

Recherches sur les effets physiologiques et toxiques du trichloroéthylène (TCE) dissous dans l'eau

par J. Lignon et S. Dunel-Erb.

avec la collaboration de

J. Armand, C. Barradas, E. Berst, Ch. Calgari, Cl. Chevalier, A. Heitz, A. **Malan**, J.P.
Robin, F. Scheer, V. Schumacher, **A.** Wulgue, Th. **Zorn**.

CENTRE D'ECOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ENERGETIQUES
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
23, rue Becquerel, F-67087 Strasbourg, France.
Téléphone: 88 10 69 30 Fax 88 10 69 06.

Convention entre l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse et le C.N.R.S. concernant **l'étude de la
toxicité du trichloroéthylène.**

197021

Rappelons qu'en 1992-1993 les hamsters du laboratoire avaient consommé pendant plusieurs mois de l'eau de la nappe phréatique issue des puits du CNRS, eau qui est polluée par du trichloroéthylène. Cette même eau avait servi de milieu d'élevage à une population de xénopes et d'écrevisses. Durant cette période nous avons constaté sur nos élevages un certain nombre d'anomalies incluant une fécondité réduite des hamsters, un blocage de la métamorphose des têtards de xénopes et un blocage de la mue des écrevisses entraînant ensuite une mortalité très élevée (>80%) des têtards et des écrevisses.

Sur la base de ces observations nous avons proposé à l'Agence de bassin d'effectuer des travaux de recherche à la fois sur les conséquences d'une pollution chronique au trichloroéthylène sur la survie de populations animales et le développement des individus et sur les effets physiologiques de cette pollution, notamment au niveau cellulaire.

Parallèlement à une analyse bibliographique des données actuelles dans ce domaine, nous avons donc réalisé une étude basée sur des animaux aquatiques placés ou non dans de l'eau polluée au trichloroéthylène et sur des hamsters dont l'eau de boisson était ou non polluée.

INTRODUCTION

Les travaux sur les effets du trichloroéthylène (TCE) sont assez nombreux mais la plupart d'entre eux se limitent à l'absorption de TCE par inhalation. Cette substance a été utilisée en médecine comme agent ami-infectieux et comme anesthésique. Dans l'industrie elle est largement utilisée comme dégraissant et comme nettoyant. En relation avec cette utilisation du TCE, la description des symptômes d'intoxication aiguë ou chronique est assez bien connue. Il n'en est pas de même en ce qui concerne les effets du TCE dissous dans l'eau de boisson. Dans ce cas, l'intoxication est moins flagrante et la prise de conscience des dangers potentiels par conséquent beaucoup plus récente.

Les recherches sur la toxicité du TCE se sont initialement focalisées sur les effets cancérogènes et mutagènes de cette substance. L'étude de ces effets, ainsi que celle du métabolisme du TCE, ont conduit à délaisser les conséquences physiologiques de l'ingestion de TCE. Cependant, la prise de conscience que l'eau de boisson peut représenter une voie d'ingestion de TCE majeure pour l'homme amène à se préoccuper du devenir du TCE introduit accidentellement dans les nappes aquifères. L'analyse épidémiologique et toxicologique des effets du TCE dissous dans l'eau reste néanmoins délicate et les résultats dans ce domaine sont encore très fragmentaires. Les discussions à ce sujet sont nombreuses mais les résultats expérimentaux le sont beaucoup moins. Les références auxquelles nous avons eu accès traitent essentiellement de la dégradation du TCE dans les nappes aquifères et les sols, tant au plan expérimental qu'au plan de la modélisation. Seules quelques références traitent des effets du TCE dissous dans l'eau de boisson et de ses effets physiologiques. Pratiquement aucune référence ne traite des effets du TCE sur les animaux aquatiques.

Une étude des conséquences physiologiques du TCE se situait en dehors de la problématique de recherche de l'équipe (celle qui a été approuvée par le Comité National lors de la création du laboratoire). Du fait des anomalies constatées dans notre élevage durant la période où l'eau de l'animalerie provenait de la nappe polluée, nous avons cependant pensé qu'il était de notre devoir de faire bénéficier la communauté au sens large de notre savoir-faire.

Les modèles expérimentaux que nous avons choisis correspondent à des modèles que nous connaissons suffisamment pour nous permettre d'être très attentifs à toute suspicion d'anomalie. Parmi ces modèles, certaines espèces ont été choisies en raison des anomalies que

nous avons constatées en 1992-1993. C'est le cas des hamsters, des écrevisses et des xénopes. Nous avons également choisi la truite et le poisson chat que nous connaissons bien. Le premier est souvent pris comme un standard en toxicologie aquatique. Le second est un animal vivant à des températures plus élevées et il présente de ce fait un métabolisme plus intense.

En opposition avec les animaux aériens, le milieu intérieur des animaux aquatiques est composé des mêmes éléments que le milieu environnant (eau, sels, gaz...). Il en résulte que les animaux aquatiques sont en permanence soumis aux gradients d'eau, d'ions, de gaz et de toute autre substance dissoute dans le milieu environnant. Par ailleurs, la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau a entraîné chez les animaux aquatiques le développement d'une surface branchiale importante, doublée d'un système d'échange à contre-courant assurant une oxygénation efficace de l'organisme.

Ces deux caractéristiques des animaux aquatiques ont des effets déterminants sur leur physiologie. La solubilité plus élevée du CO₂ (par rapport à l'oxygène) dans l'eau a pour effet de réduire la pression partielle de CO₂ dans le sang. La très forte solubilité du NH₃ fait que ces animaux sont ammonothéliques et que les dérivés azotés sont éliminés par voie branchiale, le foie n'ayant aucun rôle dans la détoxification des produits azotés. L'efficacité de l'échangeur branchial a pour conséquence la poïkilothermie des animaux aquatiques. Ce même échangeur favorise les fuites diffusives d'ions chez les espèces dulçaquicoles, fuites qui doivent être compensées par des transports actifs branchiaux. Parallèlement la branchie est le site d'un flux entrant permanent d'eau qui est ensuite éliminée par le rein. Conséquence immédiate de cette organisation, toute substance ionique ou neutre minérale ou organique normalement absente du milieu environnant pénètre par voie branchiale dans l'organisme. Son élimination se fait essentiellement par voie rénale. Ses dérivés peuvent être éliminés par voie rénale ou branchiale. De plus, la branchie est un site d'action privilégié de ces substances du fait même des volumes d'eau traversant la cavité branchiale. Il en est de même avec les téguments tels que la peau et la carapace des crustacés.

Notre étude a porté sur trois axes: de physiologie générale et comportementale, de physiologie des régulations et de physiologie cellulaire. Dans les trois cas, nous avons retenu des critères restant dans le domaine de nos compétences.

Certains résultats font l'objet de deux **résumés** acceptés dans la revue *Ecotoxicology*.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES EFFETS DU TRICHLOROÉTHYLÈNE (TCE).

Nous avons effectué une recherche bibliographique aussi exhaustive que possible en particulier quant aux effets du trichloroéthylène (TCE) dissous à faible concentration dans l'eau. Les références dans ce domaine se sont révélées peu nombreuses. Plus nombreuses sont les références concernant les effets du TCE inhalé et les études concernant les effets d'un traitement forcé chez le rat et la souris, études entreprises pour analyser le mécanisme d'action du TCE. Dans ce dernier cas bien sûr, le mode d'administration du TCE s'éloigne notablement de celui qui correspond à sa dissolution dans l'eau de boisson.

Le TCE a été déclaré comme dangereux lorsqu'il a été démontré que son administration chronique peut déclencher l'apparition de cancer chez les rongeurs. Les investigations effectuées par inhalation et par gavage ont conduit à des doses maximales admissibles dans l'eau qui sont variables: 5 µg/l (5 ppb) aux USA, 50 µg/l (50 ppb) au Canada, 70 µg/l (70 ppb) selon l'OMS.

directive européenne - maximum autorisé

Toxicité du TCE.

Les accidents dus au TCE relèvent le plus souvent d'inhalation par des travailleurs. Quelques accidents relèvent d'une ingestion accidentelle ou de toxicomanie. Le problème de l'ingestion par l'eau de boisson est peu connu.

Le TCE a des effets toxiques sur le rein, le foie, le système nerveux, le coeur et les poumons. Les travailleurs qui ont inhalé des doses sub-létales de TCE présentent des signes de fatigue, des maux de tête, une forte irritabilité, des vomissements, des rougeurs cutanées, une intolérance à l'alcool et des modifications de l'EKG. En général le retrait du TCE est suivi d'une récupération assez rapide.

Les premières études se sont focalisées sur ces accidents et la pathologie profonde et cancéreuse. La bioaccumulation de TCE dans les lipides du système nerveux a été étudiée par voie biochimique sans que cela mène à des conclusions pratiques. Par contre des études plus

récentes mettent en évidence des effets plus subtils du TCE sur la physiologie de la sphère ORL et sur la physiologie nerveuse.

Du point de vue physiologique, le TCE pris isolément peut ne pas avoir d'effet. Cependant nombreuses sont les publications qui montrent une potentialisation croisée du TCE et d'autres agents tel que l'alcool. Le TCE est susceptible de potentialiser un grand nombre de dysfonctionnements physiologiques qui paraîtraient tout à fait anodins en l'absence de cet agent.

Toxicité du TCE dans l'eau de boisson.

Le nombre d'études dans ce domaine est très restreint. Bernard et al (1987) rapporte qu'un groupe de 22 personnes ayant bu de l'eau d'un puits contaminé au TCE (8-14 ppm) pendant plus de cinq ans présentait les mêmes troubles et signes cliniques décrits dans le cas de l'intoxication aiguë par inhalation. 9 des 12 enfants du groupe présentaient des troubles marqués du point de vue psychomoteur et des difficultés comportementales. D'autres publications font état de développement de cancers de la vessie chez l'homme et d'atteinte hépatique et rénale chez la truite mais l'agent en cause est le tétrachloréthylène.

Bioaccumulation et peroxydation lipidiques.

La forte solubilité du TCE dans les graisses conduit à une interaction forte entre le TCE et les lipides. Le TCE a une forte tendance à s'accumuler dans le tissu adipeux d'où il n'est libéré que lentement lorsque cesse l'exposition au TCE. La détoxification du TCE par le foie passe partiellement par l'accumulation de graisse dans le foie, graisse dans laquelle se solubilise alors le TCE. Le TCE s'accumule également dans les lipides des membranes cellulaires qui finissent par se lyser sous l'action des radicaux libres générés par le TCE. Ceci peut conduire à la formation d'amas graisseux extracellulaires.

Métabolisme du TCE.

Quelle que soit la voie d'administration, inhalation ou ingestion, le TCE est efficacement absorbé. Bien qu'une partie soit métabolisée en dehors du foie, la majeure partie du TCE est métabolisée par le foie.

Le métabolisme hépatique du TCE a été très étudié. Chez l'homme comme chez les rongeurs, le TCE est métabolisé en époxyde par le cytochrome P-450. Cet époxyde instable se réarrange en formant du trichloroacétaldéhyde qui est ensuite hydraté en hydrate de chloral.

L'hydrate de chloral, administré directement ou en tant que dérivé du TCE est

rapidement métabolisé en trichloréthanol et en trichloroacétate. C'est ce dernier qui est le métabolite toxique essentiel chez l'homme. Le trichloréthanol est glucuronidé et éliminé dans les urines. Ces deux agents peuvent également être métabolisés par la voie de l'acide oxalique, acide monochloroacétique et le N-(hydroxyacéthyl)aminoéthanol.

L'époxyde de TCE peut aussi conduire à la formation de chlorure de dichloroacetyl et ensuite au dichloroacétate. Cette voie serait beaucoup plus utilisée chez les rongeurs que chez les humains. Le dichloroacétate peut être conjugué au glutathion par la **glutathion-SH-transferase**, étape qui est suivie d'une addition de L-cystéine formant la **S-(1,2dichlorovinyl)-L-cystéine**. La **lysase** conduit à la formation d'un groupe thiol réactif qui effectue des liaisons covalentes avec les macromolécules. Etant donné que la beta-lysase est localisée dans les mitochondries rénales, ainsi que dans le cytosol, ces réactions conduisent à une inhibition de la phosphorylation oxydative des mitochondries rénales et ensuite à une nécrose cellulaire.

Chez les rongeurs mais apparemment pas chez l'homme, le TCE à fortes doses peut contourner la voie de formation de l'époxyde contrôlée par le cytochrome P-450. Une conjugaison directe du TCE avec le glutathion conduit à la formation de **S-(1,2dichlorovinyl)-L-cystéine**.

Effet cancérigène du TCE.

Mécanismes d'induction de cancers chez les rongeurs.

Des tumeurs malignes ont été mises en évidence chez les rongeurs exposés à des doses journalières élevées de TCE (1000 **mg/kg/jour**) pendant 2 ans. On a noté des cancers du foie chez la souris et des cancers du rein chez le rat. Ces cancers se développent sur fond de nécroses hépatique et rénale (action sur les tubules rénaux). Le TCE ne paraît pas avoir d'effet **mutagène** per se. Ses effets cancérigènes paraissent nécessiter sa transformation métabolique. Cependant ni le TCE ni ses métabolites ne se lient aux macromolécules in vivo, suggérant une action épigénétique du TCE.

Carcinome hépatocellulaire chez la souris

Cet effet du TCE à fortes doses est attribué à la stimulation des divisions hépatocellulaires par des métabolites toxiques du TCE. Les métabolites du TCE induiraient des peroxyosomes hépatiques et une beta-oxydation peroxisomale. Ces oxydations ne seraient pas tempérées par un accroissement proportionnel de **catalase**, entraînant ainsi des expositions répétées à des atteintes oxydatives qui conduiraient à des cycles de nécroses cellulaires et d'hyperplasies qui deviendraient en fin de compte malignes.

Etant donné que le trichloracétate induit une prolifération des peroxysomes hépatiques et une beta-oxydation, on pense que c'est ce métabolite du TCE qui est responsable des cancers hépatiques. Ceci aurait même été démontré dans le cas de l'acide dichloroacétique.

Cependant les rats, les chats, les chiens et les hommes ne présentent pas de cancers hépatiques après ingestions de fortes doses de TCE. Une des explications les plus plausibles est que la souris est capable de mieux métaboliser de très fortes doses de TCE en acide trichloroacétique et en acide dichloroacétique. Il semblerait en effet que la souris soit plus sujette à l'induction de peroxysomes et de beta-oxydation peroxysomale que le rat.

Carcinome tubulaire du rein de rat.

Bien que les rats ne manifestent pas de cancer du foie, ils montrent le développement de cancer du rein. Chez les rats, l'acide dichloroacétique dérivé du TCE est métabolisé en **S-(1,2dichlorovinyl)-L-cystéine** qui est scindée par la cystéine beta-lyase rénale en produisant un groupement thiol très réactif. Ce groupement se lie de manière covalente aux macromolécules cellulaires, empoisonne les mitochondries rénales et induit la mort de l'épithélium rénal. Le carcinome rénal **apparaît** se développer durant le processus de régénération de l'épithélium.

En conclusion, les processus qui entraînent le développement de cancers du foie et du rein chez la souris et chez le rat sont analogues. Ils surviennent sur un fond d'attaque cellulaire et de nécroses suivies d'une hyperplasie régénérative. Le cycle complet de l'induction de cancer n'est pas totalement compris mais selon toute vraisemblance la probabilité des mutations aléatoires est plus élevée durant le processus de régénération, entraînant ainsi le développement de tumeurs malignes.

Etudes épidémiologiques d'effets cancérogènes du TCE

Les résultats de ces études ne sont pas toujours concluants. Plusieurs de ces études n'ont pas permis d'établir de relations significatives entre la fréquence des cancers et l'exposition de populations géographiquement délimitées à des vapeurs de TCE. Mais le doute subsiste toujours.

MATERIEL ET METHODES

Qualité des eaux utilisées.

Nous avons utilisé deux sources d'eau: la nappe phréatique dont les relevés en trichloroéthylène (TCE) sont rapportés sur la figure 1, et une alimentation en eau de la ville de Strasbourg (puits d'Oberhausbergen).

Les qualités ioniques de ces eaux sont identiques (Na^+ 0,63 mmol/l, K^+ 0,064 mmol/l, Ca^{2+} 2,264 mmol/l, Mg^{2+} 0,86 mmol/l, Cl^- 0,83 mmol/l, SO_4^{2-} 0,48 mmol/l, HCO_3^- 4,939 mmol/l). A 14°C l'eau fortement aérée a un pH de 8,4 et les valeurs de P_{O_2} et de P_{CO_2} sont respectivement de 150 torr et de 0,3 Torr. Cette oxygénation est réalisée dans deux colonnes de 6 m de haut dans lesquelles l'eau et l'air circulent à contre-courant, à un débit de 600 l/h } *prolatissement*
par colonne. Ces eaux ne diffèrent donc que par la présence de TCE.

A ces deux sources d'eau, il convient d'ajouter des eaux artificielles préparées à partir de l'eau de ville additionnée de TCE.

Préparation des solutions de TCE.

1-Solubilisation du TCE dans l'eau.

Selon la littérature, le TCE est très liposoluble mais pratiquement insoluble dans l'eau. De ce fait il paraissait difficile de tester les effets du TCE à des concentrations choisies. En effet un élevage de poissons ou d'écrevisses nécessite de grandes quantités d'eau et il serait illusoire de vouloir préparer de tels volumes sans partir d'une solution plus concentrée. Nous avons, dans un premier temps, préparé nos solutions aqueuses de TCE en utilisant une solution concentrée de TCE dans de l'alcool. Cependant cette technique est critiquable car l'alcool est susceptible de potentialiser les effets du TCE.

Nous avons donc recherché à solubiliser directement le TCE dans l'eau. **Le** TCE est en fait beaucoup plus soluble dans l'eau que ne le laisse supposer la littérature hormis deux références qui font état d'une solubilité de 1 g/l. Dans nos précédents rapports, nous avons noté qu'avec une agitation permanente, le TCE se solubilise à 1,5 g/l en 12h et à 3 g/l en 48h. Nous avons donc préparé chaque jour une solution mère de TCE (Trichloroéthylène RP Merck) à 1 g/l. Cette préparation a été faite à une température de 14 à 16°C, en réduisant au maximum la phase gazeuse.

2-Préparation des milieux

L'eau de boisson des hamsters expérimentaux a été préparée tous les deux jours par dilution de la solution mère à raison 1000 $\mu\text{g/l}$.

L'eau des bassins expérimentaux des xénopes a été préparée chaque jour dans un bassin de réserve à 2500 $\mu\text{g/l}$. Un écoulement par gravité assurait le renouvellement du bassin expérimental. L'extrémité du tube d'écoulement était maintenue immergée de façon à réduire l'évaporation du TCE.

Deux méthodes ont été utilisées pour les poissons et les écrevisses. La première est identique à celle utilisée pour les xénopes. La seconde consistait à utiliser de l'eau de ville dans laquelle était ajoutée une solution concentrée de TCE, chacun des deux écoulements se faisant à débit **contrôlé**. Des solutions contenant 250 $\mu\text{g/l}$, 500 $\mu\text{g/l}$ et 1500 $\mu\text{g/l}$ ont été utilisées.

3-Dosages du TCE dans l'eau.

Des dosages de toutes ces solutions ont été confiés au Laboratoire d'**Hydrobiologie** de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. **Les** résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux 1, 2 et 3.

Nous préférons indiquer dans ce rapport les valeurs nominales de TCE dans les bassins. En effet s'il paraît logique d'enregistrer une concentration inférieure à la concentration nominale dans les bassins (cas du mois de juin, tableau 1), nous sommes quelque peu surpris des résultats rapportés dans les tableaux 2 et 3. A la période du mois de juin, l'action combinée de la température et du mode de préparation des solutions peut rendre compte des différences observées entre les valeurs nominales et celles des dosages. En ce qui concerne les dosages des mois d'octobre et de novembre, deux remarques s'imposent. Dans chaque cas les valeurs de plusieurs dosages sont supérieures (facteur 5 à 10) aux valeurs nominales. De plus des solutions préparées de façons identiques donnent des résultats de dosages très différents. Enfin les résultats des dosages effectués sur la nappe sont supérieurs à ceux qui sont effectués pour le compte du CNRS directement au niveau du puits.

Espèces animales utilisées.

1-Ecrevisses

Toutes les manipulations menées sur des écrevisses ont été réalisées sur l'espèce *Astacus leptodactylus*. Elles étaient nourries régulièrement de carottes **fraîches** et de granulés.

Des écrevisses pesant de 30 à 40 g et issues de deux origines différentes ont été appariées en groupes de 15 écrevisses par bacs. Après une période test d'un mois, 4 des 8 bassins ont été alimentés, pendant 4 mois, par l'eau de la nappe contenant du TCE (environ 150 µg/l nominal) puis par de l'eau additionnée de TCE (100 µg/l nominal). Six bassins sont régulés à une température de 13°C. Les deux autres bassins ont été placés à l'extérieur de telle sorte que les écrevisses soient exposées à la fois au froid et au TCE. La qualité des eaux est en tout point identique sur le plan ionique et gazeux.

Une autre série d'écrevisses a été subdivisée en trois lots de 25 spécimens. Un des lots constitue le groupe témoin des deux autres lots traités au TCE à 250 et 500 µg/l.

Un bullage d'air de sécurité a été installé dans chaque bassin.

2-Poissons chats

Sept lots de poissons chats (*Ictalurus punctatus*) de 10 à 15 cm de long et de 40 à 200g ont été mis en expérience (180 spécimens). L'intérêt de cette espèce animale est qu'elle a un métabolisme élevé du fait qu'elle vit à une température de 23-24°C. Après une période d'adaptation de 60 jours en bassin en circuit **semi** ouvert à **23°C**, **des** lots appariés de 15 à 40 poissons ont été placés dans des bassins de 500 l et de 2000 l. Ces poissons sont nourris avec des granulés de composition standard à raison de **1,1%** fois leur poids par jour. La nourriture est distribuée le soir et l'excès est retiré le lendemain matin. Les différents bassins expérimentaux sont alimentés soit en eau de ville (sans TCE) soit avec de l'eau de la nappe (TCE: environ 150 µg/l nominal) soit en eau additionnée de TCE, 250, 500 et 1750 µg/l.

Un bullage d'air de sécurité a été installé dans chaque bassin.

3-Truitelles

Deux lots de 50 truitelles (*Salmo fario*) issues d'une même ponte ont été placés dans deux bacs identiques alimentés en eau équilibrée à l'air à 14°C. Elles ont été nourries **ad libitum** pendant la journée. Après une dizaine de jours, l'un des lots a été soumis à l'action du TCE contenu dans l'eau de la nappe (environ 150 µg/l).

Un lot de 40 truitelles a été utilisé pour des expositions aiguës au TCE (500 µg/l). **Les**

truitelles ont été placées dans des bassins semblables aux précédents et l'un des bacs a été alimenté en TCE très concentré. Les animaux ont été prélevés à intervalles réguliers et l'analyse a porté sur la structure branchiale, l'état acide base et la composition ionique du sang.

Un bullage d'air de sécurité a été installé dans chaque bassin.

4-Xénopes

Les effets du TCE ont été testés sur la croissance de petits xénopes (*Xenopus laevis*) répartis en deux lots appariés. **Les** animaux ont été élevés dans des conditions expérimentales identiques: température, éclairage, composition ionique de l'eau, pH, pression partielle d'oxygène et de gaz carbonique. **La** nourriture (vers stockés au congélateur) a été distribuée quotidiennement en quantité adaptée. Trois séries expérimentales ont été réalisées. La première a été réalisée sur des lots de 12 xénopes nés au laboratoire et exposés à l'eau de la nappe (environ 150 µg/l). Les deux autres **séries** ont été réalisées sur des lots de 24 xénopes exposés à des solutions contenant 2500 µg/l de TCE (valeur nominale).

5-Hamsters

Deux groupes de six reproducteurs de hamsters de Dzoungarie (*Phodopus sungorus*) ont été suivis. **Ils** ont été nourris **ad libitum** d'aliment pour hamster (UAR), supplémenté de cacahuètes. Pour l'un des groupes, l'eau de boisson était de l'eau de ville tandis que l'autre groupe ne recevait que de l'eau additionnée de TCE.

Deux groupes de hamsters d'Alsace (*Cricetus cricetus*) ont été également constitués. Nourris dans les mêmes conditions que les précédents, ils ont également été subdivisés en un groupe témoin et un groupe d'animaux recevant de l'eau de boisson additionnée de TCE (1 mg/l).

Techniques expérimentales

1-Microscopie électronique

Les différents organes ont été prélevés, fixés immédiatement puis traités pour la microscopie électronique à transmission selon la technique habituelle (Bailly et Dunel-Erb, 1986). Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope électronique Siemens Elmiskop 101. Pour la microscopie de balayage, les pièces fixées ont été déshydratées et séchées puis

métallisées. L'observation a été faite à l'aide d'un microscope Cambridge Stereoscan 100. (Pour la carapace d'écrevisse il n'y a pas eu de fixation).

2-Electrophysiologie

Des mesures électriques ont été effectuées sur des fragments de carapaces et sur des filaments podobranchiaux isolés d'écrevisse. La carapace a été prélevée au moyen d'une cisaille chirurgicale, débarrassée de son épithélium et fragmentée à l'aide d'une scie électrique dentaire. Les filaments branchiaux ont été préparés sous contrôle binoculaire.

La carapace a été montée dans un dispositif dit de Ussing selon une technique dérivée du montage décrit par **Avenet** et Lignon (1985) et Lignon (1987). Dans le cas des filaments, le principe du montage est identique mais sa taille est réduite et le filament est préalablement monté sur un support en verre.

Les solutions de perfusion ont été préparées comme décrit dans l'article de **Avenet** et Lignon (1985). Dans certaines séries expérimentales, la préparation a été perfusée avec des solutions formées d'un seul sel: **NaCl** (5 mmol/l) ou **MgSO₄** (100 mmol/l) tamponées avec un tampon phosphate à pH 7,0. L'activité des ions a été calculée à partir des coefficients donnés par les tables de **Parson** (1959) selon la convention de **Bates**.

La **d.d.p.** électrique a été mesurée selon la méthode décrite par **Avenet** et Lignon (1985) au moyen d'électrodes au Calomel raccordées à des micropipettes remplies de **KCl 3M** gélifié par de l'**Agar-agar** et amenées à proximité de la préparation à l'aide de micromanipulateurs. Le potentiel a été lu par double différence et mesuré par référence au potentiel de la face interne de la membrane. La différence de potentiel a été enregistrée sur un enregistreur potentiométrique **Sefram** et sur un système d'acquisition de données permettant l'analyse des réponses. Les courbes **courant/voltage** ont été obtenues en utilisant des pulses de courant constant d'amplitude variable délivrés par une source flottante au travers de deux plaques d'argent **chlorurées**. Par convention le courant entrant est mesuré positivement.

Les perméabilités ioniques ont été déterminées à partir des mesures de conductance effectuées en milieux symétriques. Une relation simple lie alors la conductance à la perméabilité (Lignon, 1987).

3-Spectrophotométrie d'absorption atomique

Les dosages de l'ion **Na⁺** ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre à absorption atomique Perkin-Elmer 2380. La flamme a été obtenue par un mélange air-acétylène et la mesure a été faite à une longueur d'onde de 589 nm et une fente de 0,2 nm. Chaque mesure a été effectuée en tripliqué.

Les solutions de référence: “blanc” et “étalon” (50 $\mu\text{mole/l}$), ont été préparées à partir d’eau osmosée (11 $\mu\text{S.cm}^{-1}$) puis déminéralisée (0,7 $\mu\text{S.cm}^{-1}$). Les échantillons ont été préparés avec la même eau.

4-Mesure de la conductivité

La conductivité des solutions diluées d’hémolymphe ou de sang a été mesurée avec un conductimètre Knick 600 avec une cellule de constante égale à 1 cm^{-1} . Les mesures se font dans un bain thermostaté à 14°C. Cette mesure permet une approche globale du contenu ionique du sang et de l’hémolymphe. Elle peut être aisément convertie en osmolarité.

5-Composition corporelle

L’analyse de la composition corporelle fait appel à la pesée des tissus frais et broyés et des tissus lyophilisés pour la détermination de l’eau. La teneur en protéines a été déterminée indirectement en dosant l’azote total par la méthode de Kjeldhal sur des aliquots de 100 mg de matière sèche. La conversion de la masse en protéines a été obtenue en utilisant une valeur moyenne estimée de 6,25 g de protéines par gramme d’azote. Les cendres ont été estimées par double pesée après calcination.

6-Mesure de la cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase a été dosée sur des lambeaux de foie de hamsters d’Alsace. Après broyage au **Potter** dans du **sucrose** et centrifugation modérée, un aliquot est ajouté à une solution de cytochrome C du coeur de cheval préalablement réduit (Sigma). La variation de densité optique de cette solution a été enregistrée en continu et l’activité de la cytochrome oxydase a été déduite de la constante de temps de la chute de DO. Cette activité est rapportée à la masse de protéine de l’aliquot (méthode de Lowry). Les animaux témoins et exposés au TCE ont été appariés.

7-Mesure de l’activité de la protéine découplante (UCP) du tissu adipeux brun (TAB).

Cette protéine, spécifique de la membrane des mitochondries du TAB, fait intervenir un canal au H^+ dont l’activité peut être visualisée en enregistrant le gonflement des mitochondries sous l’effet d’un gradient osmotique en présence de valinomycine (assurant le contre-transport de K^+). Le gonflement de la suspension de mitochondries est mesuré par la diffraction à 90° d’un faisceau lumineux (540 nm) et enregistré **grâce** à un

photomultiplicateur.

Les mitochondries ont été isolées par centrifugation et suspendues dans un milieu **sucrose** tamponné avec du TES. Un aliquot de cette suspension a été ajouté dans la cuve de spectrophotométrie contenant une solution riche en acétate de potassium, tamponnée avec du TES ou du PIPES et de l'**EDTA**. La réponse a été enregistrée en continu.

RESULTATS

Effets du TCE sur les écrevisses

1-Effets sur le comportement

En comparaison des témoins, les écrevisses soumises à l'action du TCE sont notablement moins actives: leur activité spontanée dans les bassins est réduite et leur reflexe de défense à l'approche de l'expérimentateur est virtuellement aboli. Leur posture qui est normalement une posture de vigilance est modifiée: les animaux deviennent apathiques et restent repliés sur eux-mêmes.

2-Effets sur les mues

Au moment où les animaux sont installés dans les bacs, on enregistre quelques morts par cannibalisme auxquelles il convient d'ajouter les prélèvements de contrôle en cours d'expérience. Chez les animaux exposés au TCE depuis le mois d'avril, aucune différence significative n'a été observée sur les mues. Il n'en a pas été de même chez les animaux exposés au TCE depuis le mois de janvier.

Dans les bacs témoins l'efficacité des mues chez les animaux maintenus à 14°C a été de 100% en mai-juin (figure 2). Chez les animaux exposés au TCE, le pourcentage de mues réussies est réduit de 40%. Ceci correspond en fait à une mortalité élevée lors de la mue. La figure 3 montre le même phénomène chez des écrevisses exposées au froid pendant l'hiver. Il y a un décalage des mues dans le temps mais les effets du TCE, à savoir une réduction de l'efficacité des mues, restent inchangés. Chez les témoins le pourcentage de mues réussies atteint la valeur de 100% en novembre. Chez les animaux exposés au TCE le nombre de mues réussies est plus faible (60%). A la période intermédiaire de juillet, le pourcentage d'insuccès reste égal à 40%. Dans ce cas, l'insuccès des mues correspond encore à une mortalité élevée. Ces résultats rejoignent les observations effectuées en 1993 montrant une mortalité élevée à la période de la mue (figure 4).

Chez les animaux exposés au TCE, un certain nombre d'animaux entrés en phase de **prémue** paraissent ne pas pouvoir franchir cette étape. Cette prolongation de la phase de **prémue** a été observée sur tous les lots d'écrevisses exposées au TCE alors que dans les conditions habituelles la durée de la phase prémue-mue est inférieure à 7 jours. Deux phénomènes accompagnent la mortalité élevée des écrevisses exposées au TCE. Dans certains cas la mue se fait avec difficulté et les animaux meurent deux à trois jours après avoir mué avant toute calcification notable de la carapace. D'autres mues présentent des anomalies: le

plus souvent les pattes ambulatories sont atrophiées et ne peuvent être extraites de l'exuvie. Les animaux s'autotomisent et meurent rapidement.

3-Modification de la carapace

Aspect de l'animal: Une des caractéristiques remarquables des écrevisses exposées au TCE est la modification de la pigmentation de la carapace (planche 1). Au cours du temps, la carapace devient de plus en plus sombre et brunâtre. Elle perd son aspect lissé et devient terne. Lors de l'émersion, la carapace se déshydrate très rapidement.

Etude en balayage: La surface de la carapace a été analysée en microscopie de balayage sur quelques spécimens. Les résultats sont illustrés par les planches 2 et 3. Les faibles grossissements montrent que le lissage de la surface disparaît totalement chez les animaux exposés au TCE. Chez les témoins la carapace présente d'assez nombreuses dépressions (20 par mm^2 ; diamètre: 50 à 100 μm) et des setae (1 par mm^2) dont les cils se dressent vers l'extérieur. Après exposition au TCE, les dépressions ne se distinguent plus et les cils des setae se couchent sur la surface de la carapace. A plus fort grossissement, on note que le matériel qui forme le lissage de la carapace a disparu totalement pour laisser place à une structure macrofibrillaire désorganisée.

Hydratation de l'animal: En relation avec la **dessiccation** de la surface de la carapace lors de l'emersion, nous avons analysé l'hydratation des animaux. Les résultats, rapportés sur la figure 5, montrent qu'il n'y a pas de différence d'hydratation entre les animaux témoins et ceux qui ont été exposés au TCE. Dans les deux cas l'hydratation est de 78%.

4-Mesures de conductance et perméabilité de la carapace

Ce volet expérimental a pour objectif d'analyser et d'évaluer dans quelle mesure un traitement par le TCE peut affecter les caractéristiques de perméabilité de la carapace. Le changement de pigmentation et de résistance à l'évaporation décrits ci-dessus suggèrent qu'une modification de ces caractéristiques est vraisemblable. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'étude des effets du TCE sur la perméabilité globale au MgSO_4 et au NaCl de carapaces traitées et non-traitées au TCE in vivo. Nous nous sommes aussi intéressés à l'étude des effets du TCE in vitro.

La figure 6 illustre les réponses en voltage d'une carapace perfusée par du NaCl et soumise à une série de pulses de courant constant d'amplitude variable. Le **décours** de ces

réponses est simple et traduit la présence d'une forte résistance au passage ionique et la présence d'une composante capacitive associée aux lipoprotéines épicuticulaires. La courbe **courant/voltage** déduite de ces enregistrements permet de calculer la conductance électrique de la préparation, conductance dont on peut déduire la perméabilité ionique.

Les tracés obtenus sur des écrevisses exposées au TCE depuis plusieurs mois ne diffèrent pas significativement des tracés obtenus sur les témoins. Les conductances restent très basses. Les perméabilités qui en sont déduites correspondent à des valeurs de $10^{-9} \text{ cm.s}^{-1}$ pour le Na^+ et le Cl^- (témoins, $n=10$; expérimentaux, $n=4$).

L'application de TCE (1 **mg/l**) dans le bain de perfusion de carapace des animaux témoins n'entraîne aucune modification significative des conductances, même après 24 h d'exposition ($n=3$).

5-Ultrastructure de l'épithélium branchial

L'écrevisse possède 18 branchies attachées aux appendices thoraciques. Ces branchies localisées dans deux chambres branchiales situées de part et d'autre du céphalothorax, sont constituées de filaments insérés sur un axe central. En plus, dans certaines branchies (les podobranchies) une lame contournée est accolée à l'axe des filaments (voir schéma, figure 7A). Le filament est constitué d'un canal afférent et d'un canal efférent séparés par un septum et reliés entre eux par des lacunes périphériques. Les lacunes sont bordées par un épithélium lui-même recouvert côté externe par la cuticule (figure 7B). Certains filaments ont un épithélium mince (figure 7D) il s'agit dans ce cas de filaments respiratoires, un deuxième type de filaments présente un épithélium épais de type "transporteur" avec nombreux replis des membranes (figure 7E). La lame quant à elle **est** constituée d'un épithélium "transporteur" (figure 7C) bordant un système vasculaire (Dunel-Erb et al. 1982). Un autre type cellulaire est présent dans le filament il s'agit du néphrocyte ou podocyte (Taylor and Taylor, 1992).

Le terme de podocyte, appliqué à des cellules du glomérule rénal chez les mammifères, désigne des cellules présentant de nombreux pédicelles formant un système d'interdigitations autour de l'endothélium des capillaires glomérulaires. **Les** pédicelles laissent entre eux des pores fermés par un diaphragme ("slit membrane"). Ils joueraient un rôle dans la filtration de grosses molécules.

Dans la branchie d'écrevisse les néphrocytes, un type de cellules morphologiquement semblables aux podocytes glomérulaires des Vertébrés, sont de très grandes cellules, situées dans le filament branchial, elles forment des îlots attachés au septum qui sépare le canal afférent du canal efférent et sont toujours situées du côté efférent. Il a été proposé pour ces cellules un rôle dans la filtration de l'hémolymphe pour en extraire les déchets métaboliques et autres molécules toxiques (**Strangways-Dixon** and Smith, 1970).

La structure des épithéliums branchiaux proprement dits, respiratoire ou transporteur, ne paraît pas modifiée par une exposition au TCE. Par contre la structure des podocytes, semble perturbée après un séjour dans le TCE.

La planche 4 montre que le podocyte n'est séparé de l'hémolymph (H) que par une lame **basale** (bl). Il renferme des vacuoles de différents types (*) et un système tubulaire complexe (tête de flèche). Des pédicelles (**p**) reposent sur la lame **basale**, ils laissent entre eux des pores fermés par une fine membrane (flèches). Des "coated" vésicules ou vésicules à clathrine (double flèche) s'ouvrent dans la membrane et internalisent un matériel dense qui borde cette membrane; ce matériel se retrouve dans les vésicules fermées du cytoplasme (4b). Après un séjour prolongé (3 mois) dans "l'eau de la nappe" on remarquera (planche 5b et 6) des modifications au niveau des podocytes branchiaux: le système tubulaire s'est plus ou moins désorganisé et les vacuoles remplies d'un matériel dense ont augmenté de taille, l'organisation des pédicelles est moins régulière (comparer les photos a et b dans la planche 5). Dans un cas extrême (planche 6) la structure des podocytes s'est complètement modifiée, les pédicelles ont disparus, une grande vacuole centrale pleine de matériel divers s'est formée (étoile noire).

6--Mesure des potentiels transbranchiaux

La structure des épithéliums branchiaux proprement dits, respiratoire ou transporteur, ne paraissant pas modifiée par une exposition au TCE, nous avons recherché si des tests de mesures de potentiels transbranchiaux simples permettraient de détecter un quelconque effet du TCE. En effet, les modifications de l'ionogramme de l'hémolymph d'écrevisse suggère un dysfonctionnement de la régulation ionique dont on sait qu'elle fait intervenir les branchies chez l'écrevisse. Nos résultats n'ont pas montré d'effet probant.

7-Analyse de l'hémolymph.

Des prélèvements d'hémolymph ont été effectués dans tous les groupes d'écrevisses témoins et expérimentaux (n= 7 à 9 selon les cas). **Les** mesures de conductance (index du contenu ionique total) montrent un accroissement du contenu ionique de l'hémolymph et une baisse de la **natrémie** après exposition à des doses élevées de TCE (figures 8 et 9). Ce résultat pourrait traduire un dysfonctionnement du tissu branchial bien que les tests effectués en électrophysiologie aient été négatifs et que la microscopie ne montre pas d'altération notable du tissu épithélial.

Effets du TCE sur les poissons chats

1-Comportement

Après 3 à 6 mois de traitement, la mortalité est nulle sauf dans le cas des animaux exposés aux concentrations élevées de TCE (tableau 4). Cependant la croissance des animaux varie considérablement. Le taux de croissance des animaux témoins est de 10 à 12% par mois. Ces animaux absorbent la totalité de la nourriture distribuée. Les animaux exposés à l'eau de la nappe se développent un peu moins rapidement (moins de 5%). Les poissons exposés au TCE 250, 500 et 1500 $\mu\text{g/l}$ cessent de se nourrir et ne grossissent plus, comme le montre les figures 10 et 11.

Les poissons exposés au TCE sécrètent du mucus en abondance et restent sous leur abri même la nuit. Dans l'eau de la nappe ils prennent toute leur nourriture mais en vomissent une partie par la suite. Enfin il faut remarquer qu'un nettoyage quotidien est absolument nécessaire chez les animaux exposés au TCE alors que pour les bacs témoins un nettoyage par semaine peut suffire. On remarque en outre une dépigmentation de la peau des poissons exposés au TCE.

2-Composition corporelle

En relation avec l'observation d'un blocage du grossissement des poissons chats exposés au TCE, nous avons analysé la composition corporelle d'un groupe de poissons exposés au TCE (250 $\mu\text{g/l}$) pendant 5 mois. La composition corporelle totale et celle du foie est rapportée sur les figures 12 et 13. L'exposition au TCE ne modifie pas de façon significative les pourcentages d'eau, de protéines, de lipides et de cendres par rapport à la masse fraîche. 11 n'en est pas de même vis à vis de la masse sèche (figures 14 et 15). L'exposition au TCE montre une diminution relative des lipides, diminution qui est mieux mise en évidence en exprimant le rapport lipides/protéines et lipides/cendres (figure 16).

3-Ultrastructure de l'épithélium branchial

Pour mémoire, on rappellera que le système respiratoire des poissons est formé de quatre arcs branchiaux disposés bilatéralement. Chaque arc porte des filaments qui eux-mêmes supportent les lamelles respiratoires (voir schéma d'après Hughes, 1964; figure 17). Filaments et lamelles sont recouverts d'un épithélium contenant différents types cellulaires dont les principaux sont les cellules pavimenteuses, les cellules à mucus et les cellules à chlorure. Les cellules à mucus sont plus spécialement localisées sur le bord efférent du

filament (côté d'arrivée de l'eau) bien que présentes aussi du côté afférent mais en **petit** nombre; les cellules à chlorure sont situées du côté opposé ou côté afférent, les cellules pavimenteuses recouvrent le filament et les lamelles où elles constituent l'**épithélium** respiratoire (Laurent et **Dunel**, 1980; Laurent, 1984).

Cet épithélium peut être modifié par de nombreux facteurs internes ou externes (modification du milieu environnant) (Laurent et Perry, 1991). Nous avons donc observé, en microscopie à balayage, les différents types cellulaires chez des animaux exposés au TCE. Chez les animaux maintenus dans l'eau de la nappe depuis deux mois, le nombre et la taille des cellules à chlorure ont augmenté mais la structure de leur pôle **apical** (très spéciale chez le poisson chat) reste inchangée. Les cellules à mucus sont plus nombreuses à la fois du côté efférent et afférent et sont souvent vidées de leurs grains de mucus (comparer dans les planches 7 et 8 les photos **7a**, **b** et **8a** avec les photos **7c**, **d** et **8b**). Lors d'une intoxication plus importante (Planches 7 e, f et **8c**) les cellules à chlorure deviennent moins nombreuses du côté afférent où on observe des cellules à mucus en grand nombre mais dont la structure **apicale** est très différente de celle d'une cellule en activité, du côté efférent les cellules à mucus bien que totalement vidées de leurs grains de mucus (photo **8c**) ont un aspect normal. Du côté afférent il apparaît en plus un nouveau type cellulaire (photo 7e) présentant des ornements **apicaux** différentes de celles observées dans les cellules à chlorure de poisson chat. Cet épithélium devrait être étudié en détail à l'aide du microscope à transmission, on a déjà ainsi pu remarquer que l'épithélium pavimenteux présente une prolifération importante et tend dans certains cas à recouvrir les cellules à chlorure d'où leur disparition en microscopie à balayage. Cette étude très longue ne permet pas l'observation d'ensemble que donne la microscopie à balayage. Toutefois pour être très rigoureux les travaux de microscopie à balayage doivent s'accompagner d'une quantification des résultats (comptage des différents types cellulaires, mesure des surfaces...) qui reste à faire.

Effets du TCE sur les truitelles

1-Développement des truitelles

Les résultats sont rapportés sur la figure 18. Après quelques jours d'exposition au TCE (eau de la nappe), la croissance des truitelles se ralentit. L'écart absolu et relatif des masses s'accroît avec le temps d'exposition. Il ne s'agit pas d'un ralentissement uniforme de la croissance. Ce retard de développement est plus marqué chez un grand nombre de truitelles "chétives" alors qu'un bon tiers des truitelles se développe tout à fait normalement. Cependant, ces différences s'estompent et on n'observe plus de différence de poids après trois mois d'exposition.

2-Ultrastructure de l'épithélium branchial

Chez la truite, l'épithélium de la branchie est constitué des mêmes types cellulaires que chez le poisson chat, seule l'ornementation de la surface **apicale** des cellules à chlorure est différente.

Deux types d'expériences ont été pratiqués chez la truitelle: une intoxication chronique par l'eau de la nappe (durée 2 mois) et des intoxications aiguës de 24, 48 et 72 heures. Nous savons en effet, par expérience, que l'épithélium branchial de truite peut réagir déjà en 12 ou 24 heures à des modifications du milieu environnant (O_2/CO_2 , composition ionique etc) (Laurent et al. 1994).

Nous n'avons observé, chez la truitelle, aucune modification nette de l'épithélium branchial que ce soit lors d'une intoxication aiguë ou chronique par le TCE (Planche 9).

3-Composition ionique du sang

Les intoxications chroniques par le TCE sont sans effet sur la **natrémie** et la conductance du sang des truitelles (figure 19).

Les intoxications aiguës ne paraissent pas modifier la natrémie, la conductance et le pH du sang des truitelles. Il faut cependant remarquer une tendance à une réduction de la **natrémie** et une augmentation **concomitante** du pH chez les animaux exposés au TCE après 24 heures (figure 20). Ce phénomène pourrait traduire une régulation puissante de la truite.

Effets du TCE sur la croissance des xénopes

Dans une première expérience, la croissance des animaux exposés à du TCE à une concentration moyenne nominale de 150 $\mu g/l$ (eau de la nappe phréatique alimentant le laboratoire), est ralentie de façon significative et réversible (figure 21). Cette expérience a été renouvelée sans succès sur deux autres lots de xénopes. La croissance des deux lots a été identique (figure 22). Dans le premier cas, les xénopes étaient nés au laboratoire de parents eux-mêmes exposés au TCE contenu dans l'eau de la nappe. Dans le second cas les petits provenaient de l'élevage du CNRS à Montpellier.

Effets du TCE sur les hamsters

1-Effets sur la fécondité.

Ces expériences ont été réalisées sur des hamsters de Dzoungarie, communément appelés hamsters de Sibérie. Un élevage a été partagé en deux lots de 24 hamsters, un lot témoin et un lot abreuvé d'eau additionnée de TCE. La reproduction des couples a été suivie sur un an.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 23. **La** fécondité de la première génération (nombre de couples féconds par rapport au nombre total de couples) est plus élevée chez les animaux abreuvés en TCE. Cependant, alors que la fécondité augmente chez les animaux témoins pour les générations suivantes, elle ne cesse de décroître chez les animaux abreuvés en TCE. La situation de ce lot d'élevage est telle qu'il devient maintenant difficile de former des couples qui ne soient pas des couples **frères/sœurs**. Ceci correspond à ce que nous avons observé au cours des années 1992-1993.

2-Effet sur la cytochrome oxydase hépatique.

Cette étude a été réalisée sur des hamsters d'Alsace. **Les** animaux expérimentaux ont été abreuvés d'eau additionnée de TCE (1000 $\mu\text{g/l}$ nominal).

Les résultats appariés montrent une réduction significative de l'activité de la cytochrome oxydase spécifique (figure 24). Ceci traduit une diminution de la capacité oxydative du foie. **Le** foie étant un organe de détoxification, on s'attendrait à un effet inverse.

3-Effet sur la protéine découplante du **TAB**

Ces expériences ont été réalisées sur du tissu adipeux brun de hamsters de Sibérie. **Les** animaux expérimentaux ont été abreuvés d'eau additionnée de TCE pendant 2 mois avant le sacrifice. Dans la semaine précédant le sacrifice, témoins et expérimentaux ont été exposés au froid ($5\pm 1^\circ\text{C}$) pour stimuler le tissu adipeux brun.

La courbe de titration de la protéine découplante par les ions H' , traduite par les variations de la vitesse initiale de gonflement osmotique est caractérisée par trois paramètres, deux pK' ou points de demi-titration et une vitesse maximale V_{max} . Des deux pK' , seul celui situé dans la gamme des pH physiologiques nous intéresse ici.

A 15°C (figure 25), température que les animaux peuvent atteindre au cours de leurs épisodes de torpeur, on n'observe aucune différence significative entre les animaux ayant consommé de l'eau additionnée de TCE (1000 $\mu\text{g/l}$) et les témoins abreuvés d'eau de ville

($pK'=7,29\pm0,06$ contre $7,29\pm0,04$). Par contre, lorsque les mitochondries sont étudiées à 35°C , température proche de la température corporelle normale, une différence apparaît (figure 25). Le pK' de la protéine découplante pour les ions H^+ passe de $6,85\pm0,03$ dans le lot EV à $6,95\pm0,03$ dans le lot TCE ($P<0,05$).

En conclusion, l'ingestion chronique d'une eau de boisson contenant du TCE se traduit déjà par une modification remarquable au niveau du tissu adipeux brun. La variation de pK' observée doit suffire à entraîner des effets fonctionnels, car elle est à comparer avec la variation maximale du pH intracellulaire, de $0,15$ à $0,20$ unité pH, qui intervient lors de l'activation physiologique de la thermogénèse. Nous avons observé récemment un effet de même amplitude et de même direction sur le tissu adipeux brun du rat porteur d'une tumeur cancéreuse, le sarcome Yoshida.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus montrent que le TCE ralentit ou bloque la croissance de toutes les espèces étudiées (écrevisses, truites, poissons chats, xénopes, hamsters). Chez les crustacés, ceci se traduit par un blocage total ou partiel de la mue. Alors que ces effets paraissent transitoires chez la truite, ils sont permanents chez les autres espèces, dans la mesure où l'exposition au TCE est prolongée. Les doses de TCE utilisées ne paraissent pas provoquer de mortalité importante au début de la période d'exposition. Ce n'est en effet qu'au bout d'un an que la mortalité devient plus élevée chez les poissons chats. Cette mortalité aurait certainement été plus importante si les animaux exposés au TCE n'avaient pas été nettoyés plus souvent que les témoins. La forte mortalité des écrevisses au moment de la mue montre que le TCE peut ne pas induire de mortalité notable tant que l'animal n'est pas soumis à un autre stress tel que le stress naturel de la mue.

Parallèlement à cet effet sur la croissance, d'autres effets secondaires tels que la production de mucus, la dépigmentation de la peau et des comportements anormaux peuvent être notés chez les poissons chats. Chez l'écrevisse, la dépression du système nerveux se traduit par une baisse du tonus et une certaine apathie des animaux. L'apparence de la carapace indique que le TCE modifie chez cette espèce la structure des téguments. Dans les deux cas ces effets ne sont notables qu'après plusieurs mois d'exposition.

Les analyses n'offrent pas les meilleurs index d'effets toxiques du TCE. Du point de vue biochimique, la détermination de la composition corporelle ne paraît pas permettre la mise en évidence d'un effet du TCE, dans l'état actuel des expériences. En fait, les poissons chats exposés au TCE ne se nourrissent plus et sont contraints d'utiliser leurs réserves énergétiques pour survivre. Ce ne sont pas des protéines qui sont alors utilisées mais des lipides. L'utilisation des lipides va cependant dans ce cas à contre-sens de ce que laisserait entendre la littérature. Le développement de lipides, en particulier dans le foie, devrait permettre à l'animal de lutter contre l'intoxication en permettant un stockage du TCE dans ces lipides.

Par contre l'ionogramme sanguin chez l'écrevisse peut offrir une piste intéressante. Le dosage du Na^+ et du Cl^- permettrait de mettre en évidence un dysfonctionnement de la branchie. Mais un dosage du K^+ serait peut être plus approprié en mettant en évidence une lyse cellulaire.

En dehors de quelques manifestations extérieures telles que la production de mucus, les études cellulaires et sub-cellulaires paraissent offrir les pistes les plus intéressantes pour détecter de façon précoce un début d'intoxication par le TCE. C'est le cas des variations de l'activité de la cytochrome oxydase hépatique et du pK de la protéine découplante du tissu adipeux brun de hamster. Elles indiquent clairement une modification de la physiologie des cellules sous l'action du TCE à un moment qui précède de loin les premières manifestations des variations de taux de fécondité. Chez l'écrevisse et le poisson chat, l'ultrastructure de certains types cellulaires dans la branchie est également modifiée bien avant que n'apparaissent les anomalies de mues et les retards de développement. C'est le cas pour les podocytes de la branchie d'écrevisse ainsi que pour la carapace. C'est aussi le cas pour la branchie de poissons chats. Ce sont les index de toxicité les plus remarquables que nous ayons notés.

Nos résultats soulignent également la nécessité d'une exposition de longue durée avant que les effets néfastes du TCE ne se manifestent. C'est le cas des écrevisses dont la mue n'est perturbée que si l'exposition au TCE est suffisamment longue (5 à 6 mois). C'est ce qui semble apparaître chez les xénopes également: seul le groupe de xénopes nés au laboratoire de parents exposés au TCE présente des retards de développement. C'est le cas des hamsters de Sibérie dont le taux de fécondité ne paraît chuter qu'au bout d'un an.

Nos résultats soulignent par ailleurs l'intérêt d'expérimenter sur des espèces diverses. Il semblerait bien que la truite, modèle toujours mis en avant comme test de toxicité, soit relativement insensible au TCE. La truite est très sensible à la température et à l'oxygénation de l'eau; c'est par contre sur les autres plans un animal très robuste dont les capacités d'adaptation sont élevées. Les truites sont capables de vivre dans des canaux pollués par des hydrocarbures tant que ces hydrocarbures ne forment pas une pellicule bloquant l'oxygénation de l'eau. Par contre comme le montre notre étude, le poisson chat dont le métabolisme est plus élevé est aussi beaucoup plus sensible que la truite au TCE.

A l'issue de cette expérimentation, nous éprouvons une certaine gêne et une certaine frustration quant aux concentrations de TCE qui induisent les effets que nous rapportons. Les incohérences que nous mettons en évidence dans les dosages effectués par le laboratoire agréé sont en effet très préoccupantes. Nous nous trouvons dans une situation où nous sommes incapables de dire d'un simple point de vue expérimental à quelle concentration nous avons travaillé! Notre seule consolation est de pouvoir affirmer que l'utilisation de l'eau de la nappe du campus provoque des effets reproductibles. Nous n'avons pas la compétence technique nécessaire pour pouvoir juger du niveau de précision qu'il est possible d'atteindre dans l'analyse du TCE. On est cependant en droit de se demander sur quels critères est définie la potabilité de l'eau quand les dosages paraissent si peu fiables.

Nous tenons à remercier Mr. S. Liess pour son travail photographique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, K.; Harwell, J.; Schriener, D.; Wertz, Ph.; **Maibach, H.; Maibach, H. I.** **Effects** of organic **solvent** on in vitro **human** skin barrier **function**. *J. Investig. Dermatol.* 1993; 101(4): 609-613.
- Allen, J.; **Collins, B.**; Evansky, P. Spermatid micronucleus analyses of trichloroethylene and **chloral** hydrate **effects** in **mice**. *Mut. Res. Letters*. 1994; 323: 81-88.
- Amdur, M.; Doull, J.; Klaassen, C. Casarett and **Doull's** Toxicology; the **basic** science of poisons. fourth ed ed. Oxford: Pergamon Press.
- Aragno, M.; Tamagno, E.; Poli, G.; Bocuzzi, G.; **Brignardello, E.**; Dam-ri, O. Prevention of **carbon** tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver microsomes from dehydropiandrosterone- pretreated rats. *Free Rad. Res.* 1994; 21(6): 427-435.
- Aschengrau, A.; Ozonoff, D.; **Paulu, C.**; Coogan, P.; Vezina, R.; Heeren, T.; **Zhang, Y.** Cancer risk and tetrachloroethylene contaminated drinking water in Massachusetts. **Arch.** *Environ. health*. 1993; 48(5): 284-292.
- Aust, S.; Bourquin, Al.; Loper, J.; Salanitro, J.; Suk, W.; Tiedje, J. Biodegradation of hazardous wastes. *Environ. health. Perspectives*. 1994; 102(suppl 1): 245-252.
- Avenet, P.**, Lignon, J. 1985. **Ionic** permeabilities of the gill lamina **cuticle** of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (E). *J. Physiol.* 363:377-401.
- Bailly, Y., Dunel-Erb, S. 1986. The sphincter of the efferent filament artery in teleost gills: I Structure and parasympathetic innervation. *J. Morphol.* 187:219-237.
- Barret, L.**; **Torch, S.**; **Leray, Cl.**; Sarlieve, L.; Saxod, R. Morphometric and biochemical studies in trigeminal nerve of rat after trichloroethylene or dichloroacethylene oral administration. *Neurotoxicol.* 1992; 13: 601-614.

- Bartels, M .** Quantitation of the tetrachloroethylene metabolite N-Acetyl-S-(trichlorovinyl)cysteine in rat urine via negative ion chemical ionization gas **chromatography/tandem** mass spectrometry. *Biol. Mass Spectro.* 1994; 23: 689-694.
- Blain, L.; Lachapelle, P.; Molotchnikoff, S. Electroretinal responses are modified by chronic **exposure** to trichloroethylene. *Neurotoxicology*. 1994; **15(3)**: 627-632.
- Bontoux, J.** Introduction à l'étude des eaux douces. Paris: TEC & DOC; 1993; ISBN: 2-87080-024-X.
- Brandes, D.; Farley, K. Importance of phase behavior on the **removal** of residual **DNAPLs** from porous media by alcohol flooding. *Water Environ. Res.* 1993; **65(7)**: 869-878.
- Brown, G. Control analysis applied to the whole body: control by body organs **over** plasma concentrations and organ **fluxes** of substances in the blood. *Biochem. J.* 1994; 297: 115-122.
- Clewell, H.; Andersen, M. Physiologically-based pharmacokinetic modeling and bioactivation of xenobiotics. *J. Toxicol. Industri. Health.* 1994; **10(1/2)**: 1-24.
- Cohn, P.; Klotz, J.; Bove, F.; Berkowitz, M.; Fagliano, J.** Drinking water contamination and the incidence of leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Environmental Health perspectives*. 1994; 102: 556-561.
- Crofton, K.; Lassiter, T.; Rebert, Ch. Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical **selective** mid-frequency hearing **deficit**. *Hearing Res.* 1994; 80: 25-30.
- Crofton, K.; **Zhao, X.** Mid-frequency hearing loss in rat following inhalation **exposure** to trichloroethylene: **evidence from** reflex modification audiometry. *Neurotoxicol. Teratol.* 1993; 15: 413-423.
- Dallas, C.; Muralidhara, S.; Chen, X.; Rarnanatan, R.; Varkoni, P.; Gallo, J.; Bruckner, J. Use of a physiologically based model to predict systemic uptake and respiratory elimination of perchloroethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 128: 60-68.

- Das, R. M.; Scott, J. E. Trichloroethylene-induced pneumotoxicity in fetal and neonatal **mice**. *Toxicology Letters*. 1994: 227-239.
- Dees**, C.; Travis, C. The mitogenic potential of trichloroethylene in **B6C3F1 mice**. *Toxicol. Letter..* 1993; 69: 129-137.
- Dees**, C.; Travis, C. Trichloacetate stimulation of liver DNA synthesis in maie and female **mice**. *Toxicology Letters*. 1994; 70: 343-355.
- DiPalma**, J. 1971. Drill's pharmacology in medicine. **McGraw Hill Book Cy**.N.Y.
- Dunel-Erb, S., Massabuau, J. Ch., Laurent, P. 1982. Organisation fonctionnelle de la branchie d'Ecrevisse. *C.R. Soc. Biol.* 176:248-258.
- Eckert, R. Randall, D., Augustine, G. 1988. Animal physiology. Mechanisms and adaptation. W. H. Freeman & Cy. N.Y.
- Enam, E.; Matsumara, F. **2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD)**-induced changes in glucosetransporting **activity** in guinea pigs, **mice**, and rats in vivo and in vitro. *J Biochem Toxicology*. 1994; **9(2)**: 97-106.
- Feldman, R.; White, R.; Eriator, 1.; Jabre, J.; Feldman, E.; **Niles**, C. Neurotoxic **effects** of trichloroethylene in drinking water. Approach to diagnosis. The vulnerable brain and environmental risks: toxins in air and water. Isaacson, **R.//Jensen, K** ed. Plenum Press, N.Y.: Plenum Press; 1994; 3: 3-23.
- Fromm, P. A review of some physiological and toxicological responses of fresh water fish to **acid** stress. *Env. Biol. Fish..* 1980; **5(1)**: 79-93.
- Gallo, J.; Cheung, L.; **Kim**, H.; Bruckner, J.; Gillespie, W. A physiological and system analysis hybrid pharmacokinetic model tocharacterize **carbon** tetrachloride blod concentrations following administration in different oral vehicles. *J Pharmacokinetics Biopharmaceutics*. 1993; **21(5)**: 551-574.
- Gaujous, D. La pollution des milieux aquatiques. Paris: **TEC & DOC**; 1993; ISBN: 2-85206-917-2.

- Ghate, H.; Mulherkar, L. Histological changes in the **gills** of **two freshwater** prawn species exposed to **copper** sulphate. **Indian. J Exp. Biol.** 1979; **17(8)**: 838–840.
- Gibson, S.; Roberson, D.; **Russel**, H.; Sewell, G. **Effects** of three concentrations of **mixed fatty acids** on dechlorination of tetrachloroethylene in aquifer **microcosms**. **Environ. Toxicol. Chemistry.** 1994; **13(3)**: 453-460.
- Giouranovits-Psyllidou, R.; Georgakopoulos-Gregoriades, E.; Vassilopoulou, V. **Monitoring** of organochlorine residues in rd mullet (*Mullus barbatus*) from greek waters. **Mar. Poll. Bull.** 1994; **28(2)**: 121-123.
- Goodman Gilman, A. Goodman, L. Rall, Th. **Murad**, F. 1985. The pharmacological basis of therapeutics. (7th eds).McMillan Pub. Cy. N.Y.
- Grathwohl, P.; Reinhard, M. Desorption of trichloroethylene in aquifer material: rate limitation at the grain **scale**. **Environ. Sci. Technol.** 1993; **27**: 2360-2366.
- Guarino, S.; Gambardella, C.; Gragnaniello, G.; De **Nicola**, M. A preliminary study of hepatopancreas ultrastructure in *Idotea balthica* (Isopoda). **Crustaceana**. 1994; **66(2)**: 153-162.
- Haguenoer, J.; **Furon**, D. Toxicologie et hygiène industrielles. Paris: Technique & Documentation; 1983; 10.
- Hewitt, A. Comparison of methods for sampling **vadose** zone soils for determination of trichloroethylene. **J. AOAC Intern.** 1994; **77(2)**: 458-463.
- Hewitt, A. Preparation of spiked soils by vapor fortification for volatile organic compounds analysis. **J. AOAC Intern.** 1994; **77(3)**: 735–737.
- Hewitt, A. Vapor-fortified **QA/QC** soil subsamples for the analysis of volatile organic compounds. **Amer. Environ. Lab.** 1994; **march**.
- Hewitt, A.; Mlyares, P.; Leggett, D.; Jenkins, Th. Comparison of analytical methods for determination of volatile organic **compounds**, in soils. **Environ. Sci. Technol.** 1992; **26**: 1932–1938.

- Hewitt, A.; Shoop, S. Rapid assessment of trichloroethylene in ground water. Summer 1994 GWMR. 1994: 116-122.
- Hopkins, G.; Munakata, J.; Semprini, L.; **McCarty**, P. Trichloroethylene concentration effects on **pilot** field-scale in **situ** groundwater bioremedation by **phenoy-oxyding** microorganisms. Environ. Science. Tecnol.. 1993; **27(12)**: 2542-2547.
- Kaneko, T.; Wang, P.; Sato, A. Enzymes induced by ethanol differently affect the pharmacokinetics of trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane. **Occup.** Environ. Med.. 1994; 51: 113-119.
- Kaneko, T.; Wang, P.; Sato, A. Partition coefficients of some **acetate** esters and **alcohols** in water, blood, olive oil and rat **tissues**. Occupational Environmental Med. 1994; 51: 68-72.
- Klaassen, C.; Amdur, M.; Doull, J. Casarett and Doull's Toxicology: The **basic** science of poisons. Third ed ed. N.Y. Toronto, London: MacMillan Publish Cy.
- Laurent, P. 1984. Morphologie et physiologie des organes de la respiration aquatique chez les vertébrés: la branchie. J. Physiol., Paris, **79:98-112**.
- Laurent, P. Gill structure and **function**, fish. Lung Biology in Health and disease. Lenfant, Cl. ed. N.Y., Basel.: Marcel Dekker, **Inc**; **1989**: 69-120.
- Laurent, P., Dunel, S. 1980. Morphology of gill epithelia. Arn. J. **Physiol.****238:R147-R159**.
- Laurent, P., Dunel-Erb, S., Chevalier, Cl., **Lignon**, J. 1994. Gill epithelial **cells** kinetics in a **freshwater** teleost *Oncorhynchus mykiss* during adaptation to ion-poorwater and hormonal treatments. Fish Physiol. Biochem. **13:353-370**.
- Laurent, P., Perry, S.F. 1991. Environmental effects on fish gill morphology. Physiol. Zool. **64:4-25**.
- Lignon, J. 1987. Ionic permeabilities of the isolated gill **cuticle** of the shore crab *Carcinus maenas*. J. Exp. Biol. **131:159-174**.

- Lignon, J. 1987. Structure and permeability of Decapod crustacean cuticle. **In** Kirsch, Lalhou (eds) Comparative physiology of environmental adaptations, Karger, Basel, Vol 1:178–187.
- Lignon**, J., Péqueux, A. 1990. Permeability properties of the cuticle and gill **ionexchanges** in Decapod crustaceans. **In** Truchot, J.P. and Lalhou, B. (eds) Animal nutrition and transport processes, 2: Transport, respiration and Ecretion: comparative and environmental aspects. Comp. Physiol. Base1 Karger, vol 6, **pp14–27**.
- Lock**, R.; Cruijssen, P.; Van Overbeek, A. **Effect** of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the osmoregulatory **function** of the gill in the rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. Comp. Biochem. **Physiol.**1981. 1981; 68C: 151-159.
- Love, R. M. The chemical biology of fishes. London N Y: Academic Press; 1970.
- Lu, F.C. 1992. Toxicologie. Masson, Paris.
- Lullmann**, H.; **Mohr**, K.; Ziegler, A. Atlas de poche de Pharmacologie. Paris: Medecine-Sciences, Flammarion; 1991.
- Malachowsky, K. J.; Phelps, T. J.; Teboli, A.; Minnikin, D.; White, D. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* Species. Applied and Environmental Microbiology. 1994; **60(2)**: 542-548.
- McKim**, J. M.; **Nichols**, J.; Lien, G.; Bertelsen, S. Respiratory-cardiovascular physiology and chloroethane gill flux in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Fish. Biol.. 1994; 44: 527-547.
- Mehl, A.; Schanke, T.; Johnsen, B.; Fonnum, F. The **effect** of trichlorfon and other organophosphates on prenatal brain development in the guinea pig. Neurochem. Res.. 1994; **19(5)**: 569-574.
- Michaud**, J. P.; Gandolfi, A. J.; Brendel, K. Toxic responses to defined chemical mixtures: mathematical models and experimental designs. Life Sci.. 1994; **55(9)**: 635-651.

- Miettinen, I.; Martikainen, P.; Vartiainen, T.; Lotjonen, S. Biochemical and chemical degradation of **3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone** (MX) in surface and drinking water. *Chemosphere*. 1993; **27(9)**: 1707-1718.
- Murray, W.; Richardson, M. Progress toward the biological treatment of C1 and C2 halogenated hydrocarbons. *Critic. Rev. Environ. Science. Technol.* 1993; **23(3)**: 195-217.
- Newman, M.; Keklak, M.; Doggett, M. Quantifying animal size **effects** on toxicity: a general approach. *Aquatic toxicology*. 1994; **28**: 1-12.
- Niklasson, M.; **Tham**, R.; Larsby, B.; Eriksson, B. **Effects** of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo and opto-oculo **motor** system in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1993; **15(327-334)**.
- Nonnotte**, L. Boite1 ,. F.; Truchot, J. P. Waterborne **copper** causes gill **damage** and hemolymph hypoxia in the shore **crab** *Carcinus maenas*. *Can. J. Zool.* 1993; **71**: 1569-1576.
- Okamoto, T.; Shiwaku, K. Fatty **acid** composition in the **liver,serum** and brain of rat inhaled with trichloroethylene. *Exp. Toxic. Pathol.* 1994; **46**: 133-141.
- Ramade**, F. 1977. *Ecotoxicologie*. Paris, Masson.
- Rattner, B.; Hoffman, D.; Mam, C. Use of mixed-function oxygenases to monitor cotaminant **exposure** in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989; **8**: 1093-1102.
- Rikans, L.; Hombrook, K.; Cai, Y. **Carbon** tetrachloride hepatotoxicity as a **function** of age in female Fisher 344 rats. *Mechanisms Ageing Development*. 1994; **76**: 89-99.
- Riviere, J. L.; **Cabanne**, F. Animal and plant cytochrome P-450 systems. *Biochimie*. 1987; **69**: 743-752.
- Schulte, C.; Nagel, R. Testing **acute** toxicity in the embryo of Zebrafish, *Brachydiano rerio*, as an alternative to the **acute** fish test: preliminary results. *ATLA*. 1994; **22**: 12-19.

- Schwedt, G. Atlas de poche des Methodes d'analyses. Paris: Medecine-Sciences, Flammarion; 1993.
- Seagren, E.; Rittmann, B.; Valocchi, A. Quantitative evaluation of the **enhancement** of NAPL-pool dissolution by flushing and biodegradation. Environ. Sci. Technol.. 1994; **28(5)**: 833-839.
- Sebert, Ph.; Barthelemy, L.; Peyraud, C. Oxygen **toxicity** introut at **two** seasons. Comp. Biochem. Physiol.. 1984; **78A(4)**: 719-722.
- Silbemagl, S.; Despopoulos, A. Atlas de poche de Physiologie. Paris: Médecine-Sciences, Flammarion; 1992.
- Simpson, K. Abnormalities in the tracheal gills of aquatic **insects collected** from straeams receiving chlorinated or **crude oil** wastes. Freshwater Biol. Freshwater **Biol.**. 1980; 10: 581-583.
- Steinberg, A.; **DeSosso**, J. have animal data been used inappropriately to **estimate** risks to **humans** from environmental trichloroethylene ? Reg. Toxicol. Pharmacol.. 1993; 18: 137-153.
- Steup, D.; Hall, P.; **McMillan**, D.; Sipes, I. Time course of hepatic **injury** and recovery following coadministration of **carbon** tetrachloride and trichloetehylene in Fischer-344 rats. Toxicol. Pathol.. 1993; **21(3)**: 327-334.
- Strangways-Dixon**, J., Smith, D.S. 1970. The fine structure of gill "podocytes" in ***Panulirus argus*** (Crustacea). Tissue & Cell **2**:611-624.
- Suzuki, T.; Sasaki, H.; Isono, H. Cytotoxicity of chlorinated hydrocarbons and lipids peroxydation in isolated rat hepathocytes. JNP. J. Toxicol. Environ. Health. 1994; 40: 28.
- Taylor, H.H., Taylor, E.W. 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. Microscopic anatomy of Invertebrates. F. Harrison ed. Vol. 10 Decapod Crustacea. pp. 203-293. Wiley-Liss, **Inc.**

Templin, M.; Parker, J.; Bull, R. Relative formation of dichloroacetate and trichloroacetate from trichloroethylene in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 123: 1-8.

Trichloroethylene. **INRS**, Fiche **toxycologique**. 1987; 126(FT 22): 21-26.

Vinegar, A.; Williams, R.; Fisher, J.; McDougal, J. Dose-dependent metabolism of 2,2-dichloro-1,1,1,-trifluoroethane: a physiologically based pharmacokinetic model in the male Fisher 344 rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 129: 103-113.

Waller, Ph.; Clauw, D.; Cupps, Th; Metcalf, J.; Silver, R.; Leroy, E. Fasciitis (not Scleroderma) following prolonged exposure to an organic solvent (trichloroethylene). *J. Rheumatology*. 1994; 21(8): 15-67-1570.

Watanabe, K.; Bois, F.; Daisey, J.; Auslander, D.; Spear, R. Benzene toxicokinetics in humans: exposure of bone marrow to metabolites. *Occup. Environ. Med.* 1994; 51: 141-142.

Webler, Th.; Brown, H. Exposure to tetrachloroethylene via contaminated drinking water pipes in Massachusetts: a predictive model. *Arch. Environ. Health*. 1993; 48(5): 293-297.

World Health Organization Geneva. Revision of the who guidelines for drinking water quality. Report of the Final task Group meeting. 1992: annexe E.

Yao, T.; Espost, S.; Huang, L.; Arnon, R.; Spangenberg, A.; Zem, M. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E. *Amer. J. Physiol.* 1994; 267: G476-G484.