	<b>Duarte – Domingos Gouveia (2014 - 2017)</b>
	Approches moléculaires pour la découverte, le développement et l'application de biomarqueurs de toxicité chez les gammaridés
	Encadrants : Olivier Geffard, Arnaud Chaumot, Jean Armengaud, Christine Almunia
	Ecole Doctorale: E2M2, Lyon Partenariat : CEA Li2D Marcoule.

Stratégies innovantes pour l'application de biomarqueurs moléculaires en écotoxicologie.  
La spectrométrie de masse permet de déterminer rapidement l'état de santé des organismes.  
L'écotoxicoprotéomique est une approche pertinente pour la surveillance environnementale.

La surveillance écotoxicologique des environnements aquatiques repose sur l'observation chez des organismes sentinelles d'effets toxiques liés à une contamination environnementale. Elle se voit à l'heure actuelle fortement encouragée par le recours possible aux outils moléculaires de nouvelle génération. Ce projet de thèse a proposé une méthodologie s'appuyant sur le couplage de techniques « omiques » afin de définir des biomarqueurs renseignant de la qualité des écosystèmes aquatiques. Une fois définis, ces multiples biomarqueurs peuvent être dosés rapidement à l'aide de spectromètres de masse en tandem. Le processus de découverte et de validation de biomarqueurs faisant appel à deux types d'analyses protéomiques, est illustré en Figure 1 pour une espèce non-modèle commune dans nos rivières, le crustacé *Gammarus fossarum*.

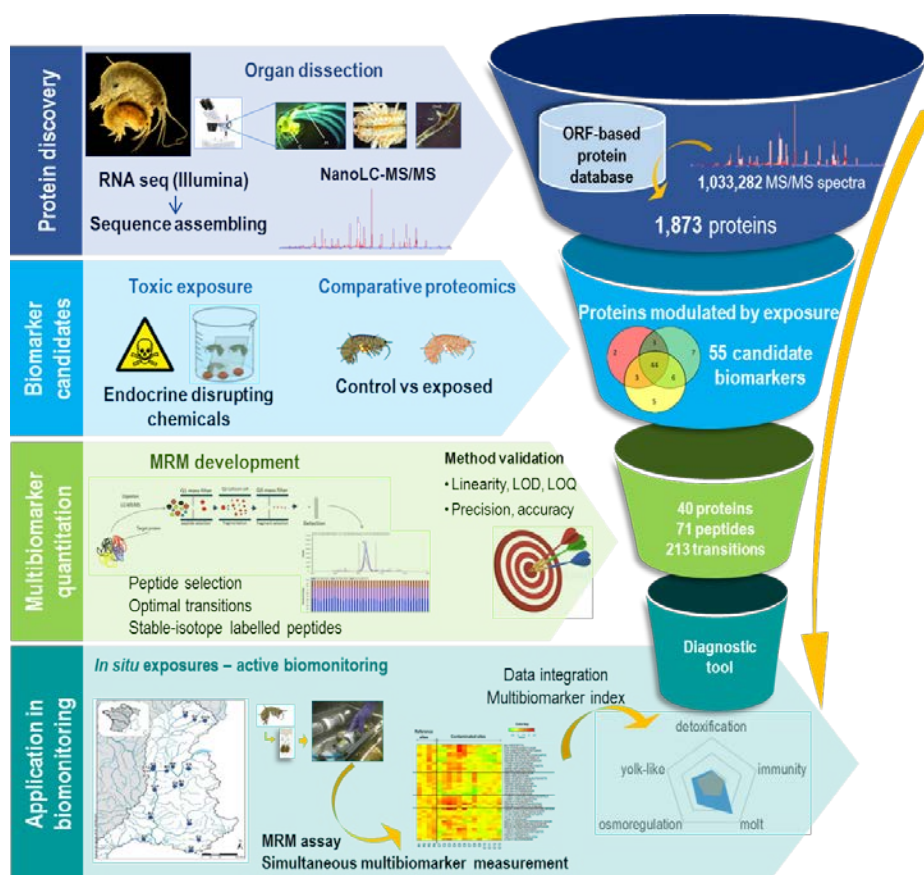


Figure 1 – Le “pipeline” protéomique proposé pour le développement d'une méthodologie de mesure multi-biomarqueur chez l'espèce bioindicatrice *Gammarus fossarum*.

Les protéines candidates biomarqueurs ont tout d'abord été identifiées par des approches « gène candidat » et de protéogénomique comparative. L'approche gène candidat a été mise en oeuvre en s'appuyant sur des recherches d'homologies de séquences, des analyses phylogénétiques, et l'étude d'expression (qPCR) de trois gènes identifiés comme impliqués dans la régulation endocrinienne de la mue et de la reproduction. L'approche de protéogénomique comparative a permis d'identifier des nombreux candidats biomarqueurs, *i.e.* de protéines modulés par des expérimentations toxiques au laboratoire. Une méthode de quantification absolue de ces protéines par spectrométrie de masse ciblée a ensuite été développée pour permettre le suivi simultané de 40 biomarqueurs d'intérêt à partir d'un seul organisme prélevé. La capacité de cette approche comme outil de diagnostic de la qualité des écosystèmes aquatiques a été testée à une échelle plus large en analysant des centaines de prélèvements de terrain réalisés sur les réseaux de surveillance opérationnels. Ce concept novateur couplant la biosurveillance active et l'analyse multi-biomarqueurs par spectrométrie de masse à haute résolution peut être appliqué à tout type d'organismes sentinelles. Les données enregistrées permettent alors de proposer un indicateur de l'état de santé de ces organismes sentinelles aux perturbations chimiques environnementales.

## Publications

Charnot, A., **D. Gouveia**, J. Armengaud, C. Almunia, A. Chaumot, J. Lemoine, O. Geffard and A. Salvador (2017). "Multiplexed assay for protein quantitation in the invertebrate *Gammarus fossarum* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **409**(16): 3969-3991. DOI: 10.1007/s00216-017-0348-0

**Gouveia, D.**; Chaumot, A.; Charnot, A.; Queau, H.; Armengaud, J.; Almunia, C.; Salvador, A.; Geffard, O., Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: a physiological and ecotoxicological study. Aquatic Toxicology 2017, 190, 199-209. DOI:10.1016/j.aquatox.2017.07.007

**Gouveia, D.**; Chaumot, A.; Charnot, A.; Almunia, C.; François, A.; Navarro, L.; Armengaud, J.; Salvador, A.; Geffard, O., Ecotoxicoproteomics for aquatic environmental monitoring: first *in situ* application of a new proteomics-based multibiomarker assay using caged amphipods. Environmental Science and Technology, 2017, 51 (22), 13417-13426. DOI: 10.1021/acs.est.7b03736.

**Gouveia, D.**, F. Bonneton, C. Almunia, J. Armengaud, H. Quéau, D. Degli-Esposti, O. Geffard and A. Chaumot (2018). "Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*." Scientific Reports **8**(1): 3793. DOI:10.1038/s41598-018-22235-7

Charnot, A., **D. Gouveia**, S. Ayciriex, J. Lemoine, J. Armengaud, C. Almunia, A. Chaumot, O. Geffard and A. Salvador (2018). "On-Line Solid Phase Extraction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for Multiplexed Proteins Quantitation in an Ecotoxicology Test Species: *Gammarus fossarum*." Journal of Applied Bioanalysis **4**(3): 81-101. DOI: 10.17145/jab.18.012

\*Trapp, J., **\*D. Gouveia**, C. Almunia, O. Pible, D. Degli Esposti, J.-C. Gaillard, A. Chaumot, O. Geffard and J. Armengaud (2018). "Digging Deeper Into the Pyriproxyfen-Response of the Amphipod *Gammarus fossarum* With a Next-Generation Ultra-High-Field Orbitrap Analyser: New Perspectives for Environmental Toxicoproteomics." Frontiers in Environmental Science **6**(54). DOI : 10.3389/fenvs.2018.00054. \*1st co-authors