

---

## LA PROTÉOMIQUE DE NOUVELLE GÉNÉRATION POUR LA SURVEILLANCE ÉCOTOXICOLOGIQUE DES ENVIRONNEMENTS AQUATIQUES

**Duarte GOUVEIA**<sup>1,3</sup>, **Arnaud CHAUMOT**<sup>1</sup>, **Arnaud SALVADOR**<sup>2</sup>, **Davide DEGLI-  
ESPOSTI**<sup>1</sup>, **Christine ALMUNIA**<sup>3</sup>, **Jean ARMENGAUD**<sup>3</sup>, **Olivier GEFFARD**<sup>1</sup>,

Travail effectué au sein des établissements suivants :

<sup>1</sup> Irstea, UR RiverLy, Laboratoire d'écotoxicologie, F-69625 Villeurbanne, France

<sup>2</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRA, F-30207 Bagnols sur Cèze, France.

Présenté par Dominique **JOB**

Directeur de Recherche émérite au CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France,  
section 6 (Sciences de la vie)

### Résumé :

La surveillance écotoxicologique des environnements aquatiques repose sur l'observation chez des organismes sentinelles d'effets toxiques liés à une contamination environnementale. Elle se voit à l'heure actuelle fortement encouragée par le recours possible aux outils moléculaires de nouvelle génération. Nous proposons ici une méthodologie s'appuyant sur le couplage de techniques « omiques » afin de définir des biomarqueurs renseignant de la qualité des écosystèmes aquatiques. Une fois définis, ces multiples biomarqueurs peuvent être dosés rapidement à l'aide de spectromètres de masse en tandem. Nous décrivons ici le processus de découverte et de validation de biomarqueurs faisant appel à deux types d'analyses protéomiques, et l'illustrons pour une espèce non-modèle commune dans nos rivières, le crustacé *Gammarus fossarum*. Les protéines candidates biomarqueurs ont tout d'abord été identifiées par une approche de protéogénomique comparative. Une méthode de quantification absolue de ces protéines par spectrométrie de masse ciblée a ensuite été développée pour permettre le suivi simultané de 25 biomarqueurs d'intérêt à partir d'un seul organisme prélevé. La capacité de cette approche comme outil de diagnostic de la qualité des écosystèmes aquatiques a été testée à large échelle en analysant des centaines de prélèvements de terrain réalisés sur les réseaux de surveillance opérationnels. Ce concept novateur couplant la biosurveillance active et l'analyse multi-biomarqueurs par spectrométrie de masse à haute résolution peut être appliqué à tout type d'organismes sentinelles. Les données enregistrées permettent alors de proposer un indicateur très performant et fiable de l'état de réactivité et de sensibilité de ces organismes sentinelles aux perturbations chimiques environnementales.

## NEXT-GENERATION PROTEOMICS FOR THE ECOTOXICOLOGICAL MONITORING OF AQUATIC ENVIRONMENTS

### **Abstract :**

*The ecotoxicological monitoring of aquatic environments relies on the observation in sentinel organisms of possible toxic effects due to toxic exposures. In recent times, these observations have been shifting from single biomarker-based classical biochemical techniques, to the use of next generation high-throughput molecular tools. In this work, we propose an omics-based methodology for defining biomarkers that will inform about the quality of aquatic ecosystems. Once selected, these multiple biomarkers can be quickly assayed using tandem mass spectrometry. We describe the implementation of a two-stage proteomics-based biomarker discovery and validation workflow, illustrated with a case study using a non-model sentinel species that is highly represented in European rivers, the amphipod *Gammarus fossarum*. Candidate biomarker proteins were first identified by a comparative proteogenomics approach. Then, a targeted mass spectrometry methodology was developed for the absolute quantification of these proteins, allowing for the simultaneous quantification of 25 biomarkers of interest in one single organism. The potential use of this approach as a diagnostic tool for the quality of aquatic ecosystems was tested on hundreds of field samples collected from several rivers monitored by the French water agency. This innovative concept that combines active biomonitoring with high resolution mass spectrometry multibiomarker analysis can be applied to all types of sentinel organisms. The data obtained from these analyses contribute usefully for the construction of a powerful and reliable indicator of the reactivity and sensitivity status of these sentinel organisms to environmental perturbations.*

## Contexte

La biosurveillance est une approche couramment utilisée en écotoxicologie aquatique afin d'évaluer la qualité de l'environnement (Oikari, 2006). Elle repose sur l'utilisation de certains organismes vivants représentatifs des milieux pour évaluer l'état global d'un écosystème. L'observation de ces organismes sentinelles permet de sonder les niveaux et les effets biologiques des contaminants présents dans l'environnement. Ces organismes proviennent d'une source « non-contaminée » et sont par exemple déployés sur les sites étudiés par encagement. Ce principe de biosurveillance dite active permet d'éviter plusieurs biais liés par exemple à l'âge ou au cycle de reproduction des organismes, à leur capacité migratoire, à la durée d'exposition, à l'adaptation locale des organismes, facilitant ainsi l'interprétation des effets mesurés en termes de toxicologie. Des milliers de substances chimiques provenant de plusieurs sources telles que l'industrie, l'urbanisation, les transports, la vie quotidienne ou l'agriculture intensive, sont couramment rejetées dans les milieux aquatiques. Ces molécules peuvent être persistantes et s'accumuler dans les organismes, au long de la chaîne alimentaire, constituant un risque écologique et sanitaire majeur. Les effets de ces multi-contaminations complexes sur les organismes et écosystèmes aquatiques doivent désormais être établis et suivis de façon rigoureuse afin de définir des mesures de prévention adaptées en vue de l'amélioration de l'état des écosystèmes aquatiques. En Europe, ces mesures sont encadrées par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE - n°2000/60/CE), qui établit une politique communautaire globale visant l'adoption des plans de gestion et des programmes de mesures appropriées à chaque masse d'eau<sup>1</sup>. La mise en place de cette législation questionne aujourd'hui le besoin de nouvelles méthodes d'évaluation et de prédiction du risque toxique pour l'environnement, les organismes qu'y habitent, et l'homme. Les mesures chimiques seules renseignent sur les polluants présents mais ne permettent pas une compréhension de la toxicité associée à ces mélanges de composés. L'approche combinée des mesures physico-chimiques de l'eau avec des mesures des effets biologiques provenant de la biosurveillance active constitue une stratégie pertinente pour répondre à ces défis. Ce sont les mesures biologiques qui vont informer de la réelle biodisponibilité de ces molécules et de leur toxicité pour les organismes aquatiques, intégrant l'effet cocktail, c'est-à-dire les effets synergiques ou antagonistes entre les composés présents.

Dans ce contexte, l'analyse des réponses biologiques à l'échelle moléculaire, basée sur le dosage de nombreux biomarqueurs moléculaires, permet d'établir le diagnostic écotoxicologique précis d'une situation environnementale donnée en cas de contamination. Le concept de biomarqueur moléculaire est appliqué depuis longtemps dans le domaine médical pour établir le diagnostic de nombreuses maladies, et sur le même principe

---

<sup>1</sup> La Directive Cadre Européenne sur l'Eau ou DCE (2000/60/CE) établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. L'objectif de cette directive est de retrouver le bon état chimique et écologique des eaux de surface (cours d'eau, lacs, eaux de transition, eaux côtières) et le bon état quantitatif et chimique des eaux souterraines à l'échéance 2015.

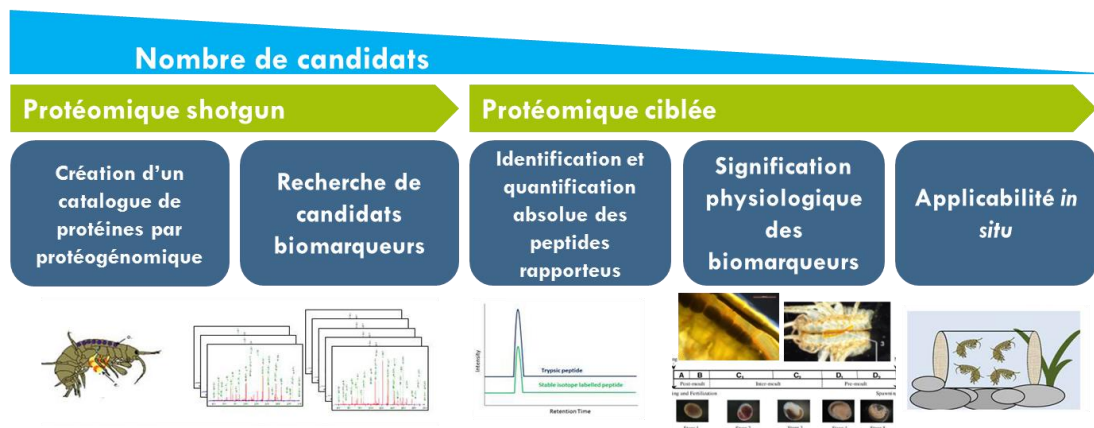
est aujourd'hui utilisé en écotoxicologie pour révéler des stress environnementaux causés par des contaminants chimiques. Mais contrairement au domaine de la santé humaine, l'utilisation de tels biomarqueurs en biosurveillance en reste à ses balbutiements. Son utilisation limitée est liée à la difficulté d'identifier, pour les invertébrés notamment, des biomarqueurs spécifiques et conservés chez tous les espèces, et à leur faible pertinence écologique (Forbes *et al.*, 2006). Le dosage d'un biomarqueur unique n'est pas représentatif de l'ensemble des modes d'action des contaminants sur les organismes vivants, ni de leurs effets spécifiques sur un individu donné. Une des stratégies pour prendre en compte la diversité des contaminants et la multiplicité des effets qu'ils peuvent exercer, est basée sur la multiplication des biomarqueurs. L'approche multi-biomarqueurs nécessite aujourd'hui la maîtrise des méthodologies « omiques » dites de dernière génération. Les données obtenues pour une batterie de biomarqueurs peuvent ensuite être intégrées sous forme d'indices multi-biomarqueurs, outil proposé par exemple comme indicateur de l'état de santé des organismes (Beliaeff et Burgeot, 2002). Pour l'heure, les efforts sur le développement de biomarqueurs en écotoxicologie ont été concentrés sur des espèces de vertébrés, alors que pour les espèces d'invertébrés, majoritaires dans les milieux aquatiques, les biomarqueurs spécifiques sont rares et non opérationnels. De plus, la grande divergence phylogénétique entre ces espèces ne permet pas toujours la transférabilité des biomarqueurs d'une espèce à l'autre. D'un point de vue technique, les méthodes de mesure de biomarqueurs classiques utilisés en écotoxicologie sont surtout des essais enzymatiques, longs à développer et mettre en œuvre alors que le nombre d'échantillons à analyser peut être important. Aujourd'hui les outils modernes de biologie moléculaire, de séquençage et de spectrométrie de masse permettent une analyse facile et directe de l'ensemble des gènes et de leurs produits que sont les ARN messagers et les protéines. Les technologies de pointe tels que les séquenceurs de nouvelle génération (NGS) ou la spectrométrie de masse en tandem à très haute résolution (MS) permettent des analyses à très haut-débit de l'ensemble des molécules d'un échantillon biologique, facilitant ainsi le développement et l'analyse de nouveaux biomarqueurs. Dans cette communication de recherche, nous exposons une méthodologie alliant transcriptomique et protéomique pour définir des biomarqueurs d'intérêt chez un organisme non-modèle, et le développement d'un essai multi-biomarqueur directement applicable sur de nombreux échantillons de terrain, en vue d'une utilisation en biosurveillance. Ce concept d'« écotoxicoprotéogénomique » illustre l'utilisation des approches moléculaires modernes dans un cadre de biosurveillance des milieux aquatiques, sur la base d'un cas d'étude concret réalisé sur le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*.

### ***A- Une approche multi-omiques pour le développement de biomarqueurs de toxicité***

Aujourd'hui, l'information moléculaire telle que séquences de gènes et de protéines est relativement rare pour la majorité des espèces sentinelles utilisées en écotoxicologie. L'obtention de ce type d'information est d'une grande importance en écotoxicologie car elle permet d'interpréter et prédire l'impact toxique de

Copyright Académie d'agriculture de France, 2018.

contaminants sur des fonctions vitales des organismes, et de détecter des effets moléculaires plus précoces, avant des manifestations physiologiques de plus long terme. Récemment, la protéogénomique est apparue comme une solution pour lever ce verrou sur les connaissances moléculaires chez les espèces non-modèles (Armengaud *et al.*, 2014). La protéogénomique combine des analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques pour l'identification sans *a priori* de nouvelles séquences protéiques, et est aujourd'hui appliquée couramment pour la découverte de protéines chez des espèces non-modèles. Cette approche a été utilisée chez le crustacé sentinelle *Gammarus fossarum*, conduisant à l'identification rapide de 1873 protéines des tissus reproductifs et impliqués dans le stockage et la synthèse des hormones de l'espèce. Dans ce cas, le transcriptome de l'animal a été séquencé ; puis cette information a été traduite par voie informatique en protéines afin d'obtenir une base de données recensant toutes les séquences possibles de protéines. Enfin, des données expérimentales ont été acquises par spectrométrie de masse dite shotgun (en vrac) et les spectres obtenus ont pu être assignés à des séquences de peptides grâce à la base de données créée par protéogénomique. Cette étape est primordiale car elle permet la découverte et la validation de très nombreuses protéines chez cette espèce orpheline d'un point de vue des connaissances moléculaires disponibles. Ensuite, des expériences où différentes conditions sont comparées permettent de définir les biomarqueurs (Trapp *et al.*, 2014a). Tel que montré sur la **Figure 1**, les protéines d'organismes exposés aux contaminants en laboratoire et les protéines d'organismes non-exposés sont comparées en terme d'abondance, permettant d'identifier les protéines induites ou réprimées suite à l'exposition aux contaminants modèles choisis.



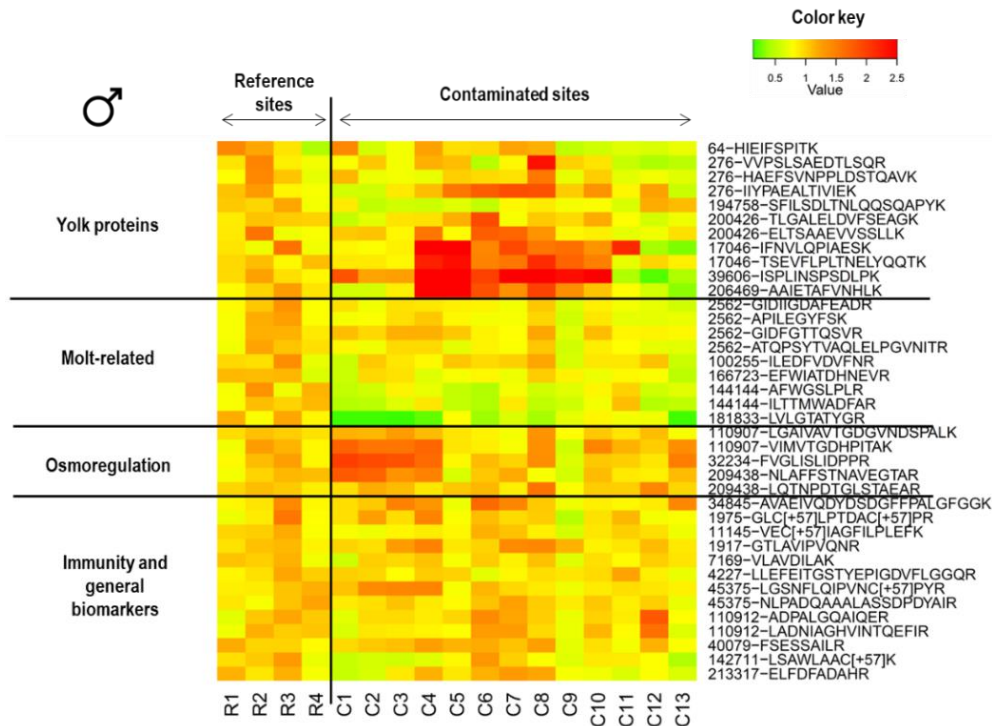
**Figure 1** – Le « pipeline » couplant la protéogénomique de découverte et la protéomique ciblée pour le développement de biomarqueurs de toxicité chez des espèces non-modèles. Adapté de Trapp *et al.* (2014a).

La deuxième étape consiste à valider les candidats biomarqueurs par spectrométrie de masse ciblée à partir d'organismes exposés au laboratoire et sur le terrain. Pour cela, les protéines détectées et modulées dans la première étape sont systématiquement dosées de façon très spécifique par protéomique ciblée du type Selected Reaction Monitoring (SRM), permettant de suivre leurs concentrations absolues entre différents échantillons. Pour cela, l'abondance de peptides représentatifs est mesurée et comparée avec des étalons

internes contenant des isotopes différentiels. Cet essai quantitatif très précis d'un échantillon à l'autre permet de valider les biomarqueurs distinguant les conditions témoin et stressé, et de rejeter d'éventuels faux positifs.

### ***B- Cas d'école : l'organisme non-modèle *Gammarus fossarum****

Nos équipes de recherche spécialisées en écotoxicologie, protéomique, chimie analytique, ont collaboré afin de démontrer la pertinence de cette démarche pour le développement d'un outil robuste pour la quantification multi-biomarqueurs applicable en biosurveillance de l'environnement. Ce qui a été réalisé sur l'amphipode *G. fossarum* est un vrai cas d'école illustrant cette démarche originale. A partir du catalogue de protéines spécifiques établi chez *G. fossarum*, identifiées par protéogénomique (Trapp *et al.*, 2014b), plusieurs dizaines de protéines biomarqueurs ont été sélectionnées comme rapporteurs de fonctions physiologiques clés, comme la mue, la détoxification et la reproduction. Un essai SRM a été développé et validé pour le suivi quantitatif de cet ensemble de biomarqueurs candidats (Charnot *et al.*, 2017). Il a été appliqué avec succès dans le cadre d'expositions d'organismes à des molécules modèles en conditions contrôlées au laboratoire (Gouveia *et al.*, 2017b). Puis, nous l'avons déployé à grande échelle dans le cadre du suivi d'organismes exposés dans la nature *in situ* sur dix-sept sites du réseau régional de surveillance dans le Sud-Est de la France (Gouveia *et al.*, 2017a). Les expositions *in situ* ont été faites par encagement actif, où quelques gammars « biologiquement synchronisés et calibrés » provenant de la même population source ont été placés à l'intérieur de cages permettant la libre circulation de l'eau et exposés pour une durée qui couvre un cycle de reproduction entier (Coulaud *et al.*, 2011). La **Figure 2** présente un exemple de résultats sous forme de carte en dégradé de couleurs indiquant les résultats quantitatifs obtenus pour 25 biomarqueurs mesurés simultanément dans chaque organisme mâle exposé sur quatre sites références (R1 – R4) et treize sites contaminés (C1 – C13). Le code couleur représente le niveau de changement des concentrations des biomarqueurs par rapport à la moyenne des sites références (la diminution est indiquée en vert, et l'augmentation en rouge), et ce pour cinq individus analysés par site. Ce graphe met en évidence, pour certains des sites, des inductions de certaines protéines de type vitellogénines (Yolk protein) et osmorégulation, et des diminutions importantes des concentrations de protéines liées au processus de la mue, indiquant des effets physiologiques marqués de certains sites contaminés. Il est par ailleurs connu que, pour cette espèce, les processus moléculaires en lien avec le cycle de mue peuvent être fortement impactés par des contaminants du type perturbateur endocrinien (Geffard *et al.*, 2010 ; Gouveia *et al.*, 2018).

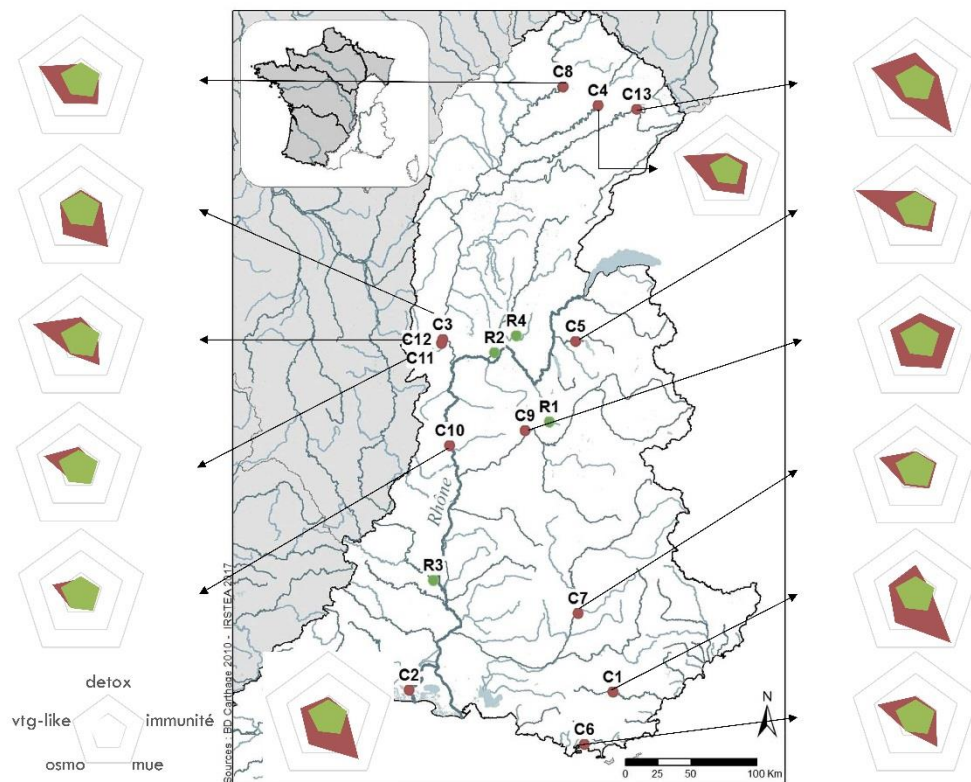


**Figure 2** – Carte en dégradé de couleurs des résultats de quantification de l'ensemble des 25 biomarqueurs dans les organismes mâles placés dans les conditions environnementales des 17 sites étudiés. Chaque site est représenté par une colonne, et la quantification de chacun des peptides rapporteurs est reportée dans une ligne. Chaque peptide est un rapporteur spécifique pour une protéine, indiqué par le numéro en amont de la séquence du peptide (exemple : la protéine 276 est présentée avec ses trois peptides rapporteurs). Pour la construction de la carte, les valeurs de changement d'abondance des peptides sont calculées par rapport à la moyenne des quatre sites référence. Le gradient de couleur varie de vert (concentration basse) à rouge (concentration élevée). Les protéines sont regroupées par rapport à leur fonction supposée. Selon Gouveia *et al.* (2017a).

Dans cette **Figure 2** sont représentés un total de 3230 points de mesure correspondant à 38 peptides rapporteurs de 25 protéines dont les abondances ont été quantifiées sur 85 organismes traités individuellement. Ces mesures ont été faites également en parallèle sur des organismes femelles (résultats non montrés), ce qui a résulté en 6460 mesures sur un total de 170 organismes. Bien que constituant un jeu de données de grande dimension, l'ensemble des analyses, allant de l'extraction des protéines à la mesure de leur niveau d'accumulation, a pu être réalisé dans un laps de temps de seulement deux semaines. Cette méthodologie constitue ainsi un énorme progrès en termes de gain de temps pour l'analyse de multiples biomarqueurs en comparaison avec les techniques de biochimie classique. Nous avons démontré que cet essai était vraiment applicable pour des études de biosurveillance en routine. A l'instar des indices multi-biomarqueurs utilisés en écotoxicologie (Beliaeff et Burgeot, 2002), la multiplicité de réponses moléculaires en lien avec de grandes fonctions physiologiques suivies par notre essai peut aussi gagner en termes d'intégration pour leur interprétation. Regrouper ces réponses en grandes fonctions permet de construire un indicateur de l'état de santé des organismes en réponse à l'action de polluants chimiques. Un tel exercice avait déjà été proposé pour des données protéomiques semi-quantitatives obtenues chez le poisson (Roland *et al.*, 2016). Dans ce cas, les Copyright Académie d'agriculture de France, 2018.

auteurs ont mis en évidence que les représentations graphiques des indices permettaient de différencier le type de polluant induisant ces réponses protéomiques.

Avec les données de la **Figure 2** nous proposons aussi, à partir d'un regroupement des biomarqueurs en cinq grandes fonctions (détoxication, immunité, mue, osmorégulation, et protéines des œufs), et de l'intégration des écarts au niveau moyen de référence, la construction d'un indice multi-biomarqueurs original chez le gammare. La représentation graphique de notre indice en forme d'étoile (**Figure 3**) permet une visualisation rapide de possibles dysfonctionnements des fonctions suivies, mettant notamment en évidence la spécificité des réponses enregistrées entre les différents sites étudiés.



**Figure 3** – Représentation graphique d'un indice multi-biomarqueur intégrant un ensemble de 25 biomarqueurs en cinq grandes fonctions : détoxication, immunité, osmorégulation, mue, et type-vtg. La zone verte correspond aux valeurs de l'indice combiné pour les quatre sites références (R1-R4), et en rouge pour chacun des sites contaminés (C1-C13).

Par exemple, les expositions dans les sites C1 et C2 ont provoqué des modulations au niveau de l'abondance des protéines impliquées dans l'osmorégulation et la mue, alors que l'exposition dans le site C5 a provoqué une modulation de l'accumulation des protéines type vtg, donc de la vitellogenèse. Ces signatures moléculaires pourront à l'avenir être utilisées pour déchiffrer rapidement le type de pressions ou contaminants présents dans chaque site. De tels résultats permettront d'approfondir la réflexion sur les mesures de prévention ou amélioration de la qualité de certains sites et de prioriser les actions de gestion.



### *Conclusions*

Cette communication montre la pertinence et l'importance de l'utilisation des approches moléculaires de nouvelle génération, notamment les approches de protéomique sans *a priori* et de protéomique ciblée pour une application en surveillance environnementale. Comme exemple, nous avons exposé des résultats à grande échelle obtenus avec l'espèce sentinelle *G. fossarum* aboutissant à la découverte et la validation de 25 biomarqueurs protéiques.

Ces travaux pionniers qui se veulent être une preuve de concept en écotoxicoprotéomique amènent à plusieurs points importants de discussion et questionnement avant la mise en place éventuelle de telles méthodes en routine pour la surveillance de l'environnement. Plus particulièrement, afin de valider l'utilisation des biomarqueurs proposés, notamment en ce qui concerne leur spécificité vis-à-vis d'une contamination, il sera important de définir des valeurs références de qualité pour leur interprétation. En effet, pour qu'un biomarqueur soit définitivement adopté pour son application, des études à large échelle comprenant les notions de spécificité, de précision et justesse de mesure, limite de quantification minimale et maximale, linéarité, robustesse, doivent être réalisées, car un grand nombre de facteurs comme la température et la salinité de l'eau par exemple, peuvent influencer la réponse des biomarqueurs. Les valeurs références doivent prendre en compte ces effets des facteurs abiotiques, et la variabilité naturelle des réponses de ces biomarqueurs.

En conclusion, cette étude appelle à une utilisation de données protéomiques ciblées pour définir un indicateur de l'état de santé des organismes. Le dosage absolu et multiplexé de plusieurs dizaines de biomarqueurs protéiques permet de définir à haut débit des indices biologiques intégratifs et pertinents pour la surveillance environnementale. Le concept de biosurveillance de l'environnement basé sur l'utilisation d'organismes sentinelles engagés pour l'évaluation de la qualité des eaux se retrouve ainsi très avantageusement renforcé par les dernières avancées de ces technologies omiques.

### Références bibliographiques

- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., Hartmann, E.M., 2014. – Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J Proteomics* 105, 5-18.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. – Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21, 1316-1322.
- Charnot, A., Gouveia, D., Armengaud, J., Almunia, C., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O., Salvador, A., 2017. – Multiplexed assay for protein quantitation in the invertebrate *Gammarus fossarum* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 409, 3969-3991.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. – *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res* 45, 6417-6429.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. – The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25, 272-280.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagiatti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. – Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environ Toxicol Chem / SETAC* 29, 2249-2259.
- Gouveia, D., Bonneton, F., Almunia, C., Armengaud, J., Quéau, H., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Chaumot, A., 2018. – Identification, expression, and endocrine-disruption of three ecdysone-responsive genes in the sentinel species *Gammarus fossarum*. *Sci Rep* 8, 3793.
- Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Almunia, C., Francois, A., Navarro, L., Armengaud, J., Salvador, A., Geffard, O., 2017a. – Ecotoxic-proteomics for aquatic environmental monitoring: First in situ application of a new proteomics-based multibiomarker assay using caged amphipods. *Environ Sci Technol* 51, 13417-13426.
- Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Queau, H., Armengaud, J., Almunia, C., Salvador, A., Geffard, O., 2017b. – Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. *Aquat Toxicol* 190, 199-209.
- Oikari, A., 2006. – Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquat Toxicol* 78, 370-381.
- Roland, K., Kestemont, P., Dieu, M., Raes, M., Silvestre, F., 2016. – Using a novel “Integrated Biomarker Proteomic” index to assess the effects of freshwater pollutants in European eel peripheral blood mononuclear cells. *J Proteomics* 137, 83-96.
- Trapp, J., Armengaud, J., Salvador, A., Chaumot, A., Geffard, O., 2014a. – Next-generation proteomics: Toward customized biomarkers for environmental biomonitoring. *Environ Sci Technol* 48, 13560-13572.
- Trapp, J., Geffard, O., Imbert, G., Gaillard, J.C., Davin, A.H., Chaumot, A., Armengaud, J., 2014b. – Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to document the reproductive system of amphipods. *Mol Cell Proteomics* 13, 3612-3625.