

Écotoxicologie

LE VER *EISENIA FETIDA* : INTÉRÊTS ET PERSPECTIVES EN ÉCOTOXICOLOGIE TERRESTRE

par

Daniel RIBERA¹

et Marine SAINT-DENIS²

Face à la quantité croissante de substances chimiques qui atteignent les sols, l'évaluation des risques en milieu terrestre est devenue une nécessité. En réponse aux nombreuses limites de la chimie analytique, des tests biologiques de toxicités aiguë ou chronique ont été développés. Dans ce contexte, les biomarqueurs permettent de détecter de manière précoce et sensible les effets des polluants sur les organismes vivants. Parmi les espèces étudiées en écotoxicologie terrestre, les vers de terre, et plus précisément l'annélide *Eisenia fetida andrei* (*E.f.a.*), présentent de nombreux intérêts. Nos travaux ont montré que les réponses de certains biomarqueurs chez *E.f.a.*, exposé en laboratoire à des composés modèles seuls et en mélanges au moyen de la méthode sol test, sont fonction de la dose de contaminant et de la durée de l'exposition. L'étude de mélanges met également en évidence l'existence d'interactions (antagonismes ou synergies) ou de toxicité additive. Les biomarqueurs chez *Eisenia* sont sensibles et précoces, mais leur spécificité n'a pu être mise en évidence. L'utilisation des analyses discriminantes qui intègrent les valeurs de l'ensemble des biomarqueurs mesurés permet de distinguer, tant au laboratoire que sur le terrain, les animaux exposés de ceux qui ne le sont pas. L'espèce *E.f.a.* et une approche multimarqueurs peuvent donc être utilisés, avec une analyse statistique appropriée, soit pour des essais sublétaux en laboratoire, soit pour la surveillance de la contamination ou de la remédiation des sols.

The worm *Eisenia fetida* : interests and perspectives in terrestrial ecotoxicology

Terrestrial risk assessment has become a necessity, since the quantity of chemical substances reaching soils is continuously increasing. In response to the limits of chemical analyses, biological tests of acute and chronic toxicity were developed. In this field, biomarkers are particularly sensitive and allow early diagnostics of the effects of pollutants on organisms. Among the species studied in terrestrial ecotoxicology, earthworms, and more particularly the annelid *Eisenia fetida andrei* (*E.f.a.*), are particularly interesting.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

Our work has shown that the responses of some biomarkers in *E.f.a.*, exposed in the laboratory to model compounds alone or in mixtures using the soil test method and on the field in a site characterized by a low metallic contamination, are related to the dose administered and to the duration of the exposure. Moreover, the study of mixtures underlined the existence of interactions (antagonism or synergism) or of additive toxicity. Biomarkers in *E.f.a.* are sensitive and precocious but we failed to highlight their specificity.

The use of discriminant analyses integrating all changes in all studied biomarkers allows the separation of exposed animals from unexposed either in laboratory or field conditions. The species *E.f.a.* and a battery of biomarkers are then of interest for the assessment of chemical hazards or for the measure of the impact of human activities on terrestrial environments.

Introduction

De nos jours, plus de 100 000 substances chimiques sont commercialisées. À la fin de leur cycle de vie, la plupart d'entre elles se retrouve dans les sols (DEPLEDGE & FOSSI, 1994 ; RIVIERE, 1998). Le sol a un rôle essentiel dans la production de la biomasse et dans le cycle des éléments, et ses caractéristiques fonctionnelles peuvent être altérées par les polluants. De plus, la pollution du sol peut gagner les autres milieux, et finalement atteindre les espèces animales ou végétales terrestres et aquatiques. Ainsi, la qualité des sols est devenu un enjeu d'importance (IICC, 1994). Les gestionnaires de l'environnement sont donc confrontés à une préoccupation essentielle : concilier la sauvegarde des milieux naturels avec les activités économiques génératrices de pollution (chronique ou accidentelle). Pour cela, des protocoles d'évaluation des risques ont été développés, le risque pouvant être défini comme « l'estimation de l'incidence et de la gravité des effets indésirables susceptibles de se produire dans une population humaine ou une composante de l'environnement en raison de l'exposition, réelle ou prévisible, à une substance » (CEE, 1993). Cette évaluation se décompose schématiquement en deux étapes. La première (ou évaluation prospective) consiste à définir, au moyen de biotests, les doses sans effets et les niveaux tolérables dans l'environnement. La seconde (ou évaluation rétrospective) consiste à « vérifier » dans le milieu naturel que les quantités présentes ne provoquent pas d'altérations aux niveaux des individus, des populations ou des communautés.

L'évaluation prospective aboutit généralement à la fixation réglementaire de quantités de substances à ne pas dépasser dans les différents compartiments des écosystèmes. Les gestionnaires ont donc pour obligation de réaliser des mesures chimiques afin de comparer les teneurs réelles dans le milieu à ces valeurs réglementaires. Toutefois, outre les problèmes d'échantillonnage particulièrement importants pour des mesures *in situ* (RIBERA, 1998), les méthodes d'analyse physico-chimique ne permettent pas d'évaluer, ni même de prévoir, l'impact des polluants sur les êtres vivants ou *a fortiori* leurs effets sur un écosystème dans son ensemble. C'est pourquoi de nombreux tests biologiques sont développés afin de déterminer les effets toxiques des rejets de produits chimiques. Ces tests sont basés sur la relation entre la quantité de substance toxique à laquelle un organisme est exposé et le degré des effets qui en sont la conséquence. On distingue principalement deux types de toxicité : aiguë ou chronique. Les

Eisenia fetida en écotoxicologie

tests de toxicité aiguë, basés sur le potentiel de survie des organismes, permettent de déterminer des doses ou concentrations responsables de la mort de 50% des individus exposés (DL₅₀ ou CL₅₀). Toutefois, ces tests sont réalisés au moyen de grandes quantités de substances toxiques produisant des effets rapides qui aboutissent à la mort. Ils sont donc peu représentatifs de la réalité environnementale où les polluants sont d'origine diffuse et généralement en quantité plus faible. Les tests de toxicité chronique sont plus pertinents car ils permettent de mesurer des effets sublétaux comme des changements au niveau de la croissance, la reproduction, le comportement, la physiologie, etc.

Ainsi, en milieu terrestre, de nombreux tests ont été proposés et certains sont actuellement normalisés. Ces derniers s'appliquent à des végétaux (AFNOR 1986, ISO 1993a, ISO 1995), des invertébrés comme les vers de terre (ISO 1998), des insectes du sol (ISO/DIS 11267) ou des oiseaux (OCDE 1984a). Récemment, des essais permettant d'évaluer des altérations au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique sont apparus. Ces essais sont regroupés sous le terme de biomarqueurs et ne font pas l'objet de standardisation pour l'instant. Ils permettent de détecter, de manière très précoce, les effets des polluants sur les organismes car les premiers événements mesurables lors d'un contact organisme/contaminant ont lieu au niveau moléculaire.

En écotoxicologie terrestre, les vers de terre présentent de nombreux avantages. Ils constituent la première biomasse animale des milieux terrestres émergés (BOUCHE, 1988), ils sont présents dans une grande majorité de sols et jouent un rôle important dans leur écologie. L'espèce *Eisenia fetida andrei* (E.f.a.), même si elle n'est pas représentative de la biomasse lombricienne naturelle, est un bon modèle pour évaluer la toxicité des substances chimiques par voie cutanée et intestinale. C'est pourquoi elle a été sélectionnée par les instances nationales et internationales comme organisme test (EEC, 1984 ; OECD, 1984b ; ISO, 1993b et 1998) et des essais ont été normalisés pour évaluer les toxicités aiguë et chronique (inhibition de la reproduction) (ISO, 1993b et 1998).

De plus, de nombreux auteurs ont montré que les vers accumulent les contaminants comme par exemple les polychlorobiphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines (ROBERT & DOROUGH, 1985) ou les métaux lourds (SCAPS *et al.*, 1997 ; LABROT *et al.*, 1999). Enfin, *Eisenia* a fait l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne les biomarqueurs (ROCH & COOPER, 1991 ; LABROT, 1996 ; VILLE *et al.*, 1997 ; SAINT-DENIS *et al.*, 1998 ; SAINT-DENIS, 1999).

Notre objectif n'est pas de faire ici une revue détaillée et exhaustive des travaux réalisés chez le ver *Eisenia fetida andrei*. Nous souhaitons, par des exemples issus de nos recherches, présenter certains résultats qui permettront d'illustrer l'intérêt et les perspectives en écotoxicologie terrestre de ce ver et notamment en ce qui concerne la mesure des effets sublétaux au moyen de biomarqueurs.

Quels biomarqueurs chez *Eisenia fetida andrei* ?

Notre premier travail a été de mettre en évidence certaines cibles moléculaires chez ce ver. A l'heure actuelle, le cytochrome P450 a été partiellement purifié et les activités de biotransformation de phase I (méthoryrésorufine-O-dééthylase (MROD),

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

NADH et NADPH cytochrome réductase (NADH Red et NADPH Red)) ont été caractérisées (VILLE, 1994 ; LABROT, 1996 ; ACHAZI *et al.*, 1998). L'activité glutathion-S-transférase (GST) impliquée dans les mécanismes de conjugaison a été purifiée (STENERSEN *et al.*, 1979 ; STENERSEN & OIEN, 1981). Les méthodes de dosage de certains marqueurs du stress oxydant ont été mises au point : activité catalase (CAT), teneurs en glutathion total (GSH total) et glutathion oxydé (%GSSG), activité glutathion peroxydase (GPX), activité glutathion réductase (GR), activité GST et teneurs en peroxydes lipidiques (LP) et en lipides peroxydables (LPI) (LABROT 1996, SAINT-DENIS *et al.* 1998).

Des marqueurs de neurotoxicité ont également été caractérisés chez *Eisenia* : les différents isozymes des cholinestérases et l'activité acétylcholinestérase (AChE) ont été mis en évidence (STENERSEN 1980a, 1980b).

Enfin, des méthodes liées à la mesure des atteintes au niveau génétique (génotoxicité) sont actuellement disponibles : mesure des adduits à l'ADN (WALSH *et al.* 1997).

Quelle méthode d'exposition ?

Plusieurs méthodes d'exposition sont disponibles pour exposer les vers aux substances chimiques. La méthode « contact-test » est basée sur le contact direct entre le produit à tester déposé sur du papier filtre et le ver. L'Artisol utilise de la silice amorphe et des billes de verre. Le sol test (ou sol ISO) est un sol reconstitué composé de 70% de sable, 20% de kaolin et 10% de tourbe (pH 6 ± 0.5). L'influence de ces trois substrats sur certains biomarqueurs a été étudiée dans des conditions non contaminées (ARNAUD *et al.*, 2000). Aucun substrat n'est apparu meilleur que les autres en terme d'absence d'effet. Toutefois, le sol ISO a été retenu car il est le plus proche des conditions environnementales « normales » des vers et il est recommandé dans la plupart des méthodes normalisés (CEE, 1988 ; OCDE, 1984b ; ISO 1993b et 1998). Enfin, ce sol est conseillé en tant que matrice de dilution pour les test de sols issus du terrain.

Effets de composés modèles : étude des mécanismes d'action

La connaissance des mécanismes d'action au niveau moléculaire et l'établissement de relations dose-réponses et temps jusqu'à l'effet (« time to effect ») sont nécessaires pour développer des biomarqueurs (VAN DER OOST 1997). Ces mécanismes ont été étudiés pour quatre composés : un hydrocarbure aromatique polycyclique (le benzo(a)pyrène : B(a)P), un pesticide carbamate (le carbaryl), un polychlorobiphényle (le phénoclor DP6) et un métal lourd (le plomb) à différentes doses et durées d'exposition (RIBERA *et al.*, 2000 a et b ; SAINT-DENIS *et al.*, 1999, 2000 a et b). Le bilan des résultats est présenté dans le tableau 1.

Le B(a)P affecte les activités enzymatiques de phase I, les marqueurs du stress oxydant, et induit la formation d'adduits à l'ADN. Le carbaryl modifie les activités cytochrome P450 dépendantes et inhibe l'activité AChE. Le phénoclor DP6 agit sur le stress oxydant. Le plomb inhibe les marqueurs de phase I et du stress oxydant, excepté la peroxydation lipidique qui est activée. Tous les biomarqueurs, excepté l'activité catalase,

Eisenia fetida en écotoxicologie

sont modulés par les composés étudiés. Ces variations sont dépendantes de la dose et/ou de la durée d'exposition (exemple Figure 1).

Tableau 1

Mécanismes d'action de certains composés modèles chez *Eisenia fetida andrei*. (nm: non mesuré, X : cas où le polluant a un effet significatif). MROD : activité méthoxyrésorufine-O-dééthylase ; NADPH red : activité NADPH cytochrome P450 réductase ; NADH red : activité NADH cytochrome b5 réductase ; GST : activités glutathion-S-transférase ; LP : teneurs en lipides peroxydés ; LPI : teneurs en lipides peroxydables ; CAT : activité catalase ; GR : activité glutathion réductase ; GSH : teneurs en glutathion total ; %GSSG : teneurs en glutathion oxydé ; AChE : activité acétylcholinestérase.

Biomarqueur	B(a)P	carbaryl	DP6	Pb	Mélange
MROD	X	X		X	X
NADPH Red	X	X		X	
NADH Red	X	X		X	
GST					X
LP	X		X	X	X
LPI	X		X	X	X
CAT			X		
GR	nm		nm	X	nm
GSH	X				nm
%GSSG	X			X	nm
AChE		X			X
adduits	X	nm	nm	nm	nm

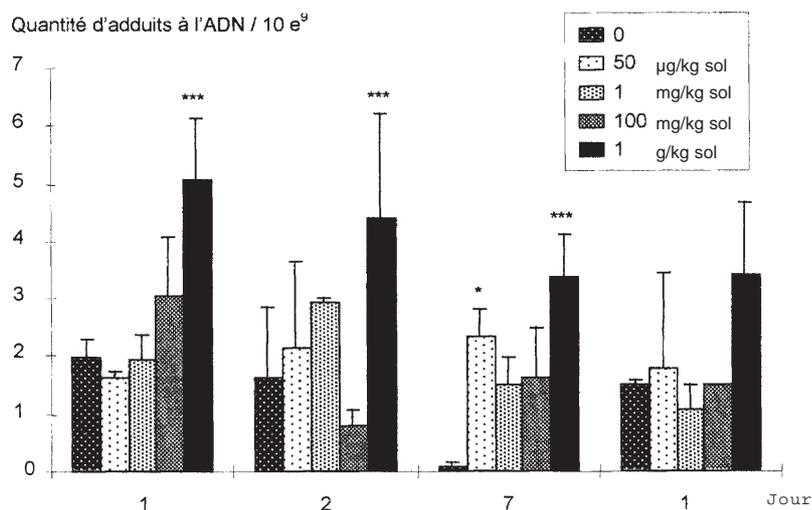


Figure 1

Quantité d'adduits à l'ADN chez *Eisenia fetida andrei* exposé à du sol artificiel contaminé au B(a)P. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type ($n = 2$). Les moyennes sont comparées avec des tests ANOVA et LSD pour des échantillons indépendants à l'aide du logiciel Statistica (licence 5.1H). Signification statistique : * $p < 5\%$; *** = $p < 1\%$.

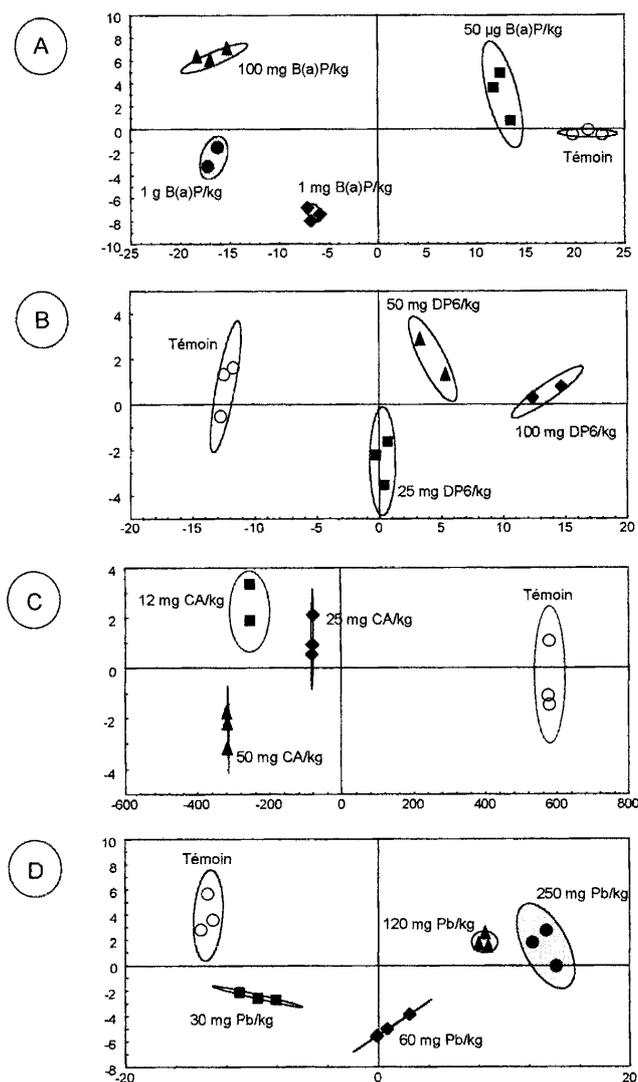


Figure 2

Représentation des doses de polluants (contrôles inclus) dans le premier plan factoriel obtenu par analyse discriminante de toutes les réponses biochimiques chez *Eisenia fetida andrei* exposé pendant 14 jours au B(a)P (A), DP6 (B), carbaryl (C) et Pb (D). Les ellipses incluent 95% des variations individuelles. Echelle: X=F1, Y=F2.

Eisenia fetida en écotoxicologie

Afin de nous rapprocher de la réalité environnementale, où il est exceptionnel voire impossible de trouver un seul polluant ou même une seule classe de contaminant, nous avons réalisé des expositions à différents mélanges de ces contaminants et pour différentes durées. Les mélanges des quatre contaminants affectent les activités MROD et GST, ainsi que la peroxydation lipidique et l'activité AChE. Il existe des mécanismes d'interactions (antagonismes ou synergies) et de toxicité additive qui sont fonction du biomarqueur considéré, de la dose administrée et de la durée de l'exposition.

Effets de composés modèles : interprétation des résultats des biomarqueurs en terme d'effet

Généralement, les variations mesurées des biomarqueurs sont relativement faibles. De plus, elles sont rarement linéaires et/ou n'obéissent pas à des modèles de régression qui permettraient de calculer une CE_{50} (concentration entraînant 50% d'effet). Il est donc difficile d'interpréter individuellement chaque biomarqueur.

Nous avons utilisé des analyses discriminantes qui permettent d'intégrer l'ensemble des mesures en une seule analyse. Il apparaît que, quel que soit le traitement et pour des durées d'exposition courtes (n'excédant pas 14 jours), les différents groupes sont discriminés dès la première dose testée (Figure 2) confirmant ainsi la sensibilité et la précocité des biomarqueurs chez le ver.

Par contre, et contrairement à ce qui est généralement établi sur les biomarqueurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence leur spécificité. Par exemple, les activités de biotransformation (considérées comme spécifiques des hydrocarbures) varient après exposition au B(a)P, au carbaryl et au plomb. Il faut également souligner que cette propriété a été remise en cause récemment (NARBONNE *et al.*, 1999) et qu'il est nécessaire de diffuser largement ce message afin de replacer l'approche biomarqueur dans un contexte réaliste.

Intérêts d'une approche multimarqueurs chez *Eisenia fetida*

Jusqu'à présent, aucun biomarqueur n'a été validé en tant qu'outil unique de détection des polluants dans l'environnement et de leurs effets sur les organismes vivants (LAGADIC *et al.*, 1998). Nos résultats sur des composés modèles administrés seuls ou en mélanges confirment cette observation et indiquent que seule l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs chez *E.f.a.* permet d'identifier les animaux exposés par rapport aux témoins.

Au cours d'une étude dans la région bordelaise sur un site contaminé par des métaux lourds, nous avons montré l'intérêt de l'approche multimarqueurs développée chez *E.f.a.* couplée à une méthode d'exposition *ex situ* (prélèvement d'échantillon de sol sur le terrain et exposition en milieu contrôlé (animaux issus de notre élevage, pH, température, humidité, luminosité). En effet, et bien que les niveaux de métaux soient relativement faibles (<60 mg Pb/kg de sol), nous avons pu discriminer les sites contaminés de ceux qui ne le sont pas.

Conclusion

L'espèce *E.f.a.* associée à une approche multimarqueurs peut être utilisée moyennant une analyse statistique appropriée, soit pour des essais sublétaux en laboratoire afin d'identifier les dangers des substances chimiques, soit pour la surveillance de la contamination ou de la rémédiation des sols afin de mesurer l'impact des activités anthropiques sur les milieux terrestres. Ce dernier point est particulièrement important, et notamment pour la gestion des sites contaminés. En effet, les seuls outils biologiques utilisés pour l'instant sont ceux qui ont trait aux études de population ou de communauté (MORRIS & THERIVEL, 1995). Toutefois, si ces outils sont particulièrement représentatifs écologiquement, ils demandent généralement un délai très long à la suite d'une pollution (délai nécessaire pour que les caractères structuraux et fonctionnels arrivent à l'équilibre). Dans ce contexte, les biomarqueurs présentent l'avantage de pouvoir fournir très rapidement des réponses en terme d'effets.

1. ADEC Tox, 120, rue Quintin, 33000 Bordeaux.
2. Laboratoire de Physico et Toxicologie des Systèmes Naturels (LPTC)
section Toxicologie Biochimique, Université Bordeaux I,
avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex.

RÉFÉRENCES

- ACHAZI, R. K., FLENNER, C., LIVINGSTONE, D. R., PETERS, L. D., SCHAUB, K. & SCHEIWE, E. (1998).- Cytochrome P-450 in the terrestrial annelids *Eisenia f. fetida* and *Enchytraeus crypticus*. *Comp. Bioch. Physiol.*, **121C**, 339-350.
- AFNOR (1986).- Norme X31-202 Qualité des sols – Essai d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance. Association Française de Normalisation, Paris.
- ARNAUD, C., SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J. F. & RIBERA, D. (2000).- Influence of different substrates used in standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biol Biochem.*, **32**, 67-73.
- BOUCHÉ, M.B. (1988).- Earthworm toxicological tests, hazard assessment and biomonitoring. A methodological approach. Earthworms in waste and environmental management, Edwards C. A. et Neuhauser E. F. (Eds), SPB Academic Publishing, The Hague, 315-320.
- CEE (1988).- Directive 87/302/CEE, JOCE n°L133/95, Toxicité pour les vers de terre, essai sur sol artificiel du 30/05/88.
- CEE (1993).- Règlement N° 793/93 du Conseil du 23 mars 1993 concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes. Journal officiel des Communautés européennes, n° L84 du 05/04/93, 1-7.
- DEPLEDGE, M.H. & FOSSI, M.C. (1994).- The role of biomarker in environmental assessment (2). *Ecotoxicol.*, **3**, 161-172.
- EEC (European Economic Community) (1984).- Directive 79/831/EEC, Annex V, part C : Method for the determination of ecotoxicity. Level 1, Earthworms-Artificial soil test. Commission of the European Communities, DGXI/128/82 Rev. 5.
- ICC (1994).- INSA/INRA/CRIDEAU/CNRS : Investigation sur les différentes approches de la définition et de la qualification des sites et sols pollués. Rapport 93-503, Lyon Association RECORD.

Eisenia fetida en écotoxicologie

- ISO (International Standard Organization) (1993a).- Standard number n°11269-1 Qualité des sols – Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 1 : Méthode de dosage de l'inhibition de la croissance des racines.
- ISO (International Standard Organization) (1993b).- Standard number n°11268-1. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part I : Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.
- ISO (International Standard Organization) (1995).- Standard number n°11269-2. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2 : Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.
- ISO (International Standard Organization) (1998).- Standard number n°11268-2. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part II : Method for the determination of effects on reproduction, 1-16.
- ISO/DIS 11267 (International Standard Organization) Standard number n°11267 Soil Quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Draft report.
- LABROT, F. (1996).- Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité. Thèse Université Bordeaux 1.
- LABROT, F., NARBONNE, J. F., VILLE, P., SAINT-DENIS, M. & RIBERA, D. (1998).- Acute toxicity, toxicokinetics and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*. Comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **36**(2), 167-178.
- LABROT, F., RIBERA, D., SAINT-DENIS, M. & NARBONNE, J. F. (1996).- *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, **1**, 21-28.
- LAGADIC, L., AMIARD, J. C. & CAQUET, T. (1998).- Biomarqueurs et évaluation de l'impact écologique des polluants. Dans : *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade éditeurs, Lavoisier Tec et Doc éditions, Paris, 299-307.
- MORRIS, P. & THERIVEL, R. (1995). – *Methods of environmental impact assessment*. The Natural and Built Environment Series 2, UCL Press, London.
- NARBONNE, J. F., DAUBEZE, M., CLERANDEAU, C. & GARRIGUES, P. (1999).- Scale of classification based on biochemical markers in mussel : application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, **4**(6), 415-424.
- OCDE (1984a).- *TG 206 Avian Reproduction Test* (original guideline, adopted 4th april 1984) (draft updated guideline, in preparation).
- OECD (1984b).- Test 207: Earthworm, acute toxicity tests. In *OECD guidelines for testing of chemicals*, ed Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- RIBERA, D. (1998).- Les indicateurs d'exposition et d'effet *in situ*. Dans : *Ecotoxicologie des sols et des déchets : enjeux réglementaires, normalisation et recherches*. ADEME Editions, Paris. 129-136.
- RIBERA, D., NARBONNE, J. F., ARNAUD, C. & SAINT-DENIS, M. (2000a).- Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem.* soumise.
- RIBERA, D., NARBONNE, J. F., ARNAUD, C. & SAINT-DENIS, M. (2000b).- Multimarker approach for soil contamination survey : laboratory exposures to mixtures of contaminants. *Environ. Health Pers.*, soumise.
- RIVIÈRE, J. L. (1998).- Evaluation du risque écologique des sols pollués. Association RECORD, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 230 pp.
- ROBERTS, B.L. & DOROUGH, H.W. (1985).- Chemical induction of midsegmental swelling in earthworms: Structure-activity relationship (Abstract). Fourth Annual Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

- ROCH, P. & COOPER, E. L. (1991).- Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by Aroclor 1254 (PCB). *Ecotox. Environ. Safety*, **22**, 283-290.
- SAINT-DENIS, M. (1999).- *Approche multimarqueurs chez le ver Eisenia fetida andrei : un modèle pour l'évaluation de l'écotoxicité des substances chimiques et la surveillance des sols contaminés*. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse.
- SAINT-DENIS, M., LABROT, F., NARBONNE, J. F. & RIBERA, D. (1998).- Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the worm *Eisenia fetida*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 594-606.
- SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J. F., ARNAUD, C., THYBAUD, E. & RIBERA, D. (1999).- Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of benzo(a)pyrene. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 1837-1846.
- SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J. F., ARNAUD, C. & RIBERA, D. (2000a).- Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, (II) effects of lead acetate. *Soil Biol. Biochem.*, sous presse.
- SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J. F., ARNAUD, C. & RIBERA, D. (2000b).- Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of phenol. *Soil Biol. Biochem.*, soumise.
- SCAPS, P., GRELE, C. & DESCAMPS, M. (1997).- Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, **116C**, 233-238.
- STENERSEN, J. (1979).- Action of pesticides on earthworms. Part I : The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. *Pestic. Sci.*, **10**, 66-74.
- STENERSEN, J. (1980a).- Esterases of earthworms. Part I : Characterisation of the cholinesterases in *Eisenia foetida* (Savigny) by substrates and inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66C**, 37-44.
- STENERSEN, J. (1980b).- Esterases of earthworms. Part II : Characterisation of the cholinesterases in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) by ion exchange chromatography and electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66C**, 45-51.
- STENERSEN, J. & OIEN, N. (1981).- Glutathione-S-transferase in earthworms (Lumbricidae). Substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69C**, 243-252.
- VAN DER OOST, R. (1997).- *Fish biomarkers for inland water pollution. An environmental field survey on the relationships between bioaccumulation and biochemical responses in freshwater fish*. PhD dissertation, University of Amsterdam, Tensen Scientific Ed., The Netherlands, 1-285.
- VILLE, P. (1994).- *Marqueurs biochimiques et toxicité subaiguë chez deux espèces de lombriciens : étude fondamentale et applications*. Thèse Université Bordeaux I.
- VILLE, P., ROCH, P., COOPER, E. L. & NARBONNE, J. F. (1997).- Immuno-modulator effects of carbaryl and 2,4D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **385**, 291-297.
- WALSH, P., EL ADLOUNI, C., NADEAU, D., FOURNIER, M., CODERRE, D. & POIRIER, G. (1997).- DNA adducts in earthworms exposed to a contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.*, **29**, 721-724.