

# Développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux basés sur les fonctions physiologiques de l'annélide oligochète *Eisenia fetida*

F. Brulle et F. Vandebulcke

Université de Lille 1 - Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie - EA 4346  
Bâtiment SN3, Rez-de-chaussée 59 655 Villeneuve d'Ascq, France

## RÉSUMÉ

Les activités métallurgiques entraînent l'accumulation d'éléments traces métalliques dans les couches superficielles des sols, où l'on peut observer des concentrations largement supérieures au fond pédogéochimique et aux normes en vigueur. La contamination des sols est une menace pour la santé publique et la présence de grandes quantités d'éléments traces métalliques peut générer un stress susceptible d'affecter les organismes exposés à des sols pollués. Les Annélides Oligochètes vivent en contact étroit avec ces sols pollués et sont parmi les organismes vivants présentant une sensibilité exacerbée aux métaux. Très peu de choses sont connues quant à l'identification et la mise en place des mécanismes de réponse à ces métaux au niveau moléculaire. En exploitant la conservation phylogénique observée entre espèces, nous avons été capables de cloner et de caractériser un ensemble de biomarqueurs potentiels à partir des cœlomocytes de l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*, une espèce modèle recommandée en écotoxicologie. Deux approches ont été mises en place. Premièrement, une approche qualifiée de ciblée, consistant à identifier tous les effecteurs parmi des protéines fortement conservées pour lesquels une variation lors d'une exposition métallique était reportée dans la littérature. Deuxièmement, nous avons entrepris une approche, qualifiée de globale, consistant en la construction de banques soustractives pour identifier chez *Eisenia fetida* les gènes dont l'expression est affectée lors d'une exposition à un mélange complexe de métaux, représentatif d'un site naturel fortement contaminé. Ces deux approches ont permis l'identification de 4 candidats biomarqueurs de pollution métallique.

### Mots clés

*Eisenia fetida*, cœlomocyte, Élément Trace Métallique (ETM), expression génique, banque soustractive, biomarqueur.

**SUMMARY****DEVELOPMENT OF METAL EXPOSURE BIOMARKERS BASED ON PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF EISENIA FETIDA (ANNELIDA OLIGOCHAETA)**

Smelting plant activities lead to accumulation of Metal Trace Elements (MTEs) in the topsoils, where MTE concentrations largely exceeding the natural background could be observed. Contaminations of soils are a threat for public health and the presence of high amount of these MTE can generate an environmental stress likely to affect the exposed organisms to contaminated soils. Earthworms living in close contact with polluted soils were studied in order to better understand the physiological changes, the mechanisms of acclimation and of detoxification caused by metals. By exploiting the conservation observed between species and using molecular biology techniques, we have been able to clone and transcriptionally characterise potential biomarkers from the immune cells of the ecotoxicologically important earthworm species *Eisenia fetida*.

1-First, we partially cloned and measured the gene expression of 16 potential biomarkers in the laboratory model *Eisenia fetida* after *in vivo* exposure to Cd in artificial soils. Effectors were chosen among highly preserved proteins for which variations (in terms of protein quantity and/or expression) following metal exposure were reported in the literature. Expression was measured in coelomocytes since the majority of the selected effectors were known to be involved in defence mechanisms (Brulle et al. 2006) (figures 1 and 2).

2- The level of expression of each gene was also analysed in whole organism following exposures to cadmium in soil using real time PCR, since the variation of gene expression in other tissues than coelomocytes cannot be excluded (Brulle et al. 2007) (figures 3 and 4).

3- The identification of a functional phytochelatin synthase in the nematode *Caenorhabditis elegans*, a representative member of the Ecdysozoa, provided the first evidence for these metal binding peptides in animals. By exploiting the conservation observed between species we have been able to clone and transcriptionally characterise a phytochelatin synthase from the immune cells of the earthworm *Eisenia fetida*, the first evidence for its presence in a phylum belonging to the Lophotrochozoa (figure 5). The complete coding sequence of this enzyme was determined and the phylogenetic relationship to plant, yeast and nematode enzymes elucidated. Temporal- and dose-profiling of the transcriptional regulation of phytochelatin synthase and metallothionein in response to cadmium was studied by using real-time PCR (Brulle et al. 2008a) (figures 6 and 7).

4- We undertook an open strategy by performing SSH libraries on the same model. The aim of this work was to identify in *Eisenia fetida* genes which expressions are regulated following exposure to a complex mixture of Metallic Trace Elements (MTE) representative of a strongly polluted smelter soil. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was used to construct cDNA libraries enriched in up- or down-regulated transcripts in the immune circulating cells of the coelomic cavities, namely coelomocytes, from worms exposed to a complex MTE contamination (figure 8). Among 1536 SSH derived cDNA clones sequenced we identified 764 unique ESTs of which we selected 18 candidates on the basis of their redundancy. These selected candidates were subjected to a two-steps validation procedure based on the study of their expression level by real-time PCR. The first step consisted in measuring the expression of the 18 candidates in worms exposed to artificial contaminated soil. The second step consisted in measuring the expression in animals exposed to a « naturally » contaminated soil collected close to a smelter. Both steps allowed us to highlight 3 candidates that are strongly induced in worms exposed to a smelter polluted soil (figure 9). These candidates are, the well-known MTE induced Cd-metallothionein and 2 original biomarkers, the lysenin and a transcript which cloning of the complete coding sequence identified as the Coactosin-Like Protein (Brulle et al. 2008b).

The description of a group of genes which expression varies following metallic exposure as well as the analysis of their expression profiles may be used to analyse mechanistically the immune response to a metallic stress. Moreover, expression profiles of selected genes may constitute a signature of changes due to MTE.

**Key-words**

*Eisenia fetida*, coelomocytes, metallic exposure, gene expression, Suppression Subtractive hybridization, biomarkers.

**RESUMEN****DESARROLLO DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A LOS METALES BASADOS SOBRE LAS FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL ANÉLIDO OLIGOQUETO EISENIA FETIDA**

Las actividades metalúrgicas implican la acumulación de elementos en trazas metálicas en las capas superficiales de los suelos, donde se puede observar concentraciones netamente superiores al fondo pedogeoquímico y a las normas usadas. La contaminación de los suelos está una amenaza para la salud pública y la presencia de grandes cantidades de elementos en trazas metálicas puede generar un estrés susceptible afectar organismos esposados a suelos contaminados. Los Anélidos Oligoquetos viven en contacto estrecho con estos suelos contaminados y están entre los organismos vivos los que presentan una sensibilidad exacerbada a los metales. Se conocen muy pocas cosas en cuanto a la identificación y a la puesta en lugar de los mecanismos de contesta a estos metales al nivel molecular. Explotando la conservación filogénica observada entre especies, fuimos capaces clonar y caracterizar un conjunto de biomarcadores

potenciales a partir de coelomocitos del Anélido Oligoqueto *Eisenia fetida*, una especie modelo recomendada en ecotoxicología. Se utilizaron dos enfoques. Primeramente, un enfoque calificado de específico, que consiste identificar todos los efectores dentro de las proteínas fuertemente conservadas para las cuales una variación durante una exposición metálica era reportada en la literatura. Segundamente, hemos usado un enfoque, calificado de global, que consiste en la construcción de bancos sustractivos para identificar en *Eisenia fetida* los genes cuyo expresión está afectada durante una exposición a una mezcla compleja de metales, representativa de un sitio natural fuertemente contaminado. Estos dos enfoques permitieron la identificación de cuatro candidatos biomarcadores de contaminación metálica.

### Palabras clave

*Eisenia fetida*, coelomocitos, elementos en trazas metálicos, expresión génica, banco sustractivo, biomarcadores

Pendant plus d'un siècle, la région Nord/Pas-de-Calais a été le siège d'une activité métallurgique intense. La région de Noyelles-Godault en est le parfait exemple. En effet, la fonderie de zinc (Zn) située à Auby, Umicore, est l'une des plus grandes usines d'Europe. Créée en 1869, elle produit aujourd'hui encore environ 220 000 tonnes de Zn par an. Jusqu'en 1975, cette fonderie utilisait un procédé de fabrication pyrométallurgique qui générait d'importantes quantités de poussières, contribuant à la contamination de l'environnement. Après 1975, ce procédé fut remplacé par un procédé électrolytique beaucoup moins polluant, qui a considérablement réduit les émissions atmosphériques. Localisée à moins de 4 km d'Umicore, la fonderie de Metaleurop Nord de Noyelles-Godault était la seule usine productrice de plomb primaire en France et l'une des plus grandes d'Europe. Cette usine a arrêté son activité en 2003 pour des raisons économiques, mais pendant plus d'un siècle, elle aura entraîné le rejet dans l'atmosphère de grandes quantités de poussières métalliques du fait de l'utilisation du procédé pyrométallurgique. Les activités métallurgiques de ces 2 usines ont entraîné l'émission de poussières métalliques qui ont affecté une aire d'environ 120 km<sup>2</sup> où plus de 55 000 personnes résident (Douay *et al.*, 2008). Les sols de cette région ont accumulé de grandes quantités d'éléments traces métalliques (ETMs) dans leurs couches supérieures. En effet, les concentrations relevées sont souvent nettement supérieures aux normes en vigueur. Ainsi, Frangi et Richard (1997) ont révélé que les couches supérieures des sols agricoles situés à proximité d'Umicore et Metaleurop présentaient des niveaux de contamination pouvant atteindre 1 132 mg kg<sup>-1</sup> de Plomb (Pb), 21 mg kg<sup>-1</sup> de Cadmium (Cd) et 2 167 mg kg<sup>-1</sup> de Zn. Une étude récente a montré que les concentrations en Cd et en Pb des sols agricoles sont respectivement 20 et 15 fois supérieures à celles des sols agricoles de référence. Il en est de même pour les sols urbains qui présentent des concentrations en Cd et en Pb respectivement

16 et 10 fois plus importantes que des sols provenant de jardins de référence (Pruvost *et al.*, 2006). Bien que la majeure partie de la contamination de ces sols concerne les couches superficielles, ces métaux ont été retrouvés en traces dans certains cas jusqu'à 2 mètres de profondeur (Sterckeman *et al.*, 2000). Cette pollution métallique peut induire une contamination des eaux souterraines et de la chaîne alimentaire et entraîner un transfert des métaux au travers différents niveaux trophiques avec, à terme, des effets néfastes pour la santé humaine. Des cas de cancer en rapport avec les fortes concentrations de Cd ont été rapportés (Nawrot *et al.*, 2006) ainsi que des cas de saturnisme chez certains enfants en relation avec les fortes concentrations en Pb (Declercq et Beauvois, 2000).

La présence d'une quantité importante d'ETMs peut aussi générer un stress environnemental susceptible d'affecter les organismes exposés aux sols contaminés. De fortes teneurs en métaux affectent les communautés microbiennes du sol en provoquant une diminution de la taille des populations (Müller *et al.*, 2001) ou une réduction de la diversité bactérienne des sols (Moffett *et al.*, 2003). Ces effets ont pour conséquences visibles, une réduction de la minéralisation qui entraîne une accumulation de la litière et une forte teneur en matière organique observable sur certains sites très pollués (Cotrufo *et al.*, 1995). La santé du sol et le maintien de sa productivité dépendent des organismes vivants qui le peuplent et qui affectent le recyclage et la biodisponibilité des composés organiques et non organiques majeurs dans leur recherche constante de nourriture et de source d'énergie (Doran et Safley, 1997). De nombreuses études chez des plantes et des animaux vivant en contact étroit avec des sols contaminés ont permis de mieux comprendre les changements physiologiques, les mécanismes d'acclimatation (adaptation physiologique) et les mécanismes de détoxification des métaux (Morgan *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2001).

Chez les plantes, l'exposition métallique peut entraîner une diminution sensible du taux de croissance de certains arbres (Dickinson *et al.*, 1992), ou une augmentation de l'hydrolyse de la chlorophylle due aux effets toxiques de l'accumulation de métaux dans les tissus, ce qui affecte la photosynthèse (Manios *et al.*, 2003).

Les populations animales, et en particulier les populations de macroinvertébrés, sont elles aussi fortement affectées. Par exemple, pour les collemboles (Insecte; Collembole), une exposition métallique peut conduire à une altération des communautés (Pawert *et al.*, 1996); chez les coléoptères appartenant à la famille des carabidae, on observe un développement larvaire ralenti, une surmortalité des larves (Mozdzer *et al.*, 2003), une fécondité moindre (Lagisz *et al.*, 2002) et une sensibilité aux stress additionnels (Stone *et al.*, 2001). Chez les vers de terre qui sont parmi les organismes dont la sensibilité aux métaux lourds est la plus exacerbée, il a été observé, par exemple, une diminution de la densité de population (Pizl et Josen, 1995) et des changements dans la structure des communautés (Lukkari *et al.*, 2004a).

Selon Weeks (1995), un « biomarqueur » est une réponse biologique à un produit chimique (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), ETMs...) qui induit un stress et peut donner une estimation de l'exposition ou une mesure des effets toxiques potentiels. Un biomarqueur peut aussi être défini comme « tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cytologique, physiologique, biologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un organisme à au moins une substance chimique à caractère polluant (...). Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel » (Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs développés à ce jour sont pour l'essentiel des marqueurs précoces d'exposition ou d'effet des contaminants mais ne révèlent pas forcément les effets potentiels à long terme sur l'écosystème. Le développement de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce des perturbations à long terme d'un écosystème représente un défi pour les écotoxicologues. Ces biomarqueurs doivent concerner des fonctions physiologiques dont les perturbations agissent sur les paramètres démoécologiques. L'émergence des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'écotoxicologie a permis de mieux appréhender les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes vivants. En effet, les profils d'expression génique représentent le premier niveau d'intégration entre les « stress » environnementaux et le génome qui, à travers la synthèse de protéines, conduit la réponse des organismes aux changements externes. L'analyse des changements dans l'expression génique est donc un outil puissant, 1- pour

diagnostiquer l'existence d'un stress dans une population et 2- pour analyser les mécanismes de réponse à un stress.

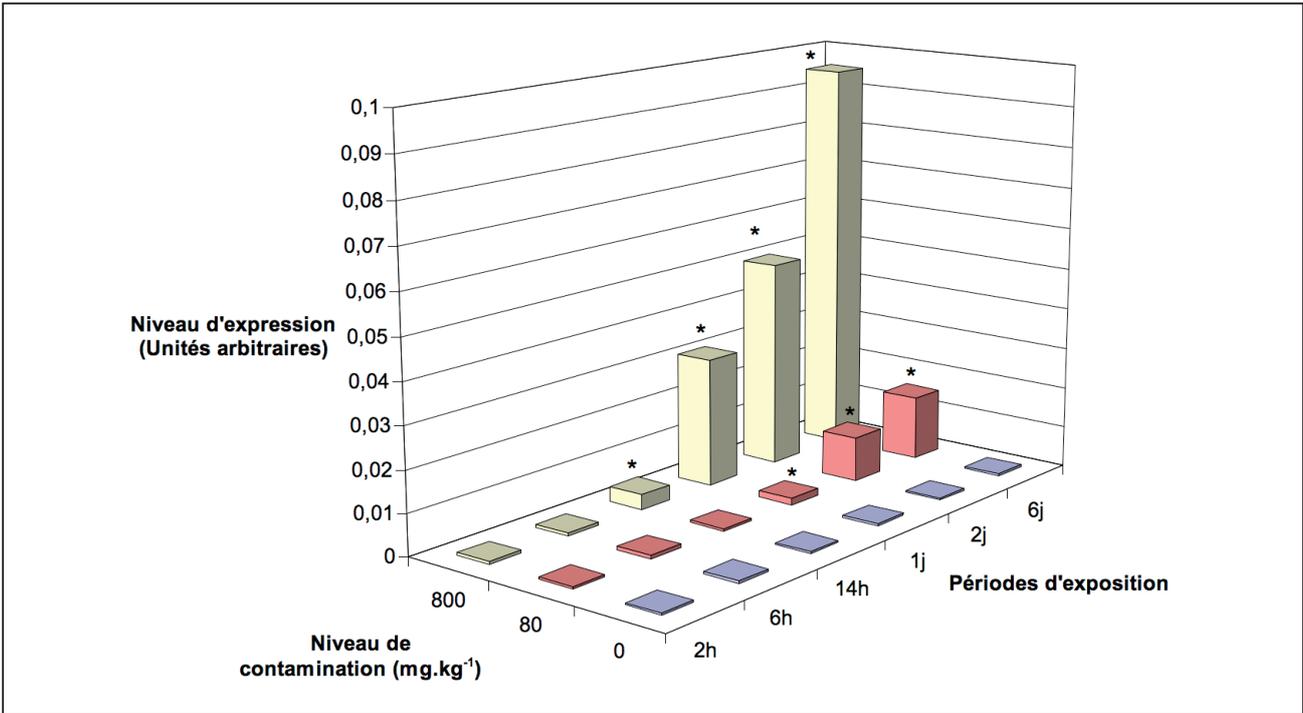
Un des groupes faunistiques les plus étudiés est celui des Annélides Oligochètes. Depuis les premiers travaux de Darwin (1883), les vers de terre (Embranchement des Annélides, sous-classe des Oligochètes) sont considérés comme les ingénieurs de l'écosystème sol du fait de leurs effets directs et indirects sur l'eau, les nutriments et le cycle du carbone dans les sols sous les climats tempérés et tropicaux. Ces animaux, qui représentent une part importante de la macrofaune du sol, jouent un rôle clé dans la plupart des écosystèmes continentaux et sont impliqués dans l'entretien de la structure et de la fertilité des sols. Pour ces raisons, les vers ont ainsi été adoptés par la communauté internationale pour le diagnostic des écosystèmes et pour l'étude de l'impact potentiel de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les métaux provenant de sources anthropiques (Spurgeon *et al.*, 2003). L'évaluation de la toxicité des éléments chimiques pour les Annélides est couramment réalisée via la mesure des principaux traits de vie (survie, croissance et reproduction) dans les conditions contrôlées au laboratoire avec des organismes tests (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* et *Lumbricus rubellus*). Ces organismes considérés comme des modèles à utiliser prioritairement en écotoxicologie (Spurgeon *et al.*, 2003) sont souvent fortement affectés par la pollution métallique. Par conséquent, l'exposition métallique de certains Annélides Oligochètes pourrait engendrer des modifications physiologiques exploitables permettant de dresser un état des lieux et de mesurer les risques provoqués par la présence de métaux polluants dans le sol.

La présence de métaux constitue un stress majeur susceptible de perturber les grandes fonctions physiologiques des animaux (Labrot *et al.*, 1996). Une stratégie alternative à la recherche de protéines fixatrices des métaux (Métallothionéines (MTs) et Métalloprotéines (MPs)) consiste en l'identification de biomarqueurs moléculaires impliqués dans de grandes fonctions biologiques, communs à plusieurs macroinvertébrés et dont l'expression est affectée par un stress métallique. Ainsi, il apparaît intéressant d'identifier et de constituer une batterie de biomarqueurs impliqués dans les grandes fonctions biologiques, révélant la nature et l'amplitude des stress (biomarqueurs qui seraient idéalement communs à plusieurs groupes d'invertébrés terrestres ou d'eau douce). Parmi les grandes fonctions physiologiques, l'immunité apparaît comme un candidat favorable à une telle étude (Munoz *et al.*, 2002; Tasiemski *et al.*, 1994). En effet, le système immunitaire est une fonction complexe qui intègre de nombreuses informations environnementales et interagit avec la fonction de nombreux organes. Schématiquement, chez les invertébrés, la réponse immunitaire est de type innée et met en œuvre des réponses non spécifiques: phagocytose, cascade de coagulation, choc oxydatif, induction de protéines (Mitta *et al.*, 2000). De plus, il est rapporté dans la littérature qu'une pollution métallique rend

**Figure 1** - Niveau d'expression de la MT chez des vers témoins et exposés au cadmium (80 ou 800 mg Cd.kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 2, 6 14, 24, 48 heures et 6 jours. En bleu (témoins), en rouge (80 mg Cd.kg<sup>-1</sup> sol sec) et en jaune (800 mg Cd.kg<sup>-1</sup> sol sec).  
\* différences significatives (p < 0,05). Travail sur cœlomocytes.

**Figure 1** - Expression levels of Metallothionein mRNA in cœlomocytes of control and Cd exposed (80 or 800 mg.kg<sup>-1</sup>) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure.

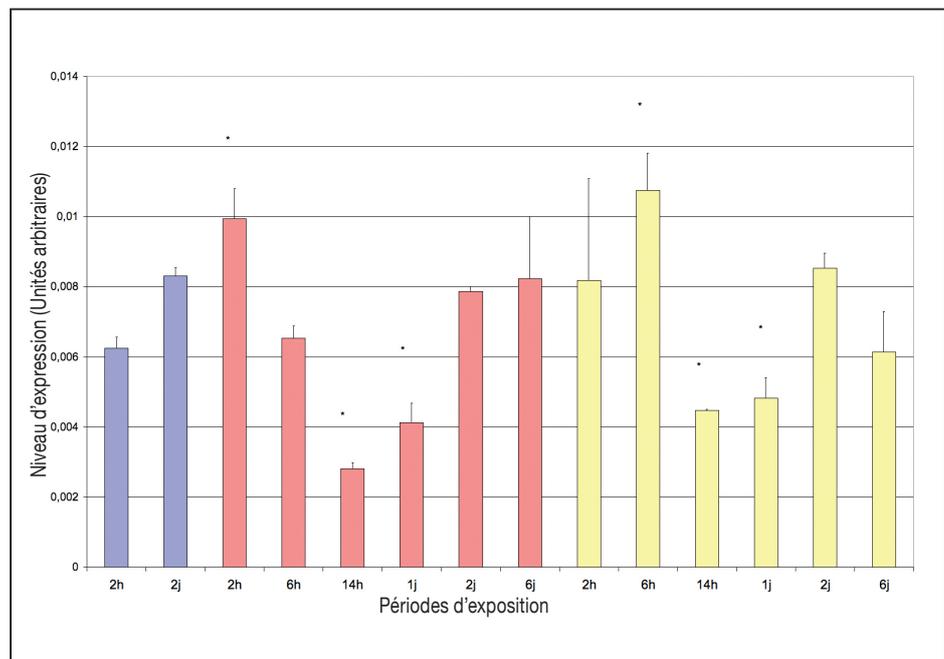
Legend: ■ : 0 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 80 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 800 mg kg<sup>-1</sup>; \* : Significant difference (p < 0.05).



**Figure 2** - Niveau d'expression de la catalase chez des vers témoins (Bleu) et exposés au cadmium via le sol (80 (Rouge) ou 800 (Jaune) mg Cd.kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 2, 6, 14, 24, 48 heures et 6 jours.  
\* : Différences significatives au seuil de 0,05. Travail sur cœlomocytes.

**Figure 2** - Expression levels of Catalase mRNA in cœlomocytes of control and Cd exposed (80 or 800 mg kg<sup>-1</sup>) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure.

Legend: ■ : 0 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 80 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 800 mg kg<sup>-1</sup>;  
\* : Significant difference (p < 0.05).

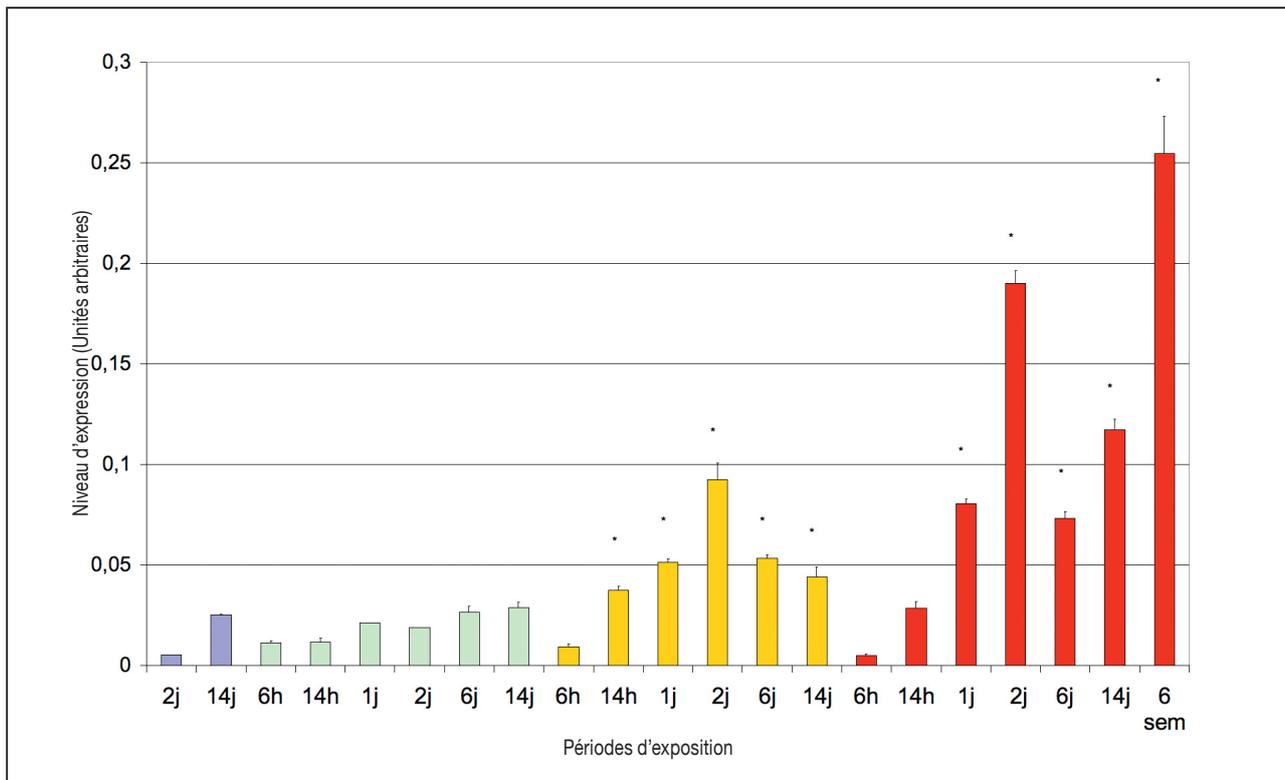


**Figure 3** - Niveau d'expression de la métallothionéine chez des vers témoins et exposés au cuivre (40, 120, ou 400 mg Cu. kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 6, 14, 24, 48 heures, 6 jours, 14 jours et 6 semaines. \*: Différences significatives au seuil de 0,05.

Travail sur animal entier. Légende: ■ Contrôle; ■ : 40 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 120 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 400 mg kg<sup>-1</sup>

**Figure 3** - Expression levels of Metallothionein mRNA in control and Cu spiked soil exposed (40, 120 and 400 mg kg<sup>-1</sup>) earthworms after 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure.

Legend: ■ Control; ■ : 40 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 120 mg kg<sup>-1</sup>; ■ : 400 mg kg<sup>-1</sup>; \*: significant difference (p < 0.05).



des invertébrés aquatiques d'élevage (moule, huître, crevette) beaucoup plus sensibles aux infections microbiennes et que les métaux affectent les processus de défense immunitaire (Fisher *et al.*, 2003; Sauvé *et al.*, 2003). Cette recherche permettrait également d'aller plus avant dans la connaissance des mécanismes de défense, de détoxification et d'adaptation des invertébrés aux contaminations environnementales.

L'objectif du travail présenté ici était de développer sur les Oligochètes, et plus particulièrement chez le modèle de laboratoire *Eisenia fetida*, un ensemble de biomarqueurs aspécifiques - biomarqueurs sensibles aux métaux - qui apporteraient une image multi-variable (correspondant à plusieurs grandes fonctions physiologiques) du stress existant chez les invertébrés.

Une première approche, qualifiée de ciblée, correspond à l'étude du niveau d'expression de nombreux gènes, identifiés dans la littérature, chez divers macroinvertébrés. Ces gènes ont été retenus en raison des variations d'expression observées lors d'expositions à un contaminant d'origine métallique.

Une deuxième approche, qualifiée de globale, correspond à la construction de banques soustractives afin d'identifier de nouveaux gènes différenciellement exprimés lors d'expositions à un mélange complexe d'ETMs, représentatif d'une contamination susceptible d'être rencontrée *in situ*.

## APPROCHE CIBLÉE

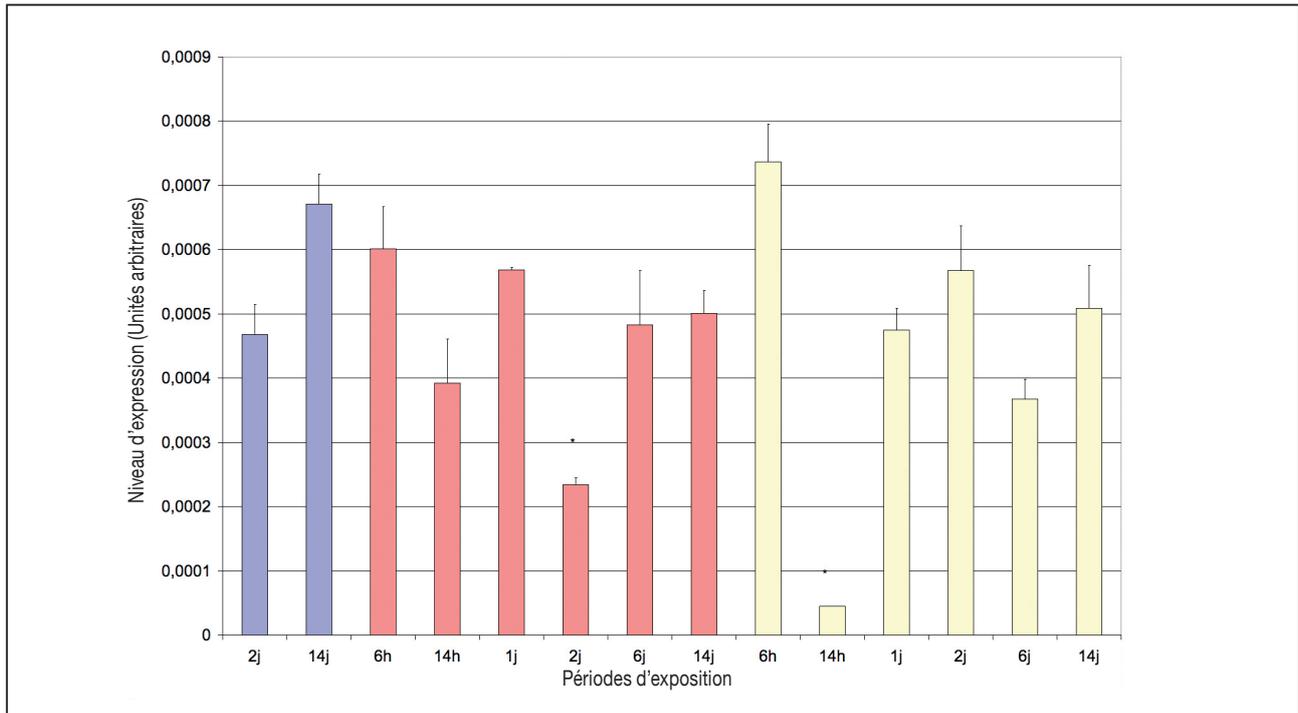
### Clonage et analyse du niveau d'expression de 16 candidats biomarqueurs chez *Eisenia fetida* lors d'expositions *in vivo* à des éléments traces métalliques

Chez une majorité d'organismes, la tolérance aux métaux repose, au moins en partie, sur l'induction de gènes codant des molécules capables de fixer les métaux. Parmi ces

**Figure 4** - Niveau d'expression de la Protein Kinase C1 chez des vers témoins (■) et exposés au cadmium (80 ■ ou 800 ■ mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 2, 6, 14, 24, 48 heures, 6 et 14 jours.

\*: Différences significatives au seuil de 0,05. Travail sur animal entier.

**Figure 4** - Expression levels of Protein Kinase C 1 mRNA in control (■) and Cd spiked soil exposed (80 ■ or 800 ■ mg kg<sup>-1</sup>) earthworms after 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ).



molécules, les métallothionéines (MT), protéines de faible masse moléculaire (6000-8000 Da) riches en cystéines (environ 30 %), et caractérisées par l'absence d'acides aminés aromatiques, sont connues pour être impliquées dans la détoxification des métaux traces tels que le Cd et dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le Zn et le Cu (Klaassen *et al.* 1999; Palmiter 1998; Vasak et Hasler, 2000). Une stratégie alternative à la recherche de protéines fixatrices des métaux (MTs et MPs) consiste en l'identification de biomarqueurs protéiques impliqués dans de grandes fonctions biologiques, communs à plusieurs macroinvertébrés et dont l'expression est affectée par un stress métallique. Outre leur capacité à accumuler de grandes quantités de métaux, et en particulier le Cd (Grelle et Descamps, 1998), les Annélides Oligochètes sont des modèles biologiques sur lesquels de nombreuses études ont permis de mettre en évidence un éventail d'effets néfastes des métaux. Concrètement, les effets sur certains traits de vie comme la survie peuvent se caractériser par l'éradication de certains genres d'Annélides (Abdul Rida et Bouché 1995) ou par des effets létaux (Spurgeon *et al.* 2004). Un retard de maturité sexuelle peut survenir chez *Eisenia fetida* (Spurgeon et Hopkin

1996) et la croissance des individus peut être diminuée (Abdul Rida et Bouché, 1995; Lukkari *et al.*, 2004a; Spurgeon et Hopkin, 1996). L'activité de certaines enzymes peut également être modifiée (Laszczyca *et al.*, 2004; Lukkari *et al.*, 2004b).

Une synthèse bibliographique exhaustive a permis d'identifier plusieurs effecteurs présents chez la plupart des macroinvertébrés continentaux dont l'expression est affectée par une pollution métallique. Le choix de ces effecteurs a été guidé en partie par les travaux de Liao et Freedman (Liao et Freedman, 1998). En effet, ces auteurs ont démontré chez *Caenorhabditis elegans* (Nématode) l'existence d'un groupe de 32 gènes dont l'expression varie lors d'expositions au Cd. Nombre de ces effecteurs sont impliqués dans des mécanismes de défense des organismes et présentent un fort degré de conservation phylogénique. Ce haut degré de conservation est lié au rôle physiologique essentiel exercé par ces effecteurs. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur le clonage de ces effecteurs par RT-PCR chez l'espèce *Eisenia fetida*. Puis, l'analyse du niveau d'expression de ces effecteurs lors d'une exposition à un contaminant métallique a été entreprise par PCR en temps réel.



Concrètement, les 16 effecteurs sélectionnés étaient: la calmoduline, les HSP 60 et 70, la superoxyde dismutase Cu/Zn, la catalase, la Cd-métallothionéine, la  $\beta$ -adrenergic receptor kinase, la pyruvate carboxylase, la TCTP, la protéine kinase C, et l'ubiquitine. Du fait de leur implication dans des mécanismes de défense, leur clonage a été entrepris sur le tissu ayant un rôle immunitaire majeur chez notre modèle, les cellules circulantes de la cavité coelomique: les coelomocytes. Le clonage est une étape préliminaire indispensable, puisque pour analyser le niveau d'expression par PCR en temps réel, il est nécessaire de connaître, au moins partiellement, la séquence des gènes sélectionnés.

Le niveau d'expression des candidats a été analysé lors d'expositions *in vivo* à des sols artificiels contaminés par différentes concentrations de Cd au moyen de la PCR en temps réel. Lors de ces intoxications expérimentales, la plupart des effecteurs n'ont pas montré de variations intéressantes de leur niveau d'expression. Seuls les gènes *Cd-mt* et *catalase* présentent des variations intéressantes (*figures 1 et 2*). Le gène de la catalase se caractérisait par une diminution significative de son niveau d'expression après 14 heures et 1 jour d'exposition à 80 et 800 mg Cd kg<sup>-1</sup>, alors que le gène de la Cd-MT était caractérisé par une augmentation dose et temps dépendante quel que soit le niveau de contamination étudié (induction après 1 jour et 14 heures pour des intoxications de 80 et 800 mg Cd kg<sup>-1</sup> respectivement). À la vue de ces résultats, la *catalase* et la *Cd-mt* peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs précoces d'exposition au Cd. De plus, il est intéressant de noter que lors de cette expérimentation a été observée une diminution du niveau d'expression d'un grand nombre d'effecteurs après 14 heures d'exposition quel que soit le niveau de contamination. Cette baisse observée est à mettre en relation avec l'augmentation significative du nombre de transcrits codant la Cd-MT, qui survient au même moment. Ceci suggère un coût métabolique pour la synthèse de Cd-MT et la séquestration des métaux au niveau subcellulaire ou dans d'autres types cellulaires. Ce mécanisme pourrait être aussi appelé Trade-off (pour plus de détails voir Brulle *et al.*, 2006).

Une variation de l'expression génique dans d'autres organes et plus particulièrement dans les épithélia de contact avec le sol contaminé, *i.e.* principalement l'épiderme, le tractus digestif ou le tissu chloragogène qui entoure le tractus digestif ne pouvant pas être négligée, l'analyse du niveau d'expression des candidats sélectionnés a également été réalisée sur individus entiers.

Ainsi, des groupes de 6 individus ont été exposés aux mêmes concentrations de Cd que celles utilisées lors de l'étude sur coelomocytes. A cela s'ajoutent le clonage et l'analyse du niveau d'expression d'un nouveau candidat biomarqueur. En effet, le gène codant la cyclophiline-A, une enzyme appartenant à la superfamille des immunophilines, a été identifié dans la littérature

comme variant chez *Lumbricus rubellus*, une espèce proche d'*Eisenia fetida*, lors d'un stress métallique (Stürzenbaum *et al.*, 1999). De plus, des expositions à trois concentrations de Cu (40, 120 et 400 mg Cu kg<sup>-1</sup>) ont été réalisées en parallèle. En effet, une analyse complémentaire de la littérature a permis de mettre en lumière que certains candidats étudiés lors d'intoxications au Cd pouvaient également être inductibles par le Cu. C'est le cas de la *Cd-mt*, du *tctp* et de la *cyclophiline-A* (Galay-Burgos *et al.*, 2003; Stürzenbaum *et al.*, 1998a; 1998b; 1999). Enfin, l'expression de chacun des effecteurs a été étudiée suite à des expositions de 14 jours, au lieu de 6 seulement comme dans le cas des travaux sur les cellules circulantes de la cavité coelomique. Cet allongement de la période d'exposition avait pour but de ne pas négliger une induction plus tardive qui pouvait survenir pour l'un des candidats.

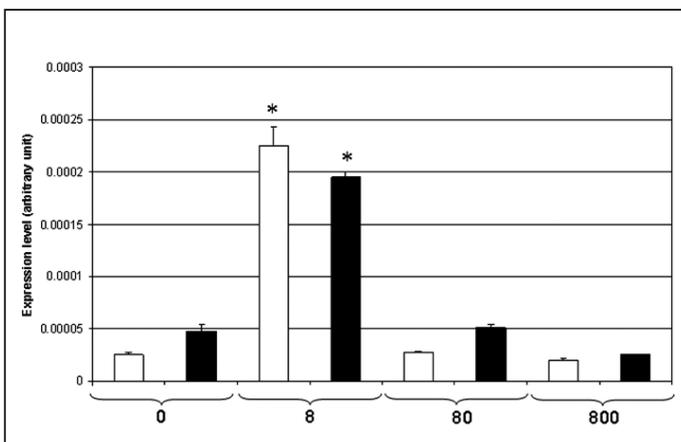
Les résultats ont montré que, parmi tous les effecteurs étudiés, seul le gène *Cd-mt* était caractérisé par une induction précoce et massive de son niveau d'expression quel que soit le niveau de contamination considéré lors d'expositions aux sols contaminés par le Cd (plus de 5 fois après 14 heures d'exposition à 80 mg Cd kg<sup>-1</sup> et plus de 3 fois après 6 heures d'exposition à 800 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Ces résultats sont similaires à ceux observés sur les coelomocytes, cependant l'induction de *Cd-mt* observée au niveau de l'individu entier est plus précoce. De plus, un maximum d'induction était rapidement atteint après 2 jours d'exposition à 800 mg Cd kg<sup>-1</sup>. Cette forte induction qui est maintenue tout au long de l'exposition (14 jours) peut être interprétée comme un phénomène d'acclimatation, c'est-à-dire un phénomène physiologique permettant à un organisme d'être plus tolérant lors d'une exposition à un contaminant. Ici, la synthèse massive de protéines impliquées dans les mécanismes de détoxication telle que la Cd-MT permettrait de rendre les individus tolérants à une contamination métallique.

Lorsque les vers étaient exposés à des sols artificiellement contaminés par le Cu, la *Cd-mt* montrait une augmentation significative de son niveau d'expression pour les concentrations de 120 et 400 mg Cu kg<sup>-1</sup> (*figure 3*). En effet, la quantité d'ARNm codant la Cd-MT était jusqu'à 16 fois supérieure à celle observée chez les vers témoins. Ces résultats démontrent l'existence d'une réponse dose-dépendante du gène *Cd-mt* pour des concentrations sub-létales de Cu chez *Eisenia fetida*.

Enfin, au-delà des résultats non informatifs obtenus pour la plupart des effecteurs, il est intéressant de noter une diminution significative du niveau d'expression de 13 des 15 effecteurs étudiés après 14 heures d'exposition à 800 mg Cd kg<sup>-1</sup> (*figure 4*). Une telle répression a également été observée pour 9 effecteurs chez les individus exposés 2

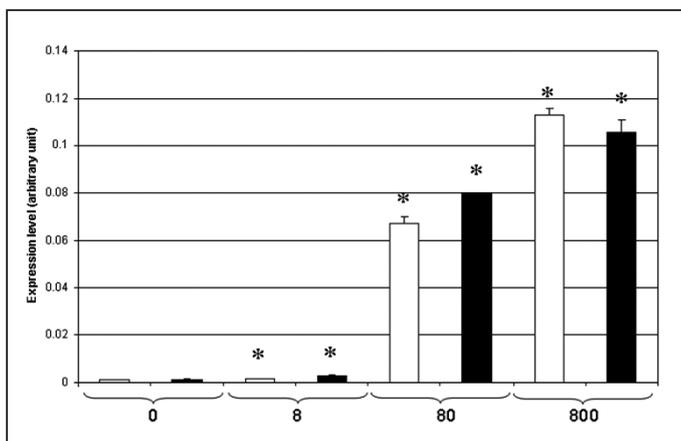
**Figure 6** - Niveau d'expression de la PCS chez des vers témoins et des vers exposés au cadmium via un sol artificiel (8, 80, ou 800 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 2 et 14 jours (barres blanches et noires respectivement) \*: Différences significatives au seuil de 0.05. Travail sur cœlomocytes.

**Figure 6** - Expression levels of phytochelatin synthase mRNA in cœlomocytes of control and Cd exposed (8, 80 or 800 mg kg<sup>-1</sup>) earthworms after 2 days (white bars) and 14 days (black bars) of exposure. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ).



**Figure 7** - Niveau d'expression de la MT chez des vers témoins et des vers exposés au cadmium via un sol artificiel (8, 80, ou 800 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec) pendant 2 et 14 jours (barres blanches et noires respectivement) \*: Différences significatives au seuil de 0.05. Travail sur cœlomocytes.

**Figure 7** - Expression levels of metallothionein mRNA in cœlomocytes of control and Cd exposed (8, 80 or 800 mg kg<sup>-1</sup>) earthworms after 2 days (white bars) and 14 days (black bars) of exposure. \*: significant difference ( $p < 0.05$ ).



jours à 80 mg Cd kg<sup>-1</sup>. Cette répression peut être mise en relation avec l'induction massive de *Cd-mt* se produisant aux mêmes moments. Lors d'un stress métallique intense, la synthèse de la Cd-MT pourrait se faire temporairement au détriment d'autres protéines non-essentielle. Ainsi, l'énergie détournée pour la synthèse accrue de Cd-MT protégerait les organismes des effets toxiques du Cd. Ce phénomène nommé Trade-off constituerait une réponse globale des organismes à une situation de stress intense (voir Brulle et al. 2007).

Cette approche ciblée, associant les données de la littérature à l'exploitation des données publiées dans les banques de séquences telles que GenBank™, nous a permis d'identifier, de caractériser et d'analyser le niveau d'expression d'un dernier candidat biomarqueur, la phytochélatine synthase (*pcs*).

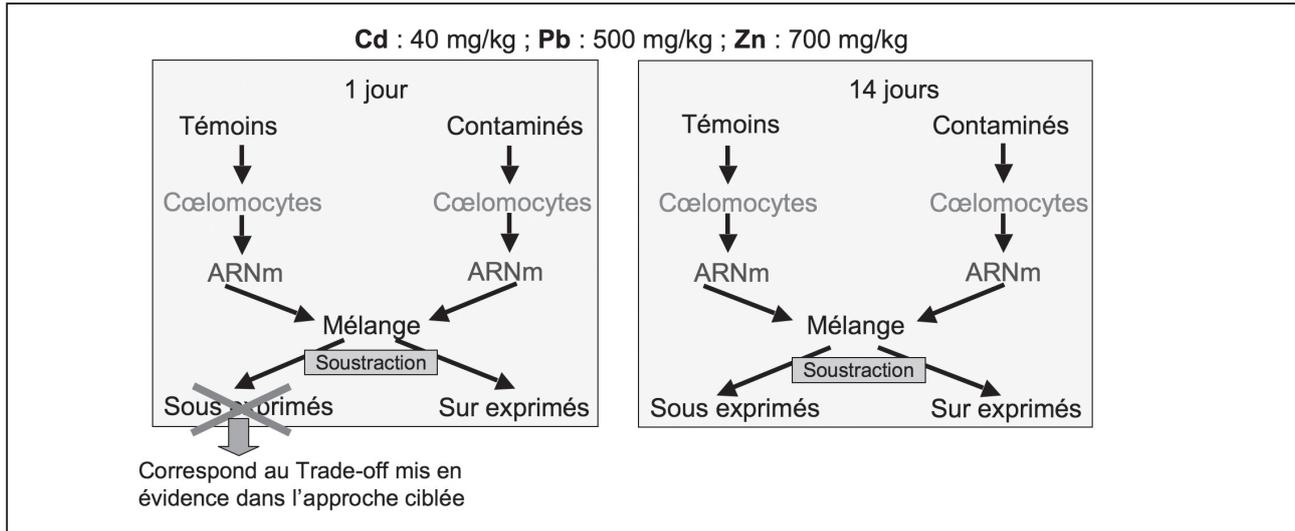
L'exploitation de la conservation protéique observée entre les espèces a conduit à la caractérisation de la *pcs* chez la première espèce appartenant aux lophotrochozoaires. Concrètement, nous avons cloné la séquence codante complète de l'ADNc codant la PCS à partir des cellules immunitaires d'*Eisenia fetida*, puis nous avons étudié sa relation avec les séquences correspondantes obtenues chez les plantes, les levures et les nématodes. Ce clonage a été réalisé grâce à l'utilisation d'amorces dégénérées, déterminées préalablement par la réalisation d'alignements protéiques utilisant les séquences des espèces animales et végétales chez lesquelles la *pcs* avait été caractérisée à ce jour (Corpet, 1988; Rose et al., 1998) (figure 5).

De plus, l'analyse du niveau d'expression de cette enzyme par PCR en temps réel, lors d'expositions expérimentales *in vivo* à 3 doses de Cd (8, 80 et 800 mg kg<sup>-1</sup>), a été réalisée en complément de celle du gène *Cd-mt*, un gène répondant de manière dose- et temps-dépendante au Cd chez *Eisenia fetida* (Brulle et al., 2006.; Brulle et al., 2007).

L'analyse de la séquence obtenue chez *E. fetida* a montré, tant au point de vue protéique et phylogénétique, que l'ADN complémentaire cloné était bien celui de la phytochélatine synthase. Puis, l'étude du niveau d'expression des gènes codant la PCS et la Cd-MT a permis de mettre en évidence une induction significative du niveau d'expression de *pcs* pour des concentrations faibles de Cd quel que soit le temps d'exposition (6 à 5 fois respectivement après 2 et 14 jours d'exposition à 8 mg Cd kg<sup>-1</sup>) (figure 6). Pour des concentrations considérées comme fortes (80 et 800 mg Cd kg<sup>-1</sup>), *pcs* ne montrait pas de variations de son niveau d'expression. La *Cd-mt* pour sa part montrait un profil d'expression totalement différent puisque caractérisé par une induction faible à 8 mg Cd kg<sup>-1</sup> (1,5 à

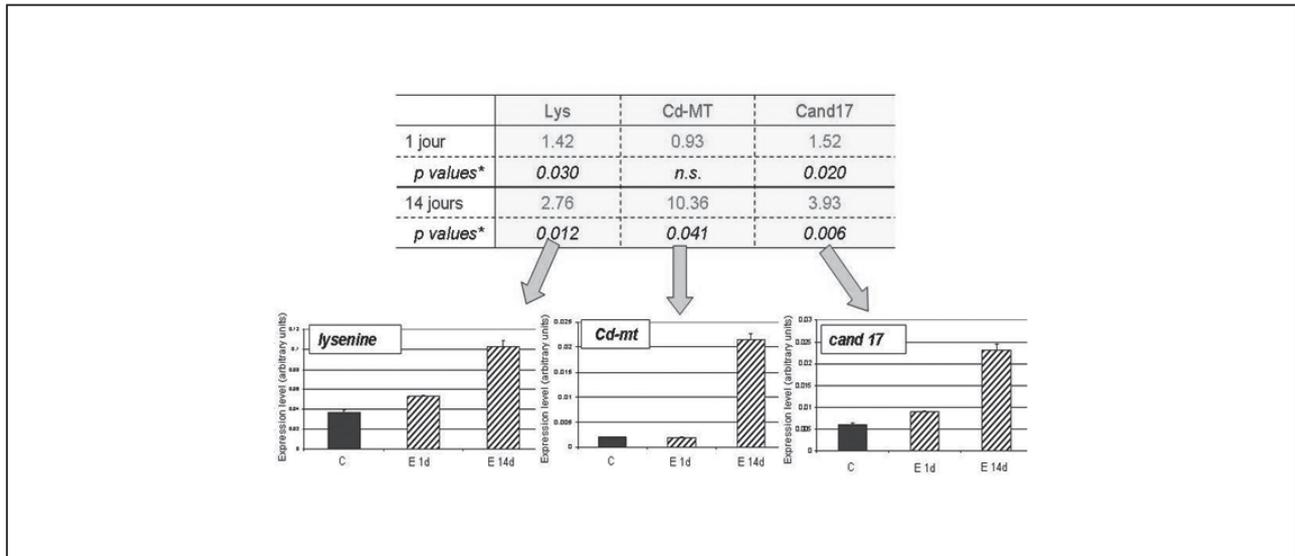
**Figure 8** - Principe du protocole expérimental mis en place pour la réalisation de la banque soustractive sur *Eisenia fetida* (Brulle et al., 2008b).

**Figure 8** - Experimental design used to performed subtractive suppressive hybridization on *Eisenia fetida* coelomocytes (Brulle et al., 2008b).



**Figure 9** - Valeurs d'induction (par rapport aux témoins) et valeurs de p (test-t) pour 3 candidats au cours de l'exposition au sol de Metaleurop. (1 et 14 jours d'exposition). Travail sur coelomocytes.

**Figure 9** - Relative expression ratios of 3 candidates during the Metaleurop soil exposure. For each transcript, expression levels (relative to  $\beta$ -actin) were measured on *E. fetida* exposed 1 and 14 days to the smelter soil and on *E. fetida* from controlled cultures of our laboratory.



2,5 fois) et massive à 80 et 800 mg Cd kg<sup>-1</sup> (50 à 90 fois) quel que soit le temps d'exposition (figure 7).

Ces résultats suggèrent que la PCS est impliquée dans la détoxification du Cd de manière dose-dépendante. De plus, les réponses comparées de la *pcs* et de la *Cd-mt* suggèrent que ces 2 gènes peuvent agir de conserve dans les processus de détoxification, avec une PCS qui aurait un rôle dans les réponses immédiates ou pour de faibles concentrations et la Cd-MT qui participerait plus tardivement ou pour des concentrations plus importantes. Ainsi, le clonage de l'ADN complémentaire codant la PCS chez *E. fetida* et l'analyse de son niveau d'expression font de la PCS un nouveau candidat biomarqueur pour des faibles contaminations par le Cd (voir Brulle *et al.*, 2008a).

## APPROCHE GLOBALE

### Identification et étude du profil d'expression de nouveaux gènes induits par les éléments traces métalliques dans les cellules circulantes de l'Annélide *Eisenia fetida*

La faiblesse de l'approche « ciblée » décrite précédemment (étude de candidats-biomarqueurs dont le rôle est documenté ou du moins suggéré) réside dans le fait que nous dépendions de données publiées ou disponibles dans les banques de données. De plus, cette approche ciblée ne nous a pas permis d'identifier d'aussi bons candidats que la *Cd-mt*.

Parmi les techniques biologiques permettant l'analyse transcriptomique, la génération d'ESTs, de petites portions d'ADN (de 200 à 500 paires de bases habituellement) générées à partir du séquençage partiel d'une des extrémités de clones d'ADN complémentaires choisis au hasard, est l'une des techniques les plus simples pour caractériser le transcriptome. En l'absence du séquençage du génome complet de Lumbricidés, les ESTs permettent une identification rapide des gènes exprimés, grâce à l'analyse de séquences. De plus, ces séquences sont une ressource importante pour les études de génomique comparative et fonctionnelle. L'analyse transcriptomique utilisant des ESTs fournit un jeu de données fondamental et rapide pour l'identification de gènes exprimés dans certaines cellules, certains tissus ou dans un organe donné.

Depuis quelques années, certains projets ont permis de générer des ESTs chez des Annélides Oligochètes. Ainsi, Stürzenbaum *et al.* (2003) et Lee *et al.*, (2005) ont produit respectivement plus de 17 000 ESTs chez *Lumbricus rubellus* et 1 106 ESTs chez *Eisenia andrei*. Cependant, il existe très peu de données disponibles dans les banques de données génétiques pour *Eisenia fetida*. En effet, jusqu'en septembre 2007, le nombre de données génétiques disponibles dans GenBank™

pour *Eisenia fetida* était de 103 séquences nucléotidiques et 96 séquences protéiques. Ainsi, en complément de l'approche ciblée, nous avons mis en œuvre une approche écotoxicogénomique en écotoxicologie des invertébrés. Cette approche dite « globale » repose sur la réalisation de banques soustractives d'ADNc (SSH: Suppressive Subtraction Hybridization) (Diatchenko *et al.*, 1996) qui devraient permettre d'identifier de nouveaux gènes dont l'expression varie lors d'un épisode d'exposition métallique, donc candidats biomarqueurs.

Les banques soustractives ont été réalisées sur cœlomocytes car nous avons montré lors de l'approche ciblée que les résultats obtenus sur cellules circulantes et animaux entiers étaient similaires, justifiant notre choix initial de travailler sur les cœlomocytes du fait de l'implication de la plupart des effecteurs dans des mécanismes de défense immunitaire. En effet, les variations les plus importantes ont été mesurées à la fois sur cœlomocytes et animal entier et d'un point de vue technique, les cœlomocytes sont simples à échantillonner, les ARN extraits sont d'excellente qualité et le protocole utilisé est non invasif. Concrètement, un substrat artificiel contenant un mélange complexe comportant Cd, Pb et Zn à des concentrations réalistes (40 mg Cd kg<sup>-1</sup>; 500 mg Pb kg<sup>-1</sup>; 700 mg Zn kg<sup>-1</sup>) (*i.e.* que l'on peut retrouver sur le terrain) a été réalisé. Des lots de 25 *Eisenia fetida* ont été exposés pendant 1 jour (exposition courte) ou 14 jours (exposition longue) à ce mélange. Les ARN ont ensuite été extraits des cœlomocytes et la banque soustractive mise en œuvre (figure 8). Un total de 1536 ESTs issus des trois conditions étudiées lors de cette banque soustractive a été obtenu. Ces séquences se répartissent de la manière suivante : 768 séquences correspondant à la condition sur-exprimé 14 jours, 384 séquences correspondant à la condition sur-exprimé 1 jour et 384 séquences correspondant à la condition sous-exprimé 14 jours. La condition Reverse 1 jour a été volontairement négligée en raison du Trade-off mis en évidence dans l'approche ciblée lors de l'étude réalisée sur animal entier (Brulle *et al.*, 2007). L'ensemble de ces séquences a ensuite fait l'objet d'une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel Sequencher™ 4.2 (Genecode, Ann Arbor, Michigan). Cette analyse a permis d'extraire vecteurs, adaptateurs et séquences de mauvaises qualités pour obtenir au final 764 séquences uniques de haute qualité. Ces 764 ESTs ont ensuite été répartis en 6 catégories fonctionnelles sur la base de données disponibles dans les banques de données et l'utilisation de « Gene Ontology » (Ashburner *et al.*, 2000). Une fonction putative a été attribuée à 27,62 % des ESTs analysés, 24,34 % des ESTs présentent des homologues avec des protéines dont la fonction est inconnue, signifiant que 48,04 % correspondent à des protéines nouvelles. L'analyse des séquences a montré que la catégorie regroupant des gènes impliqués dans le métabolisme était la catégorie fonctionnelle prédominante quelle que soit la banque considérée. De plus, cette analyse bioinformatique a permis d'identifier 18 nouveaux candidats d'exposition aux

ETMs, choisis sur la base de leur redondance *i.e.* les effecteurs les plus abondants ont été choisis.

Parmi les 18 candidats, on retrouve un gène impliqué dans la réponse immunitaire (*lysénine*) et 5 gènes impliqués dans le métabolisme (*Cd-mt*, *cytochrome c oxydase I*, *cytochrome b*, *tctp* et *granuline*). On retrouve également 2 gènes codant des protéines du signal de transduction (*sarcoplasmic calcium-binding protein* (SCBP) et *parvalbumine*), puis on retrouve un gène codant une protéine ribosomale: la Ribosomal protein S16. Enfin, les 9 autres gènes sont soit similaires à des protéines dont on ignore la fonction (4 candidats) soit ne présentent aucune similarité avec des séquences déjà présentes dans les banques de données. Ces 18 nouveaux candidats ont fait l'objet de 2 étapes de validation successives. La première étape de validation a consisté en l'étude de leurs profils d'expression génique par PCR en temps réel, grâce à une banque d'ADN complémentaires provenant des conditions qui nous ont permis de réaliser la banque soustractive. Puis, les candidats validés lors de cette première étape ont fait l'objet d'une deuxième étape de validation passant par une étude en microcosmes qui consistait en la réalisation d'expositions en microcosmes naturels en conditions contrôlées au laboratoire. Pour ces expositions en microcosmes, nous avons utilisé un sol fortement pollué provenant d'un site localisé à proximité de l'emplacement de l'ancienne usine de Metaleurop à Evin-Malmaison, dont les concentrations en métaux sont comparables à celles utilisées pour la réalisation de la banque soustractive.

Suite à ces 2 étapes de validation successives, 3 candidats parmi les 18 initiaux ont montré des variations significatives de leur niveau d'expression (*figure 9*). Ces 3 candidats sont: la Cd-MT (dont la présence démontre que l'étape de soustraction de la banque soustractive s'est bien déroulée et que les autres gènes validés sont bien différenciellement exprimés pour les conditions d'exposition utilisées), la *Lysénine*, une protéine hémolytique, localisée dans les cœlomocytes et plus particulièrement dans un type cellulaire donné: les chloragocytes, et un dernier candidat dont le clonage par RACE-PCR de la partie codante complète a identifié comme étant la Coactosin-Like Protein, une protéine impliquée dans des mécanismes de signalisation cellulaire et plus particulièrement dans la synthèse des leucotriènes chez les vertébrés, mais dont le rôle est encore inconnu chez les invertébrés (Voir Brulle *et al.* 2008b).

## CONCLUSIONS

Le constat de fonctionnement/dysfonctionnement au niveau des écosystèmes et des communautés (animales/végétales) doit s'accompagner d'une compréhension des relations entre organismes et de la biologie d'espèces clés. Le but principal est d'identifier les causes de perturbation *in situ* (exposition) et éventuellement de dégager des moyens de

remédiation efficaces compatibles avec le vivant. Une véritable approche écotoxicologique doit intégrer les différents niveaux d'organisation (du moléculaire à l'écosystème) à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Les indicateurs écologiques globaux (*e.g.* indices de diversité, indices biotiques, indices biologiques diatomiques, etc.) présentent l'avantage de donner une vision intégrée de l'état de santé de l'écosystème. Ils sont réalistes dans la mesure où ils sont établis *in situ*, intégrant une dimension temporelle, mais sont difficiles à mettre en œuvre avec une bonne « reproductibilité » et ne permettent souvent qu'un constat tardif des atteintes subies par les milieux. L'étude des réponses biologiques des individus vis-à-vis d'un contaminant est très importante pour évaluer les risques d'effets délétères sur les organismes qui peuplent un écosystème mais est rarement pertinente d'un point de vue écologique. Ainsi, de nombreuses recherches en écotoxicologie se focalisent sur la mesure des traits d'histoire de vie, typiquement la mortalité, ainsi que sur les effets des contaminants sur la reproduction et la croissance. Depuis quelques années, les recherches réalisées à l'échelle infra-individuelle, et plus particulièrement au niveau moléculaire, se multiplient. Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et tentent de mettre en rapport les changements moléculaires avec les changements observés au niveau des individus et des populations.

Les travaux décrits précédemment constituent une contribution, 1- à l'identification de gènes différenciellement exprimés chez l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*, en réponse à une contamination d'origine métallique; 2- à l'identification de gènes dont les variations d'expression pourraient être indicatrices d'expositions à des contaminants métalliques, donc biomarqueurs potentiels. Ces travaux ont été initiés sur la base de plusieurs constats, 1- la nécessité de rassembler l'ensemble des candidats potentiels identifiés chez divers macroinvertébrés, chez une seule et même espèce, 2- la nécessité d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs d'exposition et d'effet métallique, 3- le manque de données génétiques disponibles pour une espèce pourtant recommandée comme modèle en écotoxicologie (OCDE, 1984 ; 2004). Le travail d'identification de candidats biomarqueurs à partir de ces données se poursuit.

Enfin, la plupart des effecteurs étudiés lors de ce travail sont conservés et présents chez des espèces d'Annélides Oligochètes proches que l'on peut retrouver sur des terrains pollués par les ETMs (*Lumbricus rubellus*, *Lumbricus castaneus*, *Lumbricus terrestris* et *Lumbricus friendi*). L'analyse du niveau d'expression des gènes candidats biomarqueurs identifiés lors de ce travail de recherche est donc un outil transposable chez ces espèces. Les premiers résultats d'expérimentations menées récemment suggèrent que certains gènes varient de manière semblable chez des espèces collectées sur des terrains contaminés par des ETMs.

## REMERCIEMENTS

Ces travaux sont le résultat d'un projet de thèse (FB) financé par l'ADEME et la région Nord-Pas-de-Calais entre 2005 et 2008 et d'un financement provenant du Programme de Recherches Concertées: Sites et sols pollués - Environnement et Activités Humaines (Agence Nationale de la Recherche - Contrat de Plan Etat/Région Nord-Pas-de-Calais). Les auteurs remercient le Dr. Claude Cocquerelle, le Dr. Francis Douay, le Dr. Sébastien Lemièrre, le Pr. Guillaume Mitta et le Pr. Alain Leprêtre pour leur contribution et Mlle Régine Leroux pour son assistance technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdul Rida, A. M. M. et Bouché, M. B., 1995 - The eradication of earthworm genus by heavy metal in southern France. *Appl. Soil. Ecol.*, 2, pp. 45-52.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, H., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. et Sherlock, G., 2000 - Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 1, pp. 25-29.
- Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., Vieau, D., Lemièrre, S., Leprêtre, A. et Vandenbulcke, F., 2006 - Cloning and Real-Time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 40, pp. 2844-2850.
- Brulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A. et Vandenbulcke, F., 2007 - The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comp. Biochem. Phys. C*, 144, 4, pp. 334-341.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A. N., Morgan, A. J., Kille, P., Leprêtre, A. et Vandenbulcke, F., 2008a - cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida; Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Safe.*, 71, pp. 47-55.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A. et Vandenbulcke, F., 2008b - Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* cœlomocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 32, pp. 1441-1453.
- Corpet, F., 1988 - Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, 16, pp. 10881-10890.
- Cotrufo, M. F., De Santos, A. V., Alfani, A., Bartoli, G. et De Cristofaro, A., 1995 - Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in *Quercus ilex* L. woods. *Environ. Pollut.*, 89, pp. 81-87.
- Darwin, C. R. The formation of vegetable mould, through the action of worms with observations on their habitats 1883. John Murray, London.
- Declercq, C. et Beaubois, M. Programme de dépistage du saturnisme infantile autour du site Metaleurop de Noyelles-Godault. Bilan de la campagne 1999-2000, Lille, Observatoire Régional de la santé, Nord-Pas-de-Calais 2000.
- Diatchenko, L., Iau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Mogadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. et Siebert, P. D., 1996 - Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12, pp. 6025-6030.
- Dickinson, N. M., Turner, A. P., Watmough, S. A. et Lepp, N. W., 1992 - Acclimation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. *Annals of Botany*, 70, 6, pp. 569-572.
- Doran, J. W. et Safley, M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. Biological indicators of soil health. CAB International, 1997.
- Douay, F., Pruvost, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N. et Waterlot, C., 2008 - Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air Soil Poll.*, 188, pp. 247-260.
- Fisher, W. S., Oliver, L. M., Winstead, J. T. et Volety, A. K., 2003 - Stimulation of defense factor for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicol.*, 64, 4, pp. 375-391.
- Frangi, J.-P. et Richard, D., 1997 - Heavy metal pollution cartography in northern France. *Sci. Total. Environ.*, 205, pp. 71-79.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D. J., Weeks, J. M., Stürzenbaum, S. R., Morgan, A. J. et Kille, P., 2003 - Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers*, 8, 4/3, pp. 229-239.
- Grelle, C. et Descamps, M., 1998 - Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia*, 42, pp. 289-297.
- Klaassen, C. D., Liu, J. et Choudhuri, S., 1999 - Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 39, pp. 267-294.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M. et Narbonne, J. F., 1996 - In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1, pp. 21-28.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. et Ramade, F. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. In: Collection "Recherche en Biologie" 1997 pp. 419. Masson, Paris, 419p.
- Lagisz, M., Kramarz, P., Laskowski, R. et Tabor, M., 2002 - Population parameters of the beetle *Pterostichus oblongopunctatus* F. from metal contaminated and reference areas. *B. Environ. Contam. Tox.*, 69, pp. 243-249.
- Laszczyca, P., Augustyniak, M., Babczynska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G. et Witas, I., 2004 - Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ. Int.*, 30, pp. 901-910.
- Lee, M. S., Cho, S. J., Tak, E. S., Lee, J. A., Cho, H. J., Park, B. J., Shin, C., Kim, D. K. et Park, S. C., 2005 - Transcriptome analysis in the midgut of the earthworm (*Eisenia andrei*) using expressed sequence tags. *Biochem. Bioph. Res. C.*, 328, 4, pp. 1196-1204.
- Liao, V. L. C. et Freedman, J. H., 1998 - Cadmium-regulated Genes from the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, pp. 31962-31970.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A. et Haimi, J., 2004a - Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotox. Environ. Safe.*, 59, 3, pp. 340-348.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A. et Haimi, J., 2004b - Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier exposure. *Environ. Pollut.*, 19, pp. 377-386.
- Manios, T., Stentiford, E. I. et Millner, P. A., 2003 - The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecol. Eng.*, 20, pp. 65-74.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. et Roch, P., 2000 - Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.*, 486, 3, pp. 185-190.
- Moffett, B. F., Nicholson, F. A., Uwakwe, N. C., Chambers, B. J., Harris, J. A. et Hill, T. C. J., 2003 - Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, pp. 13-19.

- Morgan, A. J., Kille, P. et Stürzenbaum, S. R., 2007 - Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ. Sci. Technol.*, 41, pp. 1085-1096.
- Mozdzer, T. J., Kramarz, P., Piskiewicz, A. et Niklinska, M., 2003 - Effects of cadmium and zinc on larval growth and survival in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus*. *Environ. Int.*, 28, pp. 737-742.
- Müller, A. K., Westergaard, K., Christensen, S. et Sorensen, S. J., 2001 - The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 36, pp. 11-19.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. et Bachere, E., 2002 - Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.*, 269, pp. 2678-89.
- Nawrot, T., Plusquin, M., Hogervorst, J., Roels, H. A., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van Hecke, E. et Staessen, J. A., 2006 - Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: A prospective population-based study. *Lancet Oncol.*, 7, pp. 119-126.
- OCDE. Guideline for testing chemicals. 1984. In: Section 2: effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests. Paris, France.
- OCDE. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), 2004. In: Guidelines for the testing of chemicals. No. 222. Paris, France.
- Palmiter, R. D., 1998 - The elusive function of metallothioneins. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, pp. 8428-8430.
- Pawert, M., Triebkorn, R., Gräff, S., Berkus, M., Schulz, J. et Kölher, H.-R., 1996 - Cellular alterations in midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci. Total. Environ.*, 181, pp. 187-200.
- Pizl, V. et Josen, G., 1995 - Earthworm communities along a gradient of urbanisation. *Environ. Pollut.*, 90, pp. 7-14.
- Pruvost, C., Douay, F., Fourier, H. et Waterlot, C., 2006 - Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *J. Soil. Sediment.*, 6, 4, pp. 215-220.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrovski, S., McCallum, C. M. et Henikov, S., 1998 - Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.*, 26, pp. 1628-1635.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P. et Fournier, M., 2003 - Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotox. Environ. Safe.*, 52, 1, pp. 21-29.
- Spurgeon, D. J. et Hopkin, S. P., 1996 - Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotox. Environ. Safe.*, 35, pp. 86-95.
- Spurgeon, D. J., Weeks, J. M. et van Gestel, C. A. M., 2003 - A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, 47, 5-6, pp. 588-606.
- Spurgeon, D. J., Stürzenbaum, S. R., Svendsen, C., Hankard, P. K., Morgan, A. J., Weeks, J. M. et Kille, P., 2004 - Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Phys. C*, 138, pp. 11-21.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N. et Fourier, H., 2000 - Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the north of France. *Environ. Pollut.*, 107, pp. 377-389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, F., Fourier, H. et Perdrix, E., 2002 - Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air Soil Poll.*, 135, (1-4), pp. 173-194.
- Stone, D., Jepson, P., Kramarz, P. et Laskowski, R., 2001 - Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environ. Pollut.*, 113, pp. 239-244.
- Stürzenbaum, S. R., Kille, P. et Morgan, A. J., 1998a - The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.*, 431, pp. 437-442.
- Stürzenbaum, S. R., Kille, P. et Morgan, A. J., 1998b - Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1398, pp. 294-304.
- Stürzenbaum, S. R., Morgan, A. J. et Kille, P., 1999 - Characterisation and quantification of earthworm cyclophilins: identification of invariant and heavy metal responsive isoforms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, pp. 467-473.
- Stürzenbaum, S. R., Parkinson, J., Blaxter, M., Morgan, A. J. et Kille, P., 2003 - The earthworm expressed sequence tag project. *Pedobiologia*, 47, pp. 447-451.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautiere, P. E. et Salzet, M., 1994 - Molecular characterization of two novel anti-bacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 23, pp. 30973-30982.
- Vasak, M. et Hasler, D. W., 2000 - Metallothioneins: New functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 2, pp. 177-183.
- Weeks, J. M., 1995 - The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? *Appl. Soil. Ecol.*, 2, pp. 215-216.

