

APPROCHES MOLÉCULAIRES POUR LA DÉCOUVERTE, LE DÉVELOPPEMENT ET L'APPLICATION DE BIOMARQUEURS DE TOXICITÉ CHEZ LES GAMMARIDÉS

Thèse de **Duarte Domingos GOUVEIA**¹

Analysée par **Dominique JOB**²

Directeur de thèse : Olivier **GEFFARD**, Directeur de Recherche, Irstea Lyon
Co-directeur de thèse : Jean **ARMENGAUD**, Directeur de Recherche, CEA Marcoule
Co-encadrant : Arnaud **CHAUMOT**, Chargé de Recherche, Irstea Lyon
Co-encadrant : Christine **ALMUNIA**, Chargée de Recherche, CEA Marcoule

Le travail présenté par Duarte Domingos Gouveia a été réalisé au Laboratoire d'écotoxicologie (Centre Irstea de Lyon) en collaboration étroite avec le Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (CEA – Marcoule), sous la direction d'Olivier Geffard (Irstea) et de Jean Armengaud (CEA) et le co-encadrement d'Arnaud Chaumont (Irstea) et de Christine Almunia (CEA). L'objectif principal de cette thèse est de développer des outils et des indicateurs d'évaluation de la pollution chimique des milieux aquatiques (Écotoxicologie aquatique). Elle s'est articulée autour de deux aspects. Le premier a visé à l'identification et la validation de biomarqueurs protéiques de grandes fonctions biologiques (défense, gestion de l'énergie, développement embryonnaire...) chez *Gammarus fossarum*, une espèce clé en écotoxicologie, allant jusqu'à leur mise en place et leur utilisation dans les milieux *via* l'utilisation de dispositifs d'encagement d'individus. Le deuxième volet s'est concentré sur l'étude de la transférabilité des biomarqueurs protéiques développés et aborde pour cela les notions de variabilité du protéome au sein du genre *Gammarus*, un genre de crustacés de l'ordre des amphipodes de la famille des gammaridés dont la plupart vivent dans la mer ou dans les estuaires, les autres dans les eaux douces et propres. En effet, plusieurs espèces de gammaridés, considérées comme vulnérables ou en danger de disparition par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN), sont considérées comme d'excellents bioindicateurs de la qualité des eaux.

Le besoin de méthodes d'évaluation de l'imprégnation chimique des milieux et de leur qualité écologique pour la mise en œuvre de la directive cadre européenne sur l'eau, ainsi que de mesures prédictives du risque toxique pour l'environnement et l'homme, suscite un vif intérêt pour les biomarqueurs en tant qu'outils d'aide au diagnostic de contamination et à la gestion du risque toxique. L'utilisation en routine de biomarqueurs pour la bio-surveillance environnementale présente toutefois plusieurs limitations, en particulier chez les invertébrés. Parmi ces limitations, le manque de biomarqueurs spécifiques est une contrainte majeure. Se basant sur les catalogues de gènes et de protéines obtenus à partir d'études dites de proteogénomique (discipline associant protéomique, génomique et séquençage aléatoire à haut débit du transcriptome (RNA-Seq) et permettant

¹ Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1 présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2017 pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Lyon – ED 341 Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (Spécialité : Écotoxicologie moléculaire) – Laboratoire d'accueil : Laboratoire d'écotoxicologie, Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea,) Centre de Lyon-Villeurbanne, France. Actuellement chercheur postdoctoral au Laboratoire LI2D Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic – Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Centre de Marcoule.

² Directeur de recherche émérite au CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France, section 6

l'identification de séquences peptidiques spécifiques présentes dans le protéome d'une espèce considérée), les travaux de thèse se proposent d'identifier de tels biomarqueurs chez *Gammarus fossarum*.

Le manuscrit (257 p) est rédigé en anglais et comporte une version abrégée en français. Très clair et parfaitement illustré, il est structuré en cinq chapitres dont une synthèse bibliographique, un chapitre détaillant les matériels et méthodes, deux chapitres consacrés aux résultats, et un chapitre consacré à la discussion générale et une conclusion générale. Le manuscrit est complété de nombreuses références bibliographiques.

L'**Introduction générale**, fait le point des connaissances sur la question de l'exposition croissante et préoccupante des organismes aquatiques à une contamination multiple et complexe provenant de plusieurs sources telles que l'industrie, l'agriculture, l'urbanisation, les transports, le tourisme ou la vie quotidienne. C'est ainsi qu'environ 100 000 molécules sont rejetées dans les systèmes aquatiques, la majorité d'entre elles étant très persistante et s'accumulant dans les organismes et dans les chaînes alimentaires. L'Introduction met en évidence le besoin impérieux d'une caractérisation de biomarqueurs spécifiques pour comprendre et analyser les effets biologiques à court et à long terme de ces contaminations. Elle présente une revue exhaustive de la littérature sur l'utilisation actuelle des biomarqueurs moléculaires en écotoxicologie, notamment en lien avec l'évaluation environnementale de la pollution de l'eau, et met l'accent sur les biomarqueurs protéiques, et sur l'utilisation d'espèces sentinelles (cf. Rivière JL. Les animaux sentinelles. *Courrier de l'Environnement de l'INRA n°20*, 59-67 ; <http://www7.inra.fr/lecourrier/assets/C20Riviere.pdf>) non modèles, en particulier chez les gammaridés, dont *Gammarus fossarum*, pour lesquels de nombreuses données biologiques sont synthétisées. Une première partie de l'Introduction donne la définition des biomarqueurs et illustre les biomarqueurs protéiques les plus utilisés pour évaluer l'impact des polluants. Les limites d'application des biomarqueurs dans la bio-surveillance de routine sont également exposées. La deuxième partie de l'Introduction explore les avantages et les potentiels des nouvelles approches dites « omiques » pour le développement de biomarqueurs en écotoxicologie, soulignant notamment le fort potentiel des méthodologies protéomiques pour le développement d'approches de type multi-biomarqueurs, bien plus prédictives et efficaces que celles basées sur l'utilisation d'un seul biomarqueur. La troisième partie de l'Introduction fait le point des travaux sur les processus de régulation neuroendocrinienne chez ces espèces sentinelles aquatiques. Enfin, la dernière partie de l'introduction énumère les différents objectifs proposés pour cette thèse.

Le **chapitre Matériels et Méthodes** détaille les protocoles expérimentaux mis en œuvre au cours de la thèse. Ce chapitre est d'une grande utilité afin de comprendre les principales méthodologies utilisées dans les publications issues de la thèse. Une première partie décrit les protocoles concernant l'échantillonnage des organismes, les dispositifs utilisés pour le maintien au laboratoire de ces organismes et les mesures biologiques mises en œuvre. Les conditions d'exposition des organismes ciblés au cours d'expériences en laboratoire et sur le terrain sont également décrites. Deux autres parties de ce chapitre décrivent les techniques et les méthodologies utilisées pour les analyses moléculaires effectuées au niveau des protéines et des gènes. Les technologies de protéomique et de spectrométrie de masse sont particulièrement bien décrites et démontrent tout leur intérêt pour l'identification et le développement des biomarqueurs recherchés, notamment *via* la mesure de la masse de tels marqueurs peptidiques.

Le **premier chapitre de la partie Résultats** rassemble les études qui conduisent au développement et à l'application d'un test protéomique basé sur la spectrométrie de masse pour la quantification simultanée d'un ensemble de plusieurs dizaines de biomarqueurs protéiques spécifiques. Ces travaux sont présentés sous la forme de trois publications. La première publication décrit le développement et la validation de la méthodologie analytique protéomique employée pour la mesure de biomarqueurs multiplexés. Elle met l'accent sur l'importance de la détermination de plusieurs paramètres tels que la

précision et la reproductibilité de la méthodologie, ainsi que les limites de détection et de quantification pour chaque protéine biomarqueur. La deuxième publication correspond à l'utilisation expérimentale de cette méthodologie protéomique dans des études physiologiques et écotoxicologiques afin d'évaluer la signification biologique des biomarqueurs, ainsi que leur aptitude à caractériser les effets toxicologiques chez *Gammarus*. La troisième publication présente les résultats obtenus dans un premier test d'évaluation de l'applicabilité potentielle de la méthodologie des multi biomarqueurs protéomiques dans des études de terrain. Les réponses aux biomarqueurs ont été analysées et comparées chez les gammaridés exposés dans quatre sites de référence et treize sites soumis à une contamination chimique lors du déploiement de gammaridés « mis en cage » (dans des cylindres en polypropylène perforés) au sein d'un réseau régional de surveillance des rivières. La validation des méthodologies utilisées est particulièrement soignée et servira probablement de référence pour de nombreuses études à venir. Ce chapitre est d'un très grand intérêt scientifique et méthodologique, ainsi qu'en atteste les publications issues de ce travail dans les meilleures revues générales (Scientific Reports, Analytical and Bioanalytical Chemistry) et d'écotoxicologie (Environmental Science and Technology, Aquatic Toxicology).

Le **deuxième de la partie Résultats** rassemble les résultats obtenus sur le développement de biomarqueurs de facteurs de stress spécifiques d'un grand intérêt environnemental que sont les troubles endocriniens. La première partie décrit l'utilisation d'une nouvelle génération de spectromètres de masse pour une étude comparative de protéomique, dite en vrac (Shotgun Proteomics), avec des mâles témoins et des mâles exposés au pyriproxifène (un insecticide mimétique de l'hormone juvénile d'insectes inhibant l'embryogenèse, la métamorphose et la formation de l'adulte). Cette approche de protéomique permet d'extraire le protéome et les protéines modulées différemment sans aucune connaissance *a priori*. La deuxième partie propose une stratégie alternative, basée sur une approche gène-candidat, afin de découvrir des gènes clés liés au système endocrinien des crustacés. En particulier, cette partie présente les résultats obtenus à partir de l'étude de l'identification et de la pertinence de trois gènes liés à l'ecdysone (une hormone stéroïde intervenant notamment dans le processus de la mue des arthropodes et dans le contrôle de leur reproduction) en tant que biomarqueurs des perturbations endocriniennes chez les femelles gammaridés. Leur utilisation potentielle en tant que biomarqueurs de perturbation endocrinienne a été évaluée par mesure de la modification de leur expression après exposition à des composés suspectés de se comporter comme des perturbateurs endocriniens. A l'image du reste du document, la méthodologie est parfaitement décrite avec rigueur et pédagogie.

Enfin, le **dernier chapitre de la thèse** est une synthèse et une discussion générale. Elle est encore une fois très claire et détaillée.

En conclusion, les travaux présentés sont très conséquents. Ils ont été, à juste titre, superbement valorisés. Les résultats obtenus s'accompagnent d'une analyse statistique rigoureuse attestant la solidité des résultats. L'auteur fait preuve d'une étonnante capacité analytique qui apparaît comme une prouesse technique à laquelle il donne un sens écotoxicologique. Le document expose de façon très claire une démarche pertinente visant à apporter des données précieuses ainsi qu'une réflexion sur la stratégie d'évaluation de la santé de l'environnement. L'apport en connaissances fondamentales est remarquable. La mise en œuvre des expérimentations montre large éventail de techniques maîtrisées incluant les techniques d'élevage, de déploiement *in situ* et des techniques physico-chimiques et biologiques de pointe. Au plan finalisé, les résultats présentés permettront de mieux caractériser, *via* des méthodes optimisées et à haut débit, l'impact des polluants chimiques sur les milieux aquatiques. Ces travaux sont ainsi d'une importance majeure dans le domaine des sciences de l'Environnement tant au plan conceptuel que méthodologique. Ils ont une valeur générique car ils permettront de mieux caractériser d'autres espèces végétales et animales mises en danger par des polluants avérés ou suspectés.

Articles publiés

- Gouveia D**, Bonneton F, Almunia C, Armengaud J, Quéau H, Degli-Esposti D, Geffard O, Chaumot A, (2018) Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*. *Scientific Reports* **8 (1)**, art. no. 3793.
- Gouveia D**, Chaumot A, Charnot A, Almunia C, François A, Navarro L, Armengaud J, Salvador A, Geffard O (2017) Ecotoxicoproteomics for aquatic environmental monitoring: first in situ application of a new proteomics-based multibiomarker assay using caged amphipods. *Environmental Science and Technology* **51(22)**, 13417-13426.
- Charnot A, **Gouveia D**, Armengaud J, Almunia C, Chaumot A, Lemoine J, Geffard O, Salvador A (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.
- Gouveia D**, Chaumot A, Charnot A, Quéau H, Armengaud J, Almunia C, Salvador A, Geffard O (2017) Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. *Aquatic Toxicology* **190**, 199-209.

Articles soumis

- Trapp* J, **Gouveia* D**, Almunia C, Pible O, Degli-Esposti D, Gaillard JC, Chaumot A, Geffard O, Armengaud J (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. Submitted to *Frontiers in Environmental Science*. *1st co-authors.
- Charnot A, **Gouveia D**, Ayciriex, S, Lemoine J, Armengaud J, Almunia C, Chaumot A, Geffard O, Salvador A (2018) On-line solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry method for multiplexed proteins quantitation in an ecotoxicology test species: *Gammarus fossarum*. Submitted to *Journal of chromatography A*.

Autre publication en lien avec la thèse

- Gouveia DD**, Silva AMN, Vitorino R, Domingues MRM, Domingues P (2014) Efficiency of trypsin digestion for mass-spectrometry-based identification and quantification of oxidized proteins: Evaluation of the digestion of oxidized bovine serum albumin. *European Journal of Mass Spectrometry* **20(3)**, 271-278.