HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

soutenue le 7/6/2023

à l'Université Claude Bernard – LYON 1

numéro d'ordre …….

Intérêt des approches -*omiques* en écotoxicologie moléculaire : démonstration chez une espèce sentinelle, le crustacé d'eau douce *Gammarus fossarum*.

Davide Degli Esposti

INRAE

Unité de recherche RiverLy

Laboratoire d'écotoxicologie

Centre de Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes

Jury :

Dr. Hélène Budzinski,	CNRS	Examinatrice
Pr. Céline Brochier	Université de Lyon 1	Examinatrice
Dr. Marie-Agnès Coutellec	INRAE	Rapporteure
Pr. Alain Geffard	Université de Reims	Rapporteur
Dr. Benjamin Marie	CNRS	Rapporteur
Pr. Stéphane Reynaud	Université Grenoble Alpes	Examinateur

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier Marie-Agnès Coutellec, Alain Geffard et Benjamin Marie d'avoir accepté généreusement d'être rapporteurs de ce mémoire pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches. Je remercie aussi Céline Brochier, Hélène Budzinski et Stéphane Reynaud de participer à ce jury en tant qu'examinateurs.

Les travaux ici présentés concernent temporellement environ la moitié de mes vingt ans de voyage professionnel dans le monde de la recherche scientifique, tout ne pouvant pas rentrer dans ce genre d'exercice. Je souhaite d'abord remercier les personnes qui n'apparaissent que peu ici : d'abord mon mentor, Morando Soffritti qui m'a appris le sens profond de ce métier. Puis Antoinette Lemoine, la première personne que j'ai rencontrée en France et qui a eu confiance en moi, italien absolument non francophone arrivé à Paris grâce à un heureux hasard de la vie. Je tiens à remercier Hector Hernandez-Vargas pour m'avoir initié aux études – *omiques* et Zdenko Herceg pour m'avoir permis de mûrir comme chercheur dans un contexte excitant comme le Centre International pour la Recherche sur le Cancer.

Pour le présent, je remercie Olivier Geffard qui m'a permis de jouer mes cartes au poker du concours: sans notre rencontre, je ne serais pas arrivé ici. Et je remercie Arnaud Chaumot, qui est une présence toujours rassurante. Avec vous, c'est une joie immense de pouvoir discuter de science et pas que. Je remercie l'ancien Irstea aujourd'hui INRAE, institut qui m'offre un cadre idéal pour le développement d'activité de recherche pour améliorer l'état de santé de nos milieux de vie. Je remercie sincèrement tout le laboratoire, les anciens comme les arrivés depuis peu, pour l'aide concret au travail quotidien et la sympathie du cadre de travail. Je souhaite évidemment remercier tous les étudiantes et étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer et leur implication et contribution précieuses à mon activité de recherche.

Enfin, je remercie l'heureux hasard de la vie, mon épouse Giuse, qui partage depuis toujours ces aventures, et nos filles Marta et Giulia qui me rendent tous les jours fière et heureux d'être un papa. Ce travail leur est dédié.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 9

I. PHYSIOPATHOLOGIE ET TOXICOLOGIE MOLECULAIRES DANS L'ERE DES -*OMIQUES*. 11

Apports des –omiques en physiologie. 11

Apports des –omiques en toxicologie. 13

Apports des –omiques en cancérogenèse environnementale. 15

II. ECOTOXICOLOGIE MOLECULAIRE CHEZ LES ESPECES SENTINELLES 19

La protéogenomique chez l'amphipode *Gammarus fossarum.* 19

Réseaux de coexpression en protéomique : apports en physiologie et écotoxicologie moléculaire. 31

L'ecotoxicoprotéomique : du laboratoire au terrain. 39

III. PERSPECTIVES 48

Génome de l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum.* 48

Identification des voies moléculaires du système endocrine chez les gammaridés : construction d'outils de diagnostics pour évaluer la perturbation endocrine en milieux aquatiques. 54

Approches–omiques chez les espèces sentinelles pour l'étude de l'exposome des milieux aquatiques. 62

REFERENCES 71

ANNEXES 85

1. Curriculum Vitae. 85
2. Publications choisies. 94

INTRODUCTION

Ce manuscrit d'HDR vise à illustrer l'évolution de mes travaux de recherche, allant de la biologie moléculaire appliquée à la cancérogénèse environnementale à l'accostage de l'écotoxicologie aquatique. Le but de mes activités de recherche a toujours été la compréhension des causes des perturbations du fonctionnement normal des organes, conduisant à des formes pathologiques, notamment dans un contexte d'exposition à des stress anthropiques (contaminants chimiques) et biologiques (notamment les virus).

Dans un premier temps, je présenterai l'intérêt des approches moléculaires appelées « *-omiques* » en physiologie et toxicologie environnementale. La capacité de ces approches à acquérir une grande quantité d'informations moléculaires (expression des gènes, abondance de protéines ou métabolites, jusqu'à l'identification de marqueurs épigénétiques) à l'échelle sous-individuel (de la cellule à l'organe) permet d'aborder les études des systèmes biologiques dans toute leur complexité. Dans le cadre de l'interaction entre les organismes et leur environnement, les *-omiques* ont ouvert l'opportunité d'explorer les voies moléculaires qui lient l'exposition aux contaminants et le développement d'effets toxiques. Mes travaux menés au Centre International pour la Recherche sur le Cancer, agence de l'Organisation Mondiale de la Santé, dans la première partie de ma carrière de chercheur, ont permis de mettre en évidence des signatures géniques et épigénétiques caractéristiques à la fois de la pathogénèse (carcinome hépatocellulaire) et de l'étiologie (carcinomes de la tête et du cou) de cancers d'origine environnementale.

Dans un deuxième temps, je montrerai mes premières contributions en écotoxicologie aquatique, qui ont représenté une véritable inflexion thématique dans mon activité scientifique. Je présenterai mes travaux visant à étudier la physiologie moléculaire et les modes d'action de contaminants chez le crustacé d'eau douce *Gammarus fossarum*, principal modèle animal sur

lequel je me suis concentré depuis mon recrutement à INRAE à travers l'utilisation d'approches de protéogénomique.

Enfin, je présenterai les axes de recherche que je souhaite développer, notamment sur *i*) l'établissement d'un génome de référence pour l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*; *ii*) l'identification des voies moléculaires du système endocrine chez les gammaridés et l'utilisation de ces connaissances pour la construction d'outils diagnostiques pour mesurer la perturbation endocrine dans les milieux aquatiques ; *iii*) l'utilisation des approches -omiques pour l'étude de l'exposome des milieux aquatiques.

I. PHYSIOPATHOLOGIE ET TOXICOLOGIE MOLECULAIRES DANS L'ERE DES –*OMIQUES*.

Apports des -omiques en physiologie

Le suffixe –omique(s) désigne un ensemble d'approches dans le domaine des sciences biologiques qui visent à identifier, caractériser et quantifier toutes les molécules biologiques qui interviennent dans la structure, la fonction et la dynamique d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. Au cours de cette dernière décennie, les technologies comme le séquençage de nouvelle génération (NGS) et la spectrométrie de masse à haute résolution, ont révolutionné l'approche de l'exploration et du développement des systèmes vivants (Prat & Degli Esposti 2019). L'ensemble des approches -omiques permet des analyses « exhaustives » (dans la limite de la sensibilité analytique des technologies choisies et du design expérimental) au niveau de l'ADN (génomique et épigénomique), des ARNs codants et non codants (transcriptomique), des protéines (protéomique), des métabolites polaires (métabolomique) ou des lipides (lipidomique). Grâce au haut contenu d'information qu'elle fournissent, ces méthodologies ont permis d'étudier sans a priori les mécanismes de régulation d'un grand nombre de processus physiologiques, tels que le développement, la reproduction ou le métabolisme. (Guimarães de Almeida Barros et al 2012, de Graaf et al 2009, Noriega et Oliveira 2018, Alberio 2020).

La disponibilité d'une grande quantité de données –omiques produites par les différentes approches au cours de ces deux dernières décades a donné naissance, certains diraient "renaissance" (Wolkenhauer 2001), à la biologie systémique ou biologie des systèmes. En tant que domaine scientifique interdisciplinaire, la biologie des systèmes combine l'informatique, les statistiques, les mathématiques et l'ingénierie pour analyser et interpréter les données biologiques de grande dimension et sert d'outil clé pour décoder l'énorme volume de données générées par une variété d'approches à haut débit dont les -omiques (Kitano 2002). La biologie de système ne s'intéresse pas tant aux « inventaires de pièces » qu'à la manière dont ces pièces interagissent pour produire des unités fonctionnelles dont les propriétés sont bien plus

importantes que la somme de leurs parties. Parmi les apports remarquables de la biologie des systèmes appliquée à l'interprétation et modélisation des données -omiques, on retrouve la reconstruction et la modélisation des réseaux métaboliques (Thiele et al 2020, Nègre et al 2019). Chez l'Homme, ces approches utilisent des informations physiologiques et des données -omiques pour générer des reconstructions métaboliques. Ces reconstructions visent à représenter le métabolisme de l'organisme entier résolu au niveau d'organe d'une manière anatomiquement et physiologiquement cohérente (Thiele et al 2020). L'intégration avec les données physiologiques, alimentaires et métabolomiques a permis de récapituler les cycles métaboliques inter-organes connus et de prédire les biomarqueurs connus de maladies métaboliques héréditaires dans différents fluides biologiques (Thiele et al 2020). Un des objectifs de ces approches est le développement de modèles computationnels du corps humain qui peuvent être interrogés pour personnaliser les approches thérapeutiques potentielles (Kell 2007). Dans les sciences environnementales, les modèles métaboliques à l'échelle du génome sont devenus l'outil de choix pour l'analyse globale du métabolisme (Aite etl al 2018). Par exemple, en combinant des données génomiques et métabolomiques chez le modèle d'algue rouge *Chondrus crispus*, Belcour et al (2020) ont développé une approche pour déduire les réactions et les structures moléculaires de cette espèce. Ils ont ainsi pu montrer que même les voies métaboliques considérées comme conservées, *e.g.* celle des stérols ou les voies de synthèse des acides aminés de type mycosporine, subissent un renouvellement important, indiquant qu'un phénotype donné peut être conservé même si les mécanismes moléculaires sous-jacents diffèrent. Cette même approche a permis de proposer un modèle pour les voies de biosynthèse des principaux caroténoïdes dans deux espèces d'algues, *Saccharina japonica* et *Cladosiphon okamuranus*, mettant en évidence, d'une part, les réactions et les enzymes qui ont été préservées au cours de l'évolution et, d'autre part, les spécificités liées aux algues brunes (Nègre et al 2019).

Apports des -omiques en toxicologie.

En toxicologie, ces avancées technologiques ont permis d'explorer les circuits complexes des gènes, des protéines ou des métabolites qui modulent les réponses toxiques et d'étudier comment les produits chimiques affectent l'expression de milliers de gènes. Ces patrons ou profils moléculaires, qui reflètent les étapes clés menant de l'exposition à la maladie, constituent l'objet de la toxicogénomique (Schmidt 2002), Par exemple, Hamadeh et al (2002) ont montré que des composés (par exemple le clofibrate ou le phénobarbital) agissant par un mécanisme commun (la prolifération des peroxysomes, un processus cellulaire lié à la réponse au stress oxydatif) ont des profils d'expression génique similaires, se distinguant des profils induites par d'autres contaminants. Cela signifie que les composés ayant des mécanismes similaires peuvent être regroupés par une empreinte génique commune, qui peut ensuite être utilisée pour prédire la classe chimique d'un composé inconnu. Un des objectifs de la toxicogénomique est d'"ancrer" phénotypiquement ces patrons moléculaires à des indices toxicologiques standards, tels que la chimie clinique ou la pathologie tissulaire. Un exemple récent a utilisé une approche transcriptomique pour expliquer les mécanismes de toxicité d'un hydrocarbure polycyclique aromatique, le retene, qui est associé à une toxicité développementale dépendante de l'*aryl hydrocarbon receptor* 2 (AHR2) chez le poisson zèbre (Wilson et al 2022).

A l'image du développement de la biologie des systèmes, les approches toxicogénomiques ont favori l'émergence de la toxicologie des systèmes comme discipline visant à l'intégration de la toxicologie classique avec l'analyse quantitative de changements moléculaires et fonctionnels se produisant à travers différent niveaux d'organisation biologique. Il s'agit essentiellement d'une approche holistique pour déchiffrer l'impact des agents environnementaux (produits chimiques, mélanges complexes, expositions professionnelles, agents physiques, agents biologiques, facteurs liés au mode de vie, etc.) sur des systèmes biologiques complexes. Un exemple est le projet Toxome humain lancé par le *National Institut of Health* des Etas Unis qui

vise à tester les stratégies qui combinent les données -omiques et les modèles informatiques, dans le but de développer les concepts et les moyens pour déduire, valider et partager les voies moléculaires de toxicité (Bouhifd et al 2015, Kiani et al 2018). Un autre exemple est l'évolution du cadre conceptuel des *Adverse Outcome Pathways* (AOPs), un cadre formalisé pour organiser les connaissances biologiques et toxicologiques selon un ensemble de principes et de lignes directrices généralement acceptés par les communautés scientifiques et réglementaires (Ankley et al. 2010, Knapen et al 2018). Un AOP est une description pragmatique, basée sur des preuves de la chaîne d'effets biologiques (événements clés, KE) et des relations entre eux (KER) menant d'une perturbation moléculaire (événement initiateur moléculaire, MIE) par un facteur de stress à un effet néfaste sur la santé au niveau de l'organisme ou de la population (effet indésirable, AO) (Ankley et al. 2010). Dans ce cadre, les approches de toxicologie des systèmess peuvent permettre la combinaison de plusieurs types de données -omiques, nécessaire pour obtenir une vue d'ensemble de la cascade de réponses, et donc la définition d'un AOP. Notamment, ces approches cherchent à fournir une information quantitative sur les relations entre exposition et réponse biologique et permettre de mieux cartographier exposition et toxicité dans les AOPs (Bajard et al 2023).

Apports des -omiques en cancérogenèse environnementale.

Dans cette partie, j'illustrerai brièvement le potentiel des approches -omiques en cancérogenèse environnementale à travers deux exemples de mon activité de recherche postdoctorale au Centre International de Recherche sur le Cancer, l'agence de recherche de l'Organisation Mondiale de la Santé qui s'intéresse à comprendre les causes environnementales des cancers pour mieux les prévenir. En particulier, j'ai pu mettre en évidence des signatures moléculaires associées à certaines causes étiologiques de cancers ou l'amélioration de la caractérisation fonctionnelle de certains gènes au cours du processus de cancérogenèse.

Dans une première étude, je me suis intéressé à la question de signatures épigénétiques, en particulier la méthylation des cytosines au niveau des sites CpG, induites par le virus du papillome humain (VPH) dans les cancers de la tête et du cou (Degli Esposti et al 2017). Les cancers de la tête et du cou représentent un groupe hétérogène de cancers pour lesquels l'infection par le VPH est un facteur de risque récent. Grâce à la capacité de mesurer les niveaux de méthylation d'environ un demi-million de cytosine au niveau du génome humain (méthylome) par puce à ADN et à l'analyse groupée des résultats de différentes cohortes de patients, cette étude a mis en évidence que le VPH a un effet spécifique sur le méthylome des cancers de la tête et du cou et que cette signature est indépendante d'autres facteurs de risques connus, tel que le tabagisme ou la consommation d'alcool (Figure 1).

De plus, grâce à l'utilisation d'algorithmes prédictifs de classification (Tibshirani et al 2002), une signature minimale de 5 CpGs hautement spécifique (>95%) pour les cas VPH positifs a été identifié. Cette signature est indépendante de la localisation anatomique du cancer, ce qui suggère que l'infection du virus est capable d'induire de changements de méthylation au niveau de *loci* génétiques très précis.

Dans une deuxième étude, je me suis intéressé à l'identification et à la caractérisation fonctionnelle d'une grande famille d'ARNs qui ne codent pas pour des protéines, les longs

ARNs non codants (lncRNAs), dans le carcinome hépatocellulaire en utilisant le séquençage d'ARN (RNA-seq) (Degli Esposti et al 2016).

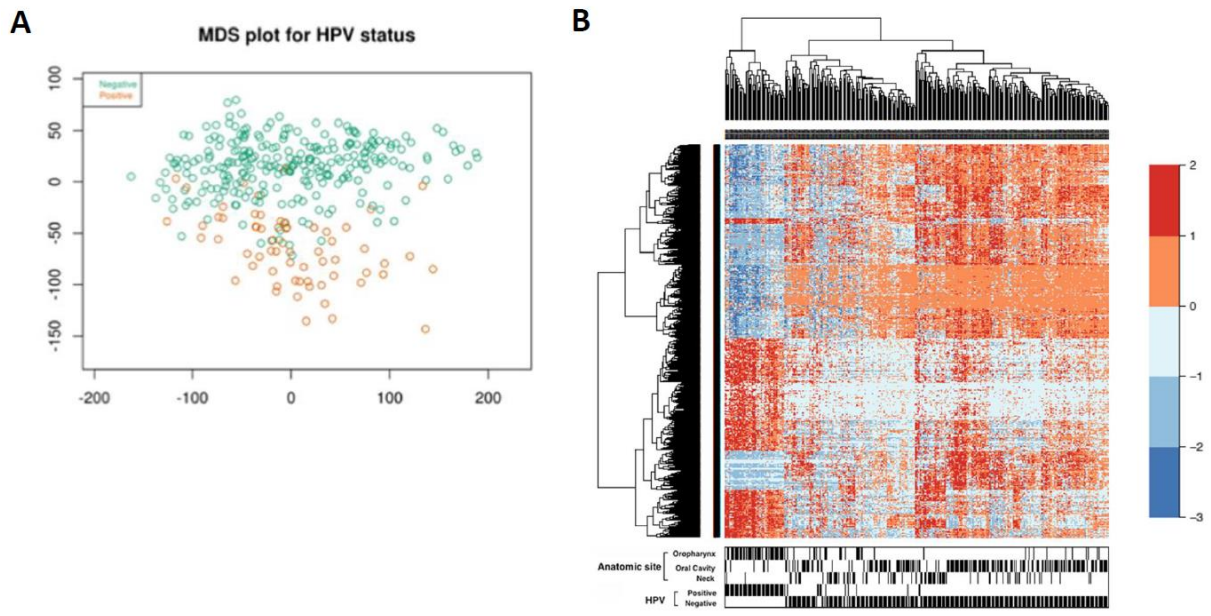


Figure 1. L'infection du VPH induit une signature spécifique dans les cancers de la tête et du cou. A) Multi Dimensional Scaling (MDS) plot montrant le clustering des échantillons en fonction de la présence du virus (positif en orange, négatif en vert). B) un *heatmap* montrant 2410 positions différentiellement méthylées associées à la présence du virus dans le tissus tumorales (FDR<0.05, différence de méthylation > 20%).

En effet, d'un point de vue mécaniste, la plupart des lncRNAs n'avait pas été caractérisée, même si un rôle dans le contrôle de l'expression génique avait été décrit pour certains d'entre eux, notamment au cours de la différentiation cellulaire chez les mammifères ou dans certaines pathologies, dont le cancer. Pour répondre à ces questions, j'ai combiné une analyse différentielle de données de RNA-seq avec des analyses de coexpression. Une analyse différentielle des 20 échantillons appariés avait mis en évidence 746 gènes différentiellement exprimés (DEGs) entre les tissus non cancéreux et les tissus cancéreux de 10 patients distincts. La même analyse sur les données RNA-seq de la cohorte américaine appartenant au *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), ayant 44 patients, avait permis de valider cette première analyse (Degli Esposti et al 2016). Parmi les DEGs identifiés, 57 étaient annotés comme lncRNAs. Afin de

déduire les fonctions biologiques des lncRNA différentiellement exprimés en d'identifiant des groupes de coexpression (modules) incluant ces lncRNA et d'autres ARNs codant pour des protéines dont la fonction était connue, j'ai utilisé une analyse du réseau de coexpression des gènes (*Weighted Gene Coexpression Network Analysis*) (Zhang & Horvath 2005). Ce type d'analyse se base sur l'hypothèse que les gènes ayant des patrons d'expression similaires dans un ensemble d'échantillons ont une forte probabilité d'être fonctionnellement corrélés (Zhang & Horvath 2005). Cette analyse avait permis d'identifier 5 modules, dont deux présentaient une présence plus importante en lncRNAs (Figure 2).

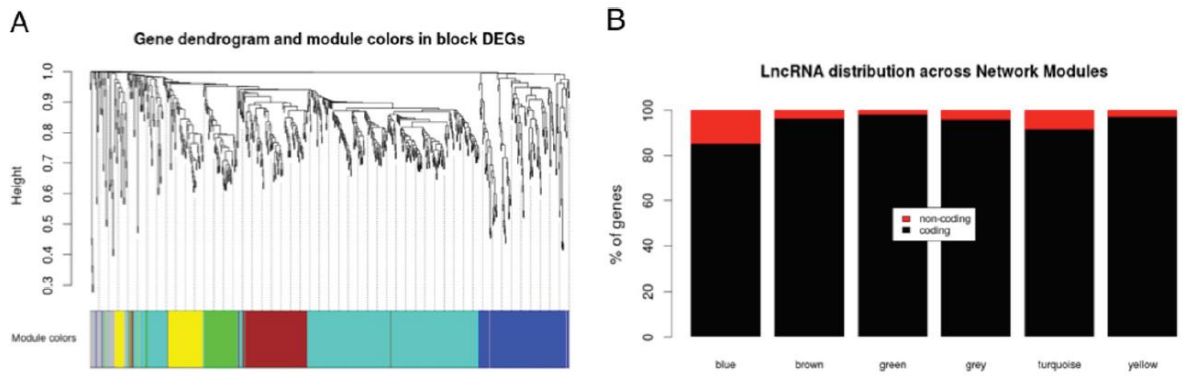


Figure 2. Analyse de coexpression des gène différentiellement exprimés entre tissus cancéreux et non cancéreux. A) *Clustering* des gènes et identification des modules (chaque module a une couleur différente). B) Distribution des lncRNAs dans les différents modules.

Un de ces deux modules présentait un groupe de 18 lncRNAs surexprimés dans les tissus cancéreux coexprimés avec des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. L'autre module présentait 28 lncRNAs coexprimés avec des gènes codant pour de fonctions majeures du métabolisme hépatique (cytochrome P450, le système du complément et le métabolisme du rétinol), tous sous-exprimés dans les tissus cancéreux. Ces résultats suggèrent que les lncRNAs peuvent participer au contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la maintenance des fonctions métaboliques du foie.

Dans les chapitres suivants, je montrerai les potentialités de ces approches pour améliorer les connaissances en physiologie moléculaire des espèces utilisées en sciences environnementales et pour répondre aux questions écotoxicologiques concernant les mécanismes de toxicité des contaminants.

II. ECOTOXICOLOGIE MOLECULAIRE CHEZ LES ESPECES SENTINELLES

La protéogenomique chez l'amphipode *Gammarus fossarum*.

Les études en science de l'environnement visent à intégrer la biodiversité en se basant sur l'étude d'organismes issus de populations naturelles, mais pour lesquelles les connaissances moléculaires sont peu disponibles. En écotoxicologie, les espèces sentinelles ont une importance particulière, car il s'agit d'espèces sensibles aux perturbations environnementales et dont la réponse biologique peut être utilisée pour évaluer l'état de santé des milieux aquatiques. De ce fait, la majorité de ces espèces est considérée comme « non-modèle » en biologie moléculaire (certaines familles de crustacés comme les gammaridés, ou des espèces de poisson comme le goujon) (Armengaud et al, 2014, Trapp et al 2016). Ce constat explique pourquoi les effets des stress chimiques chez la plupart de ces espèces ont été étudiés plutôt au niveau physiologique (Handy & Depledge 1999, Geffard et al 2010) et comportementale (Hellou, 2011). Quand des approches sub-individuelles, telles que les essais biochimiques pour la mesure d'activités enzymatiques (*e.g.* l'activité de l'acétylcholinestérase ou de l'enzyme antioxydant catalase) ont été appliquées, souvent celles-ci sont le fruit du transfert de méthodes disponibles chez les organismes modèles sans prendre en compte la potentielle diversité de spécificité et de sensibilité de la réponse de chaque biomarqueur, en lien notamment à la distance phylogénétique entre les espèces (Gagné, 2014). Dans ce cadre, accroitre nos connaissances en biologie moléculaire (séquences génomiques et protéiques, métabolomique etc.) est devenu incontournable pour fournir des mesures spécifiques de la réponse des espèces sentinelles utilisées pour surveiller l'état de santé des milieux. De surcroît, ces paramètres mesurables au niveau moléculaire peuvent offrir des alertes précoces d'un effet toxique, avant que cela soit identifiable à un niveau biologique et physiologique plus élevé (Gouveia et al 2019). Toutefois et malgré les efforts internationaux aujourd'hui en cours pour l'acquisition des génomes pour couvrir toute la biodiversité eucaryote (Lewin et al 2018, 2022, Blaxter et al

2022), nous disposons de très peu de génomes de référence pour les organismes utilisés en science de l'environnement. Pour accéder aux fonctions moléculaires de ces organismes et en étudier leurs modulations en réponse à la contamination environnementale, la protéogénomique offre une alternative au séquençage du génome, grâce à la combinaison du séquençage par courtes lectures des ARN polyadénylés (RNA-seq), dont la plupart sont codant pour de protéines, et la protéomique *shotgun* par spectrométrie de masse à haute résolution (Gouveia et al 2019, Armengaud et al 2014). La création d'une base de données théorique de séquences protéiques (*Open Reading Frames*, ORFs) de l'espèce sentinelle d'intérêt est permise grâce à l'assemblage *de novo* des données transcriptomiques, dont les transcrits et les ORFs résultants peuvent ensuite être utilisés pour interpréter et valider les spectres MS/MS (Gouveia et al 2019). Les fragments des transcrits obtenus par RNA-seq (contigs) traduits peuvent être optimisés à l'aide d'outils bioinformatiques afin de ne sélectionner que les parties codant pour les protéines, et ainsi réduire la taille des bases de données. Ces bases de données contiennent de véritables séquences protéiques mélangées à des séquences polypeptidiques erronées, mais les données de spectrométrie de masse permettent de ne confirmer que les séquences réellement présentes dans les échantillons biologiques (Figure 3).

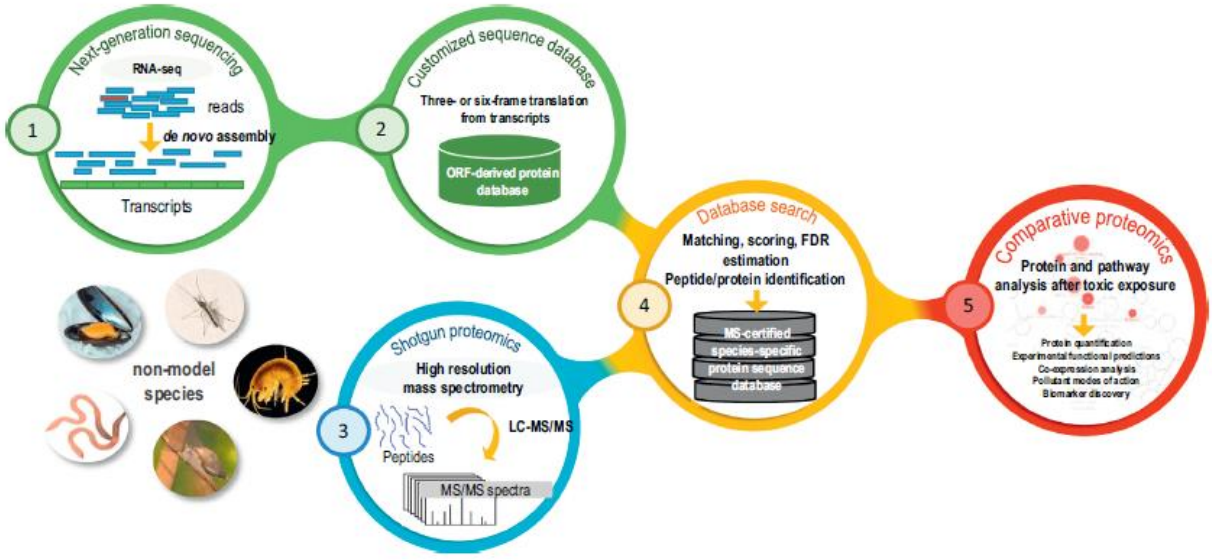


Figure 3. Stratégie de l'approche protéogénomique pour la caractérisation des protéomes d'espèces sentinelles.

Cette approche "protéomique par la transcriptomique" a été appliquée avec succès en écotoxicologie, et a permis de découvrir des milliers de séquences protéiques chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* (Trapp et al 2014) ou les bivalves *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha* (Campos et al 2016, Leprêtre et al 2020). La protéogénomique offre donc une alternative à l'absence de génome pour produire des bases de données de séquences de protéines chez les espèces non séquencées. Cependant, un certain nombre de défis restent à déverrouiller. Si pour les organismes modèles il existe aujourd'hui de bonnes pratiques pour l'analyse des données de séquençage d'ARN disponibles (Conesa et al 2016), celles-ci ne prennent pas en compte certaines verrous rencontrés avec les organismes d'intérêt environnemental, comme la présence de séquences génétiques contaminants (comme ceux du microbiome associé à l'organisme), l'absence des connaissances sur la structure des gènes et la limite de l'annotation des transcrits et des protéines issus de ces transcrits par simple analyse d'homologie.

Dans le cadre des travaux de protéogénomique menés chez *Gammarus fossarum* et dans lesquels s'inscrit mon activité de recherche (Cogne et al 2019, Gouveia et al 2019; projet GamfoCyc que je coordonne: collaborations avec Prof. Hubert Charles de UMR BF2i et Dr. Vincent Navratil plateforme PRABI) nous avons identifié des pistes méthodologiques pour améliorer l'annotation des protéines, avec une attention particulière pour celles impliquées dans les voies métaboliques. La plupart des résultats présentés ici résume une partie des résultats du Master 2 d'Amélie Lafont et de la thèse de Natacha Koenig que j'ai encadrées.

Un premier élément identifié est l'adaptation des stratégies utilisées pour l'analyse des données transcriptomiques. En effet, l'ARN provenant d'invertébrés, que ça soit des organismes entiers ou des organes isolés, est caractérisé par la présence simultanée d'ARN de l'organisme d'intérêt et du microbiome qui lui est associé. Cet aspect n'est pas souvent pris en considération dans l'analyse des lectures courtes issues du séquençage Illumina (Prado-Alvarez et al 2022, Boštjančić et al 2022, Miyake & Baba 2022). Cela implique qu'une partie des

transcrits identifiés par les pipelines d'assemblage ne correspondent pas à des gènes de l'espèce, mais plutôt de son microbiome, voire de contaminations issues de la manipulation des échantillons. En terme d'interprétation des données protéomiques, la présence d'ORFs d'ARNs non spécifiques de l'espèce d'intérêt conduit à une inflation de séquences qui peut nuire aux taux d'attribution des spectres issus de la spectrométrie de masse (Aggarwal et al 2022). Un autre aspect, lié aux assemblages *de novo,* est la présence d'un nombre de séquences largement supérieur à ce qui est attendu sur la base du nombre de gènes présents dans le génome (Raghavan et al 2022). Cela est dû à la présence de pre-mRNA ou d'ARNs non codant dans les contigs assemblés *de nov*o et à l'épissage alternatif qui génère des isoformes de transcrit (Dunham et al 2012, Freedman et al 2021, McManus et al 2011). Une réduction de la redondance de l'assemblage peut être une étape importante pour obtenir une base de données plus représentative des gènes codant pour les protéines (Raghavan et al 2022). Dans ce contexte, nous avons récemment mis en place un nouveau pipeline (Figure 4) basé sur l'utilisation de l'ensemble des données brutes de transcriptomes déjà disponibles (Cogne et al 2019), pour produire un transcriptome de référence de l'espèce *Gammarus fossarum* (type B). Pour ceci, nous avons fusionné les données brutes issues du séquençage de l'ARN extrait d'un mâle et d'une femelle (organismes entiers) de *Gammarus fossarum,* pour un total de 90 millions (M) de lectures *paired-end,* et introduit deux étapes supplémentaires par rapport aux pipelines d'assemblage *de novo* de transcriptomes utilisés dans la littérature chez les espèces d'intérêt environnemental. La première étape consiste à éliminer, au cours de l'évaluation des lectures brutes, les ARN contaminants provenant d'autres espèces ou faisant partis des ARN ribosomaux résiduels et pouvant être présents dans les échantillons utilisés pour la préparation des librairies. Pour l'identification des ARN provenant de différents taxons, nous avons construit une base de données personnalisée contenant toutes les séquences protéiques des archées, des bactéries, des virus, des plantes, des champignons, de protozoaires ainsi que des

plasmides et de l'homme présentes dans la base RefSeq, et nous avons analysé les données RNA-seq en utilisant le classeur taxonomique de séquence Kraken2 (Wood et al 2019, Wood and Salzberg 2014).

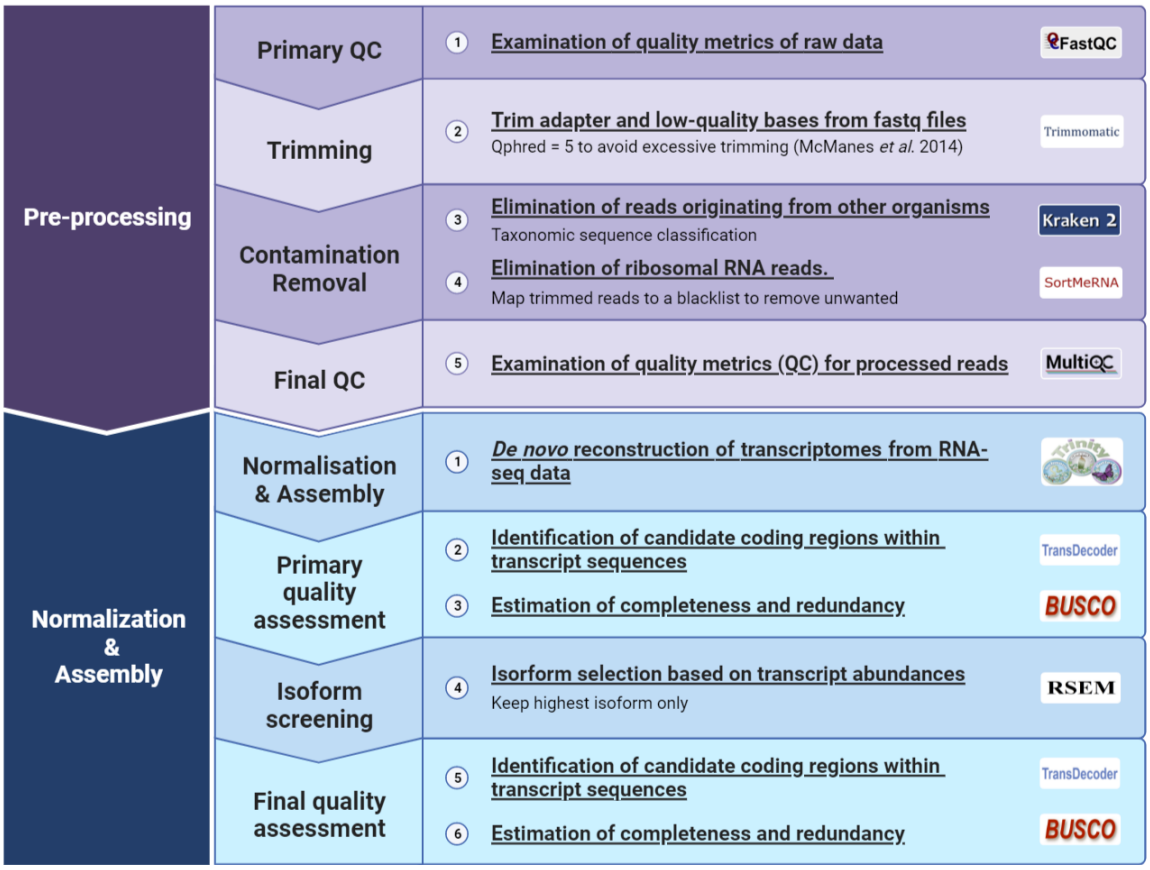


Figure 4. Pipeline mise en place pour l'obtention d'un transcriptome de référence de l'espèce Gammarus fossarum (type B). Mémoire de stage M2 Amélie Lafont.

Cette étape a montré qu'environ 23 millions de lectures (environ 12% des lectures) provenaient de taxons inclus dans cette base de données personnalisée (Figure 5, Table 1). L'ARN provenant des procaryotes constituait environ 5% des lectures et celui des eucaryotes environ 6.5%, dont un tiers venait de plantes et un tiers d'humain. Ces résultats montrent la pertinence d'une telle étape d'analyse pour établir un transcriptome caractéristique du pool génétique de l'espèce d'intérêt. De plus, elle permet d'identifier une partie du microbiome associé aux organismes, ce qui peut être pris en compte dans des études ultérieures visant à comprendre le rôle de la symbiose dans les traits de vie de l'espèce (Figure 5B et 5C). En ce

qui concerne les ARN ribosomaux, l'analyse par alignement local (par l'outil SortMeRNA, Kopylova et al 2012) a montré que ce type de contamination était minoritaire (moins de 0,7M de lectures soit <0.5% des lectures, Table 1), ce qui s'explique par la stratégie de construction des librairies par capture d'ARN polyadénylés (Cogne et al 2019).

Table 1. Résultats de l'analyse pre-assemblage des lectures du RNA-seq de l'espèce *Gammarus fossarum*.

Lectures	Données brutes	Elimination lectures de faible qualité	Elimination ARN contaminants	Elimination ARN ribosomaux	Total
Input (n)	181 487 296	181 436 578	158 074 674	157 400 267	157 400 267
Restant (%)	100%	99,97 %	87,10 %	86,73 %	86,73 %
Eliminées (n)	-	50 718	23 361 906	674 405	24 087 029

La deuxième étape que nous avons implémentée consiste à éliminer la redondance des transcrits via la sélection des isoformes ayant le niveau d'expression le plus élevé parmi les isoformes produites par l'assembleur Trinity. Cette deuxième étape diminue le nombre de contigs d'environ 30%, conduisant à un nombre de ORF de 42 997 (Table 1).

Pour mieux évaluer l'impact de ce nouveau pipeline sur le contenu de l'information biologique, nous avons effectué une analyse BUSCO, méthode qui permet d'évaluer la complétude d'un génome ou d'un transcriptome en se basant sur le nombre d'orthologues en copie unique qui devrait se retrouver dans la base de données sur la base des relations phylogénétiques avec un groupe taxonomique proche, dans ce cas celui des arthropodes.

Avant la sélection des isoformes les plus exprimées, 82% (835 des 1 013) des gènes orthologues des arthropodes sont retrouvés sous la forme complète (38% en copie unique et 45% dupliqués), 10% (96 des 1 013) sont retrouvés sous forme de fragments, et 8% (82 des 1013) ne sont pas présents dans l'assemblage (Figure 6A). Après la sélection, 79% (804 des 1 013) des gènes orthologues des arthropodes sont retrouvés en forme complète (63% en copie

unique et 16%en dupliqués), 11% (108 des 1 013) sont retrouvés sous forme de fragments, et 10% (101 des 1013) ne sont pas présents dans l'assemblage (Figure 6B).

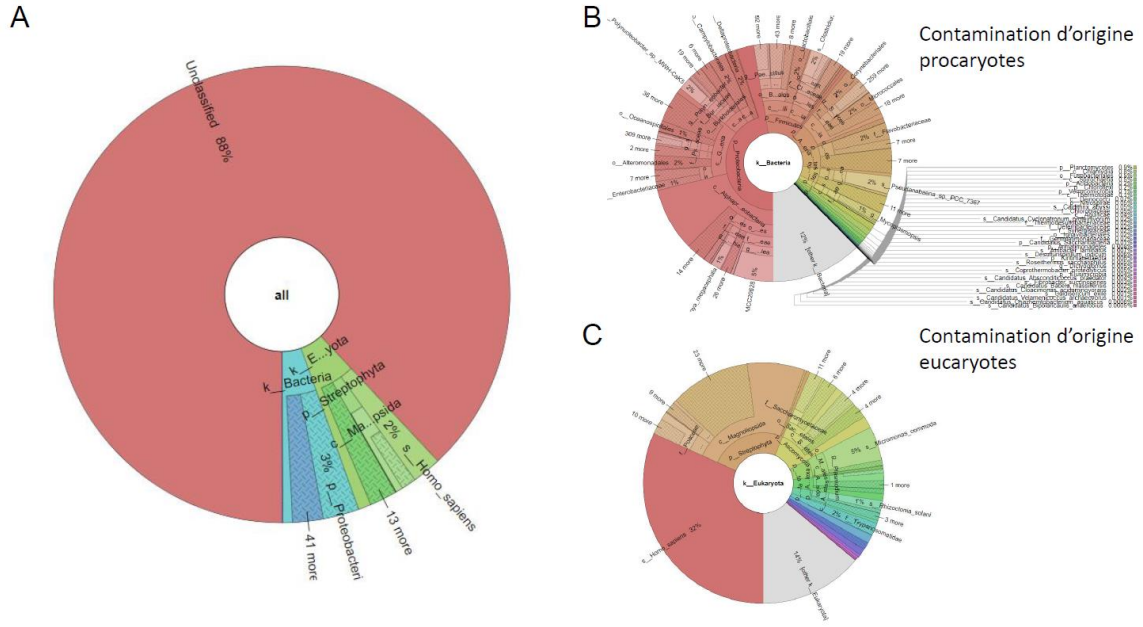


Figure 5. Résultats d'assignement taxonomique de lectures obtenues par RNA-seq d'un mâle et d'une femelle de *Gammarus fossarum* (type B). Mémoire de stage M2 Amélie Lafont.

Si l'on considère le taux d'orthologues dupliqués comme un proxy de la redondance de l'assemblage, l'élimination des isoformes les moins exprimées a donc permis de réduire cette redondance de 45% à 16%. Ces résultats montrent que l'utilisation d'une approche biologique basée sur le niveau estimé d'expression pour la sélection des transcrits assemblés est efficace pour réduire la redondance dans les transcriptomes et offre un compromis acceptable en ce qui concerne la perte d'information biologique.

A partir de ces améliorations au niveau de l'assemblage des transcriptomes, je me suis attaqué au défi, déjà abordé par Trapp et al (2016), de l'annotation des fonctions des protéines identifiées chez les espèces « non-modèles ». En effet, les approches actuelles d'annotation sont basées sur la similarité de séquences ou sur des corrélations fonctionnelles chez les espèces pour lesquelles davantage de données physiologiques et biologiques sont disponibles.

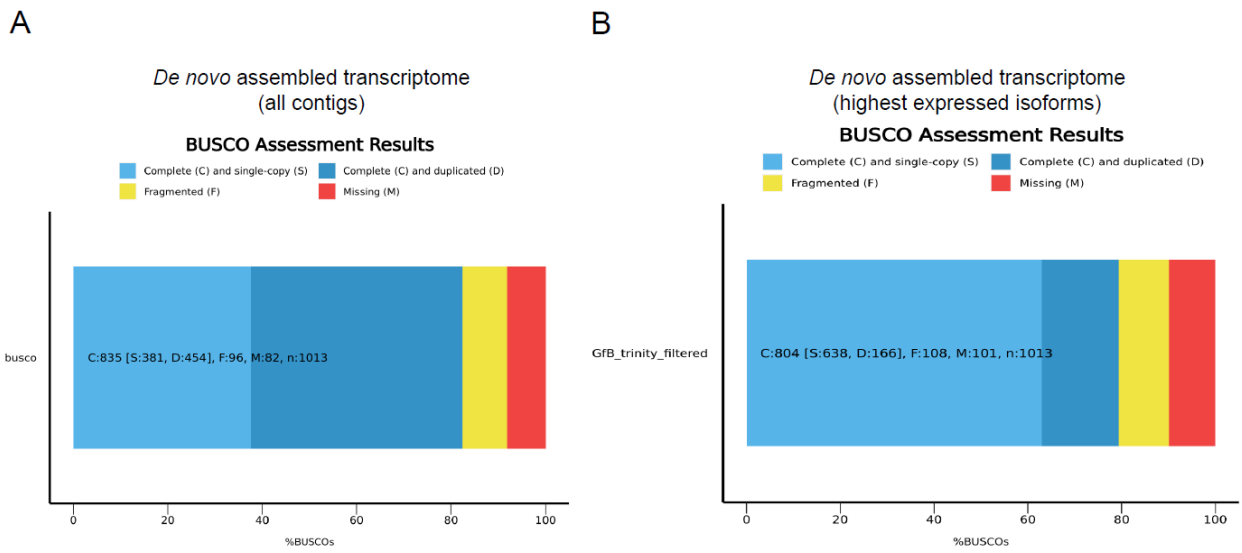


Figure 6. Résultats de l'analyse BUSCO. A) Statistiques BUSCO du transcriptome de Gammarus fossarum avant sélection des isoformes les plus exprimées. B) Statistiques BUSCO du transcriptome de Gammarus fossarum après sélection des isoformes les plus exprimées. Mémoire de stage M2 Amélie Lafont.

En effet, les approches actuelles d'annotation sont basées sur la similarité de séquences ou sur des corrélations fonctionnelles chez les espèces pour lesquelles davantage de données physiologiques et biologiques sont disponibles. Dans le cadre du projet GamfoCyc, j'ai initié une collaboration avec l'équipe SymT de l'UMR BF2i (Prof. Hubert Charles et Patrice Baa-Puyoulet) qui a développé un système d'informations (CycADS) qui permet d'obtenir une cartographie complète des protéines impliquées dans les voies métaboliques identifiées dans un génome, grâce à l'utilisation automatique de plusieurs outils d'annotation et d'orthologie, tels que Blast2GO, KAAS, Interpro et Priam (Vellozo et al 2011). L'intégration de ces différentes annotations est effectuée par l'outils *Pathway Tools* (Karp et al. 2019) qui permet de reconstruire les réseaux métaboliques complets des organismes. Cette approche a notamment été utilisée pour l'annotation fonctionnelle et la reconstruction des voies métaboliques dans différents génomes d'insectes d'intérêt agronomique, comme le puceron du pois (*Acyrthosiphon pisum*) ou le tribolium rouge de la farine (*Tribolium castaneum*) (Mathers et al., 2017, Paley and Karp, 2021). L'équipe SymT a ainsi développé ArthropodaCyc, une collection de 53 arthropodes dont les génomes sont disponibles, permettant des comparaisons

fiables et normalisées entre différentes espèces (Baa-Puyoulet et al. 2016, (https://www6.inrae.fr/cycads_eng/ArthropodaCyc). Dans ce cadre, nous avons d'abord analysé l'assemblage *de novo* du transcriptome du gammare avec CycADS. Ceci a été possible en considérant le transcriptome comme une ressource génomique grâce à l'outil TransDecoder, un logiciel qui identifie des régions potentiellement codantes à l'intérieur d'un transcrit et qui fournit un fichier d'annotation structurale des contigs assemblés en plus des ORFs identifiées, nécessaire à l'utilisation du pipeline CycADS. Cela a permis d'identifier 63 639 ORFs dans l'assemblage et d'annoter 7 630 enzymes appartenant à 377 voies métaboliques. Le niveau de complétude de la base de données métaboliques de l'espèce *Gammarus fossarum*, que nous avons nommée GamfoCyc, a été évalué en cartographiant la présence des réactions enzymatiques attendues, montrant que 295 voies possèdent plus du 75% des réactions prédites (Figure 7).

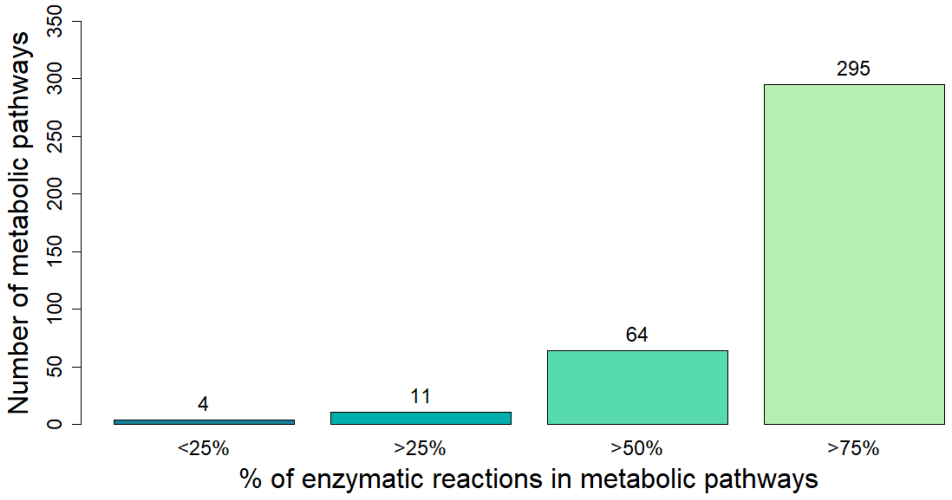


Figure 7. Evaluation de la complétude des voies enzymatiques de la base de données GamfoCyc après cartographie par MetExplore (https://vm-metexplore-prod.toulouse.inra.fr/index.html/). Thèse de Natacha Koenig.

Dans le cadre de l'amélioration de l'approche protéogénomique, nous avons intégré les données de protéomique shot-gun obtenues au niveau de différents organes du gammare (cephalons, branchies, caeca, intestins, gonades mâle ou femelle, reste du corps) pour identifier

d'un côté quelles enzymes parmi celles annotées par transcriptomique sont « visibles » en spectrométrie de masse et de l'autre côté établir une première carte organe-spécifique des voies métaboliques présentes chez *Gammarus fossarum*.Parmi les 4152 protéines identifiées par protéomique shotgun, 1245 (environ 30%) sont des enzymes annotées dans la base de données GamfoCyc (Figure 8).

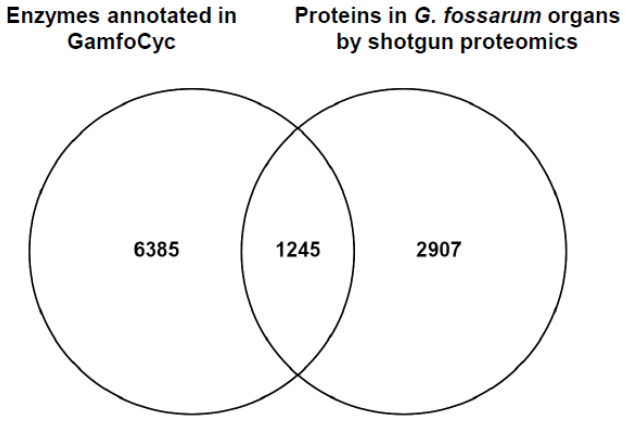


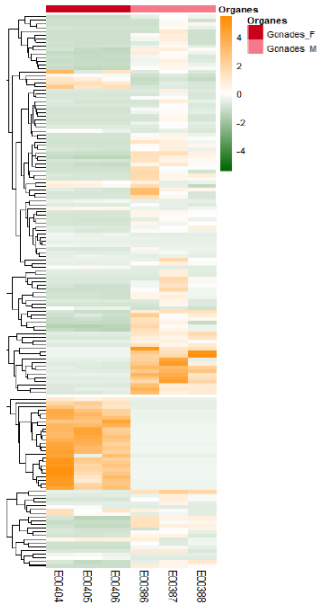
Figure 8. Comparaison entre les nombre d'enzymes annotées par la transcriptomique (base de données GamfoCyc) et protéines identifiées par protéomique shotgun dans différent organes chez des organismes mâles ou femelle de l'espèce *Gammarus fossarum.* Thèse de Natacha Koenig.

Ces résultats nous ont encouragés à proposer une première construction métabolique anatomiquement et physiologiquement représentative du gammare. Ce schéma global représente un outil pertinent et modulable pour différentes applications en écotoxicologie, telles que l'étude des modes d'action de contaminants ou l'identification de biomarqueurs d'exposition ou d'effets. Grâce à une analyse différentielle des données de protéomique shotgun, nous avons mis en évidence des profils protéomiques caractéristiques selon les différents organes, reflétant certaines spécificités métaboliques.

A titre d'exemple, les ovaires se distinguent des testicules à travers une expression plus importante des voies métaboliques impliquées dans la détoxification, notamment liées au stress oxydant (voie de détoxification du 4-hydroxy-2-nonenal ; détoxification via le glutathion)

(Figure 9B), et d'une voie d'ubiquitination des protéines connues pour maintenir la fidélité de la ségrégation des chromosomes (N-end rule pathway) (Kwon et al 2001).

A



B

Voie métabolique	Protéines (n)	Voie métabolique	Protéines (n)
Plus abondantes dans les gonades femelles		**Plus abondantes dans les gonades mâles**	
Arg/N-end rule pathway (eukaryotic)	12	homolactic fermentation	17
superpathway of purine nucleotides de novo biosynthesis I	7	glycolysis III (from glucose)	15
4-hydroxy-2-nonenal detoxification	4	phytol degradation	10
ATP biosynthesis	4	gluconeogenesis III	9
glutathione-mediated detoxification I	4	valproate β-oxidation	8
glutathione-mediated detoxification II	4	2-methyl-branched fatty acid β-oxidation	6
inosine-5'-phosphate biosynthesis II	4	ethanol degradation IV	6
5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis I	3	fatty acid β-oxidation I (generic)	6
dopamine degradation	2	glutaryl-CoA degradation	6
ethanol degradation II	2	glycogen degradation II	6

Figure 9. Analyse différentielle des protéines présentes dans les gonades mâle et femelle. A) *Heatmap* illustrant l'abondance relative des 149 protéines identifiées comme différentiellement exprimées (FDR<0.05). B) Voies métaboliques les plus représentées dans les ovaires et les testicules de gammare. Thèse de Natacha Koenig.

En parallèle, les testicules montrent une présence plus importante d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, notamment lié à la production d'énergie par glycolyse et beta-oxydation des acides gras (Figure 9B).

Un autre exemple d'intérêt est l'étude du métabolisme des branchies (Figure 10). Les branchies des crustacés constituent un organe multifonctionnel, elles sont le siège de nombreux processus physiologiques, comme le transport d'ions, qui est à la base de la osmorégulation, l'équilibre acide-base ou encore l'excrétion d'ammoniac. Les branchies sont également le site d'adsorption de nombreux métaux et jouent donc un rôle important dans la toxicologie de ces espèces (Henry et al 2012, Gestin et al 2022).

A

B

Voie métabolique	Protéines (n)	Voie métabolique	Protéines (n)
Moins abondantes dans les branchies		Plus abondantes dans les branchies	
retinol biosynthesis	4	aerobic respiration I (cytochrome c)	24
the visual cycle I (vertebrates)	4	TCA cycle III (animals)	21
(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-docosapentaenoate biosynthesis (6-desaturase)	3	NAD(P)/NADPH interconversion	19
arachidonate biosynthesis IV (8-detaturase, lower eukaryotes)	3	ATP biosynthesis	18
Arg/N-end rule pathway (eukaryotic)	3	valproate β-oxidation	15
docosahexaenoate biosynthesis III (6-desaturase, mammals)	3	2-methyl-branched fatty acid β-oxidation	14
retinoate biosynthesis I	3	aerobic respiration II (cytochrome c) (yeast)	14
sciadonate biosynthesis	3	fatty acid β-oxidation I (generic)	12
ultra-long-chain fatty acid biosynthesis	3	glutaryl-CoA degradation	12
very long chain fatty acid biosynthesis I	3	Arg/N-end rule pathway (eukaryotic)	11

Figure 10. Analyse différentielle des protéines présentes dans les branchies comparées aux autres organes de gammares. A) *Heatmap* illustrant l'abondance relative des 237 protéines identifiées comme différentiellement exprimées (FDR<0.05). B) Voies métaboliques les moins et les plus représentées dans les branchies de gammare. Thèse de Natacha Koenig.

Ces processus nécessitent une grande quantité d'énergie, ce qui est confirmé par nos résultats protéomiques montrant que les enzymes les plus présentes sont impliquées dans les voies du métabolisme énergétique, telles que la biosynthèse de l'ATP associée à la respiration aérobie et à l'oxydation des acides gras (Figure 10B).

Réseaux de coexpression en protéomique : apport en physiologie et écotoxicologie moléculaire.

Ces dernières années, la biologie a connu une révolution grâce à la disponibilité de séquences génomiques complètes pour un nombre croissant d'organismes. Dans les sciences environnementales, la protéogénomique permet d'obtenir des catalogues de milliers de transcrits et protéines chez des espèces sentinelles, même en absence de génomes séquencés ou annotés (voire chapitre précèdent). Ces ressources ont également stimulé le développement de technologies permettant l'analyse des transcriptions de gènes, des abondances des protéines et des métabolites dans un type de cellule donné et dans un ensemble de conditions données.

Les approches basées sur la reconstruction des réseaux moléculaires constituent un excellent cadre méthodologique issu de la biologie des systèmes pour étudier et intégrer la richesse des informations contenues dans les données -omiques (Zhang & Horvath, 2005, Langfelder & Horvath 2008). Parmi ces approches, l'analyse de réseau de coexpression génique pondérée (WGCNA) est une méthode conçue à l'origine pour décrire les relations de corrélation entre les gènes dont l'expression est mesurée par puces à ADN (Langfelder & Horvath 2008) ou par RNA-Seq (Degli Esposti et al 2016, Iancu et al 2012). WGCNA permet de mesurer la corrélation entre des clusters de gènes fortement corrélés (appelés modules) et des conditions externes (*ex.* exposition) ou traits biologiques (*ex.* stade de développement). L'un des principaux avantages de ce modèle statistique est d'être *data-driven* (basé sur les données), donc sans nécessité de connaissances externes ou *a priori*. Il représente ainsi une grande opportunité pour l'étude des organismes « non-modèles » pour lesquels les annotations de gènes et de protéines ou de leurs voies fonctionnelles ne sont pas encore clairement identifiées.

L'analyse de réseaux de coexpression génique de données transcriptomiques a fourni des informations utiles pour comprendre des processus biologiques fondamentaux chez de nombreuses espèces d'arthropodes. WGCNA a fourni la preuve chez 16 espèces de fourmis que des voies impliquées dans la différenciation phénotypique entre fourmis reines et ouvrières sont

conservées au cours de l'évolution de ces espèces (Morandin et al 2016). En outre, une analyse de réseau a mis en évidence le rôle des gènes du métabolisme et de la signalisation cellulaire (par exemple la réponse au stress oxydant ou la morphogenèse) dans la réponse à différents types de stress (prédation, parasites, contaminants toxiques) chez le crustacé modèle *Daphnia magna*, alors qu'une analyse d'expression différentielle n'avait pas permis de révéler de réponses biologiques significatives sur ces mêmes jeux de données (Orsini et al 2018). Les données de protéomique ont par contre été peu explorées à l'aide de WGCNA à ce jour, malgré l'intérêt biologique d'explorer un niveau moléculaire plus proche du phénotype, comme la protéomique, et la possibilité d'appliquer cette approche en se basant sur la métrique de comptage spectral largement utilisée en protéomique shotgun comme proxy de l'abondance des protéines (Pei et al 2017).

Dans ce document, je vais illustrer cette démarche et présenter l'intérêt d'utiliser l'analyse de réseau de coexpression des protéines pour améliorer les connaissances sur les voies moléculaires impliquées dans la reproduction des gammares (Degli Esposti et al 2019) et dans la réponse des gonades à différents contaminants chez le mâle, dont certains ont un effet sur la production de spermatozoïdes (Trapp et al 2015, Koenig et al 2021).

Dans ce cadre, une première étude a utilisé une approche de méta-analyse sur un ensemble de données protéomiques que le laboratoire avait déjà acquises sur les gonades mâle, femelle et les embryons à différents stades de maturation ou de développement. L'objectif a été de valider la capacité du modèle de réseau de coexpression à décrire et identifier des modules protéiques impliqués dans la régulation de la maturation des cellules germinales et le développement embryonnaire. Les résultats obtenus ont permis de valider l'utilisation de WGCNA sur des données protéomiques shotgun issues d'organes de *Gammarus fossarum*. A titre d'exemple, parmi les quatre modules de protéines identifiés (Figure 11) nous avons identifié un module corrélé aux ovaires en pleine vitellogenèse, qui était constitué de 74

protéines, dont la moitié homologues aux protéines de la famille des transporteurs de lipides (Large Lipid Transfer Proteins), connues pour faire partie des protéines de l'œuf chez les crustacés (ex. protéines annotées comme vitellogénines ou autres lipoprotéines).

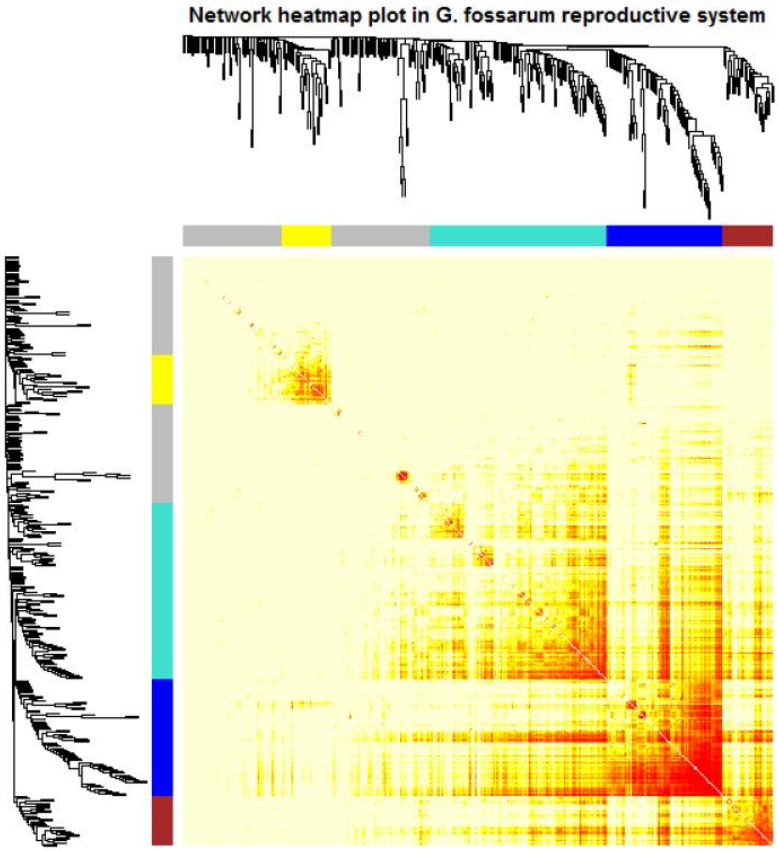


Figure 11. La *heatmap* montre les valeurs de la matrice de superposition topologique (TOM) entre les protéines du réseau délimité en modules par une méthode de *clustering* dynamique. La couleur jaune clair représente un faible superposition (c'est-à-dire une faible interconnexion), tandis que la couleur rouge foncé représente une forte superposition (c'est-à-dire une forte interconnexion).

Ces résultats ont confirmé la capacité de l'analyse de réseaux de coexpression à identifier des groupes de protéines ayant une signification biologique et physiologique chez *Gammarus fossarum* (Degli Esposti et al 2019). De façon intéressante, environ un tiers des protéines de ce module étaient des homologues de protéines identifiées chez un autre amphipode, *Hyalella atzeca*, dont la fonction n'est pas encore caractérisée. Cela indique que ce type d'analyse peut

aussi permettre d'améliorer la caractérisation de protéines dont les fonctions biologiques restent non annotées. Nous avons aussi mis en évidence deux modules de protéines corrélés aux testicules ayant un profil fonctionnel distinct. Un module était caractérisé par un enrichissement de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et l'autre par un enrichissement de protéines impliquées dans la morphogenèse des spermatozoïdes. L'analyse a aussi permis d'identifier des variations temporelles opposées des profils d'expression des deux modules. Cette observation suggère que ces voies moléculaires interagissent de manière coordonnée au cours de la spermatogenèse chez *G. fossarum* (Degli Esposti et al 2019).

Grace à ces premiers résultats, nous avons utilisé cette même approche au cours de la thèse de Natacha Koenig pour identifier des signatures spécifiques d'exposition à des contaminants et éventuellement pouvoir renseigner leur mode d'action. Pour ceci, nous avons utilisé un jeu de données protéomiques, déjà publié par l'équipe, sur des gonades prélevées chez des gammares mâles exposés à trois contaminants en conditions de laboratoire (le cadmium et deux insecticides perturbateurs de croissance, un agoniste du récepteur à l'ecdysone – le methoxyfenozide, et un analogue de l'hormone juvénile – le pyriproxyfen) (Trapp et al 2015). Au cours de cette étude, une diminution de la production de spermatozoïdes avait été observée suite à l'exposition au pyriproxyfen et au cadmium. Une première analyse de protéomique comparative n'avait pas permis d'identifier de différences significatives entre les protéines modulées par les trois contaminants, limitant la compréhension de leur mode d'action respectifs (Trapp et al 2015). Nous avons émis l'hypothèse qu'une analyse de réseaux de coexpression pourrait améliorer l'interprétation biologique de ces données protéomiques lorsque les changements d'abondances des protéines individuelles étaient trop faibles pour être détectées, soit en raison d'une puissance statistique limitée par l'effort expérimental pouvant être mis en place (par exemple, trop peu de réplicats biologiques ou faible effet de taille). Nous avons mis en évidence des modules spécifiquement associés aux différentes expositions et proposé des

hypothèses concernant les différents modes d'action du cadmium et du pyriproxyfen (Figure 12).

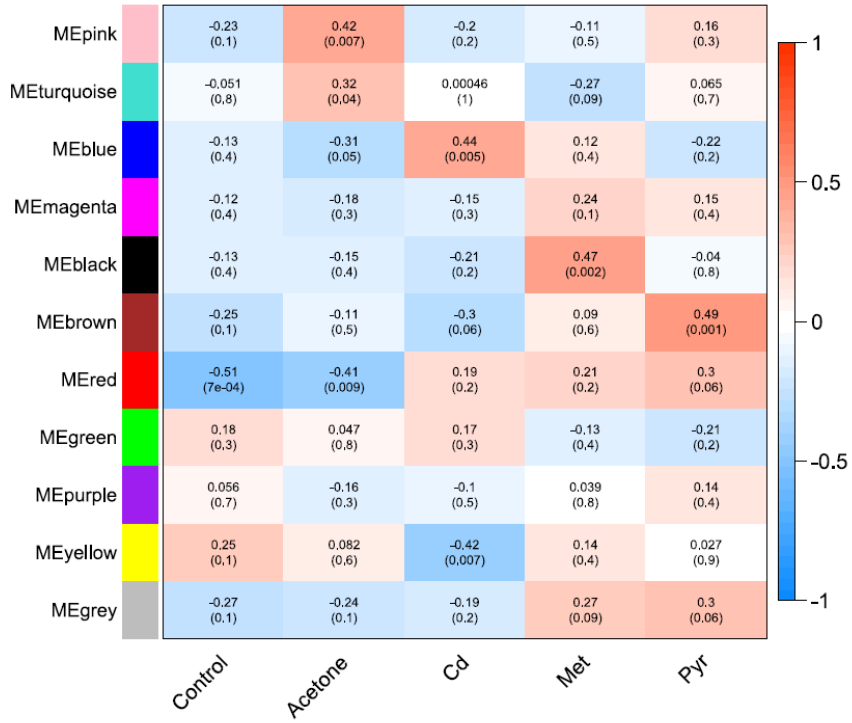


Figure 12. Associations entre les modules et les expositions chimiques. (A) La *heatmap* des relations entre les modules et les conditions d'exposition. Les vecteurs *eigenproteins* propres de module (ME) (étiquetées par couleur), qui représentent le profil d'expression protéique de chaque module, sont en lignes, et les conditions d'exposition sont en colonnes. Le gradient représente la force de la corrélation entre la protéine propre du module et la condition d'exposition (témoins ou contaminants) avec le coefficient de corrélation de Pearson (ρ) et la valeur p associée entre parenthèses. Dans la *heatmap*, la couleur rouge représente les corrélations positives (ρ >0), tandis que le bleu représente la corrélation négative (ρ <0).

A titre d'exemple, nous avons identifié un module (brun) positivement corrélé à l'exposition au pyriproxyfen. Ce module était enrichi de protéines impliquées dans la réponse aux stress du réticulum endoplasmique, avec notamment trois protéines appartenant à la famille des protéines chaperonnes, la calréticuline et les heat shock proteins 70 et 90, ayant un rôle central dans le module (protéines hub) (Figure 13).

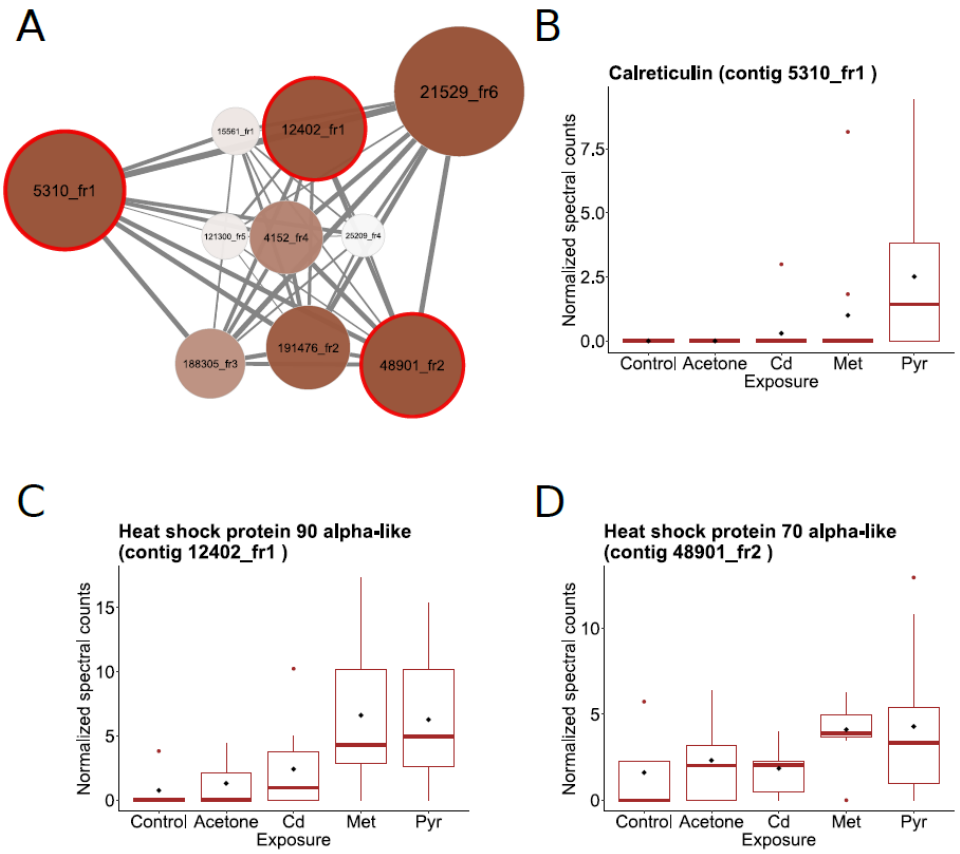


Figure 13. Interactions entre les protéines du réseau dans le module corrélé à l'exposition au Pyr. (A) Visualisation des protéines du module brun, positivement associées à l'exposition au Pyr. Pour chaque module, la taille du nœud et l'intensité de la couleur du nœud sont proportionnelles à la connectivité intra-modulaire. La largeur des bords représente la force de corrélation entre deux protéines (valeur TOM). Les cercles rouges indiquent la protéine hub appartenant au terme GO le plus enrichi dans le module. Les cercles rouges indiquent les protéines centrales les plus importantes dans les termes GO de liaison des protéines non repliées et de repliement des protéines. (B) Niveaux d'abondance de la calréticuline (contig 5310_fr1). (C) Niveaux d'abondance de la protéine de choc thermique 90 alpha-like (contig 12402_fr1). (D) Niveaux d'abondance de la protéine de choc thermique 70 (contig 48901_fr1). La moyenne de chaque box plot est représentée par le losange noir. La comparaison de l'abondance des protéines a été effectuée par ANOVA et le test de Tukey. Aucune des trois protéines présente une abondance significativement différente ($p<0,05$) entre les différentes conditions.

Une toxicité testiculaire induite par un stress du réticulum endoplasmique a été aussi récemment mise en évidence chez d'autres espèces, notamment chez de vertébrés (Li et al 2020, Ham et al 2020). Cela suggère que l'activité du réticulum endoplasmique pendant la maturation des cellules germinales mâles peut représenter une cible conservée chez les métazoaires vis-à-vis des contaminants. En ce qui concerne l'exposition au cadmium, notre analyse de réseau de

coexpression a montré qu'elle était corrélée à une diminution de la réponse au stress oxydant et à une induction des protéines impliquées dans la morphogenèse des spermatozoïdes (Figure 14).

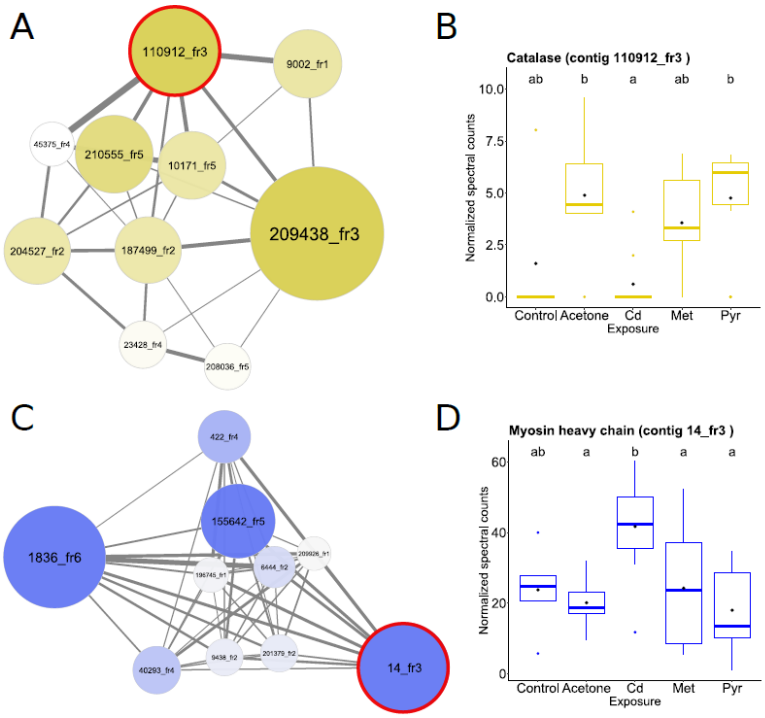


Figure 14. Interactions entre les protéines du réseau dans les modules corrélés à l'exposition au Cd. Pour chaque module, la taille des nœuds et l'intensité de la couleur des nœuds sont proportionnelles à la connectivité intra-modulaire. La largeur des bords représente la force de corrélation entre deux protéines (valeur TOM). Les cercles rouges indiquent la protéine centrale appartenant au terme GO le plus enrichi dans le module. Dans les boxplots, la moyenne de chaque box plot est représentée par le losange noir. La comparaison des abondances des protéines a été effectuée par ANOVA et le test de Tukey. Si deux conditions n'ont pas de lettre en commun, l'abondance des protéines est significativement différente ($p<0,05$). (A) Visualisation des protéines du module jaune, négativement associées à l'exposition au Cd. (B). (B) Niveaux d'abondance de la catalase (contig 110912_fr3) en fonction de l'exposition. (C) Visualisation des protéines du module bleu, positivement associées à l'exposition au Cd. (D) Niveaux d'abondance des protéines de la chaîne lourde de la myosine (contig 14_fr3) en fonction de l'exposition.

On peut noter que le Cd induit des anomalies structurelles des spermatozoïdes chez d'autres arthropodes, comme le lépidoptère *Bombyx mori* et le coléoptère *Blaps polycresta* (Yuan et al 2016, Shonouda et Osman 2018). Il est aussi intéressant de noter que la catalase (une protéine centrale appartenant au module de réponse au stress oxydant) est fortement connectée à deux

tubulines, des protéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes, ainsi qu'aux protéines de myosine et d'actine qui sont enrichies dans l'autre module protéique associé à l'exposition au Cd. Ainsi, nos résultats ouvrent l'hypothèse d'un dialogue croisé entre les acteurs moléculaires impliqués dans la morphologie des spermatozoïdes et la régulation du stress oxydant et que le Cd pourrait affecter ces deux processus. Enfin, de façon similaire à la première étude sur le système reproductif du gammare, nous avons retrouvé un module corrélé à l'exposition au methoxyfenozide, et caractérisé par des protéines homologues de *Hyalella azteca* et de fonction inconnue, renforçant l'observation qu'un nombre important des protéines associées à des processus physiologiques et cellulaire bien définis (vitellogenèse, réponse à un agoniste d'un récepteur nucléaire) sont probablement spécifiques à l'ordre des amphipodes et qu'il est donc nécessaire d'intégrer la diversité des espèces pour pouvoir mieux prédire les effets des contaminants sur l'ensemble des organismes, en particulier aquatiques. L'ensemble de ces résultats montre la pertinence de l'utilisation de l'analyse de réseau de coexpression chez un organisme sentinelle pour identifier des voies métaboliques ou de signalisation impliquées dans des processus physiologiques clé et mieux comprendre les effets des contaminants au niveau moléculaire. De plus, cette approche a permis l'identification de protéines non annotées dont les fonctions biologiques peuvent être mises en corrélation avec les protéines connues du même module, ouvrant ainsi la voie à une amélioration de leur annotation.

L’écotoxicoprotéomique : du laboratoire au terrain.

Des milliers de polluants sont régulièrement rejetés en cocktail dans les milieux aquatiques, menaçant la santé de la faune et de l'homme (Schwarzenbach et al 2006). L'importance des services écosystémiques (biodiversité, eau potable, loisirs) fournis par les masses d'eau naturelles a conduit à l'élaboration d'un cadre législatif (notamment la directive cadre de l’eau au niveau européen) qui oblige les États à atteindre un bon état chimique et écologique de leurs écosystèmes d'eau douce (Hödl et al 2018), via notamment le respect de leur conformité vis-à-vis de normes de qualité environnementale (NQE). Certaines de ces normes sont notamment fixées comme des seuils de concentrations de contaminants à ne pas dépasser dans les organismes aquatiques. Dans ce cadre, des campagnes de biosurveillance ont été mises en place pour mesurer les concentrations en contaminants accumulées dans le biote, ce qui permet d’évaluer la qualité des milieux aquatiques. La surveillance dans le biote peut être définie comme passive, basée sur l'échantillonnage d’organismes résidents, ou comme active, basée sur la transplantation d'organismes calibrés (par taille, sexe, état physiologique, etc.) provenant d'une population source unique. La biosurveillance active présente des avantages importants : i) limite la variabilité biologique et, ii) permet le contrôle du temps d'exposition (Bervoets et al 2005). Le crustacé *Gammarus fossarum* est apparu comme une espèce sentinelle pertinente dans les campagnes de biosurveillance active pour suivre la pollution des écosystèmes d'eau douce. En effet, il bioaccumule différents polluants de manière dépendante de la dose et du temps (Besse et al 2013, Ciliberti et al 2017, Alric et al 2019). La biosurveillance active est aujourd’hui une procédure bien maîtrisée et normalisée (AFNOR XP T90-721) dans le cadre du suivi chimique des masses d’eau, et il fait partie des outils opérationnels déployés par les Agences de l'Eau françaises (Geffard et al 2021).

Les gammares étant sensibles aux contaminants, ceci a conduit en parallèle des mesures de bioaccumulation réalisées par encagement, au développement de mesures de biomarqueurs

écotoxicologiques dans ce cadre de biosurveillance active: des tests d'alimentation et de reproduction ont été développés et utilisés pour évaluer l'impact biologique des pollutions environnementales (Coulaud et al 2011, Lopes et al 2020 ; Chaumot et al 2021 ; Sarkis et al 2023). Il est à noter que les NQE ne sont disponibles que pour un nombre limité de produits chimiques, ce qui fait que ces démarches d'évaluation ne tiennent pas compte de la totalité des contaminants ainsi que de leurs effets cocktail sur le vivant (Milinkovitch et al 2019). L'utilisation d'outils biologiques est donc une alternative prometteuse qui permet d'intégrer l'effet des mélanges de contaminants chimiques dans les milieux aquatiques (Wernersson et al 2015).

Au cours des dernières décennies, des efforts considérables ont été déployés pour identifier des biomarqueurs d'exposition et d'effets des contaminants (Adams 2001, Butcherine et al 2022). La plupart des biomarqueurs développés sur des espèces sentinelles invertébrés correspondent à une transposition de biomarqueurs validés sur des espèces modèles vertébrés, ce qui limite la prise en compte de la diversité biologique des écosystèmes, comme l'a souligné la revue de Trapp et al (2014). Par exemple, la mesure de certaines activités enzymatiques (e.g. la catalase, l'acétylcholinestérase) peut montrer une sensibilité différente aux substrats et aux inhibiteurs selon les espèces. De la même manière, la phase de développement des biomarqueurs est généralement réalisée par des investigations en laboratoire, en se basant sur un seul composé chimique et souvent testé à des concentrations élevées par rapport à celles rencontrées dans l'environnement (Aguirre-Martinez et al 2016). Si les expériences en laboratoire ont un rôle clé dans la découverte des biomarqueurs moléculaires, cette approche ne tient toutefois pas compte de la complexité de l'environnement, comme les cocktails complexes de polluants et leurs faibles niveaux de contamination. À cette fin, les études de terrain à large échelle représentent une alternative prometteuse pour développer des biomarqueurs qui intègrent cette complexité environnementale. Aussi la biosurveillance active fournit un cadre

intéressant pour le développement d'outils analytiques capables d'explorer et de comparer correctement les modulations biologiques au niveau moléculaire dans des échantillons collectés sur différents sites et à différentes dates (Catteau et al 2022, Leprêtre et al 2022a).

Dans le cadre de la collaboration avec l'Institut de Science Analytique de l'université de Lyon 1 (Prof. Arnaud Salvador et Dr Sophie Ayciriex), nous avons récemment montré la pertinence et l'originalité de coupler une stratégie de biomonitoring actif et l'utilisation d'une approche protéomique ciblée hautement multiplexée (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par Multiple Reaction Monitoring, MRM) pour identifier des protéines dont l'expression est modulée par différentes conditions environnementales (Faugère et al 2020, Leprêtre et al 2022b). La protéomique ciblée permet en effet de mesurer de façon sensible, quantitative et répétable un sous-ensemble des peptides identifiés par la spectrométrie shotgun, dont l'objectif est être le plus exhaustive possible. Dans une première étude, nous avons montré la possibilité de mettre au point une approche MRM pour la quantification d'un grand nombre de protéines (de l'ordre de la centaine) chez l'espèce sentinelle *G. fossarum*. Nous avons en particulier montré l'intérêt d'utiliser des méthodes statistiques descriptives multivariées (méthodes de *clustering* et analyse en composantes principales) et des approches semi-quantitatives pour une analyse comparative de ces données protéomiques dans le cadre d'une étude de biomonitoring actif d'un bassin versant à risque de contamination par les pesticides dans un contexte de pression agricole (vigne, maïs, blé). En particulier, nous avons développé une méthode pour cibler 277 peptides rapporteurs de 157 protéines précédemment identifiées par protéomique shotgun (Trapp et al 2014) en une seule analyse. Ensuite, nous avons analysé le protéome de sept gammares mâles de taille uniforme et encagés dans trois sites situés dans le bassin versant de la rivière Madeleine (sites « contaminés ») et dans un site en bon état écologique et chimique (site « témoin ») à moins de 10 km du bassin versant (Figure 15) (Faugère et al 2020).

Les analyses de protéomique comparative ont d'abord montré une tendance des organismes encagés dans le site « témoin » à avoir un protéome diffèrent par rapport à ceux encagés dans les sites « contaminés », malgré une certaine variabilité interindividuelle (Figure 16A, 16B).

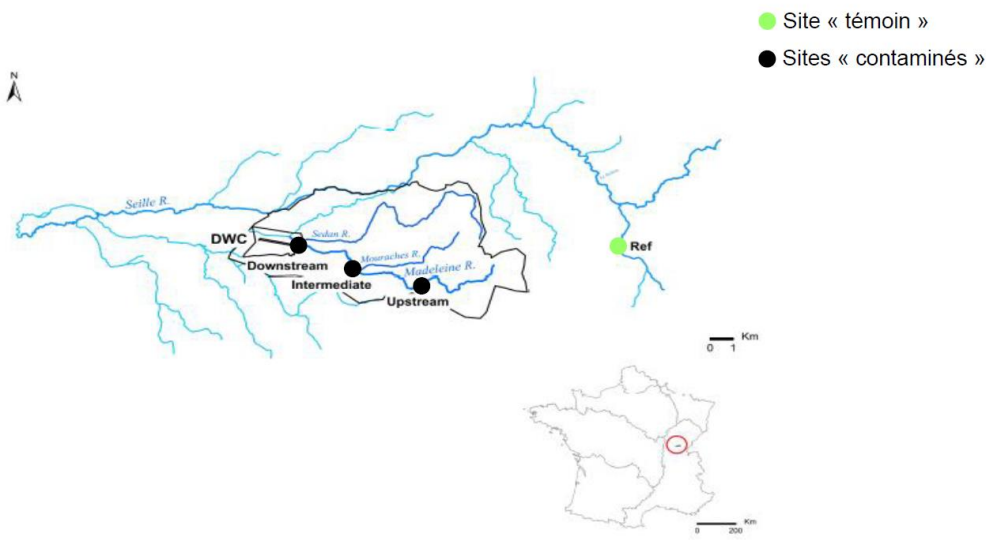


Figure 15. Distribution des sites d'encagement sur le bassin versant de la rivière Madeleine. En vert le site utilisé comme référence et en noir les 3 sites sous pression agricole avant le point de captage d'eau potable (DWC).

L'analyse différentielle de l'abondance des peptides a été effectuée à l'aide d'un modèle linéaire implémenté dans le package R *limma* (Kammers et al 2015, Smyth et al 2004) et en considérant comme significativement différents les peptides avec une p-value ajustée pour comparaisons multiples (méthode de Benjamini-Hochberg) inférieure à 0,1 (FDR<0,1). Cette analyse a permis d'identifier dix peptides différant entre les organismes exposés aux sites contaminés et les organismes encagés dans le site témoin (Figure 16C). Le peptide DIDAAFLVGAMPR, rapporteur d'une protéine annotée comme étant la malate déshydrogénase cytosolique ou enzyme malique (ME), a été plus abondant dans les organismes exposés dans les sites contaminés (logFC = 1,38, FDR = 0,038) (Figure 16D). De façon intéressante, il est connu que l'activité de la ME chez la drosophile peut être induite par l'hormone juvénile (JH), à la fois par un effet direct sur l'enzyme à court terme et par l'activation

de la transcription de son gène (Men) (Farkas et al 2002). Étant donné que les analogues de la JH sont parmi les insecticides les plus utilisés en agriculture, l'augmentation de l'expression d'un homologue de la ME chez *G. fossarum* pourrait suggérer une réponse de ces organismes non-cibles à la contamination par les analogues de JH dans les sites observés.

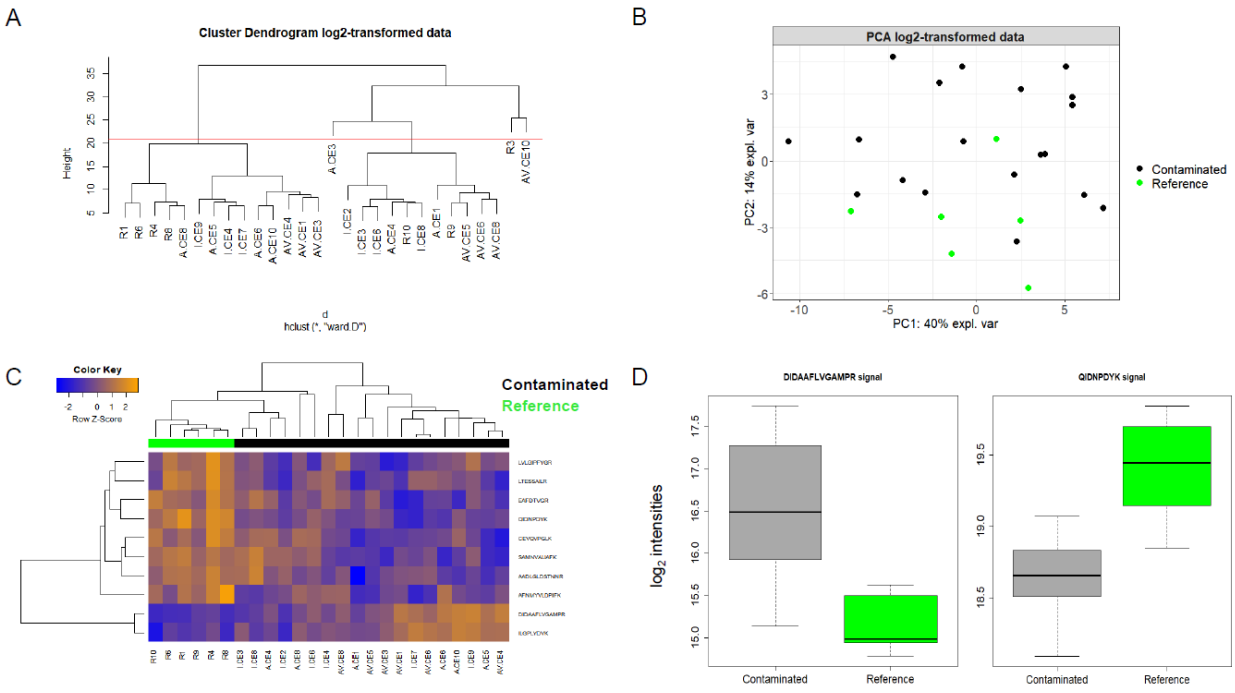


Figure 16. Analyse protéomique comparative utilisant la biosurveillance active dans un bassin versant agricole. Les analyses ont été réalisées en utilisant les aires de pic chromatographiques transformées en log2 pour chaque peptide identifié dans les organismes encagés. (A) Regroupement hiérarchique. Les échantillons situés au-dessus de la ligne rouge présentent une distance plus élevée par rapport au reste des organismes, ils ont donc été exclus des ensembles de données. (B) Analyse en composantes principales. Les échantillons mis en cage dans le site de référence (vert) ont tendance à se regrouper. (C) *Heatmap* des protéines différentiellement exprimées chez les gammares mâles mis en cage pendant trois semaines dans un site de référence (R) et dans trois sites soumis à la pression agricole (A, I, Av). Les couleurs représentent l'abondance relative : bleu moins abondant, orange plus abondant. (D) Boxplot représentant l'expression différentielle des peptides les plus déréglés (DIDAAFLVGAMPR rapporteur d'un homologue de l'enzyme malique; QIDNPDYK : rapporteur d'un homologue de la calreticulin).

Parmi les peptides régulés à la baisse dans les organismes encagés sur le site contaminé, nous avons trouvé 2 peptides appartenant à un homologue de l'endochitinase (EAFDTVGR : logFC = -0.61, FDR = 0.059 ; LVLGIPFYGR : logFC = -0,55, FDR = 0,072) et 2 peptides appartenant à une protéine annotée comme endoglucanase (ou cellulase A).

(SAMNVALIAFK : logFC = -0,76, FDR = 0,063 ; AADLGLDSTNNR : logFC = -1,28, FDR = 0.06). Les chitinases sont des enzymes clés pour la réussite du cycle de mue chez les arthropodes (Muthukrishnan et al 2019). Nous avons précédemment observé une telle diminution chez *G. fossarum* exposé sur des sites contaminés (Gouveia et al 2017). D'autres chitinases de crustacés (*Daphnia magna*, *Palaemon serratus*) ont été signalées comme des biomarqueurs sensibles aux insecticides et aux pesticides. (Rollin et al 2021, Wang et al 2023). Les cellulases sont quant à elles essentielles à la digestion chez *G. fossarum,* la diminution de leur activité et/ou leur abondance peut affecter la capacité de reproduction de l'organisme (Moshtaghi et al 2017). De plus, elles ont été signalées comme étant très sensibles aux insecticides et aux fongicides (Moshtaghi et al 2017). Globalement, ces résultats démontrent la pertinence d'une approche multi-biomarqueurs protéiques chez *G. fossarum* pour détecter une réponse biologique à une pression de contamination d'origine agricole. Le nombre limité de peptides modulés sur les sites contaminés pourrait suggérer une certaine spécificité de l'impact des substances chimiques présentes dans l'environnement aquatique auxquelles les gammares ont été exposés. Cependant, il sera crucial d'étendre la recherche à d'autres sites.

A la suite de cette étude et au cours du post-doctorat de Maxime Leprêtre, nous avons tout récemment montré la pertinence et l'originalité de coupler une stratégie de biomonitoring actif à large échelle et l'utilisation d'une approche protéomique ciblée hautement multiplexée (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par Multiple Reaction Monitoring, MRM) pour identifier des protéines dont l'expression est modulée par différentes conditions environnementales. Nous avons suivi 249 peptides rapporteurs de 147 protéines chez 273 gammare mâles encagés sur 56 sites (4-5 réplicats biologiques par site) du réseau national de surveillance, représentant ainsi la diversité des pressions rencontrées dans les milieux aquatiques du territoire français (Figure 17).

A partir des nombreuses données protéomiques obtenues, nous avons dans un premier temps proposer une méthodologie pour identifier des peptides normalisateur, typiquement indiqués en littérature comme peptides endogène stablement exprimé ou *house keeping peptides* (HKP) (Leprêtre et al 2022b). En effet, les peptides ciblés par MRM sont généralement quantifiés à travers l'utilisation de standards internes marqués par des isotopes lourds et introduits dans les échantillons avant l'analyse HPLC-MSMS. Les capacités de multiplexage des spectromètres de masse de type triple quadrupole permettent aujourd'hui de suivre plusieurs centaines de peptides par échantillon, ce qui rend les méthodes MRM intéressantes pour effectuer le criblage de peptides pour identifier de potentiels biomarqueurs d'exposition et d'effets.

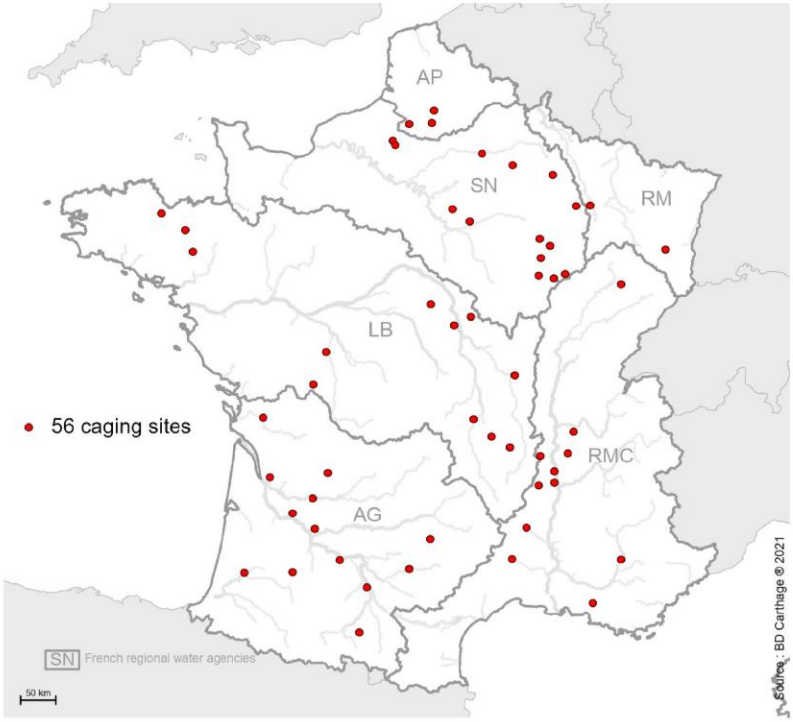


Figure 17. Distribution des sites d'encagement sur le territoire français. Les points rouges représentent les sites d'encagement de gammares (7 jours). Les limites géographiques sur la carte représentent les limites des six agences régionales de l'eau françaises: Adour Garonne (AG), Artois-Picardie (AP), Loire-Bretagne (LB), Seine-Normandie (SN), Rhin-Meuse (RM), Rhône Méditerranée-Corse (RMC).

Dans ce contexte, l'utilisation de centaines de standards internes n'est pas envisageable, car seule une partie des peptides criblés sera d'intérêt biologique et cela représenterait un coût d'analyse très élevé. C'est pourquoi nous nous sommes d'abord intéressés à mettre en place une méthode de normalisation des données par l'utilisation de HKP afin de pouvoir comparer les niveaux de peptides mesurés dans les différents échantillons et ce sur des dizaines de sites. Pour cela, nous avons identifié et sélectionné comme HKP les peptides les moins variables et les plus corrélés entre eux (ρ>0.9) (Vandesompele et al 2002), après avoir normalisé les données d'intensité de signal par différentes méthodes (normalisation par quantile et par la médiane) (Choi et al 2014). Parmi les HKP identifiés, nous avons retrouvé des peptides appartenant à des protéines structurales, telles que l'alpha-actinine ou l'alpha tubuline, ou des protéines mitochondriales, telles que la citrate synthase ou un transporteur de phosphate (Leprêtre et al 2022b), déjà identifié comme protéines ou gènes normalisateurs chez d'autres espèces d'arthropodes (Lu et al 2013, Li et al 2019). Suite à l'identification des HKP, nous avons comparé l'abondance des peptides identifiés par MRM (ratio signal sur bruit supérieur à 5) sur au moins 80% des sites (student t-test, False Discovery Rate inférieur à 0,05) et avons calculé un facteur d'induction (IF) pour chaque peptide sur chaque site en prenant en compte sa valeur médiane globale (med_{pep}) et la valeur médiane de chaque site (med_s) et sa distribution globale (premier et troisième quartiles, Q_{1pep} et Q_{3pep}) via la formule suivante :

$$IF_{pep/s} = (med_{pep/s}\text{-}med_{pep})/ Q_{3pep}\text{-}Q_{1pep}$$

Cette approche a permis d'identifier 40 peptides dont l'abondance étaient significativement différente au moins entre deux sites ((FDR<0,05; IF>2) (Figure 18).

Cette étude montre qu'il est aujourd'hui possible de proposer des approches -omiques pour la découverte de biomarqueurs moléculaires qui intègrent directement la complexité des milieux aquatiques, ce qui peut permettre de surmonter les difficultés de transfert des biomarqueurs identifiés via les approches traditionnelles de laboratoire.

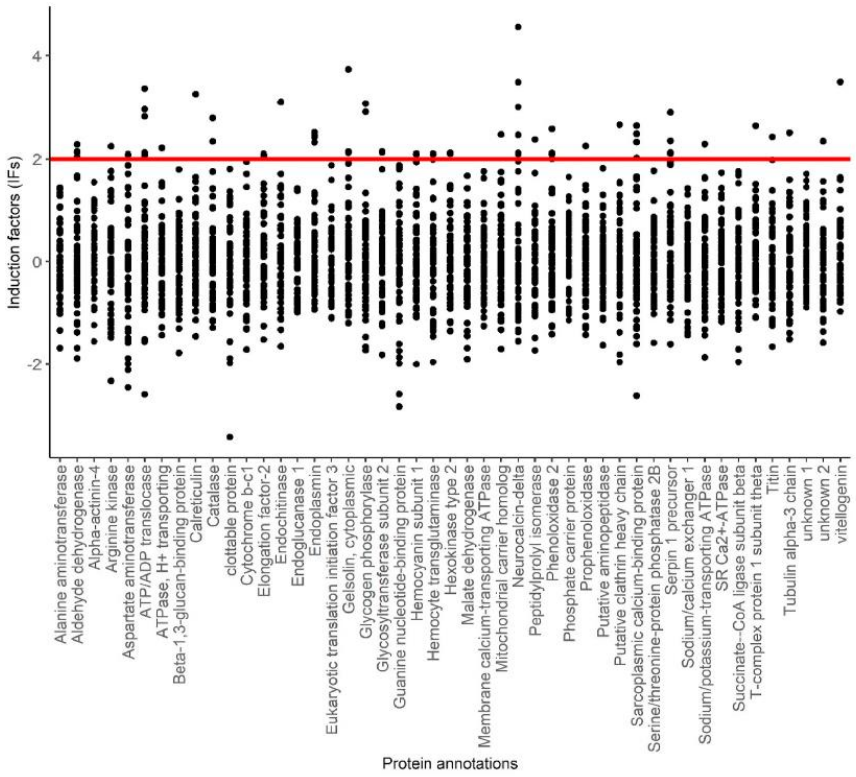


Figure 18. Facteurs d'induction (IF) des peptides les plus induits pour les protéines indiquées en abscisse. Chaque point correspond à l'un des 56 sites étudiés. Seules les protéines qui ont satisfait les critères statistiques (FDR<0,05) sont présentées. La ligne rouge indique un seuil d'IF égal à 2.

Dans la partie suivante de ce manuscrit, je détaillerai les approches méthodologiques mises en place pour identifier des biomarqueurs protéiques qui pourront être utilisés comme indicateurs d'effets écotoxicologiques liés à des conditions des contaminations représentatives des milieux aquatiques.

III. PERSPECTIVES

Génome de l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*

Les connaissances moléculaires issues des projets de séquençage de génomes du début du siècle (le génome de *Drosophila melanogaster* a été publié en 2000, le premier génome de référence humain en 2004) (Adams et al 2000, Nurk et al 2022) ont favorisé l'émergence de nouvelles stratégies en toxicologie, connues sous le nom de toxicogénomique, visant à aborder l'ampleur et la diversité des effets subcellulaires provoqués par les contaminants (Schmidt 2002). L'utilisation d'approches comme la transcriptomique et la protéomique permet l'identification d'empreintes moléculaires qui indiquent une exposition à la contamination chimique dans l'environnement (Veldhoen et al 2012, Beale et al 2022). Ces empreintes peuvent en même temps nous informer sur les voies biochimiques impliquées dans la réponse et les mécanismes d'action des contaminants, nous orientant vers une meilleure compréhension des effets toxiques et leur prédiction. Dans ce sens, l'élaboration de modèles dits *Adverse Outcome Pathways* relient de façon cause-effet les événements dits "clés" depuis les perturbations moléculaires jusqu'aux effets aux niveaux individuel (par exemple reprotoxicité, survie) et écologique (comme le déclin des population) Villeneuve et Garcia-Reyero 2011). En écotoxicologie, ces stratégies se basent sur la connaissance des génomes d'organismes modèles, tels que le poisson medaka (*Oryzias latipes)* et le poisson zèbre (Kasahara et al 2007, Howe et al 2013) ou les crustacés *Daphnia pulex* (Colbourne et al 2011) et plus récemment l'amphipode *Hyalella atzeca* (Poynton et al 2018). Toutefois, le génome des espèces couramment utilisées comme sentinelles de l'environnement ne sont pour la plupart pas encore disponibles.

Si, comme démontré par nos travaux chez le gammare, des approches alternatives (RNA-seq, protéogénomique) existent pour l'acquisition de connaissances en physiologie moléculaire, elles se confrontent à plusieurs verrous, tels que l'identification des séquences complètes des gènes codant et non codant, une quantification précise du nombre de gènes des organismes,

l'annotation des protéines ou encore le développement d'approches en génomique fonctionnelle. En outre, les approches de génomique comparative peuvent permettre l'identification de voies toxicologiques conservées au cours de l'évolution et les sites cibles permettant de prédire les effets néfastes entre les espèces (Perkins et al 2013).

Malgré l'importance des crustacés en écotoxicologie, ce groupe taxonomique reste largement moins représenté que celui des hexapodes (insectes) en terme de nombre d'espèces d'arthropodes pour lesquelles un génome annoté est disponible (*ex.* 16 espèces de crustacés par rapport à 259 espèces d'hexapodes présent dans la base de données OrthoDB qui permet l'annotation des orthologues parmi la plus large diversité d'organismes, Kuznetsov et al 2022). Pour rendre accessible les génomes chez toutes les espèces, de nombreux verrous restent à lever. Ils sont liés à la fois aux limites des techniques moléculaires (extraction d'ADN de haut poids moléculaire, customisation des approches de préparation de librairie et séquençage en aval), et des analyses bioinformatiques nécessaires à la gestion des nombreuses données générées, comme l'assemblage et l'annotation des génomes. Si aujourd'hui, une partie de ces verrous est levée par de nouvelles technologies de séquençage de type *long reads*, de cartographie de génome et par de nouveaux *pipelines* bioinformatiques, ces approches restent applicables en routine pour des génomes de taille inférieure à 2 Gb (Lewin et al 2022). Chez les crustacés amphipodes, la taille des génomes varient de 0.55 Gb (*Hyalella atzeca*, Poynton et al 2018) jusqu'à 16Gb (*Sluginella kieltinskii*, Jeffery et al 2017). Dans le cas des espèces d'amphipodes européens utilisées en écotoxicologie, comme les gammaridés *Gammarus fossarum* ou *Gammarus pulex*, j'ai réalisé des analyses en cytométrie en flux qui ont indiquées que la taille estimée de leurs génomes est d'environ 6 Gb, presque le double du génome humain (Figure 19).

L'essor des approches à haut débit de longues lectures (comme le séquençage par nanopore développé par Oxford Nanopore Technology, ou le séquençage en temps réel de molécules

uniques proposé par Pacific Biosciences) représente une des avancées majeures dans le séquençage des acides nucléiques ces dix dernières années (Marx 2023).

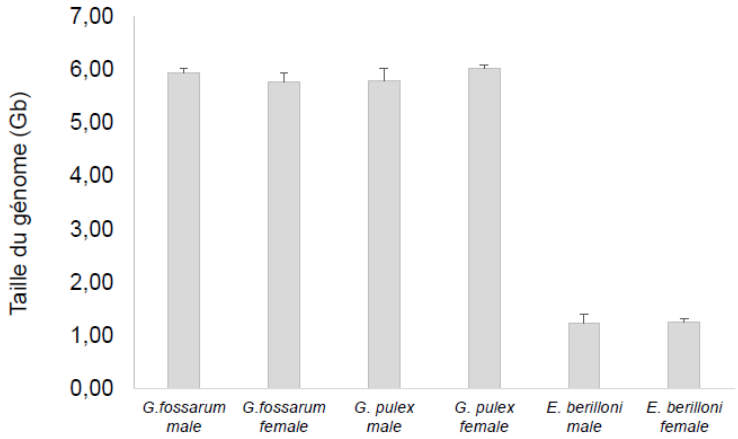


Figure 19. Estimation par cytométrie en flux de la taille du génome de différentes espèces de gammaridés du genre *Gammarus* (*G.*) et *Echinogammarus* (*E.*) en fonction du sexe.

Il est aujourd'hui possible d'envisager l'acquisition de génomes d'espèces représentatives de tout l'arbre phylogénétique, avec notamment la possibilité d'investiguer des génomes de grande taille, comme celui de *G. fossarum*. Dans ce cadre, j'ai initié une collaboration avec la plateforme de biologie moléculaire DTAMB de la Fédération de Recherche BioEEnviS (Université de Lyon) pour la mise au point du séquençage nanopore chez l'espèce *Gammarus fossarum.* Aujourd'hui, il a été possible d'identifier une méthodologie pour extraire une quantité suffisante d'ADN de haut poids moléculaire à partir d'un seul organisme (Figure 20). Cela est un point essentiel, car la construction de librairies à partir d'un seul individu permet de faciliter l'assemblage du génome et l'analyse des haplotypes en cas d'une forte hétérozygotie, souvent rencontrée chez des organismes qui ne sont pas issus d'une population consanguine (Kao et al 2016, Zhang et al 2022, Guiglielmoni et al 2021).

Une acquisition de données a ensuite été faite par séquençage nanopore sur une flowcell MinION pour deux échantillons. Le séquençage de ces deux échantillons a permis l'acquisition

de 6,7 et 23,63 Gb (correspondant environ à une couverture 1X-3,6X du génome pour les échantillons représentés en Figure 20A et 20B respectivement) avec 0,5-18 millions de lectures et un N50 respectivement de 25 et 1,7 kb (ce qui signifie que la moitié de la séquence du génome est couverte par des contigs de taille supérieure ou égale à N50).

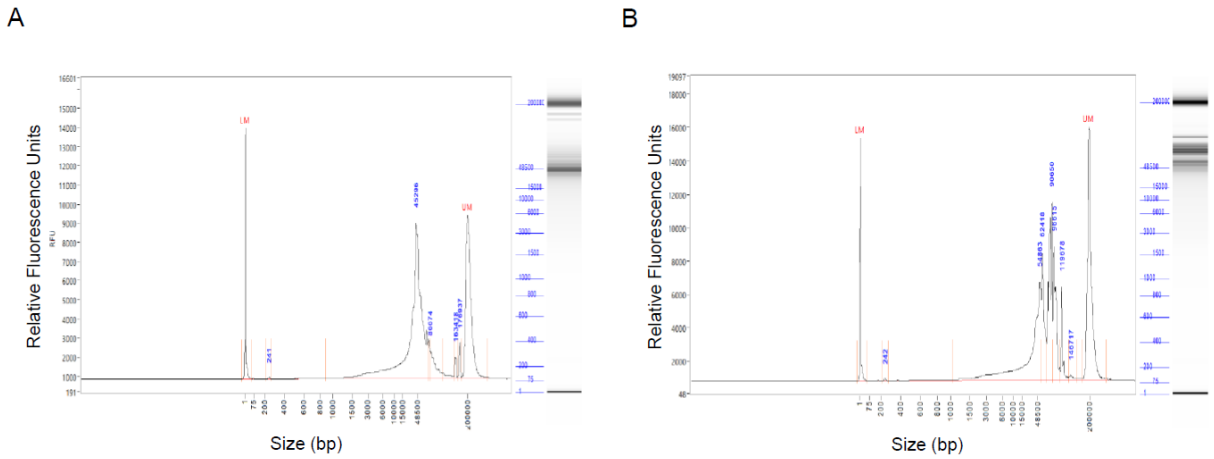


Figure 20. Profils électrophorétique d'ADN génomique issu de deux individu mâle de *Gammarus fossarum*. A) Profil d'un échantillon d'ADN ayant la plupart de fragment de taille entre 5 et 50 kb. B) Profil d'un échantillon d'ADN ayant la plupart de fragment de taille entre 5 et 100 kb.

Si ces premiers résultats montrent que l'ADN génomique extrait d'un organisme entier permet d'obtenir des données en longue lecture, on note des différences de taille de fragments et de quantités de données obtenues pour chacun des deux tests de séquençage réalisés. Ces résultats sont très probablement attribuables à la différence de taille des fragments d'ADN génomique après extraction entre les deux échantillons.

Ces prémiers résultats montrent qu'il est donc envisageable de proposer une stratégie de séquençage et l'obtention d'une quantité suffisante de données génomiques pour aborder un assemblage *de novo* du génome de *Gammarus fossarum*. Grace aux échanges avec la plateforme de génomique INRAE GeT-PlaGe, une profondeur autour de 60X pour un génome de taille de *G. fossarum* a été indiqué comme objectif pour maximiser la contiguïté de l'assemblage et pouvoir minimiser les erreurs de séquençage.

Dans le cadre de l'élaboration d'un projet génome, les aspects bioinformatiques tels que l'identification et la mise en place des outils nécessaires à l'analyse des données génomiques doivent être pris en compte en parallèle de la stratégie d'acquisition et adaptées selon les questions de recherche que l'on souhaite poser à l'aide du génome de référence. Comme cela sera détaillé dans les parties suivantes, les lignes de recherche que je souhaite développer visent à mieux comprendre les réponses biologiques de ces organismes à la contamination des milieux aquatiques, au niveau moléculaire et l'impact au niveau individuel. Dans ce cadre, le séquençage du génome de *G. fossarum* aura vocation à produire le répertoire de tous les gènes codants (Baker 2012). Cette approche permettra une identification exhaustive des protéines et des enzymes de l'organisme et une cartographie des voies de signalisation cellulaire et métaboliques. Toutefois, l'assemblage des génomes et leurs successives annotations sont typiquement guidés par des pipelines qui fournissent finalement une prédiction des gènes codant pour les protéines et des gènes non codants (Schatz et al 2010). L'annotation de gènes reste donc hypothétique jusqu'à leur validation expérimentale. La disponibilité des données transcriptomiques et protéomiques chez le gammare offre un cadre privilégié pour leur intégration dans la phase d'assemblage et d'annotation du génome (Armengaud et al 2014, Prasad et al 2017). Ainsi, l'acquisition du génome de *G. fossarum* consolidera et complétera le travail déjà commencé sur les voies métaboliques basé sur les ressources transcriptomiques et une première intégration des données protéomiques, comme illustré précédemment (voir chapitre « La protéogenomique chez l'amphipode *Gammarus fossarum* »). L'utilisation des données transcriptomiques et protéomiques pour améliorer l'annotation des génomes est déjà utilisée chez les procaryotes et les eucaryotes unicellulaires, et leur exploitation conjointe dans le cadre des génomes complexes peut améliorer l'exactitude des modèles géniques (Prasad et al 2017, Levin et Butter 2022 Ceron-Noriega et al 2023). L'assemblage d'un génome d'une taille importante comme celle prévue pour *G. fossarum* et l'intégration de données

transcriptomiques et protéomiques impliquent la mise en place d'une collaboration avec une plateforme bioinformatique ayant les ressources de calcul nécessaire et une expertise génomique robuste. Via l'intégration de notre unité au sein de la Fédération de Recherche BioEEnVis (projet NanoGamma et GamfoCyc cités en précédence), les collaborations déjà en place seront privilégiées pour identifier les stratégies et les outils nécessaires pour atteindre l'objectif fixé.

Un autre enjeu qui guidera le développement de ce projet génome est l'accessibilité et le partage de la ressource génomique à la communauté scientifique au niveau national et international. Dans ce cadre, INRAE est un institut qui a déjà créé un cadre de partage de données, notamment en ce qui concerne la génomique des arthropodes avec la constitution de la *Bioinformatics Platform for Agroecosystem Arthropods* (BIPAA). Le projet génome *G. fossarum* pourra être intégrée dans BIPAA à la fois dans la phase d'analyse et puis ensuite comme ressources génomiques. Ce projet pourra s'intégrer naturellement au consortium international i5k, auquel le BIPAA est connecté, une initiative qui vise à séquencer et analyser les génomes de 5000 espèces d'arthropodes.

Identification des voies moléculaires du système endocrine chez les gammaridés : construction d'outils de diagnostic pour évaluer la perturbation endocrine en milieux aquatiques.

Le système endocrinien est constitué de glandes qui sécrètent des messagers chimiques (hormones) qui interagissent avec des cibles spécifiques (récepteurs). Ces interactions conduisent à la régulation d'un vaste ensemble de fonctions, dont la croissance, le développement, la reproduction, l'équilibre énergétique et le métabolisme (La Merrill et al 2019). Le système endocrinien est le médiateur principal des interactions entre les génotypes et les phénotypes, et entre les organismes et leur environnement. Les réponses hormonales induites par l'environnement régulent la flexibilité phénotypique sur différentes échelles de temps en modifiant l'état physiologique, l'expression génétique et les marques épigénétiques (Vitousek et al 2018).

Il est intéressant de noter que la diversité des métazoaires se retrouve dans l'évolution des systèmes endocriniens (Bonett et al 2016). Les systèmes endocriniens des métazoaires ont évolué à partir d'un ancêtre bilatérien commun avant la divergence des protostomiens et des deutérostomes, il y a plus de 600 millions d'années (Erwin & Davidson 2002, Loof et al 2012). Les arthropodes ont divergé au sein de la lignée des protostomiens il y a environ 500 millions d'années (Ayala et al 1998). Les systèmes endocriniens des arthropodes ont divergé ultérieurement à la suite de l'évolution d'un exosquelette, qui nécessite une mue pour la croissance et la reproduction (Cheong et al 2015). Se sont donc développés des processus de signalisations endocriniennes permettant de réguler la mue et coordonner la croissance et la reproduction (Knigge et al 2021). Pour cela, les arthropodes (y compris les insectes et les crustacés) ont des systèmes endocriniens différents des vertébrés. En particulier, différents récepteurs endocriniens (par exemple, le récepteur de l'ecdysone, EcR ; ou le récepteur du méthyl farnesoate ou de l'hormone juvénile, MfR) et différentes voies moléculaires régulent

les cycles de reproduction et de mue des arthropodes ainsi que le développement embryonnaire et le métabolisme de l'organisme.

Ces systèmes de communication complexes sont sensibles à certaines substances chimiques exogènes avec lesquels elles peuvent interférer et conduire à des effets sur la santé des organismes. Les contaminants capables d'interférer avec les systèmes endocriniens sont définis comme perturbateurs endocriniens (PEs) (Bergman et al 2013). Dans le cadre de la surveillance des milieux aquatiques imposée par la Directive Cadre sur l'Eau, seul un nombre limité de composés chimiques prioritaires est actuellement mesuré dans l'eau et / ou le biote, conduisant à une sous-estimation de l'impact global des contaminants possiblement PEs pour la biodiversité aquatique. Pour pallier à ces limites, l'une des stratégies actuellement adoptée est l'inclusion de bioessais permettant d'introduire une approche bioanalytique basées sur le mode d'action (MdA) et d'intégrer ainsi tous les composés/cocktails ayant un MdA similaire. La spécificité des mécanismes d'action des hormones a permis la mise en place de bioessais *in vitro* capables de mesurer la capacité d'une substance ou d'un mélange de substances à activer un récepteur. L'intérêt de ce type de démarche bioanalytique réside dans l'utilisation d'effets biologiques (on parle d'*effect-based analysis*) pour tracer la présence des contaminants (Tousova et al 2017). Parmi les bioessais qui sont actuellement reconnus et proposés comme outils pour la surveillance des PEs dans les milieux aquatiques, on peut citer l'essai basé sur l'activité du récepteur aux œstrogènes (ER) dans la lignée cellulaire de cancer du sein MELN (Balaguer et al 1999), ou l'essai basé sur l'activité du récepteur des androgènes dans la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-kb2 (Wilson et al 2002) ou encore le GR-CALUX ® essai, basé sur l'activité du récepteur des glucocorticoïdes (Macikova et al 2014). Ces bioessais *in vitro* ont été déployés pour caractériser la contamination en PE des eaux de différentes rivières européennes (Tousova et al 2017).

Si les caractéristiques qui permettent d'identifier un PE sont les mêmes pour tous les organismes (par exemple agoniste ou antagoniste envers un récepteur d'hormone ; altération de l'expression du récepteur ; altération de la synthèse, transport, distribution, ou métabolisme de l'hormone) (La Merrill et al 2019), la divergence évolutive des systèmes endocriniens fait que les outils disponibles aujourd'hui concernent principalement les systèmes de vertébrés (dont l'Homme) et ne sont donc pas adaptés à l'étude et l'identification des PEs pour d'autres groupes taxonomiques. Actuellement, l'évaluation de la perturbation endocrinienne dans les milieux aquatiques n'intègre pas la spécificité des systèmes endocriniens des invertébrés, notamment des arthropodes, et il n'existe que peu d'outils pour détecter les effets des PEs chez ces taxons, pourtant majoritaires au sein de la biodiversité animale. Des tests spécifiques sont en cours de développement, et utilisent des éléments du système endocrinien des insectes ou de crustacés, tels que des bioessais impliquant les récepteurs ecdystéroïdes et méthyl farnésoate, la mesure des titres de 20-hydroxyecdysone (20E) ou des tests pour l'activité chitobiase. (De Wilde et al 2013, Kakaley et al 2017, Chan et al 2019, Lafontaine et al 2016, Rollin et al 2023). Néanmoins, l'établissement de protocoles fiables pour évaluer la perturbation endocrinienne chez les crustacés reste un défi, notamment à cause d'une ressource moléculaire limitée (notamment génomique) et d'une connaissance encore partielle des mécanismes moléculaires spécifiques au niveau d'organe ou de tissu.

C'est dans ce cadre que je suis en train de développer un axe de recherche qui vise d'un côté à identifier les acteurs des principales voies impliquées dans la régulation endocrine chez différentes espèces de gammaridés, et de l'autre d'utiliser ces nouvelles connaissances pour développer des outils bioanalytiques pertinents pour le diagnostic de la perturbation endocrine des milieux aquatiques sur ce groupe de crustacés. Pour cela, un premier projet de recherche, que j'ai coordonné (ThECA, projet de faisabilité ANSES 2019-2021), a contribué à l'identification des orthologues du récepteur nucléaire clé impliqué dans la réponse à l'ecdysone

(EcR) chez les gammaridés, en tirant parti des données -omiques disponibles et d'une approche phylogénétique. Dans une deuxième temps, grâce à la collaboration mise en place avec l'équipe « *Endocrine disruptors and emergent contaminants* » (Prof. Miguel Santos, Dr. Raquel Ruivo, Dr. Teresa Neuparth) du Centre Interdisciplinaire de Recherche Marine et Environnementale (CIIMAR) de Porto (Portugal), un bioessai *in vitro* a été établi en utilisant le récepteur nucléaire EcR de deux amphipodes (*G. fossarum* et *G. locusta*).

Pour identifier les orthologues du EcR, nous avons mis en œuvre une stratégie bioinformatique basée sur une approche en deux étapes. Dans la première étape, nous avons utilisé la séquence protéique du Ligand Binding Domain (LBD) de l'EcR de *Drosophila melanogaster* comme requête pour rechercher des contigs homologues dans les transcriptomes de 8 espèces différentes de gammaridés (trois espèces cryptique de *Gammarus fossarum, G. pulex, G. wautieri, G. locusta, Echinogammarus berilloni, E. marinus*). Dans un deuxième temps, les séquences présentant à la fois le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et celui pour la liaison au ligand (LBD) ont été conservées pour une analyse phylogénétique. Nous avons trouvé des contigs homologues d'EcR dans le transcriptome de chaque espèce de gammares. Tous les ORFs présentent des DBDs et des LBDs (Figure 21A). Nous avons observé les relations phylogénétiques attendues pour les décapodes, les insectes et les daphnies, cependant l'embranchement des amphipodes n'est pas bien résolu, notamment en raison d'une forte divergence des EcR chez les gammaridés (Figure 21B).

Ainsi, les EcR des gammaridés sont distincts à la fois de ceux de *Hyalell*a, un autre amphipode et de *Daphnia*, ce qui montre l'importance d'élargir la diversité des espèces au-delà des organismes modèles pour étudier l'activité potentielle de perturbation endocrinienne des produits chimiques.

Après avoir identifié les séquences d'ADN codant (CDS) des EcRs de *G. fossarum* et de *G. locusta*, nous avons mis au point deux tests *in vitro* afin de disposer d'un outil capable de cribler

les insecticides et d'autres composés ayant une activité endocrine selon leur capacité à activer les EcRs des crustacés.

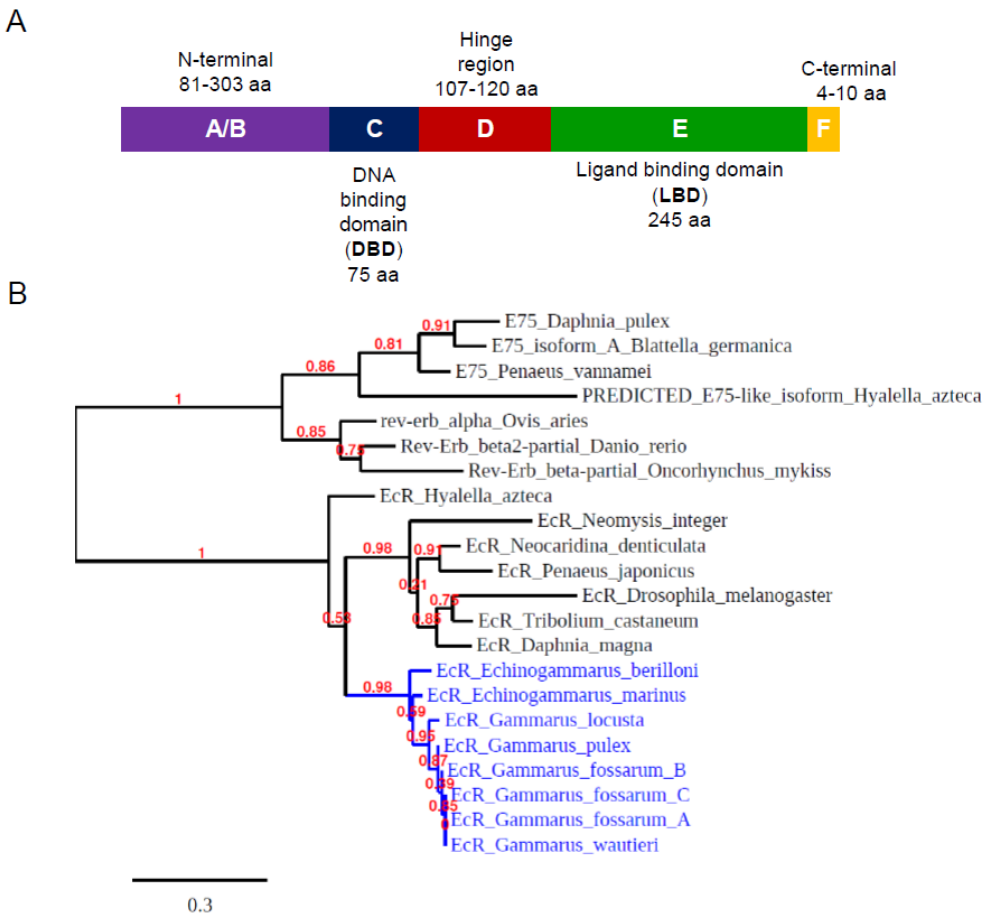


Figure 21. A) Structure schématique de l'EcR des gammaridés. La longueur des domaines s'étend du minimum au maximum identifié chez les huit espèces étudiées. B). Arbre phylogénétique obtenu utilisant l'outil en ligne Phylogeny.fr. Nous avons aligné les séquences d'acides aminés en utilisant MUSCLE et l'alignement a été corrigé avec GBlock avec la sélection moins stricte en raison de la forte divergence entre les séquences. La phylogénie a été déduite en utilisant PhyML et le test Approximate Likelihood-Ratio (SH-like) a été utilisé pour le support des branches. Les arbres phylogénétiques ont été dessinés avec Tree Dyn.

Les bioessais *in vitro* sont basés sur le clonage d'un cDNA hybride GAL4-DBD/EcR-LBD dans un plasmide qui inclut un domaine de liaison à l'ADN GAL4 de levure en amont du gène codant pour la luciférase de *Renilla reniformis*, de sorte qu'en cas d'activation de l'EcR par un composé à tester, la luciférase est exprimée comme gène rapporteur. Nous avons co-transfecté la lignée cellulaire COS-1 (une lignée de fibroblastes immortalisés dérivés du rein du singe vert

africain) avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) du *G. locusta* (dont la séquence entière est disponible) qui est le co-récepteur d'EcR, afin d'avoir un EcR fonctionnel. Les cellules ont montré la plus grande activité luciférase en utilisant les ecdystéroïdes Ponasterone A (PonA) ou 20-hydroxy ecdysone (20-OH) (Figure 22A, 22B). Le test EcR a également montré une induction pour deux insecticides de type dyacilhydrazines (1,3 à 3 fois), le methoxyfenozide (MET) et le tebufenozide (TEB) agonistes du EcR des arthropodes.

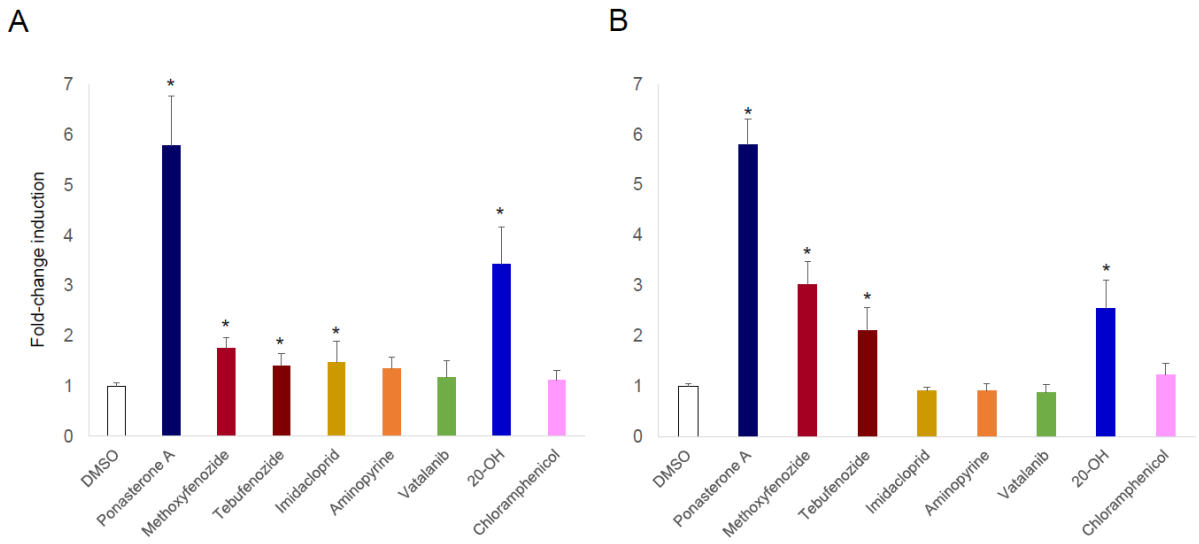


Figure 22. Activité luciférase dans les cellules COS-1 lorsqu'elles sont co-transfectées avec le récepteur de l'ecdysone (EcR) et le récepteur du rétinoïde X (RXR) de *Gammarus fossarum* (A), *Gammarus locusta* (B). Les cellules ont été traitées avec 10 µM de diméthylsulfoxyde (solvant de contrôle), ou 10 µM pour chacun des autres composés testés. Tous les tests ont été répétés trois fois. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± déviation standard de l'induction normalisée. * p-value<0,05 (ANOVA à un facteur).

Ces premiers résultats appuient l'utilisation des ressources transcriptomiques aujourd'hui disponibles chez les espèces sentinelles pour identifier les récepteurs impliqués dans la signalisation endocrine et montrent la faisabilité de développer de bioessais *in vitro* basés sur leur spécificité d'interaction avec des contaminants perturbateurs endocriniens.

Pour développer cet axe de recherche, je compte poursuivre les approches comparatives et phylogénétiques pour l'identification du répertoire complet des récepteurs nucléaires et d'autres

facteurs de transcription impliqués dans le système endocrinien chez les gammaridés. Ces approches bioinformatiques seront complémentés par des approches expérimentales, telles que l'amplification rapide des extrémités des ADNc (RACE) ou l'exploitation des données de séquençage génomique présentées dans le chapitre précédent, dans le cas où les ressources transcriptomiques disponibles ne permettraient pas l'identification des séquences complètes des récepteurs d'intérêt (Hwang et al 2014, Sessegolo et al 2019). L'identification d'autres acteurs permettra d'élargir le nombre de bioessais *in vitro* chez ces espèces grâce à la collaboration en cours avec l'équipe du CIIMAR. Nous avons déjà identifié des récepteurs capables de répondre à une grande diversité de cibles chimiques et ayant un rôle central dans la régulation de la reproduction et du métabolisme. Par exemple, le récepteur nucléaire Retinoid X receptor (RXR) est une cible des composés organostanniques, utilisés comme stabilisateur dans les biocides agricoles ou comme catalyseurs industriels (Roark 2020). Un autre exemple concerne les facteurs de transcription activés par un ligand, tel que le Methyl farnesoate Receptor (MfR), une cible des insecticides analogues aux hormones juvéniles (comme le pyriproxyfen).

A moyen terme, un premier objectif de cet axe de recherche est d'aller au-delà de l'intérêt bioanalytique (niveau de contamination / d'exposition) des bioessai *in vitro*, et de pouvoir les calibrer à l'aide des marqueurs de toxicité disponibles chez *G. fossarum* pour pouvoir établir un lien entre le niveau d'activation *in vitro* du récepteur et l'impact toxique. Une première étape permettra de calibrer chaque test en utilisant des produits chimiques modèles, connus pour activer les récepteurs, afin de normaliser l'activité de chaque récepteur en utilisant une approche d'équivalent chimique (Creusot et al 2014, Creusot et al 2016). Dans le cas du test EcR développé au cours du projet ThECA, l'hormone naturelle Ponasterone A avait montré la plus forte activation (Figure 22) et peut être utilisée comme molécule modèle pour construire l'interprétation en équivalence. Pour les autres récepteurs, l'étalonnage de chaque test sera effectué à l'aide d'agonistes connus, tels que des hormones naturelles ou des agonistes

synthétiques (par exemple, le farnésoate de méthyle ou des agonistes de l'hormone juvénile pour le MfR; le tributyltin pour le RXR) afin de choisir le produit chimique ayant la plus grande affinité. Ensuite, une deuxième étape cherchera à caractériser les équivalents toxiques *in vivo* chez les gammares, via l'utilisation des tests de toxicité sub-chronique disponibles dans notre laboratoire (inhibition de l'alimentation, reprotoxicité), afin d'exprimer l'activité des récepteurs en termes d'effets toxiques.

Un deuxième objectif est de tester la pertinence écotoxicologique et la sensibilité des bioessais *in vitro* développés. Comme cité auparavant, le projet européen SOLUTIONS a montré la capacité de ce type de bioessais pour identifier des sites caractérisés par la présence de perturbateurs endocriniens pour les vertébrés (Tousova et al 2017). Les bioessais *in vitro* développés et validés dans le cadre de cet axe recherche permettront de combler le manque d'information sur les potentielles activités de perturbation endocrinienne pour les arthropodes.

Pour valider l'intérêt du potentiel diagnostic de ces bioessais axés sur les systèmes endocriniens des crustacés, une approche de terrain semble justifiée et cohérente. Des échantillons environnementaux seront donc prélevés sur différents sites parmi des bassins versants français soumis à différentes pressions anthropiques (agricoles, urbaines, industrielles), et seront analysés pour leur capacité à activer une réponse *in vitro*. Les sites seront sélectionnés sur la base d'études antérieures, notamment en collaboration avec les Agences de l'eau françaises, l'Agence française pour la biodiversité et le plan français Ecophyto II. La collaboration avec le CIIMAR pourrait permettre d'élargir le monitoring à des sites marins ou estuariens de la côte portugaise.

Les résultats de cet axe de recherche permettront d'un côté d'améliorer nos connaissances fondamentales sur les systèmes endocriniens des crustacés et de l'autre de développer de nouveaux outils qui pourront aider les gestionnaires de l'eau à mieux prendre en compte la perturbation endocrine dans les milieux aquatiques.

Approches -omiques chez les espèces sentinelles pour l'étude de l'exposome des milieux aquatiques

Les organismes sont exposés à des milliers de substances chimiques d'origine naturelle et anthropique tout au long de leur vie. Cependant, en général, les évaluations du risque chimique sont basées sur la caractérisation des effets indésirables en testant une molécule chimique à la fois et dans des conditions contrôlées de laboratoire (Scholz et al 2022). L'évaluation du risque des mélanges chimiques environnementaux est un défi en raison de la multitude de combinaisons possibles dans les milieux. Les organismes aquatiques y sont exposés à des mélanges variables dans le temps et dans leur composition (de Zwart et al 2018). Tester des milliers de produits chimiques sur des centaines d'espèces aquatiques et pour une multitude d'effets est difficilement envisageable (Johnson et Sumpter 2016).

Afin de prendre en compte la complexité des expositions environnementales, le concept d'« exposome » a été défini en épidémiologie moléculaire pour caractériser les mélanges chimiques et leurs réponses biologiques (Wild et al 2005, Maitre et al 2018, 2022). Dans ce contexte, les données -omiques (par exemple protéomique, transcriptomique ou métabolomique) sont collectées afin d'identifier des marqueurs biologiques d'exposition externe (Vineis et al 2017). Ces réponses biologiques sont ensuite analysées pour identifier des signatures pertinentes qui pourraient expliquer les effets observés sur la santé des individus (Laine et al 2020). En épidémiologie l'exposome chimique est généralement mesuré en évaluant à la fois les expositions extérieures et les expositions personnelles (analysées dans les fluides corporels) (Vineis et al 2017, Maitre et al 2018). Ce cadre conceptuel pourrait finalement être étendu aux écosystèmes aquatiques, comme proposé par le concept d'éco-exposome (Escher et al 2017, Scholz et al 2022). Toutefois, les études pour la caractérisation de l'éco-exposome sont encore limitées en toxicologie environnementale, en raison notamment d'un nombre de biomarqueurs trop limité, tels que les marqueurs liés à l'immunité ou au stress oxydatif (Evariste

et al 2018, Lv et al 2018). Un défi majeur dans la mise en œuvre d'un cadre exposomique en écotoxicologie aquatique comprend la disponibilité des ressources moléculaires chez les espèces pertinentes pour l'environnement. Comme illustré dans les chapitres précédents, les travaux en protéogénomique sur les gammaridés ont récemment démontré la capacité d'acquérir des informations quantitatives sur l'abondance de centaines de protéines chez les gammares, soit sur individus entiers, soit sur organes groupés, en utilisant des approches protéomiques (Gouveia et al 2017, Faugère et al 2020, Leprêtre et al 2022a,b).

En parallèle, la biosurveillance des milieux aquatiques, à travers la mesure de concentrations en contaminants accumulés dans le biote et les niveaux de biomarqueurs, représente une approche valide pour évaluer la présence de mélanges chimiques dans les milieux aquatiques. La biosurveillance active, basée sur la transplantation d'organismes calibrés (par taille, sexe, état physiologique, etc.) provenant d'une population source unique, minimise la variabilité biologique et permet un contrôle total du temps d'exposition. Au cours de la dernière décennie, l'utilisation d'organismes encagés chez l'espèce d'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* a été développée pour le suivi de la contamination chimique à l'échelle nationale (Besse et al 2013, Ciliberti et al 2017, Alric et al 2019, Babut et al 2020). De plus, des bioessais écotoxicologiques *in situ* basés sur l'évaluation de marqueurs individuels, tels que la fertilité, la fécondité, la mue ou la croissance ovocytaire et la mesure de certains biomarqueurs moléculaires spécifiques (Geffard et al 2010, Gouveia et al 2017, Chaumot et al 2020, Lopes et al 2020) sont disponibles chez *G. fossarum*.

L'ambition de l'axe de recherche que je propose ici est d'étudier les effets des contaminants dans le cadre d'une exposition directe dans les milieux aquatiques et mettre en lien les perturbations moléculaires avec les effets écotoxicologiques observés. L'originalité de cette approche est d'expérimenter la toxicité de mélanges chimiques dans des conditions réelles de terrain en combinant l'approche standardisée de biosurveillance active mis au point sur l'espèce

sentinelle *Gammarus fossarum* avec les approches -omiques aujourd'hui disponibles sur des organes clés chez cette espèce.

Dans un premier temps, grâce au financement par le programme « Ecosphère Continentale et Côtière » (EC2CO) d'un projet que je coordonne actuellement, j'étudierai la réponse biologique de deux organes clés pour la reproduction chez les gammares femelles, les ovaires et le caecum (central dans le transport des lipoprotéines), par approche protéomique combinée à une approche de biosurveillance active sur environ 30 sites choisis sur le réseau national de surveillance des Agences de l'Eau. D'un point de vue méthodologique, la mise en œuvre de ce projet s'appuiera d'abord sur l'identification des sites associés à un effet reprotoxique chez les femelles exposées. Pour cela, j'utiliserai une base de données nationale (partenariat Agences de l'Eau - INRAE) rassemblant les données écotoxicologiques obtenues à l'aide des gammares encagés et déployés à travers les réseaux nationaux de surveillance (plus de 200 sites 2017-2021). Cette base de données fournit des informations toxicologiques sur les gammares encagés, telles que la mortalité, l'inhibition de l'alimentation, les altérations de la reproduction et du cycle de mue. La sélection des sites sera basée sur les critères suivants : i) aucun effet sur la reproduction des organismes observés pour cinq sites de référence ; ii) effets néfastes sur la reproduction pour vingt-cinq (25) sites. Pour chaque site, nous répéterons le test de reprotoxicité tel qu'établi par le laboratoire (Geffard et al 2010, Chaumot et al 2020, Lopes et al 2020, AFNOR XP T90T90-722-2) afin de réévaluer leurs effets toxiques et constituerons un pool de cinq caeca et un pool de cinq ovaires. Je développerai une méthode de spectrométrie de masse de type Dynamic Multiple Reaction Monitoring (dMRM) sur la base des travaux déjà réalisés (Faugère et al 2020, Leprêtre et al en préparation). Les analyses de données combineront des statistiques multivariées (mise à l'échelle multidimensionnelle; clustering hiérarchique), des analyses d'abondance différentielle de protéines (modèles linéaires généralisés et méthodes empiriques de Bayes) entre organes témoins et organes impactés (Faugère et al 2020, Kammers

et al 2015) et des analyses de réseaux de coexpression sur l'ensemble des données (Weighted Gene Coexpression Network Analysis, WGCNA) (Langfelder et al 2008, Degli Esposti et al 2019, Koenig et al 2021). L'intégration de ces méthodes biostatistiques permettra d'identifier des tendances biologiques générales à travers les échantillons et des biomarqueurs potentiels de reprotoxicité. Les profils protéomiques seront analysés pour évaluer la présence des mécanismes potentiellement différents de toxicité reproductive. De plus, il sera possible évaluer si les profils protéomiques sont corrélés à un sous-ensemble de sites de terrain potentiellement caractérisés par des caractéristiques environnementales similaires (par exemple, sites de référence ou sites reprotoxiques). La pertinence biologique des protéines ou des groupes de protéines identifiés sera évaluée par des analyses d'enrichissement fonctionnel en utilisant les annotations des protéines issues des bases de données Gene Ontology ou KEGG, comme cela a été fait précédemment (Koenig et al 2021). Enfin, ce projet permettra de caractériser l'exposome chimique tel qu'il est conceptualisé dans les études d'épidémiologie moléculaire (comme le projet HELIX, Maitre et al 2018, 2022) dans lesquelles l'exposome externe et interne est évalué. L'analyse chimique sera réalisée par l'équipe du LPTC (UMR EPOC Bordeaux), dirigée par le Dr. Hélène Budzinski. Cette preuve de concept portera sur une dizaine de sites, pour moitié associée à la reprotoxicité et pour l'autre moitié des sites de référence ne présentant pas de reprotoxicité. Afin de caractériser l'exposome interne, des analyses qualitatives et quantitatives seront réalisées pour rechercher des contaminants de préoccupation émergente (produits pharmaceutiques, retardateurs de flamme, PFASs), PAH, PCB ou autres dioxines qui pourraient se bio-accumuler dans les gammares encagés. Afin de caractériser l'exposome externe et l'exposition possible à des contaminants non-bioaccumulés, des échantillonneurs passifs tels que les POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*) seront déployés et analysés simultanément. Des analyses ciblées utilisant le GC-MS/MS et le HPLC-MS/MS seront effectuées sur des pools distincts d'organismes exposés sur les sites en même temps que

les expositions pour l'évaluation de la reprotoxicité. Une comparaison entre les sites de référence et les sites impactés produira d'abord une liste de contaminants potentiellement liés à la reprotoxicité chez les gammares. De plus, nous intégrerons les analyses protéomiques et chimiques en examinant l'association entre les profils protéomiques identifiés et la signature chimique des sites induisant la reprotoxicité afin d'identifier les voies biologiques répondant aux mélanges chimiques identifiés.

Ce projet permettra de trouver des premières réponses à des questions spécifiques comme la capacité de profils protéomiques des organes à informer sur les effets et les mécanismes de reprotoxicité.

A la suite de ce projet, pour faire avancer l'étude de l'exposome des milieux aquatiques, j'envisage de développer différents volets de recherche. Un premier volet vise à élargir le panel d'informations moléculaires disponible chez les espèces sentinelles au niveau de l'organe. Cela est nécessaire pour acquérir une vision intégrée des systèmes biologiques et permettre de répondre aux questions autour de l'éco-exposome des milieux aquatiques. L'analyse des petites molécules et des lipides, par la métabolomique et la lipidomique, représente un développement particulièrement intéressant chez l'amphipode *G. fossarum.* D'abord, les métabolites constituent les substrats des réactions métaboliques et la variation de leurs concentrations nous donne des informations importantes sur l'homéostasie de l'organisme ou de l'organe d'intérêt (Marie 2020). De plus, l'intégration de données quantitatives protéomiques et métabolomiques peut améliorer leur interprétation, comme par exemple dans le cas de l'identification de boucles de retro actions positives ou négatives, qui ne sont pas visibles en utilisant une seule dimension moléculaire, comme mis en évidence chez la moule *Mytilus galloprovincialis* exposé à la carbamazépine (Dumas et al 2022). En parallèle, l'étude de l'ensemble des lipides (lipidome) chez les organismes d'intérêt environnemental reste récente et peu abordée en écotoxicologie et encore moins dans un cadre d'étude de l'exposome (Fu et al 2021, Melvin et al 2019).

Pourtant les lipides, en plus d'être les constituants des membranes chez tous les organismes vivants, ont un rôle majeur pour comprendre l'état métabolique, nutritionnel et fonctionnel de différents organes. Un des principaux intérêts pour l'intégration de la lipidomique est leur rôle en tant que ressources énergétiques, constituants des lipoprotéines, et lipides de réserve notamment impliqués dans la maturation des ovocytes et donc ayant une importance majeure dans la reproduction. Chez le gammare, un répertoire expérimental exhaustif des métabolites et des lipides est en voie de construction. Dans le cadre de la collaboration avec l'Institut de Science Analytique, (Dr. Sophie Ayciriex, Prof. Arnaud Salvador,) nous avons commencé les développements méthodologiques pour permettre l'exploration de ces dimensions moléculaires (Fu et al 2020, Fu et al 2021, Faugère et al 2023). Une première étude a permis d'établir un lipidome de référence de gammares de différents sexes et stades de reproduction (Fu et al 2021). Plus de 200 espèces lipidiques moléculaires ont été quantifiées, correspondant à 11 classes lipidiques majeures : triacylglycérols (TAG), diacylglycérols, phosphatidylcholines, (PCs), phosphatidyléthanolamines (PEs), éther lipides (PE-O et PC-O), phosphatidylinositols (PIs), les lysophosphatidylcholines (LPCs), les lysophosphatidyl-ethanolamines (LPEs), les sphingomyelines (SMs), et le cholestérol (Figure 23A) (Fu et al 2021). Il est intéressant de noter que les femelles au stade D1 contenaient plus de TAG que les femelles au stade C1 ou que les mâles (figure 23B), une accumulation typiquement observée au cours de la vitellogenèse également chez d'autres espèces (Subramoniam 2011), alors qu'aucun changement majeur n'a été observé pour les lipides membranaires comme le cholestérol, les phospholipides (PC, PE, PE-O, PC-O, PI), les lysophospholipides (LPE, LPC) et la sphingomyéline (Figures 23C et 23D).

Les résultats de cette étude représentent un excellent point de départ pour analyser le rôle des lipides dans la réponse et l'impact de la contamination des milieux aquatiques sur les gammares.

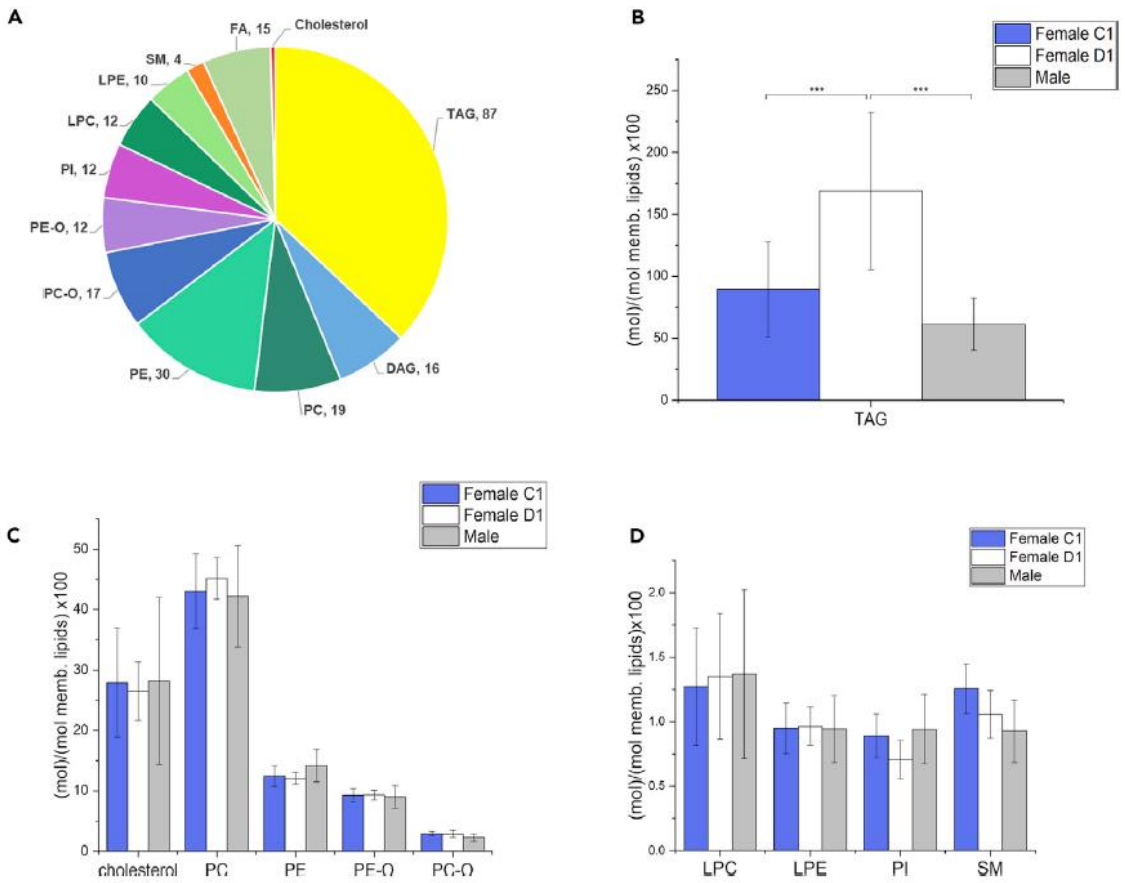


Figure 23. Composition lipidique du lipidome de *Gammarus fossarum* (Reproduit de Fu et al 2021). (A) Classes de lipides identifiées dans l'organisme *G. fossarum* avec le nombre associé d'espèces lipidiques identifiées. (B-D) Comparaison du le profil lipidique différent entre les gammares mâles et femelles à des stades de reproduction femelle spécifiques (C1 versus D1). (B) Profil TAG. (C) Distribution du cholestérol, de la phosphatidylcholine, de la phosphatidyléthanolamine et des éthers lipidiques. (D) Profil des lysophospholipides, du phosphatidylinositol et de la sphingomyéline. L'abondance des classes de lipides est présentée en moles par mole de lipides membranaires totaux (phospholipides, sphingolipides et stérols - sans compter les lipides de stockage). Les changements statistiquement significatifs sont marqués par des astérisques (*** p<0,001, test t de Student). Les données sont représentées sous forme de moyenne +/écart-type.

En parallèle, nous avons commencé à explorer la possibilité de produire l'ensemble des données –omiques (métabolomique, lipidomique et protéomique) à partir d'un seul individu pour améliorer leur intégration et interprétation biologique, notamment en ce qui concerne les liens entre profils moléculaires et variations physiologiques, comme dans le cadre du cycle de reproduction chez la femelle (Faugère et al 2023). Les développements analytiques multi-omiques ont montré qu'il est aujourd'hui possible de mettre en œuvre un protocole d'extraction

de protéines, métabolites polaires et lipides à partir d'un organisme unique et de mener leur analyse par spectrométrie de masse ciblée HPLC-MRM MS (Faugère et al 2023). A partir de ces résultats, les futurs développements analytiques se concentreront au niveau des organes pour permettre d'améliorer les connaissances sur la physiologie moléculaire chez *G. fossarum*, initiées avec la thèse de Natacha Koenig. Un des objectifs qui pourra être poursuivi à moyen terme est la construction de modèles intégrés de la physiologie moléculaire de *G. fossarum*. Cette vision intégrée permettra d'étudier de façon plus holistique les altérations fonctionnelles induites par les expositions environnementales et prédire leur impact sur la santé des organismes, de la même façon que les modèles intégrés du métabolisme humain pour les applications biomédicales (Thiele et al 2020) .

Un autre volet que je souhaite développer dans le cadre de l'étude de l'éco-exposome aquatique concerne les effets sur les populations natives. Un des points les plus complexes pour définir l'éco-exposome est le suivi de l'exposition au cours de la vie des organismes, comme cela est typiquement fait pour les cohortes longitudinales en épidémiologie (Maitre et al 2018, Vineis 2017). Dans ce cadre, l'exposition interne, les réponses biologiques mesurées par approches -omiques et les effets sur la santé sont mesurés et suivies chez les mêmes individus au cours du temps, ce qui permet d'évaluer la présence de fenêtres temporelles de susceptibilité qui peuvent être importantes pour faire le lien entre éco-exposome et effets. Cela est identifié comme un défi important dans l'évaluation de l'éco-exposome pour les organismes du milieu (Scholz et al 2022). Une des solutions proposées consiste à évaluer l'éco-exposome à travers un suivi simultané d'organismes à différents stades de vie de la population étudiée (Scholz et al 2022). Toutefois, cela est possible dans des cas particuliers, comme une exposition relativement stable (grand lacs et fleuves recevant une décharge chimique continue) et pour des organismes ayant des cycles de vie court (Rico et al 2016, Scholz et al 2022). Dans ce cadre, la combinaison du biomonitoring *in situ* et de l'étude de profils moléculaires des populations

natives de gammaridés pourrait être une approche intéressante pour avancer sur la compréhension de l'éco-exposome. De plus, il sera intéressant d'analyser l'aspect temporel de l'exposition par des approches toxicocinétique et toxicodynamique, en s'appuyant sur les études de modélisation disponibles chez le gammare (Gestin et al 2021 Gestin et al 2022, Gestin et al 2023, Ratier et 2019). Pour cela, j'envisage de renforcer les collaborations avec les collègues en modélisation (Christelle Lopes, Sandrine Charles du Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de l'Université de Lyon 1) pour intégrer des paramètres moléculaires dans les modèles toxicocinétiques et toxicodynamiques.

En conclusion, l'expansion des outils moléculaires chez l'espèce sentinelle *G. fossarum* que mon travail de recherche vise à établir permettra d'améliorer la prédiction des risques toxiques liés à la contamination chimique des milieux aquatiques.

REFERENCES

Adams, M. D.; Celniker, S. E.; Holt, R. A.; Evans, C. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P. G.; Scherer, S. E.; Li, P. W.; Hoskins, R. A.; Galle, R. F.; George, R. A.; Lewis, S. E.; Richards, S.; Ashburner, M.; Henderson, S. N.; Sutton, G. G.; Wortman, J. R.; Yandell, M. D.; Zhang, Q.; Chen, L. X.; Brandon, R. C.; Rogers, Y.-H. C.; Blazej, R. G.; Champe, M.; Pfeiffer, B. D.; Wan, K. H.; Doyle, C.; Baxter, E. G.; Helt, G.; Nelson, C. R.; Gabor, G. L.; Miklos; Abril, J. F.; Agbayani, A.; An, H.-J.; Andrews-Pfannkoch, C.; Baldwin, D.; Ballew, R. M.; Basu, A.; Baxendale, J.; Bayraktaroglu, L.; Beasley, E. M.; Beeson, K. Y.; Benos, P. V.; Berman, B. P.; Bhandari, D.; Bolshakov, S.; Borkova, D.; Botchan, M. R.; Bouck, J.; Brokstein, P.; Brottier, P.; Burtis, K. C.; Busam, D. A.; Butler, H.; Cadieu, E.; Center, A.; Chandra, I.; Cherry, J. M.; Cawley, S.; Dahlke, C.; Davenport, L. B.; Davies, P.; Pablos, B. de; Delcher, A.; Deng, Z.; Mays, A. D.; Dew, I.; Dietz, S. M.; Dodson, K.; Doup, L. E.; Downes, M.; Dugan-Rocha, S.; Dunkov, B. C.; Dunn, P.; Durbin, K. J.; Evangelista, C. C.; Ferraz, C.; Ferriera, S.; Fleischmann, W.; Fosler, C.; Gabrielian, A. E.; Garg, N. S.; Gelbart, W. M.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gong, F.; Gorrell, J. H.; Gu, Z.; Guan, P.; Harris, M.; Harris, N. L.; Harvey, D.; Heiman, T. J.; Hernandez, J. R.; Houck, J.; Hostin, D.; Houston, K. A.; Howland, T. J.; Wei, M.-H.; Ibegwam, C.; Jalali, M.; Kalush, F.; Karpen, G. H.; Ke, Z.; Kennison, J. A.; Ketchum, K. A.; Kimmel, B. E.; Kodira, C. D.; Kraft, C.; Kravitz, S.; Kulp, D.; Lai, Z.; Lasko, P.; Lei, Y.; Levitsky, A. A.; Li, J.; Li, Z.; Liang, Y.; Lin, X.; Liu, X.; Mattei, B.; McIntosh, T. C.; McLeod, M. P.; McPherson, D.; Merkulov, G.; Milshina, N. V.; Mobarry, C.; Morris, J.; Moshrefi, A.; Mount, S. M.; Moy, M.; Murphy, B.; Murphy, L.; Muzny, D. M.; Nelson, D. L.; Nelson, D. R.; Nelson, K. A.; Nixon, K.; Nusskern, D. R.; Pacleb, J. M.; Palazzolo, M.; Pittman, G. S.; Pan, S.; Pollard, J.; Puri, V.; Reese, M. G.; Reinert, K.; Remington, K.; Saunders, R. D. C.; Scheeler, F.; Shen, H.; Shue, B. C.; Sidén-Kiamos, I.; Simpson, M.; Skupski, M. P.; Smith, T.; Spier, E.; Spradling, A. C.; Stapleton, M.; Strong, R.; Sun, E.; Svirskas, R.; Tector, C.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, A. H.; Wang, X.; Wang, Z.-Y.; Wassarman, D. A.; Weinstock, G. M.; Weissenbach, J.; Williams, S. M.; Woodage, T.; Worley, K. C.; Wu, D.; Yang, S.; Yao, Q. A.; Ye, J.; Yeh, R.-F.; Zaveri, J. S.; Zhan, M.; Zhang, G.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zheng, X. H.; Zhong, F. N.; Zhong, W.; Zhou, X.; Zhu, S.; Zhu, X.; Smith, H. O.; Gibbs, R. A.; Myers, E. W.; Rubin, G. M.; Venter, J. C. The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*. *Science* **2000**, *287* (5461), 2185–2195. https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185.

Adams, S. M. Biomarker/Bioindicator Response Profiles of Organisms Can Help Differentiate between Sources of Anthropogenic Stressors in Aquatic Ecosystems. *Biomarkers* **2001**, *6* (1), 33–44. https://doi.org/10.1080/135475001452779.

Aggarwal, S.; Raj, A.; Kumar, D.; Dash, D.; Yadav, A. K. False Discovery Rate: The Achilles' Heel of Proteogenomics. *Briefings in Bioinformatics* **2022**, *23* (5), bbac163. https://doi.org/10.1093/bib/bbac163.

Aguirre-Martínez, G. V.; DelValls, T. A.; Martín-Díaz, M. L. General Stress, Detoxification Pathways, Neurotoxicity and Genotoxicity Evaluated in Ruditapes Philippinarum Exposed to Human Pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2016**, *124*, 18–31. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.031.

Aite, M.; Chevallier, M.; Frioux, C.; Trottier, C.; Got, J.; Cortés, M. P.; Mendoza, S. N.; Carrier, G.; Dameron, O.; Guillaudeux, N.; Latorre, M.; Loira, N.; Markov, G. V.; Maass, A.; Siegel, A. Traceability, Reproducibility and Wiki-Exploration for "à-La-Carte" Reconstructions of Genome-Scale Metabolic Models. *PLoS Comput Biol* **2018**, *14* (5), e1006146. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006146.

Alberio, R. Regulation of Cell Fate Decisions in Early Mammalian Embryos. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2020**, *8* (1), 377–393. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083841.

Alric, B.; Geffard, O.; Chandesris, A.; Ferréol, M.; François, A.; Perceval, O.; Piffady, J.; Villeneuve, B.; Chaumot, A. Multisubstance Indicators Based on Caged *Gammarus* Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (10), 5906–5915. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01271.

Ankley, G. T.; Bennett, R. S.; Erickson, R. J.; Hoff, D. J.; Hornung, M. W.; Johnson, R. D.; Mount, D. R.; Nichols, J. W.; Russom, C. L.; Schmieder, P. K.; Serrrano, J. A.; Tietge, J. E.; Villeneuve, D. L. Adverse Outcome Pathways: A Conceptual Framework to Support Ecotoxicology Research and Risk Assessment. *Environ Toxicol Chem* **2010**, *29* (3), 730–741. https://doi.org/10.1002/etc.34.

Armengaud, J.; Trapp, J.; Pible, O.; Geffard, O.; Chaumot, A.; Hartmann, E. M. Non-Model Organisms, a Species Endangered by Proteogenomics. *Journal of Proteomics* **2014**, *105*, 5–18. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007.

Ayala, F. J.; Rzhetsky, A.; Ayala, F. J. Origin of the Metazoan Phyla: Molecular Clocks Confirm Paleontological Estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95* (2), 606–611. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.606.

Baa-Puyoulet, P.; Parisot, N.; Febvay, G.; Huerta-Cepas, J.; Vellozo, A. F.; Gabaldón, T.; Calevro, F.; Charles, H.; Colella, S. ArthropodaCyc: A CycADS Powered Collection of BioCyc Databases to Analyse and Compare Metabolism of Arthropods. *Database* **2016**, *2016*, baw081. https://doi.org/10.1093/database/baw081.

Babut, M.; Ferrari, B. J. D.; Jame, P.; Assoumani, A.; Lestremau, F.; Hette-Tronquart, N.; Miege, C.; Perceval, O. Monitoring Priority Substances in Biota under the Water Framework Directive: How Effective Is a Tiered Approach Based on Caged Invertebrates? A Proof-of-Concept Study Targeting PFOS in French Rivers. *Environ Sci Eur* **2020**, *32* (1), 131. https://doi.org/10.1186/s12302-020-00416-4.

Bajard, L.; Adamovsky, O.; Audouze, K.; Baken, K.; Barouki, R.; Beltman, J. B.; Beronius, A.; Bonefeld-Jørgensen, E. C.; Cano-Sancho, G.; de Baat, M. L.; Di Tillio, F.; Fernández, M. F.; FitzGerald, R. E.; Gundacker, C.; Hernández, A. F.; Hilscherova, K.; Karakitsios, S.; Kuchovska, E.; Long, M.; Luijten, M.; Majid, S.; Marx-Stoelting, P.; Mustieles, V.; Negi, C. K.; Sarigiannis, D.; Scholz, S.; Sovadinova, I.; Stierum, R.; Tanabe, S.; Tollefsen, K. E.; van den Brand, A. D.; Vogs, C.; Wielsøe, M.; Wittwehr, C.; Blaha, L. Application of AOPs to Assist Regulatory Assessment of Chemical Risks – Case Studies, Needs and Recommendations. *Environmental Research* **2023**, *217*, 114650. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114650.

Baker, M. De Novo Genome Assembly: What Every Biologist Should Know. *Nat Methods* **2012**, *9* (4), 333–337. https://doi.org/10.1038/nmeth.1935.

Balaguer, P.; François, F.; Comunale, F.; Fenet, H.; Boussioux, A.-M.; Pons, M.; Nicolas, J.-C.; Casellas, C. Reporter Cell Lines to Study the Estrogenic Effects of Xenoestrogens. *Science of The Total Environment* **1999**, *233* (1–3), 47–56. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00178-3.

Barros, A. G. de A.; Liu, J.; Lemieux, G. A.; Mullaney, B. C.; Ashrafi, K. Analyses of C. Elegans Fat Metabolic Pathways. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier, 2012; Vol. 107, pp 383–407. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394620-1.00013-8.

Beale, D. J.; Sinclair, G. M.; Shah, R.; Paten, A. M.; Kumar, A.; Long, S. M.; Vardy, S.; Jones, O. A. H. A Review of Omics-Based PFAS Exposure Studies Reveals Common Biochemical Response Pathways. *Science of The Total Environment* **2022**, *845*, 157255. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157255.

Belcour, A.; Girard, J.; Aite, M.; Delage, L.; Trottier, C.; Marteau, C.; Leroux, C.; Dittami, S. M.; Sauleau, P.; Corre, E.; Nicolas, J.; Boyen, C.; Leblanc, C.; Collén, J.; Siegel, A.; Markov, G. V. Inferring Biochemical Reactions and Metabolite Structures to Understand Metabolic Pathway Drift. *iScience* **2020**, *23* (2), 100849. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100849.

Bergman, Å.; Heindel, J. J.; Kasten, T.; Kidd, K. A.; Jobling, S.; Neira, M.; Zoeller, R. T.; Becher, G.; Bjerregaard, P.; Bornman, R.; Brandt, I.; Kortenkamp, A.; Muir, D.; Drisse, M.-N. B.; Ochieng, R.; Skakkebaek, N. E.; Byléhn, A. S.; Iguchi, T.; Toppari, J.; Woodruff, T. J. The Impact of Endocrine Disruption: A Consensus Statement on the State of the Science. *Environmental Health Perspectives* **2013**, *121* (4). https://doi.org/10.1289/ehp.1205448.

Bervoets, L.; Voets, J.; Covaci, A.; Chu, S.; Qadah, D.; Smolders, R.; Schepens, P.; Blust, R. Use of Transplanted Zebra Mussels (*Dreissena Polymorpha*) To Assess the Bioavailability of Microcontaminants in Flemish Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (6), 1492–1505. https://doi.org/10.1021/es049048t.

Besse, J.-P.; Coquery, M.; Lopes, C.; Chaumot, A.; Budzinski, H.; Labadie, P.; Geffard, O. Caged Gammarus Fossarum (Crustacea) as a Robust Tool for the Characterization of Bioavailable Contamination Levels in Continental Waters: Towards the Determination of Threshold Values. *Water Research* **2013**, *47* (2), 650–660. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024.

Blaxter, M.; Archibald, J. M.; Childers, A. K.; Coddington, J. A.; Crandall, K. A.; Di Palma, F.; Durbin, R.; Edwards, S. V.; Graves, J. A. M.; Hackett, K. J.; Hall, N.; Jarvis, E. D.; Johnson, R. N.; Karlsson, E. K.; Kress,

W. J.; Kuraku, S.; Lawniczak, M. K. N.; Lindblad-Toh, K.; Lopez, J. V.; Moran, N. A.; Robinson, G. E.; Ryder, O. A.; Shapiro, B.; Soltis, P. S.; Warnow, T.; Zhang, G.; Lewin, H. A. Why Sequence All Eukaryotes? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (4), e2115636118. https://doi.org/10.1073/pnas.2115636118.

Bonett, R. M. Analyzing Endocrine System Conservation and Evolution. *General and Comparative Endocrinology* **2016**, *234*, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.011.

Boštjančić, L. L.; Francesconi, C.; Rutz, C.; Hoffbeck, L.; Poidevin, L.; Kress, A.; Jussila, J.; Makkonen, J.; Feldmeyer, B.; Bálint, M.; Schwenk, K.; Lecompte, O.; Theissinger, K. Host-Pathogen Coevolution Drives Innate Immune Response to Aphanomyces Astaci Infection in Freshwater Crayfish: Transcriptomic Evidence. *BMC Genomics* **2022**, *23* (1), 600. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08571-z.

Bouhifd, M. The Human Toxome Project. *ALTEX* **2015**, 112–124. https://doi.org/10.14573/altex.1502091.

Butcherine, P.; Kelaher, B. P.; Benkendorff, K. Assessment of Acetylcholinesterase, Catalase, and Glutathione S-Transferase as Biomarkers for Imidacloprid Exposure in Penaeid Shrimp. *Aquatic Toxicology* **2022**, *242*, 106050. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106050.

Campos, A.; Danielsson, G.; Farinha, A. P.; Kuruvilla, J.; Warholm, P.; Cristobal, S. Shotgun Proteomics to Unravel Marine Mussel (Mytilus Edulis) Response to Long-Term Exposure to Low Salinity and Propranolol in a Baltic Sea Microcosm. *Journal of Proteomics* **2016**, *137*, 97–106. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.010.

Catteau, A.; Porcher, J.-M.; Bado-Nilles, A.; Bonnard, I.; Bonnard, M.; Chaumot, A.; David, E.; Dedourge-Geffard, O.; Delahaut, L.; Delorme, N.; François, A.; Garnero, L.; Lopes, C.; Nott, K.; Noury, P.; Palluel, O.; Palos-Ladeiro, M.; Quéau, H.; Ronkart, S.; Sossey-Alaoui, K.; Turiès, C.; Tychon, B.; Geffard, O.; Geffard, A. Interest of a Multispecies Approach in Active Biomonitoring: Application in the Meuse Watershed. *Science of The Total Environment* **2022**, *808*, 152148. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152148.

Ceron-Noriega, A.; Almeida, M. V.; Levin, M.; Butter, F. Nematode Gene Annotation by Machine-Learning-Assisted Proteotranscriptomics Enables Proteome-Wide Evolutionary Analysis. *Genome Res.* **2023**, *33* (1), 112–128. https://doi.org/10.1101/gr.277070.122.

Chan, Y. H.; Chu, K. H.; Chan, K. M. Ecdysteroid-Mimicking Compounds Act as Both Agonists and Antagonists to the Crustacean Ecdysone Receptor. *Chemosphere* **2019**, *237*, 124551. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124551.

Chaumot, A.; Coulaud, R.; Adam, O.; Quéau, H.; Lopes, C.; Geffard, O. In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus Fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the Confounding Influence of Temperature and Water Hardness. *Enviro Toxic and Chemistry* **2020**, *39* (3), 667–677. https://doi.org/10.1002/etc.4655.

CHAUMOT, A.; PERCEVAL, O.; RECOURA-MASSAQUANT, R.; DEGLI ESPOSTI, D.; GEFFARD, O. Des Bioessais Écotoxicologiques in Situ Pour Évaluer Les Impacts Biologiques de La Contamination Chimique Des Cours d'eau Nationaux : L'expérience Du Gammare. **2021**. https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2021.4.16.

Cheong, S. P. S.; Huang, J.; Bendena, W. G.; Tobe, S. S.; Hui, J. H. L. Evolution of Ecdysis and Metamorphosis in Arthropods: The Rise of Regulation of Juvenile Hormone. *Integr. Comp. Biol.* **2015**, *55* (5), 878–890. https://doi.org/10.1093/icb/icv066.

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. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu305.

Ciliberti, A.; Chaumot, A.; Recoura-Massaquant, R.; Chandesris, A.; François, A.; Coquery, M.; Ferréol, M.; Geffard, O. Caged Gammarus as Biomonitors Identifying Thresholds of Toxic Metal Bioavailability That Affect Gammarid Densities at the French National Scale. *Water Research* **2017**, *118*, 131–140. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.031.

Colbourne, J. K.; Pfrender, M. E.; Gilbert, D.; Thomas, W. K.; Tucker, A.; Oakley, T. H.; Tokishita, S.; Aerts, A.; Arnold, G. J.; Basu, M. K.; Bauer, D. J.; Cáceres, C. E.; Carmel, L.; Casola, C.; Choi, J.-H.; Detter, J. C.; Dong, Q.; Dusheyko, S.; Eads, B. D.; Fröhlich, T.; Geiler-Samerotte, K. A.; Gerlach, D.; Hatcher, P.; Jogdeo, S.;

Krijgsveld, J.; Kriventseva, E. V.; Kültz, D.; Laforsch, C.; Lindquist, E.; Lopez, J.; Manak, J. R.; Muller, J.; Pangilinan, J.; Patwardhan, R. P.; Pitluck, S.; Pritham, E. J.; Rechtsteiner, A.; Rho, M.; Rogozin, I. B.; Sakarya, O.; Salamov, A.; Schaack, S.; Shapiro, H.; Shiga, Y.; Skalitzky, C.; Smith, Z.; Souvorov, A.; Sung, W.; Tang, Z.; Tsuchiya, D.; Tu, H.; Vos, H.; Wang, M.; Wolf, Y. I.; Yamagata, H.; Yamada, T.; Ye, Y.; Shaw, J. R.; Andrews, J.; Crease, T. J.; Tang, H.; Lucas, S. M.; Robertson, H. M.; Bork, P.; Koonin, E. V.; Zdobnov, E. M.; Grigoriev, I. V.; Lynch, M.; Boore, J. L. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia Pulex*. *Science* **2011**, *331* (6017), 555–561. https://doi.org/10.1126/science.1197761.

Conesa, A.; Madrigal, P.; Tarazona, S.; Gomez-Cabrero, D.; Cervera, A.; McPherson, A.; Szcześniak, M. W.; Gaffney, D. J.; Elo, L. L.; Zhang, X.; Mortazavi, A. A Survey of Best Practices for RNA-Seq Data Analysis. *Genome Biol* **2016**, *17* (1), 13. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8.

Coulaud, R.; Geffard, O.; Xuereb, B.; Lacaze, E.; Quéau, H.; Garric, J.; Charles, S.; Chaumot, A. In Situ Feeding Assay with Gammarus Fossarum (Crustacea): Modelling the Influence of Confounding Factors to Improve Water Quality Biomonitoring. *Water Research* **2011**, *45* (19), 6417–6429. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.035.

Creusot, N.; Aït-Aïssa, S.; Tapie, N.; Pardon, P.; Brion, F.; Sanchez, W.; Thybaud, E.; Porcher, J.-M.; Budzinski, H. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (7), 3649–3657. https://doi.org/10.1021/es405313r.

Creusot, N.; Dévier, M.-H.; Budzinski, H.; Aït-Aïssa, S. Evaluation of an Extraction Method for a Mixture of Endocrine Disrupters in Sediment Using Chemical and in Vitro Biological Analyses. *Environ Sci Pollut Res* **2016**, *23* (11), 10349–10360. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6062-1.

de Graaf, A. A.; Freidig, A. P.; De Roos, B.; Jamshidi, N.; Heinemann, M.; Rullmann, J. A. C.; Hall, K. D.; Adiels, M.; van Ommen, B. Nutritional Systems Biology Modeling: From Molecular Mechanisms to Physiology. *PLoS Comput Biol* **2009**, *5* (11), e1000554. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000554.

De Wilde, R.; Swevers, L.; Soin, T.; Christiaens, O.; Rougé, P.; Cooreman, K.; Janssen, C. R.; Smagghe, G. Cloning and Functional Analysis of the Ecdysteroid Receptor Complex in the Opossum Shrimp Neomysis Integer (Leach, 1814). *Aquatic Toxicology* **2013**, *130–131*, 31–40. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.011.

de Zwart, D.; Adams, W.; Galay Burgos, M.; Hollender, J.; Junghans, M.; Merrington, G.; Muir, D.; Parkerton, T.; De Schamphelaere, K. A. C.; Whale, G.; Williams, R. Aquatic Exposures of Chemical Mixtures in Urban Environments: Approaches to Impact Assessment: Aquatic Exposures of Chemical Mixtures in Urban Environments. *Environ Toxicol Chem* **2018**, *37* (3), 703–714. https://doi.org/10.1002/etc.3975.

Degli Esposti, D.; Almunia, C.; Guery, M.-A.; Koenig, N.; Armengaud, J.; Chaumot, A.; Geffard, O. Co-Expression Network Analysis Identifies Gonad- and Embryo-Associated Protein Modules in the Sentinel Species Gammarus Fossarum. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 7862. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44203-5.

Degli Esposti, D.; Hernandez-Vargas, H.; Voegele, C.; Fernandez-Jimenez, N.; Forey, N.; Bancel, B.; Calvez-Kelm, F. L.; McKay, J.; Merle, P.; Herceg, Z. Identification of Novel Long Non-Coding RNAs Deregulated in Hepatocellular Carcinoma Using RNA-Sequencing. *Oncotarget* **2016**, *7* (22), 31862–31877. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7364.

Degli Esposti, D.; Sklias, A.; Lima, S. C.; Beghelli-de la Forest Divonne, S.; Cahais, V.; Fernandez-Jimenez, N.; Cros, M.-P.; Ecsedi, S.; Cuenin, C.; Bouaoun, L.; Byrnes, G.; Accardi, R.; Sudaka, A.; Giordanengo, V.; Hernandez-Vargas, H.; Pinto, L. F. R.; Van Obberghen-Schilling, E.; Herceg, Z. Unique DNA Methylation Signature in HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Genome Med* **2017**, *9* (1), 33. https://doi.org/10.1186/s13073-017-0419-z.

Dumas, T.; Courant, F.; Almunia, C.; Boccard, J.; Rosain, D.; Duporté, G.; Armengaud, J.; Fenet, H.; Gomez, E. An Integrated Metabolomics and Proteogenomics Approach Reveals Molecular Alterations Following Carbamazepine Exposure in the Male Mussel Mytilus Galloprovincialis. *Chemosphere* **2022**, *286*, 131793. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131793.

Erwin, D. H.; Davidson, E. H. The Last Common Bilaterian Ancestor. *Development* **2002**, *129* (13), 3021–3032. https://doi.org/10.1242/dev.129.13.3021.

Escher, B. I.; Hackermüller, J.; Polte, T.; Scholz, S.; Aigner, A.; Altenburger, R.; Böhme, A.; Bopp, S. K.; Brack, W.; Busch, W.; Chadeau-Hyam, M.; Covaci, A.; Eisenträger, A.; Galligan, J. J.; Garcia-Reyero, N.; Hartung, T.; Hein, M.; Herberth, G.; Jahnke, A.; Kleinjans, J.; Klüver, N.; Krauss, M.; Lamoree, M.; Lehmann, I.; Luckenbach, T.; Miller, G. W.; Müller, A.; Phillips, D. H.; Reemtsma, T.; Rolle-Kampczyk, U.; Schüürmann, G.; Schwikowski, B.; Tan, Y.-M.; Trump, S.; Walter-Rohde, S.; Wambaugh, J. F. From the Exposome to Mechanistic Understanding of Chemical-Induced Adverse Effects. *Environment International* **2017**, *99*, 97–106. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.029.

Evariste, L.; David, E.; Cloutier, P.-L.; Brousseau, P.; Auffret, M.; Desrosiers, M.; Groleau, P. E.; Fournier, M.; Betoulle, S. Field Biomonitoring Using the Zebra Mussel Dreissena Polymorpha and the Quagga Mussel Dreissena Bugensis Following Immunotoxic Reponses. Is There a Need to Separate the Two Species? *Environmental Pollution* **2018**, *238*, 706–716. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.098.

Farkaš, R.; Daniš, P.; Medved'ová, L.; Mechler, B. M.; Knopp, J. Regulation of Cytosolic Malate Dehydrogenase by Juvenile Hormone in Drosophila Melanogaster. *CBB* **2002**, *37* (1), 37–52. https://doi.org/10.1385/CBB:37:1:37.

Faugere, J.; Brunet, T. A.; Clément, Y.; Espeyte, A.; Geffard, O.; Lemoine, J.; Chaumot, A.; Degli-Esposti, D.; Ayciriex, S.; Salvador, A. Development of a Multi-Omics Extraction Method for Ecotoxicology: Investigation of the Reproductive Cycle of Gammarus Fossarum. *Talanta* **2023**, *253*, 123806. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123806.

Faugere, J.; Gouveia, D.; Ayciriex, S.; Chaumot, A.; Almunia, C.; François, A.; Armengaud, J.; Lemoine, J.; Geffard, O.; Degli-Esposti, D.; Salvador, A. High-Multiplexed Monitoring of Protein Biomarkers in the Sentinel Gammarus Fossarum by Targeted Scout-MRM Assay, a New Vision for Ecotoxicoproteomics. *Journal of Proteomics* **2020**, *226*, 103901. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103901.

Freedman, A. H.; Clamp, M.; Sackton, T. B. Error, Noise and Bias in de Novo Transcriptome Assemblies. *Mol Ecol Resour* **2021**, *21* (1), 18–29. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13156.

Fu, T.; Knittelfelder, O.; Geffard, O.; Clément, Y.; Testet, E.; Elie, N.; Touboul, D.; Abbaci, K.; Shevchenko, A.; Lemoine, J.; Chaumot, A.; Salvador, A.; Degli-Esposti, D.; Ayciriex, S. Shotgun Lipidomics and Mass Spectrometry Imaging Unveil Diversity and Dynamics in Gammarus Fossarum Lipid Composition. *iScience* **2021**, *24* (2), 102115. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102115.

Fu, T.; Oetjen, J.; Chapelle, M.; Verdu, A.; Szesny, M.; Chaumot, A.; Degli-Esposti, D.; Geffard, O.; Clément, Y.; Salvador, A.; Ayciriex, S. In Situ Isobaric Lipid Mapping by MALDI-Ion Mobility Separation-Mass Spectrometry Imaging. *J Mass Spectrom* **2020**, *55* (9), e4531. https://doi.org/10.1002/jms.4531.

Gagné, F. Quantitative Assessments of Biochemical Analyses. In *Biochemical Ecotoxicology*; Elsevier, 2014; pp 1–20. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00001-5.

Geffard, O.; Coquery, M.; Recoura-Massaquant, R.; Perceval, O.; Bolzan, D.; Bourrain, X.; Rebillard, J.-P.; Navarro, L.; Nicolai, M.; Casterot, B.; Ferreol, M.; Villeneuve, B.; Chaumot, A. La Biosurveillance Active Pour Le Suivi de l'état Chimique Des Cours d'eau Continentaux. **2021**. https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2021.4.15.

Geffard, O.; Xuereb, B.; Chaumot, A.; Geffard, A.; Biagianti, S.; Noël, C.; Abbaci, K.; Garric, J.; Charmantier, G.; Charmantier-Daures, M. Ovarian Cycle and Embryonic Development in Gammarus Fossarum: Application for Reproductive Toxicity Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, *29* (10), 2249–2259. https://doi.org/10.1002/etc.268.

Gestin, O.; Lacoue-Labarthe, T.; Coquery, M.; Delorme, N.; Garnero, L.; Dherret, L.; Ciccia, T.; Geffard, O.; Lopes, C. One and Multi-Compartments Toxico-Kinetic Modeling to Understand Metals' Organotropism and Fate in Gammarus Fossarum. *Environment International* **2021**, *156*, 106625. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106625.

Gestin, O.; Lacoue-Labarthe, T.; Delorme, N.; Garnero, L.; Geffard, O.; Lopes, C. Influence of the Exposure Concentration of Dissolved Cadmium on Its Organotropism, Toxicokinetic and Fate in Gammarus Fossarum. *Environment International* **2023**, *171*, 107673. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107673.

Gestin, O.; Lopes, C.; Delorme, N.; Garnero, L.; Geffard, O.; Lacoue-Labarthe, T. Organ-Specific Accumulation of Cadmium and Zinc in Gammarus Fossarum Exposed to Environmentally Relevant Metal Concentrations. *Environmental Pollution* **2022**, *308*, 119625. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119625.

Gouveia, D.; Almunia, C.; Cogne, Y.; Pible, O.; Degli-Esposti, D.; Salvador, A.; Cristobal, S.; Sheehan, D.; Chaumot, A.; Geffard, O.; Armengaud, J. Ecotoxicoproteomics: A Decade of Progress in Our Understanding of Anthropogenic Impact on the Environment. *Journal of Proteomics* **2019**, *198*, 66–77. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001.

Gouveia, D.; Chaumot, A.; Charnot, A.; Almunia, C.; François, A.; Navarro, L.; Armengaud, J.; Salvador, A.; Geffard, O. Ecotoxico-Proteomics for Aquatic Environmental Monitoring: First in Situ Application of a New Proteomics-Based Multibiomarker Assay Using Caged Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (22), 13417–13426. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03736.

Guiglielmoni, N.; Houtain, A.; Derzelle, A.; Van Doninck, K.; Flot, J.-F. Overcoming Uncollapsed Haplotypes in Long-Read Assemblies of Non-Model Organisms. *BMC Bioinformatics* **2021**, *22* (1), 303. https://doi.org/10.1186/s12859-021-04118-3.

Ham, J.; Lim, W.; You, S.; Song, G. Butylated Hydroxyanisole Induces Testicular Dysfunction in Mouse Testis Cells by Dysregulating Calcium Homeostasis and Stimulating Endoplasmic Reticulum Stress. *Science of The Total Environment* **2020**, *702*, 134775. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134775.

Hamadeh, H. K. Gene Expression Analysis Reveals Chemical-Specific Profiles. *Toxicological Sciences* **2002**, *67* (2), 219–231. https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.219.

Handy, R. D.; Depledge, M. H.. *Ecotoxicology* **1999**, *8* (5), 329–349. https://doi.org/10.1023/A:1008930404461.

Hellou, J. Behavioural Ecotoxicology, an "Early Warning" Signal to Assess Environmental Quality. *Environ Sci Pollut Res* **2011**, *18* (1), 1–11. https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2.

Henry, R. P.; Lucu, Č.; Onken, H.; Weihrauch, D. Multiple Functions of the Crustacean Gill: Osmotic/Ionic Regulation, Acid-Base Balance, Ammonia Excretion, and Bioaccumulation of Toxic Metals. *Front. Physio.* **2012**, *3*. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431.

Hödl, E. Legislative Framework for River Ecosystem Management on International and European Level. In *Riverine Ecosystem Management*; Schmutz, S., Sendzimir, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 325–345. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73250-3_17.

Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; McLaren, S.; Sealy, I.; Caccamo, M.; Churcher, C.; Scott, C.; Barrett, J. C.; Koch, R.; Rauch, G.-J.; White, S.; Chow, W.; Kilian, B.; Quintais, L. T.; Guerra-Assunção, J. A.; Zhou, Y.; Gu, Y.; Yen, J.; Vogel, J.-H.; Eyre, T.; Redmond, S.; Banerjee, R.; Chi, J.; Fu, B.; Langley, E.; Maguire, S. F.; Laird, G. K.; Lloyd, D.; Kenyon, E.; Donaldson, S.; Sehra, H.; Almeida-King, J.; Loveland, J.; Trevanion, S.; Jones, M.; Quail, M.; Willey, D.; Hunt, A.; Burton, J.; Sims, S.; McLay, K.; Plumb, B.; Davis, J.; Clee, C.; Oliver, K.; Clark, R.; Riddle, C.; Elliott, D.; Threadgold, G.; Harden, G.; Ware, D.; Begum, S.; Mortimore, B.; Kerry, G.; Heath, P.; Phillimore, B.; Tracey, A.; Corby, N.; Dunn, M.; Johnson, C.; Wood, J.; Clark, S.; Pelan, S.; Griffiths, G.; Smith, M.; Glithero, R.; Howden, P.; Barker, N.; Lloyd, C.; Stevens, C.; Harley, J.; Holt, K.; Panagiotidis, G.; Lovell, J.; Beasley, H.; Henderson, C.; Gordon, D.; Auger, K.; Wright, D.; Collins, J.; Raisen, C.; Dyer, L.; Leung, K.; Robertson, L.; Ambridge, K.; Leongamornlert, D.; McGuire, S.; Gilderthorp, R.; Griffiths, C.; Manthravadi, D.; Nichol, S.; Barker, G.; Whitehead, S.; Kay, M.; Brown, J.; Murnane, C.; Gray, E.; Humphries, M.; Sycamore, N.; Barker, D.; Saunders, D.; Wallis, J.; Babbage, A.; Hammond, S.; Mashreghi-Mohammadi, M.; Barr, L.; Martin, S.; Wray, P.; Ellington, A.; Matthews, N.; Ellwood, M.; Woodmansey, R.; Clark, G.; Cooper, J. D.; Tromans, A.; Grafham, D.; Skuce, C.; Pandian, R.; Andrews, R.; Harrison, E.; Kimberley, A.; Garnett, J.; Fosker, N.; Hall, R.; Garner, P.; Kelly, D.; Bird, C.; Palmer, S.; Gehring, I.; Berger, A.; Dooley, C. M.; Ersan-Ürün, Z.; Eser, C.; Geiger, H.; Geisler, M.; Karotki, L.; Kirn, A.; Konantz, J.; Konantz, M.; Oberländer, M.; Rudolph-Geiger, S.; Teucke, M.; Lanz, C.; Raddatz, G.; Osoegawa, K.; Zhu, B.; Rapp, A.; Widaa, S.; Langford, C.; Yang, F.; Schuster, S. C.; Carter,

N. P.; Harrow, J.; Ning, Z.; Herrero, J.; Searle, S. M. J.; Enright, A.; Geisler, R.; Plasterk, R. H. A.; Lee, C.; Westerfield, M.; de Jong, P. J.; Zon, L. I.; Postlethwait, J. H.; Nüsslein-Volhard, C.; Hubbard, T. J. P.; Crollius, H. R.; Rogers, J.; Stemple, D. L. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, *496* (7446), 498–503. https://doi.org/10.1038/nature12111.

Hwang, D.-S.; Lee, B.-Y.; Kim, H.-S.; Lee, M. C.; Kyung, D.-H.; Om, A.-S.; Rhee, J.-S.; Lee, J.-S. Genome-Wide Identification of Nuclear Receptor (NR) Superfamily Genes in the Copepod Tigriopus Japonicus. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 993. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-993.

Iancu, O. D.; Kawane, S.; Bottomly, D.; Searles, R.; Hitzemann, R.; McWeeney, S. Utilizing RNA-Seq Data for *de Novo* Coexpression Network Inference. *Bioinformatics* **2012**, *28* (12), 1592–1597. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts245.

Jeffery, N. W.; Yampolsky, L.; Gregory, T. R. Nuclear DNA Content Correlates with Depth, Body Size, and Diversification Rate in Amphipod Crustaceans from Ancient Lake Baikal, Russia. *Genome* **2017**, *60* (4), 303–309. https://doi.org/10.1139/gen-2016-0128.

Johnson, A. C.; Sumpter, J. P. Are We Going about Chemical Risk Assessment for the Aquatic Environment the Wrong Way? *Environ Toxicol Chem* **2016**, *35* (7), 1609–1616. https://doi.org/10.1002/etc.3441.

Kakaley, E. K. M.; Wang, H. Y.; LeBlanc, G. A. Agonist-Mediated Assembly of the Crustacean Methyl Farnesoate Receptor. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 45071. https://doi.org/10.1038/srep45071.

Kammers, K.; Cole, R. N.; Tiengwe, C.; Ruczinski, I. Detecting Significant Changes in Protein Abundance. *EuPA Open Proteomics* **2015**, *7*, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.euprot.2015.02.002.

Kao, D.; Lai, A. G.; Stamataki, E.; Rosic, S.; Konstantinides, N.; Jarvis, E.; Di Donfrancesco, A.; Pouchkina-Stancheva, N.; Sémon, M.; Grillo, M.; Bruce, H.; Kumar, S.; Siwanowicz, I.; Le, A.; Lemire, A.; Eisen, M. B.; Extavour, C.; Browne, W. E.; Wolff, C.; Averof, M.; Patel, N. H.; Sarkies, P.; Pavlopoulos, A.; Aboobaker, A. The Genome of the Crustacean Parhyale Hawaiensis, a Model for Animal Development, Regeneration, Immunity and Lignocellulose Digestion. *eLife* **2016**, *5*, e20062. https://doi.org/10.7554/eLife.20062.

Karp, P. D.; Midford, P. E.; Billington, R.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Ong, W. K.; Subhraveti, P.; Caspi, R.; Fulcher, C.; Keseler, I. M.; Paley, S. M. Pathway Tools Version 23.0 Update: Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology. *Briefings in Bioinformatics* **2021**, *22* (1), 109–126. https://doi.org/10.1093/bib/bbz104.

Kasahara, M.; Naruse, K.; Sasaki, S.; Nakatani, Y.; Qu, W.; Ahsan, B.; Yamada, T.; Nagayasu, Y.; Doi, K.; Kasai, Y.; Jindo, T.; Kobayashi, D.; Shimada, A.; Toyoda, A.; Kuroki, Y.; Fujiyama, A.; Sasaki, T.; Shimizu, A.; Asakawa, S.; Shimizu, N.; Hashimoto, S.; Yang, J.; Lee, Y.; Matsushima, K.; Sugano, S.; Sakaizumi, M.; Narita, T.; Ohishi, K.; Haga, S.; Ohta, F.; Nomoto, H.; Nogata, K.; Morishita, T.; Endo, T.; Shin-I, T.; Takeda, H.; Morishita, S.; Kohara, Y. The Medaka Draft Genome and Insights into Vertebrate Genome Evolution. *Nature* **2007**, *447* (7145), 714–719. https://doi.org/10.1038/nature05846.

Kell, D. B. The Virtual Human: Towards a Global Systems Biology of Multiscale, Distributed Biochemical Network Models. *IUBMB Life* **2007**, *59* (11), 689–695. https://doi.org/10.1080/15216540701694252.

Kiani, N. A.; Shang, M.-M.; Zenil, H.; Tegner, J. Predictive Systems Toxicology. In *Computational Toxicology*; Nicolotti, O., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1800, pp 535–557. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1_25.

Kitano, H. Systems Biology: A Brief Overview. *Science* **2002**, *295* (5560), 1662–1664. https://doi.org/10.1126/science.1069492.

Knapen, D.; Angrish, M. M.; Fortin, M. C.; Katsiadaki, I.; Leonard, M.; Margiotta-Casaluci, L.; Munn, S.; O'Brien, J. M.; Pollesch, N.; Smith, L. C.; Zhang, X.; Villeneuve, D. L. Adverse Outcome Pathway Networks I: Development and Applications. *Enviro Toxic and Chemistry* **2018**, *37* (6), 1723–1733. https://doi.org/10.1002/etc.4125.

Knigge, T.; LeBlanc, G. A.; Ford, A. T. A Crab Is Not a Fish: Unique Aspects of the Crustacean Endocrine System and Considerations for Endocrine Toxicology. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 587608. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.587608.

Koenig, N.; Almunia, C.; Bonnal-Conduzorgues, A.; Armengaud, J.; Chaumot, A.; Geffard, O.; Degli Esposti, D. Co-Expression Network Analysis Identifies Novel Molecular Pathways Associated with Cadmium and Pyriproxyfen Testicular Toxicity in Gammarus Fossarum. *Aquatic Toxicology* **2021**, *235*, 105816. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105816.

Kopylova, E.; Noé, L.; Da Silva, C.; Berthelot, J.-F.; Alberti, A.; Aury, J.-M.; Touzet, H. Deciphering Metatranscriptomic Data. In *RNA Bioinformatics*; Picardi, E., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1269, pp 279–291. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2291-8_17.

Kuznetsov, D.; Tegenfeldt, F.; Manni, M.; Seppey, M.; Berkeley, M.; Kriventseva, E. V.; Zdobnov, E. M. OrthoDB V11: Annotation of Orthologs in the Widest Sampling of Organismal Diversity. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51* (D1), D445–D451. https://doi.org/10.1093/nar/gkac998.

Kwon, Y. T.; Xia, Z.; Davydov, I. V.; Lecker, S. H.; Varshavsky, A. Construction and Analysis of Mouse Strains Lacking the Ubiquitin Ligase UBR1 (E3α) of the N-End Rule Pathway. *Mol Cell Biol* **2001**, *21* (23), 8007–8021. https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8007-8021.2001.

La Merrill, M. A.; Vandenberg, L. N.; Smith, M. T.; Goodson, W.; Browne, P.; Patisaul, H. B.; Guyton, K. Z.; Kortenkamp, A.; Cogliano, V. J.; Woodruff, T. J.; Rieswijk, L.; Sone, H.; Korach, K. S.; Gore, A. C.; Zeise, L.; Zoeller, R. T. Consensus on the Key Characteristics of Endocrine-Disrupting Chemicals as a Basis for Hazard Identification. *Nat Rev Endocrinol* **2020**, *16* (1), 45–57. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8.

Lafontaine, A.; Gismondi, E.; Boulangé-Lecomte, C.; Geraudie, P.; Dodet, N.; Caupos, F.; Lemoine, S.; Lagadic, L.; Thomé, J.-P.; Forget-Leray, J. Effects of Chlordecone on 20-Hydroxyecdysone Concentration and Chitobiase Activity in a Decapod Crustacean, Macrobrachium Rosenbergii. *Aquatic Toxicology* **2016**, *176*, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.006.

Laine, J. E.; Bodinier, B.; Robinson, O.; Plusquin, M.; Scalbert, A.; Keski-Rahkonen, P.; Robinot, N.; Vermeulen, R.; Pizzi, C.; Asta, F.; Nawrot, T.; Gulliver, J.; Chatzi, L.; Kogevinas, M.; Nieuwenhuijsen, M.; Sunyer, J.; Vrijheid, M.; Chadeau-Hyam, M.; Vineis, P. Prenatal Exposure to Multiple Air Pollutants, Mediating Molecular Mechanisms, and Shifts in Birthweight. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (22), 14502–14513. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02657.

Langfelder, P.; Horvath, S. WGCNA: An R Package for Weighted Correlation Network Analysis. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9* (1), 559. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559.

Leprêtre, M.; Almunia, C.; Armengaud, J.; Le Guernic, A.; Salvador, A.; Geffard, A.; Palos-Ladeiro, M. Identification of Immune-Related Proteins of Dreissena Polymorpha Hemocytes and Plasma Involved in Host-Microbe Interactions by Differential Proteomics. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 6226. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63321-z.

Leprêtre, M.; Geffard, A.; Palos Ladeiro, M.; Dedourge-Geffard, O.; David, E.; Delahaut, L.; Bonnard, I.; Barjhoux, I.; Nicolaï, M.; Noury, P.; Espeyte, A.; Chaumot, A.; Degli-Esposti, D.; Geffard, O.; Lopes, C. Determination of Biomarkers Threshold Values and Illustration of Their Use for the Diagnostic in Large-Scale Freshwater Biomonitoring Surveys. *Environ Sci Eur* **2022a**, *34* (1), 115. https://doi.org/10.1186/s12302-022-00692-2.

Leprêtre, M.; Geffard, O.; Espeyte, A.; Faugere, J.; Ayciriex, S.; Salvador, A.; Delorme, N.; Chaumot, A.; Degli-Esposti, D. Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for the Discovery of Environmentally Modulated Proteins in an Aquatic Invertebrate Sentinel Species, Gammarus Fossarum. *Environmental Pollution* **2022b**, *315*, 120393. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120393.

Levin, M.; Butter, F. Proteotranscriptomics – A Facilitator in Omics Research. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2022**, *20*, 3667–3675. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.07.007.

Lewin, H. A.; Richards, S.; Lieberman Aiden, E.; Allende, M. L.; Archibald, J. M.; Bálint, M.; Barker, K. B.; Baumgartner, B.; Belov, K.; Bertorelle, G.; Blaxter, M. L.; Cai, J.; Caperello, N. D.; Carlson, K.; Castilla-Rubio, J. C.; Chaw, S.-M.; Chen, L.; Childers, A. K.; Coddington, J. A.; Conde, D. A.; Corominas, M.; Crandall, K. A.; Crawford, A. J.; DiPalma, F.; Durbin, R.; Ebenezer, T. E.; Edwards, S. V.; Fedrigo, O.; Flicek, P.; Formenti, G.; Gibbs, R. A.; Gilbert, M. T. P.; Goldstein, M. M.; Graves, J. M.; Greely, H. T.; Grigoriev, I. V.; Hackett, K. J.; Hall, N.; Haussler, D.; Helgen, K. M.; Hogg, C. J.; Isobe, S.; Jakobsen, K. S.; Janke, A.; Jarvis, E. D.; Johnson, W. E.; Jones, S. J. M.; Karlsson, E. K.; Kersey, P. J.; Kim, J.-H.; Kress, W. J.; Kuraku, S.; Lawniczak, M. K. N.; Leebens-Mack, J. H.; Li, X.; Lindblad-Toh, K.; Liu, X.; Lopez, J. V.; Marques-Bonet, T.; Mazard, S.; Mazet, J. A. K.; Mazzoni, C. J.; Myers, E. W.; O'Neill, R. J.; Paez, S.; Park, H.; Robinson, G. E.; Roquet, C.; Ryder, O. A.; Sabir, J. S. M.; Shaffer, H. B.; Shank, T. M.; Sherkow, J. S.; Soltis, P. S.; Tang, B.; Tedersoo, L.; Uliano-Silva, M.; Wang, K.; Wei, X.; Wetzer, R.; Wilson, J. L.; Xu, X.; Yang, H.; Yoder, A. D.; Zhang, G. The Earth BioGenome Project 2020: Starting the Clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (4), e2115635118. https://doi.org/10.1073/pnas.2115635118.

Lewin, H. A.; Robinson, G. E.; Kress, W. J.; Baker, W. J.; Coddington, J.; Crandall, K. A.; Durbin, R.; Edwards, S. V.; Forest, F.; Gilbert, M. T. P.; Goldstein, M. M.; Grigoriev, I. V.; Hackett, K. J.; Haussler, D.; Jarvis, E. D.; Johnson, W. E.; Patrinos, A.; Richards, S.; Castilla-Rubio, J. C.; van Sluys, M.-A.; Soltis, P. S.; Xu, X.; Yang, H.; Zhang, G. Earth BioGenome Project: Sequencing Life for the Future of Life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115* (17), 4325–4333. https://doi.org/10.1073/pnas.1720115115.

Li, J.; Gao, L.; Zhu, B.-B.; Lin, Z.-J.; Chen, J.; Lu, X.; Wang, H.; Zhang, C.; Chen, Y.-H.; Xu, D.-X. Long-Term 1-Nitropyrene Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibits Steroidogenesis in Mice Testes. *Chemosphere* **2020**, *251*, 126336. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126336.

Li, Q.-Y.; Li, Z.-L.; Lu, M.-X.; Cao, S.-S.; Du, Y.-Z. Selection of Valid Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Cotesia Chilonis (Hymenoptera: Braconidae) Exposed to Different Temperatures. *PLoS ONE* **2019**, *14* (12), e0226139. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226139.

Loof, A. D.; Lindemans, M.; Liu, F.; De Groef, B.; Schoofs, L. Endocrine Archeology: Do Insects Retain Ancestrally Inherited Counterparts of the Vertebrate Releasing Hormones GnRH, GHRH, TRH, and CRF? *General and Comparative Endocrinology* **2012**, *177* (1), 18–27. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.02.002.

Lopes, C.; Chaumot, A.; Xuereb, B.; Coulaud, R.; Jubeaux, G.; Quéau, H.; François, A.; Geffard, O. In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus Fossarum* (Crustacea): Part 2—Evaluating the Relevance of Using a Molt Cycle Temperature-Dependent Model as a Reference to Assess Toxicity in Freshwater Monitoring. *Enviro Toxic and Chemistry* **2020**, *39* (3), 678–691. https://doi.org/10.1002/etc.4656.

Lu, Y.; Yuan, M.; Gao, X.; Kang, T.; Zhan, S.; Wan, H.; Li, J. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in Spodoptera Litura (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE* **2013**, *8* (7), e68059. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068059.

Lv, X.; Yang, Y.; Tao, Y.; Jiang, Y.; Chen, B.; Zhu, X.; Cai, Z.; Li, B. A Mechanism Study on Toxicity of Graphene Oxide to Daphnia Magna: Direct Link between Bioaccumulation and Oxidative Stress. *Environmental Pollution* **2018**, *234*, 953–959. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.034.

Macikova, P.; Groh, K. J.; Ammann, A. A.; Schirmer, K.; Suter, M. J.-F. Endocrine Disrupting Compounds Affecting Corticosteroid Signaling Pathways in Czech and Swiss Waters: Potential Impact on Fish. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (21), 12902–12911. https://doi.org/10.1021/es502711c.

Maitre, L.; de Bont, J.; Casas, M.; Robinson, O.; Aasvang, G. M.; Agier, L.; Andrušaitytė, S.; Ballester, F.; Basagaña, X.; Borràs, E.; Brochot, C.; Bustamante, M.; Carracedo, A.; de Castro, M.; Dedele, A.; Donaire-Gonzalez, D.; Estivill, X.; Evandt, J.; Fossati, S.; Giorgis-Allemand, L.; R Gonzalez, J.; Granum, B.; Grazuleviciene, R.; Bjerve Gützkow, K.; Småstuen Haug, L.; Hernandez-Ferrer, C.; Heude, B.; Ibarluzea, J.; Julvez, J.; Karachaliou, M.; Keun, H. C.; Hjertager Krog, N.; Lau, C.-H. E.; Leventakou, V.; Lyon-Caen, S.; Manzano, C.; Mason, D.; McEachan, R.; Meltzer, H. M.; Petraviciene, I.; Quentin, J.; Roumeliotaki, T.; Sabido, E.; Saulnier, P.-J.; Siskos, A. P.; Siroux, V.; Sunyer, J.; Tamayo, I.; Urquiza, J.; Vafeiadi, M.; van Gent, D.; Vives-Usano, M.; Waiblinger, D.; Warembourg, C.; Chatzi, L.; Coen, M.; van den Hazel, P.; Nieuwenhuijsen, M. J.; Slama, R.; Thomsen, C.; Wright, J.; Vrijheid, M. Human Early Life Exposome (HELIX) Study: A European Population-Based Exposome Cohort. *BMJ Open* **2018**, *8* (9), e021311. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-021311.

Maitre, L.; Guimbaud, J.-B.; Warembourg, C.; Güil-Oumrait, N.; Petrone, P. M.; Chadeau-Hyam, M.; Vrijheid, M.; Basagaña, X.; Gonzalez, J. R. State-of-the-Art Methods for Exposure-Health Studies: Results from the Exposome Data Challenge Event. *Environment International* **2022**, *168*, 107422. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107422.

Marie, B. Disentangling of the Ecotoxicological Signal Using "Omics" Analyses, a Lesson from the Survey of the Impact of Cyanobacterial Proliferations on Fishes. *Science of The Total Environment* **2020**, *736*, 139701. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139701.

Marx, V. Method of the Year: Long-Read Sequencing. *Nat Methods* **2023**, *20* (1), 6–11. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01730-w.

Mathers, T. C.; Chen, Y.; Kaithakottil, G.; Legeai, F.; Mugford, S. T.; Baa-Puyoulet, P.; Bretaudeau, A.; Clavijo, B.; Colella, S.; Collin, O.; Dalmay, T.; Derrien, T.; Feng, H.; Gabaldón, T.; Jordan, A.; Julca, I.; Kettles, G. J.; Kowitwanich, K.; Lavenier, D.; Lenzi, P.; Lopez-Gomollon, S.; Loska, D.; Mapleson, D.; Maumus, F.; Moxon, S.; Price, D. R. G.; Sugio, A.; van Munster, M.; Uzest, M.; Waite, D.; Jander, G.; Tagu, D.; Wilson, A. C. C.; van Oosterhout, C.; Swarbreck, D.; Hogenhout, S. A. Rapid Transcriptional Plasticity of Duplicated Gene Clusters Enables a Clonally Reproducing Aphid to Colonise Diverse Plant Species. *Genome Biol* **2017**, *18* (1), 27. https://doi.org/10.1186/s13059-016-1145-3.

McManus, C. J.; Graveley, B. R. RNA Structure and the Mechanisms of Alternative Splicing. *Current Opinion in Genetics & Development* **2011**, *21* (4), 373–379. https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.04.001.

Melvin, S. D.; Lanctôt, C. M.; Doriean, N. J. C.; Bennett, W. W.; Carroll, A. R. NMR-Based Lipidomics of Fish from a Metal(Loid) Contaminated Wetland Show Differences Consistent with Effects on Cellular Membranes and Energy Storage. *Science of The Total Environment* **2019**, *654*, 284–291. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.113.

Milinkovitch, T.; Geffard, O.; Geffard, A.; Mouneyrac, C.; Chaumot, A.; Xuereb, B.; Fisson, C.; Minier, C.; Auffret, M.; Perceval, O.; Egea, E.; Sanchez, W. Biomarkers as Tools for Monitoring within the Water Framework Directive Context: Concept, Opinions and Advancement of Expertise. *Environ Sci Pollut Res* **2019**, *26* (32), 32759–32763. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06434-x.

Miyake, K.; Baba, Y. De Novo Transcriptome Assembly of the Midgut Glands of Herbivorous Land Crabs, Chiromantes Haematocheir, and Identification of Laccase Genes Involved in Lignin Degradation. *J Comp Physiol B* **2022**, *192* (2), 247–261. https://doi.org/10.1007/s00360-021-01424-3.

Morandin, C.; Tin, M. M. Y.; Abril, S.; Gómez, C.; Pontieri, L.; Schiøtt, M.; Sundström, L.; Tsuji, K.; Pedersen, J. S.; Helanterä, H.; Mikheyev, A. S. Comparative Transcriptomics Reveals the Conserved Building Blocks Involved in Parallel Evolution of Diverse Phenotypic Traits in Ants. *Genome Biol* **2016**, *17* (1), 43. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0902-7.

Moshtaghi, A.; Rahi, Md. L.; Mather, P. B.; Hurwood, D. A. Understanding the Genomic Basis of Adaptive Response to Variable Osmotic Niches in Freshwater Prawns: A Comparative Intraspecific RNA-Seq Analysis of Macrobrachium Australiense. *Journal of Heredity* **2017**, *108* (5), 544–552. https://doi.org/10.1093/jhered/esx045.

Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H.; Arakane, Y.; Yang, Q. Chitin Organizing and Modifying Enzymes and Proteins Involved In Remodeling of the Insect Cuticle. In *Targeting Chitin-containing Organisms*; Yang, Q., Fukamizo, T., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, 2019; Vol. 1142, pp 83–114. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_5.

Nègre; Aite; Belcour; Frioux; Brillet-Guéguen; Liu; Bordron; Godfroy; Lipinska; Leblanc; Siegel; Dittami; Corre; Markov. Genome–Scale Metabolic Networks Shed Light on the Carotenoid Biosynthesis Pathway in the Brown Algae Saccharina Japonica and Cladosiphon Okamuranus. *Antioxidants* **2019**, *8* (11), 564. https://doi.org/10.3390/antiox8110564.

Noriega, F. G.; Oliveira, P. L. Editorial Overview: Molecular Physiology: From Omics Data Encyclopedia to Physiology 'Short Stories.' *Current Opinion in Insect Science* **2018**, *29*, vi–viii. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.08.004.

Nurk, S.; Koren, S.; Rhie, A.; Rautiainen, M.; Bzikadze, A. V.; Mikheenko, A.; Vollger, M. R.; Altemose, N.; Uralsky, L.; Gershman, A.; Aganezov, S.; Hoyt, S. J.; Diekhans, M.; Logsdon, G. A.; Alonge, M.; Antonarakis, S. E.; Borchers, M.; Bouffard, G. G.; Brooks, S. Y.; Caldas, G. V.; Chen, N.-C.; Cheng, H.; Chin, C.-S.; Chow, W.; de Lima, L. G.; Dishuck, P. C.; Durbin, R.; Dvorkina, T.; Fiddes, I. T.; Formenti, G.; Fulton, R. S.; Fungtammasan, A.; Garrison, E.; Grady, P. G. S.; Graves-Lindsay, T. A.; Hall, I. M.; Hansen, N. F.; Hartley, G. A.; Haukness, M.; Howe, K.; Hunkapiller, M. W.; Jain, C.; Jain, M.; Jarvis, E. D.; Kerpedjiev, P.; Kirsche, M.; Kolmogorov, M.; Korlach, J.; Kremitzki, M.; Li, H.; Maduro, V. V.; Marschall, T.; McCartney, A. M.; McDaniel, J.; Miller, D. E.; Mullikin, J. C.; Myers, E. W.; Olson, N. D.; Paten, B.; Peluso, P.; Pevzner, P. A.; Porubsky, D.; Potapova, T.; Rogaev, E. I.; Rosenfeld, J. A.; Salzberg, S. L.; Schneider, V. A.; Sedlazeck, F. J.; Shafin, K.; Shew, C. J.; Shumate, A.; Sims, Y.; Smit, A. F. A.; Soto, D. C.; Sović, I.; Storer, J. M.; Streets, A.; Sullivan, B. A.; Thibaud-Nissen, F.; Torrance, J.; Wagner, J.; Walenz, B. P.; Wenger, A.; Wood, J. M. D.; Xiao, C.; Yan, S. M.; Young, A. C.; Zarate, S.; Surti, U.; McCoy, R. C.; Dennis, M. Y.; Alexandrov, I. A.; Gerton, J. L.; O'Neill, R. J.; Timp, W.; Zook, J. M.; Schatz, M. C.; Eichler, E. E.; Miga, K. H.; Phillippy, A. M. The Complete Sequence of a Human Genome. *Science* **2022**, *376* (6588), 44–53. https://doi.org/10.1126/science.abj6987.

Orsini, L.; Brown, J. B.; Shams Solari, O.; Li, D.; He, S.; Podicheti, R.; Stoiber, M. H.; Spanier, K. I.; Gilbert, D.; Jansen, M.; Rusch, D. B.; Pfrender, M. E.; Colbourne, J. K.; Frilander, M. J.; Kvist, J.; Decaestecker, E.; De Schamphelaere, K. A. C.; De Meester, L. Early Transcriptional Response Pathways in *Daphnia Magna* Are Coordinated in Networks of Crustacean-specific Genes. *Mol Ecol* **2018**, *27* (4), 886–897. https://doi.org/10.1111/mec.14261.

Paley, S.; Karp, P. D. The BioCyc Metabolic Network Explorer. *BMC Bioinformatics* **2021**, *22* (1), 208. https://doi.org/10.1186/s12859-021-04132-5.

Pei, G.; Chen, L.; Zhang, W. WGCNA Application to Proteomic and Metabolomic Data Analysis. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2017; Vol. 585, pp 135–158. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.016.

Perkins, E. J.; Ankley, G. T.; Crofton, K. M.; Garcia-Reyero, N.; LaLone, C. A.; Johnson, M. S.; Tietge, J. E.; Villeneuve, D. L. Current Perspectives on the Use of Alternative Species in Human Health and Ecological Hazard Assessments. *Environmental Health Perspectives* **2013**, *121* (9), 1002–1010. https://doi.org/10.1289/ehp.1306638.

Poynton, H. C.; Hasenbein, S.; Benoit, J. B.; Sepulveda, M. S.; Poelchau, M. F.; Hughes, D. S. T.; Murali, S. C.; Chen, S.; Glastad, K. M.; Goodisman, M. A. D.; Werren, J. H.; Vineis, J. H.; Bowen, J. L.; Friedrich, M.; Jones, J.; Robertson, H. M.; Feyereisen, R.; Mechler-Hickson, A.; Mathers, N.; Lee, C. E.; Colbourne, J. K.; Biales, A.; Johnston, J. S.; Wellborn, G. A.; Rosendale, A. J.; Cridge, A. G.; Munoz-Torres, M. C.; Bain, P. A.; Manny, A. R.; Major, K. M.; Lambert, F. N.; Vulpe, C. D.; Tuck, P.; Blalock, B. J.; Lin, Y.-Y.; Smith, M. E.; Ochoa-Acuña, H.; Chen, M.-J. M.; Childers, C. P.; Qu, J.; Dugan, S.; Lee, S. L.; Chao, H.; Dinh, H.; Han, Y.; Doddapaneni, H.; Worley, K. C.; Muzny, D. M.; Gibbs, R. A.; Richards, S. The Toxicogenome of *Hyalella Azteca* : A Model for Sediment Ecotoxicology and Evolutionary Toxicology. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (10), 6009–6022. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00837.

Prado-Álvarez, M.; Dios, S.; García-Fernández, P.; Tur, R.; Hachero-Cruzado, I.; Domingues, P.; Almansa, E.; Varó, I.; Gestal, C. De Novo Transcriptome Reconstruction in Aquacultured Early Life Stages of the Cephalopod Octopus Vulgaris. *Sci Data* **2022**, *9* (1), 609. https://doi.org/10.1038/s41597-022-01735-2.

Prasad, T. S. K.; Mohanty, A. K.; Kumar, M.; Sreenivasamurthy, S. K.; Dey, G.; Nirujogi, R. S.; Pinto, S. M.; Madugundu, A. K.; Patil, A. H.; Advani, J.; Manda, S. S.; Gupta, M. K.; Dwivedi, S. B.; Kelkar, D. S.; Hall, B.; Jiang, X.; Peery, A.; Rajagopalan, P.; Yelamanchi, S. D.; Solanki, H. S.; Raja, R.; Sathe, G. J.; Chavan, S.; Verma, R.; Patel, K. M.; Jain, A. P.; Syed, N.; Datta, K. K.; Khan, A. A.; Dammalli, M.; Jayaram, S.; Radhakrishnan, A.; Mitchell, C. J.; Na, C.-H.; Kumar, N.; Sinnis, P.; Sharakhov, I. V.; Wang, C.; Gowda, H.; Tu, Z.; Kumar, A.; Pandey, A. Integrating Transcriptomic and Proteomic Data for Accurate Assembly and Annotation of Genomes. *Genome Res.* **2017**, *27* (1), 133–144. https://doi.org/10.1101/gr.201368.115.

Prat, O.; Degli-Esposti, D. New Challenges: Omics Technologies in Ecotoxicology. In *Ecotoxicology*; Elsevier, 2019; pp 181–208. https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50006-7.

Raghavan, V.; Kraft, L.; Mesny, F.; Rigerte, L. A Simple Guide to *de Novo* Transcriptome Assembly and Annotation. *Briefings in Bioinformatics* **2022**, *23* (2), bbab563. https://doi.org/10.1093/bib/bbab563.

Ratier, A.; Lopes, C.; Labadie, P.; Budzinski, H.; Delorme, N.; Quéau, H.; Peluhet, L.; Geffard, O.; Babut, M. A Bayesian Framework for Estimating Parameters of a Generic Toxicokinetic Model for the Bioaccumulation of Organic Chemicals by Benthic Invertebrates: Proof of Concept with PCB153 and Two Freshwater Species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *180*, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.080.

Roark, A. M. Endocrine Disruptors and Marine Systems. In *Encyclopedia of the World's Biomes*; Elsevier, 2020; pp 188–194. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12426-1.

Rollin, M.; Coulaud, R.; Rocher, B.; Duflot, A.; Poret, A.; Le Foll, F.; Xuereb, B. N-Acetyl-β-d-Glucosaminidase Activity in Palaemon Serratus - Methodological Optimisation and Intrinsic Variability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2021**, *256*, 110932. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110932.

Rollin, M.; Coulaud, R.; Rocher, B.; Billoir, E.; Geffard, O.; Duflot, A.; Fromont, C.; Boulangé-Lecomte, C.; Le Foll, F.; Xuereb, B. Effects of Chemical Compounds on the Activity of the *N* -acetyl-β-D-Glucosaminidase of the Marine Prawn, *Palaemon Serratus* : Screening In Vitro. *Enviro Toxic and Chemistry* **2023**, etc.5567. https://doi.org/10.1002/etc.5567.

Sarkis, N.; Geffard, O.; Souchon, Y.; Chandesris, A.; Ferréol, M.; Valette, L.; François, A.; Piffady, J.; Chaumot, A.; Villeneuve, B. Identifying the Impact of Toxicity on Stream Macroinvertebrate Communities in a Multi-Stressor Context Based on National Ecological and Ecotoxicological Monitoring Databases. *Science of The Total Environment* **2023**, *859*, 160179. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160179.

Schatz, M. C.; Delcher, A. L.; Salzberg, S. L. Assembly of Large Genomes Using Second-Generation Sequencing. *Genome Res.* **2010**, *20* (9), 1165–1173. https://doi.org/10.1101/gr.101360.109.

Schmidt, C. W. Toxicogenomics: An Emerging Discipline. *Environmental Health Perspectives* **2002**, *110* (12). https://doi.org/10.1289/ehp.110-a750.

Scholz, S.; Nichols, J. W.; Escher, B. I.; Ankley, G. T.; Altenburger, R.; Blackwell, B.; Brack, W.; Burkhard, L.; Collette, T. W.; Doering, J. A.; Ekman, D.; Fay, K.; Fischer, F.; Hackermüller, J.; Hoffman, J. C.; Lai, C.; Leuthold, D.; Martinovic-Weigelt, D.; Reemtsma, T.; Pollesch, N.; Schroeder, A.; Schüürmann, G.; von Bergen, M. The Eco-Exposome Concept: Supporting an Integrated Assessment of Mixtures of Environmental Chemicals. *Enviro Toxic and Chemistry* **2022**, *41* (1), 30–45. https://doi.org/10.1002/etc.5242.

Schwarzenbach, R. P.; Escher, B. I.; Fenner, K.; Hofstetter, T. B.; Johnson, C. A.; von Gunten, U.; Wehrli, B. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science* **2006**, *313* (5790), 1072–1077. https://doi.org/10.1126/science.1127291.

Sessegolo, C.; Cruaud, C.; Da Silva, C.; Cologne, A.; Dubarry, M.; Derrien, T.; Lacroix, V.; Aury, J.-M. Transcriptome Profiling of Mouse Samples Using Nanopore Sequencing of CDNA and RNA Molecules. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 14908. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51470-9.

Shonouda, M.; Osman, W. Ultrastructural Alterations in Sperm Formation of the Beetle, Blaps Polycresta (Coleoptera: Tenebrionidae) as a Biomonitor of Heavy Metal Soil Pollution. *Environ Sci Pollut Res* **2018**, *25* (8), 7896–7906. https://doi.org/10.1007/s11356-017-1172-y.

Smyth, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **2004**, *3* (1), 1–25. https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027.

Subramoniam, T. Mechanisms and Control of Vitellogenesis in Crustaceans. *Fish Sci* **2011**, *77* (1), 1–21. https://doi.org/10.1007/s12562-010-0301-z.

Thiele, I.; Sahoo, S.; Heinken, A.; Hertel, J.; Heirendt, L.; Aurich, M. K.; Fleming, R. M. Personalized Whole-body Models Integrate Metabolism, Physiology, and the Gut Microbiome. *Mol Syst Biol* **2020**, *16* (5). https://doi.org/10.15252/msb.20198982.

Tibshirani, R.; Hastie, T.; Narasimhan, B.; Chu, G. Diagnosis of Multiple Cancer Types by Shrunken Centroids of Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99* (10), 6567–6572. https://doi.org/10.1073/pnas.082099299.

Tousova, Z.; Oswald, P.; Slobodnik, J.; Blaha, L.; Muz, M.; Hu, M.; Brack, W.; Krauss, M.; Di Paolo, C.; Tarcai, Z.; Seiler, T.-B.; Hollert, H.; Koprivica, S.; Ahel, M.; Schollée, J. E.; Hollender, J.; Suter, M. J.-F.; Hidasi, A. O.; Schirmer, K.; Sonavane, M.; Ait-Aissa, S.; Creusot, N.; Brion, F.; Froment, J.; Almeida, A. C.; Thomas, K.; Tollefsen, K. E.; Tufi, S.; Ouyang, X.; Leonards, P.; Lamoree, M.; Torrens, V. O.; Kolkman, A.; Schriks, M.; Spirhanzlova, P.; Tindall, A.; Schulze, T. European Demonstration Program on the Effect-Based and Chemical Identification and Monitoring of Organic Pollutants in European Surface Waters. *Science of The Total Environment* **2017**, *601–602*, 1849–1868. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032.

Trapp, J.; Armengaud, J.; Gaillard, J.-C.; Pible, O.; Chaumot, A.; Geffard, O. High-Throughput Proteome Dynamics for Discovery of Key Proteins in Sentinel Species: Unsuspected Vitellogenins Diversity in the Crustacean Gammarus Fossarum. *Journal of Proteomics* **2016**, *146*, 207–214. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.007.

Trapp, J.; Armengaud, J.; Pible, O.; Gaillard, J.-C.; Abbaci, K.; Habtoul, Y.; Chaumot, A.; Geffard, O. Proteomic Investigation of Male *Gammarus Fossarum* , a Freshwater Crustacean, in Response to Endocrine Disruptors. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (1), 292–303. https://doi.org/10.1021/pr500984z.

Trapp, J.; Geffard, O.; Imbert, G.; Gaillard, J.-C.; Davin, A.-H.; Chaumot, A.; Armengaud, J. Proteogenomics of Gammarus Fossarum to Document the Reproductive System of Amphipods. *Molecular & Cellular Proteomics* **2014**, *13* (12), 3612–3625. https://doi.org/10.1074/mcp.M114.038851.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. [No Title Found]. *Genome Biol* **2002**, *3* (7), research0034.1. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

Veldhoen, N.; Ikonomou, M. G.; Helbing, C. C. Molecular Profiling of Marine Fauna: Integration of Omics with Environmental Assessment of the World's Oceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2012**, *76*, 23–38. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.005.

Vellozo, A. F.; Veron, A. S.; Baa-Puyoulet, P.; Huerta-Cepas, J.; Cottret, L.; Febvay, G.; Calevro, F.; Rahbe, Y.; Douglas, A. E.; Gabaldon, T.; Sagot, M.-F.; Charles, H.; Colella, S. CycADS: An Annotation Database System to Ease the Development and Update of BioCyc Databases. *Database* **2011**, *2011* (0), bar008–bar008. https://doi.org/10.1093/database/bar008.

Villeneuve, D. L.; Garcia-Reyero, N. Vision & Strategy: Predictive Ecotoxicology in the 21st Century. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2011**, *30* (1), 1–8. https://doi.org/10.1002/etc.396.

Vineis, P.; Chadeau-Hyam, M.; Gmuender, H.; Gulliver, J.; Herceg, Z.; Kleinjans, J.; Kogevinas, M.; Kyrtopoulos, S.; Nieuwenhuijsen, M.; Phillips, D. H.; Probst-Hensch, N.; Scalbert, A.; Vermeulen, R.; Wild, C. P. The Exposome in Practice: Design of the EXPOsOMICS Project. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2017**, *220* (2), 142–151. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.08.001.

Vitousek, M. N.; Johnson, M. A.; Husak, J. F. Illuminating Endocrine Evolution: The Power and Potential of Large-Scale Comparative Analyses. *Integrative and Comparative Biology* **2018**, *58* (4), 712–719. https://doi.org/10.1093/icb/icy098.

Wang, K.; Liang, Y.; Duan, M.; Che, W.; He, L. Chronic Toxicity of Broflanilide in Daphnia Magna: Changes in Molting, Behavior, and Gene Expression. *Environ Sci Pollut Res* **2023**. https://doi.org/10.1007/s11356-023-26255-3.

Wernersson, A.-S.; Carere, M.; Maggi, C.; Tusil, P.; Soldan, P.; James, A.; Sanchez, W.; Dulio, V.; Broeg, K.; Reifferscheid, G.; Buchinger, S.; Maas, H.; Van Der Grinten, E.; O'Toole, S.; Ausili, A.; Manfra, L.; Marziali, L.; Polesello, S.; Lacchetti, I.; Mancini, L.; Lilja, K.; Linderoth, M.; Lundeberg, T.; Fjällborg, B.; Porsbring, T.; Larsson, D. J.; Bengtsson-Palme, J.; Förlin, L.; Kienle, C.; Kunz, P.; Vermeirssen, E.; Werner, I.; Robinson, C. D.; Lyons, B.; Katsiadaki, I.; Whalley, C.; den Haan, K.; Messiaen, M.; Clayton, H.; Lettieri, T.; Carvalho, R. N.; Gawlik, B. M.; Hollert, H.; Di Paolo, C.; Brack, W.; Kammann, U.; Kase, R. The European Technical Report on

Aquatic Effect-Based Monitoring Tools under the Water Framework Directive. *Environ Sci Eur* **2015**, *27* (1), 7. https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4.

Wild, C. P. Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2005**, *14* (8), 1847–1850. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456.

Wilson, L. B.; McClure, R. S.; Waters, K. M.; Simonich, M. T.; Tanguay, R. L. Concentration-Response Gene Expression Analysis in Zebrafish Reveals Phenotypically-Anchored Transcriptional Responses to Retene. *Front. Toxicol.* **2022**, *4*, 950503. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.950503.

Wilson, V. S. A Novel Cell Line, MDA-Kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicological Sciences* **2002**, *66* (1), 69–81. https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.69.

Wolkenhauer, O. Systems Biology: The Reincarnation of Systems Theory Applied in Biology? *Briefings in Bioinformatics* **2001**, *2* (3), 258–270. https://doi.org/10.1093/bib/2.3.258.

Yuan, H.; Qin, F.; Guo, W.; Gu, H.; Shao, A. Oxidative Stress and Spermatogenesis Suppression in the Testis of Cadmium-Treated Bombyx Mori Larvae. *Environ Sci Pollut Res* **2016**, *23* (6), 5763–5770. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5818-3.

Zhang, B.; Horvath, S. A General Framework for Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **2005**, *4* (1). https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128.

Zhang, T.; Xing, W.; Wang, A.; Zhang, N.; Jia, L.; Ma, S.; Xia, Q. Comparison of Long-Read Methods for Sequencing and Assembly of Lepidopteran Pest Genomes. *IJMS* **2022**, *24* (1), 649. https://doi.org/10.3390/ijms24010649.

ANNEXES

CURRICULUM VITAE

Davide DEGLI ESPOSTI
Chargé de recherche en écotoxicologie
ORCHID ID 0000-0003-1390-4845
Adresse professionnel :
Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement,
Laboratoire d'écotoxicologie
UR RiverLy, Centre de Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes
5 rue de la Doua - CS 20244,
69625 Villeurbanne Cedex, France

PARCOURS PROFESSIONNEL

Depuis 2017 **Chargé de recherche en écotoxicologie** Irstea/INRAE
Etudes de la physiologie moléculaire et des modes d'action de contaminants chez les espèces sentinelles à travers l'utilisation d'approche *-omiques*.

2012-2017 **Post-doc** Mechanisms of carcinogenesis - Epigenetic group
International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation
Lyon, Rhône-Alpes, FR
Etude des mécanismes moléculaires à l'aide d'approches omiques et de biologie des systèmes dans les cancers associés à des expositions environnementales.

2011-2012 **Post-doc** Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire
Hôpital Paul Brousse - INSERM U1004: Paris-Villejuif, FR
Rôle des protéines anti apoptotiques du réticulum endoplasmique dans un modèle cellulaire de stéatohépatite.

2007-2011 **Thèse** Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire
Hôpital Paul Brousse - INSERM U1004: Paris-Villejuif, FR
Etude des mécanismes biochimiques de survie des cellules hépatiques dans le contexte de la cancérogenèse hépatique.

2003-2007 **Chercheur** en cancérogenèse environnementale, Istituto Ramazzini: Bologna - Bentivoglio, IT
Conduite d'études toxicologiques chez les rongeurs sur agents chimiques et physiques potentiellement cancérigènes pour l'Homme.

2000-2003 **Chercheur R&D** en nutrition et produit pour l'agriculture, Guaber S.p.A.

FORMATION

1995-2000 ***Laurea* en Biotechnologie Industrielle** (équivalent français: **DEA**)
Note final: 110 e lode (équivalent aux félicitations du jury)
Université de Bologne, Italie
Mémoire de DEA: « Mécanismes de transport du taxol dans des suspension des cellules de *Taxus baccata* »

2007-2011 **Doctorat en Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire**. **Université Paris-Sud Paris XI**
Sujet : « Les mécanismes de réponse à l'inflammation chronique dans le foie stéatosique et les conséquences sur l'homéostasie cellulaire et la cancérogenèse ».
Note final : mention « très honorable ».

ENCADREMENT ET ENSEIGNEMENT

Thèses

T1 **Diego Uribe** (2018). Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia (15%).

T2 **Athena Sklias** (2019). Université de Lyon 1 (25%). Régulation de l'épigénome par le récepteur des œstrogènes dans le cancer du sein.

T3 **Natacha Koenig** (2022). Université Lyon 1 (80%). Approches bioinformatiques pour l'exploration sans a priori des voies moléculaires chez les espèces non modèles : le cas du métabolisme lipidique chez *Gammarus fossarum*.

T4 **Auréline Lalouette** (en cours). Université Lyon 1 (25%). Plasticité de la sensibilité toxicologie et des traits d'histoire de vie comme facteur explicatif de la vulnérabilité des espèces d'invertébrés aquatiques face à la contamination métallique.

Post-docs

P1 **Maxime Leprêtre** (en cours). (50%). Etudes protéomiques pour l'Identification de biomarqueurs moléculaires en lien avec la réponse au stress métallique au niveau des organes du gammare *Gammarus fossarum*.

P2 **Kevin Sugier** (2022). (25%). Multi-omics exploration of proteome conservation and divergence within the diversity of crustacean gammarids, application in ecotoxicology.

Masters

M1 **Picard Léa** (2014). Master 2 Génétique, Biologie cellulaire et Pathologie, Université de Lyon 1. Identification of cancer associate long non coding RNAs in an in vitro model of early liver disease.

M2 **Marc Antoine Guery** (2018). Master 1 Bioinformatique Moléculaire Méthodes et Analyses Université de Lyon 1. Détermination de protéines d'intérêt du système reproducteur de Gammarus fossarum par l'approche des réseaux de co-expression

M3 **Mélanie Bonhomme** (2019). Master 1 Bioinformatique Moléculaire Méthodes et Analyses Université de Lyon 1. Identification de gènes conservés d'intérêt écotoxicologique à partir de données RNA-Seq sur différentes espèces de gammaridés.

M4 Sarah Bancel (2021). Master 2 Biodiversité, Ecologie, Evolution. Université Paris Sorbonne. Etude du caractère perturbateur endocrinien de différents insecticides chez le crustacé Gammarus fossarum. Approche par protéomique ciblée.

M5 Victor Deguise (2021). Master 1 Bioinformatique Moléculaire Méthodes et Analyses Université de Lyon 1. Développement d'outils bio-informatique pour l'identification et l'analyse de la famille des cytochromes P450 impliqués dans la synthèse des hormones ecdystéroïdes chez différentes espèces de gammaridés

M6 Zineb Chaabi (2022). Master 1 Biochimie Biologie Moléculaire Université de Lyon 1. Etude de l'expression des métallothionéines chez l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*.

M7 Louveline Lepaule (2022). Master 2 Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement Université de Bordeaux. Etude de l'organotropisme des métallothionéines et du rôle de leur expression dans l'acquisition de la tolérance au cadmium chez l'espèce *Gammarus fossarum*.

M8 Amélie Lafont (2022). Master 2 Bioinformatique Moléculaire Méthodes et Analyses Université de Lyon 1. Multi-omics approach for the annotation of metabolic pathways in sentinel species *Gammarus fossarum*. Applications in ecotoxicology

M9 Sarah Oddoux (2022). Master 1 Toxicologie Ecotoxicologie Université Le Mans. Recherche de signatures moléculaires chez des femelles de l'espèce *Gammarus fossarum* exposées à des potentiels perturbateurs endocriniens.

M10 Isis Lorenzo Colina (en cours, co-encadrement Dr. Christelle Lopes, LBBE, Université Lyon 1). Master 2 Bioinformatique Moléculaire Méthodes et Analyses Université de Lyon 1. Étude du lien entre bioaccumulation des métaux et effets au niveau moléculaire et individue chez l'amphipode *Gammarus fossarum.*

Enseignement en formation initiale

2006-2007.	Cancérogenèse environnementale. Université de Bologna, Italie. 4h/an
2009-2011.	Master Mécanismes de différentiation et prolifération cellulaire. Université de Paris-Sud Paris 11. 3h/an.
2014-2015.	Master Génétique. Université de Lyon 1. 2h/an
Depuis 2019.	Master Ecotechnologies. Ecole Polytechnique. 4h/an
Depuis 2019.	Master MRESTE (Recherche en Environnement-Santé-Toxicologie-Ecotoxicologie). Université de Grenoble. 3h/an
Depuis 2021.	Intervention UE ToxRisk, Université Paris Sorbonne, Museum National d'Histoire Naturelle. 2h/an

EXPERTISE

Evaluateur de projets de recherche de l'APR PNR EST 2020 de l'ANSES.

Evaluateur de projets de recherche de l'Appel à Projets ESR 2020 Région Nouvelle Aquitaine.

Evaluation d'article pour les revues :

BMC Genomics; Cell Biology and Toxicology; Environmental Pollution; International Journal of Molecular Medicine; Oncotarget and Therapy; PeerJ; Plos One; Chemosphere; International Journal of Molecular Sciences; Comparative Biochemistry and Physiology part D: Genomics and Proteomics; Environmental Science and Pollution Research; Science of Total Environment; Environmental Pollution, International Journal of Molecular Sciences.

PROJETS DE RECHERCHE

Coordinateur.

AAP ANR 2019. Systems biology for investigating the molecular mechanisms of toxicological effects induced by environmental exposures to aquatic contaminants (SYSTER). Non financé à la phase 2.

Projet ThECA (ANSES 2019/1/112). Integrated testing tool to identify and quantify new endocrine disrupting chemicals in crustaceans. Obtention 2019. 42 k€

AAP ANR 2020. Data-driven network biology for investigating the molecular mechanisms of toxicological effects induced by environmental exposures to aquatic contaminants (sYSTER). Non financé à la phase 2.

AAP ANR 2021. Data-driven network biology for investigating the molecular mechanisms of toxicological effects induced by environmental exposures to aquatic contaminants (sYSTER). Non financé à la phase 2.

Projet GamfoCyc (FR BioEEnviS, financeur: CNRS). Approche multi-omiques pour l'annotation des voies métaboliques chez l'espèce sentinelle Gammarus fossarum. Application en écotoxicologie. Obtention 2022. 10k€

Projet PACS (EC2CO CNRS). Proteomics and ACtive biomonitoring to move aquatic ecotoxicology towards an expoSome approach. Obtention 2023 (24 k€).

Partenaire

ANR Proteomics for novel biomarkers relevant in ecotoxicology from gammarids : challenging the biodiversity and multiplexed immunoassay as diagnostic tool. Coordinateur: Olivier Geffard. Partenaire. Obtention 2015.

ANR. Integrated Approach to Propose PRoteomics for environmental biOmonitoring: accumulation, fate and multi-markers (Approve). Coordinateur: Olivier Geffard. Partenaire. Obtention 2019

ANR. Proteomics and Lipidomics approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity in conjunction with lipid metabolism in Gammarus fossarum during reproduction cycle. (Plan-Tox). Coordinatrice: Sophie Ayciriex. Partenaire. Obtention 2019

OFB 2019-2021. Protéomique ciblée pour la quantification multiplexée de biomarqueurs : perspectives pour la surveillance environnementale. Coordinateur: Arnaud Chaumot. Partenaire. Obtention 2019

PUBLICATIONS

Articles scientifiques

1. Fornalè S, Degli Esposti D, Navia-Osori A, Cusidò RM, Palazòn J, Pinol MT, Bagni N. Taxol transport in Taxus baccata cell suspension cultures. Plant Physiol Biochem 2002; 40: 81-8.
2. Soffritti M, Belpoggi F, Padovani M, Lauriola M, Degli Esposti D, Minardi F. Life-time carcinogenicity bioassays of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats. Eur J Oncol 2004; 9(2): 91-102.
3. Soffritti M, Minardi F, Bua L, Degli Esposti D, Belpoggi F. First experimental evidence of peritoneal and pleural mesotheliomas induces by fluoro-edenite fibres present in Etnean volcanic material from Biancavilla (Sicily, Italy). Eur J Oncol 2004; 9(3): 169-75.
4. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Lambertini L. Aspartame induces lymphomas and leukaemias in rats. Eur J Oncol 2005; 10(2): 107-16.
5. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Lambertini L, Tibaldi E, Rigano A. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. Environ Health Perspect 2006; 114(3): 379-385.
6. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Lambertini L. Results of a long term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to sodium arsenite administered in drinking water. Ann NY Acad Sci 2006; 1076: 578-591
7. Belpoggi F, Soffritti M, Padovani M, Degli Esposti D, Lauriola M, Minardi F. Results of a long term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. Ann NY Acad Sci 2006; 1076: 559-577.
8. Soffritti M, Patelli M, Degli Esposti D, Lambertini L, Fornelli A, Belpoggi F. Pleural mesothelioma in a goldsmith. Eur J Oncol 2007; 12(1): 41-46 [In Italian].
9. Soffritti M, Belpoggi F, Tibaldi E, Degli Esposti D, Lauriola M. Lifespan exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. Environ Health Perpect 2007; 115(9): 1293-1297.
10. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Falcioni L, Bua L. Long-term consequences of exposure to carcinogens beginning during developmental life. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008; 102(2): 118-124.
11. Einbond LS, Soffritti M, Degli Esposti D, Park T, Su T, Wu H, Wang X, Zhang YJ, Ham J, Cruz E, Goldberg IJ, Kronenberg F, Vladimirova A. Actein activates stress- and statin-associated responses and is bioavailable in Sprague-Dawley rats. Fundament Clinic Pharmacol 2009; 23(3): 311-321.
12. Domart MC*, Degli Esposti D*, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G, Franc B, Tanabe KK, Debuire B, Azoulay D, Brenner C, Lemoine A. Concurrent induction of necrosis, apoptosis and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. J Hepatol 2009; 51: 881-889. *Contributed equally
13. Degli Esposti D, Pham P, Saffroy R, Azoulay D, Debuire B, Lemoine A. Environmental risk factors in primary liver cancer: a review of the literature and perspectives for primary prevention and early detection. Eur J Oncol 2009; 3: 133-150.
14. Degli Esposti D*, Domart MC*, Sebagh M, Harper F, Pierron G, Brenner C, Lemoine A. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis. Autophagy, 2010; 1: 172-174. *Contributed equally
15. Andreani P, Hoti E, de la Serna S, Degli Esposti D, Sebagh M, Lemoine A, Ichai P, Saliba F, Castaing D, Azoulay D. Ischemic preconditioning of the graft in adult living related right lobe liver transplantation: impact on ischemia-reperfusion injury and clinical relevance. HPB, 2010; 12: 439-446.
16. Degli Esposti D, M Sebagh, P Pham, M Reffas, C Poüs, C Brenner, D Azoulay, A Lemoine. Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes. Cell Death and Disease 2, e111 (13 January 2011) doi:10.1038/cddis. 2010.89
17. Mayola E, Gallerne C, Degli Esposti D, Martel C,Pervaiz S, Larue L, Debuire B, Lemoine A, Brenner C, Lemaire C. Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down regulation of Bcl-2. Apoptosis, 2011; 16(10): 1014-1027.
18. Martel C, Degli Esposti D, Bouchet A, Brenner C, Lemoine A. Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012; 13: 726-735
19. Einbond LS, Soffritti M, Degli Esposti D, Wu H, Tibaldi E, Lauriola M, He K, Park T, Su T, Huggins L, Wang X, Roller M, Brennan R. Pharmacological mechanisms of black cohosh in Sprague–Dawley rats.

Fitoterapia, 2012; 83:461-8.

20. Einbond LS, Soffritti M, Degli Esposti D, Tibaldi E, Lauriola M, Bua L, He K, Genovese G, Su T Huggins L, Wang X, Roller M, Brennan R, Wu H. Chemopreventive Potential of Black Cohosh on breast cancer in Sprague-Dawley rats. Anticancer Res, 2012; 32: 21-30.
21. Degli Esposti D, Hamelin J, Bosselut N, Saffroy R, Sebagh M, Pommier A, Martel C, Lemoine A. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. Biochemistry Research International. 2012. http://dx.doi.org/10.1155/2012/387626.
22. Sebagh M, Samuel D, Antonini TM, Coilly A, Degli Esposti D, Roche B, Karam V, Dos Santos A, Duclos-Vallée JC, Roque-Afonso AM, Ballot E, Guettier C, Blandin F, Saliba F, Azoulay D.Twenty-year protocol liver biopsies: Invasive but useful for the management of liver recipients. J Hepatol. 2012 Apr;56(4):840-7.
23. Martel C, Allouche M, Degli Esposti D, Fanelli E, Boursier C, Henry C, Chopineau J, Calamita G, Kroemer G, Lemoine A, Brenner C. Glycogen synthase kinase 3-mediated voltage-dependent anion channel phosphorylation controls outer mitochondrial membrane permeability during lipid accumulation. Hepatology. 2013 Jan;57(1):93-102. doi: 10.1002/hep.25967.
24. Tufo G, Jones AW, Wang Z, Hamelin J, Tajeddine N, Degli Esposti D, Martel C, Boursier C, Gallerne C, Migdal C, Lemaire C, Szabadkai G, Lemoine A, Kroemer G, Brenner C. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. Cell Death Differ. 2014 May;21(5):685-95. doi: 10.1038/cdd.2013.193.
25. Lambert MP, Ancey PB, Degli Esposti D, Cros MP, Sklias A, Scoazec JY, Durantel D, Hernandez-Vargas H, Herceg Z.Aberrant DNA methylation of imprinted loci in hepatocellular carcinoma and after in vitro exposure to common risk factors.Clin Epigenetics. 2015 Feb 27;7(1):15. doi: 10.1186/s13148-015-0053-9. eCollection 2015.
26. Ricca L, Lemoine A, Cauchy F, Hamelin J, Sebagh M, Degli Esposti D, Salloum C, Vibert E, Balducci G, Azoulay D. Ischemic Postconditioning of the Liver Graft in Adult Liver Transplantation. Transplantation. 2015 Aug;99(8):1633-43. doi: 10.1097/TP.0000000000000685.
27. Degli Esposti D, Hernandez-Vargas H, Voegele C, Fernandez-Jimenez N, Forey N, Bancel B, Le Calvez-Kelm F, Mckay J, Merle P, Herceg Z. Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing. Oncotarget. 2016 Feb 13. doi: 10.18632/oncotarget.7364
28. Holmila R, Sklias A, Muller D, de Santos-Silva D, Degli Esposti D, Guilloreau P, Mckay J, Sangrajrang S, Srivatanakul P, Hainaut P, Merle P, Herceg Z, Nogueira da Costa A. Targeted deep sequencing of plasma circulating DNA shows VIM and FBLN1 methylation as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2017 Mar 23;12(3):e0174265. doi: 10.1371/journal.pone.0174265.
29. Degli Esposti D, Sklias A, Lima SC, Beghelli-de la Forest Divonne S, Cahais V, Fernandez-Jimenez N, Cros MP et al. Unique DNA methylation signature in HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas. Genome Med. 2017 Apr 5;9(1):33. doi: 10.1186/s13073-017-0419-z.
30. Fernandez-Jimenez N, Sklias A, Ecsedi S, Cahais V, Degli-Esposti D, Jay A, Ancey PB, Woo HD, Hernandez-Vargas H, Herceg Z. Lowly methylated region analysis identifies EBF1 as a potential epigenetic modifier in breast cancer. Epigenetics. 2017;12(11):964-972. doi: 10.1080/15592294.2017.1373919.
31. Degli Esposti D, Aushev VN, Lee E, Cros MP, Zhu J, Herceg Z, Chen J, Hernandez-Vargas H. miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival. Sci Rep. 2017 Nov 21;7(1):15966. doi: 10.1038/s41598-017-16226-3.
32. Aushev VN, Lee E, Zhu J, Gopalakrishnan K, Li Q, Teitelbaum SL, Wetmur J, Degli Esposti D, Hernandez-Vargas H, Herceg Z, Parada H, Santella RM, Gammon MD, Chen J. Novel Predictors of Breast Cancer Survival Derived from miRNA Activity Analysis. Clin Cancer Res. 2018 Feb 1;24(3):581-591. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0996.
33. Gouveia D, Bonneton F, Almunia C, Armengaud J, Quéau H, Degli-Esposti D, Geffard O, Chaumot A. Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species Gammarus fossarum. Sci Rep. 2018 Feb 28;8(1):3793. doi: 10.1038/s41598-018-22235-7
34. Herceg Z, Ghantous A, Wild CP, Sklias A, Casati L, Duthie SJ, Fry R, Issa JP, Kellermayer R, Koturbash I, Kondo Y, Lepeule J, Lima SCS, Marsit CJ, Rakyan V, Saffery R, Taylor JA, Teschendorff AE, Ushijima T, Vineis P, Walker CL, Waterland RA, Wiemels J, Ambatipudi S, Degli Esposti D, Hernandez-Vargas H. Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of cancer. Int J Cancer. 2018 Mar 1;142(5):874-882. doi: 10.1002/ijc.31014.
35. Woo HD, Fernandez-Jimenez N, Ghantous A, Degli Esposti D, Cuenin C, Cahais V, Choi IJ, Kim YI, Kim J, Herceg Z. Genome-wide profiling of normal gastric mucosa identifies Helicobacter pylori- and cancer-associated DNA methylome changes. Int J Cancer. 2018 Mar 25. doi: 10.1002/ijc.31381.

36. Demetriou C, Degli Esposti D, Pullen Fedinick K, Russo F, Robinson O, Vineis P. Chemical carcinogenesis and the hallmarks of cancer: A temporal perspective. Eur J Clin Invest. 2018 Mar 31:e12933. doi: 10.1111/eci.12933.

37. Trapp J, Gouveia D, Almunia C, Pible O, Degli-Esposti D, Gaillard JC, Chaumot A, Geffard O, Armengaud J. 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. Front Env Sci. 2018 June 13. doi: 10.3389/fenvs.2018.00054

38. Uribe D, Cardona A, Degli Esposti D, Cros MP, Cuenin C, Herceg Z, Camargo M, Cortés-Mancera FM. Antiproliferative Effects of Epigenetic Modifier Drugs Through E-cadherin Up-regulation in Liver Cancer Cell Lines. Ann Hepatol. 2018 May-June;17(3):444-460.

39. Einbond LS, Soffritti M, Degli Esposti D, Wu HA, Balick M, Ma H, Redenti S, Roter A.A transcriptomic analysis of black cohosh: Actein alters cholesterol biosynthesis pathways and synergizes with simvastatin. Food Chem Toxicol. 2018 Jun 30. pii: S0278-6915(18)30438-1

40. Gouveia D, Almunia C, Cogne Y, Pible O, Degli-Esposti D, Salvador A, Cristobal S, Sheehan D, Chaumot A, Geffard O, Armengaud J. Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. J Proteomics. 2018 Dec 6. pii: S1874-3919(18)30423-8 doi: 10.1016/j.jprot.2018.12.001.

41. Cogne Y, Almunia C, Gouveia D, Pible O, François A, Degli-Esposti D, Geffard O, Armengaud J, Chaumot A. Comparative proteomics in the wild: Accounting for intrapopulation variability improves describing proteome response in a Gammarus pulex field population exposed to cadmium. Aquatic Tox. 2019, 214 https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105244

42. Fernandez-Jimenez N, Garcia-Etxebarria K, Plaza-Izurieta L, Romero-Garmendia I, Jauregi-Miguel A, Legarda M, Ecsedi S, Castellanos-Rubio A, Cahais V, Cuenin C, Degli Esposti D, Irastorza I, Hernandez-Vargas H, Herceg Z, Bilbao JR. The methylome of the celiac intestinal epithelium harbours genotype-independent alterations in the HLA region. Sci Rep. 2019 Feb 4;9(1):1298. doi: 10.1038/s41598-018-37746-6.

43. Gouveia D, Cogne Y, Gaillard JC, Almunia C, Pible O, François A, Degli-Esposti D, Geffard O, Chaumot A, Armengaud J. Shotgun proteomics datasets acquired on Gammarus pulex animals sampled from the wild. Data Brief. 2019 Oct 12;27:104650. doi: 10.1016/j.dib.2019.

44. Degli Esposti D, Almunia C, Guery MA, Koenig N, Armengaud J, Chaumot A, Geffard O. Co-expression network analysis identifies gonad- and embryo-associated protein modules in the sentinel species Gammarus fossarum. Sci Rep. 2019 May 27;9(1):7862. doi: 10.1038/s41598-019-44203-5.

45. Pez F, Gifu P, Degli Esposti D, Fares N, Lopez A, Lefrancois L, Michelet M, Rivoire M, Bancel B, Sylla BS, Herceg Z, Merle P, de Fromentel CC. In vitro transformation of primary human hepatocytes: Epigenetic changes and stemness properties. Exp Cell Res. 2019 Sep 23:111643. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111643.

46. Cogne Y, Degli-Esposti D, Pible O, Gouveia D, François A, Bouchez O, Eché C, Ford A, Geffard O, Armengaud J, Chaumot A, Almunia C. De novo transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. Scientific Data. 2019 10.1038/s41597-019-0192-5

47. Cogne Y, Gouveia D, Chaumot A, Degli-Esposti D, Geffard O, Pible O, Almunia C, Armengaud J. Proteogenomics-Guided Evaluation of RNA-Seq Assembly and Protein Database Construction for Emergent Model Organisms. Proteomics. 2020 May;20(10):e1900261. doi: 10.1002/pmic.201900261.

48. Gouveia D, Pible O, Culotta K, Jouffret V, Geffard O, Chaumot A, Degli-Esposti D, Armengaud J. Combining proteogenomics and metaproteomics for deep taxonomic and functional characterization of microbiomes from a non-sequenced host. NPJ Biofilms Microbiomes. 2020 Jun 5;6(1):23. doi: 10.1038/s41522-020-0133-2.

49. Cribiu P, Devaux A, Garnero L, Abbaci K, Bastide T, Delorme N, Quéau H, Degli Esposti D, Ravanat JL, Geffard O, Bony S, Chaumot A. A "Population Dynamics" Perspective on the Delayed Life-History Effects of Environmental Contaminations: An Illustration with a Preliminary Study of Cadmium Transgenerational Effects over Three Generations in the Crustacean Gammarus. Int J Mol Sci. 2020 Jul 1;21(13):E4704. doi: 10.3390/ijms21134704.

50. Faugere J, Gouveia D, Ayciriex S, Chaumot A, Almunia C, François A, Armengaud J, Lemoine J, Geffard O, Degli-Esposti D, Salvador A. High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the sentinel Gammarus fossarum by targeted scout-MRM assay, a new vision for ecotoxicoproteomics. J Proteomics. 2020 Jul 12;226:103901. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103901.

51. Fu T, Oetjen J, Chapelle M, Verdu A, Szesny M, Chaumot A, Degli-Esposti D, Geffard O, Clément Y, Salvador A, Ayciriex S. In situ isobaric lipid mapping by MALDI-ion mobility separation-mass spectrometry

imaging. J Mass Spectrom. 2020 Sep;55(9):e4531. doi: 10.1002/jms.4531.

52. Fu T, Knittelfelder O, Geffard O, Clément Y, Testet E, Elie N, Touboul D, Abbaci K, Shevchenko A, Lemoine J, Chaumot A, Salvador A, Degli-Esposti D, Ayciriex S. Shotgun lipidomics and mass spectrometry imaging unveil diversity and dynamics in Gammarus fossarum lipid composition. iScience. 2021 Jan 29;24(2):102115. doi: 10.1016/j.isci.2021.102115.
53. Koenig N, Almunia C, Bonnal-Conduzorgues A, Armengaud J, Chaumot A, Geffard O, Degli Esposti D. Co-expression network analysis identifies novel molecular pathways associated with cadmium and pyriproxyfen testicular toxicity in Gammarus fossarum. .Aquat Toxicol. 2021 Mar 26;235:105816. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.
54. Soares-Lima SC, Mehanna H, Camuzi D, de Souza-Santos PT, Simão TA, Nicolau-Neto P, Almeida Lopes MS, Cuenin C, Talukdar FR, Batis N, Costa I, Dias F, Degli Esposti D, Boroni M, Herceg Z, Ribeiro Pinto LF. Upper Aerodigestive Tract Squamous Cell Carcinomas Show Distinct Overall DNA Methylation Profiles and Different Molecular Mechanisms behind WNT Signaling Disruption. Cancers (Basel). 2021 Jun 16;13(12):3014. doi: 10.3390/cancers13123014
55. Camuzi D, Buexm LA, Lourenço SQC, Degli Esposti D, Cuenin C, Lopes MSA, Manara F, Talukdar FR, Herceg Z, Ribeiro Pinto LF, Soares-Lima SC. HPV Infection Leaves a DNA Methylation Signature in Oropharyngeal Cancer Affecting Both Coding Genes and Transposable Elements. Cancers (Basel). 2021 Jul 20;13(14):3621. doi: 10.3390/cancers13143621.
56. Cosio C, Degli-Esposti D, Almunia C, Gaillet V, Sartelet H, Armengaud J, Chaumot A, Geffard O, Geffard A. Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in Gammarus fossarum and Its Impact on the Amphipod Proteome. Environ Sci Technol. 2021 Aug 3;55(15):10514-10523. doi: 10.1021/acs.est.1c02385. Epub 2021 Jul 20
57. Ruivo R, Sousa J, Neuparth T, Geffard O, Chaumot A, Castro LFC, Degli-Esposti D, Santos MM. From Extrapolation to Precision Chemical Hazard Assessment: The Ecdysone Receptor Case Study. Toxics. 2022, 10 (1), pp.6. https://doi.org/10.3390/toxics10010006
58. Faugere J, Brunet TA, Clément Y, Espeyte A, Geffard O, Lemoine J, Chaumot A, Degli-Esposti D, Ayciriex S, Salvador A. Development of a multi-omics extraction method for ecotoxicology: investigation of the reproductive cycle of *Gammarus fossarum*. Talanta. 2022 Aug 28;253:123806. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123806.
59. Leprêtre M, Geffard O, Espeyte A, Faugere J, Ayciriex S, Salvador A, Delorme N, Chaumot A, Degli-Esposti D. Multiple reaction monitoring mass spectrometry for the discovery of environmentally modulated proteins in an aquatic invertebrate sentinel species, *Gammarus fossarum*. Environ Pollut. 2022 Oct 9;315:120393. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120393.
60. Leprêtre M, Geffard A, Palos Ladeiro M, Dedourge-Geffard, David E, Delahaut L, Bonnard I, Barjhoux I, Nicolaï M, Noury P, Espeyte A, Chaumot A, Degli-Esposti D, Geffard O, Christelle L. Determination of biomarkers threshold values and illustration of their use for the diagnostic in large-scale freshwater biomonitoring surveys. Environ Sci Eur 34, 115 (2022). https://doi.org/10.1186/s12302-022-00692-2.
61. Calabrese V, Salvador A, Clément Y, Brunet TA, Espeyte A, Chaumot A, Geffard O, Degli-Esposti D, Ayciriex S. Challenges and perspectives in MS-based omics approaches for ecotoxicology studies: an insight on gammarids sentinel species. Front Anal Sci 3; 2023. https://doi.org/10.3389/frans.2023.1118494

Revue techniques

1. Chaumot A, Perceval O, Recoura-Massaquant R, Degli Esposti D, Geffard O. Des bioessais écotoxicologiques in situ pour évaluer les impacts biologiques de la contamination chimique des cours d'eau nationaux : l'expérience du gammare. Sciences Eaux & Territoires, 2021, 37, pp.88-91. ⟨10.14758/SET-REVUE.2021.4.16⟩. ⟨hal-03601759⟩

Chapitre d'ouvrage

1. Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D. Cancer Prevention: The Lesson from the Lab. In Biasco G, Tanneberger S (Eds) Cancer Medicine, Chapter 3. Bologna: Bonomia University Press. 2006.
2. Degli Esposti D, Soffritti M, Lemoine A, Tibaldi E, Manservigi M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and etiology. In Wan-Yee Lau (Ed) Hepatocellular Carcinoma / Book 2, Chapter 1. The Chinese University of Hong Kong, Prince of Wales Hospital, Hong Kong SAR, China. 2012
3. Demetriou C, Degli Esposti D, Fedinick KP, Vineis P. Exposomics: Meet-in-the-Middle and Network Perturbation. In Sonia Dagnino and Anthony Macherone (Eds): Unraveling the Exposome, 978-3-319-

89320-4, 432672_1_En, (2018)

4. Pratt O, Degli Esposti D. Omics Technologies in Ecotoxicology. In by E. Gross and J. Garric (Eds) Ecotoxicology, new challenges and new approaches .ISTE Press, ELSEVIER (2019).
5. Chaumot A, Degli Esposti D, Santos MM, Geffard O. Ecotoxicology, aquatic invertebrates. In Reference Module in Biomedical Sciences. DOI: 10.1016/B978-0-12-824315-2.00116-0.

PUBLICATIONS CHOISIES

Biologie des systèmes pour la physiologie et l'écotoxicologie moléculaire.

44. Degli Esposti D, Almunia C, Guery MA, Koenig N, Armengaud J, Chaumot A, Geffard O. Co-expression network analysis identifies gonad- and embryo-associated protein modules in the sentinel species Gammarus fossarum. Sci Rep. 2019 May 27;9(1):7862. doi: 10.1038/s41598-019-44203-5.

53. Koenig N, Almunia C, Bonnal-Conduzorgues A, Armengaud J, Chaumot A, Geffard O, Degli Esposti D. Co-expression network analysis identifies novel molecular pathways associated with cadmium and pyriproxyfen testicular toxicity in Gammarus fossarum. .Aquat Toxicol. 2021 Mar 26;235:105816. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.

Protéomique *in situ*

50. Faugere J, Gouveia D, Ayciriex S, Chaumot A, Almunia C, François A, Armengaud J, Lemoine J, Geffard O, Degli-Esposti D, Salvador A. High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the sentinel Gammarus fossarum by targeted scout-MRM assay, a new vision for ecotoxicoproteomics. J Proteomics. 2020 Jul 12;226:103901. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103901.

59. Leprêtre M, Geffard O, Espeyte A, Faugere J, Ayciriex S, Salvador A, Delorme N, Chaumot A, Degli-Esposti D. Multiple reaction monitoring mass spectrometry for the discovery of environmentally modulated proteins in an aquatic invertebrate sentinel species, *Gammarus fossarum*. Environ Pollut. 2022 Oct 9;315:120393. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120393.