
Analyse des profils d'expression chez les Annélides Oligochètes afin d'identifier de grandes fonctions physiologiques perturbées par les métaux

Franck Brulle* & Franck Vandembulcke**

**Laboratoire Ecologie Numérique et Ecotoxicologie – Université Lille 1
Bâtiment SN3, Biologie animale, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex*

*** IUTA – Université Lille 1, Département Génie Biologique
Boulevard Langevin-BP 179 59653 621 Villeneuve d'Ascq Cedex*

franckbrulle@yahoo.fr ; franck.vandembulcke@univ-lille1.fr

Sections de rattachement : 68

Secteur : Secondaire

RÉSUMÉ. Les activités métallurgiques mènent à l'accumulation de métaux dans les couches superficielles des sols où l'on peut observer des concentrations largement supérieures aux normes en vigueur. La contamination des sols est une menace pour la santé publique et la présence de grandes quantités de contaminants peut générer un stress environnemental pouvant affecter les organismes exposés à ces sols. Les organismes vivant en contact étroit avec ces sols contaminés peuvent être affectés à différents niveaux, des plus élevés (populations et communautés) jusqu'aux plus bas (niveau moléculaire). Le lien entre les conséquences biologiques d'une exposition métallique et les changements observés à l'échelle moléculaire (expression génique modifiée par exemple) n'a été établi que partiellement. Quelques gènes montrant des réponses spécifiques aux métaux ont été testés individuellement. La plupart sont impliqués dans des mécanismes de résistance aux effets délétères induits par les métaux (i.e. les métallothionéines). Ces dernières années, des outils moléculaires permettant l'identification et l'analyse des changements globaux d'expression génique en réponse à une exposition aux métaux ont été développés chez les Annélides Oligochètes. Ces outils de transcriptomique (Expressed Sequence Tags, banques soustractives, puces à ADN, PCR temps réel) permettent (1) l'identification de groupes de gènes dont l'expression est affectée par une exposition aux métaux et (2) l'identification des fonctions physiologiques dans lesquelles ils sont impliqués. L'identification des fonctions physiologiques altérées par la présence de métaux polluants et l'analyse des profils d'expression des gènes appartenant à ces fonctions permet d'obtenir plus d'informations sur le mode d'action de ces contaminants. Dans cette revue, nous avons compilé les études faites au niveau moléculaire chez les Annélides Oligochètes lors d'expositions à des métaux polluants (Cadmium, Plomb, Cuivre, Zinc).

MOTS-CLÉS : Pollution des sols, Annelides Oligochètes, Expression génique, Analyses transcriptomiques, Biomarqueurs d'exposition, Signature de perturbation.

1. Introduction

Toutes les réponses à un stress externe, incluant les Eléments Traces Métalliques (ETMs), impliquent des changements dans les profils d'expression génique. Quelques réponses sont le résultat de l'exposition à un composé chimique, d'autres sont compensatoires, c'est à dire qu'elles reflètent la réponse d'un organisme aux dommages moléculaires ou aux dysfonctionnements cellulaires provoqués par la présence du composé chimique (Ankley *et al.*, 2006). Depuis quelques années, les outils permettant l'analyse du transcriptome ont connu un très grand essor. Ainsi, la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire permettant l'identification des changements globaux survenant au niveau des profils d'expression en ARNm en réponse à diverses conditions expérimentales (Puce à ADN, Banque soustractive suivie de PCR Temps-Réel) s'est généralisée. L'estimation de l'impact des ETMs chez les invertébrés terrestres, via l'utilisation de techniques de biologie moléculaire est une stratégie développée par plusieurs laboratoires depuis de nombreuses années. En effet, les ETMs sont susceptibles de moduler l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes. L'analyse des profils d'expression génique a permis l'identification de biomarqueurs candidats chez les Annelides Oligochètes. Le candidat le plus connu est la Cadmium-métallothionéine (Cd-MT), une protéine de faible poids moléculaire (6000-8000 Da), riche en cystéines (environ 30%), impliquée dans l'homéostasie des éléments traces essentiels tels que le Zinc (Zn) mais aussi la détoxification de métaux tels que le cadmium (Cd) (Palmiter, 1998). La Cd-MT est considérée comme un bon biomarqueur d'exposition car elle montre une réponse dose- et temps-dépendante à certains contaminants métalliques. (Demuyne *et al.*, 2007). 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 dont l'expression est affectée par un stress métallique.

Le terme "toxicogénomique" fut inventé pour décrire l'application de la génomique à la toxicologie (Nuwaysir *et al.*, 1999). Les informations obtenues grâce à la génomique peuvent être utilisées pour réaliser des puces à ADN avec tout ou partie des gènes d'un organisme. Ces puces peuvent être ensuite utilisées pour déterminer quels gènes sont sur- ou sous-exprimés dans une cellule, un organe et/ou le tissu d'un organisme dans des conditions physiologiques données ou en réponse à une perturbation environnementale, telle que l'exposition à un composé chimique toxique. Ces approches transcriptomiques ont permis d'étudier l'expression de nombreux gènes et de mettre en évidence des voies physiologiques impliquées dans la réponse à un composé chimique non essentiel (Métaux, Hydrocarbures, pesticides...). La mise en évidence de voies

physiologiques mises en œuvre pour répondre à un stress chez un organisme test, ainsi que l'identification des gènes associés à ces voies constituent des outils de choix pour identifier un panel de marqueurs d'exposition. Ainsi, l'objectif de cette analyse bibliographique est de faire une **synthèse des études transcriptomiques portant sur la réponse des Annélides Oligochètes suite à une exposition à des ETMs**. Les Annélides Oligochètes, sont considérés comme des « ingénieurs du sol » de par leur rôle primordial dans le maintien de la structure et de la fertilité des sols. Ce groupe d'organismes est distribué mondialement et leur mode de vie, en contact étroit avec le sol, fait d'eux d'excellents organismes test de la toxicité des sols.

2. Analyse des profils d'expression génique chez les Annélides Oligochètes

2.1. Chez *Lumbricus rubellus*

Parmi les techniques biologiques permettant l'analyse transcriptomique, la génération d'ESTs (Expressed Sequence Tags), 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 clonés au hasard, est l'une des techniques les plus simples pour caractériser le transcriptome. En l'absence du séquençage du génome complet des 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 rapidement un jeu de données fondamental pour l'identification de gènes exprimés dans certaines cellules, certains tissus ou dans un organe donné.

Récemment, l'Annélide Oligochète *Lumbricus rubellus* a fait l'objet de plusieurs études transcriptomiques. Contrairement à l'espèce modèle *Caenorhabditis elegans* (Nématode) (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), le génome de *L. rubellus* n'est pas encore connu mais 17 225 séquences ont été obtenues pour cette espèce lors de travaux antérieurs (Stürzenbaum *et al.*, 2003). Une analyse bioinformatique a permis l'identification de 8129 séquences uniques, chacune correspondant à un gène. Puis, une puce à ADN contenant plus de 8100 éléments a été fabriquée, avec pour but d'identifier les profils de transcription spécifiques à une exposition au Cd. (Owen *et al.*, 2008). Concrètement, les vers ont été maintenus dans des sols naturels contaminés artificiellement pendant une période relativement longue (28 jours) en comparaison avec les périodes préconisées pour des tests de toxicité aiguë (48h sur papier filtre et 14 jours dans le sol). Les auteurs ont délibérément choisi une période d'exposition longue pour mesurer la réponse transcriptomique observée à un niveau correspondant au plateau d'acclimatation physiologique, plutôt que dans une phase dynamique associée au stress initial.

Outre l'activation de voies de protection et de détoxification (voie des métallothionéines), le Cd est connu pour ses effets cancérigènes pour l'homme (IARC, 1993). Il induit également des dommages oxydatifs, module la réparation de l'ADN et interfère avec le métabolisme des ions métalliques essentiels, incluant le fer, le calcium et le Zn. L'analyse des profils d'expression obtenus chez *L. rubellus* a confirmé l'existence de profils dose dépendant en accord avec ces mécanismes (Tableau 1).

Un second travail a porté sur la mise en évidence des profils de transcription observés chez *L. rubellus* lors d'une exposition longue (70 jours) en mésocosme à un sol naturel artificiellement contaminé par différentes concentrations de Cuivre (Cu) (Bundy *et al.*, 2008). Outre la mise en évidence de gènes impliqués dans divers mécanismes de détoxification, *i.e.* métallothionéines, hsp 40 et 70, etc, les auteurs ont observé que des gènes impliqués dans 3 voies présentaient de forts changements de leurs niveaux de transcription : (1) la voie associée au transport des électrons ; (2) la voie impliquée dans la liaison des métaux essentiels tels que le calcium ou le fer ; (3) la voie du métabolisme lipidique. D'autre part, nous savons que le Cu entraîne une génotoxicité du fait de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2005), ainsi que des dommages menant à l'apoptose (Raes *et al.*, 2000). Il n'est pas surprenant dès lors d'observer l'induction de certains gènes codant des protéines impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN et dans la régulation des mécanismes apoptotiques.

2.2. Chez *Eisenia fetida*

Depuis quelques années, certains projets ont permis de générer des ESTs chez des Annelides 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, en dépit de son statut d'espèce modèle en Ecotoxicologie, il existait très peu de données disponibles dans les banques de données génétiques pour le vers *Eisenia fetida*. En effet, jusqu'en septembre 2007, le nombre de données génétiques disponibles dans la banque de données GenBankTM pour *Eisenia fetida* était de 103 séquences nucléotidiques et 96 séquences protéiques. Pour combler ce manque, Pirooznia *et al.* (2007) avec une stratégie passant par la réalisation de banques soustractives ont cloné et séquencé 4032 ESTs. Ces auteurs ont construit 2 banques en utilisant notamment les ETMs (Cd, Plomb (Pb), Zn, et Cu). Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus pour chaque exposition à un contaminant après 3 périodes d'exposition (4, 14 et 28 jours) ont été récupérés. Puis, ces ADNc ont été mélangés par groupe de 5 composés chimiques dont les ETMs, pour ensuite réaliser une banque soustractive (Diatchenko *et al.*, 1996). Ainsi, ces auteurs ont obtenu un mélange de séquences représentatif du profil d'expression correspondant à une exposition à 5 contaminants environnementaux. Cette approche ne permet pas de dissocier les gènes altérés spécifiquement par les ETMs mais a tout de même permis l'obtention de 4032 séquences correspondant à 2231 séquences uniques pour lesquelles une fonction a été

assignée via l'utilisation de la banque de données Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000).

Très récemment, une approche similaire reposant sur la réalisation de banques soustractives d'ADNc a été mise en œuvre sur les cellules de la cavité coelomique d'*E. fetida*. Ces cellules appelées coelomocytes sont les cellules immunitaires. Ce travail a permis d'identifier de nouveaux gènes dont l'expression varie lors d'un épisode d'exposition métallique, donc candidats biomarqueurs (Brulle *et al.*, 2008). Concrètement, pour réaliser ces banques soustractives un substrat artificiel contenant un mélange complexe de Cd, Pb et Zn à des concentrations réalistes (40 mg Cd/kg ; 500 mg Pb/kg ; 700 mg Zn/kg) (*i.e.* que l'on peut retrouver sur sites pollués) 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. Un total de 1536 ESTs a été obtenu. L'ensemble de ces séquences a ensuite fait l'objet d'une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel SequencherTM 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, chacune correspondant à un gène unique. 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 homologies 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 quelque 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 (Tableau 1).

Parmi les 18 candidats on retrouve, un gène impliqué dans la réponse immunitaire (lysénine), 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. Suite à ces 2 étapes, 3 candidats ont montré des variations significatives de leur niveau d'expression. Ces 3 candidats sont : la Cd-MT, la Lysénine, une protéine hémolytique, localisée dans les coelomocytes 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.

3. Conclusion

L'analyse bibliographique réalisée ici a pour but d'illustrer l'intérêt des approches transcriptomiques à travers un exemple concret : la pollution du sol qui affecte l'expression de gènes chez des organismes vivants en contact avec ce sol. L'identification de gènes clés, associés à des voies spécifiques peut être faite chez des espèces clés pour établir des connaissances sur les modes d'action des produits chimiques. En effet, selon Ankley *et al.* (2006), l'exploration des effets des produits chimiques au travers de l'étude de diverses espèces, est un domaine où une meilleure compréhension des modes d'action via la transcriptomique pourrait fournir de précieuses informations. Par exemple, quelques mécanismes de toxicité sont très bien conservés entre espèces, tandis que d'autres ne le sont pas. Les techniques de toxicogénomique pourraient permettre de définir les similarités ou au contraire les différences entre espèces, afin d'estimer si l'extrapolation des risques des produits chimiques d'une espèce à l'autre est techniquement faisable et pertinent.

Parmi toutes les voies physiologiques identifiées, les ETMs ont plus particulièrement un impact sur les voies de détoxification de phase I (gènes des cytochromes P450) et II (gènes des GSTs), les voies de l'homéostasie du Ca et du Fe (ex : gènes de la Sarcoplasmic Calcium Binding Protein (SCBP) et de la ferritine), les voies associées à la dégradation protéique (voie des ubiquitines) et les voies associées au transport des électrons (gènes des cytochromes c oxydases). L'identification de ces voies, ainsi que les gènes qui y sont associés pourrait permettre de constituer une nouvelle batterie de candidats biomarqueurs potentiels. Un tel groupe de gènes pourrait constituer une signature de l'ensemble des changements survenant au niveau transcriptomique, chez un organisme test, lors d'une contamination d'origine métallique. L'étude de ces changements au niveau moléculaire, pourrait également permettre d'identifier une signature stress spécifique dans les profils d'expression génique, pour diagnostiquer l'impact d'un xénobiotique sur les populations (Snell *et al.*, 2003).

La toxicogénomique est donc une approche innovante pour l'étude des effets des produits chimiques sur un organisme. Appliquée à l'écotoxicologie, cet outil de génomique augmente notre capacité à comprendre le mode d'action des éléments chimiques chez des espèces modèles et des espèces considérées comme clés pour les écosystèmes. Depuis une dizaine d'années, l'emploi de ces techniques de biologie moléculaire s'est largement généralisé, pour aujourd'hui concerner la plupart des organismes vivants, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés, continentaux ou marins. Le but principal étant d'obtenir de meilleures connaissances sur les modes d'action des produits chimiques. On peut penser également que ces techniques contribueront à l'estimation des risques engendrés pour les organismes.

Organismes	Substances testées	Substrat et concentrations testées	Durée d'exposition	Outil moléculaire utilisé	Observations : Voies physiologiques atteintes	Références
<i>Lumbricus rubellus</i>	Cadmium	Sol test (Sugeon et al., 2003) ; 0-13-43-148-500 mg/kg	28 jours	Face à ADN (-8100 gènes)	<p>↗ Détoxification des ions métalliques (mt (x11 à 37), ↘ métabolisme des ions métalliques (Ca, Fe, Zn) (<i>ferritin</i>, <i>scp2</i>, <i>calcineurine</i>), ↗ Voie de détoxification de Phase I et II (x1,5 à 3), ↘ réparation de l'ADN (équivalent du gène <i>rad51</i> (x3)), ↗ gènes impliqués dans la formation du cytosquelette (<i>trypomprotine 2</i> (x24)), ↘ voies associées au transport des électrons (Cytochromes c oxydases (x4), Cytochrome b), ↘ voie des protéases</p>	Owen et al., 2008
<i>Lumbricus rubellus</i>	Cuivre	Sol naturel ([Cu] initial = 16,1 mg/kg) contaminé artificiellement ; 0-10-40-180-480 mg/kg	70 jours	Face à ADN (-8100 gènes)	<p>↗ Détoxification des ions métalliques (mt (x1,5 à 5,2)), ↗ voie des chaperonnes (<i>hsp 40</i> (x1,7) et <i>70</i> (x1,5 à 3)), ↗ voie de détoxification de phase II (x1,7 à 2,9), voie du transport des électrons, métabolisme des ions métalliques (Ca, Fe, Zn), réparation de l'ADN, ↘ gènes de régulation de l'apoptose (x2)</p>	Burdy et al., 2008
<i>Eisenia fetida</i>	Cadmium, Plomb & Zinc (Mélange)	Sol artificiel contaminé avec 40, 500 et 700 mg/kg respectivement	1 et 14 jours	SSH et PCR temps réel	<p>↗ Détoxification des ions métalliques (<i>mt</i> (x10)), ↗ Cènes codant des protéines impliquées dans l'immunité (<i>Lysozyme</i> (x5) et <i>Coactosin-like Protein</i> (x4)), ↘ Voie de détoxification de Phase I (cytochrome <i>P450</i>) et ↗ de Phase II (<i>gst</i>), ↗ gènes impliqués dans la formation du cytosquelette (<i>trypomprotine</i>), ↗ voies associées au transport des électrons (<i>MADH déhydrogénase</i>, <i>cytochrome b</i>), voie des chaperonnes (↗ <i>hsp 40</i> et ↘ <i>hsp 70</i>), ↗ métabolisme des ions métalliques (Ca, Fe, Zn) (<i>calreticuline</i>, <i>scbp</i>), ↗ ubiquitine, ↘ synthèse protéique (<i>Ubiquitin-protein ligase</i>)</p>	Brulle et al., 2008

Tableau 1. Travaux de recherche utilisant des outils de transcriptomique et de génomique pour identifier les gènes différemment exprimés lors d'une exposition à un contaminant et les voies physiologiques qui y sont associées. ↗ : induction des gènes ; ↘ : répression des gènes ; ↗ : variations d'expression non indiquées entre parenthèses quand elles sont disponibles.

Bibliographie

Ankley G. T., Daston G. P., Degitz S. J., Denslow N. D., Hoke R. A., Kennedy S. W., Miracle A. L., Perkins E. J., Snape J., Tillitt D. E., Tyler C. R. & Versteeg D. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, vol. 40, 2006, p. 4055-4065.

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. & Sherlock G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, vol. 25, n° 1, 2000, p. 25-29.

Brulle F., Cocquerelle C., Mitta G., Castric V., Douay F., Leprêtre A. & Vandebulcke F. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* cœlomocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 32, 2008, p. 1441-1453.

Bundy J. G., Sidhu J. K., Rana F., Spurgeon D. J., Svendsen C., Wren J., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Kille P. 'Systems toxicology' approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biology*, vol. 6, 2008, art. n° 25.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, vol. 282, 1998, p. 2012–2018.

Cervantes-Cervantes M. P., Calderon-Salinas J. V., Albores A. & Munoz-Sanchez J. L. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biological Trace Element Research*, vol. 103, 2005, p. 229-248.

Demuynek S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemiere S. & Leprêtre A. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, vol. 145, n° 4, 2007, p. 658-668.

Diatchenko L., Lau Y. F., Campbell A. P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. D. & Siebert P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n° 12, 1996, p. 6025-6030.

IARC. (International Agency for Research on Cancer). Cadmium and cadmium compounds. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, vol. 58, 1993, p. 119-237.

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M. & Narbonne J. F. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination : lipid peroxydation, acetylcholinesterase and glutathione peroxydase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, vol. 1, 1996, p. 21-28.

Lee M. S., Cho S. J., Tak E. S., Lee J. A., Cho H. J., Park B. J., Shin C., Kim D. K. & Park S. C. Transcriptome analysis in the midgut of the earthworm (*Eisenia andrei*) using expressed sequence tags. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, vol. 328, n° 4, 2005, p. 1196-1204.

- Nuwaysir E. F., Bittner M., Trent J., Barrett J. C. & Afshari C. A. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular carcinogenesis*, vol. 24, n° 3, 1999, p. 153-159.
- Owen J., Hedley B. A., Svendsen C., Wren J., Jonker M. J., Hankard P., Lister J. L., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J., Spurgeon D. J., Blaxter M. L. & Kille P. Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*. *BMC Genomics*, vol. 9, 2008, art. n° 266.
- Palmiter R. D. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, 1998, p. 8428-8430.
- Pirooznia M., Gong P., Guan X., Inouye L. S., Yang K., Perkins E. J. & Deng Y. Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics*, vol. 8, Suppl 7, 2007, art. n° S7.
- Raes H., Braekman B. P., Criel G. R. J., Rzeznik U. & Vanfleteren J. R. Copper induces apoptosis in *Aedes C6/36* cells. *Journal of Experimental Zoology*, vol. 286, 2000, p. 1-12.
- Snell T. W., Brognon S. E. & Morgan M. B. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, vol. 12, 2003, p. 475-483.
- Spurgeon D. J., Svendsen C., Weeks J. M., Hankard P. K., Stubberud H. E. & Kammenga J. E. Quantifying copper and cadmium impacts on intrinsic rate of population increase in the terrestrial oligochaete *Lumbricus rubellus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, n° 7, 2003, p. 1465-1472.
- Stürzenbaum S. R., Parkinson J., Blaxter M., Morgan A. J. & Kille P. The earthworm expressed sequence tag project. *Pedobiologia*, vol. 47, 2003, p. 447-451.