CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TOXICOLOGIE DU TRICHLORETHYLENE

II. RESULTATS DES ETUDES EXPERIMENTALES CHEZ L'ANIMAL

PAR

RENÉ FABRE et RENÉ TRUHAUT

Du Laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris

Ayant établi une méthode de dosage du trichloréthylène et de son produit de transformation métabolique, l'acide trichloracétique, dans les milieux biologiques, nous avons entrepris l'étude de l'intoxication expérimentale par le trichloréthylène. Nous avons pu ainsi apporter un certain nombre de précisions relatives à cette intoxication : localisations du solvant et de son métabolite dans les divers organes, répartition érythro-plasmatique, rythme d'élimination, organes de transformation du trichloréthylène en acide trichloracétique, modalités de cette transformation*.

Localisations dans l'Intoxication Chronique.—Des cobayes ont été soumis, en cage respiratoire, à des inhalations répétées d'air chargé de trichloréthylène à faible concentration. (La concentration dans l'atmosphère était assurée de façon homogène grâce au dispositif classique de mélange de vapeurs de solvant et d'air.) Les animaux ont été sacrifiés et leurs organes ou humeurs prélevés, pesés, et conservés à la glacière en vue du dosage du toxique et de son métabolite.

Cobaye No. 1.—Inhalation pendant cinq jours, à raison de quatre heures par jour, d'une atmosphère à 9 mg. de trichloréthylène par litre.

Cobaye No. 2.—Inhalation pendant 13 jours, à raison de quatre heures 30 par jour, d'une atmosphère à 6 mg. de trichloréthylène par litre.

Cobaye No. 3.—Inhalation pendant 19 jours, à raison de cinq heures par jour, d'une atmosphère à 6 mg. de trichloréthylène par litre.

* Les premiers résultats de ce travail ont été obtenus avec la collaboration de Melle de Belvata Balasy qui a effectué sur ce sujet une thèse de Doctorat en Pharmacie à notre laboratoire (de Belvata Balasy "Contribution à l'étude du trichloréthylène de son élimination, de sa localisation et de son métabolisme dans l'organisme", Paris, 1949).

Cobaye No. 4.—Inhalation pendant 23 jours, à raison de cinq heures 15 par jour, d'une atmosphère à 7 mg. de trichloréthylène par litre.

Les résultats sont consignés dans les deux tableaux suivants (Tableaux 1 et 2).

L'examen des chiffres montre que le trichloréthylène diffuse dans tous les organes qui en renferment des taux notables. Il y a donc imprégnation profonde de tout l'organisme. Si l'on classe les tissus d'après les teneurs observées, en commençant par les plus faibles, on obtient l'ordre suivant ; pour le trichloréthylène : muscle, foie, cerveau, sang, poumon, rate, rein, surrénale ; pour l'acide trichloracétique : foie, cerveau, rein, sang, poumon, rate, surrénale.

Ainsi, aussi bien pour l'acide trichloracétique que pour le trichloréthylène, les taux les plus élevés s'observent dans les glandes endocrines (surrénales et glandes génitales en particulier), la rate, le rein, le poumon, les réserves adipeuses et le cerveau, cette dernière localisation rendant compte des symptômes nerveux observés.

Localisations dans l'Intoxication Massive.—Un cobaye a été soumis à l'inhalation d'une atmosphère saturée de vapeurs de trichloréthylène, le premier jour pendant deux heures, le second jour pendant quatre heures, ce qui a provoqué une anesthésie totale au cours de laquelle l'animal a été sacrifié. Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau No. 3).

La quantité de trichloréthylène retrouvée est naturellement beaucoup plus grande que dans les cas précédents. Mais le taux d'acide trichloracétique est sensiblement le même dans les deux modes d'intoxication, ce qui tendrait à prouver que l'excès de trichloréthylène inhalé n'a pas eu le temps de subir de transformation et, par suite, n'a pas élevé le taux du métabolite dans les organes.

Repartition Erythroplasmatique.—Elle a été étudiée chez le rat. Cinq animaux ont été soumis à l'inhalation d'une

TABLEAU No. 1

RÉPARTITION DU TRICHLORÉTHYLÈNE DANS LES TISSUS OU HUMEURS DU COBAYE AU COURS DE L'INTOXICATION CHRONIQUE

Tissu ou humeur	Cobaye No. 1	Cobaye No. 2	Cobaye No. 3	Cobaye No. 4
Cerveau ..	0,5	0,7	0,9	1
Foie ..	0,8	0,5	1	0,56
Tissu adipeux..	3,1	3,5	3,9	3,8
Muscle ..	—	0,5	0,21	0,24
Ovaires ..	—	2,3	2,3	—
Poumons ..	0,8	1,2	0,7	0,8
Rate ..	1,7	1,9	1,3	0,9
Reins ..	2,2	0,8	1,4	1,8
Surrénales ..	—	3,4	2,2	3,8
Sang ..	1,3	1	0,5	0,78
Urine ..	—	3,5	3,1	2,6

(Taux en m./100 g. de matière fraîche)

TABLEAU No. 2

RÉPARTITION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE DANS LES TISSUS OU HUMEURS DU COBAYE AU COURS DE L'INTOXICATION CHRONIQUE

Tissu ou humeur	Cobaye No. 1	Cobaye No. 2	Cobaye No. 3	Cobaye No. 4
Cerveau ..	3,2	3	2,5	3
Foie ..	2,8	2	1,2	1,1
Tissu adipeux..	4,4	—	3,5	—
Ovaires ..	—	7	8	—
Poumons ..	4,2	3,3	3,2	3,2
Rate ..	9,3	9	8,6	7,8
Rein ..	4,	3,4	2,1	—
Surrénales ..	—	12	11	10
Sang ..	3,6	3,75	3,1	2,7
Urine ..	—	5	4,8	4,7

(Taux en mg./100 g. de matière fraîche)

TABLEAU No. 3

RÉPARTITION DU TRICHLORÉTHYLÈNE DANS LES TISSUS DU COBAYE AU COURS DE L'INTOXICATION MASSIVE

Organes	Trichloréthylène (mg./100 g.)	Acide Trichloracétique (mg./100 g.)
Cerveau ..	16	2,5
Foie ..	—	2
Graisse ..	14	—
Poumons ..	—	3,6
Rate ..	8,75	6,6
Surrénales ..	20	—

atmosphère renfermant 4 mg. par litre de trichloréthylène (atmosphère 1), deux heures par jour pendant un certain nombre de jours variable avec les animaux, après quoi, ils ont subi l'inhalation d'une atmosphère à 10 mg. par litre (atmosphère 2) entraînant l'anesthésie,

puis, ils ont été sacrifiés par saignée à blanc. Le sang recueilli sur fluorure de sodium a été immédiatement centrifugé à grande vitesse et le plasma et les globules ont été soumis séparément à la double détermination du trichloréthylène et de l'acide trichloracétique.

Rat No 1.—Inhalation pendant deux heures de l'atmosphère 1 ; le lendemain, inhalation pendant une heure de l'atmosphère 2.

Rats Nos. 2 et 3.—Inhalation deux heures par jour, pendant trois jours, de l'atmosphère 1 ; le quatrième jour, inhalation pendant une heure de l'atmosphère 2.

Rat No. 4.—Intoxication comme pour les rats Nos. 2 et 3, mais, à la suite de la dernière inhalation, l'animal a été laissé au repos 24 heures avant d'être sacrifié.

Rat No. 5.—Inhalation deux heures par jour, pendant quatre jours de l'atmosphère 1 ; à la suite de la dernière inhalation, l'animal a été laissé au repos 48 heures avant d'être sacrifié.

Voici les résultats obtenus (Tableau No. 4).

TABLEAU No. 4

RÉPARTITION ÉRYTHROPLASMATIQUE DANS L'INTOXICATION LENTE PAR LE TRICHLORÉTHYLÈNE CHEZ LE RAT

	Trichloréthylène (mg./100 g.)	Acide Trichloracétique (mg./100 g.)
<i>Rat No. 1</i>		
Globules ..	41,3	10
Plasma ..	2,5	2,4
Rapport G/P	16	4
<i>Rat No. 2</i>		
Globules ..	91	12
Plasma ..	5,6	5,4
Rapport G/P	16	2,2
<i>Rat No. 3</i>		
Globules ..	73-75	12,75
Plasma ..	4,7	4,4
Rapport G/P	15,6	2,8
<i>Rat No. 4</i>		
Globules ..	13	6
Plasma ..	2	6
Rapport G/P	6	1
<i>Rat No. 5</i>		
Globules ..	2	6,5
Plasma ..	1,2	6
Rapport G/P	1,6	1

Ces chiffres démontrent d'une façon évidente la fixation élective du trichloréthylène et, à un moindre degré, de l'acide trichloracétique sur les globules rouges. Cette fixation élective qui découle logiquement de l'affinité pour les lipides, que traduisent en outre les symptômes nerveux de l'intoxication, explique l'accumulation splénique (rate réservoir de globules rouges) ; elle doit, par ailleurs, intervenir pour ralentir l'élimination du toxique et de son métabolite.

Evolution de la Transformation du Trichloréthylène en Acide Trichloracétique.—Nous avons dosé dans les principaux organes des rats précédents le trichloréthylène et son métabolite. Les chiffres obtenus sont consignés dans les deux tableaux suivants (Tableaux 5 et 6).

TABLEAU No. 5

RÉPARTITION DU TRICHLORÉTHYLENE DANS LES TISSUS DU RAT AU COURS D'INTOXICATIONS LENTES

Organes	Rat No. 1	Rat No. 2	Rat No. 4	Rat No. 5
Cerveau ..	5	12,8	2,2	—
Foie ..	8,5	10	6,75	3,5
Poumons ..	9	8,5	1,3	1
Rate ..	9	14	14	8
Reins ..	4,5	5,9	3	—

(Taux en mg./100 g. de matière fraîche)

TABLEAU No. 6

RÉPARTITION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE DANS LES TISSUS DU RAT AU COURS D'INTOXICATIONS LENTES

Organes	Rat No. 1	Rat No. 2	Rat No. 4	Rat No. 5
Cerveau ..	2,5	2,5	2,4	—
Foie ..	2,6	2,6	4	5
Poumons ..	4,5	3	2,7	4,3
Rate ..	6,4	6	5,4	10
Reins ..	2,3	2,1	—	—

(Taux en mg./100 g. de matière fraîche)

On voit que se vérifie sur le rat la notion établie sur le cobaye de la diffusion dans tous les organes du trichloréthylène inhalé. Il subit, dans certains d'entre eux, une transformation en acide trichloracétique dont le taux augmente progressivement après la suppression de la cause d'intoxication.

Elimination de l'Acide Trichloracétique Absorbé par Voie Buccale.—L'acide trichloracétique, formé à la suite d'une intoxication au trichloréthylène, s'élimine lentement. D'après Powell (1945), la production est maximale en 48 heures et se poursuit pendant 10 à 12 jours. Les auteurs suédois Ahlmark et Forssman (1948) ont également insisté sur l'élimination retardée de ce métabolite.

Nous avons personnellement effectué quelques recherches pour préciser le rythme de cette élimination. Nous avons administré à des cobayes 0 g 01 d'acide trichloracétique en solution aqueuse neutralisée par le bicarbonate de sodium et nous avons pu montrer que son élimination dans ces conditions était beaucoup plus rapide (deux jours au lieu de six à huit jours) que celle de l'acide formé dans le métabolisme du trichloréthylène. Ce résultat était prévisible, car il faut que soit réalisée au préalable l'accumulation du solvant dans les organes de transformation et, par ailleurs, cette dernière n'est évidemment pas immédiate, mais progressive.

Les Organes de Transformation du Trichloréthylène en Acide Trichloracétique : Ses Modalités.—Après avoir étudié les localisations du trichloréthylène et de l'acide trichloracétique et précisé les conditions d'élimination de ce dernier, nous avons essayé de mettre en évidence le ou les organes dans lesquels s'effectue la transformation du trichloréthylène. Dans ce but, nous avons effectué successivement des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Pour les expériences *in vitro*, nous avons utilisé des rats blancs normaux de poids moyen de 200 g., qui ont été sacrifiés et dont nous avons prélevé immédiatement les organes. Ceux-ci, additionnés de doses variables de trichloréthylène en solution aqueuse dans des flacons bouchant à l'émeri, ont été portés à l'étuve à 37°, pendant une durée variant d'une demi-heure à huit heures. Puis nous avons dosé le trichloréthylène résiduel et l'acide trichloracétique apparu.

La technique adoptée a été la suivante : on prépare tout d'abord une solution de trichloréthylène dans l'eau distillée à la concentration de 220 γ par cm.3 et une solution aqueuse saturée de toluène, cette dernière destinée à éviter les phénomènes de putréfaction.

On pèse l'organe ou une portion d'organe, on le pulpe au sein d'un faible volume de soluté physiologique (5 cm.3 pour 1 g. d'organe), on transvase dans un flacon bouchant à l'émeri, on ajoute 1 cm.3 de solution de trichloréthylène et 0, 50 cm.3 de solution toluénique, on bouche, on agite, on porte le flacon à l'étuve à 37° et on l'y maintient le temps prévu. On place ensuite l'échantillon à la glacière pour suspendre les actions fermentaires et on procède au dosage.

Nous avons réuni les résultats obtenus dans le tableau No. 7.

On voit que la transformation du trichloréthylène en acide trichloracétique augmente avec la durée de séjour à l'étuve. Le maximum semble être atteint

TABLEAU No. 7

TRANSFORMATION DU TRICHLORÉTHYLENE EN ACIDE TRICHLORACÉTIQUE DANS LES ORGANES *in vitro**

Temps de Séjour à l'étuve à 37°	1/2 h	3/4 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
Cerveau ..	0	0	0	0	traces	80	73	—	64	54
Foie ..	0	0	traces	traces	31	20	36	47	69	43
Poumons ..	0	0	0	0	42	68	182	112	62	60
Rate ..	0	traces	traces	traces	62	132	171	200	150	112
Reins ..	0	traces	traces	traces	50	—	85	—	45	55

* Quantités d'acide trichloracétique en γ raménées à 2 g. d'organe frais (rats).

après cinq à six heures. Les organes qui sont le plus actifs sont la rate et les poumons, le foie ne venant qu'en troisième ligne.

Pour les expériences *in vivo*, au lieu de mettre en contact des organes d'animaux normaux avec une solution de trichloréthylène, nous avons placé à l'étuve en flacons bouchés des organes provenant d'animaux soumis à l'inhalation d'air chargé de trichloréthylène; quatre expériences ont été réalisées sur des foies et rates de cobayes et de rats.

Elles nous ont permis d'observer une formation supplémentaire d'acide trichloracétique qui traduit la continuation du processus métabolique déjà commencé *in vivo*.

Nous avons enfin étudié l'influence sur ce processus métabolique, d'une part de la concentration en trichloréthylène, d'autre part du fluorure de sodium dont on sait l'action inhibitrice sur toute une série de processus enzymatiques.

Des pulpes d'organes ont été mises en contact pendant quatre heures à l'étuve à 37° avec des solutions de trichloréthylène à des titres divers (160 γ /cm.³ et 320 γ /cm.³). A la fin de l'expérience, le trichloréthylène restant et l'acide trichloracétique apparu ont été dosés. Les chiffres obtenus montrent que la formation d'acide trichloracétique semble, dans une certaine mesure, indépendante de la concentration en trichloréthylène comme s'il existait une limite au pouvoir de transformation des tissus (Tableau No. 8).

Ainsi se trouve légitimée l'utilisation de ce produit pour le prélèvement des échantillons de sang en vue du dosage du trichloréthylène et de l'acide trichloracétique.

Conclusions

A l'aide de la méthode antérieurement établie pour le dosage du trichloréthylène et de son produit de transformation métabolique l'acide trichloracétique, nous avons abordé l'étude de l'intoxication expérimentale aiguë ou chronique par le trichloréthylène chez l'animal (rat, cobaye).

Nous avons tout d'abord mis en évidence la fixation importante aussi bien du trichloréthylène que de l'acide trichloracétique dans les glandes endocrines (surrénales et glandes génitales en particulier), la rate, le sang, le rein, le poumon, et le cerveau. Cette dernière localisation cadre avec les symptômes nerveux observés dans l'intoxication. Dans le cas du sang, l'étude de la répartition globuloplasmatique nous a permis de démontrer l'affinité du toxique et, à un moindre degré, de l'acide trichloracétique pour les globules rouges. Cette fixation élective qui découle de l'affinité pour les lipides, explique l'accumulation splénique (rate réservoir de globules rouges).

TABLEAU NO. 8

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TRICHLORÉTHYLÈNE SUR LA TRANSFORMATION EN ACIDE TRICHLORACÉTIQUE PAR DES PULPES D'ORGANES *in vitro*

Organes (Rat)	Prélèvement en g.	Temps de séjour à 37°	Trichloréthylène Ajouté en γ	Acide Trichloracétique Apparu en γ
Foie	3	3 h.	320	57
Foie	3	5 h.	160	55
Rate.. ..	0,4	3 h. 30	320	25
Rate.. ..	0,4	3 h. 30	160	28
Reins	0,8	5 h.	320	20
Reins	0,8	5 h.	160	28

Pour étudier l'action du fluorure de sodium, nous avons opéré avec de la pulpe de foie provenant d'un cobaye ayant respiré une atmosphère concentrée de trichloréthylène jusqu'à anesthésie. Nous avons fait trois expériences simultanées: pulpe témoin placée immédiatement à 0°; pulpe témoin additionnée de 0,5 cm.³ de solution toluénique et placée 4 h. 15 à l'étuve à 37° en flacon bouché; et pulpe additionnée de quantités croissantes d'une solution de fluorure de sodium à 500 γ /cm.³ et placée à l'étuve à 37° en flacon bouché.

Sur ces différentes pulpes, nous avons dosé le trichloréthylène et l'acide trichloracétique.

Les chiffres obtenus nous ont montré que le fluorure de sodium à la concentration de 50 γ pour 2 g. d'organe exerce une action retardatrice sur la transformation du trichloréthylène en acide trichloracétique.

Par utilisation de pulpes d'organes, nous avons pu démontrer que, dans la transformation métabolique en acide trichloracétique, les tissus splénique et pulmonaire ont un rôle prépondérant, nettement supérieur en particulier à celui du tissu hépatique. Nous n'avons pu élucider le mécanisme exact de cette transformation curieuse à plus d'un titre, mais, en revanche, nous avons pu montrer que le fluorure de sodium exerçait vis à vis d'elle une influence inhibitrice, légitimant ainsi l'emploi de ce composé pour les prélèvements destinés à l'analyse toxicologique.

Du point de vue de l'élimination, alors que, chez l'homme comme chez l'animal, celle du trichloréthylène s'effectue rapidement par l'air

expiré et l'urine, celle de l'acide trichloracétique, exclusivement urinaire, est plus lente et persiste plusieurs jours après la suppression de la cause d'intoxication. Il constitue par suite un véritable indicateur d'exposition. L'intérêt de sa recherche et de son dosage dans l'urine pour le dépistage des intoxications professionnelles, déjà souligné

par les auteurs suédois Ahlmark et Forssman (1948, 1951), se trouve ainsi confirmé.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahlmark, A., et Forssman, S. Proceedings of the ninth international congress on Industrial Medicine, London, September 1948. Wright, Bristol, 1949 : pp. 552-53 ; (1951) *Arch. industr. Hyg. occup. Med.*, 3, 386.
Fabre, R., et Truhaut, R. (1951). *British Journal of Industrial Medicine*, 8, 275.
Powell, J. F. (1945). *Ibid.*, 2, 142.