

## DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **16 septembre 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur BRUNET Thomas**

Titre de la thèse : « Développement d'approches Multi-Omique par LC-MS/MS pour la caractérisation de perturbations métaboliques chez *Gammarus fossarum* après exposition à des contaminants »

### Résumé



Les approches multi-omiques par spectrométrie de masse, combinant la protéomique, la lipidomique et la métabolomique, permettent d'obtenir de nombreuses informations moléculaires sur un échantillon biologique. Les approches focalisées sur une seule « -omique », fournissent une image restreinte de la complexité biologique d'un système. Afin de pallier cette limitation, nous avons optimisé une procédure d'extraction biphasique basée sur un mélange de solvants organiques méthyl tert-butyl éther / méthanol permettant d'extraire simultanément et séparément les protéines, les métabolites et les lipides à partir d'un échantillon unique. Ce protocole a été appliqué à l'étude du cycle reproductif des femelles de l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum*, révélant des signatures moléculaires spécifiques aux différents stades grâce à des analyses de données multivariées. Ces outils statistiques ont non seulement mis en évidence les protéines, lipides et métabolites associés à la maturation des gammares femelles, mais ils ont également révélé les liens complexes entre ces différentes classes de biomolécules. Des corrélations entre les molécules ont pu être mises en évidence pour comprendre les voies métaboliques mises en jeu.

La métabolomique par spectrométrie de masse est une discipline complexe intégrant une très grande variété de métabolites en termes de polarité, de masse, de fonctions chimiques et de rôles dans les voies biologiques. Elle nécessite la détection et la quantification simultanées de nombreux métabolites contenus dans un échantillon. Or dans les approches ciblées classiques basées sur le suivi de l'ion précurseur et d'un ou plusieurs de ses ions fragments, les méthodes se limitent au suivi de quelques métabolites. Pour relever ce défi analytique, a été récemment introduit le mode d'acquisition *scout-triggered MRM* (stMRM). stMRM améliore la robustesse et la transférabilité des grands multiplexes ciblés en métabolomique issus de la littérature. Ce mode a considérablement augmenté le nombre de transitions détectées, démontrant sa polyvalence et son adaptabilité à différents systèmes de chromatographie liquide sans nécessiter de nouvelles optimisations.

Dans les approches non ciblées, l'application du mode d'acquisition indépendante des données (SWATH-DIA), combinée avec la Zeno trap et la dissociation activée par électron (EAD), a montré une

amélioration significative de la reproductibilité de détection et de la capacité à identifier des composés inconnus à partir de leurs spectres. Ces innovations ont levé des verrous analytiques majeurs, permettant une couverture plus exhaustive des variables moléculaires et une élucidation structurale approfondie de molécules clés. Nos travaux, portant sur l'analyse du lipidome et du métabolome de *G. fossarum*, ont bénéficié de cette approche. La combinaison de méthodes Zeno-SWATH-DIA et de l'EAD a facilité l'identification putative des composés et a mis en lumière les changements moléculaires durant le cycle de reproduction des gammares femelles.

Dans l'ensemble, notre stratégie multi-omique, intégrant des techniques innovantes de spectrométrie de masse aussi bien ciblée que non ciblée, a résolu des défis analytiques majeurs dans la détection et l'identification de composés inconnus. Elle offre des méthodologies multiplexées, exhaustives et reproductibles pour une analyse moléculaire complète, promettant ainsi des avancées significatives dans l'identification de biomarqueurs et l'évaluation de la santé environnementale.

**Mots clés :** Spectrométrie de masse ; LC-MS/MS ; Multi-omique ; Métabolomique ; Lipidomique ; Protéomique ; *scout-triggered MRM* ; Transfert de méthode ; *Machine learning* ; Intégration de données.