_AEY_3y8d	LSPL	4		35	22.9	Q93KB7	AEYTGWDGHLSR
464.55	684.34	Q93KB7_AEY_3y6	LSPL	4		35	22.9	Q93KB7	AEYTGWDGHLSR
464.55	569.32	Q93KB7_AEY_3y5	LSPL	4		35	22.9	Q93KB7	AEYTGWDGHLSR
521.31	657.37	E0SGF2_ISA_2y7	LSPL	4		39.1	27.6	E0SGF2	ISALGPGLTR
521.31	600.35	E0SGF2_ISA_2y6	LSPL	4		39.1	27.6	E0SGF2	ISALGPGLTR
521.31	329.19	E0SGF2_ISA_2y7d	LSPL	4		39.1	27.6	E0SGF2	ISALGPGLTR
589.31	846.47	E0SFS3_APY_2y7	LSPL	4		44.1	30.1	E0SFS3	APYTELIQR
589.31	759.44	E0SFS3_APY_2y6	LSPL	4		44.1	30.1	E0SFS3	APYTELIQR
589.31	553.80	E0SFS3_APY_2y9d	LSPL	4		44.1	30.1	E0SFS3	APYTELIQR
695.84	876.41	E0SGC2_MGV_2y7	LSPL	4		51.8	33.9	E0SGC2	MGVQVTDEQLDR
695.84	775.36	E0SGC2_MGV_2y6	LSPL	4		51.8	33.9	E0SGC2	MGVQVTDEQLDR
695.84	660.33	E0SGC2_MGV_2y5	LSPL	4		51.8	33.9	E0SGC2	MGVQVTDEQLDR
568.80	847.47	E0SC36_STT_2y7	LSPL	4		42.6	29.3	E0SC36	STTPYAEVIR
568.80	587.35	E0SC36_STT_2y5	LSPL	4		42.6	29.3	E0SC36	STTPYAEVIR
568.80	424.24	E0SC36_STT_2y7d	LSPL	4		42.6	29.3	E0SC36	STTPYAEVIR
455.29	711.48	E0SGE8_TPP_2y7	LSPL	4		34.3	25.2	E0SGE8	TPPAVLLK
455.29	404.77	E0SGE8_TPP_2y8d	LSPL	4		34.3	25.2	E0SGE8	TPPAVLLK
455.29	356.24	E0SGE8_TPP_2y7d	LSPL	4		34.3	25.2	E0SGE8	TPPAVLLK
669.32	865.42	E0SKZ6_EEL_2y8	LSPL	4		49.9	33	E0SKZ6	EELTEGGYNIGR
669.32	736.37	E0SKZ6_EEL_2y7	LSPL	4		49.9	33	E0SKZ6	EELTEGGYNIGR
669.32	679.35	E0SKZ6_EEL_2y6	LSPL	4		49.9	33	E0SKZ6	EELTEGGYNIGR
605.31	794.42	E0SLC2_TSN_2y7	LSPL	4		45.2	30.6	E0SLC2	TSNLSAAYR
605.31	680.37	E0SLC2_TSN_2y6	LSPL	4		45.2	30.6	E0SLC2	TSNLSAAYR
605.31	567.29	E0SLC2_TSN_2y5	LSPL	4		45.2	30.6	E0SLC2	TSNLSAAYR



467.75	688.36	E0SIU9_FVV_2y6	LSPL	4		35.2	25.7	E0SIU9	FVVEGDLR
467.75	460.25	E0SIU9_FVV_2y4	LSPL	4		35.2	25.7	E0SIU9	FVVEGDLR
467.75	288.20	E0SIU9_FVV_2y2	LSPL	4		35.2	25.7	E0SIU9	FVVEGDLR
441.77	656.37	E0SDS3_ILE_2y6	LSPL	4		33.3	24.8	E0SDS3	ILEVPVGR
441.77	527.33	E0SDS3_ILE_2y5	LSPL	4		33.3	24.8	E0SDS3	ILEVPVGR
441.77	428.26	E0SDS3_ILE_2y4	LSPL	4		33.3	24.8	E0SDS3	ILEVPVGR
478.77	643.34	E0SIU6_VTL_2y5	LSPL	4		36	26.1	E0SIU6	VTLEPLER
478.77	514.30	E0SIU6_VTL_2y4	LSPL	4		36	26.1	E0SIU6	VTLEPLER
478.77	257.65	E0SIU6_VTL_2y4d	LSPL	4		36	26.1	E0SIU6	VTLEPLER
531.80	844.49	E0SCC0_AFS_2y9	LSPL	4		39.9	28	E0SCC0	AFSGIVAGNVK
531.80	587.35	E0SCC0_AFS_2y6	LSPL	4		39.9	28	E0SCC0	AFSGIVAGNVK
531.80	488.28	E0SCC0_AFS_2y5	LSPL	4		39.9	28	E0SCC0	AFSGIVAGNVK
571.82	930.48	E0SIX2_LVD_2y8	LSPL	4		42.8	29.4	E0SIX2	LVDIVPETEK
571.82	702.37	E0SIX2_LVD_2y6	LSPL	4		42.8	29.4	E0SIX2	LVDIVPETEK
571.82	474.26	E0SIX2_LVD_2y4	LSPL	4		42.8	29.4	E0SIX2	LVDIVPETEK
472.76	718.35	Q05528-KDUD_LLA_2y6	LSPL	4		35.6	25.9	Q05528	LLANEWAK
472.76	647.31	Q05528-KDUD_LLA_2y5	LSPL	4		35.6	25.9	Q05528	LLANEWAK
472.76	404.23	Q05528-KDUD_LLA_2y3	LSPL	4		35.6	25.9	Q05528	LLANEWAK
468.27	712.47	E0SIN3_VLD_3y6	LSPL	4		35.3	23.1	E0SIN3	VLDEAYNKPLLK
468.27	470.33	E0SIN3_VLD_3y4	LSPL	4		35.3	23.1	E0SIN3	VLDEAYNKPLLK
468.27	595.82	E0SIN3_VLD_3y10d	LSPL	4		35.3	23.1	E0SIN3	VLDEAYNKPLLK
515.28	687.40	E0SEW8_GGD_2y6	LSPL	4		38.7	27.4	E0SEW8	GGDLVENVVK
515.28	588.34	E0SEW8_GGD_2y5	LSPL	4		38.7	27.4	E0SEW8	GGDLVENVVK
515.28	459.29	E0SEW8_GGD_2y4	LSPL	4		38.7	27.4	E0SEW8	GGDLVENVVK
507.28	543.31	E0SGM8_ELD_2y5	LSPL	4		38.1	27.1	E0SGM8	ELDLVKPAE
507.28	444.25	E0SGM8_ELD_2y4	LSPL	4		38.1	27.1	E0SGM8	ELDLVKPAE
507.28	316.15	E0SGM8_ELD_2y3	LSPL	4		38.1	27.1	E0SGM8	ELDLVKPAE
450.73	437.21	E0SI57_AHL_2b4	LSPL	4		34	25.1	E0SI57	AHLQVFA
450.73	565.27	E0SI57_AHL_2b5	LSPL	4		34	25.1	E0SI57	AHLQVFA
450.73	664.34	E0SI57_AHL_2b6	LSPL	4		34	25.1	E0SI57	AHLQVFA
405.23	452.25	E0SMY9_LPF_2y4	LSPL	4		30.7	23.4	E0SMY9	LPFAYAK
405.23	381.21	E0SMY9_LPF_2y3	LSPL	4		30.7	23.4	E0SMY9	LPFAYAK
405.23	348.69	E0SMY9_LPF_2y6d	LSPL	4		30.7	23.4	E0SMY9	LPFAYAK
624.32	815.44	E0SIU8_STP_2y8	LSPL	4		46.6	31.3	E0SIU8	STPFAAQVAAER
624.32	744.40	E0SIU8_STP_2y7	LSPL	4		46.6	31.3	E0SIU8	STPFAAQVAAER
624.32	530.28	E0SIU8_STP_2y10d	LSPL	4		46.6	31.3	E0SIU8	STPFAAQVAAER
446.91	845.44	E0SDN8_AAL_3y7	LSPL	4		33.7	21.9	E0SDN8	AALTHLEEGIER
446.91	732.35	E0SDN8_AAL_3y6	LSPL	4		33.7	21.9	E0SDN8	AALTHLEEGIER
446.91	491.75	E0SDN8_AAL_3y8d	LSPL	4		33.7	21.9	E0SDN8	AALTHLEEGIER
425.79	624.41	E0SD22_ILP_2y6	LSPL	4		32.2	24.2	E0SD22	ILPAPVIK
425.79	456.32	E0SD22_ILP_2y4	LSPL	4		32.2	24.2	E0SD22	ILPAPVIK
425.79	312.71	E0SD22_ILP_2y6d	LSPL	4		32.2	24.2	E0SD22	ILPAPVIK
469.74	726.31	E0SEU9_VIF_2y6	LSPL	4		35.4	25.8	E0SEU9	VIFMDEGK
469.74	448.20	E0SEU9_VIF_2y4	LSPL	4		35.4	25.8	E0SEU9	VIFMDEGK
469.74	333.18	E0SEU9_VIF_2y3	LSPL	4		35.4	25.8	E0SEU9	VIFMDEGK
540.78	852.45	E0SE41_VEF_2y8	LSPL	4		40.5	28.3	E0SE41	VEFEITSGAK
540.78	576.34	E0SE41_VEF_2y6	LSPL	4		40.5	28.3	E0SE41	VEFEITSGAK
540.78	463.25	E0SE41_VEF_2y5	LSPL	4		40.5	28.3	E0SE41	VEFEITSGAK
519.33	712.41	E0SKN4_LLV_2y7	LSPL	4		39	27.6	E0SKN4	LLVAAQAVPR
519.33	641.37	E0SKN4_LLV_2y6	LSPL	4		39	27.6	E0SKN4	LLVAAQAVPR
519.33	272.17	E0SKN4_LLV_2y2	LSPL	4		39	27.6	E0SKN4	LLVAAQAVPR
509.79	774.45	E0SHP0_MIT_2y8	LSPL	4		38.3	27.2	E0SHP0	MITVAGSIAR
509.79	574.33	E0SHP0_MIT_2y6	LSPL	4		38.3	27.2	E0SHP0	MITVAGSIAR
509.79	503.29	E0SHP0_MIT_2y5	LSPL	4		38.3	27.2	E0SHP0	MITVAGSIAR
533.77	806.37	A5JMQ6_FLQ_2y7	LSPL	4		40	28.1	A5JMQ6	FLQDEMGVK
533.77	678.31	A5JMQ6_FLQ_2y6	LSPL	4		40	28.1	A5JMQ6	FLQDEMGVK
533.77	303.20	A5JMQ6_FLQ_2y3	LSPL	4		40	28.1	A5JMQ6	FLQDEMGVK
608.78	715.30	E0SGT4_EIA_2y5	LSPL	4		45.5	30.8	E0SGT4	EIASTDDFYR
608.78	600.28	E0SGT4_EIA_2y4	LSPL	4		45.5	30.8	E0SGT4	EIASTDDFYR
608.78	485.25	E0SGT4_EIA_2y3	LSPL	4		45.5	30.8	E0SGT4	EIASTDDFYR
567.28	660.37	E0SDS4_AGD_2y6	LSPL	4		42.5	29.3	E0SDS4	AGDMVIDGSIR
567.28	547.28	E0SDS4_AGD_2y5	LSPL	4		42.5	29.3	E0SDS4	AGDMVIDGSIR
567.28	432.26	E0SDS4_AGD_2y4	LSPL	4		42.5	29.3	E0SDS4	AGDMVIDGSIR
729.37	860.41	E0SG50_LLD_2y8	LSPL	4		54.3	35.1	E0SG50	LLDAGQAGVEVDDR
729.37	789.37	E0SG50_LLD_2y7	LSPL	4		54.3	35.1	E0SG50	LLDAGQAGVEVDDR
729.37	290.15	E0SG50_LLD_2y2	LSPL	4		54.3	35.1	E0SG50	LLDAGQAGVEVDDR
494.28	759.44	E0SLA1_LDT_2y7	LSPL	4		37.1	26.7	E0SLA1	LDTAGLIER
494.28	658.39	E0SLA1_LDT_2y6	LSPL	4		37.1	26.7	E0SLA1	LDTAGLIER
494.28	587.35	E0SLA1_LDT_2y5	LSPL	4		37.1	26.7	E0SLA1	LDTAGLIER
501.30	789.44	E0SNF0_VLE_2y7	LSPL	4		37.7	26.9	E0SNF0	VLETLAEVK
501.30	559.34	E0SNF0_VLE_2y5	LSPL	4		37.7	26.9	E0SNF0	VLETLAEVK

501.30	446.26	E0SNF0_VLE_2y4	LSPL	4		37.7	26.9	E0SNF0	VLETLAEVK
411.56	657.40	E0SDV5_EGF_3y6	LSPL	4		31.1	20	E0SDV5	EGFELAVSRPK
411.56	586.37	E0SDV5_EGF_3y5	LSPL	4		31.1	20	E0SDV5	EGFELAVSRPK
411.56	487.30	E0SDV5_EGF_3y4	LSPL	4		31.1	20	E0SDV5	EGFELAVSRPK
485.76	647.30	E0SHB6_IPL_2y5	LSPL	4		36.5	26.3	E0SHB6	IPLDEDLR
485.76	288.20	E0SHB6_IPL_2y2	LSPL	4		36.5	26.3	E0SHB6	IPLDEDLR
485.76	429.22	E0SHB6_IPL_2y7d	LSPL	4		36.5	26.3	E0SHB6	IPLDEDLR
529.78	615.38	E0SEU6_DAE_2y5	LSPL	4		39.7	27.9	E0SEU6	DAEQDLVLR
529.78	387.27	E0SEU6_DAE_2y3	LSPL	4		39.7	27.9	E0SEU6	DAEQDLVLR
529.78	288.20	E0SEU6_DAE_2y2	LSPL	4		39.7	27.9	E0SEU6	DAEQDLVLR
516.80	660.39	Q937L1_LGT_2y6	LSPL	4		38.8	27.5	Q937L1	LGTTLTGELK
516.80	547.31	Q937L1_LGT_2y5	LSPL	4		38.8	27.5	Q937L1	LGTTLTGELK
516.80	260.20	Q937L1_LGT_2y2	LSPL	4		38.8	27.5	Q937L1	LGTTLTGELK
615.34	874.46	E0SD44_ELL_2y9	LSPL	4		46	31	E0SD44	ELLAGVATQAEK
615.34	803.43	E0SD44_ELL_2y8	LSPL	4		46	31	E0SD44	ELLAGVATQAEK
615.34	647.34	E0SD44_ELL_2y6	LSPL	4		46	31	E0SD44	ELLAGVATQAEK
607.35	701.39	E0SN74_LGL_2y6	LSPL	4		45.4	30.7	E0SN74	LGLTQQVVAER
607.35	573.34	E0SN74_LGL_2y5	LSPL	4		45.4	30.7	E0SN74	LGLTQQVVAER
607.35	474.27	E0SN74_LGL_2y4	LSPL	4		45.4	30.7	E0SN74	LGLTQQVVAER
471.22	664.32	E0SCI6_NYF_2y5	LSPL	4		35.5	25.8	E0SCI6	NYFNPMR
471.22	517.26	E0SCI6_NYF_2y4	LSPL	4		35.5	25.8	E0SCI6	NYFNPMR
471.22	403.21	E0SCI6_NYF_2y3	LSPL	4		35.5	25.8	E0SCI6	NYFNPMR
543.81	728.44	E0SLJ0_AGM_2y7	LSPL	4		40.8	28.4	E0SLJ0	AGMVAGVIVNR
543.81	657.40	E0SLJ0_AGM_2y6	LSPL	4		40.8	28.4	E0SLJ0	AGMVAGVIVNR
543.81	501.31	E0SLJ0_AGM_2y4	LSPL	4		40.8	28.4	E0SLJ0	AGMVAGVIVNR
671.35	831.42	scout_APAATVVDVDEVR_2y7	APAA	1	40000	40.1	33		APAATVVDVDEVR
671.35	635.84	scout_APAATVVDVDEVR_2y12d	APAA	2		40.1	33		APAATVVDVDEVR
538.77	704.41	E0SEZ3_EQD_2y6	APAA	4		40.4	28.3	E0SEZ3	EQDPTLAFR
538.77	393.22	E0SEZ3_EQD_2y3	APAA	4		40.4	28.3	E0SEZ3	EQDPTLAFR
538.77	352.71	E0SEZ3_EQD_2y6d	APAA	4		40.4	28.3	E0SEZ3	EQDPTLAFR
567.82	848.50	E0SIW8_SAG_2y7	APAA	4		42.5	29.3	E0SIW8	SAGAYVQIVAR
567.82	685.44	E0SIW8_SAG_2y6	APAA	4		42.5	29.3	E0SIW8	SAGAYVQIVAR
567.82	586.37	E0SIW8_SAG_2y5	APAA	4		42.5	29.3	E0SIW8	SAGAYVQIVAR
494.93	812.46	E0SD32_AYG_3y8	APAA	4		37.2	24.5	E0SD32	AYGIEHPEAGVALR
494.93	586.37	E0SD32_AYG_3y6	APAA	4		37.2	24.5	E0SD32	AYGIEHPEAGVALR
494.93	624.84	E0SD32_AYG_3y12d	APAA	4		37.2	24.5	E0SD32	AYGIEHPEAGVALR
522.78	785.45	E0SC51_QMD_2y7	APAA	4		39.2	27.7	E0SC51	QMDITPAIR
522.78	557.34	E0SC51_QMD_2y5	APAA	4		39.2	27.7	E0SC51	QMDITPAIR
522.78	456.29	E0SC51_QMD_2y4	APAA	4		39.2	27.7	E0SC51	QMDITPAIR
430.25	617.36	E0SIA5_LEL_2y5	APAA	4		32.5	24.3	E0SIA5	LELEISR
430.25	504.28	E0SIA5_LEL_2y4	APAA	4		32.5	24.3	E0SIA5	LELEISR
430.25	375.24	E0SIA5_LEL_2y3	APAA	4		32.5	24.3	E0SIA5	LELEISR
643.85	887.52	E0SDS5_AEA_2y8	APAA	4		48.1	32	E0SDS5	AEAQVIEQASK
643.85	788.45	E0SDS5_AEA_2y7	APAA	4		48.1	32	E0SDS5	AEAQVIEQASK
643.85	675.37	E0SDS5_AEA_2y6	APAA	4		48.1	32	E0SDS5	AEAQVIEQASK
523.28	803.43	E0SK30_IEE_2y7	APAA	4		39.3	27.7	E0SK30	IEEDLLGTR
523.28	446.27	E0SK30_IEE_2y4	APAA	4		39.3	27.7	E0SK30	IEEDLLGTR
523.28	333.19	E0SK30_IEE_2y3	APAA	4		39.3	27.7	E0SK30	IEEDLLGTR
529.30	729.43	E0SHB7_TVQ_2y7	APAA	4		39.7	27.9	E0SHB7	TVQAALDIAR
529.30	474.27	E0SHB7_TVQ_2y4	APAA	4		39.7	27.9	E0SHB7	TVQAALDIAR
529.30	359.24	E0SHB7_TVQ_2y3	APAA	4		39.7	27.9	E0SHB7	TVQAALDIAR
525.78	850.44	E0SIU7_LSD_2y7	APAA	4		39.4	27.8	E0SIU7	LSDYGVQLR
525.78	735.41	E0SIU7_LSD_2y6	APAA	4		39.4	27.8	E0SIU7	LSDYGVQLR
525.78	572.35	E0SIU7_LSD_2y5	APAA	4		39.4	27.8	E0SIU7	LSDYGVQLR
610.81	893.44	E0SI38_EVV_2y9	APAA	4		45.6	30.8	E0SI38	EVVEAEFAAAGK
610.81	764.39	E0SI38_EVV_2y8	APAA	4		45.6	30.8	E0SI38	EVVEAEFAAAGK
610.81	346.21	E0SI38_EVV_2y4	APAA	4		45.6	30.8	E0SI38	EVVEAEFAAAGK
640.33	859.48	E0SG96_YEQ_2y7	APAA	4		47.8	31.9	E0SG96	YEQQPAFLR
640.33	603.36	E0SG96_YEQ_2y5	APAA	4		47.8	31.9	E0SG96	YEQQPAFLR
640.33	288.20	E0SG96_YEQ_2y2	APAA	4		47.8	31.9	E0SG96	YEQQPAFLR
455.24	760.41	E0SLC3_YQA_3y6	APAA	4		34.3	22.4	E0SLC3	YQALQHSTLFR
455.24	623.35	E0SLC3_YQA_3y5	APAA	4		34.3	22.4	E0SLC3	YQALQHSTLFR
455.24	380.71	E0SLC3_YQA_3y6d	APAA	4		34.3	22.4	E0SLC3	YQALQHSTLFR
465.26	502.30	E0SLM4_QGI_2y4	APAA	4		35	25.6	E0SLM4	QGIEDIVR
465.26	387.27	E0SLM4_QGI_2y3	APAA	4		35	25.6	E0SLM4	QGIEDIVR
465.26	274.19	E0SLM4_QGI_2y2	APAA	4		35	25.6	E0SLM4	QGIEDIVR
482.76	647.35	E0SG52_GFL_2y7	APAA	4		36.3	26.2	E0SG52	GFLIGGTSGR
482.76	534.26	E0SG52_GFL_2y6	APAA	4		36.3	26.2	E0SG52	GFLIGGTSGR
482.76	477.24	E0SG52_GFL_2y5	APAA	4		36.3	26.2	E0SG52	GFLIGGTSGR
436.92	500.28	E0SBI4_EVP_3y4	APAA	4		33	21.4	E0SBI4	EVPLEIKPEVR
436.92	274.19	E0SBI4_EVP_3y2	APAA	4		33	21.4	E0SBI4	EVPLEIKPEVR

436.92	492.30	E0SBI4_EVP_3y8d	APAA	4		33	21.4	E0SBI4	EVPLEIKPEVR
563.32	557.38	E0SDQ3_LPD_2y5	APAA	4		42.2	29.1	E0SDQ3	LPDQDIIVVR
563.32	444.29	E0SDQ3_LPD_2y4	APAA	4		42.2	29.1	E0SDQ3	LPDQDIIVVR
563.32	506.77	E0SDQ3_LPD_2y9d	APAA	4		42.2	29.1	E0SDQ3	LPDQDIIVVR
474.27	634.37	E0SKN5_LAE_2y5	APAA	4		35.7	25.9	E0SKN5	LAEQAFLR
474.27	506.31	E0SKN5_LAE_2y4	APAA	4		35.7	25.9	E0SKN5	LAEQAFLR
474.27	288.20	E0SKN5_LAE_2y2	APAA	4		35.7	25.9	E0SKN5	LAEQAFLR
483.60	827.51	E0SBI4_IEG_3y7	APAA	4		36.4	23.9	E0SBI4	IEGGQHLNVNVL
483.60	714.43	E0SBI4_IEG_3y6	APAA	4		36.4	23.9	E0SBI4	IEGGQHLNVNVL
483.60	603.84	E0SBI4_IEG_3y11d	APAA	4		36.4	23.9	E0SBI4	IEGGQHLNVNVL
554.80	676.36	E0SDS2_VGY_2y6	APAA	4		41.6	28.8	E0SDS2	VGYLTVSTDR
554.80	577.29	E0SDS2_VGY_2y5	APAA	4		41.6	28.8	E0SDS2	VGYLTVSTDR
554.80	478.23	E0SDS2_VGY_2y4	APAA	4		41.6	28.8	E0SDS2	VGYLTVSTDR
562.33	741.40	E0SHQ0_VGI_2y7	APAA	4		42.1	29.1	E0SHQ0	VGILANVPANR
562.33	670.36	E0SHQ0_VGI_2y6	APAA	4		42.1	29.1	E0SHQ0	VGILANVPANR
562.33	457.25	E0SHQ0_VGI_2y4	APAA	4		42.1	29.1	E0SHQ0	VGILANVPANR
546.79	823.39	E0SFS3_VAV_2y7	APAA	4		41	28.5	E0SFS3	VAVFDTAVDR
546.79	676.33	E0SFS3_VAV_2y6	APAA	4		41	28.5	E0SFS3	VAVFDTAVDR
546.79	561.30	E0SFS3_VAV_2y5	APAA	4		41	28.5	E0SFS3	VAVFDTAVDR
575.79	890.42	E0SMZ4_IFL_2y8	APAA	4		43.1	29.6	E0SMZ4	IFLDASAEER
575.79	777.34	E0SMZ4_IFL_2y7	APAA	4		43.1	29.6	E0SMZ4	IFLDASAEER
575.79	662.31	E0SMZ4_IFL_2y6	APAA	4		43.1	29.6	E0SMZ4	IFLDASAEER
431.74	564.31	E0SLQ8_LGQ_2y4	APAA	4		32.6	24.4	E0SLQ8	LGQLEFR
431.74	451.23	E0SLQ8_LGQ_2y3	APAA	4		32.6	24.4	E0SLQ8	LGQLEFR
431.74	322.19	E0SLQ8_LGQ_2y2	APAA	4		32.6	24.4	E0SLQ8	LGQLEFR
445.76	614.36	E0SGM9_YLG_2y6	APAA	4		33.6	24.9	E0SGM9	YLGLTAPR
445.76	444.26	E0SGM9_YLG_2y4	APAA	4		33.6	24.9	E0SGM9	YLGLTAPR
445.76	272.17	E0SGM9_YLG_2y2	APAA	4		33.6	24.9	E0SGM9	YLGLTAPR
430.26	727.45	E0SN77_TFS_3y7	APAA	4		32.5	21	E0SN77	TFSIIKPNNAVAK
430.26	599.35	E0SN77_TFS_3y6	APAA	4		32.5	21	E0SN77	TFSIIKPNNAVAK
430.26	520.83	E0SN77_TFS_3y10d	APAA	4		32.5	21	E0SN77	TFSIIKPNNAVAK
460.59	816.45	E0SEZ5_LIA_3y8	APAA	4		34.7	22.6	E0SEZ5	LIAEHLDDAAAIAIK
460.59	577.30	E0SEZ5_LIA_3y11d	APAA	4		34.7	22.6	E0SEZ5	LIAEHLDDAAAIAIK
460.59	477.26	E0SEZ5_LIA_3y9d	APAA	4		34.7	22.6	E0SEZ5	LIAEHLDDAAAIAIK
557.81	686.42	E0SG89_EVA_2y6	APAA	4		41.8	28.9	E0SG89	EVAEIVEVAR
557.81	573.34	E0SG89_EVA_2y5	APAA	4		41.8	28.9	E0SG89	EVAEIVEVAR
557.81	474.27	E0SG89_EVA_2y4	APAA	4		41.8	28.9	E0SG89	EVAEIVEVAR
531.28	760.38	E0SG93_STL_2y6	APAA	4		39.8	28	E0SG93	STLDEVIER
531.28	645.36	E0SG93_STL_2y5	APAA	4		39.8	28	E0SG93	STLDEVIER
531.28	417.25	E0SG93_STL_2y3	APAA	4		39.8	28	E0SG93	STLDEVIER
406.77	600.38	E0SN89_LVI_2y6	APAA	4		30.8	23.5	E0SN89	LVIGIAAR
406.77	487.30	E0SN89_LVI_2y5	APAA	4		30.8	23.5	E0SN89	LVIGIAAR
406.77	317.19	E0SN89_LVI_2y3	APAA	4		30.8	23.5	E0SN89	LVIGIAAR
536.80	886.50	E0SKS5_SVD_2y9	APAA	4		40.2	28.2	E0SKS5	SVDGIQVGIGK
536.80	473.31	E0SKS5_SVD_2y5	APAA	4		40.2	28.2	E0SKS5	SVDGIQVGIGK
536.80	374.24	E0SKS5_SVD_2y4	APAA	4		40.2	28.2	E0SKS5	SVDGIQVGIGK
535.30	660.37	E0SG98_IAQ_3y6	APAA	4		40.1	26.7	E0SG98	IAQQHGIPVVIDSAR
535.30	561.30	E0SG98_IAQ_3y5	APAA	4		40.1	26.7	E0SG98	IAQQHGIPVVIDSAR
535.30	333.19	E0SG98_IAQ_3y3	APAA	4		40.1	26.7	E0SG98	IAQQHGIPVVIDSAR
671.85	760.39	E0SI88_TGL_2y7	APAA	4		50.1	33	E0SI88	TGLVPDDVTAQAR
671.85	546.30	E0SI88_TGL_2y5	APAA	4		50.1	33	E0SI88	TGLVPDDVTAQAR
671.85	486.74	E0SI88_TGL_2y9d	APAA	4		50.1	33	E0SI88	TGLVPDDVTAQAR
630.83	791.39	E0SGM8_LQD_2y7	APAA	4		47.1	31.6	E0SGM8	LQDLLSSEEAR
630.83	678.31	E0SGM8_LQD_2y6	APAA	4		47.1	31.6	E0SGM8	LQDLLSSEEAR
630.83	591.27	E0SGM8_LQD_2y5	APAA	4		47.1	31.6	E0SGM8	LQDLLSSEEAR
608.34	526.30	E0SL36_VVQ_3y4	APAA	4		45.5	30.7	E0SL36	VVQVGGVATGTTQVLHEK
608.34	413.21	E0SL36_VVQ_3y3	APAA	4		45.5	30.7	E0SL36	VVQVGGVATGTTQVLHEK
608.34	592.82	E0SL36_VVQ_3y11d	APAA	4		45.5	30.7	E0SL36	VVQVGGVATGTTQVLHEK
696.33	821.35	E0SLC4_AIE_2y7	APAA	4		51.9	33.9	E0SLC4	AIEGSLDEIDS DK
696.33	464.20	E0SLC4_AIE_2y4	APAA	4		51.9	33.9	E0SLC4	AIEGSLDEIDS DK
696.33	349.17	E0SLC4_AIE_2y3	APAA	4		51.9	33.9	E0SLC4	AIEGSLDEIDS DK
768.37	579.29	scout_NYTPQLSEAEVER_2y7	NYTP	1	5000	47.1	36.5		NYTPQLSEAEVER
768.37	819.38	scout_NYTPQLSEAEVER_2y10d	NYTP	2		47.1	36.5		NYTPQLSEAEVER
612.30	880.42	E0SF05_TEL_2y8	NYTP	4		45.8	30.9	E0SF05	TELFDTGVEVGR
612.30	733.35	E0SF05_TEL_2y7	NYTP	4		45.8	30.9	E0SF05	TELFDTGVEVGR
612.30	517.27	E0SF05_TEL_2y5	NYTP	4		45.8	30.9	E0SF05	TELFDTGVEVGR
706.40	871.50	E0SB47_AVA_2y8	NYTP	4		52.6	34.3	E0SB47	AVAEAVGEQAVIVR
706.40	685.44	E0SB47_AVA_2y6	NYTP	4		52.6	34.3	E0SB47	AVAEAVGEQAVIVR
706.40	387.27	E0SB47_AVA_2y3	NYTP	4		52.6	34.3	E0SB47	AVAEAVGEQAVIVR
438.27	430.30	E0SDE1_VAF_2y4	NYTP	4		33.1	24.6	E0SDE1	VAFQAVIK
438.27	260.20	E0SDE1_VAF_2y2	NYTP	4		33.1	24.6	E0SDE1	VAFQAVIK

438.27	353.22	E0SDE1_VAF_2y6d	NYTP	4		33.1	24.6	E0SDE1	VAFAQVIK
550.77	790.39	E0SKN9_YFG_2y8	NYTP	4		41.3	28.7	E0SKN9	YFGEDITAGK
550.77	376.22	E0SKN9_YFG_2y4	NYTP	4		41.3	28.7	E0SKN9	YFGEDITAGK
550.77	275.17	E0SKN9_YFG_2y3	NYTP	4		41.3	28.7	E0SKN9	YFGEDITAGK
494.77	788.41	E0SEZ7_SLA_2y8	NYTP	4		37.2	26.7	E0SEZ7	SLADIGDAVK
494.77	602.35	E0SEZ7_SLA_2y6	NYTP	4		37.2	26.7	E0SEZ7	SLADIGDAVK
494.77	489.27	E0SEZ7_SLA_2y5	NYTP	4		37.2	26.7	E0SEZ7	SLADIGDAVK
508.79	816.46	E0SMZ1_TVT_2y7	NYTP	4		38.2	27.2	E0SMZ1	TVTELLQGR
508.79	586.37	E0SMZ1_TVT_2y5	NYTP	4		38.2	27.2	E0SMZ1	TVTELLQGR
508.79	473.28	E0SMZ1_TVT_2y4	NYTP	4		38.2	27.2	E0SMZ1	TVTELLQGR
515.29	802.44	E0SFV4_NLA_2y7	NYTP	4		38.7	27.4	E0SFV4	NLALNIESR
515.29	731.40	E0SFV4_NLA_2y6	NYTP	4		38.7	27.4	E0SFV4	NLALNIESR
515.29	618.32	E0SFV4_NLA_2y5	NYTP	4		38.7	27.4	E0SFV4	NLALNIESR
492.78	758.38	E0SCU8_LLP_2y6	NYTP	4		37	26.6	E0SCU8	LLPAEQWK
492.78	661.33	E0SCU8_LLP_2y5	NYTP	4		37	26.6	E0SCU8	LLPAEQWK
492.78	379.70	E0SCU8_LLP_2y6d	NYTP	4		37	26.6	E0SCU8	LLPAEQWK
419.26	681.40	E0SKJ7_LSV_3y6	NYTP	4		31.7	20.4	E0SKJ7	LSVFKPIAQR
419.26	471.27	E0SKJ7_LSV_3y4	NYTP	4		31.7	20.4	E0SKJ7	LSVFKPIAQR
419.26	341.21	E0SKJ7_LSV_3y6d	NYTP	4		31.7	20.4	E0SKJ7	LSVFKPIAQR
527.77	778.38	E0SH69_LYI_2y6	NYTP	4		39.6	27.9	E0SH69	LYIETMER
527.77	665.29	E0SH69_LYI_2y5	NYTP	4		39.6	27.9	E0SH69	LYIETMER
527.77	536.25	E0SH69_LYI_2y4	NYTP	4		39.6	27.9	E0SH69	LYIETMER
408.25	516.31	P42195-PECS_VSL_2y4	NYTP	4		30.9	23.6	P42195	VSLIDR
408.25	403.23	P42195-PECS_VSL_2y3	NYTP	4		30.9	23.6	P42195	VSLIDR
408.25	290.15	P42195-PECS_VSL_2y2	NYTP	4		30.9	23.6	P42195	VSLIDR
409.55	784.39	E0SHB8_DLL_3y6	NYTP	4		31	19.9	E0SHB8	DLLTTEHIR
409.55	683.35	E0SHB8_DLL_3y5	NYTP	4		31	19.9	E0SHB8	DLLTTEHIR
409.55	554.30	E0SHB8_DLL_3y4	NYTP	4		31	19.9	E0SHB8	DLLTTEHIR
692.35	831.44	E0SMU7_NNP_2y7	NYTP	4		51.6	33.8	E0SMU7	NNPNYPPADIR
692.35	668.37	E0SMU7_NNP_2y6	NYTP	4		51.6	33.8	E0SMU7	NNPNYPPADIR
692.35	288.20	E0SMU7_NNP_2y2	NYTP	4		51.6	33.8	E0SMU7	NNPNYPPADIR
538.28	849.38	E0SJT3_ILV_2y7	NYTP	4		40.4	28.2	E0SJT3	ILVVDDMR
538.28	750.31	E0SJT3_ILV_2y6	NYTP	4		40.4	28.2	E0SJT3	ILVVDDMR
538.28	306.16	E0SJT3_ILV_2y2	NYTP	4		40.4	28.2	E0SJT3	ILVVDDMR
514.81	816.46	E0SDX4_VLL_2y7	NYTP	4		38.6	27.4	E0SDX4	VLLSAQLER
514.81	703.37	E0SDX4_VLL_2y6	NYTP	4		38.6	27.4	E0SDX4	VLLSAQLER
514.81	616.34	E0SDX4_VLL_2y5	NYTP	4		38.6	27.4	E0SDX4	VLLSAQLER
596.82	916.48	E0SDV6_LYL_2y8	NYTP	4		44.6	30.3	E0SDV6	LYLSQDIGQR
596.82	803.40	E0SDV6_LYL_2y7	NYTP	4		44.6	30.3	E0SDV6	LYLSQDIGQR
596.82	473.28	E0SDV6_LYL_2y4	NYTP	4		44.6	30.3	E0SDV6	LYLSQDIGQR
526.81	826.44	E0SE86_LLT_2y7	NYTP	4		39.5	27.8	E0SE86	LLTLQPDRP
526.81	484.25	E0SE86_LLT_2y4	NYTP	4		39.5	27.8	E0SE86	LLTLQPDRP
526.81	272.17	E0SE86_LLT_2y2	NYTP	4		39.5	27.8	E0SE86	LLTLQPDRP
491.61	834.45	E0SLG6_ALN_3y7	NYTP	4		37	24.3	E0SLG6	ALNLGVAPEHINPK
491.61	453.25	E0SLG6_ALN_3y8d	NYTP	4		37	24.3	E0SLG6	ALNLGVAPEHINPK
491.61	417.73	E0SLG6_ALN_3y7d	NYTP	4		37	24.3	E0SLG6	ALNLGVAPEHINPK
473.26	685.36	E0SIU5_LFN_2y6	NYTP	4		35.6	25.9	E0SIU5	LFNELGPR
473.26	442.28	E0SIU5_LFN_2y4	NYTP	4		35.6	25.9	E0SIU5	LFNELGPR
473.26	329.19	E0SIU5_LFN_2y3	NYTP	4		35.6	25.9	E0SIU5	LFNELGPR
526.77	703.37	E0SFM1_YSV_2y6	NYTP	4		39.5	27.8	E0SFM1	YSVSDVINR
526.77	616.34	E0SFM1_YSV_2y5	NYTP	4		39.5	27.8	E0SFM1	YSVSDVINR
526.77	501.31	E0SFM1_YSV_2y4	NYTP	4		39.5	27.8	E0SFM1	YSVSDVINR
557.31	786.44	E0SGF1_DLV_2y8	NYTP	4		41.7	28.9	E0SGF1	DLVESAPAALK
557.31	657.39	E0SGF1_DLV_2y7	NYTP	4		41.7	28.9	E0SGF1	DLVESAPAALK
557.31	499.32	E0SGF1_DLV_2y5	NYTP	4		41.7	28.9	E0SGF1	DLVESAPAALK
578.81	844.43	E0SG51_AVA_2y7	NYTP	4		43.3	29.7	E0SG51	AVAAALEQMPR
578.81	773.40	E0SG51_AVA_2y6	NYTP	4		43.3	29.7	E0SG51	AVAAALEQMPR
578.81	660.31	E0SG51_AVA_2y5	NYTP	4		43.3	29.7	E0SG51	AVAAALEQMPR
475.26	607.32	E0SKI2_ATG_2y5	NYTP	4		35.8	26	E0SKI2	ATGIAFDVR
475.26	536.28	E0SKI2_ATG_2y4	NYTP	4		35.8	26	E0SKI2	ATGIAFDVR
475.26	274.19	E0SKI2_ATG_2y2	NYTP	4		35.8	26	E0SKI2	ATGIAFDVR
400.26	401.29	E0SIW6_LVA_2y3	NYTP	4		30.3	23.3	E0SIW6	LVADLIR
400.26	587.35	E0SIW6_LVA_2y5	NYTP	4		30.3	23.3	E0SIW6	LVADLIR
400.26	516.31	E0SIW6_LVA_2y4	NYTP	4		30.3	23.3	E0SIW6	LVADLIR
539.29	650.36	E0SKY2_ALQ_2y6	NYTP	4		40.4	28.3	E0SKY2	ALQDASGFIR
539.29	579.32	E0SKY2_ALQ_2y5	NYTP	4		40.4	28.3	E0SKY2	ALQDASGFIR
539.29	288.20	E0SKY2_ALQ_2y2	NYTP	4		40.4	28.3	E0SKY2	ALQDASGFIR
570.32	656.37	E0SH81_VGD_2y6	NYTP	4		42.7	29.4	E0SH81	VGDVIVAVDPR
570.32	557.30	E0SH81_VGD_2y5	NYTP	4		42.7	29.4	E0SH81	VGDVIVAVDPR
570.32	272.17	E0SH81_VGD_2y2	NYTP	4		42.7	29.4	E0SH81	VGDVIVAVDPR
493.29	616.37	E0SK33_GVN_2y6	NYTP	4		37.1	26.6	E0SK33	GVNVLADAVK

493.29	503.28	E0SK33_GVN_2y5	NYTP	4		37.1	26.6	E0SK33	GVNVLADAVK
493.29	317.22	E0SK33_GVN_2y3	NYTP	4		37.1	26.6	E0SK33	GVNVLADAVK
574.98	576.31	E0SFN0_AVV_3y5	NYTP	4		43	28.9	E0SFN0	AVVLDHDANIVSVSQR
574.98	675.38	E0SFN0_AVV_3y6	NYTP	4		43	28.9	E0SFN0	AVVLDHDANIVSVSQR
574.98	390.21	E0SFN0_AVV_3y3	NYTP	4		43	28.9	E0SFN0	AVVLDHDANIVSVSQR
529.26	873.43	E0SH96_SPM_2y7	NYTP	4		39.7	27.9	E0SH96	SPMVGTFYR
529.26	742.39	E0SH96_SPM_2y6	NYTP	4		39.7	27.9	E0SH96	SPMVGTFYR
529.26	643.32	E0SH96_SPM_2y5	NYTP	4		39.7	27.9	E0SH96	SPMVGTFYR
521.80	815.46	E0SG23_VQG_2y7	NYTP	4		39.2	27.6	E0SG23	VQGVLEIR
521.80	659.37	E0SG23_VQG_2y5	NYTP	4		39.2	27.6	E0SG23	VQGVLEIR
521.80	288.20	E0SG23_VQG_2y2	NYTP	4		39.2	27.6	E0SG23	VQGVLEIR
678.38	815.46	E0SKS4_LVA_2y9	NYTP	4		50.6	33.3	E0SKS4	LVAEQIEAAGGVAK
678.38	702.38	E0SKS4_LVA_2y8	NYTP	4		50.6	33.3	E0SKS4	LVAEQIEAAGGVAK
678.38	502.30	E0SKS4_LVA_2y6	NYTP	4		50.6	33.3	E0SKS4	LVAEQIEAAGGVAK
523.29	473.75	scout_VPSVYPLDR_2y4	VPSV	1	80000	29.3	27.7		VPSVYPLDR
523.29	500.28	scout_VPSVYPLDR_2y8d	VPSV	2		29.3	27.7		VPSVYPLDR
452.27	735.44	E0SFX4_APA_2y7	VPSV	4		34.1	25.1	E0SFX4	APAFSLVAK
452.27	664.40	E0SFX4_APA_2y6	VPSV	4		34.1	25.1	E0SFX4	APAFSLVAK
452.27	416.75	E0SFX4_APA_2y8d	VPSV	4		34.1	25.1	E0SFX4	APAFSLVAK
664.33	888.44	E0SFQ4_YYL_2y9	VPSV	4		49.5	32.8	E0SFQ4	YYLGNADIEIAAK
664.33	831.42	E0SFQ4_YYL_2y8	VPSV	4		49.5	32.8	E0SFQ4	YYLGNADIEIAAK
664.33	289.19	E0SFQ4_YYL_2y3	VPSV	4		49.5	32.8	E0SFQ4	YYLGNADIEIAAK
462.91	632.32	E0SIU7_EKP_3y6	VPSV	4		34.9	22.8	E0SIU7	EKPTWLEVDAAK
462.91	503.28	E0SIU7_EKP_3y5	VPSV	4		34.9	22.8	E0SIU7	EKPTWLEVDAAK
462.91	289.19	E0SIU7_EKP_3y3	VPSV	4		34.9	22.8	E0SIU7	EKPTWLEVDAAK
681.87	859.49	Q93AT5_FVQ_2y7	VPSV	4		50.8	33.4	Q93AT5	FVQLEQTQLK
681.87	746.40	Q93AT5_FVQ_2y6	VPSV	4		50.8	33.4	Q93AT5	FVQLEQTQLK
681.87	489.30	Q93AT5_FVQ_2y4	VPSV	4		50.8	33.4	Q93AT5	FVQLEQTQLK
539.27	403.23	E0SE86_HGE_3y3	VPSV	4		40.4	26.9	E0SE86	HGEFNRPLFDEVR
539.27	274.19	E0SE86_HGE_3y2	VPSV	4		40.4	26.9	E0SE86	HGEFNRPLFDEVR
539.27	739.87	E0SE86_HGE_3y12d	VPSV	4		40.4	26.9	E0SE86	HGEFNRPLFDEVR
472.77	746.40	E0SH66_VVD_2y6	VPSV	4		35.6	25.9	E0SH66	VVDLLTER
472.77	518.29	E0SH66_VVD_2y4	VPSV	4		35.6	25.9	E0SH66	VVDLLTER
472.77	405.21	E0SH66_VVD_2y3	VPSV	4		35.6	25.9	E0SH66	VVDLLTER
589.78	732.37	P52662-PECT_SVE_2y6	VPSV	4		44.1	30.1	P52662	SVEMMSPELR
589.78	601.33	P52662-PECT_SVE_2y5	VPSV	4		44.1	30.1	P52662	SVEMMSPELR
589.78	514.30	P52662-PECT_SVE_2y4	VPSV	4		44.1	30.1	P52662	SVEMMSPELR
432.75	664.38	E0SH09_SIG_2y6	VPSV	4		32.7	24.4	E0SH09	SIGFATIR
432.75	460.29	E0SH09_SIG_2y4	VPSV	4		32.7	24.4	E0SH09	SIGFATIR
432.75	389.25	E0SH09_SIG_2y3	VPSV	4		32.7	24.4	E0SH09	SIGFATIR
468.26	701.42	E0SIW1_YAG_2y7	VPSV	4		35.3	25.7	E0SIW1	YAGVGDIK
468.26	545.33	E0SIW1_YAG_2y5	VPSV	4		35.3	25.7	E0SIW1	YAGVGDIK
468.26	260.20	E0SIW1_YAG_2y2	VPSV	4		35.3	25.7	E0SIW1	YAGVGDIK
470.61	940.56	E0SCM3_LDQ_3y8	VPSV	4		35.4	23.2	E0SCM3	LDQLAEIVKPQR
470.61	528.33	E0SCM3_LDQ_3y4	VPSV	4		35.4	23.2	E0SCM3	LDQLAEIVKPQR
470.61	400.23	E0SCM3_LDQ_3y3	VPSV	4		35.4	23.2	E0SCM3	LDQLAEIVKPQR
593.35	772.47	E0SDJ7_LSN_2y8	VPSV	4		44.4	30.2	E0SDJ7	LSNVTVGAGLVR
593.35	671.42	E0SDJ7_LSN_2y7	VPSV	4		44.4	30.2	E0SDJ7	LSNVTVGAGLVR
593.35	572.35	E0SDJ7_LSN_2y6	VPSV	4		44.4	30.2	E0SDJ7	LSNVTVGAGLVR
451.75	530.33	E0SH14_GSD_2y4	VPSV	4		34	25.1	E0SH14	GSDLELLR
451.75	401.29	E0SH14_GSD_2y3	VPSV	4		34	25.1	E0SH14	GSDLELLR
451.75	288.20	E0SH14_GSD_2y2	VPSV	4		34	25.1	E0SH14	GSDLELLR
515.81	830.50	E0SM26_TVV_2y8	VPSV	4		38.7	27.4	E0SM26	TVVAEISLAK
515.81	731.43	E0SM26_TVV_2y7	VPSV	4		38.7	27.4	E0SM26	TVVAEISLAK
515.81	418.27	E0SM26_TVV_2y4	VPSV	4		38.7	27.4	E0SM26	TVVAEISLAK
660.33	935.49	Q934G5_GTP_2y8	VPSV	4		49.3	32.6	Q934G5	GTPEYNIALGER
660.33	545.30	Q934G5_GTP_2y5	VPSV	4		49.3	32.6	Q934G5	GTPEYNIALGER
660.33	581.30	Q934G5_GTP_2y10d	VPSV	4		49.3	32.6	Q934G5	GTPEYNIALGER
705.37	852.48	Q934G5_GVS_2y8	VPSV	4		52.5	34.3	Q934G5	GVSADQISVVSYGK
705.37	739.40	Q934G5_GVS_2y7	VPSV	4		52.5	34.3	Q934G5	GVSADQISVVSYGK
705.37	454.23	Q934G5_GVS_2y4	VPSV	4		52.5	34.3	Q934G5	GVSADQISVVSYGK
537.30	746.38	E0SFS5_LTL_2y7	VPSV	4		40.3	28.2	E0SFS5	LTLDLGGQTR
537.30	631.35	E0SFS5_LTL_2y6	VPSV	4		40.3	28.2	E0SFS5	LTLDLGGQTR
537.30	518.27	E0SFS5_LTL_2y5	VPSV	4		40.3	28.2	E0SFS5	LTLDLGGQTR
564.82	916.47	E0SED0_IVS_2y8	VPSV	4		42.3	29.2	E0SED0	IVSDTPLDIR
564.82	613.37	E0SED0_IVS_2y5	VPSV	4		42.3	29.2	E0SED0	IVSDTPLDIR
564.82	288.20	E0SED0_IVS_2y2	VPSV	4		42.3	29.2	E0SED0	IVSDTPLDIR
524.79	765.39	E0SN64_ALV_2y6	VPSV	4		39.4	27.7	E0SN64	ALVVDTQFR
524.79	666.32	E0SN64_ALV_2y5	VPSV	4		39.4	27.7	E0SN64	ALVVDTQFR
524.79	551.29	E0SN64_ALV_2y4	VPSV	4		39.4	27.7	E0SN64	ALVVDTQFR
419.78	626.40	E0SKN5_LVQ_2y5	VPSV	4		31.7	24	E0SKN5	LVQLIPR

419.78	498.34	E0SKN5_LVQ_2y4	VPSV	4		31.7	24	E0SKN5	LVQLIPR
419.78	272.17	E0SKN5_LVQ_2y2	VPSV	4		31.7	24	E0SKN5	LVQLIPR
639.84	916.51	E0SG20_AQY_2y8	VPSV	4		47.8	31.9	E0SG20	AQYVLAEEVTR
639.84	817.44	E0SG20_AQY_2y7	VPSV	4		47.8	31.9	E0SG20	AQYVLAEEVTR
639.84	704.36	E0SG20_AQY_2y6	VPSV	4		47.8	31.9	E0SG20	AQYVLAEEVTR
686.84	756.40	E0SDP8_WFG_2y7	VPSV	4		51.2	33.6	E0SDP8	WFGPETPSAQPR
686.84	655.35	E0SDP8_WFG_2y6	VPSV	4		51.2	33.6	E0SDP8	WFGPETPSAQPR
686.84	272.17	E0SDP8_WFG_2y2	VPSV	4		51.2	33.6	E0SDP8	WFGPETPSAQPR
771.93	931.48	E0SHF6_VLL_2y9	VPSV	4		57.4	36.6	E0SHF6	VLLTGQAPSTELASR
771.93	860.45	E0SHF6_VLL_2y8	VPSV	4		57.4	36.6	E0SHF6	VLLTGQAPSTELASR
771.93	446.27	E0SHF6_VLL_2y4	VPSV	4		57.4	36.6	E0SHF6	VLLTGQAPSTELASR
664.36	901.47	E0SH19_VVV_2y8	VPSV	4		49.5	32.8	E0SH19	VVVETPVNLSDR
664.36	800.43	E0SH19_VVV_2y7	VPSV	4		49.5	32.8	E0SH19	VVVETPVNLSDR
664.36	451.24	E0SH19_VVV_2y8d	VPSV	4		49.5	32.8	E0SH19	VVVETPVNLSDR
465.76	619.32	E0SDK2_TPL_2y5	VPSV	4		35.1	25.6	E0SDK2	TPLVDMVR
465.76	520.25	E0SDK2_TPL_2y4	VPSV	4		35.1	25.6	E0SDK2	TPLVDMVR
465.76	415.23	E0SDK2_TPL_2y7d	VPSV	4		35.1	25.6	E0SDK2	TPLVDMVR
546.95	719.41	E0SFR7_LSV_3y7	VPSV	4		41	27.3	E0SFR7	LSVGDPDHVPAGIYAK
546.95	381.21	E0SFR7_LSV_3y3	VPSV	4		41	27.3	E0SFR7	LSVGDPDHVPAGIYAK
546.95	584.31	E0SFR7_LSV_3y11d	VPSV	4		41	27.3	E0SFR7	LSVGDPDHVPAGIYAK
610.31	587.35	E0SGI8_DFN_2y5	VPSV	4		45.6	30.8	E0SGI8	DFNQILADR
610.31	474.27	E0SGI8_DFN_2y4	VPSV	4		45.6	30.8	E0SGI8	DFNQILADR
610.31	361.18	E0SGI8_DFN_2y3	VPSV	4		45.6	30.8	E0SGI8	DFNQILADR
484.96	802.48	E0SKK2_LLS_3y7	VPSV	4		36.5	24	E0SKK2	LLSLSHQVTVVTR
484.96	674.42	E0SKK2_LLS_3y6	VPSV	4		36.5	24	E0SKK2	LLSLSHQVTVVTR
484.96	575.35	E0SKK2_LLS_3y5	VPSV	4		36.5	24	E0SKK2	LLSLSHQVTVVTR
521.31	800.46	E0SG93_LQI_2y7	VPSV	4		39.1	27.6	E0SG93	LQIAQALER
521.31	687.38	E0SG93_LQI_2y6	VPSV	4		39.1	27.6	E0SG93	LQIAQALER
521.31	488.28	E0SG93_LQI_2y4	VPSV	4		39.1	27.6	E0SG93	LQIAQALER
486.30	673.42	E0SHT8_NAI_2y7	VPSV	4		36.6	26.4	E0SHT8	NAIIAAALSK
486.30	560.34	E0SHT8_NAI_2y6	VPSV	4		36.6	26.4	E0SHT8	NAIIAAALSK
486.30	347.23	E0SHT8_NAI_2y3	VPSV	4		36.6	26.4	E0SHT8	NAIIAAALSK
516.78	601.33	E0SH40_IGN_2y5	VPSV	4		38.8	27.5	E0SH40	IGNFEIPSR
516.78	472.29	E0SH40_IGN_2y4	VPSV	4		38.8	27.5	E0SH40	IGNFEIPSR
516.78	359.20	E0SH40_IGN_2y3	VPSV	4		38.8	27.5	E0SH40	IGNFEIPSR
611.33	924.44	E0SMJ4_ALI_2y7	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMJ4	ALIQESIYER
611.33	796.38	E0SMJ4_ALI_2y6	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMJ4	ALIQESIYER
611.33	667.34	E0SMJ4_ALI_2y5	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMJ4	ALIQESIYER
430.26	516.31	E0SL29_FVP_2y4	VPSV	4		32.5	24.3	E0SL29	FVPLIDR
430.26	403.23	E0SL29_FVP_2y3	VPSV	4		32.5	24.3	E0SL29	FVPLIDR
430.26	307.19	E0SL29_FVP_2y5d	VPSV	4		32.5	24.3	E0SL29	FVPLIDR
543.30	658.39	Q93KB7_EGI_2y6	VPSV	4		40.7	28.4	Q93KB7	EGIQALGLER
543.30	587.35	Q93KB7_EGI_2y5	VPSV	4		40.7	28.4	Q93KB7	EGIQALGLER
543.30	474.27	Q93KB7_EGI_2y4	VPSV	4		40.7	28.4	Q93KB7	EGIQALGLER
457.22	619.30	E0SH19_FFD_2y5	VPSV	4		34.4	25.3	E0SH19	FFDDLTR
457.22	504.28	E0SH19_FFD_2y4	VPSV	4		34.4	25.3	E0SH19	FFDDLTR
457.22	389.25	E0SH19_FFD_2y3	VPSV	4		34.4	25.3	E0SH19	FFDDLTR
672.36	856.53	E0SD70_DVS_2y8	VPSV	4		50.1	33.1	E0SD70	DVSGEVQQALLK
672.36	700.44	E0SD70_DVS_2y6	VPSV	4		50.1	33.1	E0SD70	DVSGEVQQALLK
672.36	260.20	E0SD70_DVS_2y2	VPSV	4		50.1	33.1	E0SD70	DVSGEVQQALLK
539.28	790.42	E0SJW2_GMV_2y7	VPSV	4		40.4	28.3	E0SJW2	GMVGSVLMQR
539.28	547.30	E0SJW2_GMV_2y4	VPSV	4		40.4	28.3	E0SJW2	GMVGSVLMQR
539.28	434.22	E0SJW2_GMV_2y3	VPSV	4		40.4	28.3	E0SJW2	GMVGSVLMQR
456.29	727.45	E0SLG8_ALA_2y7	VPSV	4		34.4	25.3	E0SLG8	ALALGLTPR
456.29	656.41	E0SLG8_ALA_2y6	VPSV	4		34.4	25.3	E0SLG8	ALALGLTPR
456.29	543.32	E0SLG8_ALA_2y5	VPSV	4		34.4	25.3	E0SLG8	ALALGLTPR
426.59	630.39	E0SGG8_LLG_3y5	VPSV	4		32.2	20.8	E0SGG8	LLGAGVHTIQLR
426.59	526.30	E0SGG8_LLG_3y10d	VPSV	4		32.2	20.8	E0SGG8	LLGAGVHTIQLR
426.59	384.23	E0SGG8_LLG_3y6d	VPSV	4		32.2	20.8	E0SGG8	LLGAGVHTIQLR
426.59	709.41	E0SD85_ILL_3y6	VPSV	4		32.2	20.8	E0SD85	ILLSAAVAINHRR
426.59	610.34	E0SD85_ILL_3y5	VPSV	4		32.2	20.8	E0SD85	ILLSAAVAINHRR
426.59	539.30	E0SD85_ILL_3y4	VPSV	4		32.2	20.8	E0SD85	ILLSAAVAINHRR
474.27	601.37	E0SKP1_QAF_2y5	VPSV	4		35.7	25.9	E0SKP1	QAFDIVVR
474.27	486.34	E0SKP1_QAF_2y4	VPSV	4		35.7	25.9	E0SKP1	QAFDIVVR
474.27	373.26	E0SKP1_QAF_2y3	VPSV	4		35.7	25.9	E0SKP1	QAFDIVVR
530.29	744.43	E0SFF8_TDV_2y6	VPSV	4		39.8	27.9	E0SFF8	TDVLLDEVR
530.29	631.34	E0SFF8_TDV_2y5	VPSV	4		39.8	27.9	E0SFF8	TDVLLDEVR
530.29	316.17	E0SFF8_TDV_2y5d	VPSV	4		39.8	27.9	E0SFF8	TDVLLDEVR
490.28	765.41	E0SDQ3_TLG_2y7	VPSV	4		36.9	26.5	E0SDQ3	TLGDIYLGK
490.28	593.37	E0SDQ3_TLG_2y5	VPSV	4		36.9	26.5	E0SDQ3	TLGDIYLGK
490.28	317.22	E0SDQ3_TLG_2y3	VPSV	4		36.9	26.5	E0SDQ3	TLGDIYLGK

611.84	828.42	E0SMN7_LIA_2y8	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMN7	LIAPPDIGAEAR
611.84	463.24	E0SMN7_LIA_2y9d	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMN7	LIAPPDIGAEAR
611.84	414.71	E0SMN7_LIA_2y8d	VPSV	4		45.7	30.9	E0SMN7	LIAPPDIGAEAR
724.34	792.38	E0SHR5_ALG_2y6	VPSV	4		53.9	34.9	E0SHR5	ALGQGNPWPWNYR
724.34	509.25	E0SHR5_ALG_2y4	VPSV	4		53.9	34.9	E0SHR5	ALGQGNPWPWNYR
724.34	338.18	E0SHR5_ALG_2y2	VPSV	4		53.9	34.9	E0SHR5	ALGQGNPWPWNYR
567.32	850.43	E0SDS1_VAL_2y8	VPSV	4		42.5	29.3	E0SDS1	VALTGLTMAEK
567.32	749.39	E0SDS1_VAL_2y7	VPSV	4		42.5	29.3	E0SDS1	VALTGLTMAEK
567.32	579.28	E0SDS1_VAL_2y5	VPSV	4		42.5	29.3	E0SDS1	VALTGLTMAEK
694.88	873.50	E0SBD8_IAE_2y9	VPSV	4		51.8	33.9	E0SBD8	IAEMAGITVPASTK
694.88	703.40	E0SBD8_IAE_2y7	VPSV	4		51.8	33.9	E0SBD8	IAEMAGITVPASTK
694.88	503.28	E0SBD8_IAE_2y5	VPSV	4		51.8	33.9	E0SBD8	IAEMAGITVPASTK
543.79	545.30	E0SDY6_ADI_2y5	VPSV	4		40.8	28.4	E0SDY6	ADILEAEGIR
543.79	787.43	E0SDY6_ADI_2y7	VPSV	4		40.8	28.4	E0SDY6	ADILEAEGIR
543.79	674.35	E0SDY6_ADI_2y6	VPSV	4		40.8	28.4	E0SDY6	ADILEAEGIR
523.30	743.47	E0SEW8_SSQ_2y7	VPSV	4		39.3	27.7	E0SEW8	SSQAALDLLK
523.30	601.39	E0SEW8_SSQ_2y5	VPSV	4		39.3	27.7	E0SEW8	SSQAALDLLK
523.30	488.31	E0SEW8_SSQ_2y4	VPSV	4		39.3	27.7	E0SEW8	SSQAALDLLK
514.33	730.45	E0SC00_ALI_2y7	VPSV	4		38.6	27.4	E0SC00	ALIVALAQTk
514.33	631.38	E0SC00_ALI_2y6	VPSV	4		38.6	27.4	E0SC00	ALIVALAQTk
514.33	560.34	E0SC00_ALI_2y5	VPSV	4		38.6	27.4	E0SC00	ALIVALAQTk
701.35	789.37	Q9F495-OPGH_LEL_2y8	VPSV	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
701.35	488.23	Q9F495-OPGH_LEL_2y5	VPSV	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
701.35	545.30	Q9F495-OPGH_LEL_2y6	VPSV	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
510.90	672.90	scout_SVALAPHVGMGLDTR_3y13d	SVAL	1	50000	60	19.5		SVALAPHVGMGL*DTR
510.90	545.30	scout_SVALAPHVGMGLDTR_3y10d	SVAL	2		60	19.5		SVALAPHVGMGL*DTR
701.35	789.37	Q9F495-OPGH_LEL_2y8	SVAL	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
701.35	488.23	Q9F495-OPGH_LEL_2y5	SVAL	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
701.35	545.30	Q9F495-OPGH_LEL_2y6	SVAL	4		52.2	34.1	Q9F495	LLEAWEDGLNGGK
511.79	776.43	E0SM69_FVA_2y8	SVAL	4		38.4	27.3	E0SM69	FVAGFIGSPK
511.79	705.39	E0SM69_FVA_2y7	SVAL	4		38.4	27.3	E0SM69	FVAGFIGSPK
511.79	388.22	E0SM69_FVA_2y4	SVAL	4		38.4	27.3	E0SM69	FVAGFIGSPK
666.89	872.49	E0SGW7_LIA_2y8	SVAL	4		49.7	32.9	E0SGW7	LIAYVTGVQNVr
666.89	773.43	E0SGW7_LIA_2y7	SVAL	4		49.7	32.9	E0SGW7	LIAYVTGVQNVr
666.89	672.38	E0SGW7_LIA_2y6	SVAL	4		49.7	32.9	E0SGW7	LIAYVTGVQNVr
645.33	889.45	E0SDX0_GTL_2y7	SVAL	4		48.2	32.1	E0SDX0	GTLEDPNQFIR
645.33	774.43	E0SDX0_GTL_2y6	SVAL	4		48.2	32.1	E0SDX0	GTLEDPNQFIR
645.33	387.72	E0SDX0_GTL_2y6d	SVAL	4		48.2	32.1	E0SDX0	GTLEDPNQFIR
494.30	773.45	E0SD70_TLL_2y7	SVAL	4		37.2	26.7	E0SD70	TLLAETLAR
494.30	660.37	E0SD70_TLL_2y6	SVAL	4		37.2	26.7	E0SD70	TLLAETLAR
494.30	589.33	E0SD70_TLL_2y5	SVAL	4		37.2	26.7	E0SD70	TLLAETLAR
529.81	874.49	E0SMW9_AIE_2y8	SVAL	4		39.7	27.9	E0SMW9	AIEALTEAIK
529.81	561.32	E0SMW9_AIE_2y5	SVAL	4		39.7	27.9	E0SMW9	AIEALTEAIK
529.81	331.23	E0SMW9_AIE_2y3	SVAL	4		39.7	27.9	E0SMW9	AIEALTEAIK
543.81	874.46	E0SCK5_LVS_2y8	SVAL	4		40.8	28.4	E0SCK5	LVSEALDLAR
543.81	658.39	E0SCK5_LVS_2y6	SVAL	4		40.8	28.4	E0SCK5	LVSEALDLAR
543.81	359.24	E0SCK5_LVS_2y3	SVAL	4		40.8	28.4	E0SCK5	LVSEALDLAR
641.84	900.48	E0SAX8_EGP_2y8	SVAL	4		47.9	32	E0SAX8	EGPVPLADISER
641.84	690.34	E0SAX8_EGP_2y6	SVAL	4		47.9	32	E0SAX8	EGPVPLADISER
641.84	450.74	E0SAX8_EGP_2y8d	SVAL	4		47.9	32	E0SAX8	EGPVPLADISER
703.38	908.46	E0SMN5_VAV_2y8	SVAL	4		52.4	34.2	E0SMN5	VAVDLYGQQIGSR
703.38	745.40	E0SMN5_VAV_2y7	SVAL	4		52.4	34.2	E0SMN5	VAVDLYGQQIGSR
703.38	319.17	E0SMN5_VAV_2y3	SVAL	4		52.4	34.2	E0SMN5	VAVDLYGQQIGSR
606.68	916.48	E0SHD8_VLP_3y8	SVAL	4		45.3	30.6	E0SHD8	VLPVAVSVHVEGTQVQR
606.68	817.42	E0SHD8_VLP_3y7	SVAL	4		45.3	30.6	E0SHD8	VLPVAVSVHVEGTQVQR
606.68	719.39	E0SHD8_VLP_3y13d	SVAL	4		45.3	30.6	E0SHD8	VLPVAVSVHVEGTQVQR
519.59	731.40	E0SLK4_YQA_3y6	SVAL	4		39	25.9	E0SLK4	YQAYTQADLTNLR
519.59	616.38	E0SLK4_YQA_3y5	SVAL	4		39	25.9	E0SLK4	YQAYTQADLTNLR
519.59	503.29	E0SLK4_YQA_3y4	SVAL	4		39	25.9	E0SLK4	YQAYTQADLTNLR
515.77	846.41	E0SD22_LAL_2y6	SVAL	4		38.7	27.4	E0SD22	LALDWQER
515.77	733.33	E0SD22_LAL_2y5	SVAL	4		38.7	27.4	E0SD22	LALDWQER
515.77	618.30	E0SD22_LAL_2y4	SVAL	4		38.7	27.4	E0SD22	LALDWQER
641.33	881.43	E0SDB3_ITS_2y8	SVAL	4		47.9	31.9	E0SDB3	ITSVNIIGMAYR
641.33	767.39	E0SDB3_ITS_2y7	SVAL	4		47.9	31.9	E0SDB3	ITSVNIIGMAYR
641.33	654.30	E0SDB3_ITS_2y6	SVAL	4		47.9	31.9	E0SDB3	ITSVNIIGMAYR
642.65	908.41	E0SDV5_INI_3y8	SVAL	4		48	32.6	E0SDV5	INIVDTPGHADFGGEVER
642.65	793.38	E0SDV5_INI_3y7	SVAL	4		48	32.6	E0SDV5	INIVDTPGHADFGGEVER
642.65	635.79	E0SDV5_INI_3y12d	SVAL	4		48	32.6	E0SDV5	INIVDTPGHADFGGEVER
451.90	744.38	E0SMJ4_NAD_3y6	SVAL	4		34.1	22.2	E0SMJ4	NADVPLGIDHFR
451.90	459.25	E0SMJ4_NAD_3y3	SVAL	4		34.1	22.2	E0SMJ4	NADVPLGIDHFR
451.90	477.76	E0SMJ4_NAD_3y8d	SVAL	4		34.1	22.2	E0SMJ4	NADVPLGIDHFR

529.79	872.47	E0SDS3_SVD_2y8	SVAL	4		39.7	27.9	E0SDS3	SVDAMIPIGR
529.79	555.36	E0SDS3_SVD_2y5	SVAL	4		39.7	27.9	E0SDS3	SVDAMIPIGR
529.79	442.28	E0SDS3_SVD_2y4	SVAL	4		39.7	27.9	E0SDS3	SVDAMIPIGR
628.86	717.41	E0SB50_ALG_2y7	SVAL	4		47	31.5	E0SB50	ALGANLVLTEGAK
628.86	618.35	E0SB50_ALG_2y6	SVAL	4		47	31.5	E0SB50	ALGANLVLTEGAK
628.86	505.26	E0SB50_ALG_2y5	SVAL	4		47	31.5	E0SB50	ALGANLVLTEGAK
638.65	860.48	E0SL49_EED_3y9	SVAL	4		47.7	32.3	E0SL49	EEDLEISTHGGQLTISGK
638.65	291.17	E0SL49_EED_3y3	SVAL	4		47.7	32.3	E0SL49	EEDLEISTHGGQLTISGK
638.65	649.86	E0SL49_EED_3y13d	SVAL	4		47.7	32.3	E0SL49	EEDLEISTHGGQLTISGK
573.31	830.46	E0SIX3_SDL_2y8	SVAL	4		42.9	29.5	E0SIX3	SDLALELEGAK
573.31	759.42	E0SIX3_SDL_2y7	SVAL	4		42.9	29.5	E0SIX3	SDLALELEGAK
573.31	646.34	E0SIX3_SDL_2y6	SVAL	4		42.9	29.5	E0SIX3	SDLALELEGAK
476.59	622.32	E0SDK4_HQA_3y5	SVAL	4		35.9	23.5	E0SDK4	HQATLAAIEAFQK
476.59	493.28	E0SDK4_HQA_3y4	SVAL	4		35.9	23.5	E0SDK4	HQATLAAIEAFQK
476.59	422.24	E0SDK4_HQA_3y3	SVAL	4		35.9	23.5	E0SDK4	HQATLAAIEAFQK
536.81	760.44	P38448-ALKH_ALQ_2y8	SVAL	4		40.3	28.2	P38448	ALQAIAGPFGK
536.81	576.31	P38448-ALKH_ALQ_2y6	SVAL	4		40.3	28.2	P38448	ALQAIAGPFGK
536.81	505.28	P38448-ALKH_ALQ_2y5	SVAL	4		40.3	28.2	P38448	ALQAIAGPFGK
742.88	746.40	E0SCK7_VNA_2y6	SVAL	4		55.3	35.6	E0SCK7	VNAPLDEEVELTR
742.88	518.29	E0SCK7_VNA_2y4	SVAL	4		55.3	35.6	E0SCK7	VNAPLDEEVELTR
742.88	600.81	E0SCK7_VNA_2y10d	SVAL	4		55.3	35.6	E0SCK7	VNAPLDEEVELTR
596.34	836.46	E0SD71_ILE_2y7	SVAL	4		44.6	30.3	E0SD71	ILEYLAVQSR
596.34	673.40	E0SD71_ILE_2y6	SVAL	4		44.6	30.3	E0SD71	ILEYLAVQSR
596.34	560.32	E0SD71_ILE_2y5	SVAL	4		44.6	30.3	E0SD71	ILEYLAVQSR
574.80	730.45	E0SKV6_EMG_2y6	SVAL	4		43	29.5	E0SKV6	EMGTVELLTR
574.80	631.38	E0SKV6_EMG_2y5	SVAL	4		43	29.5	E0SKV6	EMGTVELLTR
574.80	502.33	E0SKV6_EMG_2y4	SVAL	4		43	29.5	E0SKV6	EMGTVELLTR
724.38	846.43	Q9ZAB3_VLN_2y8	SVAL	4		53.9	34.9	Q9ZAB3	VLNQFDDAGIVTR
724.38	731.40	Q9ZAB3_VLN_2y7	SVAL	4		53.9	34.9	Q9ZAB3	VLNQFDDAGIVTR
724.38	616.38	Q9ZAB3_VLN_2y6	SVAL	4		53.9	34.9	Q9ZAB3	VLNQFDDAGIVTR
693.39	932.48	E0SDU0_VIQ_2y10	SVAL	4		51.7	33.8	E0SDU0	VIQLEGLAGTSAAR
693.39	803.44	E0SDU0_VIQ_2y9	SVAL	4		51.7	33.8	E0SDU0	VIQLEGLAGTSAAR
693.39	633.33	E0SDU0_VIQ_2y7	SVAL	4		51.7	33.8	E0SDU0	VIQLEGLAGTSAAR
556.84	871.54	E0SD74_QLL_2y7	SVAL	4		41.7	28.9	E0SD74	QLLTQQLIR
556.84	758.45	E0SD74_QLL_2y6	SVAL	4		41.7	28.9	E0SD74	QLLTQQLIR
556.84	529.35	E0SD74_QLL_2y4	SVAL	4		41.7	28.9	E0SD74	QLLTQQLIR
457.28	762.44	E0SBA4_VAR_3y6	SVAL	4		34.5	22.5	E0SBA4	VARPAIPEYIIK
457.28	536.34	E0SBA4_VAR_3y4	SVAL	4		34.5	22.5	E0SBA4	VARPAIPEYIIK
457.28	381.72	E0SBA4_VAR_3y6d	SVAL	4		34.5	22.5	E0SBA4	VARPAIPEYIIK
625.33	845.45	E0SLQ9_ASF_2y8	SVAL	4		46.7	31.4	E0SLQ9	ASFVTLQDVGGR
625.33	744.40	E0SLQ9_ASF_2y7	SVAL	4		46.7	31.4	E0SLQ9	ASFVTLQDVGGR
625.33	631.32	E0SLQ9_ASF_2y6	SVAL	4		46.7	31.4	E0SLQ9	ASFVTLQDVGGR
564.31	858.44	E0SBZ2_VGL_2y8	SVAL	4		42.3	29.2	E0SBZ2	VGLLGYGYASK
564.31	745.35	E0SBZ2_VGL_2y7	SVAL	4		42.3	29.2	E0SBZ2	VGLLGYGYASK
564.31	305.18	E0SBZ2_VGL_2y3	SVAL	4		42.3	29.2	E0SBZ2	VGLLGYGYASK
471.92	730.40	E0SLJ0_LME_3y6	SVAL	4		35.5	23.3	E0SLJ0	LMENPVFLASHR
471.92	583.33	E0SLJ0_LME_3y5	SVAL	4		35.5	23.3	E0SLJ0	LMENPVFLASHR
471.92	470.25	E0SLJ0_LME_3y4	SVAL	4		35.5	23.3	E0SLJ0	LMENPVFLASHR
447.59	448.23	E0SLI5_ALG_3y3	SVAL	4		33.7	21.9	E0SLI5	ALGRPVDIASWR
447.59	519.27	E0SLI5_ALG_3y4	SVAL	4		33.7	21.9	E0SLI5	ALGRPVDIASWR
447.59	578.81	E0SLI5_ALG_3y10d	SVAL	4		33.7	21.9	E0SLI5	ALGRPVDIASWR
637.82	466.75	scout_VNEPSILEMSR_2y5	VNEP	1	35000	37.6	31.8		VNEPSILEMSR
637.82	635.32	scout_VNEPSILEMSR_2y8d	VNEP	2		37.6	31.8		VNEPSILEMSR
664.79	737.36	E0SAU3_ADF_2y7	VNEP	4		49.6	32.8	E0SAU3	ADFEFATDAGR
664.79	590.29	E0SAU3_ADF_2y6	VNEP	4		49.6	32.8	E0SAU3	ADFEFATDAGR
664.79	303.18	E0SAU3_ADF_2y3	VNEP	4		49.6	32.8	E0SAU3	ADFEFATDAGR
457.92	931.47	E0SHH0_VDL_3y8	VNEP	4		34.5	22.5	E0SHH0	VDLIFGSHSQLR
457.92	784.41	E0SHH0_VDL_3y7	VNEP	4		34.5	22.5	E0SHH0	VDLIFGSHSQLR
457.92	466.24	E0SHH0_VDL_3y8d	VNEP	4		34.5	22.5	E0SHH0	VDLIFGSHSQLR
623.82	702.38	E0SHE0_GLN_2y6	VNEP	4		46.6	31.3	E0SHE0	GLNPHYEDVAR
623.82	589.29	E0SHE0_GLN_2y5	VNEP	4		46.6	31.3	E0SHE0	GLNPHYEDVAR
623.82	481.75	E0SHE0_GLN_2y8d	VNEP	4		46.6	31.3	E0SHE0	GLNPHYEDVAR
635.87	858.47	E0SB50_TIV_2y8	VNEP	4		47.5	31.7	E0SB50	TIVVILPSSGER
635.87	745.38	E0SB50_TIV_2y7	VNEP	4		47.5	31.7	E0SB50	TIVVILPSSGER
635.87	632.30	E0SB50_TIV_2y6	VNEP	4		47.5	31.7	E0SB50	TIVVILPSSGER
618.31	921.48	Q93AU2_WQA_2y8	VNEP	4		46.2	31.1	Q93AU2	WQAFSEQLAR
618.31	850.44	Q93AU2_WQA_2y7	VNEP	4		46.2	31.1	Q93AU2	WQAFSEQLAR
618.31	703.37	Q93AU2_WQA_2y6	VNEP	4		46.2	31.1	Q93AU2	WQAFSEQLAR
632.29	914.44	E0SGW8_FSD_2y8	VNEP	4		47.2	31.6	E0SGW8	FSDFGSIDYGR
632.29	767.37	E0SGW8_FSD_2y7	VNEP	4		47.2	31.6	E0SGW8	FSDFGSIDYGR
632.29	395.20	E0SGW8_FSD_2y3	VNEP	4		47.2	31.6	E0SGW8	FSDFGSIDYGR



535.33	871.52	E0SIW0_VVV_2y8	VNEP	4		40.1	28.1	E0SIW0	VVVEGINLVK
535.33	772.46	E0SIW0_VVV_2y7	VNEP	4		40.1	28.1	E0SIW0	VVVEGINLVK
535.33	643.41	E0SIW0_VVV_2y6	VNEP	4		40.1	28.1	E0SIW0	VVVEGINLVK
697.35	889.47	E0SG71_LDE_2y8	VNEP	4		52	34	E0SG71	LDEFETVGNTIR
697.35	760.43	E0SG71_LDE_2y7	VNEP	4		52	34	E0SG71	LDEFETVGNTIR
697.35	560.32	E0SG71_LDE_2y5	VNEP	4		52	34	E0SG71	LDEFETVGNTIR
569.27	876.42	E0SBL5_NFM_2y8	VNEP	4		42.6	29.4	E0SBL5	NFMAEAADIR
569.27	745.38	E0SBL5_NFM_2y7	VNEP	4		42.6	29.4	E0SBL5	NFMAEAADIR
569.27	288.20	E0SBL5_NFM_2y2	VNEP	4		42.6	29.4	E0SBL5	NFMAEAADIR
472.24	642.30	E0SKF0_GAG_3y5	VNEP	4		35.5	23.3	E0SKF0	GAGLVDFIHSQDR
472.24	505.24	E0SKF0_GAG_3y4	VNEP	4		35.5	23.3	E0SKF0	GAGLVDFIHSQDR
472.24	303.18	E0SKF0_GAG_3y2	VNEP	4		35.5	23.3	E0SKF0	GAGLVDFIHSQDR
554.84	555.32	E0SBC1_VLD_2y5	VNEP	4		41.6	28.8	E0SBC1	VLDLIAHISK
554.84	896.52	E0SBC1_VLD_2y8	VNEP	4		41.6	28.8	E0SBC1	VLDLIAHISK
554.84	668.41	E0SBC1_VLD_2y6	VNEP	4		41.6	28.8	E0SBC1	VLDLIAHISK
564.32	757.46	E0SKY1_QEI_2y7	VNEP	4		42.3	29.2	E0SKY1	QEIIGLAEVR
564.32	644.37	E0SKY1_QEI_2y6	VNEP	4		42.3	29.2	E0SKY1	QEIIGLAEVR
564.32	274.19	E0SKY1_QEI_2y2	VNEP	4		42.3	29.2	E0SKY1	QEIIGLAEVR
576.79	845.47	E0SEB2_FC_2y7	VNEP	4		43.2	29.6	E0SEB2	FC[+57]IITDEVR
576.79	732.39	E0SEB2_FC_2y6	VNEP	4		43.2	29.6	E0SEB2	FC[+57]IITDEVR
576.79	619.30	E0SEB2_FC_2y5	VNEP	4		43.2	29.6	E0SEB2	FC[+57]IITDEVR
562.28	832.43	Q93AU2_QYG_2y7	VNEP	4		42.1	29.1	Q93AU2	QYGLEAWTR
562.28	662.33	Q93AU2_QYG_2y5	VNEP	4		42.1	29.1	Q93AU2	QYGLEAWTR
562.28	533.28	Q93AU2_QYG_2y4	VNEP	4		42.1	29.1	Q93AU2	QYGLEAWTR
562.86	785.46	E0SIN3_LLI_2y8	VNEP	4		42.1	29.1	E0SIN3	LLIIQAGA AVR
562.86	672.38	E0SIN3_LLI_2y7	VNEP	4		42.1	29.1	E0SIN3	LLIIQAGA AVR
562.86	544.32	E0SIN3_LLI_2y6	VNEP	4		42.1	29.1	E0SIN3	LLIIQAGA AVR
610.32	830.44	E0SIW9_LFE_2y7	VNEP	4		45.6	30.8	E0SIW9	LFEVEVDVR
610.32	731.37	E0SIW9_LFE_2y6	VNEP	4		45.6	30.8	E0SIW9	LFEVEVDVR
610.32	274.19	E0SIW9_LFE_2y2	VNEP	4		45.6	30.8	E0SIW9	LFEVEVDVR
460.94	615.36	E0SFV4_SAV_3y5	VNEP	4		34.7	22.7	E0SFV4	SAVL PANLIQAQR
460.94	502.27	E0SFV4_SAV_3y4	VNEP	4		34.7	22.7	E0SFV4	SAVL PANLIQAQR
460.94	374.21	E0SFV4_SAV_3y3	VNEP	4		34.7	22.7	E0SFV4	SAVL PANLIQAQR
753.86	929.49	E0SGY3_FSP_2y9	VNEP	4		56.1	36	E0SGY3	FSPDMTPDDGAIK
753.86	828.45	E0SGY3_FSP_2y8	VNEP	4		56.1	36	E0SGY3	FSPDMTPDDGAIK
753.86	636.81	E0SGY3_FSP_2y12d	VNEP	4		56.1	36	E0SGY3	FSPDMTPDDGAIK
711.40	945.49	E0SEN8_HIL_2y9	VNEP	4		53	34.5	E0SEN8	HILIAVDLSPE SK
711.40	547.27	E0SEN8_HIL_2y5	VNEP	4		53	34.5	E0SEN8	HILIAVDLSPE SK
711.40	460.24	E0SEN8_HIL_2y4	VNEP	4		53	34.5	E0SEN8	HILIAVDLSPE SK
457.79	688.40	E0SMX5_LLG_2y6	VNEP	4		34.5	25.3	E0SMX5	LLGETLLR
457.79	502.33	E0SMX5_LLG_2y4	VNEP	4		34.5	25.3	E0SMX5	LLGETLLR
457.79	401.29	E0SMX5_LLG_2y3	VNEP	4		34.5	25.3	E0SMX5	LLGETLLR
632.83	917.47	E0SBC7_FSI_2y8	VNEP	4		47.3	31.6	E0SBC7	FSIIQDEGLSR
632.83	804.38	E0SBC7_FSI_2y7	VNEP	4		47.3	31.6	E0SBC7	FSIIQDEGLSR
632.83	676.33	E0SBC7_FSI_2y6	VNEP	4		47.3	31.6	E0SBC7	FSIIQDEGLSR
651.86	747.40	E0SMU7_QIS_2y6	VNEP	4		48.6	32.3	E0SMU7	QISAGVFQPLDK
651.86	472.28	E0SMU7_QIS_2y4	VNEP	4		48.6	32.3	E0SMU7	QISAGVFQPLDK
651.86	262.14	E0SMU7_QIS_2y2	VNEP	4		48.6	32.3	E0SMU7	QISAGVFQPLDK
627.80	846.42	E0SE41_GFG_2y8	VNEP	4		46.9	31.5	E0SE41	GFGFITPEDGSK
627.80	733.34	E0SE41_GFG_2y7	VNEP	4		46.9	31.5	E0SE41	GFGFITPEDGSK
627.80	632.29	E0SE41_GFG_2y6	VNEP	4		46.9	31.5	E0SE41	GFGFITPEDGSK
551.33	875.49	E0SHQ0_IIT_2y9	VNEP	4		41.3	28.7	E0SHQ0	IITVGSVIGSR
551.33	774.45	E0SHQ0_IIT_2y8	VNEP	4		41.3	28.7	E0SHQ0	IITVGSVIGSR
551.33	675.38	E0SHQ0_IIT_2y7	VNEP	4		41.3	28.7	E0SHQ0	IITVGSVIGSR
517.95	680.41	E0SLU3_LGT_3y6	VNEP	4		38.9	25.8	E0SLU3	LGTAIESALVSHPK
517.95	567.32	E0SLU3_LGT_3y5	VNEP	4		38.9	25.8	E0SLU3	LGTAIESALVSHPK
517.95	468.26	E0SLU3_LGT_3y4	VNEP	4		38.9	25.8	E0SLU3	LGTAIESALVSHPK
653.34	949.47	E0SMY9_SGV_2y9	VNEP	4		48.7	32.4	E0SMY9	SGVLTGLPDAYGR
653.34	848.43	E0SMY9_SGV_2y8	VNEP	4		48.7	32.4	E0SMY9	SGVLTGLPDAYGR
653.34	678.32	E0SMY9_SGV_2y6	VNEP	4		48.7	32.4	E0SMY9	SGVLTGLPDAYGR
621.80	729.32	Q9F495-OPGH_ELV_2y5	VNEP	4		46.4	31.2	Q9F495	ELVATDEYFR
621.80	614.29	Q9F495-OPGH_ELV_2y4	VNEP	4		46.4	31.2	Q9F495	ELVATDEYFR
621.80	485.25	Q9F495-OPGH_ELV_2y3	VNEP	4		46.4	31.2	Q9F495	ELVATDEYFR
805.41	915.49	E0SG94_ITT_2y9	VNEP	4		59.8	37.9	E0SG94	ITTSEYDVGGIAIDR
805.41	800.46	E0SG94_ITT_2y8	VNEP	4		59.8	37.9	E0SG94	ITTSEYDVGGIAIDR
805.41	701.39	E0SG94_ITT_2y7	VNEP	4		59.8	37.9	E0SG94	ITTSEYDVGGIAIDR
625.63	793.38	E0SH09_AGD_3y7	VNEP	4		46.7	31.6	E0SH09	AGDIVGEHTAMFADVGER
625.63	460.25	E0SH09_AGD_3y4	VNEP	4		46.7	31.6	E0SH09	AGDIVGEHTAMFADVGER
625.63	361.18	E0SH09_AGD_3y3	VNEP	4		46.7	31.6	E0SH09	AGDIVGEHTAMFADVGER
561.31	880.48	E0SBC1_AGI_2y8	VNEP	4		42	29.1	E0SBC1	AGIALSDTFVK
561.31	809.44	E0SBC1_AGI_2y7	VNEP	4		42	29.1	E0SBC1	AGIALSDTFVK

561.31	696.36	E0SBC1_AGI_2y6	VNEP	4		42	29.1	E0SBC1	AGIALSDTFVK
671.37	743.40	E0SDE0_LAA_2y7	VNEP	4		50.1	33	E0SDE0	LAAETIDVSLPGR
671.37	529.31	E0SDE0_LAA_2y5	VNEP	4		50.1	33	E0SDE0	LAAETIDVSLPGR
671.37	329.19	E0SDE0_LAA_2y3	VNEP	4		50.1	33	E0SDE0	LAAETIDVSLPGR
582.31	903.47	E0SM68_FIE_2y7	VNEP	4		43.6	29.8	E0SM68	FIEFINQPR
582.31	774.43	E0SM68_FIE_2y6	VNEP	4		43.6	29.8	E0SM68	FIEFINQPR
582.31	514.27	E0SM68_FIE_2y4	VNEP	4		43.6	29.8	E0SM68	FIEFINQPR
542.33	786.45	E0SIE8_ALI_2y7	VNEP	4		40.7	28.4	E0SIE8	ALIEVAQIR
542.33	657.40	E0SIE8_ALI_2y6	VNEP	4		40.7	28.4	E0SIE8	ALIEVAQIR
542.33	586.37	E0SIE8_ALI_2y5	VNEP	4		40.7	28.4	E0SIE8	ALIEVAQIR
487.23	727.38	E0SFF7_MDY_2y5	VNEP	4		36.6	26.4	E0SFF7	MDYEFLLR
487.23	564.31	E0SFF7_MDY_2y4	VNEP	4		36.6	26.4	E0SFF7	MDYEFLLR
487.23	435.27	E0SFF7_MDY_2y3	VNEP	4		36.6	26.4	E0SFF7	MDYEFLLR
625.80	947.44	E0SD68_FGV_2y9	VNEP	4		46.7	31.4	E0SD68	FGVDDGSLDGLR
625.80	717.39	E0SD68_FGV_2y7	VNEP	4		46.7	31.4	E0SD68	FGVDDGSLDGLR
625.80	345.22	E0SD68_FGV_2y3	VNEP	4		46.7	31.4	E0SD68	FGVDDGSLDGLR
426.56	744.38	E0SH64_YIG_3y6	VNEP	4		32.2	20.8	E0SH64	YIGSLVADFHR
426.56	645.31	E0SH64_YIG_3y5	VNEP	4		32.2	20.8	E0SH64	YIGSLVADFHR
426.56	459.25	E0SH64_YIG_3y3	VNEP	4		32.2	20.8	E0SH64	YIGSLVADFHR
509.25	843.47	E0SEQ9_FDS_3y8	VNEP	4		38.2	25.3	E0SEQ9	FDSFWGTPKGIDR
509.25	557.30	E0SEQ9_FDS_3y5	VNEP	4		38.2	25.3	E0SEQ9	FDSFWGTPKGIDR
509.25	632.33	E0SEQ9_FDS_3y11d	VNEP	4		38.2	25.3	E0SEQ9	FDSFWGTPKGIDR
591.30	824.38	E0SHE6_IIM_2y6	VNEP	4		44.2	30.1	E0SHE6	IIMEYLLDER
591.30	695.34	E0SHE6_IIM_2y5	VNEP	4		44.2	30.1	E0SHE6	IIMEYLLDER
591.30	304.16	E0SHE6_IIM_2y2	VNEP	4		44.2	30.1	E0SHE6	IIMEYLLDER
517.29	716.39	E0SCK7_LGF_2y6	VNEP	4		38.8	27.5	E0SCK7	LGFEVAIER
517.29	587.35	E0SCK7_LGF_2y5	VNEP	4		38.8	27.5	E0SCK7	LGFEVAIER
517.29	488.28	E0SCK7_LGF_2y4	VNEP	4		38.8	27.5	E0SCK7	LGFEVAIER
592.34	829.45	E0SIV6_QLI_2y8	VNEP	4		44.3	30.2	E0SIV6	QLIQVAADLR
592.34	545.30	E0SIV6_QLI_2y5	VNEP	4		44.3	30.2	E0SIV6	QLIQVAADLR
592.34	288.20	E0SIV6_QLI_2y2	VNEP	4		44.3	30.2	E0SIV6	QLIQVAADLR
468.77	674.40	E0SEA5_YVF_2y6	VNEP	4		35.3	25.7	E0SEA5	YVFPALAR
468.77	527.33	E0SEA5_YVF_2y5	VNEP	4		35.3	25.7	E0SEA5	YVFPALAR
468.77	264.17	E0SEA5_YVF_2y5d	VNEP	4		35.3	25.7	E0SEA5	YVFPALAR
455.81	696.48	E0SE21_ITV_2y6	VNEP	4		34.3	25.3	E0SE21	ITVVPILR
455.81	597.41	E0SE21_ITV_2y5	VNEP	4		34.3	25.3	E0SE21	ITVVPILR
455.81	498.34	E0SE21_ITV_2y4	VNEP	4		34.3	25.3	E0SE21	ITVVPILR
661.85	860.46	E0SC36_MFA_2y9	VNEP	4		49.4	32.7	E0SC36	MFAITGATGQLGR
661.85	759.41	E0SC36_MFA_2y8	VNEP	4		49.4	32.7	E0SC36	MFAITGATGQLGR
661.85	631.35	E0SC36_MFA_2y6	VNEP	4		49.4	32.7	E0SC36	MFAITGATGQLGR
598.34	853.49	E0SM69_TLQ_2y7	VNEP	4		44.7	30.4	E0SM69	TLQLSHLLDR
598.34	740.40	E0SM69_TLQ_2y6	VNEP	4		44.7	30.4	E0SM69	TLQLSHLLDR
598.34	653.37	E0SM69_TLQ_2y5	VNEP	4		44.7	30.4	E0SM69	TLQLSHLLDR
784.44	912.56	E0SK33_AAV_2y10	VNEP	4		58.3	37.1	E0SK33	AAVEEGVAGGGVALIR
784.44	813.49	E0SK33_AAV_2y9	VNEP	4		58.3	37.1	E0SK33	AAVEEGVAGGGVALIR
784.44	742.46	E0SK33_AAV_2y8	VNEP	4		58.3	37.1	E0SK33	AAVEEGVAGGGVALIR
707.90	862.43	Q84EZ6_NLI_2y10	VNEP	4		52.7	34.3	Q84EZ6	NLILVDSGTGALGGK
707.90	747.40	Q84EZ6_NLI_2y9	VNEP	4		52.7	34.3	Q84EZ6	NLILVDSGTGALGGK
707.90	261.16	Q84EZ6_NLI_2y3	VNEP	4		52.7	34.3	Q84EZ6	NLILVDSGTGALGGK
633.38	260.20	E0SH20_LAP_2y2	VNEP	4		47.3	31.7	E0SH20	LAPPQISAEVLK
633.38	541.32	E0SH20_LAP_2y10d	VNEP	4		47.3	31.7	E0SH20	LAPPQISAEVLK
633.38	492.79	E0SH20_LAP_2y9d	VNEP	4		47.3	31.7	E0SH20	LAPPQISAEVLK
541.84	755.50	E0SIU5_VVE_2y7	VNEP	4		40.6	28.4	E0SIU5	VVEPLITLAK
541.84	432.28	E0SIU5_VVE_2y4	VNEP	4		40.6	28.4	E0SIU5	VVEPLITLAK
541.84	378.25	E0SIU5_VVE_2y7d	VNEP	4		40.6	28.4	E0SIU5	VVEPLITLAK
536.30	696.90	scout_VDPEVLHSLQTQLK_3y12d	VDPE	1	350000	30.2	26.8		VDPEVLHSLQTQLK
536.30	648.37	scout_VDPEVLHSLQTQLK_3y11d	VDPE	2		30.2	26.8		VDPEVLHSLQTQLK
747.40	448.22	E0SG17_LAD_3y4	VDPE	4		55.6	38.2	E0SG17	LADLTPGATVAVTITRPDGESR
747.40	262.15	E0SG17_LAD_3y2	VDPE	4		55.6	38.2	E0SG17	LADLTPGATVAVTITRPDGESR
747.40	863.96	E0SG17_LAD_3y17d	VDPE	4		55.6	38.2	E0SG17	LADLTPGATVAVTITRPDGESR
690.04	871.50	E0SN74_IGA_3y8	VDPE	4		51.4	35.1	E0SN74	IGAPGAVQVEFGGKPVDLRSR
690.04	686.38	E0SN74_IGA_3y6	VDPE	4		51.4	35.1	E0SN74	IGAPGAVQVEFGGKPVDLRSR
690.04	913.99	E0SN74_IGA_3y17d	VDPE	4		51.4	35.1	E0SN74	IGAPGAVQVEFGGKPVDLRSR
681.86	870.49	E0SH51_SLY_2y8	VDPE	4		50.8	33.4	E0SH51	SLYEAELIPEAK
681.86	557.33	E0SH51_SLY_2y5	VDPE	4		50.8	33.4	E0SH51	SLYEAELIPEAK
681.86	444.25	E0SH51_SLY_2y4	VDPE	4		50.8	33.4	E0SH51	SLYEAELIPEAK
575.31	923.45	E0SAV4_LLD_2y7	VDPE	4		43.1	29.6	E0SAV4	LLDIYEVEVER
575.31	808.42	E0SAV4_LLD_2y6	VDPE	4		43.1	29.6	E0SAV4	LLDIYEVEVER
575.31	695.34	E0SAV4_LLD_2y5	VDPE	4		43.1	29.6	E0SAV4	LLDIYEVEVER
598.78	748.37	E0SHE2_EAT_2y6	VDPE	4		44.8	30.4	E0SHE2	EATFEEMIR
598.78	619.32	E0SHE2_EAT_2y5	VDPE	4		44.8	30.4	E0SHE2	EATFEEMIR

598.78	490.28	E0SHE2_EAT_2y4	VDPE	4		44.8	30.4	E0SHE2	EATFEEMIAR
638.67	760.39	E0SGF3_AIV_3y8	VDPE	4		47.7	32.3	E0SGF3	AIVQLEDGSIQAGDTLAR
638.67	632.34	E0SGF3_AIV_3y6	VDPE	4		47.7	32.3	E0SGF3	AIVQLEDGSIQAGDTLAR
638.67	460.29	E0SGF3_AIV_3y4	VDPE	4		47.7	32.3	E0SGF3	AIVQLEDGSIQAGDTLAR
711.35	764.43	E0SBL0_AAQ_2y6	VDPE	4		53	34.5	E0SBL0	AAQEEEFSLCLR
711.35	617.36	E0SBL0_AAQ_2y5	VDPE	4		53	34.5	E0SBL0	AAQEEEFSLCLR
711.35	288.20	E0SBL0_AAQ_2y2	VDPE	4		53	34.5	E0SBL0	AAQEEEFSLCLR
512.28	805.46	E0SCU4_FAS_2y7	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU4	FASLGPYLR
512.28	605.34	E0SCU4_FAS_2y5	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU4	FASLGPYLR
512.28	548.32	E0SCU4_FAS_2y4	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU4	FASLGPYLR
658.36	816.48	E0SIV2_VEG_2y7	VDPE	4		49.1	32.6	E0SIV2	VEGDIDLNTLK
658.36	703.40	E0SIV2_VEG_2y6	VDPE	4		49.1	32.6	E0SIV2	VEGDIDLNTLK
658.36	588.37	E0SIV2_VEG_2y5	VDPE	4		49.1	32.6	E0SIV2	VEGDIDLNTLK
607.80	830.39	E0SJ78_IAA_2y6	VDPE	4		45.4	30.7	E0SJ78	IAAEGPWWER
607.80	773.37	E0SJ78_IAA_2y5	VDPE	4		45.4	30.7	E0SJ78	IAAEGPWWER
607.80	490.24	E0SJ78_IAA_2y3	VDPE	4		45.4	30.7	E0SJ78	IAAEGPWWER
642.37	884.52	E0SM63_AIN_2y8	VDPE	4		47.9	32	E0SM63	AINTGLIPLTR
642.37	714.41	E0SM63_AIN_2y6	VDPE	4		47.9	32	E0SM63	AINTGLIPLTR
642.37	601.33	E0SM63_AIN_2y5	VDPE	4		47.9	32	E0SM63	AINTGLIPLTR
470.62	612.40	E0SD29_ADV_3y12d	VDPE	4		35.4	23.2	E0SD29	ADVVGSLLRPAAIK
470.62	562.86	E0SD29_ADV_3y11d	VDPE	4		35.4	23.2	E0SD29	ADVVGSLLRPAAIK
470.62	513.33	E0SD29_ADV_3y10d	VDPE	4		35.4	23.2	E0SD29	ADVVGSLLRPAAIK
635.84	836.49	E0SN77_FES_2y8	VDPE	4		47.5	31.7	E0SN77	FESAGFTIASK
635.84	418.27	E0SN77_FES_2y4	VDPE	4		47.5	31.7	E0SN77	FESAGFTIASK
635.84	305.18	E0SN77_FES_2y3	VDPE	4		47.5	31.7	E0SN77	FESAGFTIASK
502.28	690.36	E0SFM1_ISI_2y6	VDPE	4		37.7	26.9	E0SFM1	ISIVEVMGR
502.28	591.29	E0SFM1_ISI_2y5	VDPE	4		37.7	26.9	E0SFM1	ISIVEVMGR
502.28	296.15	E0SFM1_ISI_2y5d	VDPE	4		37.7	26.9	E0SFM1	ISIVEVMGR
592.36	772.46	E0SDS5_QVA_2y8	VDPE	4		44.3	30.2	E0SDS5	QVAILAIAGAEK
592.36	659.37	E0SDS5_QVA_2y7	VDPE	4		44.3	30.2	E0SDS5	QVAILAIAGAEK
592.36	475.25	E0SDS5_QVA_2y5	VDPE	4		44.3	30.2	E0SDS5	QVAILAIAGAEK
467.77	750.41	E0SH07_LAF_2y6	VDPE	4		35.2	25.7	E0SH07	LAFELSVR
467.77	474.30	E0SH07_LAF_2y4	VDPE	4		35.2	25.7	E0SH07	LAFELSVR
467.77	361.22	E0SH07_LAF_2y3	VDPE	4		35.2	25.7	E0SH07	LAFELSVR
479.78	744.43	E0SLH5_LTI_2y6	VDPE	4		36.1	26.1	E0SLH5	LTIDELVR
479.78	631.34	E0SLH5_LTI_2y5	VDPE	4		36.1	26.1	E0SLH5	LTIDELVR
479.78	516.31	E0SLH5_LTI_2y4	VDPE	4		36.1	26.1	E0SLH5	LTIDELVR
734.41	860.48	A5JMK3_VPT_2y8	VDPE	4		54.7	35.3	A5JMK3	VPTPNVSVDLTAR
734.41	460.29	A5JMK3_VPT_2y4	VDPE	4		54.7	35.3	A5JMK3	VPTPNVSVDLTAR
734.41	585.83	A5JMK3_VPT_2y11d	VDPE	4		54.7	35.3	A5JMK3	VPTPNVSVDLTAR
666.83	800.39	E0SM63_LQY_2y6	VDPE	4		49.7	32.9	E0SM63	LQYQFTDYVR
666.83	653.33	E0SM63_LQY_2y5	VDPE	4		49.7	32.9	E0SM63	LQYQFTDYVR
666.83	437.25	E0SM63_LQY_2y3	VDPE	4		49.7	32.9	E0SM63	LQYQFTDYVR
512.32	697.44	E0SCU8_GGL_2y7	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU8	GGLVPGALLAR
512.32	600.38	E0SCU8_GGL_2y6	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU8	GGLVPGALLAR
512.32	349.22	E0SCU8_GGL_2y7d	VDPE	4		38.5	27.3	E0SCU8	GGLVPGALLAR
560.33	836.46	E0SMN4_IGL_2y8	VDPE	4		42	29	E0SMN4	IGLIGTYGIGR
560.33	723.38	E0SMN4_IGL_2y7	VDPE	4		42	29	E0SMN4	IGLIGTYGIGR
560.33	666.36	E0SMN4_IGL_2y6	VDPE	4		42	29	E0SMN4	IGLIGTYGIGR
625.29	446.22	E0SIW9_EGQ_2y5	VDPE	4		46.7	31.4	E0SIW9	EGQNLDFIGGAE
625.29	333.14	E0SIW9_EGQ_2y4	VDPE	4		46.7	31.4	E0SIW9	EGQNLDFIGGAE
625.29	297.15	E0SIW9_EGQ_2y6d	VDPE	4		46.7	31.4	E0SIW9	EGQNLDFIGGAE
603.66	861.45	E0SEH6_HGG_3y7	VDPE	4		45.1	30.4	E0SEH6	HGGSIGVILNPEVYPR
603.66	635.35	E0SEH6_HGG_3y5	VDPE	4		45.1	30.4	E0SEH6	HGGSIGVILNPEVYPR
603.66	431.23	E0SEH6_HGG_3y7d	VDPE	4		45.1	30.4	E0SEH6	HGGSIGVILNPEVYPR
460.54	460.21	E0SMN0_DMT_3y7d	VDPE	4		34.7	22.6	E0SMN0	DMTIHDFDMVR
460.54	782.35	E0SMN0_DMT_3y6	VDPE	4		34.7	22.6	E0SMN0	DMTIHDFDMVR
460.54	405.23	E0SMN0_DMT_3y3	VDPE	4		34.7	22.6	E0SMN0	DMTIHDFDMVR
561.35	894.57	E0SDU0_VQP_2y8	VDPE	4		42	29.1	E0SDU0	VQPIIPVDLK
561.35	571.34	E0SDU0_VQP_2y5	VDPE	4		42	29.1	E0SDU0	VQPIIPVDLK
561.35	260.20	E0SDU0_VQP_2y2	VDPE	4		42	29.1	E0SDU0	VQPIIPVDLK
563.85	843.49	E0SB19_LAV_2y8	VDPE	4		42.2	29.2	E0SB19	LAVNIGAEVLK
563.85	729.45	E0SB19_LAV_2y7	VDPE	4		42.2	29.2	E0SB19	LAVNIGAEVLK
563.85	616.37	E0SB19_LAV_2y6	VDPE	4		42.2	29.2	E0SB19	LAVNIGAEVLK
544.81	747.41	E0SEZ4_EVI_2y7	VDPE	4		40.8	28.5	E0SEZ4	EVIPFGASLR
544.81	503.29	E0SEZ4_EVI_2y5	VDPE	4		40.8	28.5	E0SEZ4	EVIPFGASLR
544.81	374.21	E0SEZ4_EVI_2y7d	VDPE	4		40.8	28.5	E0SEZ4	EVIPFGASLR
433.58	695.39	E0SAU9_TLE_3y6	VDPE	4		32.7	21.2	E0SAU9	TLEFLGHNVIR
433.58	501.31	E0SAU9_TLE_3y4	VDPE	4		32.7	21.2	E0SAU9	TLEFLGHNVIR
433.58	319.69	E0SAU9_TLE_3y5d	VDPE	4		32.7	21.2	E0SAU9	TLEFLGHNVIR
621.86	716.43	E0SFM5_QLD_2y7	VDPE	4		46.5	31.2	E0SFM5	QLDAVLNLTGAK

621.86	603.35	E0SFM5_QLD_2y6	VDPE	4		46.5	31.2	E0SFM5	QLDAVLNTLGAK
621.86	275.17	E0SFM5_QLD_2y3	VDPE	4		46.5	31.2	E0SFM5	QLDAVLNTLGAK
642.86	786.47	E0SIN8_QID_2y8	VDPE	4		48	32	E0SIN8	QIDAALVDAGK
642.86	673.39	E0SIN8_QID_2y7	VDPE	4		48	32	E0SIN8	QIDAALVDAGK
642.86	275.17	E0SIN8_QID_2y3	VDPE	4		48	32	E0SIN8	QIDAALVDAGK
653.32	667.38	E0SF05_SFD_2y5	VDPE	4		48.7	32.4	E0SF05	SFDSTTPLYFK
653.32	457.24	E0SF05_SFD_2y3	VDPE	4		48.7	32.4	E0SF05	SFDSTTPLYFK
653.32	294.18	E0SF05_SFD_2y2	VDPE	4		48.7	32.4	E0SF05	SFDSTTPLYFK
591.36	840.52	E0SMN1_IVE_2y8	VDPE	4		44.2	30.1	E0SMN1	IVESVLPSPK
591.36	654.42	E0SMN1_IVE_2y6	VDPE	4		44.2	30.1	E0SMN1	IVESVLPSPK
591.36	541.33	E0SMN1_IVE_2y5	VDPE	4		44.2	30.1	E0SMN1	IVESVLPSPK
632.87	810.45	E0SDI4_LVE_2y7	VDPE	4		47.3	31.6	E0SDI4	LVELEAPQLPR
632.87	681.40	E0SDI4_LVE_2y6	VDPE	4		47.3	31.6	E0SDI4	LVELEAPQLPR
632.87	610.37	E0SDI4_LVE_2y5	VDPE	4		47.3	31.6	E0SDI4	LVELEAPQLPR
451.76	603.35	E0SDF0_WLL_2y5	VDPE	4		34.1	25.1	E0SDF0	WLLDTRV
451.76	490.26	E0SDF0_WLL_2y4	VDPE	4		34.1	25.1	E0SDF0	WLLDTRV
451.76	375.24	E0SDF0_WLL_2y3	VDPE	4		34.1	25.1	E0SDF0	WLLDTRV
501.93	851.43	E0SL36_TSL_3y7	VDPE	4		37.7	24.9	E0SL36	TSLIHLDTFAER
501.93	738.34	E0SL36_TSL_3y6	VDPE	4		37.7	24.9	E0SL36	TSLIHLDTFAER
501.93	494.75	E0SL36_TSL_3y8d	VDPE	4		37.7	24.9	E0SL36	TSLIHLDTFAER
557.31	887.49	E0SJW2_ELT_3y9	VDPE	4		41.7	27.9	E0SJW2	ELTPAAVTGTLSTPVGR
557.31	616.34	E0SJW2_ELT_3y6	VDPE	4		41.7	27.9	E0SJW2	ELTPAAVTGTLSTPVGR
557.31	428.26	E0SJW2_ELT_3y4	VDPE	4		41.7	27.9	E0SJW2	ELTPAAVTGTLSTPVGR
698.91	885.48	E0SMT7_LIS_2y9	VDPE	4		52.1	34	E0SMT7	LISVVLGAPSDAVR
698.91	772.39	E0SMT7_LIS_2y8	VDPE	4		52.1	34	E0SMT7	LISVVLGAPSDAVR
698.91	644.34	E0SMT7_LIS_2y6	VDPE	4		52.1	34	E0SMT7	LISVVLGAPSDAVR
544.80	747.40	E0SKK1_IDI_2y7	VDPE	4		40.8	28.5	E0SKK1	IDIDAFPAVK
544.80	632.38	E0SKK1_IDI_2y6	VDPE	4		40.8	28.5	E0SKK1	IDIDAFPAVK
544.80	414.27	E0SKK1_IDI_2y4	VDPE	4		40.8	28.5	E0SKK1	IDIDAFPAVK
668.36	866.46	E0SKR9_AGV_2y8	VDPE	4		49.8	32.9	E0SKR9	AGVLESSFVAEVK
668.36	779.43	E0SKR9_AGV_2y7	VDPE	4		49.8	32.9	E0SKR9	AGVLESSFVAEVK
668.36	446.26	E0SKR9_AGV_2y4	VDPE	4		49.8	32.9	E0SKR9	AGVLESSFVAEVK
483.32	638.42	E0SH26_LTI_2y6	VDPE	4		36.4	26.3	E0SH26	LTIAPPLK
483.32	567.39	E0SH26_LTI_2y5	VDPE	4		36.4	26.3	E0SH26	LTIAPPLK
483.32	284.20	E0SH26_LTI_2y5d	VDPE	4		36.4	26.3	E0SH26	LTIAPPLK
507.98	672.44	E0SBJ4_IID_3y6	VDPE	4		38.1	25.2	E0SBJ4	IIDSKPPVLALSIR
507.98	488.32	E0SBJ4_IID_3y4	VDPE	4		38.1	25.2	E0SBJ4	IIDSKPPVLALSIR
507.98	483.31	E0SBJ4_IID_3y9d	VDPE	4		38.1	25.2	E0SBJ4	IIDSKPPVLALSIR
526.28	750.41	E0SAY8_AMV_2y6	VDPE	4		39.5	27.8	E0SAY8	AMVEVFLSR
526.28	621.37	E0SAY8_AMV_2y5	VDPE	4		39.5	27.8	E0SAY8	AMVEVFLSR
526.28	522.30	E0SAY8_AMV_2y4	VDPE	4		39.5	27.8	E0SAY8	AMVEVFLSR
485.60	599.33	E0SD43_MNI_3y6	VDPE	4		36.5	24	E0SD43	MNIIEGVVAAPNAR
485.60	528.29	E0SD43_MNI_3y5	VDPE	4		36.5	24	E0SD43	MNIIEGVVAAPNAR
485.60	457.25	E0SD43_MNI_3y4	VDPE	4		36.5	24	E0SD43	MNIIEGVVAAPNAR
533.29	724.39	E0SH68_DLI_2y6	VDPE	4		40	28.1	E0SH68	DLIVDSYIK
533.29	625.32	E0SH68_DLI_2y5	VDPE	4		40	28.1	E0SH68	DLIVDSYIK
533.29	510.29	E0SH68_DLI_2y4	VDPE	4		40	28.1	E0SH68	DLIVDSYIK
530.31	762.41	E0SBE2_LAI_2y7	VDPE	4		39.8	27.9	E0SBE2	LAI AASSIWK
530.31	691.38	E0SBE2_LAI_2y6	VDPE	4		39.8	27.9	E0SBE2	LAI AASSIWK
530.31	333.19	E0SBE2_LAI_2y2	VDPE	4		39.8	27.9	E0SBE2	LAI AASSIWK
573.98	804.41	E0SE26_TFG_3y7	VDPE	4		43	28.8	E0SE26	TFGVEVLGISTDKPEK
573.98	501.30	E0SE26_TFG_3y4	VDPE	4		43	28.8	E0SE26	TFGVEVLGISTDKPEK
573.98	373.21	E0SE26_TFG_3y3	VDPE	4		43	28.8	E0SE26	TFGVEVLGISTDKPEK
670.34	937.44	E0SCD7_ALF_2y8	VDPE	4		50	33	E0SCD7	ALFATGNFEDVR
670.34	836.39	E0SCD7_ALF_2y7	VDPE	4		50	33	E0SCD7	ALFATGNFEDVR
670.34	274.19	E0SCD7_ALF_2y2	VDPE	4		50	33	E0SCD7	ALFATGNFEDVR
632.83	807.44	E0SN28_DGS_2y7	VDPE	4		47.3	31.6	E0SN28	DGSVVVLGFTDR
632.83	708.37	E0SN28_DGS_2y6	VDPE	4		47.3	31.6	E0SN28	DGSVVVLGFTDR
632.83	595.28	E0SN28_DGS_2y5	VDPE	4		47.3	31.6	E0SN28	DGSVVVLGFTDR
634.88	685.42	scout_EVELIQVTPK_2y7	EVEL	1	25000	37.4	31.7		EVELIQVTPK
634.88	798.51	scout_EVELIQVTPK_2y6	EVEL	2		37.4	31.7		EVELIQVTPK
679.86	916.50	E0SKI2_EAL_2y9	EVEL	4		50.7	33.3	E0SKI2	EALEWGVGTGAGLR
679.86	730.42	E0SKI2_EAL_2y8	EVEL	4		50.7	33.3	E0SKI2	EALEWGVGTGAGLR
679.86	574.33	E0SKI2_EAL_2y6	EVEL	4		50.7	33.3	E0SKI2	EALEWGVGTGAGLR
621.36	829.49	E0SLP5_LAD_2y8	EVEL	4		46.4	31.2	E0SLP5	LADILAAGLTQR
621.36	716.40	E0SLP5_LAD_2y7	EVEL	4		46.4	31.2	E0SLP5	LADILAAGLTQR
621.36	645.37	E0SLP5_LAD_2y6	EVEL	4		46.4	31.2	E0SLP5	LADILAAGLTQR
596.34	851.46	E0SJA9_NIL_2y7	EVEL	4		44.6	30.3	E0SJA9	NILLVTEYAR
596.34	738.38	E0SJA9_NIL_2y6	EVEL	4		44.6	30.3	E0SJA9	NILLVTEYAR
596.34	639.31	E0SJA9_NIL_2y5	EVEL	4		44.6	30.3	E0SJA9	NILLVTEYAR
474.61	883.48	E0SGJ3_VAV_3y9	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGJ3	VAVVGLGLGHMAIK

474.61	656.35	E0SGJ3_VAV_3y6	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGJ3	VAVVGLGGLGHMAIK
474.61	442.24	E0SGJ3_VAV_3y9d	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGJ3	VAVVGLGGLGHMAIK
474.60	623.42	E0SGD3_IEG_3y5	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGD3	IEGLDDGVIHLK
474.60	510.34	E0SGD3_IEG_3y4	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGD3	IEGLDDGVIHLK
474.60	397.26	E0SGD3_IEG_3y3	EVEL	4		35.7	23.4	E0SGD3	IEGLDDGVIHLK
575.82	700.40	E0SC64_VGF_2y7	EVEL	4		43.1	29.6	E0SC64	VGFFNPIATGK
575.82	586.36	E0SC64_VGF_2y6	EVEL	4		43.1	29.6	E0SC64	VGFFNPIATGK
575.82	376.22	E0SC64_VGF_2y4	EVEL	4		43.1	29.6	E0SC64	VGFFNPIATGK
693.84	881.45	E0SHN1_EYV_2y7	EVEL	4		51.7	33.8	E0SHN1	EYVNPGFLEYR
693.84	338.18	E0SHN1_EYV_2y2	EVEL	4		51.7	33.8	E0SHN1	EYVNPGFLEYR
693.84	441.23	E0SHN1_EYV_2y7d	EVEL	4		51.7	33.8	E0SHN1	EYVNPGFLEYR
592.30	784.43	E0SLH5_SLL_3y7	EVEL	4		44.3	29.8	E0SLH5	SLLAEEAYNPDLVQR
592.30	572.35	E0SLH5_SLL_3y5	EVEL	4		44.3	29.8	E0SLH5	SLLAEEAYNPDLVQR
592.30	392.72	E0SLH5_SLL_3y7d	EVEL	4		44.3	29.8	E0SLH5	SLLAEEAYNPDLVQR
439.90	758.42	E0SKB0_SLM_3y6	EVEL	4		33.2	21.5	E0SKB0	SLMDLAKPEWK
439.90	559.29	E0SKB0_SLM_3y4	EVEL	4		33.2	21.5	E0SKB0	SLMDLAKPEWK
439.90	333.19	E0SKB0_SLM_3y2	EVEL	4		33.2	21.5	E0SKB0	SLMDLAKPEWK
668.05	317.22	E0SDB3_TLL_3y3	EVEL	4		49.8	33.9	E0SDB3	TLLTQVAPPVSAHVVDVAK
668.05	638.36	E0SDB3_TLL_3y13d	EVEL	4		49.8	33.9	E0SDB3	TLLTQVAPPVSAHVVDVAK
668.05	589.83	E0SDB3_TLL_3y12d	EVEL	4		49.8	33.9	E0SDB3	TLLTQVAPPVSAHVVDVAK
652.85	842.48	A5JMW4_SDL_2y8	EVEL	4		48.7	32.4	A5JMW4	SDLFNVNAGIVR
652.85	728.44	A5JMW4_SDL_2y7	EVEL	4		48.7	32.4	A5JMW4	SDLFNVNAGIVR
652.85	629.37	A5JMW4_SDL_2y6	EVEL	4		48.7	32.4	A5JMW4	SDLFNVNAGIVR
587.80	832.43	E0SD68_QDV_2y7	EVEL	4		44	30	E0SD68	QDVLGDLMQR
587.80	719.35	E0SD68_QDV_2y6	EVEL	4		44	30	E0SD68	QDVLGDLMQR
587.80	547.30	E0SD68_QDV_2y4	EVEL	4		44	30	E0SD68	QDVLGDLMQR
434.78	654.45	E0SM65_VDP_2y6	EVEL	4		32.8	24.5	E0SM65	VDPIALLK
434.78	444.32	E0SM65_VDP_2y4	EVEL	4		32.8	24.5	E0SM65	VDPIALLK
434.78	327.73	E0SM65_VDP_2y6d	EVEL	4		32.8	24.5	E0SM65	VDPIALLK
499.31	787.47	E0SEZ2_LPG_2y7	EVEL	4		37.5	26.8	E0SEZ2	LPGILELSR
499.31	617.36	E0SEZ2_LPG_2y5	EVEL	4		37.5	26.8	E0SEZ2	LPGILELSR
499.31	442.76	E0SEZ2_LPG_2y8d	EVEL	4		37.5	26.8	E0SEZ2	LPGILELSR
693.41	856.50	E0SC75_TTL_2y8	EVEL	4		51.7	33.8	E0SC75	TTLTLQVIAAAQR
693.41	728.44	E0SC75_TTL_2y7	EVEL	4		51.7	33.8	E0SC75	TTLTLQVIAAAQR
693.41	629.37	E0SC75_TTL_2y6	EVEL	4		51.7	33.8	E0SC75	TTLTLQVIAAAQR
466.93	260.20	E0SB60_IDL_3y2	EVEL	4		35.2	23	E0SB60	IDLNRPMADILK
466.93	643.35	E0SB60_IDL_3y11d	EVEL	4		35.2	23	E0SB60	IDLNRPMADILK
466.93	585.84	E0SB60_IDL_3y10d	EVEL	4		35.2	23	E0SB60	IDLNRPMADILK
491.58	897.44	E0SEH6_YGL_3y7	EVEL	4		37	24.3	E0SEH6	YGLIEIDLEHDR
491.58	784.36	E0SEH6_YGL_3y6	EVEL	4		37	24.3	E0SEH6	YGLIEIDLEHDR
491.58	427.20	E0SEH6_YGL_3y3	EVEL	4		37	24.3	E0SEH6	YGLIEIDLEHDR
408.27	587.41	E0SHT8_DLI_2y5	EVEL	4		30.9	23.6	E0SHT8	DLITILK
408.27	474.33	E0SHT8_DLI_2y4	EVEL	4		30.9	23.6	E0SHT8	DLITILK
408.27	260.20	E0SHT8_DLI_2y2	EVEL	4		30.9	23.6	E0SHT8	DLITILK
501.60	501.31	E0SD29_LQF_3y5	EVEL	4		37.7	24.9	E0SD29	LQFQAGEIDAAALR
501.60	616.34	E0SD29_LQF_3y6	EVEL	4		37.7	24.9	E0SD29	LQFQAGEIDAAALR
501.60	430.28	E0SD29_LQF_3y4	EVEL	4		37.7	24.9	E0SD29	LQFQAGEIDAAALR
829.73	815.46	E0SFK8_SNW_3y7	EVEL	4		61.6	42.7	E0SFK8	SNWTQQQAGEASAPTIEVDALR
829.73	702.38	E0SFK8_SNW_3y6	EVEL	4		61.6	42.7	E0SFK8	SNWTQQQAGEASAPTIEVDALR
829.73	507.28	E0SFK8_SNW_3y9d	EVEL	4		61.6	42.7	E0SFK8	SNWTQQQAGEASAPTIEVDALR
701.39	912.51	E0SHN1_LAA_2y8	EVEL	4		52.2	34.1	E0SHN1	LAAAYPDLIVEAR
701.39	700.44	E0SHN1_LAA_2y6	EVEL	4		52.2	34.1	E0SHN1	LAAAYPDLIVEAR
701.39	456.76	E0SHN1_LAA_2y8d	EVEL	4		52.2	34.1	E0SHN1	LAAAYPDLIVEAR
539.29	538.29	E0SMZ2_ELP_2y4	EVEL	4		40.4	28.3	E0SMZ2	ELPSILDYK
539.29	310.18	E0SMZ2_ELP_2y2	EVEL	4		40.4	28.3	E0SMZ2	ELPSILDYK
539.29	418.23	E0SMZ2_ELP_2y7d	EVEL	4		40.4	28.3	E0SMZ2	ELPSILDYK
497.92	887.47	E0SMX4_FNT_3y7	EVEL	4		37.4	24.7	E0SMX4	FNTEIVFDHITR
497.92	788.40	E0SMX4_FNT_3y6	EVEL	4		37.4	24.7	E0SMX4	FNTEIVFDHITR
497.92	526.31	E0SMX4_FNT_3y4	EVEL	4		37.4	24.7	E0SMX4	FNTEIVFDHITR
602.83	790.42	E0SLG7_LGI_2y8	EVEL	4		45.1	30.6	E0SLG7	LGIMPGFGGTVR
602.83	693.37	E0SLG7_LGI_2y7	EVEL	4		45.1	30.6	E0SLG7	LGIMPGFGGTVR
602.83	395.71	E0SLG7_LGI_2y8d	EVEL	4		45.1	30.6	E0SLG7	LGIMPGFGGTVR
490.95	848.47	E0SM64_ALD_3y8	EVEL	4		36.9	24.3	E0SM64	ALDIPLPAVTAHR
490.95	424.74	E0SM64_ALD_3y8d	EVEL	4		36.9	24.3	E0SM64	ALDIPLPAVTAHR
490.95	376.21	E0SM64_ALD_3y7d	EVEL	4		36.9	24.3	E0SM64	ALDIPLPAVTAHR
539.96	726.39	P52662-PECT_LLT_3y6	EVEL	4		40.5	27	P52662	LLTEHQIQLGYAR
539.96	579.32	P52662-PECT_LLT_3y5	EVEL	4		40.5	27	P52662	LLTEHQIQLGYAR
539.96	466.24	P52662-PECT_LLT_3y4	EVEL	4		40.5	27	P52662	LLTEHQIQLGYAR
603.31	616.33	E0SH81_YFR_3y6	EVEL	4		45.1	30.4	E0SH81	YFRPAEVDTLGDPSPK
603.31	503.25	E0SH81_YFR_3y5	EVEL	4		45.1	30.4	E0SH81	YFRPAEVDTLGDPSPK
603.31	331.20	E0SH81_YFR_3y3	EVEL	4		45.1	30.4	E0SH81	YFRPAEVDTLGDPSPK

761.93	800.39	E0SFA5_VIL_2y7	EVEL	4		56.7	36.3	E0SFA5	VILIGNLGQDPEVR
761.93	500.28	E0SFA5_VIL_2y4	EVEL	4		56.7	36.3	E0SFA5	VILIGNLGQDPEVR
761.93	274.19	E0SFA5_VIL_2y2	EVEL	4		56.7	36.3	E0SFA5	VILIGNLGQDPEVR
575.66	744.43	E0SDI4_VGV_3y7	EVEL	4		43.1	28.9	E0SDI4	VGIVVGAEQQVAEVAQK
575.66	645.36	E0SDI4_VGV_3y6	EVEL	4		43.1	28.9	E0SDI4	VGIVVGAEQQVAEVAQK
575.66	346.21	E0SDI4_VGV_3y3	EVEL	4		43.1	28.9	E0SDI4	VGIVVGAEQQVAEVAQK
497.28	589.35	E0SH95_SGF_2y5	EVEL	4		37.4	26.8	E0SH95	SGFIFIGPR
497.28	442.28	E0SH95_SGF_2y4	EVEL	4		37.4	26.8	E0SH95	SGFIFIGPR
497.28	329.19	E0SH95_SGF_2y3	EVEL	4		37.4	26.8	E0SH95	SGFIFIGPR
585.86	944.55	E0SKK2_LLI_2y10	EVEL	4		43.8	29.9	E0SKK2	LLITGGTGLIGR
585.86	831.47	E0SKK2_LLI_2y9	EVEL	4		43.8	29.9	E0SKK2	LLITGGTGLIGR
585.86	730.42	E0SKK2_LLI_2y8	EVEL	4		43.8	29.9	E0SKK2	LLITGGTGLIGR
723.88	915.44	E0SN63_FLS_2y9	EVEL	4		53.9	34.9	E0SN63	FLSALAGIDDPEAK
723.88	844.40	E0SN63_FLS_2y8	EVEL	4		53.9	34.9	E0SN63	FLSALAGIDDPEAK
723.88	444.25	E0SN63_FLS_2y4	EVEL	4		53.9	34.9	E0SN63	FLSALAGIDDPEAK
676.05	391.23	Q934G6-TOLB_IIEI_3y3	EVEL	4		50.4	34.4	Q934G6	IEITQGVDSARPIGVVPPFK
676.05	294.18	Q934G6-TOLB_IIEI_3y2	EVEL	4		50.4	34.4	Q934G6	IEITQGVDSARPIGVVPPFK
676.05	835.96	Q934G6-TOLB_IIEI_3y16d	EVEL	4		50.4	34.4	Q934G6	IEITQGVDSARPIGVVPPFK
670.89	944.50	E0SH14_AII_2y10	EVEL	4		50	33	E0SH14	AIIVAEGLADAVAK
670.89	744.43	E0SH14_AII_2y8	EVEL	4		50	33	E0SH14	AIIVAEGLADAVAK
670.89	388.26	E0SH14_AII_2y4	EVEL	4		50	33	E0SH14	AIIVAEGLADAVAK
548.63	642.36	E0SGU7_ALL_3y5	EVEL	4		41.1	27.4	E0SGU7	ALLEFAQQTPELQR
548.63	416.26	E0SGU7_ALL_3y3	EVEL	4		41.1	27.4	E0SGU7	ALLEFAQQTPELQR
548.63	321.68	E0SGU7_ALL_3y5d	EVEL	4		41.1	27.4	E0SGU7	ALLEFAQQTPELQR
647.40	911.53	E0SDP8_LVG_2y9	EVEL	4		48.3	32.2	E0SDP8	LVGLLGNLPAQAQK
647.40	798.45	E0SDP8_LVG_2y8	EVEL	4		48.3	32.2	E0SDP8	LVGLLGNLPAQAQK
647.40	514.30	E0SDP8_LVG_2y5	EVEL	4		48.3	32.2	E0SDP8	LVGLLGNLPAQAQK
657.36	684.44	E0SBL5_IIEG_2y6	EVEL	4		49	32.5	E0SBL5	IEGGSWLVPTVR
657.36	571.36	E0SBL5_IIEG_2y5	EVEL	4		49	32.5	E0SBL5	IEGGSWLVPTVR
657.36	472.29	E0SBL5_IIEG_2y4	EVEL	4		49	32.5	E0SBL5	IEGGSWLVPTVR
426.56	503.28	P52234-DSBA_YHV_3y5	EVEL	4		32.2	20.8	P52234	YHVDFLGEGLGK
426.56	446.26	P52234-DSBA_YHV_3y4	EVEL	4		32.2	20.8	P52234	YHVDFLGEGLGK
426.56	317.22	P52234-DSBA_YHV_3y3	EVEL	4		32.2	20.8	P52234	YHVDFLGEGLGK
810.90	870.47	E0SIW4_VLY_2y8	EVEL	4		60.2	38	E0SIW4	VLYEMDGVPEELAR
810.90	813.45	E0SIW4_VLY_2y7	EVEL	4		60.2	38	E0SIW4	VLYEMDGVPEELAR
810.90	714.38	E0SIW4_VLY_2y6	EVEL	4		60.2	38	E0SIW4	VLYEMDGVPEELAR
472.79	742.48	E0SIE8_TTI_2y6	EVEL	4		35.6	25.9	E0SIE8	TTIDILLR
472.79	629.40	E0SIE8_TTI_2y5	EVEL	4		35.6	25.9	E0SIE8	TTIDILLR
472.79	514.37	E0SIE8_TTI_2y4	EVEL	4		35.6	25.9	E0SIE8	TTIDILLR
586.65	756.40	E0SD85_FVL_3y13d	EVEL	4		43.9	29.5	E0SD85	FVLPYNPAEIRPDAR
586.65	699.86	E0SD85_FVL_3y12d	EVEL	4		43.9	29.5	E0SD85	FVLPYNPAEIRPDAR
586.65	651.33	E0SD85_FVL_3y11d	EVEL	4		43.9	29.5	E0SD85	FVLPYNPAEIRPDAR
471.78	758.44	E0SMW9_ALD_2y6	EVEL	4		35.5	25.8	E0SMW9	ALDIELLR
471.78	643.41	E0SMW9_ALD_2y5	EVEL	4		35.5	25.8	E0SMW9	ALDIELLR
471.78	530.33	E0SMW9_ALD_2y4	EVEL	4		35.5	25.8	E0SMW9	ALDIELLR
590.98	918.45	E0SMN1_ELG_3y9	EVEL	4		44.2	29.7	E0SMN1	ELGVNLQVLDSQGSSPK
590.98	805.37	E0SMN1_ELG_3y8	EVEL	4		44.2	29.7	E0SMN1	ELGVNLQVLDSQGSSPK
590.98	690.34	E0SMN1_ELG_3y7	EVEL	4		44.2	29.7	E0SMN1	ELGVNLQVLDSQGSSPK
557.96	770.42	E0SGF0_AAA_3y7	EVEL	4		41.8	27.9	E0SGF0	AAAFEGELIPAAQIDR
557.96	602.33	E0SGF0_AAA_3y5	EVEL	4		41.8	27.9	E0SGF0	AAAFEGELIPAAQIDR
557.96	385.71	E0SGF0_AAA_3y7d	EVEL	4		41.8	27.9	E0SGF0	AAAFEGELIPAAQIDR
563.29	925.45	P37982-IHFA_LSG_2y8	EVEL	4		42.2	29.1	P37982	LSGFNGFDLR
563.29	721.36	P37982-IHFA_LSG_2y6	EVEL	4		42.2	29.1	P37982	LSGFNGFDLR
563.29	288.20	P37982-IHFA_LSG_2y2	EVEL	4		42.2	29.1	P37982	LSGFNGFDLR
721.40	785.45	E0SD92_SQT_2y7	EVEL	4		53.7	34.8	E0SD92	SQTLNIITELPGR
721.40	672.37	E0SD92_SQT_2y6	EVEL	4		53.7	34.8	E0SD92	SQTLNIITELPGR
721.40	329.19	E0SD92_SQT_2y3	EVEL	4		53.7	34.8	E0SD92	SQTLNIITELPGR
509.30	597.85	P37985-RS1_AFL_3y11d	EVEL	4		38.2	25.3	P37985	AFLPGSLVDVPRVPR
509.30	549.32	P37985-RS1_AFL_3y10d	EVEL	4		38.2	25.3	P37985	AFLPGSLVDVPRVPR
509.30	313.71	P37985-RS1_AFL_3y5d	EVEL	4		38.2	25.3	P37985	AFLPGSLVDVPRVPR
750.90	948.43	E0SLI5_LGG_2y8	EVEL	4		55.9	35.9	E0SLI5	LGGVLLDSEALER
750.90	833.40	E0SLI5_LGG_2y7	EVEL	4		55.9	35.9	E0SLI5	LGGVLLDSEALER
750.90	304.16	E0SLI5_LGG_2y2	EVEL	4		55.9	35.9	E0SLI5	LGGVLLDSEALER
859.43	689.36	E0SDV4_GGY_2y6	EVEL	4		63.8	39.8	E0SDV4	GGYFPVPPVDSAQDLR
859.43	288.20	E0SDV4_GGY_2y2	EVEL	4		63.8	39.8	E0SDV4	GGYFPVPPVDSAQDLR
859.43	549.28	E0SDV4_GGY_2y10d	EVEL	4		63.8	39.8	E0SDV4	GGYFPVPPVDSAQDLR
518.60	651.35	E0SLP9_LFH_3y5	EVEL	4		38.9	25.8	E0SLP9	LFHYGDGLAYLER
518.60	580.31	E0SLP9_LFH_3y4	EVEL	4		38.9	25.8	E0SLP9	LFHYGDGLAYLER
518.60	417.25	E0SLP9_LFH_3y3	EVEL	4		38.9	25.8	E0SLP9	LFHYGDGLAYLER
537.82	701.39	E0SLP9_FLL_2y6	EVEL	4		40.3	28.2	E0SLP9	FLLVLDQR
537.82	602.33	E0SLP9_FLL_2y5	EVEL	4		40.3	28.2	E0SLP9	FLLVLDQR

537.82	374.21	E0SLP9_FLL_2y3	EVEL	4		40.3	28.2	E0SLP9	FLLVLDAQR
529.28	807.45	scout_SYYWIGIR_2y6	SYW	1	80000	29.7	27.9		SYWIGIR
529.28	644.39	scout_SYYWIGIR_2y5	SYW	2		29.7	27.9		SYWIGIR
567.79	628.41	E0SAT2_DEF_2y6	SYW	4		42.5	29.3	E0SAT2	DEFDLIAVGR
567.79	515.33	E0SAT2_DEF_2y5	SYW	4		42.5	29.3	E0SAT2	DEFDLIAVGR
567.79	402.25	E0SAT2_DEF_2y4	SYW	4		42.5	29.3	E0SAT2	DEFDLIAVGR
651.85	946.52	E0SM65_GAD_2y8	SYW	4		48.6	32.3	E0SM65	GADISTLLEVER
651.85	859.49	E0SM65_GAD_2y7	SYW	4		48.6	32.3	E0SM65	GADISTLLEVER
651.85	645.36	E0SM65_GAD_2y5	SYW	4		48.6	32.3	E0SM65	GADISTLLEVER
476.78	726.39	E0SHB6_LIF_2y5	SYW	4		35.9	26	E0SHB6	LIFQYLR
476.78	579.32	E0SHB6_LIF_2y4	SYW	4		35.9	26	E0SHB6	LIFQYLR
476.78	451.27	E0SHB6_LIF_2y3	SYW	4		35.9	26	E0SHB6	LIFQYLR
626.67	875.45	E0SH50_IFD_3y8	SYW	4		46.8	31.7	E0SH50	IFDFVKPGVITGDDVQK
626.67	762.36	E0SH50_IFD_3y7	SYW	4		46.8	31.7	E0SH50	IFDFVKPGVITGDDVQK
626.67	661.32	E0SH50_IFD_3y6	SYW	4		46.8	31.7	E0SH50	IFDFVKPGVITGDDVQK
568.31	662.35	E0SIX7_FVN_2y6	SYW	4		42.5	29.3	E0SIX7	FVNILMVDGK
568.31	549.27	E0SIX7_FVN_2y5	SYW	4		42.5	29.3	E0SIX7	FVNILMVDGK
568.31	319.16	E0SIX7_FVN_2y3	SYW	4		42.5	29.3	E0SIX7	FVNILMVDGK
481.30	634.37	E0SEQ4_ITL_2y6	SYW	4		36.2	26.2	E0SEQ4	ITLALAGFR
481.30	563.33	E0SEQ4_ITL_2y5	SYW	4		36.2	26.2	E0SEQ4	ITLALAGFR
481.30	450.25	E0SEQ4_ITL_2y4	SYW	4		36.2	26.2	E0SEQ4	ITLALAGFR
624.02	636.36	E0SBC0_QLD_3y5	SYW	4		46.6	31.5	E0SBC0	QLDQLPIIVDHPQVR
624.02	499.30	E0SBC0_QLD_3y4	SYW	4		46.6	31.5	E0SBC0	QLDQLPIIVDHPQVR
624.02	636.87	E0SBC0_QLD_3y11d	SYW	4		46.6	31.5	E0SBC0	QLDQLPIIVDHPQVR
552.82	878.46	E0SDE1_ILA_2y8	SYW	4		41.4	28.8	E0SDE1	ILADIADFVK
552.82	579.31	E0SDE1_ILA_2y5	SYW	4		41.4	28.8	E0SDE1	ILADIADFVK
552.82	409.21	E0SDE1_ILA_2y3	SYW	4		41.4	28.8	E0SDE1	ILADIADFVK
695.91	857.52	E0SCC9_AVS_2y9	SYW	4		51.8	33.9	E0SCC9	AVSLYLGAVATAVR
695.91	744.44	E0SCC9_AVS_2y8	SYW	4		51.8	33.9	E0SCC9	AVSLYLGAVATAVR
695.91	687.41	E0SCC9_AVS_2y7	SYW	4		51.8	33.9	E0SCC9	AVSLYLGAVATAVR
615.83	933.44	E0SLG7_LAI_2y7	SYW	4		46	31	E0SLG7	LAITDQLDWR
615.83	832.39	E0SLG7_LAI_2y6	SYW	4		46	31	E0SLG7	LAITDQLDWR
615.83	361.20	E0SLG7_LAI_2y2	SYW	4		46	31	E0SLG7	LAITDQLDWR
476.99	470.31	E0SEZ3_IVI_3y4	SYW	4		35.9	23.5	E0SEZ3	IVIRPLPGLPVVR
476.99	658.43	E0SEZ3_IVI_3y12d	SYW	4		35.9	23.5	E0SEZ3	IVIRPLPGLPVVR
476.99	608.90	E0SEZ3_IVI_3y11d	SYW	4		35.9	23.5	E0SEZ3	IVIRPLPGLPVVR
620.83	877.48	E0SED7_YLS_2y7	SYW	4		46.4	31.2	E0SED7	YLSLLPYTDR
620.83	764.39	E0SED7_YLS_2y6	SYW	4		46.4	31.2	E0SED7	YLSLLPYTDR
620.83	651.31	E0SED7_YLS_2y5	SYW	4		46.4	31.2	E0SED7	YLSLLPYTDR
712.37	867.48	E0SIM2_EAI_3y7	SYW	4		53	36.3	E0SIM2	EAIALGGVDEVVDLHQVSQR
712.37	754.40	E0SIM2_EAI_3y6	SYW	4		53	36.3	E0SIM2	EAIALGGVDEVVDLHQVSQR
712.37	819.42	E0SIM2_EAI_3y15d	SYW	4		53	36.3	E0SIM2	EAIALGGVDEVVDLHQVSQR
537.65	655.39	E0SMT2_ELV_3y6	SYW	4		40.3	26.8	E0SMT2	ELVFKPLEAAQLPR
537.65	513.31	E0SMT2_ELV_3y4	SYW	4		40.3	26.8	E0SMT2	ELVFKPLEAAQLPR
537.65	385.26	E0SMT2_ELV_3y3	SYW	4		40.3	26.8	E0SMT2	ELVFKPLEAAQLPR
709.02	878.42	E0SJX0_IDS_3y8	SYW	4		52.8	36.2	E0SJX0	IDSSVQAVGYVDDSTLTAR
709.02	763.39	E0SJX0_IDS_3y7	SYW	4		52.8	36.2	E0SJX0	IDSSVQAVGYVDDSTLTAR
709.02	648.37	E0SJX0_IDS_3y6	SYW	4		52.8	36.2	E0SJX0	IDSSVQAVGYVDDSTLTAR
524.29	793.50	E0SEY9_ITY_3y7	SYW	4		39.3	26.1	E0SEY9	ITYIDGVDGVLHHR
524.29	694.44	E0SEY9_ITY_3y6	SYW	4		39.3	26.1	E0SEY9	ITYIDGVDGVLHHR
524.29	538.35	E0SEY9_ITY_3y4	SYW	4		39.3	26.1	E0SEY9	ITYIDGVDGVLHHR
783.88	944.48	E0SDS4_AAF_2y8	SYW	4		58.3	37.1	E0SDS4	AAFDFAVENQALDR
783.88	845.41	E0SDS4_AAF_2y7	SYW	4		58.3	37.1	E0SDS4	AAFDFAVENQALDR
783.88	716.37	E0SDS4_AAF_2y6	SYW	4		58.3	37.1	E0SDS4	AAFDFAVENQALDR
555.27	717.41	E0SC51_HED_3y6	SYW	4		41.6	27.8	E0SC51	HEDMYTAVNELITK
555.27	361.24	E0SC51_HED_3y3	SYW	4		41.6	27.8	E0SC51	HEDMYTAVNELITK
578.35	884.55	E0SH51_ASL_2y8	SYW	4		43.3	29.7	E0SH51	ASLPTIEIALK
578.35	686.44	E0SH51_ASL_2y6	SYW	4		43.3	29.7	E0SH51	ASLPTIEIALK
578.35	442.78	E0SH51_ASL_2y8d	SYW	4		43.3	29.7	E0SH51	ASLPTIEIALK
536.99	671.42	E0SDS1_LVL_3y7	SYW	4		40.3	26.8	E0SDS1	LVLEVQQQLGGGLVR
536.99	558.34	E0SDS1_LVL_3y6	SYW	4		40.3	26.8	E0SDS1	LVLEVQQQLGGGLVR
536.99	501.31	E0SDS1_LVL_3y5	SYW	4		40.3	26.8	E0SDS1	LVLEVQQQLGGGLVR
657.39	900.55	E0SEU7_ALT_2y8	SYW	4		49	32.5	E0SEU7	ALTQETLAVVR
657.39	771.51	E0SEU7_ALT_2y7	SYW	4		49	32.5	E0SEU7	ALTQETLAVVR
657.39	557.38	E0SEU7_ALT_2y5	SYW	4		49	32.5	E0SEU7	ALTQETLAVVR
836.93	918.43	Q9F496-OPGG_GLA_2y8	SYW	4		62.1	39	Q9F496	GLAIDTALPSGEEFPR
836.93	821.38	Q9F496-OPGG_GLA_2y7	SYW	4		62.1	39	Q9F496	GLAIDTALPSGEEFPR
836.93	272.17	Q9F496-OPGG_GLA_2y2	SYW	4		62.1	39	Q9F496	GLAIDTALPSGEEFPR
700.06	815.44	E0SHR0_IVA_3y8	SYW	4		52.2	35.7	E0SHR0	IVASVQAKPEFINDVAAAVR
700.06	586.37	E0SHR0_IVA_3y6	SYW	4		52.2	35.7	E0SHR0	IVASVQAKPEFINDVAAAVR
700.06	487.30	E0SHR0_IVA_3y5	SYW	4		52.2	35.7	E0SHR0	IVASVQAKPEFINDVAAAVR

611.88	768.47	E0SDN8_ELL_2y8	SYW	4		45.7	30.9	E0SDN8	ELLVLAGGVPR
611.88	655.39	E0SDN8_ELL_2y7	SYW	4		45.7	30.9	E0SDN8	ELLVLAGGVPR
611.88	584.35	E0SDN8_ELL_2y6	SYW	4		45.7	30.9	E0SDN8	ELLVLAGGVPR
661.83	876.44	E0SHE6_DAF_2y8	SYW	4		49.4	32.7	E0SHE6	DAFLASLTAER
661.83	805.41	E0SHE6_DAF_2y7	SYW	4		49.4	32.7	E0SHE6	DAFLASLTAER
661.83	605.29	E0SHE6_DAF_2y5	SYW	4		49.4	32.7	E0SHE6	DAFLASLTAER
540.84	712.44	E0SIM5_GVI_2y6	SYW	4		40.5	28.3	E0SIM5	GVIVPVDLR
540.84	288.20	E0SIM5_GVI_2y2	SYW	4		40.5	28.3	E0SIM5	GVIVPVDLR
540.84	356.72	E0SIM5_GVI_2y6d	SYW	4		40.5	28.3	E0SIM5	GVIVPVDLR
606.36	785.46	E0SKH9_VDV_2y8	SYW	4		45.3	30.7	E0SKH9	VDVIVQALAGAR
606.36	686.39	E0SKH9_VDV_2y7	SYW	4		45.3	30.7	E0SKH9	VDVIVQALAGAR
606.36	558.34	E0SKH9_VDV_2y6	SYW	4		45.3	30.7	E0SKH9	VDVIVQALAGAR
523.26	768.40	E0SF72_NYF_2y6	SYW	4		39.3	27.7	E0SF72	NYFDIAR
523.26	621.34	E0SF72_NYF_2y5	SYW	4		39.3	27.7	E0SF72	NYFDIAR
523.26	506.31	E0SF72_NYF_2y4	SYW	4		39.3	27.7	E0SF72	NYFDIAR
682.36	832.45	E0SCL7_VVA_2y8	SYW	4		50.9	33.4	E0SCL7	VVADFLSSVGVD
682.36	719.37	E0SCL7_VVA_2y7	SYW	4		50.9	33.4	E0SCL7	VVADFLSSVGVD
682.36	446.24	E0SCL7_VVA_2y4	SYW	4		50.9	33.4	E0SCL7	VVADFLSSVGVD
658.34	838.41	E0SJ64_QAG_3y8	SYW	4		49.1	33.4	E0SJ64	QAGIDVQLNPVDSGGFISR
658.34	723.38	E0SJ64_QAG_3y7	SYW	4		49.1	33.4	E0SJ64	QAGIDVQLNPVDSGGFISR
658.34	636.35	E0SJ64_QAG_3y6	SYW	4		49.1	33.4	E0SJ64	QAGIDVQLNPVDSGGFISR
440.28	642.39	E0SH66_TVL_3y6	SYW	4		33.2	21.5	E0SH66	TVLHLIPSGILR
440.28	545.34	E0SH66_TVL_3y5	SYW	4		33.2	21.5	E0SH66	TVLHLIPSGILR
440.28	321.70	E0SH66_TVL_3y6d	SYW	4		33.2	21.5	E0SH66	TVLHLIPSGILR
525.29	789.43	E0SLP5_FID_2y7	SYW	4		39.4	27.8	E0SLP5	FIDAMLAIR
525.29	674.40	E0SLP5_FID_2y6	SYW	4		39.4	27.8	E0SLP5	FIDAMLAIR
525.29	603.36	E0SLP5_FID_2y5	SYW	4		39.4	27.8	E0SLP5	FIDAMLAIR
705.41	860.48	E0SIE9_APL_3y16d	SYW	4		52.5	36	E0SIE9	APLILVDGIPQSNPLRPTGR
705.41	803.94	E0SIE9_APL_3y15d	SYW	4		52.5	36	E0SIE9	APLILVDGIPQSNPLRPTGR
705.41	696.89	E0SIE9_APL_3y13d	SYW	4		52.5	36	E0SIE9	APLILVDGIPQSNPLRPTGR
544.28	827.40	E0SLK4_FLF_2y6	SYW	4		40.8	28.5	E0SLK4	FLFDQYVR
544.28	680.34	E0SLK4_FLF_2y5	SYW	4		40.8	28.5	E0SLK4	FLFDQYVR
544.28	565.31	E0SLK4_FLF_2y4	SYW	4		40.8	28.5	E0SLK4	FLFDQYVR
458.78	716.43	E0SIX0_SIL_2y6	SYW	4		34.6	25.4	E0SIX0	SILSELVR
458.78	603.35	E0SIX0_SIL_2y5	SYW	4		34.6	25.4	E0SIX0	SILSELVR
458.78	387.27	E0SIX0_SIL_2y3	SYW	4		34.6	25.4	E0SIX0	SILSELVR
715.38	944.54	E0SED6_DIA_2y10	SYW	4		53.3	34.6	E0SED6	DIADAITAAGVDVAK
715.38	831.46	E0SED6_DIA_2y9	SYW	4		53.3	34.6	E0SED6	DIADAITAAGVDVAK
715.38	659.37	E0SED6_DIA_2y7	SYW	4		53.3	34.6	E0SED6	DIADAITAAGVDVAK
775.40	908.45	P37985-RS1_GAT_2y8	SYW	4		57.6	36.8	P37985	GATVELADGVEGYLR
775.40	793.42	P37985-RS1_GAT_2y7	SYW	4		57.6	36.8	P37985	GATVELADGVEGYLR
775.40	508.29	P37985-RS1_GAT_2y4	SYW	4		57.6	36.8	P37985	GATVELADGVEGYLR
661.34	895.39	E0SBJ2_LVT_2y8	SYW	4		49.3	32.7	E0SBJ2	LVTIDGFEFGGWK
661.34	780.37	E0SBJ2_LVT_2y7	SYW	4		49.3	32.7	E0SBJ2	LVTIDGFEFGGWK
661.34	447.24	E0SBJ2_LVT_2y4	SYW	4		49.3	32.7	E0SBJ2	LVTIDGFEFGGWK
613.88	886.54	E0SEB2_IGV_2y8	SYW	4		45.9	31	E0SEB2	IGVAASVQQLLK
613.88	815.50	E0SEB2_IGV_2y7	SYW	4		45.9	31	E0SEB2	IGVAASVQQLLK
613.88	629.40	E0SEB2_IGV_2y5	SYW	4		45.9	31	E0SEB2	IGVAASVQQLLK
537.32	829.50	E0SIM5_MLI_2y7	SYW	4		40.3	28.2	E0SIM5	MLILVDIEK
537.32	716.42	E0SIM5_MLI_2y6	SYW	4		40.3	28.2	E0SIM5	MLILVDIEK
537.32	603.33	E0SIM5_MLI_2y5	SYW	4		40.3	28.2	E0SIM5	MLILVDIEK
657.31	763.41	E0SGF2_FIE_3y7	SYW	4		49	33.3	E0SGF2	FIEQDPEGQYGLEAAFR
657.31	593.30	E0SGF2_FIE_3y5	SYW	4		49	33.3	E0SGF2	FIEQDPEGQYGLEAAFR
657.31	464.26	E0SGF2_FIE_3y4	SYW	4		49	33.3	E0SGF2	FIEQDPEGQYGLEAAFR
714.04	845.45	E0SG23_NLA_3y8	SYW	4		53.2	36.4	E0SG23	NLATAAGAVAGGVAGNSIEGAVNR
714.04	645.33	E0SG23_NLA_3y6	SYW	4		53.2	36.4	E0SG23	NLATAAGAVAGGVAGNSIEGAVNR
714.04	516.29	E0SG23_NLA_3y5	SYW	4		53.2	36.4	E0SG23	NLATAAGAVAGGVAGNSIEGAVNR
620.34	816.92	E0SGJ9_ILA_3y15d	SYW	4		46.3	31.3	E0SGJ9	ILALGGQPLHAYS DYLK
620.34	724.86	E0SGJ9_ILA_3y13d	SYW	4		46.3	31.3	E0SGJ9	ILALGGQPLHAYS DYLK
620.34	603.81	E0SGJ9_ILA_3y10d	SYW	4		46.3	31.3	E0SGJ9	ILALGGQPLHAYS DYLK
436.89	770.42	E0SBZ4_IDY_3y6	SYW	4		33	21.4	E0SBZ4	IDYFEHFLPK
436.89	641.38	E0SBZ4_IDY_3y5	SYW	4		33	21.4	E0SBZ4	IDYFEHFLPK
436.89	459.25	E0SBZ4_IDY_3y7d	SYW	4		33	21.4	E0SBZ4	IDYFEHFLPK
578.00	855.42	E0SDZ1_GRP_3y7	SYW	4		43.3	29	E0SDZ1	GRPIINLLPLEPDER
578.00	516.24	E0SDZ1_GRP_3y4	SYW	4		43.3	29	E0SDZ1	GRPIINLLPLEPDER
578.00	304.16	E0SDZ1_GRP_3y2	SYW	4		43.3	29	E0SDZ1	GRPIINLLPLEPDER
729.90	898.49	E0SMN5_TLF_2y7	SYW	4		54.3	35.1	E0SMN5	TLFAQPAQWLR
729.90	801.44	E0SMN5_TLF_2y6	SYW	4		54.3	35.1	E0SMN5	TLFAQPAQWLR
729.90	449.75	E0SMN5_TLF_2y7d	SYW	4		54.3	35.1	E0SMN5	TLFAQPAQWLR
654.90	941.61	E0SMZ2_NVG_2y9	SYW	4		48.9	32.4	E0SMZ2	NVGPAGLTLVIVR
654.90	870.58	E0SMZ2_NVG_2y8	SYW	4		48.9	32.4	E0SMZ2	NVGPAGLTLVIVR



654.90	700.47	E0SMZ2_NVG_2y6	SYW	4		48.9	32.4	E0SMZ2	NVGPAGLTLVIVR
707.39	791.43	E0SMX4_ANL_2y7	SYW	4		52.7	34.3	E0SMX4	ANLNPLITGMEK
707.39	678.35	E0SMX4_ANL_2y6	SYW	4		52.7	34.3	E0SMX4	ANLNPLITGMEK
707.39	565.27	E0SMX4_ANL_2y5	SYW	4		52.7	34.3	E0SMX4	ANLNPLITGMEK
436.62	868.56	E0SGQ2_IVN_3y7	SYW	4		32.9	21.3	E0SGQ2	IVNLLRPLLEK
436.62	597.88	E0SGQ2_IVN_3y10d	SYW	4		32.9	21.3	E0SGQ2	IVNLLRPLLEK
436.62	548.35	E0SGQ2_IVN_3y9d	SYW	4		32.9	21.3	E0SGQ2	IVNLLRPLLEK
503.62	569.82	scout_DRVYIHPFHLVI_3y9d	DRVY	1	12000	27.8	25		DRVYIHPFHLVI
503.62	363.22	scout_DRVYIHPFHLVI_3y6d	DRVY	2		27.8	25		DRVYIHPFHLVI
692.88	887.46	E0SIY6_LDG_2y8	DRVY	4		51.6	33.8	E0SIY6	LDGVIPGWTEGLK
692.88	444.23	E0SIY6_LDG_2y8d	DRVY	4		51.6	33.8	E0SIY6	LDGVIPGWTEGLK
692.88	367.20	E0SIY6_LDG_2y6d	DRVY	4		51.6	33.8	E0SIY6	LDGVIPGWTEGLK
471.31	713.49	E0SG95_DIV_2y7	DRVY	4		35.5	25.8	E0SG95	DIVLAIIGK
471.31	501.34	E0SG95_DIV_2y5	DRVY	4		35.5	25.8	E0SG95	DIVLAIIGK
471.31	317.22	E0SG95_DIV_2y3	DRVY	4		35.5	25.8	E0SG95	DIVLAIIGK
598.34	701.39	E0SIW5_GVA_3y6	DRVY	4		44.7	30.1	E0SIW5	GVADIAGVPAQINIAEVR
598.34	474.27	E0SIW5_GVA_3y4	DRVY	4		44.7	30.1	E0SIW5	GVADIAGVPAQINIAEVR
598.34	274.19	E0SIW5_GVA_3y2	DRVY	4		44.7	30.1	E0SIW5	GVADIAGVPAQINIAEVR
613.33	894.47	E0SMT7_AFI_2y8	DRVY	4		45.8	30.9	E0SMT7	AFILIDYASGR
613.33	781.38	E0SMT7_AFI_2y7	DRVY	4		45.8	30.9	E0SMT7	AFILIDYASGR
613.33	668.30	E0SMT7_AFI_2y6	DRVY	4		45.8	30.9	E0SMT7	AFILIDYASGR
430.94	502.32	E0SCV4_AIH_3y4	DRVY	4		32.5	21	E0SCV4	AHILIQLEIK
430.94	389.24	E0SCV4_AIH_3y3	DRVY	4		32.5	21	E0SCV4	AHILIQLEIK
430.94	276.16	E0SCV4_AIH_3y2	DRVY	4		32.5	21	E0SCV4	AHILIQLEIK
519.95	604.34	E0SKR0_VLE_3y6	DRVY	4		39	25.9	E0SKR0	VLEDGVDILIGTTGR
519.95	491.26	E0SKR0_VLE_3y5	DRVY	4		39	25.9	E0SKR0	VLEDGVDILIGTTGR
519.95	434.24	E0SKR0_VLE_3y4	DRVY	4		39	25.9	E0SKR0	VLEDGVDILIGTTGR
629.37	917.52	E0SF07_VQL_2y9	DRVY	4		47	31.5	E0SF07	VQLASGLAMIVR
629.37	846.49	E0SF07_VQL_2y8	DRVY	4		47	31.5	E0SF07	VQLASGLAMIVR
629.37	759.45	E0SF07_VQL_2y7	DRVY	4		47	31.5	E0SF07	VQLASGLAMIVR
946.81	890.43	E0SDL4_GNP_3y10	DRVY	4		70.1	49.1	E0SDL4	GNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSR
946.81	819.40	E0SDL4_GNP_3y9	DRVY	4		70.1	49.1	E0SDL4	GNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSR
946.81	410.20	E0SDL4_GNP_3y9d	DRVY	4		70.1	49.1	E0SDL4	GNPTVEAEVHLEGGFVGLAAAPSGASTGSR
733.88	892.43	E0SG94_LYQ_2y7	DRVY	4		54.6	35.3	E0SG94	LYQGLEAFC[+57]PLR
733.88	763.39	E0SG94_LYQ_2y6	DRVY	4		54.6	35.3	E0SG94	LYQGLEAFC[+57]PLR
733.88	692.35	E0SG94_LYQ_2y5	DRVY	4		54.6	35.3	E0SG94	LYQGLEAFC[+57]PLR
755.36	821.39	E0SE26_FSL_3y7	DRVY	4		56.2	38.7	E0SE26	FSLPDQDGEQVNLADFQGGQR
755.36	750.35	E0SE26_FSL_3y6	DRVY	4		56.2	38.7	E0SE26	FSLPDQDGEQVNLADFQGGQR
755.36	635.33	E0SE26_FSL_3y5	DRVY	4		56.2	38.7	E0SE26	FSLPDQDGEQVNLADFQGGQR
547.77	795.38	E0SLJ2_ADL_2y6	DRVY	4		41	28.6	E0SLJ2	ADLASWFER
547.77	724.34	E0SLJ2_ADL_2y5	DRVY	4		41	28.6	E0SLJ2	ADLASWFER
547.77	637.31	E0SLJ2_ADL_2y4	DRVY	4		41	28.6	E0SLJ2	ADLASWFER
536.65	826.48	E0SL29_LVL_3y8	DRVY	4		40.2	26.8	E0SL29	LVLGVHYPLDVIGGR
536.65	501.31	E0SL29_LVL_3y5	DRVY	4		40.2	26.8	E0SL29	LVLGVHYPLDVIGGR
536.65	289.16	E0SL29_LVL_3y3	DRVY	4		40.2	26.8	E0SL29	LVLGVHYPLDVIGGR
590.82	753.39	E0SH40_NIS_2y7	DRVY	4		44.2	30.1	E0SH40	NISLSFFPGAK
590.82	519.29	E0SH40_NIS_2y5	DRVY	4		44.2	30.1	E0SH40	NISLSFFPGAK
590.82	372.22	E0SH40_NIS_2y4	DRVY	4		44.2	30.1	E0SH40	NISLSFFPGAK
727.05	584.38	E0SCK5_ALV_3y5	DRVY	4		54.1	37.1	E0SCK5	ALVAVNLASEDPYHDPLNIK
727.05	863.43	E0SCK5_ALV_3y15d	DRVY	4		54.1	37.1	E0SCK5	ALVAVNLASEDPYHDPLNIK
727.05	749.86	E0SCK5_ALV_3y13d	DRVY	4		54.1	37.1	E0SCK5	ALVAVNLASEDPYHDPLNIK
616.82	842.47	Q93KA9_GWF_2y7	DRVY	4		46.1	31.1	Q93KA9	GWFLQEVTPR
616.82	729.39	Q93KA9_GWF_2y6	DRVY	4		46.1	31.1	Q93KA9	GWFLQEVTPR
616.82	601.33	Q93KA9_GWF_2y5	DRVY	4		46.1	31.1	Q93KA9	GWFLQEVTPR
600.84	883.57	E0SET8_DMA_2y8	DRVY	4		44.9	30.5	E0SET8	DMALIGQALIR
600.84	770.49	E0SET8_DMA_2y7	DRVY	4		44.9	30.5	E0SET8	DMALIGQALIR
600.84	657.40	E0SET8_DMA_2y6	DRVY	4		44.9	30.5	E0SET8	DMALIGQALIR
706.69	844.49	E0SDL4_SGE_3y9	DRVY	4		52.6	36	E0SDL4	SGETEDATIADLAVGTAAGQIK
706.69	745.42	E0SDL4_SGE_3y8	DRVY	4		52.6	36	E0SDL4	SGETEDATIADLAVGTAAGQIK
706.69	516.31	E0SDL4_SGE_3y5	DRVY	4		52.6	36	E0SDL4	SGETEDATIADLAVGTAAGQIK
595.33	933.45	E0SN12_TIL_3y8	DRVY	4		44.5	30	E0SN12	TILVPVDIDEALTKQ
595.33	560.34	E0SN12_TIL_3y5	DRVY	4		44.5	30	E0SN12	TILVPVDIDEALTKQ
595.33	376.22	E0SN12_TIL_3y3	DRVY	4		44.5	30	E0SN12	TILVPVDIDEALTKQ
640.67	871.50	E0SI50_QVT_3y8	DRVY	4		47.8	32.4	E0SI50	QVTGQFYPLAGLNIDR
640.67	758.42	E0SI50_QVT_3y7	DRVY	4		47.8	32.4	E0SI50	QVTGQFYPLAGLNIDR
640.67	687.38	E0SI50_QVT_3y6	DRVY	4		47.8	32.4	E0SI50	QVTGQFYPLAGLNIDR
703.88	831.46	E0SJ70_AIY_2y7	DRVY	4		52.4	34.2	E0SJ70	AIYDIVLESEVR
703.88	732.39	E0SJ70_AIY_2y6	DRVY	4		52.4	34.2	E0SJ70	AIYDIVLESEVR
703.88	490.26	E0SJ70_AIY_2y4	DRVY	4		52.4	34.2	E0SJ70	AIYDIVLESEVR
555.64	644.37	E0SKY5_LHI_3y6	DRVY	4		41.6	27.8	E0SKY5	LHILGVMEQAISTPR
555.64	573.34	E0SKY5_LHI_3y5	DRVY	4		41.6	27.8	E0SKY5	LHILGVMEQAISTPR

555.64	460.25	E0SKY5_LHI_3y4	DRVY	4		41.6	27.8	E0SKY5	LHILGVMEQAISTPR
641.31	750.40	E0SG96_LSE_2y6	DRVY	4		47.9	31.9	E0SG96	LSESDIDDLFK
641.31	637.32	E0SG96_LSE_2y5	DRVY	4		47.9	31.9	E0SG96	LSESDIDDLFK
641.31	294.18	E0SG96_LSE_2y2	DRVY	4		47.9	31.9	E0SG96	LSESDIDDLFK
691.36	937.44	E0SKJ2_LAF_2y9	DRVY	4		51.5	33.7	E0SKJ2	LAFILGFDAATEAR
691.36	733.35	E0SKJ2_LAF_2y7	DRVY	4		51.5	33.7	E0SKJ2	LAFILGFDAATEAR
691.36	618.32	E0SKJ2_LAF_2y6	DRVY	4		51.5	33.7	E0SKJ2	LAFILGFDAATEAR
620.36	642.38	E0SFF8_IIE_2y6	DRVY	4		46.3	31.2	E0SFF8	ILEIEGLPDLK
620.36	472.28	E0SFF8_IIE_2y4	DRVY	4		46.3	31.2	E0SFF8	ILEIEGLPDLK
620.36	260.20	E0SFF8_IIE_2y2	DRVY	4		46.3	31.2	E0SFF8	ILEIEGLPDLK
720.41	858.45	O07097_QLI_2y7	DRVY	4		53.6	34.8	O07097	QLIQVNPDIIMR
720.41	744.41	O07097_QLI_2y6	DRVY	4		53.6	34.8	O07097	QLIQVNPDIIMR
720.41	532.33	O07097_QLI_2y4	DRVY	4		53.6	34.8	O07097	QLIQVNPDIIMR
743.40	944.52	E0SJT1_DAL_2y9	DRVY	4		55.3	35.6	E0SJT1	DALLENVTVLADGR
743.40	731.40	E0SJT1_DAL_2y7	DRVY	4		55.3	35.6	E0SJT1	DALLENVTVLADGR
743.40	531.29	E0SJT1_DAL_2y5	DRVY	4		55.3	35.6	E0SJT1	DALLENVTVLADGR
685.88	873.43	E0SCL7_ITA_2y7	DRVY	4		51.1	33.5	E0SCL7	ITAVIPYFGYAR
685.88	613.31	E0SCL7_ITA_2y5	DRVY	4		51.1	33.5	E0SCL7	ITAVIPYFGYAR
685.88	437.22	E0SCL7_ITA_2y7d	DRVY	4		51.1	33.5	E0SCL7	ITAVIPYFGYAR
469.76	676.41	E0SM64_DFF_2y6	DRVY	4		35.4	25.8	E0SM64	DFFGAIR
469.76	529.35	E0SM64_DFF_2y5	DRVY	4		35.4	25.8	E0SM64	DFFGAIR
469.76	472.32	E0SM64_DFF_2y4	DRVY	4		35.4	25.8	E0SM64	DFFGAIR
658.39	856.53	E0SC61_LQA_2y8	DRVY	4		49.1	32.6	E0SC61	LQAFEGVVIAR
658.39	727.48	E0SC61_LQA_2y7	DRVY	4		49.1	32.6	E0SC61	LQAFEGVVIAR
658.39	571.39	E0SC61_LQA_2y5	DRVY	4		49.1	32.6	E0SC61	LQAFEGVVIAR
817.98	943.48	E0SD99_IPL_2y8	DRVY	4		60.7	38.3	E0SD99	IPLVGVIPEDQSVLR
817.98	602.36	E0SD99_IPL_2y5	DRVY	4		60.7	38.3	E0SD99	IPLVGVIPEDQSVLR
817.98	761.44	E0SD99_IPL_2y14d	DRVY	4		60.7	38.3	E0SD99	IPLVGVIPEDQSVLR
595.33	906.47	E0SF07_IGI_2y7	DRVY	4		44.5	30.3	E0SF07	IGIFQDLVER
595.33	759.40	E0SF07_IGI_2y6	DRVY	4		44.5	30.3	E0SF07	IGIFQDLVER
595.33	631.34	E0SF07_IGI_2y5	DRVY	4		44.5	30.3	E0SF07	IGIFQDLVER
807.94	918.49	E0SL34_NVD_2y8	DRVY	4		60	37.9	E0SL34	NVDLALAGITITEER
807.94	748.38	E0SL34_NVD_2y6	DRVY	4		60	37.9	E0SL34	NVDLALAGITITEER
807.94	304.16	E0SL34_NVD_2y2	DRVY	4		60	37.9	E0SL34	NVDLALAGITITEER
674.70	858.53	E0SH95_IQV_3y8	DRVY	4		50.3	34.3	E0SH95	IQVEHPVTEMITGVDLIK
674.70	745.45	E0SH95_IQV_3y7	DRVY	4		50.3	34.3	E0SH95	IQVEHPVTEMITGVDLIK
674.70	644.40	E0SH95_IQV_3y6	DRVY	4		50.3	34.3	E0SH95	IQVEHPVTEMITGVDLIK
492.32	757.46	E0SG17_ILL_2y6	DRVY	4		37	26.6	E0SG17	ILLENLLR
492.32	644.37	E0SG17_ILL_2y5	DRVY	4		37	26.6	E0SG17	ILLENLLR
492.32	515.33	E0SG17_ILL_2y4	DRVY	4		37	26.6	E0SG17	ILLENLLR
701.89	903.47	E0SLG8_ITA_2y7	DRVY	4		52.3	34.1	E0SLG8	ITATLINLMEQR
701.89	790.39	E0SLG8_ITA_2y6	DRVY	4		52.3	34.1	E0SLG8	ITATLINLMEQR
701.89	563.26	E0SLG8_ITA_2y4	DRVY	4		52.3	34.1	E0SLG8	ITATLINLMEQR
640.89	842.46	E0SIT8_LVL_2y7	DRVY	4		47.8	31.9	E0SIT8	LVLINPELLEK
640.89	728.42	E0SIT8_LVL_2y6	DRVY	4		47.8	31.9	E0SIT8	LVLINPELLEK
640.89	502.32	E0SIT8_LVL_2y4	DRVY	4		47.8	31.9	E0SIT8	LVLINPELLEK
732.71	851.43	E0SL49_LFS_3y7	DRVY	4		54.5	37.4	E0SL49	LFSQLTGDTPLTATPSYDIR
732.71	750.38	E0SL49_LFS_3y6	DRVY	4		54.5	37.4	E0SL49	LFSQLTGDTPLTATPSYDIR
732.71	288.20	E0SL49_LFS_3y2	DRVY	4		54.5	37.4	E0SL49	LFSQLTGDTPLTATPSYDIR
782.40	947.46	E0SIZ5_DVF_2y8	DRVY	4		58.2	37	E0SIZ5	DVFGVDELQVGM
782.40	832.43	E0SIZ5_DVF_2y7	DRVY	4		58.2	37	E0SIZ5	DVFGVDELQVGM
782.40	363.18	E0SIZ5_DVF_2y3	DRVY	4		58.2	37	E0SIZ5	DVFGVDELQVGM
749.36	936.44	E0SIS8_ELA_2y8	DRVY	4		55.7	35.8	E0SIS8	ELAFVAVFGEEER
749.36	865.41	E0SIS8_ELA_2y7	DRVY	4		55.7	35.8	E0SIS8	ELAFVAVFGEEER
749.36	766.34	E0SIS8_ELA_2y6	DRVY	4		55.7	35.8	E0SIS8	ELAFVAVFGEEER
816.90	871.47	A5JMQ6_EEF_2y8	DRVY	4		60.7	38.3	A5JMQ6	EEFGGELIDGGPWVK
816.90	758.38	A5JMQ6_EEF_2y7	DRVY	4		60.7	38.3	A5JMQ6	EEFGGELIDGGPWVK
816.90	643.36	A5JMQ6_EEF_2y6	DRVY	4		60.7	38.3	A5JMQ6	EEFGGELIDGGPWVK
654.90	854.51	E0SGF3_LLD_2y8	DRVY	4		48.9	32.4	E0SGF3	LLDLAAPDIIVR
654.90	783.47	E0SGF3_LLD_2y7	DRVY	4		48.9	32.4	E0SGF3	LLDLAAPDIIVR
654.90	712.44	E0SGF3_LLD_2y6	DRVY	4		48.9	32.4	E0SGF3	LLDLAAPDIIVR
521.62	545.79	scout_YPLVVFVSHGLGAFR_3y10d	YPLV	1	25000	29.1	26		YPLVVFVSHGLGAFR
521.62	595.33	scout_YPLVVFVSHGLGAFR_3y11d	YPLV	2		29.1	26		YPLVVFVSHGLGAFR
645.87	828.53	E0SD43_YDA_2y8	YPLV	4		48.2	32.1	E0SD43	YDAIVALGTVIR
645.87	729.46	E0SD43_YDA_2y7	YPLV	4		48.2	32.1	E0SD43	YDAIVALGTVIR
645.87	545.34	E0SD43_YDA_2y5	YPLV	4		48.2	32.1	E0SD43	YDAIVALGTVIR
782.41	855.47	E0SG28_FAY_2y7	YPLV	4		58.2	37	E0SG28	FAYVDILQNPDIR
782.41	742.38	E0SG28_FAY_2y6	YPLV	4		58.2	37	E0SG28	FAYVDILQNPDIR
782.41	288.20	E0SG28_FAY_2y2	YPLV	4		58.2	37	E0SG28	FAYVDILQNPDIR
664.88	932.49	E0SC47_VLA_2y10	YPLV	4		49.6	32.8	E0SC47	VLALDMGALVAGAK
664.88	817.46	E0SC47_VLA_2y9	YPLV	4		49.6	32.8	E0SC47	VLALDMGALVAGAK

664.88	686.42	E0SC47_VLA_2y8	YPLV	4	49.6	32.8	E0SC47	VLALDMGALVAGAK
702.36	911.49	Q05528-KDUD_FLS_3y9	YPLV	4	52.3	35.8	Q05528	FLSLTADMSDISGHAALVEK
702.36	824.46	Q05528-KDUD_FLS_3y8	YPLV	4	52.3	35.8	Q05528	FLSLTADMSDISGHAALVEK
702.36	822.90	Q05528-KDUD_FLS_3y16d	YPLV	4	52.3	35.8	Q05528	FLSLTADMSDISGHAALVEK
674.88	745.46	E0SCC0_VLD_2y7	YPLV	4	50.3	33.2	E0SCC0	VLDEFIVSTLGR
674.88	632.37	E0SCC0_VLD_2y6	YPLV	4	50.3	33.2	E0SCC0	VLDEFIVSTLGR
674.88	533.30	E0SCC0_VLD_2y5	YPLV	4	50.3	33.2	E0SCC0	VLDEFIVSTLGR
596.33	837.44	E0SDD5_AIG_2y7	YPLV	4	44.6	30.3	E0SDD5	AIGIELSDFVK
596.33	708.39	E0SDD5_AIG_2y6	YPLV	4	44.6	30.3	E0SDD5	AIGIELSDFVK
596.33	595.31	E0SDD5_AIG_2y5	YPLV	4	44.6	30.3	E0SDD5	AIGIELSDFVK
666.73	784.42	E0SMT2_FLQ_3y7	YPLV	4	49.7	33.9	E0SMT2	FLQSLGLITIKPNIDPTK
666.73	345.21	E0SMT2_FLQ_3y3	YPLV	4	49.7	33.9	E0SMT2	FLQSLGLITIKPNIDPTK
666.73	705.42	E0SMT2_FLQ_3y13d	YPLV	4	49.7	33.9	E0SMT2	FLQSLGLITIKPNIDPTK
641.71	894.52	E0SIM6_YAL_3y8	YPLV	4	47.9	32.5	E0SIM6	YALLVDQLIGQHVVVK
641.71	731.92	E0SIM6_YAL_3y13d	YPLV	4	47.9	32.5	E0SIM6	YALLVDQLIGQHVVVK
641.71	682.39	E0SIM6_YAL_3y12d	YPLV	4	47.9	32.5	E0SIM6	YALLVDQLIGQHVVVK
464.26	677.40	E0SKY0_SRP_3y5	YPLV	4	35	22.8	E0SKY0	SRPEMLIELFR
464.26	564.31	E0SKY0_SRP_3y4	YPLV	4	35	22.8	E0SKY0	SRPEMLIELFR
464.26	435.27	E0SKY0_SRP_3y3	YPLV	4	35	22.8	E0SKY0	SRPEMLIELFR
873.48	866.46	E0SAY1_NIG_2y8	YPLV	4	64.8	40.3	E0SAY1	NIGSGLLPGASGFVLEK
873.48	575.34	E0SAY1_NIG_2y5	YPLV	4	64.8	40.3	E0SAY1	NIGSGLLPGASGFVLEK
873.48	476.27	E0SAY1_NIG_2y4	YPLV	4	64.8	40.3	E0SAY1	NIGSGLLPGASGFVLEK
597.33	763.45	E0SI57_TLT_2y7	YPLV	4	44.7	30.4	E0SI57	TLTDVAASFLR
597.33	664.38	E0SI57_TLT_2y6	YPLV	4	44.7	30.4	E0SI57	TLTDVAASFLR
597.33	593.34	E0SI57_TLT_2y5	YPLV	4	44.7	30.4	E0SI57	TLTDVAASFLR
836.14	784.49	Q8RST5_AQI_3y7	YPLV	4	62.1	43.1	Q8RST5	AQILQQAGTSVLAQANQVPQTVLK
836.14	685.42	Q8RST5_AQI_3y6	YPLV	4	62.1	43.1	Q8RST5	AQILQQAGTSVLAQANQVPQTVLK
836.14	260.20	Q8RST5_AQI_3y2	YPLV	4	62.1	43.1	Q8RST5	AQILQQAGTSVLAQANQVPQTVLK
736.73	840.49	E0SDE6_STV_3y7	YPLV	4	54.8	37.7	E0SDE6	STVHTIGSTEELLPQLDLVR
736.73	387.27	E0SDE6_STV_3y3	YPLV	4	54.8	37.7	E0SDE6	STVHTIGSTEELLPQLDLVR
736.73	420.75	E0SDE6_STV_3y7d	YPLV	4	54.8	37.7	E0SDE6	STVHTIGSTEELLPQLDLVR
681.71	856.45	E0SBC0_IYT_3y7	YPLV	4	50.8	34.7	E0SBC0	IYTQPASLSLIEDPVLQR
681.71	727.41	E0SBC0_IYT_3y6	YPLV	4	50.8	34.7	E0SBC0	IYTQPASLSLIEDPVLQR
681.71	612.38	E0SBC0_IYT_3y5	YPLV	4	50.8	34.7	E0SBC0	IYTQPASLSLIEDPVLQR
716.69	803.38	E0SHB8_IEV_3y7	YPLV	4	53.4	36.6	E0SHB8	IEVMELLYQPEAAGEYHR
716.69	661.31	E0SHB8_IEV_3y5	YPLV	4	53.4	36.6	E0SHB8	IEVMELLYQPEAAGEYHR
716.69	475.24	E0SHB8_IEV_3y3	YPLV	4	53.4	36.6	E0SHB8	IEVMELLYQPEAAGEYHR
663.87	758.49	E0SAT2_EAV_2y6	YPLV	4	49.5	32.8	E0SAT2	EAVGPDFPLILR
663.87	611.42	E0SAT2_EAV_2y5	YPLV	4	49.5	32.8	E0SAT2	EAVGPDFPLILR
663.87	485.79	E0SAT2_EAV_2y8d	YPLV	4	49.5	32.8	E0SAT2	EAVGPDFPLILR
465.78	730.45	E0SDS2_SLL_2y6	YPLV	4	35.1	25.6	E0SDS2	SLLDTLLR
465.78	617.36	E0SDS2_SLL_2y5	YPLV	4	35.1	25.6	E0SDS2	SLLDTLLR
465.78	502.33	E0SDS2_SLL_2y4	YPLV	4	35.1	25.6	E0SDS2	SLLDTLLR
697.44	882.54	E0SMK1_TVV_2y9	YPLV	4	52	34	E0SMK1	TVVVLPIGIGLQK
697.44	672.40	E0SMK1_TVV_2y7	YPLV	4	52	34	E0SMK1	TVVVLPIGIGLQK
697.44	441.77	E0SMK1_TVV_2y9d	YPLV	4	52	34	E0SMK1	TVVVLPIGIGLQK
705.38	855.48	E0JIT3_IVG_3y7	YPLV	4	52.5	36	E0JIT3	IVGLEIGADDYIPKPFNPR
705.38	630.34	E0JIT3_IVG_3y5	YPLV	4	52.5	36	E0JIT3	IVGLEIGADDYIPKPFNPR
705.38	745.38	E0JIT3_IVG_3y13d	YPLV	4	52.5	36	E0JIT3	IVGLEIGADDYIPKPFNPR
739.40	936.50	E0SBJ4_NLV_2y8	YPLV	4	55	35.5	E0SBJ4	NLVSQIVEYGEVK
739.40	595.31	E0SBJ4_NLV_2y5	YPLV	4	55	35.5	E0SBJ4	NLVSQIVEYGEVK
739.40	432.25	E0SBJ4_NLV_2y4	YPLV	4	55	35.5	E0SBJ4	NLVSQIVEYGEVK
652.40	887.56	E0SGE5_TTL_2y9	YPLV	4	48.7	32.3	E0SGE5	TTLTAAITTVLAK
652.40	816.52	E0SGE5_TTL_2y8	YPLV	4	48.7	32.3	E0SGE5	TTLTAAITTVLAK
652.40	632.40	E0SGE5_TTL_2y6	YPLV	4	48.7	32.3	E0SGE5	TTLTAAITTVLAK
565.34	943.58	E0SEE7_SVL_2y9	YPLV	4	42.3	29.2	E0SEE7	SVLGELGLTLK
565.34	830.50	E0SEE7_SVL_2y8	YPLV	4	42.3	29.2	E0SEE7	SVLGELGLTLK
565.34	531.35	E0SEE7_SVL_2y5	YPLV	4	42.3	29.2	E0SEE7	SVLGELGLTLK
699.36	677.37	E0SJX0_DGV_3y7	YPLV	4	52.1	35.6	E0SJX0	DGVVTLSGFISSQMATGAVK
699.36	546.32	E0SJX0_DGV_3y6	YPLV	4	52.1	35.6	E0SJX0	DGVVTLSGFISSQMATGAVK
699.36	475.29	E0SJX0_DGV_3y5	YPLV	4	52.1	35.6	E0SJX0	DGVVTLSGFISSQMATGAVK
745.43	875.50	E0SB47_MIS_2y9	YPLV	4	55.5	35.7	E0SB47	MISGILVSPGIAFGK
745.43	776.43	E0SB47_MIS_2y8	YPLV	4	55.5	35.7	E0SB47	MISGILVSPGIAFGK
745.43	689.40	E0SB47_MIS_2y7	YPLV	4	55.5	35.7	E0SB47	MISGILVSPGIAFGK
624.35	948.51	E0SD99_TVV_2y8	YPLV	4	46.6	31.3	E0SD99	TVVIDFDIGLR
624.35	835.43	E0SD99_TVV_2y7	YPLV	4	46.6	31.3	E0SD99	TVVIDFDIGLR
624.35	458.31	E0SD99_TVV_2y4	YPLV	4	46.6	31.3	E0SD99	TVVIDFDIGLR
508.78	789.43	E0SKC6_NIL_2y6	YPLV	4	38.2	27.2	E0SKC6	NILDWISR
508.78	676.34	E0SKC6_NIL_2y5	YPLV	4	38.2	27.2	E0SKC6	NILDWISR
508.78	561.31	E0SKC6_NIL_2y4	YPLV	4	38.2	27.2	E0SKC6	NILDWISR
612.34	926.51	E0SH44_FLL_3y8	YPLV	4	45.8	30.9	E0SH44	FLLLEGVHPNALENLR

612.34	787.94	E0SH44_FLL_3y14d	YPLV	4		45.8	30.9	E0SH44	FLLEGVHPNALENLR
612.34	731.39	E0SH44_FLL_3y13d	YPLV	4		45.8	30.9	E0SH44	FLLEGVHPNALENLR
641.01	866.44	E0SJT1_GIE_3y8	YPLV	4		47.8	32.5	E0SJT1	GIETQLGAVSVDTGIFTGR
641.01	650.36	E0SJT1_GIE_3y6	YPLV	4		47.8	32.5	E0SJT1	GIETQLGAVSVDTGIFTGR
641.01	480.26	E0SJT1_GIE_3y4	YPLV	4		47.8	32.5	E0SJT1	GIETQLGAVSVDTGIFTGR
750.43	871.52	E0SH61_LGI_2y8	YPLV	4		55.8	35.9	E0SH61	LGIVMDPISSINIK
750.43	661.39	E0SH61_LGI_2y6	YPLV	4		55.8	35.9	E0SH61	LGIVMDPISSINIK
750.43	574.36	E0SH61_LGI_2y5	YPLV	4		55.8	35.9	E0SH61	LGIVMDPISSINIK
906.14	876.46	E0SH26_LYQ_3y7	YPLV	4		67.2	46.9	E0SH26	LYQPQDATTNPSSLILNAAQIPEYR
906.14	564.28	E0SH26_LYQ_3y4	YPLV	4		67.2	46.9	E0SH26	LYQPQDATTNPSSLILNAAQIPEYR
906.14	338.18	E0SH26_LYQ_3y2	YPLV	4		67.2	46.9	E0SH26	LYQPQDATTNPSSLILNAAQIPEYR
717.89	852.44	E0SDL5_GLD_2y8	YPLV	4		53.5	34.7	E0SDL5	GLDAILVPGGFGYR
717.89	753.37	E0SDL5_GLD_2y7	YPLV	4		53.5	34.7	E0SDL5	GLDAILVPGGFGYR
717.89	300.15	E0SDL5_GLD_2y5d	YPLV	4		53.5	34.7	E0SDL5	GLDAILVPGGFGYR
539.30	573.37	P42195-PECS_EFD_2y5	YPLV	4		40.4	28.3	P42195	EFDILATLR
539.30	460.29	P42195-PECS_EFD_2y4	YPLV	4		40.4	28.3	P42195	EFDILATLR
539.30	389.25	P42195-PECS_EFD_2y3	YPLV	4		40.4	28.3	P42195	EFDILATLR
661.68	858.42	E0SJ70_LGI_3y7	YPLV	4		49.4	33.6	E0SJ70	LGILQGVDVTLFAEQAHR
661.68	711.35	E0SJ70_LGI_3y6	YPLV	4		49.4	33.6	E0SJ70	LGILQGVDVTLFAEQAHR
661.68	640.32	E0SJ70_LGI_3y5	YPLV	4		49.4	33.6	E0SJ70	LGILQGVDVTLFAEQAHR
603.31	906.45	E0SCC9_WLG_2y8	YPLV	4		45.1	30.6	E0SCC9	WLGGMILTNNWK
603.31	548.28	E0SCC9_WLG_2y4	YPLV	4		45.1	30.6	E0SCC9	WLGGMILTNNWK
603.31	333.19	E0SCC9_WLG_2y2	YPLV	4		45.1	30.6	E0SCC9	WLGGMILTNNWK
686.36	944.50	E0SKY5_DQA_2y8	YPLV	4		51.2	33.6	E0SKY5	DAQIIDELIGER
686.36	831.42	E0SKY5_DQA_2y7	YPLV	4		51.2	33.6	E0SKY5	DAQIIDELIGER
686.36	361.18	E0SKY5_DQA_2y3	YPLV	4		51.2	33.6	E0SKY5	DAQIIDELIGER
802.41	646.32	E0SB15_FAG_2y5	YPLV	4		59.6	37.7	E0SB15	FAGEMLPVIDNLER
802.41	531.29	E0SB15_FAG_2y4	YPLV	4		59.6	37.7	E0SB15	FAGEMLPVIDNLER
523.95	858.49	E0SDF2_HLQ_3y8	YPLV	4		39.3	26.1	E0SDF2	HLQWFEAADLIVK
523.95	729.45	E0SDF2_HLQ_3y7	YPLV	4		39.3	26.1	E0SDF2	HLQWFEAADLIVK
523.95	658.41	E0SDF2_HLQ_3y6	YPLV	4		39.3	26.1	E0SDF2	HLQWFEAADLIVK
711.38	859.48	E0SH32_ILG_3y7	YPLV	4		53	36.3	E0SH32	ILGLEIGADDYITKPFNPR
711.38	630.34	E0SH32_ILG_3y5	YPLV	4		53	36.3	E0SH32	ILGLEIGADDYITKPFNPR
711.38	747.37	E0SH32_ILG_3y13d	YPLV	4		53	36.3	E0SH32	ILGLEIGADDYITKPFNPR
629.68	916.51	E0SKN4_QST_3y8	YPLV	4		47	31.8	E0SKN4	QSTALTQLQDQLTALQK
629.68	673.42	E0SKN4_QST_3y6	YPLV	4		47	31.8	E0SKN4	QSTALTQLQDQLTALQK
629.68	560.34	E0SKN4_QST_3y5	YPLV	4		47	31.8	E0SKN4	QSTALTQLQDQLTALQK
628.34	897.48	E0SJY8_AS_L_2y7	YPLV	4		46.9	31.5	E0SJY8	ASLSAFDYLR
628.34	826.45	E0SJY8_AS_L_2y6	YPLV	4		46.9	31.5	E0SJY8	ASLSAFDYLR
628.34	564.35	E0SJY8_AS_L_2y4	YPLV	4		46.9	31.5	E0SJY8	ASLSAFDYLR
774.76	916.45	E0SFH2_LLT_3y9	YPLV	4		57.6	39.7	E0SFH2	LLTLQITLPADNLQQAQADAGK
774.76	788.39	E0SFH2_LLT_3y8	YPLV	4		57.6	39.7	E0SFH2	LLTLQITLPADNLQQAQADAGK
774.76	660.33	E0SFH2_LLT_3y7	YPLV	4		57.6	39.7	E0SFH2	LLTLQITLPADNLQQAQADAGK
669.92	896.58	E0SDN6_LIS_2y8	YPLV	4		50	33	E0SDN6	LISEVLPDILVK
669.92	797.51	E0SDN6_LIS_2y7	YPLV	4		50	33	E0SDN6	LISEVLPDILVK
669.92	684.43	E0SDN6_LIS_2y6	YPLV	4		50	33	E0SDN6	LISEVLPDILVK
592.37	858.49	E0SKI8_LVL_2y7	YPLV	4		44.3	30.2	E0SKI8	LVLDLLLQEK
592.37	630.38	E0SKI8_LVL_2y5	YPLV	4		44.3	30.2	E0SKI8	LVLDLLLQEK
592.37	517.30	E0SKI8_LVL_2y4	YPLV	4		44.3	30.2	E0SKI8	LVLDLLLQEK
631.31	803.40	E0SLK4_AES_3y6	YPLV	4		47.1	31.9	E0SLK4	AESFQAVADAVLDYHQB
631.31	575.29	E0SLK4_AES_3y4	YPLV	4		47.1	31.9	E0SLK4	AESFQAVADAVLDYHQB
631.31	412.23	E0SLK4_AES_3y3	YPLV	4		47.1	31.9	E0SLK4	AESFQAVADAVLDYHQB
647.71	912.56	E0SIM2_ALE_3y8	YPLV	4		48.3	32.8	E0SIM2	AELGAIQVFTKQPLGIR
647.71	683.42	E0SIM2_ALE_3y6	YPLV	4		48.3	32.8	E0SIM2	AELGAIQVFTKQPLGIR
647.71	757.94	E0SIM2_ALE_3y14d	YPLV	4		48.3	32.8	E0SIM2	AELGAIQVFTKQPLGIR
745.39	857.48	E0SCD0_AFG_2y8	YPLV	4		55.5	35.7	E0SCD0	AFGEEVIAAALNER
745.39	744.40	E0SCD0_AFG_2y7	YPLV	4		55.5	35.7	E0SCD0	AFGEEVIAAALNER
745.39	673.36	E0SCD0_AFG_2y6	YPLV	4		55.5	35.7	E0SCD0	AFGEEVIAAALNER
666.37	915.49	E0SDE6_VFG_2y8	YPLV	4		49.7	32.8	E0SDE6	VFGILQALGEER
666.37	802.41	E0SDE6_VFG_2y7	YPLV	4		49.7	32.8	E0SDE6	VFGILQALGEER
666.37	304.16	E0SDE6_VFG_2y2	YPLV	4		49.7	32.8	E0SDE6	VFGILQALGEER
593.02	728.47	E0SE17_ALA_3y7	YPLV	4		44.3	29.9	E0SE17	ALAINLVDPAAAAIVVQK
593.02	657.43	E0SE17_ALA_3y6	YPLV	4		44.3	29.9	E0SE17	ALAINLVDPAAAAIVVQK
593.02	473.31	E0SE17_ALA_3y4	YPLV	4		44.3	29.9	E0SE17	ALAINLVDPAAAAIVVQK
476.92	795.45	E0SGD2_DLE_3y7	YPLV	4		35.9	23.5	E0SGD2	DLEYLVALAEHR
476.92	696.38	E0SGD2_DLE_3y6	YPLV	4		35.9	23.5	E0SGD2	DLEYLVALAEHR
476.92	512.26	E0SGD2_DLE_3y4	YPLV	4		35.9	23.5	E0SGD2	DLEYLVALAEHR
543.62	728.35	E0SC68_GIH_3y6	YPLV	4		40.7	27.2	E0SC68	GIHTLEHLFAGFMR
543.62	581.29	E0SC68_GIH_3y5	YPLV	4		40.7	27.2	E0SC68	GIHTLEHLFAGFMR
543.62	510.25	E0SC68_GIH_3y4	YPLV	4		40.7	27.2	E0SC68	GIHTLEHLFAGFMR
696.86	793.46	scout_QDNEILIFWSK_2y6	QDNE	1	80000	51.9	33.9		QDNEILIFWSK

696.86	567.29	scout_QDNEILIFWSK_2y4	QDNE	2		51.9	33.9		QDNEILIFWSK
722.92	933.53	E0SD72_VLD_2y9	QDNE	4		53.8	34.9	E0SD72	VLDAIGSVTESLK
722.92	820.44	E0SD72_VLD_2y8	QDNE	4		53.8	34.9	E0SD72	VLDAIGSVTESLK
722.92	577.32	E0SD72_VLD_2y5	QDNE	4		53.8	34.9	E0SD72	VLDAIGSVTESLK
904.80	941.52	E0SAU3_YID_3y8	QDNE	4		67.1	46.8	E0SAU3	YIDELDDKPVLTGPTNPAIDAWIR
904.80	660.35	E0SAU3_YID_3y5	QDNE	4		67.1	46.8	E0SAU3	YIDELDDKPVLTGPTNPAIDAWIR
904.80	545.32	E0SAU3_YID_3y4	QDNE	4		67.1	46.8	E0SAU3	YIDELDDKPVLTGPTNPAIDAWIR
734.42	854.51	E0SIX6_AGP_2y8	QDNE	4		54.7	35.3	E0SIX6	AGPLAGFPVVDLGV
734.42	559.32	E0SIX6_AGP_2y5	QDNE	4		54.7	35.3	E0SIX6	AGPLAGFPVVDLGV
734.42	444.29	E0SIX6_AGP_2y4	QDNE	4		54.7	35.3	E0SIX6	AGPLAGFPVVDLGV
514.34	767.51	E0SIA5_FLI_2y7	QDNE	4		38.6	27.4	E0SIA5	FLILPLVGR
514.34	654.43	E0SIA5_FLI_2y6	QDNE	4		38.6	27.4	E0SIA5	FLILPLVGR
514.34	541.35	E0SIA5_FLI_2y5	QDNE	4		38.6	27.4	E0SIA5	FLILPLVGR
661.03	874.48	E0SCU4_LQA_3y8	QDNE	4		49.3	33.6	E0SCU4	LQALVEQLDPPFSLSARP
661.03	630.36	E0SCU4_LQA_3y6	QDNE	4		49.3	33.6	E0SCU4	LQALVEQLDPPFSLSARP
661.03	486.27	E0SCU4_LQA_3y9d	QDNE	4		49.3	33.6	E0SCU4	LQALVEQLDPPFSLSARP
667.37	769.49	E0SDR7_GVG_3y7	QDNE	4		49.8	33.9	E0SDR7	GVGENFIASDQLALLPVTR
667.37	698.46	E0SDR7_GVG_3y6	QDNE	4		49.8	33.9	E0SDR7	GVGENFIASDQLALLPVTR
667.37	472.29	E0SDR7_GVG_3y4	QDNE	4		49.8	33.9	E0SDR7	GVGENFIASDQLALLPVTR
709.39	849.45	E0SMC8_ALE_2y7	QDNE	4		52.8	34.4	E0SMC8	ALEAALDDFIAR
709.39	734.42	E0SMC8_ALE_2y6	QDNE	4		52.8	34.4	E0SMC8	ALEAALDDFIAR
709.39	619.39	E0SMC8_ALE_2y5	QDNE	4		52.8	34.4	E0SMC8	ALEAALDDFIAR
591.30	903.43	E0SE30_QSL_3y7	QDNE	4		44.2	29.8	E0SE30	QSLGGLIEAYEEVAHR
591.30	740.37	E0SE30_QSL_3y6	QDNE	4		44.2	29.8	E0SE30	QSLGGLIEAYEEVAHR
591.30	611.33	E0SE30_QSL_3y5	QDNE	4		44.2	29.8	E0SE30	QSLGGLIEAYEEVAHR
754.46	925.58	E0SIS7_LAA_2y9	QDNE	4		56.1	36	E0SIS7	LAADVGVPTLLVAR
754.46	868.56	E0SIS7_LAA_2y8	QDNE	4		56.1	36	E0SIS7	LAADVGVPTLLVAR
754.46	769.49	E0SIS7_LAA_2y7	QDNE	4		56.1	36	E0SIS7	LAADVGVPTLLVAR
692.36	837.47	E0SHW9_FDI_2y7	QDNE	4		51.6	33.8	E0SHW9	FDIGNYLELATK
692.36	674.41	E0SHW9_FDI_2y6	QDNE	4		51.6	33.8	E0SHW9	FDIGNYLELATK
692.36	432.28	E0SHW9_FDI_2y4	QDNE	4		51.6	33.8	E0SHW9	FDIGNYLELATK
663.89	943.56	E0SDL5_GIA_2y9	QDNE	4		49.5	32.8	E0SDL5	GIAAASLAAILEAR
663.89	743.44	E0SDL5_GIA_2y7	QDNE	4		49.5	32.8	E0SDL5	GIAAASLAAILEAR
663.89	672.40	E0SDL5_GIA_2y6	QDNE	4		49.5	32.8	E0SDL5	GIAAASLAAILEAR
656.91	642.45	E0SDX1_LVT_2y6	QDNE	4		49	32.5	E0SDX1	LVTDELVIALVK
656.91	543.39	E0SDX1_LVT_2y5	QDNE	4		49	32.5	E0SDX1	LVTDELVIALVK
656.91	430.30	E0SDX1_LVT_2y4	QDNE	4		49	32.5	E0SDX1	LVTDELVIALVK
733.41	801.48	E0SDZ3_LFA_2y7	QDNE	4		54.6	35.3	E0SDZ3	LFAEGFLVTEIAR
733.41	688.40	E0SDZ3_LFA_2y6	QDNE	4		54.6	35.3	E0SDZ3	LFAEGFLVTEIAR
733.41	589.33	E0SDZ3_LFA_2y5	QDNE	4		54.6	35.3	E0SDZ3	LFAEGFLVTEIAR
689.36	928.53	E0SFM5_AFE_3y9	QDNE	4		51.4	35.1	E0SFM5	AFENTVIAYEPVVAIGTGK
689.36	732.40	E0SFM5_AFE_3y7	QDNE	4		51.4	35.1	E0SFM5	AFENTVIAYEPVVAIGTGK
689.36	362.20	E0SFM5_AFE_3y4	QDNE	4		51.4	35.1	E0SFM5	AFENTVIAYEPVVAIGTGK
652.35	801.41	E0SBB7_LLM_3y7	QDNE	4		48.7	33.1	E0SBB7	LLMAIGPEVMVDTALEPR
652.35	514.30	E0SBB7_LLM_3y4	QDNE	4		48.7	33.1	E0SBB7	LLMAIGPEVMVDTALEPR
652.35	272.17	E0SBB7_LLM_3y2	QDNE	4		48.7	33.1	E0SBB7	LLMAIGPEVMVDTALEPR
629.39	875.51	E0SEZ6_AVL_2y8	QDNE	4		47	31.5	E0SEZ6	AVLVNIFGGIVR
629.39	648.38	E0SEZ6_AVL_2y6	QDNE	4		47	31.5	E0SEZ6	AVLVNIFGGIVR
629.39	501.31	E0SEZ6_AVL_2y5	QDNE	4		47	31.5	E0SEZ6	AVLVNIFGGIVR
695.70	885.44	E0SI62_ILF_3y8	QDNE	4		51.8	35.4	E0SI62	ILFGEQIASLADQIPADAR
695.70	529.27	E0SI62_ILF_3y5	QDNE	4		51.8	35.4	E0SI62	ILFGEQIASLADQIPADAR
695.70	265.14	E0SI62_ILF_3y5d	QDNE	4		51.8	35.4	E0SI62	ILFGEQIASLADQIPADAR
877.93	879.46	E0SDV4_GGV_2y7	QDNE	4		65.1	40.5	E0SDV4	GGVFTDDAIDAYIELR
877.93	764.43	E0SDV4_GGV_2y6	QDNE	4		65.1	40.5	E0SDV4	GGVFTDDAIDAYIELR
877.93	288.20	E0SDV4_GGV_2y2	QDNE	4		65.1	40.5	E0SDV4	GGVFTDDAIDAYIELR
624.34	778.41	E0SKP1_LAV_2y6	QDNE	4		46.6	31.3	E0SKP1	LAVWLDEFVR
624.34	665.33	E0SKP1_LAV_2y5	QDNE	4		46.6	31.3	E0SKP1	LAVWLDEFVR
624.34	550.30	E0SKP1_LAV_2y4	QDNE	4		46.6	31.3	E0SKP1	LAVWLDEFVR
660.87	789.46	E0SB87_IGV_2y7	QDNE	4		49.3	32.6	E0SB87	IGVDFLAVSFPR
660.87	676.38	E0SB87_IGV_2y6	QDNE	4		49.3	32.6	E0SB87	IGVDFLAVSFPR
660.87	506.27	E0SB87_IGV_2y4	QDNE	4		49.3	32.6	E0SB87	IGVDFLAVSFPR
647.35	912.51	E0SEU6_SFF_2y9	QDNE	4		48.3	32.2	E0SEU6	SFFDNPLAALAK
647.35	797.49	E0SEU6_SFF_2y8	QDNE	4		48.3	32.2	E0SEU6	SFFDNPLAALAK
647.35	683.45	E0SEU6_SFF_2y7	QDNE	4		48.3	32.2	E0SEU6	SFFDNPLAALAK
660.34	706.42	E0SHP0_EIP_3y6	QDNE	4		49.3	33.5	E0SHP0	EIPADIVYQDELVTAFR
660.34	593.34	E0SHP0_EIP_3y5	QDNE	4		49.3	33.5	E0SHP0	EIPADIVYQDELVTAFR
660.34	494.27	E0SHP0_EIP_3y4	QDNE	4		49.3	33.5	E0SHP0	EIPADIVYQDELVTAFR
629.37	817.48	E0SKQ8_DVI_2y7	QDNE	4		47	31.5	E0SKQ8	DVILLDSITR
629.37	704.39	E0SKQ8_DVI_2y6	QDNE	4		47	31.5	E0SKQ8	DVILLDSITR
629.37	476.28	E0SKQ8_DVI_2y4	QDNE	4		47	31.5	E0SKQ8	DVILLDSITR
780.42	793.45	E0SIX0_DVA_2y7	QDNE	4		58	37	E0SIX0	DVAGIDPVSLIAFDK

780.42	593.33	E0SIX0_DVA_2y5	QDNE	4		58	37	E0SIX0	DVAGIDPVSLIAFDK
780.42	480.25	E0SIX0_DVA_2y4	QDNE	4		58	37	E0SIX0	DVAGIDPVSLIAFDK
641.35	887.46	E0SIM6_VLQ_3y8	QDNE	4		47.9	32.5	E0SIM6	VLQETTHILENLLDGAR
641.35	531.29	E0SIM6_VLQ_3y5	QDNE	4		47.9	32.5	E0SIM6	VLQETTHILENLLDGAR
641.35	303.18	E0SIM6_VLQ_3y3	QDNE	4		47.9	32.5	E0SIM6	VLQETTHILENLLDGAR
761.37	891.45	E0SAK1_ETD_2y7	QDNE	4		56.6	36.3	E0SAK1	ETDLATLEEMLEK
761.37	778.37	E0SAK1_ETD_2y6	QDNE	4		56.6	36.3	E0SAK1	ETDLATLEEMLEK
761.37	649.32	E0SAK1_ETD_2y5	QDNE	4		56.6	36.3	E0SAK1	ETDLATLEEMLEK
811.06	767.38	E0SGW4_APD_3y6	QDNE	4		60.2	41.7	E0SGW4	APDYTTIDIALDFDLHPEQTR
811.06	630.32	E0SGW4_APD_3y5	QDNE	4		60.2	41.7	E0SGW4	APDYTTIDIALDFDLHPEQTR
811.06	777.90	E0SGW4_APD_3y13d	QDNE	4		60.2	41.7	E0SGW4	APDYTTIDIALDFDLHPEQTR
564.31	925.45	E0SN31_GLA_3y8	QDNE	4		42.3	28.3	E0SN31	GLAILNALDQVAEAHR
564.31	810.42	E0SN31_GLA_3y7	QDNE	4		42.3	28.3	E0SN31	GLAILNALDQVAEAHR
564.31	583.29	E0SN31_GLA_3y5	QDNE	4		42.3	28.3	E0SN31	GLAILNALDQVAEAHR
680.01	759.40	P0C1A1-ASSY_IYK_3y7	QDNE	4		50.7	34.6	P0C1A1	IYKPWLDTDFIDELGGR
680.01	646.32	P0C1A1-ASSY_IYK_3y6	QDNE	4		50.7	34.6	P0C1A1	IYKPWLDTDFIDELGGR
680.01	531.29	P0C1A1-ASSY_IYK_3y5	QDNE	4		50.7	34.6	P0C1A1	IYKPWLDTDFIDELGGR
605.02	641.37	E0SCD8_IAI_3y5	QDNE	4		45.2	30.5	E0SCD8	IAIVNVSSIFQQLPQR
605.02	513.31	E0SCD8_IAI_3y4	QDNE	4		45.2	30.5	E0SCD8	IAIVNVSSIFQQLPQR
605.02	400.23	E0SCD8_IAI_3y3	QDNE	4		45.2	30.5	E0SCD8	IAIVNVSSIFQQLPQR
704.06	943.48	E0SIM0_QLL_3y8	QDNE	4		52.4	35.9	E0SIM0	QLLMVLENIPEKPSETR
704.06	589.29	E0SIM0_QLL_3y5	QDNE	4		52.4	35.9	E0SIM0	QLLMVLENIPEKPSETR
704.06	276.17	E0SIM0_QLL_3y2	QDNE	4		52.4	35.9	E0SIM0	QLLMVLENIPEKPSETR
734.73	903.49	E0SG50_VIP_3y8	QDNE	4		54.7	37.6	E0SG50	VIPSIAYTEPEVAWVGLTEK
734.73	832.46	E0SG50_VIP_3y7	QDNE	4		54.7	37.6	E0SG50	VIPSIAYTEPEVAWVGLTEK
734.73	547.31	E0SG50_VIP_3y5	QDNE	4		54.7	37.6	E0SG50	VIPSIAYTEPEVAWVGLTEK
587.64	389.18	E0SHP9_ITT_3y3	QDNE	4		44	29.6	E0SHP9	ITTVQAAIDFIQANQQ
587.64	275.13	E0SHP9_ITT_3y2	QDNE	4		44	29.6	E0SHP9	ITTVQAAIDFIQANQQ
587.64	482.23	E0SHP9_ITT_3y8d	QDNE	4		44	29.6	E0SHP9	ITTVQAAIDFIQANQQ
574.29	865.44	E0SCC6_MQ_3y7	QDNE	4		43	28.8	E0SCC6	MQQLQNIITAFER
574.29	752.36	E0SCC6_MQ_3y6	QDNE	4		43	28.8	E0SCC6	MQQLQNIITAFER
574.29	623.31	E0SCC6_MQ_3y5	QDNE	4		43	28.8	E0SCC6	MQQLQNIITAFER
544.99	742.48	E0SLC3_FVF_3y6	QDNE	4		40.8	27.2	E0SLC3	FVFIGAGGAALQLLQK
544.99	501.34	E0SLC3_FVF_3y4	QDNE	4		40.8	27.2	E0SLC3	FVFIGAGGAALQLLQK
544.99	388.26	E0SLC3_FVF_3y3	QDNE	4		40.8	27.2	E0SLC3	FVFIGAGGAALQLLQK
596.31	833.49	E0SGI8_GDW_2y7	QDNE	4		44.6	30.3	E0SGI8	GDWLGEVFR
596.31	720.40	E0SGI8_GDW_2y6	QDNE	4		44.6	30.3	E0SGI8	GDWLGEVFR
596.31	534.34	E0SGI8_GDW_2y4	QDNE	4		44.6	30.3	E0SGI8	GDWLGEVFR
734.73	844.45	E0SIX1_IFT_3y7	QDNE	4		54.7	37.6	E0SIX1	IFTEDGVSPVTVIEIANR
734.73	731.37	E0SIX1_IFT_3y6	QDNE	4		54.7	37.6	E0SIX1	IFTEDGVSPVTVIEIANR
734.73	602.33	E0SIX1_IFT_3y5	QDNE	4		54.7	37.6	E0SIX1	IFTEDGVSPVTVIEIANR

## 5. Liste des 45 peptides de synthèse utilisés dans la sélection des « Scouts » (3.4.5)

Séquence du peptide	Temps de rétention (min)	Protéine
FDGRPSSR	3.94	kirrel
GPEEEETGSR	4.14	kirrel
IPGSSDGSSSR	4.43	kirrel
VHSITGDR	4.44	Angiopoietin-related protein 4
ASASFEQK	8.43	kirrel
SSSHPIFHR	9.27	Beta-nerve growth factor
YEAGAGPCK	9.68	Dengue polyprotein type 4 / prot E
APLTKPLK	12.87	C-reactive protein
EANYIGSDK	17.48	Serum amyloid A-1 protein
EPGLCTWQSLR	18.84	Metalloproteinase inhibitor 1
YFLHQSHEER	18.84	Ferritin heavy chain
ATFNPAQDK	24.00	Podocalyxin
DPTNGYYK	24.05	kirrel
LYYPSQDNDR	36.63	Platelet-activating factor acetylhydrolase
GRPLLFK	37.76	Dengue polyprotein type 4 / prot pr
SLAPAVVTGK	39.31	Aquaporin-2
FSQEPADQTVVAGQR	40.48	kirrel
ESDTSYVSLK	42.78	C-reactive protein
AEIEYLEK	48.43	L-selectin
GPIVHTDHSDLVLEEK	48.99	kirrel
LSPLGEEMR	52.13	Apolipoprotein A-I
NVNQSLLELHK	53.49	Ferritin heavy chain
APAATVVDVDEVR	54.87	Podocin
MGLAFESTK	55.44	Apolipoprotein B-100
SLGPALLLQK	55.64	Matrix metalloproteinase-9
NYTPQLSEAEVER	57.13	Neutrophil collagenase
VPSVYPLDR	59.05	Vascular cell adhesion protein 1
YPLSLPDDCR	61.53	Stromelysin-3
SVALAPHVGMGL*DTR	67.32	Dengue polyprotein
ALVQQMEQLR	69.29	Apolipoprotein A-IV
VESWILR	69.44	Dengue polyprotein type 4 / prot E
GFQALGDAADIR	70.09	Metalloproteinase inhibitor 1
VNEPSILEMSR	70.33	Apolipoprotein L1
VDPEVLHSLQTQLK	76.73	Angiopoietin-related protein 4
DPVALEGVSHFFR	79.16	Ferritin light chain
FPVHAALVWGPEK	79.16	Stromelysin-3
GPGGWAAEAISDAR	79.85	Serum amyloid A-1 protein
EVELIIQVTPK	81.63	Vascular cell adhesion protein 1
SYYWIGIR	87.45	L-selectin
DRVYIHPFHLVI	93.98	Angiotensinogen
LGLGADVAQVTGALR	95.40	Matrix metalloproteinase-9
YPLVVFSHGLGAFR	101.5	Platelet-activating factor acetylhydrolase
LGGPEAGLGEYLFER	102.51	Ferritin light chain
QDNEILIFWSK	109.31	C-reactive protein
SWFEPLVEDMQR	111.37	Apolipoprotein E

Tableau 17 : Liste des 45 peptides de synthèse utilisés pour le choix des "Scouts", et mesure de leurs temps de rétention

## 6. Autres résultats publiés

Au cours de ces travaux de thèse d'autres travaux ont été menés, en particulier impliquant des partenaires industriels. Par exemple, pour la société Erytech Pharma, nous avons réalisé une preuve de concept de la faisabilité d'un dosage de l'acide phytique par spectrométrie de masse. C'est un potentiel anticancéreux dont le procédé d'encapsulation a été breveté en 2010 par Vanessa Bourgeois<sup>179</sup>, chercheur à Erytech Pharma. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, en avril 2016.

### **Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of Inositol hexaphosphate after solid phase extraction**

Blandine Rougemont<sup>1</sup>, Catherine Fonbonne<sup>1</sup>, Jérôme Lemoine<sup>1</sup>, Vanessa Bourgeois<sup>2</sup>, Arnaud Salvador<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>2</sup> ERYTECH Pharma, Lyon, France

# corresponding author: [arnaud.salvador@univ-lyon1.fr](mailto:arnaud.salvador@univ-lyon1.fr)

#### **ABSTRACT**

Inositol hexaphosphate or IHP, a naturally occurring component in cereals and plants, is the main reserve and principal carrier of phosphate. IHP is also found in biological fluids such as urine, plasma or whole blood. Moreover, IHP is studied for pharmaceutical applications. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) is now the reference method for small analytes determination. However, the specific quantitation of polyanionic molecules in the biological matrix is still challenging. In this paper, a bioanalytical method for extraction and determination of IHP in whole blood is described by using solid phase extraction followed by LC-MS/MS using SRM mode for its specificity. Using pentylamine in excess, an ion pair is created enhancing sensitivity by avoiding the presence of many Na adducts on phosphate's functions of IHP. Moreover, hexafluoroisopropanol was added to stabilize the ion pairs also created. Then, a specific extraction of IHP by anion-exchange solid-phase extraction was developed resulting in an extraction recovery of 89%. The linearity of the method was verified between 0.78-100µg/mL and both accuracy and precision were greater than 85%. Finally, the endogenous rate of IHP was measured in whole blood of mice and estimated at 2 µg/mL.

**Key words:** IHP, phytic acid, LC-MS/MS, WAX SPE, anion exchange, blood



## 1. INTRODUCTION

Inositol hexaphosphate or phytic acid, also known as IHP (Figure 1) is a naturally occurring component in cereals and plant seeds<sup>1</sup>, and represents the main storage form of phosphate<sup>2,3</sup>. IHP is also present in biological tissues and fluids<sup>4</sup>, and its physiological functions have been studied for years. IHP has benefits on human health including but not limited to: involvement in cardiovascular calcification<sup>5</sup>, probable antioxidant properties<sup>6,7</sup>, and likely prevention of renal lithiasis<sup>8</sup>. Moreover, in medical literature, numerous studies are led to understand the role of IHP as an anti-neoplastic agent<sup>9</sup>. IHP is also a powerful allosteric effector of haemoglobin<sup>10-12</sup>. In this respect, it can be used to reduce the affinity of haemoglobin for oxygen and to increase the release of oxygen in the tissues. It can be used as a radiotherapy adjuvant in cancerology, for hypoxic tumors, in particular if encapsulated in human red blood cells<sup>13-15</sup>. The clinical use of red blood cells encapsulating IHP requires the amount of IHP present to be known, in order to be able to determine the volume of suspension to transfuse according to the prescribed dose. In addition, since IHP is a metal-chelating agent, e.g. calcium-chelating agent, that can potentially have harmful effects if it is administered in free form, it is also essential to assay the extracellular IHP present in the final pharmaceutical product.

Typically, IHP is determined with indirect assays measuring a spectrophotometric compound formed by complexation with a metal, forming next a colored compound [16,17]. Previously, Bourgeaux et al. developed a method to assaying IHP in red blood cells after complexation with metal (Fe-III). Then, the complex (Fe-III/phytate) is measured by UV-spectroscopy<sup>18</sup>. Other methods have been developed to quantify IHP in biological matrices. For example, it could be determined in urine with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, by measuring total phosphorus level after a specific pretreatment<sup>19</sup>.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry is now the reference method for assaying small molecules in clinical<sup>20</sup> or environmental domains<sup>21,22</sup>. However, determination of polyanionic molecules in the biological matrix is still challenging, due to low retention in reversed phase liquid chromatography. Actually, strong anion exchange HPLC is often used for polyanionic molecules analysis<sup>23,24</sup>, but it uses salted buffers or solvents, leading to compatibility problems with the MS analysis. Moreover, the possibility of numerous adduct formations causes a signal distribution leading to a sensibility loss. Recently, Perello and Grasses group proposed an LC-MS method to measure IHP levels in plasma<sup>25,26</sup>. IHP was detected in Single Ion Monitoring acquisition mode after protein

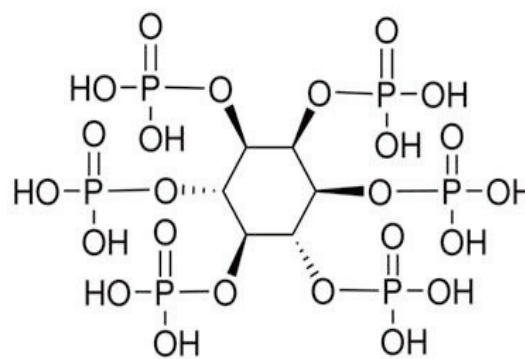


Figure 1: Structure of phytic acid, IHP

precipitation followed by ion pair reverse phase chromatography with triethylammonium acetate (TEAA) buffer in mobile phase. In protein extraction however, contaminants that remain may cause ion suppression or enhancement, resulting in inconsistencies and inaccuracies in detection and quantitation of the analyte. It is interesting to have additional extraction methods. SPE solves problems associated with protein precipitation, is amenable to small sample volumes, and can be easily automated. The problem of ion suppression can be solved using an appropriate solid-phase extraction method<sup>27</sup>. The objective of this paper was to report a complementary solid phase extraction and a MS analysis in the multiple reaction monitoring mode to determine IHP in whole blood samples.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Reagents and chemicals

Acetonitrile, methanol and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Pentylamine (PTA), Hexafluoroisopropanol (HFIP), Ammonium Formiate, Formic acid, trichloroacetic acid, Sodium Phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Sodium Phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and Inositol hexaphosphate (IHP) or phytic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France).

### 2.2. Standards and Quality control samples

Two stock solutions of IHP were prepared independently by dissolving accurately weighed pure substances in water to yield a concentration of  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Both stock solutions were diluted further with water. One solution was used to prepare the working calibration solution, and the other was used to prepare the quality control (QC) working solutions. The preparation of calibration standards and quality control samples was performed using fresh blood mice. Fresh blood was supplied by Erytech Pharma and

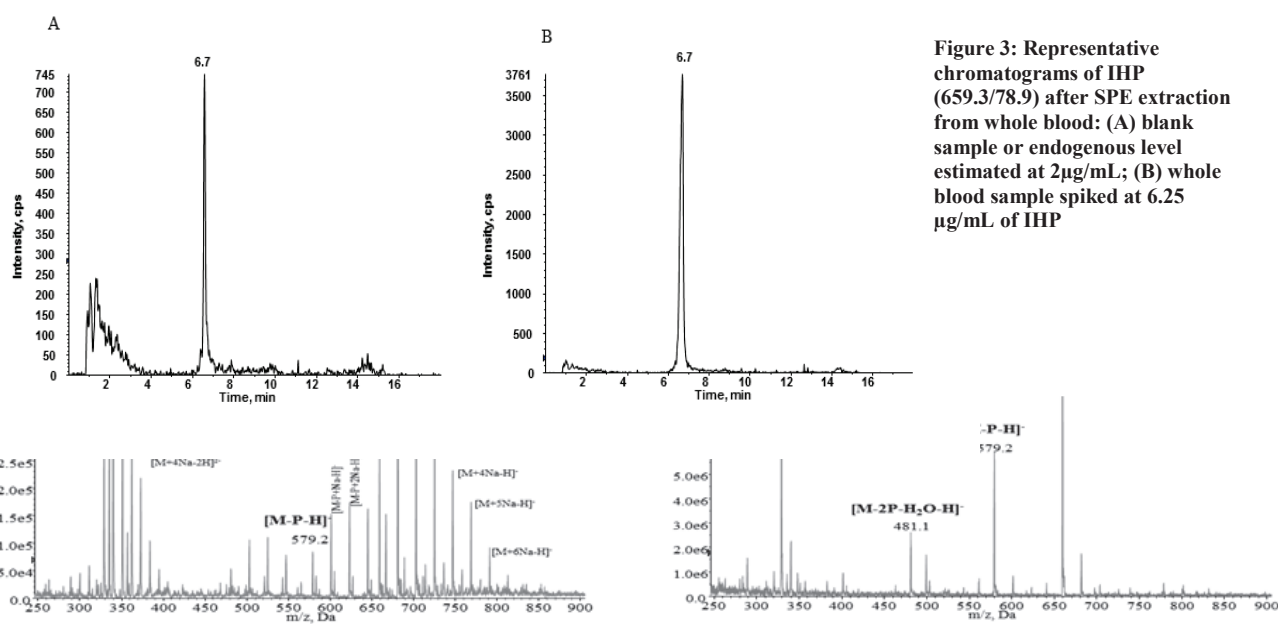
mice didn't grow with a special diet. Endogenous IHP level was evaluated at 2 µg/mL. A 10 µL volume of IHP spiking solution was added to 90 µL of whole blood. Standard concentrations (at eight levels) of IHP ranged from 0.78 to 100 µg.mL<sup>-1</sup> or 2.78 to 102 µg. mL<sup>-1</sup> with endogenous IHP and quality control (QC) samples were prepared at 1, 10 and 35 µg.mL<sup>-1</sup> or 3, 12 and 37 µg.mL<sup>-1</sup> with endogenous IHP.

### **2.3. Whole blood extraction**

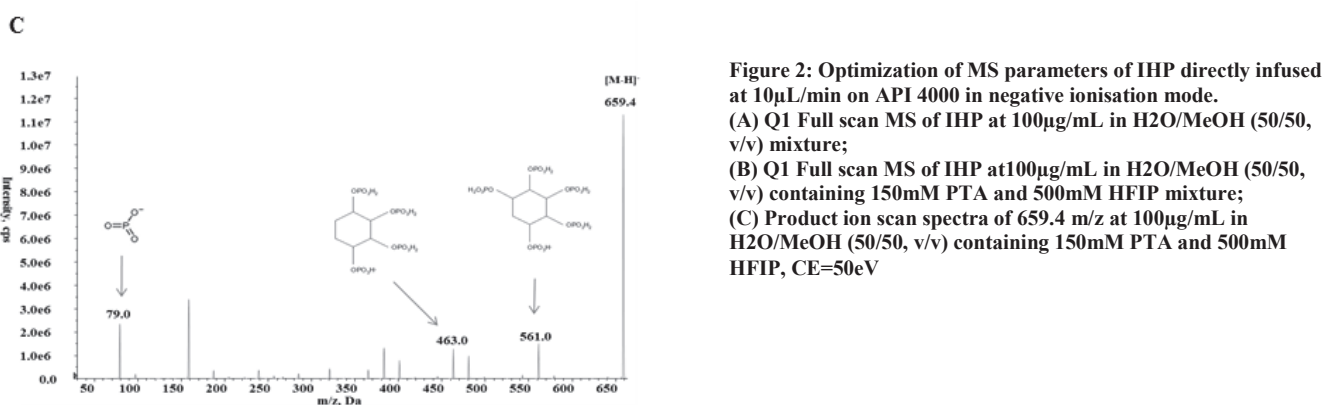
Required amounts of IHP working solution (10 µl) were added to 90 µL of whole blood to obtain the standard and QC. For blanks and unknown samples 10 µL of water were added, instead

of IHP solution. Then, 900µL of Phosphate Buffer 150mM (pH=4) were added to the samples, before loading them onto Oasis<sup>TM</sup> WAX 1cc (20mg) extraction cartridges (Waters, Milford, MA, USA), pre-conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water at pH 4. Following rinsing with 1 mL of water/methanol (50/50, v/v), IHP was eluted with a mixture of 1mL of Ammonium Formate 3M prepared in water containing PTA/HFIP at 15 and 50 mM.

### **2.4. Liquid chromatography and mass spectrometry conditions**



**Figure 3:** Representative chromatograms of IHP (659.3/78.9) after SPE extraction from whole blood: (A) blank sample or endogenous level estimated at 2 µg/mL; (B) whole blood sample spiked at 6.25 µg/mL of IHP



**Figure 2:** Optimization of MS parameters of IHP directly infused at 10 µL/min on API 4000 in negative ionisation mode. (A) Q1 Full scan MS of IHP at 100 µg/mL in H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50, v/v) mixture; (B) Q1 Full scan MS of IHP at 100 µg/mL in H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50, v/v) containing 150 mM PTA and 500 mM HFIP mixture; (C) Product ion scan spectra of 659.4 m/z at 100 µg/mL in H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50, v/v) containing 150 mM PTA and 500 mM HFIP, CE=50 eV

The LC-MS/MS analysis was performed with an HP 1290 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled with a QTRAP 4000 LC-MS/MS hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex Foster City, CA, USA) equipped with a Turbolonspray Ion Source. Instrument control, data acquisition, and processing were performed using Analyst 1.6 software. The mass spectrometer was initially calibrated with a propylpropylene glycol standard (AB Sciex Foster City, CA, USA). Q1 and Q3 quadrupole resolution was adjusted to 0.7+/-0.1Th. The MS analysis was carried out in negative ionization mode, using an ion spray voltage of -4500V. The orifice voltage was set at -125 V. The auxiliary (air), nebulizer (air) and the curtain (nitrogen) gas flow were set to 20, 30 and Psi respectively. The Turbo Ion source was operated at 450°C. Selected reaction monitoring (SRM) experiments were performed to detect ion transitions of [M-H]<sup>-</sup> at m/z 659.3/78, 9 (collision energy: -128 eV), 659.3/561.0 (collision energy: -40 eV) and m/z 659.3/462.8 (collision energy: -52 eV) with a dwell time of 150 ms per transition in order to have at least 30 data

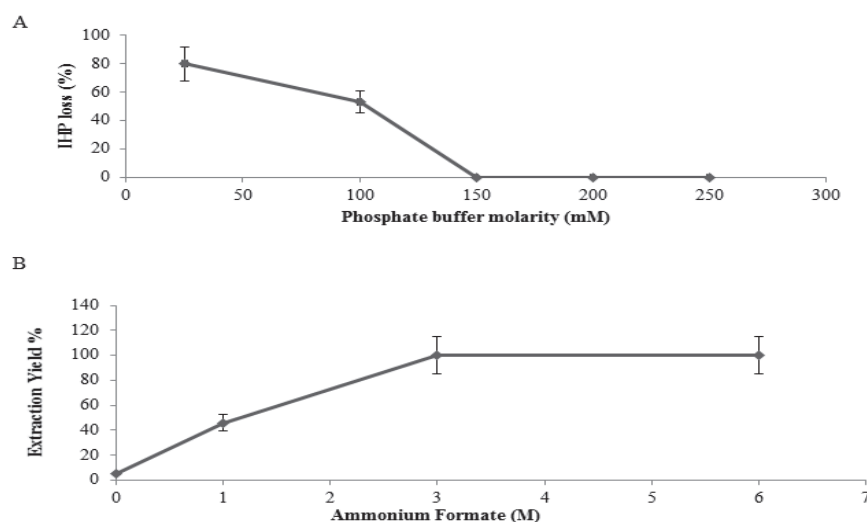
points across the LC peak. Product ions used for monitoring were selected based on their significance in the MS/MS spectra. The 3 transitions were simultaneously monitored in order to ensure the correct identification of IHP. The HPLC separation was carried out on a X-Select CSH column (2.1x100 mm; particle size 3.5 µm) from Waters (Milford, MA, USA). Elution was performed at a flow rate of 300 µL/min with water containing PTA/HFIP 15:50 mM as eluent A and Acetonitrile containing PTA/HFIP 15:50 mM as eluent B. The elution sequence is composed of a 3 minutes' plateau at 5% of B, a linear gradient from 5% to 80% B in 9 minutes, and lastly a 1-minute plateau at 80% of B. The column was re-equilibrated for 5 minutes and the overall injection duty cycle was 15 minutes. The injection volume was set to 10 µL. Ion pairing LC-MS/MS chromatography required a 30 min equilibration time (with a flow directed towards the MS) before the first analysis. Between MS assay, mass spectrometer was cleaned by 100% H<sub>2</sub>O during 15 minutes and 100% ACN during 15 minutes at 300 µL/min.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimization of MS and LC-MS/MS

As expected, IHP is preferentially ionized by negative ion electrospray. However, mass measurement of IHP is complicated by the affinity of the six anionic phosphates (Figure 1) and by the 12 replaceable proton parts to various cations including sodium and potassium, which are often present in analytic solutions. Indeed, as illustrated in figure 2A, infusion in an

surface (if not the bulk), and the pH at the surface rises higher in value. At high pH the PTA ion pairs dissociate and IHP can be desorbed in the gas phase. Then, MRM parameters were optimized from MS2 spectra, as illustrated in figure 2C for  $[\text{IHP-H}]^-$ . Successive losses of  $m/z$  98 corresponding to the loss of  $\text{H}_2\text{PO}_4$  and this gives, for example, the product ions at  $m/z$  561 and 463 (Figure 2C) were observed. In addition, a product ion at  $m/z$  79 corresponding to the phosphates (Figure 2C) was observed; this intense product ion is selected for the final method to allow us great sensitivity (quantitation transition). As its  $m/z$



$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (v/v, 50/50) mixture shows a very large signal distribution, due to Na adducts presence on one until six phosphates (and this, for one or two charge states). Moreover, loss of one or two phosphates during the ionization process, even after source parameters optimization, (gas and declustering potential, data not shown) was observed. These cations lower the MS signal sensitivity of IHP by dispersing the ion abundance among multiple adducted ions. In the case of ESI-MS, the multiple cation adduct ions result in highly complex spectra, reducing their applicability for IHP quantification. Therefore, the effective removal of these cations is crucial to obtain optimal mass spectra and satisfactory signal sensitivity. For this a buffer system consisting of pentylamine (PTA) and hexafluoroisopropanol (HFIP) was used (Figure 2B). Adding pentylamine (PTA) in a large excess led to the removal of sodium adducts by creating ion pairs and the addition of hexafluoroisopropanol (HFIP) allowed ion-pairs stabilization and ensured a better desolvation<sup>28,29</sup>. Intensities increase by a factor of 50 for  $[\text{IHP-H}]^-$  and 26 for  $[\text{IHP-2H}]^{2-}$ . PTA/HFIP mixture was preferred to other ion-pairing reagents (e.g. TEAA) because of higher MS sensibility observed<sup>29</sup>. This is probably due to the high volatility of HFIP (bp=57°C). During electrospray process, volatile HFIP is depleted at the droplet

is low, selected  $m/z$  561 and 463 product ions were also selected for qualification transition. Moreover, SRM parameters for  $[\text{IHP-2H}]^{2-}$  were also optimized. But, despite a very intense transition corresponding to the  $m/z$  79 product ion, other product ions gave low SRM signals and this led to a lower specificity (data not shown).

Adding PTA/HFIP is also advantageous to perform ion-pairing chromatography and to retain IHP on  $\text{C}_{18}$  column. PTA and HFIP were added directly in water or MeOH at optimized concentrations. The best response of IHP is observed with the mixture containing PTA/HFIP at 15 and 50 mM respectively. Great care should be taken to the equilibration time of the system, which is especially long (30 minutes) before the start of every batch of analysis. With these chromatographic conditions, IHP is eluted in 6.5 minutes (Figure 3).

#### 3.2. Optimization of IHP extraction

Precipitation remains a popular method for sample clean up because it is relatively fast and inexpensive. Protein precipitation was previously used for IHP extraction from plasma [20]; however, it is only addressed in the removal of proteins. Other matrix contaminants remaining may cause ion suppression or

enhancement, resulting in inconsistencies and inaccuracies in detection and quantitation of the analyte. Therefore, to reduce the possibility of having co-eluted interferences and to reduce matrix effects during electrospray ionization in negative mode in such a complex matrix as whole blood, a specific extraction of the targeted compound was preferred<sup>30</sup>. As IHP is a strong poly-

from a concentration on 3M (Figure 4.B). As IHP doesn't have a great solubility in organic solvent, the elution solvent (ammonium formate 3M) is prepared in water containing PTA/HFIP at 15/50mM respectively. Thus, the IHP extracted could be directly analysed by LC-MS/MS.

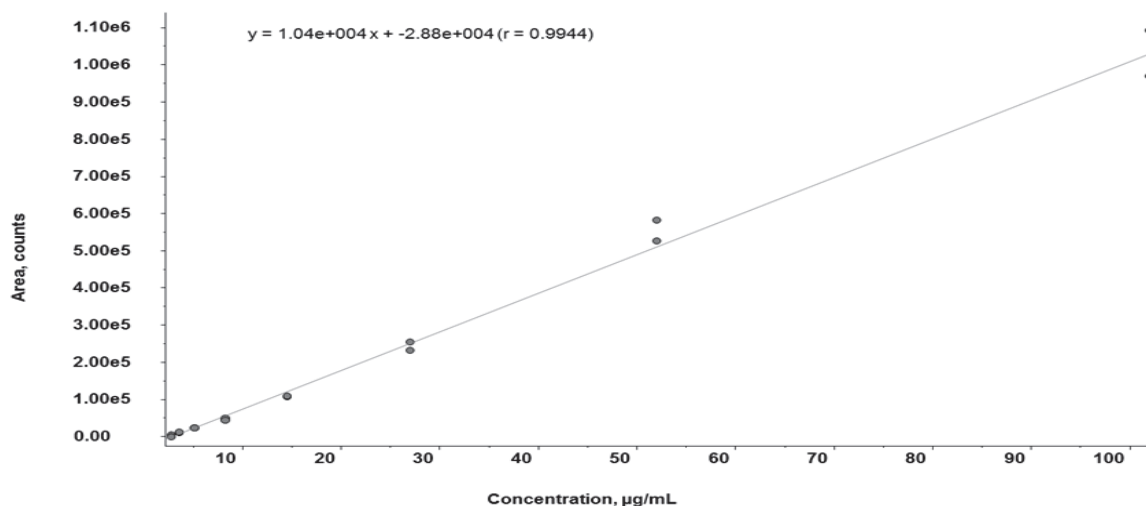


Figure 5: Calibration curve for IHP quantification

acid compound, anion exchange solid phases, such as Weak Anion (WAX), Strong Anion (SAX) and Mixed Anion (MAX) were first tested. A summary of these experiments is given in supplementary data (Supplementary Table 1), and the results led to select WAX SPE to extract IHP from whole blood. During method development, it was noticed that selection of loading and elution solvent was crucial to obtain the best extraction recovery. For example, dilution of IHP

in water before loading it onto SPE cartridges lead to poor recoveries, as IHP was not retained on the WAX SPE cartridge. Meanwhile, dilution of IHP in phosphate buffer (150mM, pH=4) lead to no loss of IHP at loading step. In such pH, WAX SPE stationary phase remains positively charged. As reported in figure 4, retention of IHP was influenced by phosphate buffer concentration. A concentration of phosphate buffer of 150mM at pH=4 gave the best retention of IHP (Figure 4.A).

Finally, the elution step was optimized by increasing the elution force by increasing the molarity of the ammonium formate buffer until 6M (pH=8). This led to an IHP recovery of 100%

Figure 4: SPE optimization of (A) loading step (B) elution step

### 3.3. Method performance evaluation

#### 3.3.1. Linearity

Standard curves were prepared in duplicate by injecting the extracts from 8 known concentrations of IHP without internal standard. During method development a polypyrophosphate IHP derivative (hexadeuterated myo-inositol tris pyrophosphate) was evaluated as internal standard. An LC/MS method was recently reported by Lam and al<sup>31</sup> for myo-inositol tris pyrophosphate. However, due to the observation of big differences between these two compounds in their MS responses and chromatographic behaviors, this internal standard was not selected. Blank whole blood (n=3) was used to estimate endogenous level. Determining IHP levels in biological fluids of mammals is a complex issue. For example, estimations are comprised in a very large range varying between 0.5nM to 0.3µM, depending on the studies<sup>4,19,26,27,32-34</sup>. In the mice blood sample at our disposal, IHP level is 2µg/mL (3µM), which is close to the estimations of the Perello and Grasses group.

The calibration curve was obtained by 1/x least-square linear regression analysis of IHP concentrations ratios versus peak area. Sample concentrations were calculated by using the regression equation of the straight-line  $y = ax + b$ , where  $y$  is the peak area,  $a$  the slope,  $b$  the intercept and  $x$  the area of unknown

concentration. Good linearity was obtained in the range of 0.78-100 µg/mL (or 2.78-102 µg/mL with endogenous level) with typical correlation coefficients higher than 0.99, and an average slope of  $1.04 \times 10^4 \pm 624$  (Figure 5).

### 3.3.2. Precision and accuracy

The intra-assay precision and accuracy were assessed by extracting and analyzing four replicates of the plasma standards at three concentration levels. The intra-assay precision (expressed as percent relative standard deviation, %R.S.D.) ranged from 0.3% to 4% and the intra-assay accuracy (expressed

However, we noticed the presence of endogenous IHP in the whole blood of mice at our disposal.

## CONCLUSION

A sensitive and specific method for assaying IHP in whole blood was developed. The method specifically extracts IHP from whole blood by anion exchange solid phase extraction. The extraction yield is 84% and this WAX SPE protocol allows us to override matrix effects. We succeeded in controlling the

Nominal concentration (ng/mL)	Intra-day variation (n=4)			Matrix effect (%) <sup>3</sup>
	Determined concentration (Mean ± S.D.)	Precision (%) <sup>1</sup>	Accuracy (%) <sup>2</sup>	
3	2.80 ± 0.010	0.37	93.27	-25%
12	11.61 ± 0.119	1.03	96.72	-17%
37	39.41 ± 1.455	3.69	106.51	

<sup>1</sup> Expressed as R.S.D.: (S.D. / mean) x 100

<sup>2</sup> Expressed as: (determined concentration / nominal concentration) x 100

<sup>3</sup> Matrix effect is expressed as: ((spiked plasma / spiked solvent) x 100) - 100

**Table 1: Intra-day precision and accuracy**

as a percentage of nominal values ranging from 93% to 107% (at LLOQ level) (Table 1).

### 3.3.3. Extraction recovery and matrix effect

To evaluate the sample pre-treatment in the matrix, IHP was spiked in whole blood at 50µg/mL. Extraction recovery was calculated by comparing the differential peak area ratios for IHP spiked before SPE-WAX treatment versus IHP spiked after SPE WAX treatment. The mean extraction recovery for IHP, calculated by the average recoveries, was 89.3%. Matrix effect was determined based on the differences between the area of neat standards and that of post-extraction spiked control plasma at 50µg/mL. The amount of ion suppression (expressed as [(mean peak area of post-extraction spiked plasma samples/mean peak area of neat samples) × 100] - 100) is 3%. After the SPE-WAX extraction protocol, the representative SRM chromatogram of IHP didn't show co-eluted interferences (Figure 3), showing that efficiency of the extraction protocol developed. Moreover, a greater selectivity is obtained by using the SRM mode compared with SIM mode used by Tur and all<sup>25</sup>.

electrospray ionization of IHP by adding PTA and HFIP in order to create an ion pair and also avoid Na adducts and signal dispersion. This procedure increases the sensitivity and the reproducibility of the method. Moreover, PTA and HFIP adding to the mobile phase and re-creating the ion pair made IHP retention possible in reversed phase chromatography. The specificity of the developed method is also increased by using the SRM mode. The linearity of the assay was demonstrated between 0.78µg/mL and 100µg/mL.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The research leading to these results has received funding from Erytech Pharma.

## REFERENCES

- (1) March, J. G.; Simonet, B. M.; Grases, F. Kinetic-turbidimetric Determination of Phytic Acid by Sequential Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *409* (1-2), 9–16.
- (2) Schlemmer, U.; Frølich, W.; Prieto, R. M.; Grases, F. Phytate in Foods and Significance for Humans: Food Sources, Intake, Processing, Bioavailability, Protective Role and Analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53 Suppl 2*, S330–S375.
- (3) Viveros, A.; Centeno, C.; Brenes, A.; Canales, R.; Lozano, A. Phytase and Acid Phosphatase Activities in Plant Feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (9), 4009–4013.
- (4) Grases, F.; Simonet, B. M.; Prieto, R. M.; March, J. G. Variation of InsP4, InsP5 and InsP6 Levels in Tissues and Biological Fluids Depending on Dietary Phytate. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, *12* (10), 595–601.
- (5) Grases, F. Phytate Reduces Age-Related Cardiovascular Calcification. *Front. Biosci.* **2008**, *Volume* (13), 7115.
- (6) Midorikawa, K.; Murata, M.; Oikawa, S.; Hiraku, Y.; Kawanishi, S. Protective Effect of Phytic Acid on Oxidative DNA Damage with Reference to Cancer Chemoprevention. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288* (3), 552–557.
- (7) Graf, E. Antioxidant Functions of Phytic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8* (1), 61–69.
- (8) Grases, F. Phytate Acts as an Inhibitor in Formation of Renal Calculi. *Front. Biosci.* **2007**, *12* (1), 2580.
- (9) Fox, C. H.; Eberl, M. Phytic Acid (IP6), Novel Broad Spectrum Anti-Neoplastic Agent: A Systematic Review. *Complement. Ther. Med.* **2002**, *10* (4), 229–234.
- (10) Isaacks, R. E.; Harkness, D. R.; Goldman, P. H.; Adler, J. L.; Kim, C. Y. Studies on Avian Erythrocyte Metabolism. VII. Effect of Inositol Pentaphosphate and Other Organic Phosphates on Oxygen Affinity of the Embryonic and Adult-Type Hemoglobins of the Turkey Embryo. *Hemoglobin* **1977**, *1* (6), 577–593.
- (11) Gibson, Q. H.; Gray, R. D. The Reaction of Inositol Hexaphosphate with Hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *41* (2), 415–420.
- (12) Bailleul, C.; Borrelly-Villereal, M. C.; Chassaingne, M.; Ropars, C. Modification of Partial Pressure of Oxygen (P50) in Mammalian Red Blood Cells by Incorporation of an Allosteric Effector of Hemoglobin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1989**, *11* (1), 31–40.
- (13) Lamarre, Y.; Bourgeaux, V.; Pichon, A.; Hardeman, M. R.; Campion, Y.; Hardeman-Zijp, M.; Martin, C.; Richalet, J.-P.; Bernaudin, F.; Driss, F.; Godfrin, Y.; Connes, P. Effect of Inositol Hexaphosphate-Loaded Red Blood Cells (RBCs) on the Rheology of Sickle RBCs. *Transfusion* **2013**, *53* (3), 627–636.
- (14) Bourgeaux, V.; Aufradet, E.; Campion, Y.; De Souza, G.; Horand, F.; Bessaad, A.; Chevrier, A.-M.; Canet-Soulas, E.; Godfrin, Y.; Martin, C. Efficacy of Homologous Inositol Hexaphosphate-Loaded Red Blood Cells in Sickle Transgenic Mice. *Br. J. Haematol.* **2012**, *157* (3), 357–369.
- (15) Bourgeaux, V.; Hequet, O.; Campion, Y.; Delcambre, G.; Chevrier, A.-M.; Rigal, D.; Godfrin, Y. Inositol Hexaphosphate-Loaded Red Blood Cells Prevent in Vitro Sickling. *Transfusion* **2010**, *50* (10), 2176–2184.
- (16) Phillippy, B. Q.; Lin, M.; Rasco, B. Analysis of Phytate in Raw and Cooked Potatoes. *J. Food Compos. Anal.* **2004**, *17* (2), 217–226.
- (17) Dost, K.; Tokul, O. Determination of Phytic Acid in Wheat and Wheat Products by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558* (1-2), 22–27.
- (18) Bourgeaux, V.; Godfrin, Y. Method for assaying inositol hexaphosphate (IHP) Assaying inositol hexaphosphate . Patent WO/2010/115880, October 14, 2010.
- (19) Muñoz, J. A.; Valiente, M. Determination of Phytic Acid in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (22), 6374–6378.
- (20) Grebe, S. K.; Singh, R. J. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin. Biochem. Rev.* **2011**, *32* (1), 5–31.
- (21) Piram, A.; Salvador, A.; Verne, C.; Herbreteau, B.; Faure,

- R. Photolysis of Beta-Blockers in Environmental Waters. *Chemosphere* **2008**, *73* (8), 1265–1271.
- (22) Ji, Y.; Ferronato, C.; Salvador, A.; Yang, X.; Chovelon, J.-M. Degradation of Ciprofloxacin and Sulfamethoxazole by Ferrous-Activated Persulfate: Implications for Remediation of Groundwater Contaminated by Antibiotics. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 800–808.
- (23) Galeotti, F.; Volpi, N. Novel Reverse-Phase Ion Pair-High Performance Liquid Chromatography Separation of Heparin, Heparan Sulfate and Low Molecular Weight-Heparins Disaccharides and Oligosaccharides. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1284*, 141–147.
- (24) Karamanos, N. K.; Vanky, P.; Tzanakakis, G. N.; Tsegenidis, T.; Hjerpe, A. Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography for Determining Disaccharide Composition in Heparin and Heparan Sulphate. *J. Chromatogr. A* **1997**, *765* (2), 169–179.
- (25) Tur, F.; Tur, E.; Lenthalic, I.; Mendoza, P.; Encabo, M.; Isern, B.; Grases, F.; Maraschiello, C.; Perelló, J. Validation of an LC-MS Bioanalytical Method for Quantification of Phytate Levels in Rat, Dog and Human Plasma. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *928*, 146–154.
- (26) Perelló, J.; Grases, F. Phytate Levels in Biological Fluids of Mammals. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *960*, 255–257.
- (27) Muñoz, J. A.; López-Mesas, M.; Valiente, M. Minimum Handling Method for the Analysis of Phosphorous Inhibitors of Urolithiasis (pyrophosphate and Phytic Acid) in Urine by SPE-ICP Techniques. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *658* (2), 204–208.
- (28) Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Holyoke, J. L.; Davoudi, H.; Gebler, J. C. Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with on-Line Mass Spectrometry Detection. *Oligonucleotides* **2003**, *13* (4), 229–243.
- (29) Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (7), 1320–1325.
- (30) Mei, H.; Hsieh, Y.; Nardo, C.; Xu, X.; Wang, S.; Ng, K.; Korfmacher, W. A. Investigation of Matrix Effects in Bioanalytical High-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometric Assays: Application to Drug Discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17* (1), 97–103.
- (31) Lam, G.; Zhao, S.; Sandhu, J.; Yi, R.; Loganathan, D.; Morrissey, B. Detection of myo-inositol tris pyrophosphate (ITPP) in equine following an administration of ITPP. *Drug Test. Analysis.* **2014**, *6*, 268-276.
- (32) Cao, S.; Dong, N.; Chen, J. Synchronous Fluorescence Determination of Phytic Acid in Foodstuffs and Urine Based on Replacement Reaction. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22* (2), 119–123.
- (33) Chen, Y.; Chen, J.; Ma, K.; Cao, S.; Chen, X. Fluorimetric Determination of Phytic Acid in Urine Based on Replacement Reaction. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605* (2), 185–191.
- (34) Irvine, R. F. Absence of Detectable Inositol Hexakisphosphate (phytate) in Plasma. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *960*, 253–254



# COMMUNICATIONS

---



## I. Publications dans des journaux à comité de relecture

---

### LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF INOSITOL HEXAPHOSPHATE AFTER SOLID PHASE EXTRACTION

Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Catherine Fonbonne <sup>(1)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>, Vanessa Bourgeaux <sup>(2)</sup>, Arnaud Salvador <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> ERYTECH Pharma, Lyon, France

**Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2016, paper in press**

**DOI:10.1080/10826076.2016.1169427**

---

### IDENTIFICATION AND ABSOLUTE QUANTIFICATION OF ENZYMES IN LAUNDRY DETERGENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Alexandra Gaubert <sup>(1)</sup>, Jérémy Jeudy <sup>(1)</sup>, Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Claire Bordes <sup>(1)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>, Hervé Casabianca <sup>(1)</sup>, Arnaud Salvador <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

**Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, paper in press**

**DOI: 10.1007/s00216-016-9550-8**

---

### ABSOLUTE QUANTIFICATION OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 4 CHIMERA VACCINE CANDIDATE IN VERO CELL CULTURE BY TARGETED MASS SPECTROMETRY

Rougemont Blandine <sup>(1)</sup>, Simon Romain <sup>(1)</sup>, Carrière Romain <sup>(1)</sup>, Biarc Jordane <sup>(1)</sup>, Fonbonne Catherine <sup>(1)</sup>, Salvador Arnaud <sup>(1)</sup>, Huillet Céline <sup>(2)</sup>, Berard Yves <sup>(2)</sup>, Adam Olivier <sup>(2)</sup>, Manin Catherine <sup>(2)</sup> and Lemoine Jérôme <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> Sanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'étoile, France

**Proteomics, 2015, 15, 3320–3330**

**DOI 10.1002/pmic.201500101**

## II. Posters

---

### SCOUT-MRM: EXTENDED PORTABILITY OF LARGE MULTIPLEXED PEPTIDE ASSAY

Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Romain Carrière <sup>(1)</sup>, Sophie Ayciriex <sup>(1)</sup>, Jean-Marie Lacroix <sup>(2)</sup>, David Cox <sup>(3)</sup>, Yves Leblanc <sup>(3)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Villeneuve d'Ascq, France

<sup>(3)</sup> Sciex, Concord, ON, Canada

**Accepté à : 64th ASMS Conference, San Antonio, Texas ; 2016, 5-9 juin**

---

### MULTIPLEXED ANALYSIS OF 215 PESTICIDES USING SCOUT-MRM

Romain Carrière <sup>(1)</sup>, Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Romain Carrière <sup>(1)</sup>, Christelle Margoum <sup>(2)</sup>, Mathieu Ledreau <sup>(2)</sup>, David Cox <sup>(3)</sup>, Yves Leblanc <sup>(3)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France ;

<sup>(2)</sup> IRSTEA, Villeurbanne, France

<sup>(3)</sup> Sciex, Concord, ON, Canada

**Accepté à : 64th ASMS Conference, San Antonio, Texas ; 2016, 5-9 juin**

---

### SCOUT-MRM; A METHOD TO ACQUIRE LARGE NUMBERS OF MRM WITHOUT PREDEFINED RETENTION TIME

Yves Leblanc <sup>(1)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(2)</sup>, David Cox <sup>(1)</sup>, Romain Carrière <sup>(2)</sup>, Blandine Rougemont <sup>(2)</sup>, Romain Carrière <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Sciex, Concord, ON, Canada

<sup>(2)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

**Accepté à : 64th ASMS Conference, San Antonio, Texas ; 2016, 5-9 juin**

---

**ABSOLUTE QUANTIFICATION OF CHIMERIC DENGUE VIRUS PROTEINS BY LC-MS/MS**

Rougemont Blandine <sup>(1)</sup>, Simon Romain <sup>(1)</sup>, Carrière Romain <sup>(1)</sup>, Biarc Jordane <sup>(1)</sup>, Fonbonne Catherine <sup>(1)</sup>, Salvador Arnaud <sup>(1)</sup>, Huillet Céline <sup>(2)</sup>, Berard Yves <sup>(2)</sup>, Adam Olivier <sup>(2)</sup>, Manin Catherine <sup>(2)</sup> and Lemoine Jérôme <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> Sanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'étoile, France

**Congrès SMAP, Lyon ; 2014, juillet**

---

**EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ACIDE PHYTIQUE DANS LE SANG TOTAL PAR SPECTROMETRIE DE MASSE**

Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Catherine Fonbonne <sup>(1)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>, Vanessa Bourdeaux <sup>(2)</sup>, Arnaud Salvador <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> ERYTECH Pharma, Lyon, France

**Congrès SMAP, Lyon ; 2014, juillet**

### III. Communications orales

**DIFFERENTIAL PROTEOMIC ANALYSIS ASSOCIATED WITH THE INFECTION OF A PLANT MODEL BY Dickeya dadantii: FROM THE DISCOVERY PHASE TO THE TARGETED MRM METHOD**

---

Blandine Rougemont <sup>(1)</sup>, Jean-Marie Lacroix <sup>(2)</sup>, Jérôme Lemoine <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 5280 CNRS, Université de Lyon, Lyon1, Institut des Sciences Analytiques, France

<sup>(2)</sup> UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Villeneuve d'Ascq, France

**Ecole de printemps de la Société Française de Spectrométrie de Masse, XXIèmes rencontres jeunes ; 2016 ; 22 mars**

# BIBLIOGRAPHIE

---





- (1) Kuster, B.; Schirle, M.; Mallick, P.; Aebersold, R. Scoring Proteomes with Proteotypic Peptide Probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (7), 577–583.
- (2) Gillette, M. A.; Carr, S. A. Quantitative Analysis of Peptides and Proteins in Biomedicine by Targeted Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2013**, *10* (1), 28–34.
- (3) Surinova, S.; Schiess, R.; Hüttenhain, R.; Cerciello, F.; Wollscheid, B.; Aebersold, R. On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (1), 5–16.
- (4) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (12), 6940–6945.
- (5) Lottspeich, F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38* (17), 2476–2492.
- (6) De Gruttola, V. G.; Clax, P.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Ellenberg, S. S.; Friedman, L.; Gail, M. H.; Prentice, R.; Wittes, J.; Zeger, S. L. Considerations in the Evaluation of Surrogate Endpoints in Clinical Trials. Summary of a National Institutes of Health Workshop. *Control. Clin. Trials* **2001**, *22* (5), 485–502.
- (7) Papsidero, L. D.; Wang, M. C.; Valenzuela, L. A.; Murphy, G. P.; Chu, T. M. A Prostate Antigen in Sera of Prostatic Cancer Patients. *Cancer Res.* **1980**, *40* (7), 2428–2432.
- (8) Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A.; Levine, P. J.; Fusaro, V. A.; Steinberg, S. M.; Mills, G. B.; Simone, C.; Fishman, D. A.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A. Use of Proteomic Patterns in Serum to Identify Ovarian Cancer. *Lancet (London, England)* **2002**, *359* (9306), 572–577.
- (9) Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: The First Decade and Beyond. *Nat. Genet.* **2003**, *33* Suppl, 311–323.
- (10) O'Farrell, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (10), 4007–4021.
- (11) Jackson, D.; Craven, R. A.; Hutson, R. C.; Graze, I.; Lueth, P.; Tonge, R. P.; Hartley, J. L.; Nickson, J. A.; Rayner, S. J.; Johnston, C.; Dieplinger, B.; Hubalek, M.; Wilkinson, N.; Perren, T. J.; Kehoe, S.; Hall, G. D.; Daxenbichler, G.; Dieplinger, H.; Selby, P. J.; Banks, R. E. Proteomic Profiling Identifies Afamin as a Potential Biomarker for Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (24), 7370–7379.
- (12) Arentz, G.; Weiland, F.; Oehler, M. K.; Hoffmann, P. State of the Art of 2D DIGE. *Proteomics. Clin. Appl.* **2015**, *9* (3-4), 277–288.
- (13) van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. Immunoassay Using Hapten--Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1972**, *24* (1), 77–81.
- (14) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871–874.
- (15) Baker, M. Reproducibility Crisis: Blame It on the Antibodies. *Nature* **2015**, *521* (7552), 274–276.
- (16) Pastor, M. D.; Nogal, A.; Molina-Pinelo, S.; Meléndez, R.; Romero-Romero, B.; Mediano, M. D.; López-Campos, J. L.; García-Carbonero, R.; Sanchez-Gastaldo, A.; Carnero, A.; Paz-Ares, L. Identification of Oxidative Stress Related Proteins as Biomarkers for Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Bronchoalveolar Lavage. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (2), 3440–3455.

- (17) Deak, E.; Charlton, C. L.; Bobenchik, A. M.; Miller, S. A.; Pollett, S.; McHardy, I. H.; Wu, M. T.; Garner, O. B. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS Platforms for Routine Identification of Commonly Isolated Bacteria and Yeast in the Clinical Microbiology Laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *81* (1), 27–33.
- (18) Gregorich, Z. R.; Chang, Y.-H.; Ge, Y. Proteomics in Heart Failure: Top-down or Bottom-Up? *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2014**, *466* (6), 1199–1209.
- (19) Catherman, A. D.; Durbin, K. R.; Ahlf, D. R.; Early, B. P.; Fellers, R. T.; Tran, J. C.; Thomas, P. M.; Kelleher, N. L. Large-Scale Top-down Proteomics of the Human Proteome: Membrane Proteins, Mitochondria, and Senescence. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (12), 3465–3473.
- (20) Ntai, I.; LeDuc, R. D.; Fellers, R. T.; Erdmann-Gilmore, P.; Davies, S. R.; Rumsey, J.; Early, B. P.; Thomas, P. M.; Li, S.; Compton, P. D.; Ellis, M. J. C.; Ruggles, K. V.; Fenyo, D.; Boja, E. S.; Rodriguez, H.; Townsend, R. R.; Kelleher, N. L. Integrated Bottom-up and Top-down Proteomics of Patient-Derived Breast Tumor Xenografts. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *15* (1), 45–56.
- (21) Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution Is Needed? *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1474–1482.
- (22) Iwasaki, M.; Miwa, S.; Ikegami, T.; Tomita, M.; Tanaka, N.; Ishihama, Y. One-Dimensional Capillary Liquid Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the Escherichia Coli Proteome on a Microarray Scale. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2616–2620.
- (23) Ting, Y. S.; Egertson, J. D.; Payne, S. H.; Kim, S.; MacLean, B.; Käll, L.; Aebersold, R.; Smith, R. D.; Noble, W. S.; MacCoss, M. J. Peptide-Centric Proteome Analysis: An Alternative Strategy for the Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (9), 2301–2307.
- (24) Roepstorff, P.; Fohlman, J. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11* (11), 601.
- (25) Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive Ions). *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 886–887.
- (26) Dongré, A. R.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H. Surface-Induced Dissociation: An Effective Tool to Probe Structure, Energetics and Fragmentation Mechanisms of Protonated Peptides. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31* (4), 339–350.
- (27) Tabb, D. L.; Huang, Y.; Wysocki, V. H.; Yates, J. R. Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 1243–1248.
- (28) Blueggel, M.; Chamrad, D.; Meyer, H. E. Bioinformatics in Proteomics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5* (1), 79–88.
- (29) Palagi, P. M.; Hernandez, P.; Walther, D.; Appel, R. D. Proteome Informatics I: Bioinformatics Tools for Processing Experimental Data. *Proteomics* **2006**, *6* (20), 5435–5444.
- (30) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Huang, L.; Hansen, K. C.; Allen, N. P.; Rexach, M.; Burlingame, A. L. Comprehensive Analysis of a Multidimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Dataset Acquired on a Quadrupole Selecting, Quadrupole Collision Cell, Time-of-Flight Mass Spectrometer: II. New Developments in Protein Prospector Allow for Reliable and. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (8), 1194–

- 1204.
- (31) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Medzihradsky, K. F.; Lynn, A. J.; Burlingame, A. L. In-Depth Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data from Disparate Instrument Types. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (12), 2386–2398.
- (32) Michalski, A.; Damoc, E.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Wieghaus, A.; Makarov, A.; Nagaraj, N.; Cox, J.; Mann, M.; Horning, S. Mass Spectrometry-Based Proteomics Using Q Exactive, a High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (9), M111.011015.
- (33) Scheltema, R. A.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Hornburg, D.; Denisov, E.; Damoc, E.; Kuehn, A.; Makarov, A.; Mann, M. The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-Filter, High-Performance Quadrupole and an Ultra-High-Field Orbitrap Analyzer. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (12), 3698–3708.
- (34) Andrews, G. L.; Simons, B. L.; Young, J. B.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal. Chem.* **2011**, *83* (13), 5442–5446.
- (35) Ong, S.-E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (5), 376–386.
- (36) Grønborg, M.; Kristiansen, T. Z.; Iwahori, A.; Chang, R.; Reddy, R.; Sato, N.; Molina, H.; Jensen, O. N.; Hruban, R. H.; Goggins, M. G.; Maitra, A.; Pandey, A. Biomarker Discovery from Pancreatic Cancer Secretome Using a Differential Proteomic Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (1), 157–171.
- (37) Thompson, A.; Schäfer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Johnstone, R.; Mohammed, A. K. A.; Hamon, C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (8), 1895–1904.
- (38) Moulder, R.; Goo, Y. A.; Goodlett, D. R. Label-Free Quantitation for Clinical Proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1410*, 65–76.
- (39) Schulze, W. X.; Usadel, B. Quantitation in Mass-Spectrometry-Based Proteomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 491–516.
- (40) Zhang, A.; Sun, H.; Yan, G.; Han, Y.; Wang, X. Serum Proteomics in Biomedical Research: A Systematic Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *170* (4), 774–786.
- (41) Van Oudenhove, L.; Devreese, B. A Review on Recent Developments in Mass Spectrometry Instrumentation and Quantitative Tools Advancing Bacterial Proteomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (11), 4749–4762.
- (42) Mueller, L. N.; Brusniak, M.-Y.; Mani, D. R.; Aebersold, R. An Assessment of Software Solutions for the Analysis of Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics Data. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (1), 51–61.
- (43) Neilson, K. A.; Ali, N. A.; Muralidharan, S.; Mirzaei, M.; Mariani, M.; Assadourian, G.; Lee, A.; van Sluyter, S. C.; Haynes, P. A. Less Label, More Free: Approaches in Label-Free Quantitative Mass Spectrometry. *Proteomics* **2011**, *11* (4), 535–553.
- (44) MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G. L.; Frewen, B.; Kern, R.; Tabb, D. L.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics* **2010**, *26* (7), 966–968.

- (45) Clough, T.; Thaminy, S.; Ragg, S.; Aebersold, R.; Vitek, O. Statistical Protein Quantification and Significance Analysis in Label-Free LC-MS Experiments with Complex Designs. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13 Suppl 1* (16), S6.
- (46) Michalski, A.; Cox, J.; Mann, M. More than 100,000 Detectable Peptide Species Elute in Single Shotgun Proteomics Runs but the Majority Is Inaccessible to Data-Dependent LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (4), 1785–1793.
- (47) Gautier, V.; Mouton-Barbosa, E.; Bouyssié, D.; Delcourt, N.; Beau, M.; Girard, J.-P.; Cayrol, C.; Burlet-Schiltz, O.; Monsarrat, B.; Gonzalez de Peredo, A. Label-Free Quantification and Shotgun Analysis of Complex Proteomes by One-Dimensional SDS-PAGE/NanoLC-MS: Evaluation for the Large Scale Analysis of Inflammatory Human Endothelial Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (8), 527–539.
- (48) Biarc, J.; Gonzalo, P.; Mikaelian, I.; Fattet, L.; Deygas, M.; Gillet, G.; Lemoine, J.; Rimokh, R. Combination of a Discovery LC-MS/MS Analysis and a Label-Free Quantification for the Characterization of an Epithelial-mesenchymal Transition Signature. *J. Proteomics* **2014**, *110*, 183–194.
- (49) Panchaud, A.; Scherl, A.; Shaffer, S. A.; von Haller, P. D.; Kulasekara, H. D.; Miller, S. I.; Goodlett, D. R. Precursor Acquisition Independent from Ion Count: How to Dive Deeper into the Proteomics Ocean. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (15), 6481–6488.
- (50) Röst, H. L.; Malmström, L.; Aebersold, R. Reproducible Quantitative Proteotype Data Matrices for Systems Biology. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26* (22), 3926–3931.
- (51) Bruderer, R.; Bernhardt, O. M.; Gandhi, T.; Miladinović, S. M.; Cheng, L.-Y.; Messner, S.; Ehrenberger, T.; Zanotelli, V.; Butscheid, Y.; Escher, C.; Vitek, O.; Rinner, O.; Reiter, L. Extending the Limits of Quantitative Proteome Profiling with Data-Independent Acquisition and Application to Acetaminophen-Treated Three-Dimensional Liver Microtissues. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (5), 1400–1410.
- (52) Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (12), 1709–1723.
- (53) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.
- (54) Rauniyar, N. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (12), 28566–28581.
- (55) Tang, H.; Fang, H.; Yin, E.; Brasier, A. R.; Sowers, L. C.; Zhang, K. Multiplexed Parallel Reaction Monitoring Targeting Histone Modifications on the QExactive Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (11), 5526–5534.
- (56) Tsuchiya, H.; Tanaka, K.; Saeki, Y. The Parallel Reaction Monitoring Method Contributes to a Highly Sensitive Polyubiquitin Chain Quantification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *436* (2), 223–229.
- (57) Schilling, B.; MacLean, B.; Held, J. M.; Sahu, A. K.; Rardin, M. J.; Sorensen, D. J.; Peters, T.; Wolfe, A. J.; Hunter, C. L.; MacCoss, M. J.; Gibson, B. W. Multiplexed, Scheduled High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Anal. Chem.* **2015**.
- (58) Schiffmann, C.; Hansen, R.; Baumann, S.; Kublik, A.; Nielsen, P. H.; Adrian, L.; von Bergen, M.; Jehmlich, N.; Seifert, J. Comparison of Targeted Peptide Quantification Assays for Reductive Dehalogenases by Selective Reaction Monitoring (SRM) and

- Precursor Reaction Monitoring (PRM). *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (1), 283–291.
- (59) Ellis, M. J.; Gillette, M.; Carr, S. A.; Paulovich, A. G.; Smith, R. D.; Rodland, K. K.; Townsend, R. R.; Kinsinger, C.; Mesri, M.; Rodriguez, H.; Liebler, D. C. Connecting Genomic Alterations to Cancer Biology with Proteomics: The NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. *Cancer Discov.* **2013**, *3* (10), 1108–1112.
- (60) Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Ranish, J.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R. Computational Prediction of Proteotypic Peptides for Quantitative Proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (1), 125–131.
- (61) Fusaro, V. A.; Mani, D. R.; Mesirov, J. P.; Carr, S. A. Prediction of High-Responding Peptides for Targeted Protein Assays by Mass Spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (2), 190–198.
- (62) Brönstrup, M. Absolute Quantification Strategies in Proteomics Based on Mass Spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1* (4), 503–512.
- (63) Carr, S. A.; Abbatiello, S. E.; Ackermann, B. L.; Borchers, C.; Domon, B.; Deutsch, E. W.; Grant, R. P.; Hoofnagle, A. N.; Hüttenhain, R.; Koomen, J. M.; Liebler, D. C.; Liu, T.; MacLean, B.; Mani, D. R.; Mansfield, E.; Neubert, H.; Paulovich, A. G.; Reiter, L.; Vitek, O.; Aebersold, R.; Anderson, L.; Bethem, R.; Blonder, J.; Boja, E.; Botelho, J.; Boyne, M.; Bradshaw, R. A.; Burlingame, A. L.; Chan, D.; Keshishian, H.; Kuhn, E.; Kinsinger, C.; Lee, J. S. H.; Lee, S.-W.; Moritz, R.; Oses-Prieto, J.; Rifai, N.; Ritchie, J.; Rodriguez, H.; Srinivas, P. R.; Townsend, R. R.; Van Eyk, J.; Whiteley, G.; Wiita, A.; Weintraub, S. Targeted Peptide Measurements in Biology and Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-Based Assay Development Using a Fit-for-Purpose Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (3), 907–917.
- (64) Picotti, P.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring-Based Proteomics: Workflows, Potential, Pitfalls and Future Directions. *Nat. Methods* **2012**, *9* (6), 555–566.
- (65) Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Lacoux, X.; Morla, A.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J. Clinical Quantitation of Prostate-Specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (5), 1006–1015.
- (66) Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed Absolute Quantification in Proteomics Using Artificial QCAT Proteins of Concatenated Signature Peptides. *Nat. Methods* **2005**, *2* (8), 587–589.
- (67) Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J. Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (12), 2139–2149.
- (68) Gallien, S.; Duriez, E.; Domon, B. Selected Reaction Monitoring Applied to Proteomics. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (3), 298–312.
- (69) Zhao, L.; Whiteaker, J. R.; Pope, M. E.; Kuhn, E.; Jackson, A.; Anderson, N. L.; Pearson, T. W.; Carr, S. A.; Paulovich, A. G. Quantification of Proteins Using Peptide Immunoaffinity Enrichment Coupled with Mass Spectrometry. *J. Vis. Exp.* **2011**, No. 53.
- (70) Anderson, N. L.; Anderson, N. G.; Haines, L. R.; Hardie, D. B.; Olafson, R. W.; Pearson, T. W. Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* **2003**, *2* (2), 235–244.

- (71) Shi, T.; Fillmore, T. L.; Sun, X.; Zhao, R.; Schepmoes, A. A.; Hossain, M.; Xie, F.; Wu, S.; Kim, J.-S.; Jones, N.; Moore, R. J.; Pasa-Tolić, L.; Kagan, J.; Rodland, K. D.; Liu, T.; Tang, K.; Camp, D. G.; Smith, R. D.; Qian, W.-J. Antibody-Free, Targeted Mass-Spectrometric Approach for Quantification of Proteins at Low Picogram per Milliliter Levels in Human Plasma/serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (38), 15395–15400.
- (72) Shi, T.; Qian, W.-J. Antibody-Free PRISM-SRM for Multiplexed Protein Quantification: Is This the New Competition for Immunoassays in Bioanalysis? *Bioanalysis* **2013**, *5* (3), 267–269.
- (73) Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Bettsworth, F.; Lacoux, X.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J. Multiple Reaction Monitoring Cubed for Protein Quantification at the Low Nanogram/milliliter Level in Nondepleted Human Serum. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (22), 9343–9352.
- (74) Venable, J. D.; Dong, M.-Q.; Wohlschlegel, J.; Dillin, A.; Yates, J. R. Automated Approach for Quantitative Analysis of Complex Peptide Mixtures from Tandem Mass Spectra. *Nat. Methods* **2004**, *1* (1), 39–45.
- (75) Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (6), O111.016717.
- (76) Liu, Y.; Buil, A.; Collins, B. C.; Gillet, L. C. J.; Blum, L. C.; Cheng, L.-Y.; Vitek, O.; Mouritsen, J.; Lachance, G.; Spector, T. D.; Dermitzakis, E. T.; Aebersold, R. Quantitative Variability of 342 Plasma Proteins in a Human Twin Population. *Mol. Syst. Biol.* **2015**, *11* (1), 786.
- (77) Plumb, R. S.; Johnson, K. A.; Rainville, P.; Smith, B. W.; Wilson, I. D.; Castro-Perez, J. M.; Nicholson, J. K. UPLC/MS(E); a New Approach for Generating Molecular Fragment Information for Biomarker Structure Elucidation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (13), 1989–1994.
- (78) Helm, S.; Dobritzsch, D.; Rödiger, A.; Agne, B.; Baginsky, S. Protein Identification and Quantification by Data-Independent Acquisition and Multi-Parallel Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry (MS(E)) in the Chloroplast Stroma Proteome. *J. Proteomics* **2014**, *98*, 79–89.
- (79) Domon, B.; Aebersold, R. Options and Considerations When Selecting a Quantitative Proteomics Strategy. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (7), 710–721.
- (80) Ebhardt, H. A.; Root, A.; Sander, C.; Aebersold, R. Applications of Targeted Proteomics in Systems Biology and Translational Medicine. *Proteomics* **2015**, *15* (18), 3193–3208.
- (81) Sam, S.-S.; Omar, S. F. S.; Teoh, B.-T.; Abd-Jamil, J.; AbuBakar, S. Review of Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases Seen among Adults: A Retrospective Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7* (5), e2194.
- (82) Kalayanarooj, S.; Vaughn, D. W.; Nimmannitya, S.; Green, S.; Suntayakorn, S.; Kunentrasai, N.; Viramitrachai, W.; Ratanachu-eke, S.; Kiatpolpoj, S.; Innis, B. L.; Rothman, A. L.; Nisalak, A.; Ennis, F. A. Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176* (2), 313–321.
- (83) Alera, M. T.; Srikiatkachorn, A.; Velasco, J. M.; Tac-An, I. A.; Lago, C. B.; Clapham, H. E.; Fernandez, S.; Levy, J. W.; Thaisomboonsuk, B.; Klungthong, C.; Macareo, L. R.; Nisalak, A.; Hermann, L.; Villa, D.; Yoon, I.-K. Incidence of Dengue Virus Infection

- in Adults and Children in a Prospective Longitudinal Cohort in the Philippines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (2), e0004337.
- (84) Bhatt, S.; Gething, P. W.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Farlow, A. W.; Moyes, C. L.; Drake, J. M.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Sankoh, O.; Myers, M. F.; George, D. B.; Jaenisch, T.; Wint, G. R. W.; Simmons, C. P.; Scott, T. W.; Farrar, J. J.; Hay, S. I. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* **2013**, *496* (7446), 504–507.
- (85) Brady, O. J.; Gething, P. W.; Bhatt, S.; Messina, J. P.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Moyes, C. L.; Farlow, A. W.; Scott, T. W.; Hay, S. I. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (8), e1760.
- (86) Guzman, M. G.; Halstead, S. B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H. S.; Martínez, E.; Nathan, M. B.; Pelegrino, J. L.; Simmons, C.; Yoksan, S.; Peeling, R. W. Dengue: A Continuing Global Threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (12 Suppl), S7–S16.
- (87) Telle, O.; Vaguet, A.; Yadav, N. K.; Lefebvre, B.; Daudé, E.; Paul, R. E.; Cebeillac, A.; Nagpal, B. N. The Spread of Dengue in an Endemic Urban Milieu-The Case of Delhi, India. *PLoS One* **2016**, *11* (1), e0146539.
- (88) Schaffner, F.; Mathis, A. Dengue and Dengue Vectors in the WHO European Region: Past, Present, and Scenarios for the Future. *Lancet. Infect. Dis.* **2014**, *14* (12), 1271–1280.
- (89) Kraemer, M. U. G.; Sinka, M. E.; Duda, K. A.; Mylne, A.; Shearer, F. M.; Barker, C. M.; Moore, C. G.; Carvalho, R. G.; Coelho, G. E.; Van Bortel, W.; Hendrickx, G.; Schaffner, F.; Elyazar, I. R.; Teng, H.-J.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Pigott, D. M.; Scott, T. W.; Smith, D. L.; Wint, G. W.; Golding, N.; Hay, S. I. The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* **2015**, *4*, e08347.
- (90) Halstead, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* **1988**, *239* (4839), 476–481.
- (91) Perera, R.; Kuhn, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11* (4), 369–377.
- (92) Wallace, D.; Canouet, V.; Garbes, P.; Wartel, T. A. Challenges in the Clinical Development of a Dengue Vaccine. *Curr. Opin. Virol.* **2013**, *3* (3), 352–356.
- (93) Guy, B.; Barrere, B.; Malinowski, C.; Saville, M.; Teyssou, R.; Lang, J. From Research to Phase III: Preclinical, Industrial and Clinical Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine. *Vaccine* **2011**, *29* (42), 7229–7241.
- (94) Fernandez, S.; Thomas, S. J.; De La Barrera, R.; Im-Erbsin, R.; Jarman, R. G.; Baras, B.; Toussaint, J.-F.; Mossman, S.; Innis, B. L.; Schmidt, A.; Malice, M.-P.; Festrats, P.; Warter, L.; Putnak, J. R.; Eckels, K. H. An Adjuvanted, Tetravalent Dengue Virus Purified Inactivated Vaccine Candidate Induces Long-Lasting and Protective Antibody Responses against Dengue Challenge in Rhesus Macaques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92* (4), 698–708.
- (95) Dulbecco, R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1952**, *38* (8), 747–752.
- (96) LaBarre, D. D.; Lowy, R. J. Improvements in Methods for Calculating Virus Titer Estimates from TCID<sub>50</sub> and Plaque Assays. *J. Virol. Methods* **2001**, *96* (2), 107–126.
- (97) Puttikhunt, C.; Prommool, T.; U-thainual, N.; Ong-ajchaowlerd, P.; Yoosook, K.; Tawilert, C.; Duangchinda, T.; Jairangsri, A.; Tangthawornchaikul, N.; Malasit, P.;

- Kasinrerk, W. The Development of a Novel Serotyping-NS1-ELISA to Identify Serotypes of Dengue Virus. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50* (4), 314–319.
- (98) Young, P. R.; Hilditch, P. A.; Bletchly, C.; Halloran, W. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38* (3), 1053–1057.
- (99) Menting, S.; Thai, K. T. D.; Nga, T. T. T.; Phuong, H. L.; Klatser, P.; Wolthers, K. C.; Binh, T. Q.; de Vries, P. J.; Beld, M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* **2011**, *2011*, 514681.
- (100) Weidmann, M.; Sall, A. A.; Manuguerra, J.-C.; Koivogui, L.; Adjami, A.; Traoré, F. F.; Hedlund, K.-O.; Lindegren, G.; Mirazimi, A. Quantitative Analysis of Particles, Genomes and Infectious Particles in Supernatants of Haemorrhagic Fever Virus Cell Cultures. *Viol. J.* **2011**, *8*, 81.
- (101) Kraus, A. A.; Messer, W.; Haymore, L. B.; de Silva, A. M. Comparison of Plaque- and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (11), 3777–3780.
- (102) Santana, W. I.; Williams, T. L.; Winne, E. K.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. Quantification of Viral Proteins of the Avian H7 Subtype of Influenza Virus: An Isotope Dilution Mass Spectrometry Method Applicable for Producing More Rapid Vaccines in the Case of an Influenza Pandemic. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4088–4095.
- (103) Williams, T. L.; Luna, L.; Guo, Z.; Cox, N. J.; Pirkle, J. L.; Donis, R. O.; Barr, J. R. Quantification of Influenza Virus Hemagglutinins in Complex Mixtures Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Vaccine* **2008**, *26* (20), 2510–2520.
- (104) Simon, R.; Lemoine, J.; Fonbonne, C.; Jaffuel, A.; Léonard, J.-F.; Gautier, J.-C.; Pasquier, O.; Salvador, A. Absolute Quantification of Podocin, a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Human Urine, by Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Cubed Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *94*, 84–91.
- (105) Percy, A. J.; Yang, J.; Chambers, A. G.; Simon, R.; Hardie, D. B.; Borchers, C. H. Multiplexed MRM with Internal Standards for Cerebrospinal Fluid Candidate Protein Biomarker Quantitation. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (8), 3733–3747.
- (106) Huillet, C.; Adrait, A.; Lebert, D.; Picard, G.; Trauchessec, M.; Louwagie, M.; Dupuis, A.; Hittinger, L.; Ghaleh, B.; Le Corvoisier, P.; Jaquinod, M.; Garin, J.; Bruley, C.; Brun, V. Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ<sup>TM</sup>) and Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (2), M111.008235.
- (107) Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A. Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 787–797.
- (108) Whiteaker, J. R.; Lin, C.; Kennedy, J.; Hou, L.; Trute, M.; Sokal, I.; Yan, P.; Schoenherr, R. M.; Zhao, L.; Voytovich, U. J.; Kelly-Spratt, K. S.; Krasnoselsky, A.; Gafken, P. R.; Hogan, J. M.; Jones, L. A.; Wang, P.; Amon, L.; Chodosh, L. A.; Nelson, P. S.; McIntosh, M. W.; Kemp, C. J.; Paulovich, A. G. A Targeted Proteomics-Based Pipeline for Verification of Biomarkers in Plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (7), 625–634.
- (109) Martínez-Bartolomé, S.; Deutsch, E. W.; Binz, P.-A.; Jones, A. R.; Eisenacher, M.; Mayer, G.; Campos, A.; Canals, F.; Bech-Serra, J.-J.; Carrascal, M.; Gay, M.; Paradela, A.; Navajas, R.; Marcilla, M.; Hernáez, M. L.; Gutiérrez-Blázquez, M. D.;



- Velarde, L. F. C.; Aloria, K.; Beaskoetxea, J.; Medina-Aunon, J. A.; Albar, J. P. Guidelines for Reporting Quantitative Mass Spectrometry Based Experiments in Proteomics. *J. Proteomics* **2013**, *95*, 84–88.
- (110) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
- (111) Bereman, M. S.; MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. The Development of Selected Reaction Monitoring Methods for Targeted Proteomics via Empirical Refinement. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1134–1141.
- (112) Percy, A. J.; Parker, C. E.; Borchers, C. H. Pre-Analytical and Analytical Variability in Absolute Quantitative MRM-Based Plasma Proteomic Studies. *Bioanalysis* **2013**, *5* (22), 2837–2856.
- (113) Mo, W.; Ma, Y.; Takao, T.; Neubert, T. A. Sequencing of Oxidized Methionine-Containing Peptides for Protein Identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (21), 2080–2081.
- (114) Whiteaker, J. R.; Lin, C.; Kennedy, J.; Hou, L.; Trute, M.; Sokal, I.; Yan, P.; Schoenherr, R. M.; Zhao, L.; Voytovich, U. J.; Kelly-Spratt, K. S.; Krasnoselsky, A.; Gafken, P. R.; Hogan, J. M.; Jones, L. A.; Wang, P.; Amon, L.; Chodosh, L. A.; Nelson, P. S.; McIntosh, M. W.; Kemp, C. J.; Paulovich, A. G. A Targeted Proteomics-Based Pipeline for Verification of Biomarkers in Plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (7), 625–634.
- (115) Domanski, D.; Percy, A. J.; Yang, J.; Chambers, A. G.; Hill, J. S.; Freue, G. V. C.; Borchers, C. H. MRM-Based Multiplexed Quantitation of 67 Putative Cardiovascular Disease Biomarkers in Human Plasma. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1222–1243.
- (116) Rougemont, B.; Simon, R.; Carrière, R.; Biarc, J.; Fonbonne, C.; Salvador, A.; Huillet, C.; Berard, Y.; Adam, O.; Manin, C.; Lemoine, J. Absolute Quantification of Dengue Virus Serotype 4 Chimera Vaccine Candidate in Vero Cell Culture by Targeted Mass Spectrometry. *Proteomics* **2015**, *15* (19), 3320–3330.
- (117) Guy, B.; Almond, J.; Lang, J. Dengue Vaccine Prospects: A Step Forward. *Lancet* **2011**, *377* (9763), 381–382.
- (118) Villar, L.; Dayan, G. H.; Arredondo-García, J. L.; Rivera, D. M.; Cunha, R.; Deseda, C.; Reynales, H.; Costa, M. S.; Morales-Ramírez, J. O.; Carrasquilla, G.; Rey, L. C.; Dietze, R.; Luz, K.; Rivas, E.; Montoya, M. C. M.; Supelano, M. C.; Zambrano, B.; Langevin, E.; Boaz, M.; Tornieporth, N.; Saville, M.; Noriega, F. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 141103114505002.
- (119) Capeding, M. R.; Tran, N. H.; Hadinegoro, S. R. S.; Ismail, H. I. H. M.; Chotpitayasunondh, T.; Chua, M. N.; Luong, C. Q.; Rusmil, K.; Wirawan, D. N.; Nallusamy, R.; Pitisuttithum, P.; Thisyakorn, U.; Yoon, I.-K.; van der Vliet, D.; Langevin, E.; Laot, T.; Hutagalung, Y.; Frago, C.; Boaz, M.; Wartel, T. A.; Tornieporth, N. G.; Saville, M.; Bouckenooghe, A. Clinical Efficacy and Safety of a Novel Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children in Asia: A Phase 3, Randomised, Observer-Masked, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2014**, *384* (9951), 1358–1365.
- (120) Guy, B.; Briand, O.; Lang, J.; Saville, M.; Jackson, N. Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine: One More Step Forward. *Vaccine* **2015**, *33* (50), 7100–7111.
- (121) Hamer, D.; Lichtveld, M. Spatial Distribution of Epidemiological Cases of Dengue Fever in Suriname, 2001-2012. *West Indian Med. J.* **2015**, *64* (4).

- (122) Mantel, N.; Aguirre, M.; Gulia, S.; Girerd-Chambaz, Y.; Colombani, S.; Moste, C.; Barban, V. Standardized Quantitative RT-PCR Assays for Quantitation of Yellow Fever and Chimeric Yellow Fever-Dengue Vaccines. *J. Virol. Methods* **2008**, *151* (1), 40–46.
- (123) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
- (124) Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A. Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 787–797.
- (125) Arsene, C. G.; Ohlendorf, R.; Burkitt, W.; Pritchard, C.; Henrion, A.; O'Connor, G.; Bunk, D. M.; Güttler, B. Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (11), 4154–4160.
- (126) Percy, A. J.; Yang, J.; Hardie, D. B.; Chambers, A. G.; Tamura-Wells, J.; Borchers, C. H. Precise Quantitation of 136 Urinary Proteins by LC/MRM-MS Using Stable Isotope Labeled Peptides as Internal Standards for Biomarker Discovery And/or Verification Studies. *Methods* **2015**, *81*, 24–33.
- (127) Sturm, R.; Sheynkman, G.; Booth, C.; Smith, L. M.; Pedersen, J. A.; Li, L. Absolute Quantification of Prion Protein (90-231) Using Stable Isotope-Labeled Chymotryptic Peptide Standards in a LC-MRM AQUA Workflow. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (9), 1522–1533.
- (128) Li, L.; Lok, S.-M.; Yu, I.-M.; Zhang, Y.; Kuhn, R. J.; Chen, J.; Rossmann, M. G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* **2008**, *319* (5871), 1830–1834.
- (129) Plevka, P.; Battisti, A. J.; Sheng, J.; Rossmann, M. G. Mechanism for Maturation-Related Reorganization of Flavivirus Glycoproteins. *J. Struct. Biol.* **2014**, *185* (1), 27–31.
- (130) Zheng, A.; Yuan, F.; Kleinfelter, L. M.; Kielian, M. A Toggle Switch Controls the Low pH-Triggered Rearrangement and Maturation of the Dengue Virus Envelope Proteins. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3877.
- (131) van den Broek, I.; Romijn, F. P. H. T. M.; Smit, N. P. M.; van der Laarse, A.; Drijfhout, J. W.; van der Burgt, Y. E. M.; Cobbaert, C. M. Quantifying Protein Measurands by Peptide Measurements: Where Do Errors Arise? *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (2), 928–942.
- (132) van den Broek, I.; Smit, N. P. M.; Romijn, F. P. H. T. M.; van der Laarse, A.; Deelder, A. M.; van der Burgt, Y. E. M.; Cobbaert, C. M. Evaluation of Interspecimen Trypsin Digestion Efficiency prior to Multiple Reaction Monitoring-Based Absolute Protein Quantification with Native Protein Calibrators. *J. Proteome Res.* **2013**, *12* (12), 5760–5774.
- (133) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.; Cojocar, L.; Dufield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; Xu, K.; Yang, Z.; Yu, J.; Zhang, Y. J.; Vazvaei, F. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *AAPS J.* **2014**, *17* (1), 1–16.
- (134) Simon, R.; Girod, M.; Fonbonne, C.; Salvador, A.; Clément, Y.; Lantéri, P.; Amouyel, P.; Lambert, J. C.; Lemoine, J. Total ApoE and ApoE4 Isoform Assays in an Alzheimer's Disease Case-Control Study by Targeted Mass Spectrometry (n=669): A Pilot Assay for Methionine-Containing Proteotypic Peptides. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (11), 1389–1403.

- (135) Dai, J.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, X.; Lu, Z.; Cai, Y.; Qian, X. Identification of Degradation Products Formed during Performic Oxidation of Peptides and Proteins by High-Performance Liquid Chromatography with Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization and Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (9), 1130–1138.
- (136) Bordeerat, N. K.; Georgieva, N. I.; Klapper, D. G.; Collins, L. B.; Cross, T. J.; Borchers, C. H.; Swenberg, J. A.; Boysen, G. Accurate Quantitation of Standard Peptides Used for Quantitative Proteomics. *Proteomics* **2009**, *9* (15), 3939–3944.
- (137) Kato, M.; Kato, H.; Eyama, S.; Takatsu, A. Application of Amino Acid Analysis Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Isotope Dilution Mass Spectrometry for Peptide and Protein Quantification. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (27), 3059–3064.
- (138) Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Dupierris, V.; Couté, Y.; Bruley, C.; Garin, J.; Dupuis, A.; Jaquinod, M.; Brun, V. Introducing AAA-MS, a Rapid and Sensitive Method for Amino Acid Analysis Using Isotope Dilution and High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (7), 3929–3936.
- (139) Keil-Dlouhá, V.; Zylber, N.; Imhoff, J.-M.; Tong, N.-T.; Keil, B. Proteolytic Activity of Pseudotrypsin. *FEBS Lett.* **1971**, *16* (4), 291–295.
- (140) Research, C. for D. E. and. Guidances (Drugs) - Biopharmaceutics. Center for Drug Evaluation and Research.
- (141) Hunter, Christie L; Simons, B. The Scheduled MRM™ Algorithm Enables Intelligent Use of Retention Time During Multiple Reaction Monitoring. *Sciex Tech. Note* **2010**.
- (142) Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K. Applications of Liquid Chromatography–mass Spectrometry for Food Analysis. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 74–85.
- (143) Martínez-Domínguez, G.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A. Analytical Approaches for the Determination of Pesticide Residues in Nutraceutical Products and Related Matrices by Chromatographic Techniques Coupled to Mass Spectrometry. *Talanta* **2014**, *118*, 277–291.
- (144) Boja, E. S.; Fehniger, T. E.; Baker, M. S.; Marko-Varga, G.; Rodriguez, H. Analytical Validation Considerations of Multiplex Mass-Spectrometry-Based Proteomic Platforms for Measuring Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (12), 5325–5332.
- (145) Escher, C.; Reiter, L.; MacLean, B.; Ossola, R.; Herzog, F.; Chilton, J.; MacCoss, M. J.; Rinner, O. Using iRT, a Normalized Retention Time for More Targeted Measurement of Peptides. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1111–1121.
- (146) Reiter, L.; Rinner, O.; Picotti, P.; Hüttenhain, R.; Beck, M.; Brusniak, M.-Y.; Hengartner, M. O.; Aebersold, R. mProphet: Automated Data Processing and Statistical Validation for Large-Scale SRM Experiments. *Nat. Methods* **2011**, *8* (5), 430–435.
- (147) Lawrence, R. T.; Searle, B. C.; Llovet, A.; Villén, J. Plug-and-Play Analysis of the Human Phosphoproteome by Targeted High-Resolution Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2016**.
- (148) Abbatiello, S. E.; Mani, D. R.; Schilling, B.; Maclean, B.; Zimmerman, L. J.; Feng, X.; Cusack, M. P.; Sedransk, N.; Hall, S. C.; Addona, T.; Allen, S.; Dodder, N. G.; Ghosh, M.; Held, J. M.; Hedrick, V.; Inerowicz, H. D.; Jackson, A.; Keshishian, H.; Kim, J. W.; Lyssand, J. S.; Riley, C. P.; Rudnick, P.; Sadowski, P.; Shaddock, K.; Smith, D.; Tomazela, D.; Wahlander, A.; Waldemarson, S.; Whitwell, C. A.; You, J.; Zhang, S.;

- Kinsinger, C. R.; Mesri, M.; Rodriguez, H.; Borchers, C. H.; Buck, C.; Fisher, S. J.; Gibson, B. W.; Liebler, D.; Maccoss, M.; Neubert, T. A.; Paulovich, A.; Regnier, F.; Skates, S. J.; Tempst, P.; Wang, M.; Carr, S. A. Design, Implementation and Multisite Evaluation of a System Suitability Protocol for the Quantitative Assessment of Instrument Performance in Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS). *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (9), 2623–2639.
- (149) Chambers, A. G.; Percy, A. J.; Yang, J.; Borchers, C. H. Multiple Reaction Monitoring Enables Precise Quantification of 97 Proteins in Dried Blood Spots. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (11), 3094–3104.
- (150) Soste, M.; Hrabakova, R.; Wanka, S.; Melnik, A.; Boersema, P.; Maiolica, A.; Wernas, T.; Tognetti, M.; von Mering, C.; Picotti, P. A Sentinel Protein Assay for Simultaneously Quantifying Cellular Processes. *Nat. Methods* **2014**, *11* (10), 1045–1048.
- (151) Surinova, S.; Choi, M.; Tao, S.; Schüffler, P. J.; Chang, C.-Y.; Clough, T.; Vysloužil, K.; Khoylou, M.; Srovnal, J.; Liu, Y.; Matondo, M.; Hüttenhain, R.; Weisser, H.; Buhmann, J. M.; Hajdúch, M.; Brenner, H.; Vitek, O.; Aebersold, R. Prediction of Colorectal Cancer Diagnosis Based on Circulating Plasma Proteins. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7* (9), 1166–1178.
- (152) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.
- (153) Gallien, S.; Kim, S. Y.; Domon, B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (6), 1630–1644.
- (154) Kiyonami, R.; Schoen, A.; Prakash, A.; Peterman, S.; Zabrouskov, V.; Picotti, P.; Aebersold, R.; Huhmer, A.; Domon, B. Increased Selectivity, Analytical Precision, and Throughput in Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (2), M110.002931.
- (155) Toth, I. K.; van der Wolf, J. M.; Saddler, G.; Lojkowska, E.; Hélias, V.; Pirhonen, M.; Tsrör Lahkim, L.; Elphinstone, J. G. Dickeya Species: An Emerging Problem for Potato Production in Europe. *Plant Pathol.* **2011**, *60* (3), 385–399.
- (156) Reverchon, S.; Nasser, W. Dickeya Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5* (5), 622–636.
- (157) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Lacroix, J.-M. The Two-Component System CpxAR Is Essential for Virulence in the Phytopathogen Bacteria Dickeya Dadantii EC3937. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17* (11), 4415–4428.
- (158) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Lacroix, J.-M. Inactivation of pecS Restores the Virulence of Mutants Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans in the Phytopathogenic Bacterium Dickeya Dadantii. *Microbiology* **2014**, *160* (Pt 4), 766–777.
- (159) Bontemps-Gallo, S.; Madec, E.; Dondeyne, J.; Delrue, B.; Robbe-Masselot, C.; Vidal, O.; Prouvost, A.-F.; Boussemart, G.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. Concentration of Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPGs) Modulates the Activation Level of the RcsCD RcsB Phosphorelay in the Phytopathogen Bacteria Dickeya Dadantii. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (3), 881–894.
- (160) Bouchart, F.; Delangle, A.; Lemoine, J.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. Proteomic Analysis of a Non-Virulent Mutant of the Phytopathogenic Bacterium Erwinia Chrysanthemi Deficient in Osmoregulated Periplasmic Glucans: Change in Protein Expression Is Not Restricted to the Envelope, but Affects General Metabolism. *Microbiology* **2007**, *153* (Pt 3), 760–767.
- (161) Bouchart, F.; Boussemart, G.; Prouvost, A.-F.; Cogez, V.; Madec, E.; Vidal, O.; Delrue,

- B.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M. The Virulence of a *Dickeya Dadantii* 3937 Mutant Devoid of Osmoregulated Periplasmic Glucans Is Restored by Inactivation of the RcsCD-RcsB Phosphorelay. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (13), 3484–3490.
- (162) Delangle, A.; Prouvost, A.-F.; Cogez, V.; Bohin, J.-P.; Lacroix, J.-M.; Cotte-Pattat, N. H. Characterization of the *Erwinia Chrysanthemi* Gan Locus, Involved in Galactan Catabolism. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (19), 7053–7061.
- (163) Chalkley, R. J.; Baker, P. R.; Medzihradzky, K. F.; Lynn, A. J.; Burlingame, A. L. In-Depth Analysis of Tandem Mass Spectrometry Data from Disparate Instrument Types. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7* (12), 2386–2398.
- (164) Schilling, B.; Rardin, M. J.; MacLean, B. X.; Zawadzka, A. M.; Frewen, B. E.; Cusack, M. P.; Sorensen, D. J.; Bereman, M. S.; Jing, E.; Wu, C. C.; Verdin, E.; Kahn, C. R.; Maccoss, M. J.; Gibson, B. W. Platform-Independent and Label-Free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline: Application to Protein Acetylation and Phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (5), 202–214.
- (165) Choi, M.; Chang, C.-Y.; Clough, T.; Broudy, D.; Killeen, T.; MacLean, B.; Vitek, O. MSstats: An R Package for Statistical Analysis of Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomic Experiments. *Bioinformatics* **2014**, *30* (17), 2524–2526.
- (166) Klipper-Aurbach, Y.; Wasserman, M.; Braunsiegel-Weintrob, N.; Borstein, D.; Peleg, S.; Assa, S.; Karp, M.; Benjamini, Y.; Hochberg, Y.; Laron, Z. Mathematical Formulae for the Prediction of the Residual Beta Cell Function during the First Two Years of Disease in Children and Adolescents with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Med. Hypotheses* **1995**, *45* (5), 486–490.
- (167) Kanehisa, M.; Goto, S.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Hirakawa, M. KEGG for Representation and Analysis of Molecular Networks Involving Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (Database issue), D355–D360.
- (168) Reverchon, S.; Nasser, W. *Dickeya* Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5* (5), 622–636.
- (169) Effantin, G.; Rivasseau, C.; Gromova, M.; Bligny, R.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Massive Production of Butanediol during Plant Infection by Phytopathogenic Bacteria of the Genera *Dickeya* and *Pectobacterium*. *Mol. Microbiol.* **2011**, *82* (4), 988–997.
- (170) Fagard, M.; Dellagi, A.; Roux, C.; Périno, C.; Rigault, M.; Boucher, V.; Shevchik, V. E.; Expert, D. *Arabidopsis thaliana* Expresses Multiple Lines of Defense to Counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **2007**, *20* (7), 794–805.
- (171) Biarc, J.; Gonzalo, P.; Mikaelian, I.; Fattet, L.; Deygas, M.; Gillet, G.; Lemoine, J.; Rimokh, R. Combination of a Discovery LC–MS/MS Analysis and a Label-Free Quantification for the Characterization of an Epithelial–mesenchymal Transition Signature. *J. Proteomics* **2014**, *110*, 183–194.
- (172) Sjöström, M.; Ossola, R.; Breslin, T.; Rinner, O.; Malmström, L.; Schmidt, A.; Aebersold, R.; Malmström, J.; Niméus, E. A Combined Shotgun and Targeted Mass Spectrometry Strategy for Breast Cancer Biomarker Discovery. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (7), 2807–2818.
- (173) Picotti, P.; Clément-Ziza, M.; Lam, H.; Campbell, D. S.; Schmidt, A.; Deutsch, E. W.; Röst, H.; Sun, Z.; Rinner, O.; Reiter, L.; Shen, Q.; Michaelson, J. J.; Frei, A.; Alberti, S.; Kusebauch, U.; Wollscheid, B.; Moritz, R. L.; Beyer, A.; Aebersold, R. A Complete Mass-Spectrometric Map of the Yeast Proteome Applied to Quantitative Trait Analysis. *Nature* **2013**, *494* (7436), 266–270.
- (174) Hüttenhain, R.; Surinova, S.; Ossola, R.; Sun, Z.; Campbell, D.; Cerciello, F.; Schiess,

- R.; Bausch-Fluck, D.; Rosenberger, G.; Chen, J.; Rinner, O.; Kusebauch, U.; Hajdúch, M.; Moritz, R. L.; Wollscheid, B.; Aebersold, R. N-Glycoprotein SRMAtlas: A Resource of Mass Spectrometric Assays for N-Glycosites Enabling Consistent and Multiplexed Protein Quantification for Clinical Applications. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (4), 1005–1016.
- (175) Whiteaker, J. R.; Halusa, G. N.; Hoofnagle, A. N.; Sharma, V.; MacLean, B.; Yan, P.; Wrobel, J. A.; Kennedy, J.; Mani, D. R.; Zimmerman, L. J.; Meyer, M. R.; Mesri, M.; Boja, E.; Carr, S. A.; Chan, D. W.; Chen, X.; Chen, J.; Davies, S. R.; Ellis, M. J. C.; Fenyő, D.; Hiltke, T.; Ketchum, K. A.; Kinsinger, C.; Kuhn, E.; Liebler, D. C.; Liu, T.; Loss, M.; MacCoss, M. J.; Qian, W.-J.; Rivers, R.; Rodland, K. D.; Ruggles, K. V.; Scott, M. G.; Smith, R. D.; Thomas, S.; Townsend, R. R.; Whiteley, G.; Wu, C.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Rodriguez, H.; Paulovich, A. G. Using the CPTAC Assay Portal to Identify and Implement Highly Characterized Targeted Proteomics Assays. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1410*, 223–236.
- (176) Burgess, M. W.; Keshishian, H.; Mani, D. R.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. Simplified and Efficient Quantification of Low-Abundance Proteins at Very High Multiplex via Targeted Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (4), 1137–1149.
- (177) Selevsek, N.; Chang, C.-Y.; Gillet, L. C.; Navarro, P.; Bernhardt, O. M.; Reiter, L.; Cheng, L.-Y.; Vitek, O.; Aebersold, R. Reproducible and Consistent Quantification of the *Saccharomyces Cerevisiae* Proteome by SWATH-Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (3), 739–749.
- (178) Lebert, D.; Louwagie, M.; Goetze, S.; Picard, G.; Ossola, R.; Duquesne, C.; Basler, K.; Ferro, M.; Rinner, O.; Aebersold, R.; Garin, J.; Mouz, N.; Brunner, E.; Brun, V. DIGESTIF: A Universal Quality Standard for the Control of Bottom-up Proteomics Experiments. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (2), 787–803.
- (179) BOURGEOUX, V.; GODFRIN, Y. METHOD FOR ASSAYING INOSITOL HEXAPHOSPHATE (IHP). October 15, 2010.



## Résumé

La spectrométrie de masse en tandem est désormais une technique de choix pour l'analyse du protéome humain ou de micro-organismes. Typiquement, les protéines sont tout d'abord digérées en peptides protéotypiques, ceux-ci étant ensuite séparés par chromatographie liquide avant d'être analysés par MS/MS. L'identification et la quantification de ces peptides rapporteurs de protéines permet la mise en évidence d'un phénotype ou d'un mécanisme cellulaire particulier, dans un organisme complexe. Des approches par spectrométrie de masse ciblée et non ciblée coexistent et sont complémentaires dans l'analyse protéomique. Les travaux présentés ici se sont focalisés sur le développement et le transfert de méthodes ciblées, et plus particulièrement en mode SRM, à travers deux applications chez des micro-organismes modèles. Ainsi, une première étude s'est portée sur la quantification absolue des protéines du virus chimère dengue – fièvre jaune candidat vaccin. Par l'utilisation d'une stratégie de quantification de type AQUA, nous avons pu développer, valider et transférer le dosage des quatre sérotypes du virus chimère candidat vaccin. Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à développer un nouvel outil d'acquisition de données hautement multiplexées en SRM. Nous avons ainsi réalisé une analyse quantitative sans marquage de 445 protéines d'un phytopathogène, *Dickeya dadantii*, lors de l'infection d'une plante modèle.

DISCIPLINE : Chimie, biologie

MOTS CLES : Spectrométrie de masse, chromatographie liquide, quantification ciblée, protéines

---

## Abstract

Tandem mass spectrometry is now a technique of choice for human or micro-organisms proteome analysis. Typically, proteins are first digested into surrogates' peptides, separated by liquid chromatography before being analyzed by MS/MS. The ultimate goal is the identification and the quantification of these peptides, belonging to proteins and highlighting a phenotype or a cellular mechanism in a complex organism. Both targeted and untargeted approaches are used and are complementary in proteomic analysis. The work presented here is focused on the development and the transfer of targeted methods, and more particularly in the SRM mode. So, the first study was focused on the absolute quantification of viral proteins of the chimeric yellow-dengue fever, vaccine candidate against dengue. By using the AQUA quantification strategy, we were able to develop, to validate and to transfer the method for the four chimeric virus serotypes. In the second part, we developed a new data acquisition tool highly multiplexed SRM. Thus, we conducted a label free quantitative analysis on 445 proteins of a plant pathogen *Dickeya dadantii*, during a plant infection.

KEYWORDS: Mass spectrometry, liquid chromatography, targeted quantification, proteins



