



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT LMD
(3^{ème} CYCLE) EN BIOLOGIE

Spécialité : Biologie Animale Environnementale

Option : Reproduction et Développement

Intitulée

**Evaluation des effets de l'éthylène Glycol Mono
méthyle Ether (EGME) administré par voie cutanée
sur la reproduction et les paramètres hématologiques
des lapins male (*Oryctolagus Cuniculus*).**

Présentée Par : M^{me}. BENDJEDDOU Mouna

Membres de jury :

M. BOULAKOUD Med Salah (Prof)	Président	Université d'Annaba
M. KHELILI Kamel (Prof)	Directeur de thèse	Université d'Annaba
M ^{me} . MAALEM Leila (MC)	Examinatrice	Université d'Annaba
M. NECIB Youcef (Prof)	Examineur	Université de Constantine -1-
M. NOUADRI Tahar (MC.A)	Examineur	Université de Constantine -1-
M ^{me} . MEHDI Djahida (MC.A)	Examinatrice	Université d'Oum el Bouagui

Année universitaire : 2013-2014

REMERCIEMENTS

Au terme de cette recherche, je suis heureuse de pouvoir remercier tous ceux et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure.

Je voudrais tout d'abord remercier mon encadreur, monsieur Kamel KHELILI Professeur à l'université d'Annaba de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, je vous remercie pour vos conseils pratiques, techniques et scientifiques tout au long de ce travail, et votre aide précieuse lors de la réalisation de la partie pratique. Je voudrais également souligner vos disponibilités, vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour moi une source de motivation supplémentaire. Eternelle reconnaissance.

Je tiens également à remercier le Professeur Med Salah BOULAKOUD de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire, un très grand merci pour sa gentillesse et surtout pour son humanité. Merci.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Madame Leila MAALEM maitre de conférence à l'université d'Annaba, Je voudrais lui exprimer mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté d'examiner mon travail et surtout son enthousiasme pour la recherche.

Madame Djahida MEHDI maitre de conférence à l'université d'Oum el Bouagui, Je voudrais qu'elle trouve ici mes remerciements les plus vifs, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Monsieur Youcef NECIB Professeur à l'université de Constantine, Je voudrais lui exprimer ici mes sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Et à monsieur Tahar NOUADRI maitre de conférences à l'université de Constantine Je voudrais qu'il trouve ici tous mes remerciements d'avoir bien voulu examiner mon travail et de faire partie du jury.

Au sein du laboratoire d'Ecophysiologie animale,

Je voudrais que tous mes collègues trouvent ici l'expression de mes chaleureux remerciements pour leur aide morale et fraternelle qui ont toujours manifesté. Ma profonde sympathie va à : Mlle Rym, M. Tahar, M^{me} Asma, M^{me} Radia, M^{me} Wahiba, M. Hichem, M. Bachir.

Je remercie tous mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin merci à ma famille qui a toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager. A la mémoire de mon Père. A ma Mère pour m'avoir encouragé et écouté à d'innombrables reprises. A mes sœurs : Moulka, Randa et Rouza. A mon mari didou et mon fils Jad. A toute ma famille.

Résumé :

Notre problématique tend à mettre en évidence, simultanément, l'effet nocif de l'éthylène glycol monométhyl éther sur les paramètres de reproduction, biochimiques et hématologiques chez le lapin mâle *Oryctolagus Cuniculus*. Pour cela, deux lots d'animaux ont été traités à l'EGME par injection cutanée (200 et 300 ppm) pendant une période de 4 semaines successive.

A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable du gain de poids durant le traitement à l'EGME, une variation claire au niveau du poids du foie a été obtenue, on note aussi une diminution importante de poids du testicule et d'épididyme chez les lapins traités à l'EGME.

En vue des résultats trouvés, le traitement par l'EGME avait une grande influence sur les paramètres de reproduction, il a induit une diminution significative de quelques paramètres biologiques des spermatozoïdes (concentration, vitesse, mobilité et vitalité).

Sur le plan endocrinien, une diminution significative de la testostérone est observée chez les animaux des lots DI et DII (respectivement 0.27 ± 0.045 ng/ml et 0.13 ± 0.022 ng/ml) comparativement à ceux du lot témoin (1.94 ± 0.47 ng/ml), $p < 0.001$.

Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques caractérisés surtout, par une diminution significative ($p < 0.001$) dans le taux du glucose, une augmentation significative ($p < 0.05$) dans le taux des triglycérides, du cholestérol et des protéines totales.

Des perturbations significatives dans les paramètres du sang (globules rouges, le taux d'hémoglobine et d'hématocrite, le volume globulaire moyen, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine) ont été observées chez les individus traités par l'EGME comparés aux témoins.

Sur un plan macroscopique, l'EGME entraîne des lésions très claires au niveau de la membrane des tubes séminifères des testicules, et une diminution des spermatozoïdes dans la lumière de l'épididyme, d'autre part l'observation des coupes histologiques hépatiques des lapins traités a révélé la présence d'une nécrose hépatique au niveau des lots DI et DII par rapport au témoin.

Nos résultats montrent aussi une réduction du taux de glutathion GSH dans les organes étudiés (testicules, épидидyme et foie).

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition à l'EGME a des effets toxiques sur les paramètres de reproduction, biochimiques, hématologiques et histologiques.

Mots clés : Éthylène glycol, Lapin, *Oryctolagus Cuniculus*, Repro-toxicité, Testicule, Testostérone.

Abstract :

This study was carried out to investigate the harmful effect of ethylene Glycol Mono Methyl Ether (EGME) on reproductive, biochemical and hematological parameters. For this purpose, male rabbits **Oryctolagus Cuniculus**, were treated with (EGME) by cutaneous injection into the skin (1 mL/injection) over a period of 4 weeks, the rabbits were sacrificed and the parameters are determined.

From the analysis of our results, we observed a significant decrease in weight gain during treatment with EGME, a clear change in weight of the liver was obtained, there was also a significant decrease in testicular weight and epididymis in rabbits treated with EGME.

In view of the results, treatment with EGME had a great influence on reproductive parameters, it induced a significant decrease in some biological parameters of sperm (concentration, speed, mobility and vitality).

On the endocrine level, a significant decrease in testosterone is observed in animals of lots DI and DII (respectively 0.27 ± 0.13 and ± 0.045 ng/ml 0.022 ng/ml) compared to the control group (1.94 ± 0.47 ng / ml), $p < 0.001$.

The results also showed significant changes in biochemical parameters characterized mainly by a significant decrease ($p < 0.001$) in glucose, a significant increase ($p < 0.05$) in triglyceride and cholesterol levels and a significant increase ($p < 0.05$) in the rate of total protein.

Highly significant disturbances in the cell parameters of the blood which contain the numeration of blood cells (white blood cells, red blood cells, the rate of hemoglobin, hematocrit, the average spherical volume, the corpuscular concentration average in hemoglobin and spherical content average in hemoglobin) at the individuals treated by the EGME compared with witnesses.

On macroscopic plan, EGME causes alterations in tissue structures of the testis , and a decrease of sperm cells in the light of the epididym, on the other hand the observation of the hepatic histological cups of rabbits treated revealed the presence of a hepatic necrosis compared with the witness. Our results also showed a reduction of the rate of glutathione GSH in studied organs (testis, epididym and liver).

In conclusion, the present study showed that exposure to EGME has toxic effects on reproductive parameters, biochemical, hematological and histological findings.

Keywords : Ethylene glycol, Rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*, Repro-toxic, Testis, Testosterone.

المخلص:

لقد قمنا خلال هذه الدراسة معرفة مدى الأثر الضار للاثير مونوميثيل غليكول الإثيلين على بعض مؤشرات التكاثر وكذلك بعض المؤشرات البيوكيميائية والخلوية للدم عند ذكور الأرانب من نوع *Oryctolagus Cuniculus*, لهذا يعامل فوجين من الحيوانات بواسطة الاثير مونوميثيل غليكول الاثيلين EGME (200 ppm 300 ppm) عن طريق حقن جلد أرانب ذكور لمدة 4 أسابيع متتالية .

من تحليل النتائج التي توصلنا إليها، نلاحظ انخفاض كبير في زيادة وزن الجسم أثناء المعاملة ب EGME ، تم الحصول على تباين واضح في مستوى وزن الكبد بالنسبة لوزن الجسم ، كما كان هناك انخفاض مهم في وزن الخصي والبربخ بالنسبة لوزن الجسم في الأرانب المعاملة وكان له تأثير كبير على المعلمات الإيجابية، لقد أدى إلى انخفاض ملحوظ في بعض المعلمات البيولوجية للحيوانات المنوية (التركيز والسرعة والتنقل والحيوية).

على مستوى الغدد الصماء، يلاحظ انخفاض كبير في التستوستيرون عند حيوانات الفوج الأول والثاني على التوالي بالمقارنة مع حيوانات الفوج الشاهد . (نانوغرام / مل 0.13 ± 0.022 نانوغرام / مل) (0.27 ± 0.045)

كما أظهرت النتائج اضطرابات واضحة في تركيز كل من: الغلوكوز، البروتينات الكلية، الكولسترول و ثلاثي الغلسيريدات عند الأفواج المعاملة مقارنة بالفوج الشاهد.

من جهة أخرى فالنتائج أظهرت اضطرابات معنوية في عدد بعض الخلايا الدموية: (خلايا الدم الحمراء، الهيموغلوبين، وكذلك نسبة الهيماتوكريت، VGM، CCMH و TGMH) لوحظت عند الأفواج المعاملة مقارنة بالفوج الشاهد.

أثبت الفحص المجهرى أن الاثير مونوميثيل غليكول الاثيلين يؤدي إلى خلل في مستوى غشاء الأنبوب المنوي للخصية و انخفاض الحيوانات المنوية في البربخ من جهة أخرى هناك خلل في النسيج الكبدي عند الفوجين مقارنة بالفوج الشاهد.

كما أظهرت نتائجنا تناقصا في تركيز الجلوتاتيون على مستوى الكبد، الخصي و البربخ .

كخاتمة أظهرت هذه الدراسة أن التعرض إلى الاثير مونوميثيل غليكول الاثيلين له أثار سامة على بعض مؤشرات التكاثر وكذلك بعض المؤشرات البيوكيميائية والخلوية للدم .

الكلمات الدالة: الإثيلين غليكول، أرنب ، *Oryctolagus Cuniculus* ، سمية، الخصية، التستوستيرون .

ABRÉVIATIONS

BSA : Sérum albumine bovine

CCMH : Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine.

DNTB : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

EGME : Ethylène glycol mono méthyle ether .

GB : Globules Blancs.

GR : Globules Rouges.

GSH : Glutathion réduit.

Hb : Hémoglobine.

MAA : l'acide méthoxyacétique.

OMS : Organisation mondiale de la sante.

Ppm : partie par million.

TGMH : Teneur globulaire moyenne en hémoglobine.

TSM : le taux des spermatozoïdes morts.

TSV : le taux des spermatozoïdes vivants.

VGM : Volume globulaire moyen.

FNS : Formule de numération sanguine.

COOH : Groupement carboxyle.

CSC : Commission de sécurité des consommateurs.

CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène professionnel de France.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME.	4
2	Répartition des groupes et traitement des animaux.	25
3	Variation de perte du poids corporel chez le lot témoin (T) et les lots traités à l'EGME DI /DII (n=10).	46
4	Variation de poids absolu et relatif de foie chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	47
5	Variation du poids absolu et relatif du testicule chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	49
6	Variation du poids absolu et relatif de l'épididyme chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	51
7	Variation du taux de concentration des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).	53
8	Variation du taux de mobilité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).	54
9	Variation du taux de vitesse des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).	55
10	Variation du taux de vitalité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).	56
11	Variation du taux des malformations morphologiques des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).	57
12	Variation du taux de la Testostérone chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	59
13	Variation du nombre des globules blancs (n GB) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	60

14	Variation du nombre des globules rouges (n GR) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	61
15	Variation du taux d'hémoglobine (Hb) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	62
16	Variation du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	63
17	Variation du volume globulaire moyen (VGM) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	64
18	Variation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	65
19	Variation de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	66
20	Variation de la concentration sérique du glucose chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	67
21	Variation de la concentration du cholestérol chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	68
22	Variation de la concentration sérique des triglycérides chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	69
23	Variation de la concentration sérique des protéines totales chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	70
24	Variation du taux du glutathion hépatique (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	71
25	Variation du taux du glutathion testiculaire (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	72
26	Variation du taux du glutathion épидидymaire (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).	73

LISTE DES FIGURES

Fig ures	Titre	Page
1	Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME.	10
2	Formule de l'EGME en 3D.	23
3	Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono methyl (EGME).	24
4	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	26
5	Présentation schématiquement real des modifications morphologique caractéristique des spermatozoïdes exposées à stress hypo osmotique.	29
6	Courbe d'étalonnage des protéines hépatiques.	38
7	Hémogramme RUBIS.	39
8	Fragment d'organe dans des boites contenant du Bouin alcoolique.	41
9	Variation en fonction du temps (semaines), de perte du poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).	46
10	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) du foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).	47
11	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids relatif (PR) du foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n=10).	48
12	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) des testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).	49
13	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids relatif (PR) des testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n=10).	50
14	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) de l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).	51

15	Variation moyenne ($X\pm SD$) du poids relatif (PR) de l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n=10).	52
16	Variation moyenne du nombre total des spermatozoïdes ($X\pm SD$) en (Nombre spz x $10^6/ml$) entre les trois groupes (n=10).	53
17	Variation moyenne de la mobilité des spermatozoïdes ($X\pm SD$) en (%) entre les trois groupes (n=10).	54
18	Variation moyenne de la vitesse des spermatozoïdes ($X\pm SD$) en ($\mu m/sec$) entre les trois groupes (n=10).	55
19	Variation moyenne de la vitalité des spermatozoïdes ($X\pm SD$) en (%) (Après un test de coloration à l'éosine) entre les trois groupes (n=10).	56
20	Variation moyenne des types de malformations morphologiques des spermatozoïdes ($X\pm SD$) en (%) (Après un test hypo-osmotique) entre les trois groupes (n=10).	58
21	Variation moyenne ($X\pm SD$) dans le taux de la testostérone (ng/ml) (n=10).	59
22	Variation moyenne ($X\pm SD$) du nombre des globules blancs (n GB), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	60
23	Variation moyenne ($X\pm SD$) du nombre des globules rouges (n GR) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	61
24	Variation moyenne ($X\pm SD$) du taux d'hémoglobine (Hb) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	62
25	Variation moyenne ($X\pm SD$) du pourcentage d'hématocrite (Ht), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	63
26	Variation moyenne ($X\pm SD$) du taux moyen du volume globulaire moyen (VGM) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	64
27	Variation moyenne ($X\pm SD$) du taux de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	65
28	Variation moyenne ($X\pm SD$) du taux moyen de la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	66

29	Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	67
30	Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du cholestérol chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	68
31	Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique des triglycérides chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	69
32	Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique des protéines totales chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	70
33	Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de glutathion dans le foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	71
34	Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de glutathion dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	72
35	Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de glutathion dans l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).	73
36	Coupes histologiques du foie de lapin témoin et traités par l'EGME colorées à Hématéine-Eosine X 400.	75
37	Variation de l'aspect histologique des testicules entre les 3 groupes X 40.	76
38	Les modifications histologiques de l'épididyme du lapin dans les différents groupes de traitement X40.	78



Sommaire

TABLE DES MATIERE

Introduction.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE I. :Synthèse bibliographique

1. L'absorption cutanée :	6
1.1. Définition de l'absorption cutanée :.....	6
1.2. Le passage cutané des substances volatiles :	6
2. Le risque cutané lié aux vapeurs des éthers de glycol :.....	6
2.1. Les données générales sur les éthers de glycol :.....	7
2.2. L'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) :.....	7
2.2.1. Définition :.....	7
2.2.2. Identité et propriétés physico-chimiques :.....	7
2.2.3. Caractérisation de la pénétration de l'EGME dans l'environnement :.....	8
2.2.3.1. Production, importation et utilisations :.....	8
2.2.3.2. Sources et rejets :	9
2.2.3.3. Devenir dans l'environnement :.....	9
2.2.3.4. Distribution dans l'environnement :	10
2.2.4. Devenir dans l'organisme :	11
2.2.4.1. Absorption :	11
2.2.4.2. Distribution :.....	12
2.2.4.3. Passage placentaire et distribution chez le fœtus :.....	12
2.2.4.4. Métabolisme :	12
2.2.4.5.Élimination :	14
2.2.5.1.Organismes terrestres :.....	15
2.2.5.2.Organismes aquatiques :	15
2.2.6. Toxicité chez l'animal :	16
2.2.6.1. Toxicité aiguë :	16
2.2.6.2. Toxicité à court terme :.....	16
2.2.6.3. Toxicité chronique :.....	17
2.2.6.4.Génotoxicité.....	18
2.2.5.6. Toxicité pour le développement :	19

2.2.6.6. Toxicité pour la reproduction :	21
2.2.2.7. Immunotoxicité :	23
2.2.2.8. Neurotoxicité :	23
2.2.7. Toxicité chez l'homme:	24
2.2.7.1. Études cliniques :	24
2.2.7.2. Études épidémiologiques :	24

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

1. Matériels :	27
1.1. Matériel biologique :	27
1.2. Matériel chimique :	27
1.3. Conditions d'élevages :	28
2. Méthodologie :	28
2.1. Protocole expérimental :	28
2.2. Préparation des prélèvements :	29
2.3. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine :	31
2.4. Dosage des paramètres biochimiques :	33
2.5. Evaluation de la toxicité hématologique :	42
2.6. Etude histologique :	42
2.7. Etude hormonal :	45
2.8. Traitement statistique des résultats :	47

CHAPITRE III : Résultats

1. Etude pondérale :	49
2. Etude de la reproduction :	56
3. Effets sur la fonction hématologique :	63
4. Etude des paramètres biochimiques:	70
5. Etude histologique :	77
5.1. Atteinte tissulaire au niveau du foie :	77
5.2. Atteinte tissulaire au niveau des testicules :	78
5.3. Atteinte tissulaire au niveau de l'épididyme :	80

CHAPITRE IV: DISCUSSION et CONCLUSION

Discussion 83

Conclusion générale 90

Références..... 92

Annexes..... 118



Introduction

Introduction

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel, elle peut affecter l'homme soit directement dans sa santé ou son environnement plus lointain (Francois, 2002). L'un des problèmes majeurs de ce siècle est la préservation de la qualité de l'environnement face à la croissance industrielle exceptionnelle et à la pollution engendrée par le développement économique. Le rejet des substances naturelles ou industrielles constitue l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme (Lagadic *et al.*, 1997). Les substances xénobiotiques responsable de cette pollution sont nombreuses et diverses en raison d'activité humaine multiples qui peuvent en être la source, mais l'attention est particulièrement portée sur les engrais, les pesticides, métaux lourds, et certains produits pétrochimiques de grande consommation tel que les solvants (Derosa *et al.*, 2004).

Les éthers de glycol (EG) sont des solvants oxygénés dont l'usage s'est largement développé ces trente dernières années. Plus d'une trentaine d'éthers de glycol sont synthétisés aujourd'hui par l'industrie chimique (INRS, 2004), ils sont directement ou indirectement omniprésents dans notre monde moderne, au travail, chez soi, etc. (Eckel *et al.*, 1996). Ils se répartissent en deux séries: les dérivés de l'éthylène (série E) et les dérivés du propylène glycol (série P). Jusqu'en 1990, les dérivés de l'éthylène glycol étaient les principaux éthers de glycol commercialisés, probablement parce que l'oxyde d'éthylène nécessaire à leur synthèse est un important sous produit de l'industrie pétrolière (INRS, 2004).

Leur faible toxicité aiguë, comparée à celle de la plupart des solvants organiques, a favorisé leur présence dans de nombreuses préparations à usage industriel ou domestique tels que les peintures, encres, vernis, teintures, produits de nettoyage, savons liquides, cosmétiques ou certaines formulations pharmaceutiques (Lemazurier *et al.*, 2003), sans prendre en considération leurs effet nocif sur la santé (INSERM, 1999).

Pour cela l'homme pourra être exposé et en contact direct avec ces produits dans son milieu professionnel, donc il reste en situation de « menacé » pour des dizaines d'années, en même temps les industries qui fabriquent, transforment et utilisent les éthers de glycol peuvent en émettre dans l'air et en libérer dans les eaux de surface ou souterraines (Eckel *et al.*, 1996). c'est la raison pour laquelle plusieurs recherches étudies l'effet des solvants sur la physiologie des êtres humains comme l'Ethylène Glycol Mono Méthyle Ether (EGME) qu'est l'un de ces produits.

Les différents éthers de glycol, dérivés de l'éthylène glycol, sont facilement absorbés par voie orale, cutanée ou pulmonaire. L'absorption est favorisée par dilution des composés dans l'eau, les alcools ou les solvants organiques, c'est-à-dire dans les conditions standards d'utilisation des éthers de glycol. Les fonctions esters (acétate, en général) sont aisément hydrolysées et libèrent in situ les différents éthers de glycol. (Gijsbers *et al.*, 2004).

Du fait de leur caractère amphiphile, les éthers de glycol traversent facilement les membranes et se répartissent dans les compartiments aqueux et lipidiques ils accèdent à tous les compartiments y compris dans les tissus fœtaux dans les minutes qui suivent l'absorption, quelle que soit la voie d'administration (orale, cutanée, pulmonaire) (Ahmed *et al.*, 1994 ; Sabourin *et al.*, 1992a,b ; Johanson, 1994 ; Ghanayem *et al.*, 1987). Les systèmes enzymatiques transforment ensuite les éthers de glycol en composés hydrosolubles plus facilement éliminés ou transformés en métabolites réactifs, responsables de manifestations toxiques (Marie, 2002; Etiemble, 2003).

La plupart des travaux expérimentaux ont déterminé la toxicité et l'impact de ces produits sur la santé (Fastier *et al.*, 2005), sont considérés comme des produits très toxiques pour la plupart des fonctions du corps, car ils peuvent altérer la reproduction (reprotoxiques) (Lorente *et al.*, 2000; KU *et al.*, 1995), les cellules sanguines (héματο-immunotoxiques) (INSERM, 1999) et le système nerveux (neurotoxiques) (Brashear, 1996). Leurs métabolites semblent être plus toxiques que leurs produits initiaux (Wang *et al.*, 2000).

Actuellement les effets des éthers de glycol sur les paramètres de reproduction y compris la fertilité masculine font l'objet des études menées à l'échelle internationale (Cicolella, 2006). Depuis la première publication de Nagano en 1979,

de nombreuses études réalisées chez l'animal de laboratoire ont montré que des éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol (principalement l'éther méthylique ou EGME) présentaient des effets adverses sur la reproduction et le développement.

L'effet des éthers de glycol sur le testicule est hautement spécifique. Ce sont les cellules de la lignée germinale (spermatocytes au stade pachytène) qui en sont la cible. L'atteinte de la lignée germinale conduit à un arrêt de la spermatogenèse. Dans ce cas, l'arrêt de la spermatogenèse peut être définitif et le testicule s'atrophie. En diminuant le niveau de production de spermatozoïdes, ces éthers de glycol diminuent le potentiel de fertilité, ce qui peut aboutir à une stérilité (INSERM, 1999).

Des études ont montré que L'exposition par voie cutanée des cobayes à l'EGME engendre une altération des paramètres hématologiques (légère anémie et diminution du nombre de leucocytes) (Hobson *et al.*, 1986).

D'autres travaux ont démontré que l'administration répétée d'éthers de glycol produit parfois des altérations fonctionnelles et/ou histologiques hépatiques. Elles sont toujours bénignes (modulation d'activités enzymatiques, gonflement des hépatocytes, augmentation du poids du foie) et traduiraient plutôt une réponse métabolique adaptative qu'un effet toxique hépatique (INSERM, 1999).

Récemment, un intérêt réel relatif à l'exposition cutanée professionnelle est apparu au niveau européen avec la naissance de deux vastes projets. Le premier s'intitule RISKOFDERM (Risk Assessment for Occupational Dermal Exposure to Chemicals) (Van Hemmen *et al.*, 2003) et a pour but de développer des outils d'évaluation des risques liés à une exposition cutanée. Le second appelé EDETOX cherche des critères d'évaluations et de prédictions de l'absorption cutanée des toxiques (Williams Faith, 2004).

Malgré cette prise de conscience évidente au niveau scientifique, le risque cutané est considéré principalement vis-à-vis des produits chimiques à l'état liquide mais très peu d'intérêt semble porter sur l'exposition cutanée aux toxiques volatils. Pourtant, certaines études ont montré que cette voie pouvait participer à la toxicité systématique et parfois dans des proportions non négligeables vis-à-vis du passage par inhalation (Hursh *et al.* , 1989 ; Johanson et Boman, 1991 ; Mraz et Nohova, 1992 ; Kezic *et al.* , 1997 ; Corely *et al.* , 1997 ; Brooke *et al.* , 1998 ; Shih *et al.*, 2000 ; Miyauchi *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2003 ; Chang *et al.*, 2007).

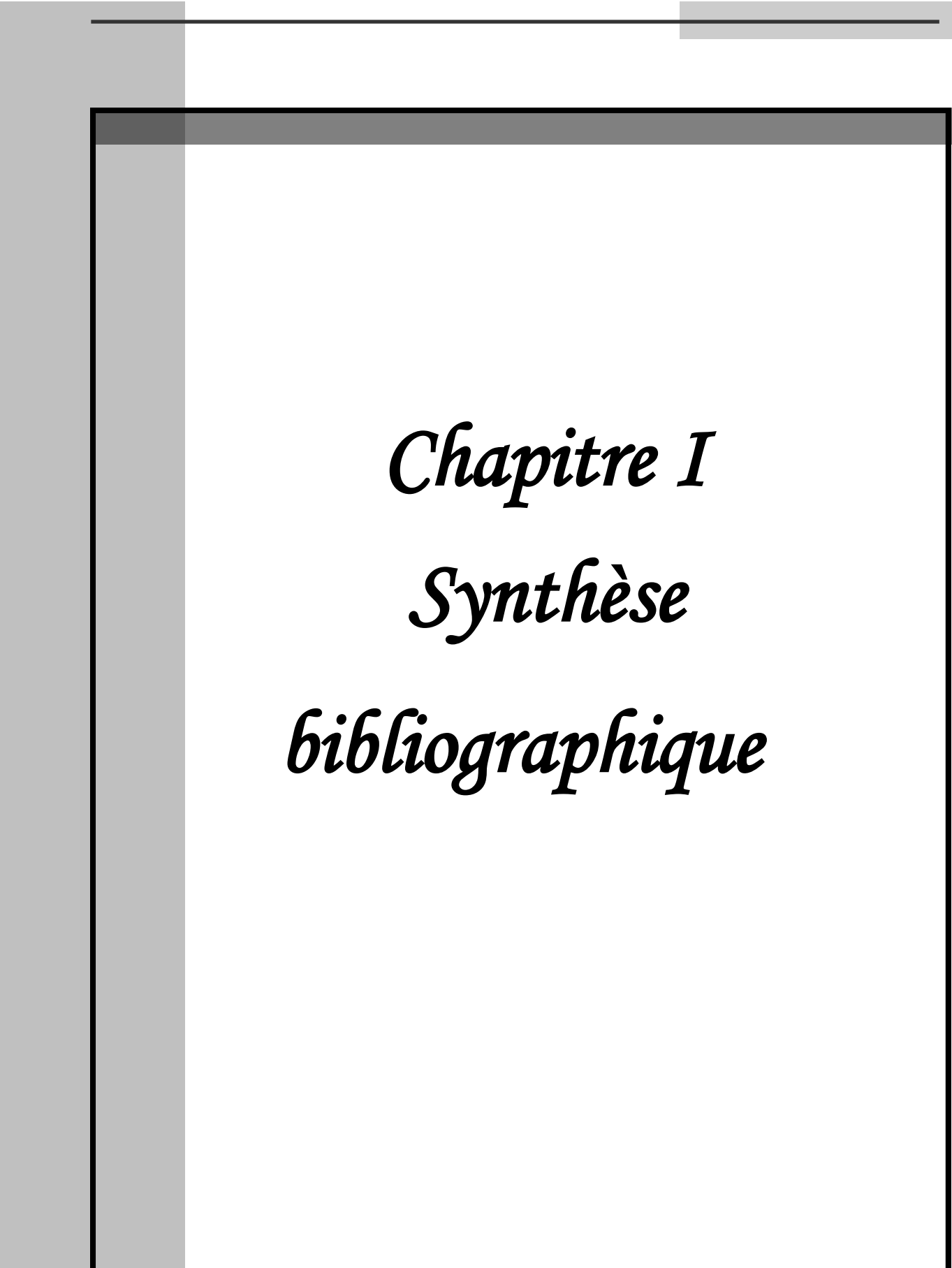
La pénétration des éthers de glycol dans l'organisme humain se fait principalement lors d'un contact direct, à travers la peau, leur faible volatilité limite la contamination par voie respiratoire sauf dans des situations où les produits sont chauffés ou utilisés sous forme d'aérosols. Chez l'animal les études récentes *in vivo* montrent, d'une façon générale, une absorption cutanée chez le rongeur supérieure à celle observée chez l'homme (Sabourin *et al.*, 1992 ; Lockley *et al.*, 2002) , la voie cutanée représentant environ 10 % de l'absorption totale des vapeurs d'EGBE (Corley *et al.*, 1997). Cependant, elle peut atteindre de l'ordre de 40 % dans certaines conditions industrielles (Jones & Cocker, 2003).

Les vapeurs de l'EGME sont largement absorbées par voie cutanée: l'absorption du composé par voie dermique représenterait plus de 50% de son absorption totale (Kezic *et al.*, 1997).

Dans cet axe se dirige notre travail qui se base sur une étude expérimentale de l'effet d'un solvant : l'Éthylène glycol mono méthyle éther (EGME) sur certains paramètres relatifs à la fonction de reproduction ainsi quelques paramètres biochimiques et hématologiques chez le lapin mâle (*Oryctolagus Cuniculus*) après une exposition cutanée.

Ce manuscrit se divise en quatre chapitres:

- ✚ Le premier est une synthèse bibliographique des éthers de glycol et plus particulièrement l'EGME, la famille, classification, les caractères physico-chimiques, utilisation et les effets sur la santé et l'environnement.
- ✚ Le second est une étude expérimentale, dans laquelle nous présentons le matériel et les méthodes de, le mode de traitement ainsi que l'ensemble de manipulations réalisées au niveau du laboratoire pour obtenir les résultats souhaités.
- ✚ Dans le troisième chapitre, nous présentons les résultats obtenus après l'exposition des animaux à l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME).
- ✚ Dans le quatrième chapitre, nous essayons de discuter les résultats obtenus et les comparer avec les données disponibles au niveau international.



Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1. L'absorption cutanée :

1.1. Définition de l'absorption cutanée :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (W.H.O., 2006), l'absorption cutanée décrit globalement le transport des molécules de la surface externe de l'épiderme vers la circulation systémique. L'absorption se déroule en trois phases :

- **La phase de pénétration (1)** : une molécule se fixe en fonction de son affinité au film hydrolipido-protéique à la surface de la couche cornée, puis elle pénètre la barrière semi-perméable en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques.
- **La phase de diffusion (2)** : la molécule diffuse à travers les différentes couches de l'épiderme (Brisson, 1974 ; Agache *et al.*, 2000).
- **La phase d'absorption proprement dite (3)** : la molécule est absorbée dans les différents réseaux vasculaires du derme et de l'hypoderme.

1.2. Le passage cutané des substances volatiles :

A première vue, le fait qu'un gaz ou un produit volatil puisse passer en partie la barrière cutanée peut paraître étonnant. Pourtant, c'est depuis 1851 que l'on sait que la peau peut absorber physiologiquement une partie de l'oxygène atmosphérique. Cette étude a même montré que l'oxygène ambiant contribue entièrement à l'oxygénation de la surface externe de la couche cornée et qu'elle participe à la nutrition de l'épiderme et d'une partie du derme (Stucker *et al.*, 2002). Il existe depuis de nombreuses années des expériences *in vivo* objectivant le passage de gaz ou de vapeurs à travers la peau.

2. Le risque cutané lié aux vapeurs des éthers de glycol :

Pour évoquer un éventuel risque du passage cutané de toxiques volatils, il faut à la fois objectiver la dangerosité du produit, sa pénétration cutanée dans des conditions expérimentales et les conditions de travail, l'exposition possible et une dose suffisante pour entraîner des effets aigus ou chroniques. La famille des éthers de glycol est choisie en exemple du fait de leur dangerosité révélée depuis quelques années, leur présence dans de nombreux secteurs d'activité et produits de consommation. Deux rapports récents de l'INSERM (1999, 2006) ont montré une affinité importante entre les éthers de glycol et la

peau humaine. Un intérêt grandissant s'est porté sur l'exposition cutanée des éthers de glycol (Bonney., 2009).

2.1. Les données générales sur les éthers de glycol :

Les éthers de glycol font partie de la famille des solvants organiques et comprennent 80 dérivés. Ce sont des liquides, incolores et volatils utilisés comme solvants amphiphiles, c'est-à-dire hydrophile (soluble dans l'eau) et lipophiles (solubles dans les huiles et solvants organiques) Du fait de ce caractère amphiphile, ils entrent dans la composition de nombreux produits à usage industriel ou domestique. Leurs synthèses s'effectuant principalement par l'action d'un alcool sur l'oxyde d'éthylène ou de propylène, les éthers de glycol se divisent en deux principaux groupes : les dérivés de l'éthylène glycol (série E) et les dérivés du propylène glycol (série P).

La plupart des études publiées dans la littérature internationale concernent les éthers de glycol de la série éthylénique et en particulier l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) (INSERM, 2006).

2.2. L'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) :

2.2.1. Définition :

L'EGME fait partie des dérivés de l'éthylène glycol (série E) : $R-O-CH_2-CH_2-OH$: possède une fonction alcool primaire qui se métabolise dans l'organisme par voie de l'alcool déshydrogénase puis de l'aldéhyde déshydrogénase en acides alkoxyacétiques

(Etiemble, 2003). Ces acides alkoxyacétiques sont responsables d'effets toxiques sur la reproduction, notamment l'acide méthoxyacétique (MAA), métabolite de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) (Lemazurier *et al.*, 2003; INRS, 2005).

2.2.2. Identité et propriétés physico-chimiques :

L'éthylène glycol monométhyl éther a pour formule moléculaire empirique $C_3H_8O_2$; sa formule développée est $CH_3OCH_2CH_2OH$ et son poids moléculaire s'élève à 76,1 g/mole. Il porte le numéro 109-86-4 au registre du *Chemical Abstracts Service* (CAS).

L'éthylène glycol monométhyl éther est un liquide visqueux et incolore, d'une solubilité de 500 000 mg/L dans l'eau (DMER et AEL, 1996). Son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (log K_{ow}) est de -0,77 (Hansch et Leo, 1985); il a une tension de vapeur de 1 300 Pa à 25 °C (Riddick *et al.*, 1986) et une constante de la loi de Henry égale à 0,198 Pa·m³/mole

(valeur théorique) (DMER et AEL, 1996). Le facteur de conversion de l'EGME dans l'air correspond à 1 ppm = 3,11 mg/m³.

L'EGME fait partie du groupe de composés chimiques parfois baptisés « éthers glycoliques ». Parmi ses synonymes, mentionnons le 2-méthoxy-1-éthanol, l'éther d'éthylène glycol et de monométhyle et le méthyl Cellosolve.

Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

Paramètre	Valeur/description	Référence
Nom chimique	2-méthoxyéthanol (ou Ethylène glycol méthyl éther ou Ethylène glycol monométhyl éther)	INRS, 1999
Numéro CAS	109-86-4	INRS, 1999
Numéro EINECS	203-713-7	INRS, 1999
Formule chimique	C ₃ H ₈ O ₂	INRS, 1999
Etat physique	Liquide incolore	INRS, 1999
Poids moléculaire	76,09 g.mol ⁻¹	INRS, 1999
Tension de vapeur	13 hPa (25°C)	IPCS, 2004
Concentration de vapeur saturante	40,6 mg/l (13 000 ppm) à 20°C et 1033 hPa	Calculée
Solubilité	complètement soluble dans l'eau	ECETOC 1994
Températures d'ébullition/fusion	123-126°C / -85°C	INRS, 1999
Point d'éclair	37-39 °C en coupelle fermée	INRS, 1999
Limites d'explosibilité	(en volume) Limite inférieure : 2,4 %, Limite supérieure : 20 %	INRS, 1999
Facteurs de conversion à 20°C et 1013 hPa	1 ppm = 3,11 mg/m ³ 1mg/m ³ = 0,32 ppm	INRS, 1999

Tableau 1: Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME.

2.2.3. Caractérisation de la pénétration de l'EGME dans l'environnement :

2.2.3.1. Production, importation et utilisations :

L'EGME entre dans la fabrication des peintures, des enduits, des encres, des nettoyants, des produits à polir, des fluides hydrauliques de frein et du carburéacteur. Il trouve de nombreuses applications comme solvant, produit intermédiaire et coupleur de solvant dans les mélanges et les préparations à base d'eau (Stemmler *et al.*, 1997).

L'analyse des données de surveillance recueillies par le ministère du Travail de l'Ontario entre 1983 et 1994 (Rachamin *et al.*, 1996) révèle que la plupart des industries rapportant une concentration de l'EGME supérieure à la limite de détection dans l'air ambiant étaient des imprimeries commerciales ou des fabricants de petits appareils électroménagers, de machines et d'équipement.

2.2.3.2. Sources et rejets :

➤ **Sources naturelles :**

L'EGME n'existe pas à l'état naturel (U.S. EPA, 1986; OMS, 1990). Aucune réaction connue n'entraîne la production *in situ* de l'EGME ou d'autres éthers glycoliques et leur rejet dans l'atmosphère (Rogozen *et al.*, 1987).

➤ **Sources anthropiques :**

Les rejets de l'EGME dans l'environnement immédiat signalés dans le cadre de l'Inventaire national des rejets de polluants totalisaient 17,0 tonnes en 1994 (INRP, 1996). Une usine du sud de l'Ontario est à l'origine de ces émissions, toutes atmosphériques de nature. La même année, les transferts de l'EGME en vue de leur élimination hors des lieux, dans un incinérateur, se chiffraient à 2,12 tonnes. Enfin, 0,07 tonne de l'EGME a servi à la récupération de l'énergie en 1994 (INRP, 1996). En 1995, les rejets de l'EGME dans l'environnement immédiat rapportés par des entreprises à l'Inventaire national des rejets de polluants s'établissaient à 6,3 tonnes (INRP, 1998). La totalité du polluant a été libérée dans l'atmosphère par les cheminées d'une usine du sud de l'Ontario.

Les transferts de l'EGME en prévision de sa destruction hors des lieux s'élevaient à 33,9 tonnes en 1995 (INRP, 1998). Aucun rejet de l'EGME n'a été signalé à l'Inventaire national des rejets de polluants en 1996 (INRP, 1998).

2.2.3.3. Devenir dans l'environnement :

➤ **Air :**

Étant donné sa grande volatilité (tension de vapeur de 1 300 Pa à 25 °C), l'EGME devrait surtout se retrouver dans l'air. Howard *et al.* (1991) situent la demi-vie du composé entre 5,7 et 57 heures dans l'atmosphère, d'après la constante de vitesse de sa réaction avec les radicaux hydroxyles.

L'*Environmental Protection Agency* des États-Unis (U.S. EPA, 1986) fixe la demi-vie de l'EGME à 17,5 heures en fonction de la réaction de ce composé avec les radicaux hydroxyles présents dans l'air ambiant.

➤ **Eaux de surface :**

L'EGME s'évapore rapidement à la surface de l'eau. Sa demi-vie est estimée à 2,8 heures (Lyman *et al.*, 1982).

L'EGME pourrait se biodégrader de manière sensible dans l'eau naturelle (U.S.EPA, 1986). Howard *et al.* (1991) situent la demi-vie du composé dans cet élément entre 1 et 4 semaines, avec une biodégradation aérobie sans acclimatation.

➤ **Eaux souterraines :**

Selon Howard *et al.* (1991), le composé a une demi-vie de 2 à 8 semaines dans les eaux souterraines, compte tenu d'une biodégradation aérobie sans acclimatation.

➤ **Sols :**

La grande solubilité dans l'eau (U.S. EPA, 1986) de l'EGME devrait permettre à ce dernier de se déplacer très facilement dans le sol, mais une grande partie du composé s'évaporerait à la surface du sol.

Howard *et al.* (1991) établissent la demi-vie du composé dans les sols aérobies entre 1 et 4 semaines, en supposant une biodégradation aérobie sans acclimatation. La bactérie tellurique *Alcaligenes* MC11 oxyde l'EGME en acide 2-méthoxyacétique (AMA) et s'en sert comme source de carbone (Harada et Nagashima, 1975). *Pseudomonas* sp. 4-5-3, *Xanthobacter autotrophicus* EC1-2-1 et une bactérie simplement baptisée « souche MC2-2-1 » pourraient aussi tirer le carbone dont elles ont besoin pour croître dans des conditions aérobies de l'EGME (Kawai, 1995).

La demi-vie de l'EGME dans les sols aérobies se situe entre 4 et 16 semaines, compte tenu de la demi-vie du composé en milieu aqueux aérobie, avec biodégradation sans acclimatation (Howard *et al.*, 1991).

2.2.3.4. Distribution dans l'environnement :

L'EGME ne devrait pas beaucoup s'adsorber aux solides en suspension ni aux sédiments à cause de sa grande solubilité dans l'eau (U.S. EPA, 1986). Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques de L'EGME signifient que le composé devrait s'évaporer ou se lixivier rapidement dans le sol (Howard, 1990).

Quand il y a émission d'EGME dans l'air, le critère d'équilibre (CEQ) prévoit qu'environ 50 % du composé se retrouvera dans l'air, contre 25 % environ dans le sol et autant dans l'eau. Si le rejet s'effectuait dans l'eau, plus de 99 % du composé y resterait. Enfin, libéré dans le sol, environ 75 % de l'EGME se retrouverait dans le sol et 25 % dans l'eau (DMER et AEL, 1996).

2.2.4. Devenir dans l'organisme :

Les éthers de glycol pénètrent aisément dans l'organisme, que ce soit par voie orale, pulmonaire ou cutanée.

2.2.4.1. Absorption :

Du fait de son caractère amphiphile, l'EGME traverse facilement les membranes et se répartissent dans les compartiments aqueux et lipidiques. Absorbé très efficacement quelle que soit la voie de pénétration (orale, cutanée, pulmonaire), il se distribue dans la plupart des tissus biologiques y compris dans les tissus fœtaux. Les systèmes enzymatiques le transforme ensuite en composés hydrosolubles plus facilement éliminés ou en métabolites réactifs, responsables de manifestations toxiques. (INSERM, 1999).

➤ **Absorption chez l'animal :**

L'absorption par voie cutanée des éthers de glycol est très efficace pour la plupart d'entre eux. Des mesures quantitatives ont été réalisées avec plusieurs éthers de glycol de la série éthylénique (Barber *et al.*, 1992; Bartnik *et al.*, 1987; Boatman *et al.*, 1993; Guest *et al.*, 1984; Johanson et Fernstrom, 1986, 1988; Johanson *et al.*,

1986). La pénétration varie de 20 à 2 800, mg/h/cm² en fonction inverse du poids moléculaire.

La pénétration cutanée est facilitée lorsque les éthers de glycol sont en solution aqueuse ou éthanolique. Ceci est particulièrement bien démontré pour EGBE chez le cobaye (Bartnick *et al.*, 1987; Johanson and Fernstrom, 1988) mais il est également vrai pour l'EGME puisque les effets toxiques sont potentialités lorsque le produit est dilué dans l'eau (Cooper et Hobson 1989).

L'EGME s'absorbe facilement après exposition par voie orale, par inhalation ou par pénétration cutanée (Welsch et Sleet, 1987; Sleet *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989).

➤ **Absorption chez l'homme :**

Des travaux sur différents éthers de glycol et diéthers montrent un passage cutané humain de 35 à 2 800, mg/h/cm, ces absorptions variant en fonction inverse du poids moléculaire des composés: EGME > 2PG1ME > EGEE > EGEEA > EGnPE > EGBE > DEGME > DEGEE > DEGBE (Dugard et al., 1984; Barber et al., 1992; Larese et al., 1994).

Selon l'Inserm (2006), la peau d'un adulte humain en absorbe 2 à 30 fois moins que celle du rat (selon le composé considéré). On peut penser que l'absorption est plus importante chez les enfants où la peau est plus fine.

2.2.4.2. Distribution :

L'EGME gagne toutes les parties de l'organisme ou presque, y compris le fœtus en développement, où la concentration de métabolites peut être plus élevée que chez la mère (Welsch et Sleet, 1987; Sleet *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989).

Après quelques heures, de fortes concentrations se retrouvent dans le foie, les reins et les graisses. Les concentrations tissulaires sont alors supérieures aux concentrations circulantes. De fortes concentrations ont également été mesurées dans la moelle osseuse, la vessie, la rate et le thymus de souris ayant reçu de l'EGME par voie intraveineuse. Vingt-quatre à 48 h après administration d'EGME, une forte rémanence de composés est observée dans la carcasse (5 à 10 %) et dans le foie. (Bartnick *et al.*, 1987).

2.2.4.3. Passage placentaire et distribution chez le fœtus :

Administrés à des souris gravides, l'EGME se retrouve dans les fœtus à des concentrations supérieures aux concentrations sanguines maternelles (Daniel *et al.* 1991). Une étude comparée rat/souris/singe montre que l'EGME s'accumule dans tous les cas dans le placenta et l'embryon, ainsi que dans le sac vitellin (Sleet et al., 1986; Scott et al., 1989; Clarke et al., 1991a, 1993; Daniel et al., 1991).

2.2.4.4. Métabolisme :

Les éthers de glycol sont métabolisés très rapidement, L'expertise Inserm de 1999 rapport que les esters (acétate en général) sont hydrolysés en quelques minutes dans le sang ou au niveau des muqueuses par des carboxylestérases et ne sont pas détectés dans les fluides biologiques. les transformations ultérieures impliquent des réactions d'oxydations éventuellement suivies de conjugaisons qui dépendent de la nature des substituants portés par

les dérivés de l'éthylène, du diéthylène ou du triéthylène glycol ou de la position des substituants portés par les propylène, dipropylène ou tripropylène glycols.

La voie principale du métabolisme des éthers monosubstitués de l'éthylène glycol est une série de transformation majoritairement en aldéhydes (alkoxyacétaldéhyde) qui peut être secondairement conjugué en acides (alkoxyacétiques) par des alcools et des aldéhydes déshydrogénases. Une voie alternative peut être impliquée en cas de saturation de la première : elle implique des monooxygénases à cytochrome P450 qui catalysent la rupture du pont éther, libérant un alcool primaire et l'éthylène glycol.

La fonction alcool primaire des dérivés du diéthylène ou du triéthylène glycol est également transformée en aldéhydes et acides du diéthylène ou triéthylène glycol. Les liaisons éthers de ces derniers peuvent être coupées par des mono-oxygénases, les déshydrogénases réagissant ensuite sur l'éthylène glycol ainsi formé. Les glymes, dérivés disubstitués de l'éthylène glycol, du diéthylène glycol et du triéthylène glycol, subissent au préalable une désalkylation d'un groupement méthoxyle aboutissant à la production d'un dérivé monosubstitué. Ce dernier subit alors une voie métabolique commune aux dérivés monosubstitués.

En conclusion, les divers produits du métabolisme excrétés sont : les acides alkoxyacétiques ou éthylène glycol, molécules mères inchangées et CO₂. (Figure 01).

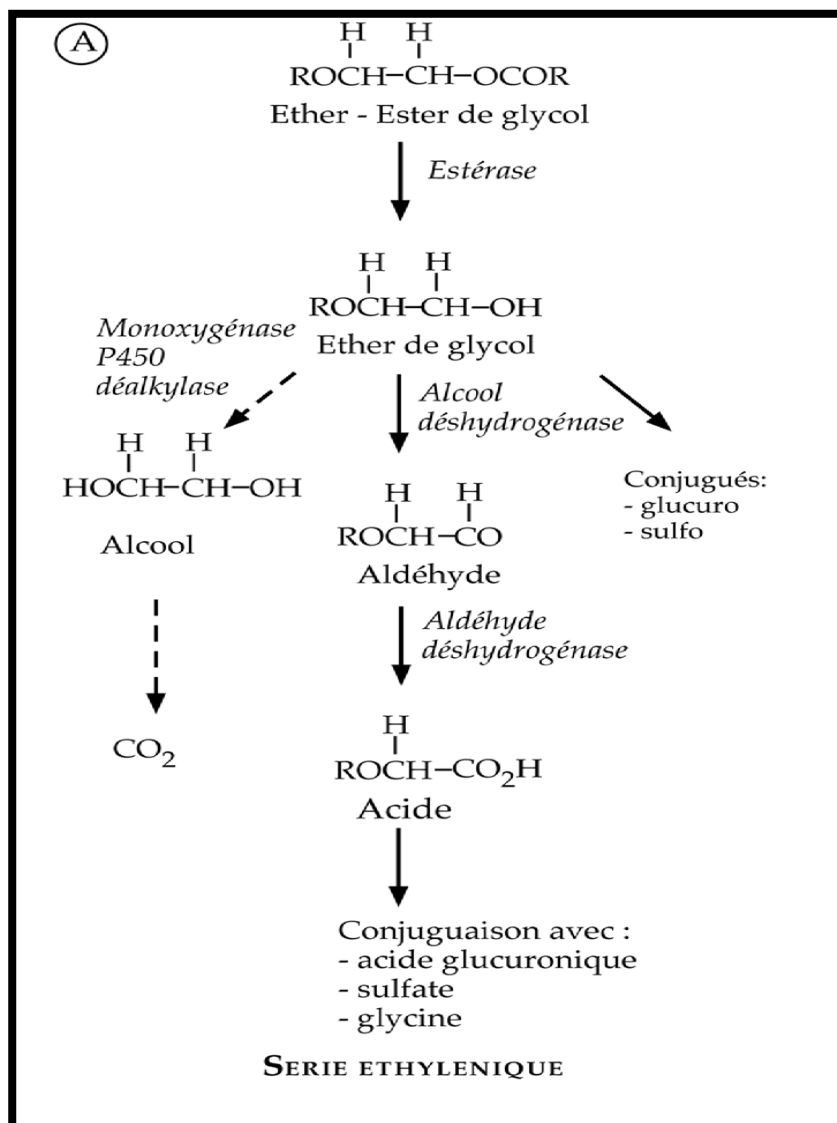


Figure 1: Métabolisme de l'EGME (INSERM, 1999).

2.2.4.5. Elimination :

Le temps de demi-vie plasmatique des molécules mères est court, de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes. Cela contraste avec le plus long séjour des métabolites acides dans l'organisme et de leur élimination urinaire, de quelques heures à plus de 48 heures pour certains d'entre eux (71 h pour le MAA). Pour les éthers monosubstitués, la vitesse d'élimination des métabolites urinaires va dépendre de la longueur de la chaîne alkyl : les métabolites acides des éthers de glycol à chaînes longues (butyles) sont plus rapidement éliminés (demi-vie de 6 h) que les dérivés éthylés ou méthylés (demi-vies de 40 et 80 h respectivement). L'alcool et l'aldéhyde

déshydrogénases sont des systèmes enzymatiques saturables, expliquant que la quantité de composé administré va également intervenir dans la vitesse d'élimination et le mode de transformation métabolique. L'administration simultanée d'autres composés (alcool éthylique) substrats de ces enzymes va diminuer la vitesse de transformation métabolique des éthers de glycol (Humbert et al., 2003).

En général, l'AMA (libre ou conjugué) est le principal métabolite décelé dans l'urine du rat, de la souris et de l'être humain exposés au produit par ingestion ou inhalation; les autres métabolites dans l'urine comprennent l'éthylène glycol (surtout chez le rat exposé de façon répétitive au composé par l'eau potable) (Medinsky et al., 1990) et les produits métaboliques du cycle de Krebs. L'être humain élimine le prétendument métabolite toxique AMA beaucoup plus lentement que le rat, avec des demi-vies dans le sang de 77 et de 19 heures, respectivement (Groeseneken et al., 1989).

2.2.5.Écotoxicologie :

2.2.5.1. Organismes terrestres :

On ne possède pas d'information sur les effets que L'EGME pourrait avoir sur la faune. Selon les résultats des études d'inhalation qu'on y retrouve, le lapin blanc de Nouvelle-Zélande est l'animal le plus sensible à l'EGME présent dans l'air. (Hanley *et al.*, 1984a,b).

2.2.5.2. Organismes aquatiques :

Les données sur la toxicité chronique ne portent que sur les protozoaires et les algues. Le flagellé *Chilomonas paramecium* demeure l'organisme le plus sensible avec un seuil de toxicité après 2 jours de 2 200 µg/L, si l'on se fie à l'inhibition de la multiplication des cellules (Bringmann et Kuehn, 1981).

L'algue la plus sensible est la cyanophycée *Microcystis aeruginosa*, avec un seuil de toxicité au bout de 8 jours de 100 000 µg/L. (Bringmann et Kuehn, 1978).

2.2.6. Toxicité chez l'animal :

2.2.6.1. Toxicité aiguë :

L'EGME se caractérise par une toxicité aiguë faible à moyenne chez les animaux de laboratoire exposés par voie orale, par inhalation ou par pénétration cutanée. La DL₅₀ orale se situe habituellement autour de 1 000 mg/kg-mc ou plus (Smyth *et al.*, 1941; Carpenter *et al.*, 1956; ECETOC, 1995). Les effets sublétaux résultant de l'exposition aiguë à des doses plus faibles comprennent des effets toxiques pour le système reproducteur mâle (≥ 50 mg/kg-mc), une altération des paramètres sanguins (≥ 200 mg/kg-mc) et des effets sur le foie, le thymus et la rate (300 mg/kg-mc) (Chapin et Lamb, 1984; Anderson *et al.*, 1987; Holloway *et al.*, 1990; Kawamoto *et al.*, 1990; Ku *et al.*, 1994). L'EGME ne sensibilise pas la peau et il est peu probable qu'il irrite la peau ou les yeux (Carpenter et Smyth, 1946; Jacobs *et al.*, 1987, 1989; Jacobs, 1992; Devillers et Chessel, 1995; Zissu, 1995).

2.2.6.2. Toxicité à court terme :

Le thymus, les testicules et le sang du rat restent les organes les plus sensibles à l'EGME ou à l'acétate de l'EGME lors d'expositions répétées à court terme, par ingestion, par inhalation ou par application sur la peau (Miller *et al.*, 1981; Grant *et al.*, 1985; Fairhurst *et al.*, 1989; Feuston *et al.*, 1989; Kawamoto *et al.*, 1990; Exon *et al.*, 1991; Smialowicz *et al.*, 1991a; NTP, 1993; Butterworth *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1995). Le poids relatif du thymus diminue chez les rats à qui on administre oralement 50 mg/kg-mc ou plus du composé par jour (4 jours) ou qui sont exposés à une concentration de 300 ppm (933 mg/m³) ou plus du composé dans l'air (9 jours). Les taux d'exposition supérieurs entraînent des modifications histopathologiques. Des effets histopathologiques ou une réduction du poids des testicules ont aussi été observés chez les rats exposés à environ 88 mg/kg par jour ou 300 ppm (933 mg/m³) ou plus du produit pendant 9 ou 10 jours, tandis que les rats à qui on avait donné 70 mg/kg-mc par jour ou 300 ppm (933 mg/m³) ou plus du composé pendant au moins 5 jours présentaient des anomalies au niveau des paramètres sanguins.

En dépit de données moins nombreuses, la souris paraît moins sensible que le rat en ce qui concerne l'induction d'effets sur les organes précités. En effet, le thymus, le sang et les testicules ne présentent des altérations qu'après administration de doses de 1 000, de 500 et de 250 mg/kg-mc par jour (≥ 4 jours) par voie orale (Nagano *et al.*, 1979, 1984; Miller *et al.*, 1981; Hong *et al.*, 1988) ou exposition à des concentrations de 300, de 300 et de 1 000 ppm (933, 933 et 3 110 mg/m³) dans l'air (9 jours), respectivement (NTP, 1993). Les données sur

la toxicité à court terme du produit pour les autres animaux de laboratoire ne sont pas assez nombreuses pour autoriser une comparaison valable.

2.2.6.3. Toxicité chronique :

➤ Ingestion

Le thymus, les testicules et le sang sont les principaux organes affectés par l'EGME chez les rats exposés de manière subchronique au composé soit par gavage, soit au moyen d'eau potable. Les rats à qui on administre 285 mg/kg-mc par jour (la plus petite dose testée) ou plus du produit par voie orale pendant 6 semaines souffrent d'une atrophie du thymus et des testicules ainsi que d'une altération des paramètres hématologiques (notamment la concentration moyenne d'hémoglobine, l'hématocrite ainsi que la numération des érythrocytes et des leucocytes) (U.S. EPA, 1992). La dégénérescence des testicules, une diminution du poids du thymus et des effets sur le sang (y compris l'anémie, la réduction du nombre de leucocytes et de plaquettes) ont aussi été signalés chez les rats exposés durant 13 semaines à l'EGME dans l'eau potable, à une concentration équivalente à une dose de 71 mg/kg-mc par jour ou plus (NTP, 1993). Un peu comme cela s'est produit dans les études à court terme, les souris B6C3F₁ sont moins sensibles que les rats à l'EGME. En effet, les testicules et le thymus ne sont atteints qu'après exposition à des doses de 530 et de 990 mg/kg-mc par jour ou 19 plus. (NTP, 1993).

➤ Inhalation

Les rats Sprague-Dawley exposés par inhalation à 300 ppm (933 mg/m³) de l'EGME pendant 13 semaines présentaient une atrophie du thymus et des testicules, accompagnée de modifications histopathologiques aux testicules et d'altérations à plusieurs paramètres sanguins (concentration de leucocytes, de plaquettes et d'hémoglobine) et chimiques (bilan protéique, albumine, globuline). Le seul effet observé aux concentrations inférieures était une perte pondérale chez la femelle à 100 ppm (311 mg/m³) (Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a). Les mêmes chercheurs ont remarqué que les testicules du lapin blanc de Nouvelle-Zélande sont plus sensibles à l'exposition à l'EGME pendant 13 semaines, les tissus de cet organe présentant une dégénérescence à une concentration aussi faible que 30 ppm (93 mg/m³), alors qu'il y a atrophie lymphoïde du thymus à une concentration de 100 ppm (311 mg/m³) ou plus. Les paramètres sanguins subissent des modifications (plus faible numération des globules rouges et blancs et des plaquettes, baisse de la concentration d'hémoglobine) à 300 ppm (933 mg/m³) (Miller *et al.*, 1983).

➤ **Application cutanée**

L'exposition par voie cutanée des cobayes à 1 000 mg/kg-mc du composé par jour pendant 13 semaines engendre des effets histopathologiques sur les testicules,

plus une réduction du poids des organes et une perte pondérale, et une altération des paramètres hématologiques (légère anémie et diminution du nombre de leucocytes) et chimiques (enzymes du sang et calcium dans l'urine) (Hobson *et al.*, 1986).

2.2.6.4. Génotoxicité

Bien que l'EGME n'ait pas révélé de propriété mutagène dans les essais *in vitro*, il semble que le composé ait une certaine activité clastogène. Des preuves cohérentes indiquent que le premier métabolite, le MALD, est génotoxique pour plusieurs lignées cellulaires. Même si les résultats des études *in vivo* existantes suggèrent que l'EGME n'est pas génotoxique pour les cellules somatiques, il se pourrait qu'il engendre des modifications génétiques dans les gonocytes du mâle.

➤ **Études *in vitro***

L'EGME n'a pas d'effet mutagène sur diverses souches de *Salmonella* (McGregor *et al.*, 1983; McGregor, 1984; Zeiger *et al.*, 1992; Hoflack *et al.*, 1995). Par ailleurs, bien que l'AMA, son métabolite primaire, ne soit pas mutagène (McGregor *et al.*, 1983; Hoflack *et al.*, 1995), l'acétaldéhyde intermédiaire (MALD) a une action de ce genre sur une souche, qu'il y ait ou non activation métabolique exogène (Hoflack *et al.*, 1995). L'acétate de l'EGME n'induit pas d'effet mutagène sur les levures (Abbondandolo *et al.*, 1980), mais il entraîne une mauvaise ségrégation des chromosomes. (Zimmermann *et al.*, 1985; Whittaker *et al.*, 1989).

L'EGME n'engendre pas de mutations ponctuelles dans les cellules des mammifères cultivées *in vitro* (McGregor, 1984; Ma *et al.*, 1993; Chiewchanwit *et al.*, 1995). Toutefois, son métabolite, l'acétaldéhyde, augmente le nombre de mutations dans les cellules de hamster chinois (Elias *et al.*, 1996).

Quelques résultats indiquent que l'EGME et son acétate accroissent le nombre d'aberrations chromosomiques dans les cultures de cellules de mammifères (dont celles de cellules humaines). Si le composé intermédiaire MALD est à l'origine de maintes aberrations chromosomiques dans diverses lignées cellulaires, l'AMA, en revanche, n'en entraîne aucune (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1989; Chiewchanwit et Au, 1994; Elias *et al.*, 1996). Le composé-mère et les deux métabolites induisent des micronoyaux dans les cellules de mammifère,

l'acétaldéhyde ayant des effets beaucoup plus prononcés que l'EGME ou l'AMA (Elias *et al.*, 1996). Aucun résultat concluant n'indique que l'EGME suscite des échanges de chromatides soeurs *in vitro*, bien que le MALD et l'AMA le fassent (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1989; Loveday *et al.*, 1990; Chiewchanwit et Au, 1994; Elias *et al.*, 1996). L'EGME et le MALD causent l'aneuploïdie ou d'autres anomalies de la mitose *in vitro* (Zimmermann *et al.*, 1985; Whittaker *et al.*, 1989; Elias *et al.*, 1996).

➤ **Études *in vivo***

L'EGME n'induit pas d'aberrations chromosomiques chez le rat ni chez la souris après une exposition unique ou répétée par inhalation, ingestion ou intraveineuse (McGregor *et al.*, 1983; Au *et al.*, 1993). L'acétate de l'EGME n'engendre pas non plus l'apparition de micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse chez les hamsters à qui on a injecté une seule dose du composé par voie intrapéritonéale (Basler, 1986).

Par ailleurs, les spermatozoïdes des souris exposées à plusieurs reprises par inhalation à 500 ppm (1 555 mg/m³) d'EGME pendant 5 jours présentaient des anomalies morphologiques, également relevées chez les souris et les rats à qui on avait administré une dose aiguë de 500 mg/kg-mc ou plus du produit par voie orale (McGregor *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1987). Malgré cela, les résultats des essais sur les mutations létales dominantes chez les rongeurs ne sont pas concluants (McGregor *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1987).

2.2.5.6. Toxicité pour le développement :

➤ **Ingestion**

L'EGME et l'AMA, son principal métabolite, s'avèrent constamment toxiques pour le développement dans maintes études sur diverses espèces d'animaux de laboratoire à qui ces composés avaient été administrés par voie orale (même si les données ne permettent pas d'évaluer la variation interspécifique de la sensibilité), habituellement à des doses ou à des concentrations inférieures à celles qui s'avèrent toxiques pour la mère et fréquemment au degré d'exposition le plus bas testé. Ainsi, on observe une diminution du poids du fœtus chez les rates exposées à des doses répétées de 16 mg/kgmc par jour (la dose la plus faible) ou plus d'EGME dans le régime alimentaire durant la gestation. Des malformations apparaissent à des doses de 31 mg/kg-mc par jour ou plus, alors que la toxicité pour la mère ne survient qu'à une dose plus élevée (à savoir ≥ 140 mg/kg-mc par jour) (Nelson *et al.*, 1989). Plusieurs autres

études sur des rats exposés à l'EGME par leur alimentation ou par gavage (dose unique ou répétée) débouchent sur des résultats analogues (Ritter *et al.*, 1985; Toraason *et al.*,

1985, 1986a,b,c; Toraason et Breitenstein, 1988; Nelson *et al.*, 1991; Sleet *et al.*, 1996). Les malformations touchaient principalement le système cardiovasculaire, les reins et le système squelettique dans bon nombre de cas; à cela s'ajoutent dans quelques cas des problèmes de fonctionnement cardiaque. Une étude signalait des modifications au squelette et une ossification tardive chez les souris ayant reçu à plusieurs reprises une dose assez faible de l'EGME par voie orale (à savoir $\geq 31,25$ mg/kg-mc par jour). Ces effets s'aggravent quand on augmente la dose, qui devient aussi toxique pour la mère (Nagano *et al.*, 1981, 1984). Le cœur semble être l'organe le plus sensible chez le rat, mais non pas chez la souris, bien que les essais sur cet animal soient moins nombreux. Dans une étude, le système immunitaire en développement de la souris a été atteint, si l'on se fie aux observations sur les cellules du thymus, sur l'expression des antigènes des thymocytes et sur les cellules prolymphoïdes du foie (Holladay *et al.*, 1994). L'administration quotidienne de 12 mg d'EGME /kg-mc ou plus par voie orale pendant 25 jours durant la gestation s'avère toxique pour la mère et l'embryon chez le macaque de Buffon. Aucune preuve ne permet toutefois de conclure à l'existence de malformations lorsque la dose ne dépasse pas 36 mg/kg-mc par jour (Scott *et al.*, 1989).

➤ **Inhalation**

Dans les essais sur les rats, l'exposition répétée de la mère à une concentration de 50 ppm (156 mg/m³) d'EGME ou plus par inhalation entraîne divers effets sur le développement, notamment de fortes résorptions, une perte de poids chez les petits ou le fœtus et des anomalies bénignes au squelette (Doe *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a,b; Nelson *et al.*, 1984a); il faut une concentration de 100 ppm (311 mg/m³) ou davantage pour observer des malformations plus prononcées, telles les anomalies cardiaques (Nelson *et al.*, 1984a). L'inhalation de 25 ppm (78 mg/m³) du composé se traduit par des effets neurochimiques et comportementaux chez la progéniture du rat (Nelson *et al.*, 1984b). Dans le cadre d'essais uniques sur la souris et le lapin, la CMEO toxique pour le fœtus (diminution du poids, légères modifications osseuses, hypoplasie des testicules) s'établit respectivement à 50 et à 10 ppm (156 et 31 mg/m³), tandis que la CSEO se situe respectivement à 10 et à 3 ppm (31 et 9 mg/m³) (Hanley *et al.*, 1984a,b).

➤ **Application cutanée**

L'exposition répétée des rates à environ 48 mg/kg-mc par jour ou plus de produit par voie cutanée engendre des effets toxiques pour le développement (y compris des malformations) (Wickramaratne, 1986; Feuston *et al.*, 1990; Hellwig, 1993). L'EGME s'avère aussi tératogène pour le rat et la souris quand il est administré par d'autres voies d'exposition (à savoir intraveineuse, inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale).

2.2.6.6. Toxicité pour la reproduction :

❖ **Effets sur le système reproducteur des mâles :**

➤ **Ingestion**

Dans les nombreuses études pertinentes recensées, l'EGME se révèle toujours toxique pour le système reproducteur mâle des espèces testées, peu importe la voie d'administration. Des effets sur la capacité de reproduction et les organes reproducteurs ont souvent été observés à la dose ou à la concentration la plus faible testée. L'administration d'une ou de plusieurs doses d'EGME par voie orale a des effets nocifs sur les testicules (notamment atrophie et altérations histopathologiques ou signes biochimiques de dommages aux testicules, comme la présence de créatine dans l'urine) et/ou sur divers paramètres du sperme dans toutes les études au cours desquelles ces paramètres ont été examinés et cela, généralement à une dose d'environ 50 mg/kg-mc par jour ou davantage (Foster *et al.*, 1983, 1984; Chapin et Lamb, 1984; Chapin *et al.*, 1985a,b; a Creasy *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1987; Ghanayem et Chapin, 1990; Holloway *et al.*, 1990; Reader *et al.*, 1991; Smialowicz *et al.*, 1991a; Vachhrajani et Dutta, 1992; NTP, 1993; Ku *et al.*, 1994; Butterworth *et al.*, 1995; Aich et Manna, 1996; Timbrell *et al.*, 1996), bien que les effets sur les testicules puissent apparaître à une dose de 30 mg/kg-mc par jour, si l'on en croit la citation d'une étude portant sur plusieurs générations de rats exposés à l'EGME dans l'eau potable (Gulati *et al.*, 1990 a,b). On a aussi noté une diminution de la fertilité chez le mâle dans plusieurs études sur l'exposition aiguë et à court terme (dans un cas, à une dose inférieure à celle induisant des changements histopathologiques dans les testicules [soit 50 mg/kg-mc par jour]) (Chapin *et al.*, 1985a; Anderson *et al.*, 1987; Holloway *et al.*, 1990).

Chez la souris, la fertilité et les organes de la reproduction du mâle sont respectivement affectés par l'administration quotidienne, à court et à long terme, de 60 et de 170 mg/kg-mc ou plus du produit par voie orale, même si les essais sur la souris s'avèrent moins nombreux (Nagano *et al.*, 1979, 1984; Anderson *et al.*, 1987; Chapin *et al.*, 1993; NTP, 1993). Des effets

analogues sur les testicules ou sur les aptitudes à la reproduction du mâle ont été relevés dans les études sur l'exposition subchronique et à court terme de cobayes, de hamsters et de lapins; la CMEO s'établissait à 25 mg/kg-mc par jour pour le lapin (Nagano *et al.*, 1984; Ku *et al.*, 1994, 1995; Foote *et al.*, 1995; Berndtson et Foote, 1997).

➤ **Inhalation**

L'exposition aiguë ou répétée des rats à 300 ppm (933 mg/m³) ou plus d'EGME par inhalation a des effets toxiques sur la reproduction chez le mâle (effets sur les testicules, les paramètres du sperme et/ou la fertilité) (Doe *et al.*, 1983; McGregor *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983 ; Hanley *et al.*, 1984a; Samuels *et al.*, 1984; Lee et Kinney, 1989; Lee *et al.*, 1989). Des effets similaires ont été relevés chez la souris mâle exposée à 500 ppm (1 555 mg/m³) d'EGME (pas d'autre concentration testée) pendant 5 jours (McGregor *et al.*, 1983) et chez le lapin mâle exposé à 30 ppm (93 mg/m³) (concentration la plus faible testée) ou plus durant 13 semaines (Miller *et al.*, 1983).

➤ **Application cutanée**

L'exposition répétée à l'EGME par voie cutanée pendant 7 jours affecte aussi les testicules, les paramètres du sperme et la fertilité du rat. Ces effets ont été notés à toutes les concentrations testées lorsqu'il y avait occlusion du site d'administration (Feuston *et al.*, 1989).

❖ **Effets sur le système reproducteur des femelles :**

➤ **Ingestion**

Bien qu'il n'ait pas fait l'objet d'études importantes, le système de reproduction de la femelle est atteint lui aussi quand l'animal est exposé à l'EGME. Ainsi, on remarque une modification du cycle œstral et de la concentration d'hormones, plus des modifications histopathologiques aux ovaires chez les rates recevant respectivement 100 et 300 mg/kg-mc par jour ou plus du composé pendant plusieurs jours; la CSEO s'établissait à 10 mg/kg-mc par jour (Davis *et al.*, 1997). Les rates exposées à une dose quotidienne de 297 mg/kg-mc ou plus du produit par voie orale durant 13 semaines se démarquaient aussi par des organes de la reproduction atrophiés, bien que cette dose donne également lieu à une perte pondérale (NTP, 1993). De même, l'administration subchronique de l'EGME par voie orale entraîne l'atrophie des ovaires et perturbe le cycle œstral de la souris, mais uniquement à une dose supérieure à celle qui induit ces effets chez le rat (à savoir $\geq 1\ 839$ et $\geq 1\ 194$ mg/kg-mc par jour respectivement, aucun effet noté aux doses inférieures) (NTP, 1993). Chapin et ses collaborateurs (1993), en revanche, rapportent une augmentation du poids des ovaires chez la

souris femelle exposée à 636 mg/kg-mc de produit par jour dans le cadre d'essais portant sur plusieurs générations.

➤ ***Inhalation***

Les rates et les lapines exposées pendant 13 semaines par inhalation à une concentration allant jusqu'à 300 ppm (933 mg/m³) de l'EGME ne montraient aucune difficulté au niveau de la reproduction, ni de modification à leurs organes (Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a).

2.2.2.7. Immunotoxicité :

L'exposition à l'EGME ou à l'acétate de l'EGME par voie orale ou cutanée affaiblit sensiblement la fonction immunitaire du rat. En dépit d'études moins nombreuses, le système immunitaire de la souris paraît beaucoup moins sensible à l'EGME. Diverses études signalent des problèmes d'immunosuppression chez le rat mâle et/ou femelle (plusieurs souches) à qui on avait administré oralement une dose quotidienne de 50 mg de l'EGME /kg-mc ou plus de façon répétitive, pendant 2 à 21 jours; ces problèmes se caractérisaient par une modification de la multiplication des lymphocytes de la rate après administration de divers mitogènes, par la réaction des cellules formatrices de plaques aux antigènes et par l'altération d'autres paramètres de la fonction immunitaire (Exon *et al.*, 1991; Smialowicz *et al.*, 1991a,b, 1992a,b, 1993; Riddle *et al.*, 1992, 1996; Williams *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le thymus avait perdu du poids dans la plupart des essais (dose aussi faible que 25 mg/kgpc par jour) et on a occasionnellement observé une atrophie de la rate ou une réduction de la cellularité dans cet organe. On ne possède néanmoins aucune preuve cohérente d'immunosuppression chez la souris à l'administration répétée d'une dose de l'EGME allant jusqu'à 1 000 mg/kg-mc par jour ou d'AMA allant jusqu'à 1 920 mg/kg-mc par jour, même si le thymus s'était résorbé et si l'on a remarqué une amélioration ou une modulation de la réaction immunitaire dans quelques études (House *et al.*, 1985; Kayama *et al.*, 1991; Riddle *et al.*, 1992, 1996; Smialowicz *et al.*, 1992b, 1994). Les résultats des essais sur les rats qui avaient reçu des inhibiteurs d'enzyme indiquent que le composé-mère n'est pas immunotoxique en soi, mais que ses métabolites, soit l'aldéhyde et l'acide (MALD et AMA), inhibent le système immunitaire (Smialowicz *et al.*, 1991a,b, 1993).

2.2.2.8. Neurotoxicité :

L'EGME induit des effets neurotoxiques après inhalation d'une dose aiguë ou inhalation à court terme. Ces effets comprennent l'inhibition de la réaction d'évitement après

conditionnement, une prolongation du sommeil induit par les barbituriques ou une paralysie partielle des membres inférieurs à une concentration de 125 ppm (389 mg/m³) ou plus, ainsi qu'une activité enzymatique accrue ou anormale dans l'encéphale, à une concentration de 50 ppm (156 mg/m³) ou plus (Goldberg *et al.*, 1962; Savolainen, 1980). Par ailleurs, l'exposition répétée de rates gravides à une dose de 25 ppm (78 mg/m³) modifie la réaction d'évitement conditionné et engendre des altérations neurochimiques chez la progéniture (Nelson *et al.*, 1984b).

2.2.7. Toxicité chez l'homme:

2.2.7.1. Études cliniques :

La seule étude clinique répertoriée (elle avait essentiellement pour but d'établir la toxicocinétique de l'EGME chez l'être humain) ne signalait aucune modification de la fréquence de ventilation pulmonaire ni du rythme cardiaque chez les sept volontaires de sexe masculin exposés à 5 ppm (16 mg/m³) de l'EGME pendant 4 heures (Groeseneken *et al.*, 1989).

2.2.7.2. Études épidémiologiques :

Plusieurs études épidémiologiques ont tenté d'établir s'il existe un lien entre les éthers glycoliques ou les procédés industriels faisant appel à ces produits et divers paramètres sanitaires (effets sur les systèmes sanguin, immunitaire, nerveux ou reproducteur et sur le développement notamment, ainsi que leucémie myéloïde aiguë).

Ces études n'ont cependant produit aucune preuve permettant de conclure que l'exposition à l'EGME pendant le travail induit des effets nocifs sur la santé humaine, les populations examinées ayant toutes été exposées à d'autres solvants. Les données restreintes issues de plusieurs enquêtes transversales suggèrent néanmoins qu'il pourrait y avoir une relation de cause à effet entre des anomalies hématologiques ainsi que des réactions des systèmes immunitaire et nerveux et l'exposition à l'EGME et à d'autres substances, par inhalation et par contact avec la peau.

Ainsi, des travailleurs qui avaient été exposés à l'EGME en traitant des cols dans une entreprise qui confectionne des chemises (25–76 ppm ou 78–236 mg/m³; Greenburg *et al.*, 1938), en posant de la peinture dans un chantier naval (jusqu'à 5,7 ppm ou 17,7 mg/m³; Welch et Cullen, 1988) ou en installant de la parqueterie (jusqu'à 48 ppm ou 149 mg/m³; Denkhaus *et al.*, 1986), voire en fabriquant et en emballant le composé (jusqu'à 20 ppm ou 62

mg/m³; Cook *et al.*, 1982), présentaient des modifications au niveau de divers paramètres du sang (y compris numération des érythrocytes, des leucocytes [granulocytes et leucocytes polymorphonucléaires surtout] ou des plaquettes et concentration d'hémoglobine). Enfin, la distribution des sous-groupes de lymphocytes variait sensiblement entre les travailleurs qui avaient posé de la parqueterie et les témoins (Denkhaus *et al.*, 1986). Une étude transversale a également révélé une diminution de la spermatogenèse chez peintres de chantier naval exposés au 2-méthoxyéthanol et au 2-éthoxyéthanol (Welch *et al.*, 1988), tandis que 40 hommes fabriquant ou emballant de l'EGME éprouvaient de la difficulté à concevoir, comparativement à 25 travailleurs non exposés, même si le nombre de spermatozoïdes et la concentration d'hormones ne différaient pas de façon significative entre de petits sous-groupes de ces employés (Cook *et al.*, 1982). Par ailleurs, le manque de données sur le degré d'exposition ne permet pas d'établir le rôle spécifique d'EGME sur le système de reproduction de la femme, bien que les résultats d'une étude de cohorte historique sur 891 femmes indiquent une augmentation du nombre d'avortements spontanés chez les employées du service de fabrication dans 14 usines de semi-conducteurs, comparativement à celles affectées à un autre travail, surtout lorsque ces personnes étaient exposées aux éthers glycoliques. La partie prospective de l'étude, qui portait sur 481 femmes, révèle une fois de plus un lien significatif entre les avortements spontanés et l'exposition aux éthers glycoliques et une diminution non significative de la fécondabilité (Beaumont *et al.*, 1995; Schenker *et al.*, 1995; Swan *et al.*, 1995; Schenker, 1996; Swan et Forest, 1996).

Chapitre II

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

1. Matériels :

1.1. Matériel biologique :

Les animaux qui ont servi à cette étude sont composés de 30 lapins mâles (*Oryctolagus Cuniculus*), sexuellement matures âgées de 06 mois, poids corporel moyen 1700 ± 120 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche.

1.2. Matériel chimique :

Le solvant utilisé dans cette expérimentation est l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) qui fait partie de la catégorie «E» des éthers de glycol ou la catégorie des dérivés de l'éthylène glycol.

L'EGME (l'éthylène glycol monométhyl éther) est principalement utilisé comme solvant pour la fabrication de peintures, vernis, encres, colorants. Il est également utilisé comme antigel pour les carburants de l'aviation et comme produit de nettoyage et de dégraissage.

La substance est classée selon les données de l'INRS:

T : Toxique

R60 : Peut altérer la fertilité.

R61 : Risques pendant la grossesse d'effets néfastes chez l'enfant.

R20/21/22 : Nocif par inhalation, par contact avec la peau et en cas d'ingestion.

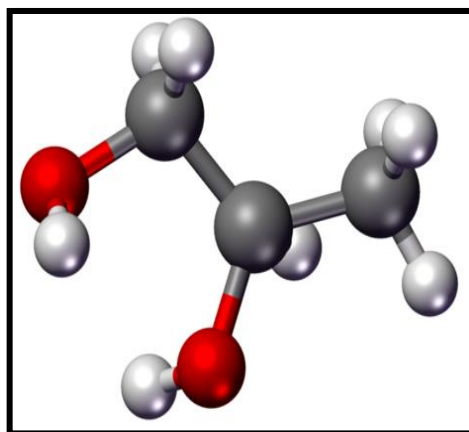


Figure 2 : Formule de l'EGME en 3D (Welsch, 2005).

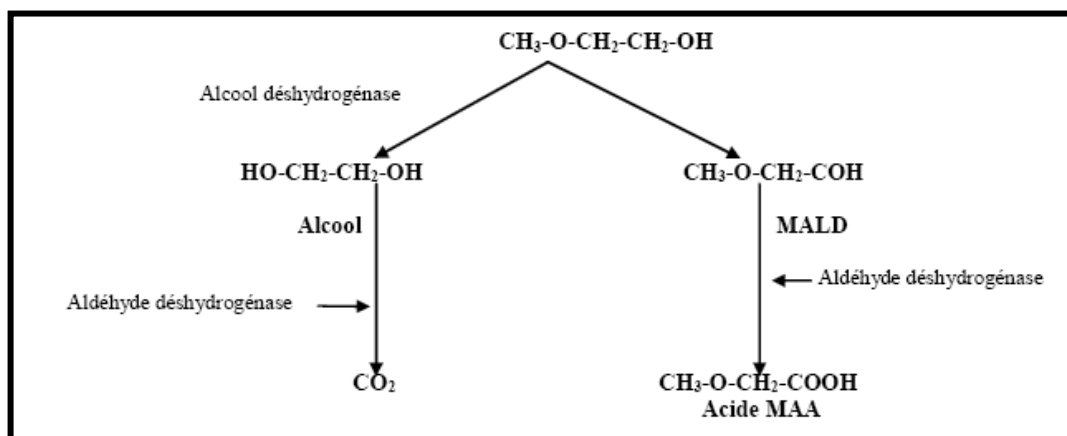


Figure 3: Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono méthyl (EGME) (Paul et al., 1986; Lemazurier et al., 2003).

1.3. Conditions d'élevages :

Ces lapins ont été regroupés à raison de 3 ou 4 lapins/cage dans des cages spécifiques de (50x60x53 cm), grillagée, munies par des abreuvoirs d'eau. Les cages sont nettoyées régulièrement et tapissées avec une litière qui est changée chaque jour.

Les lapins ont été soumis à une période d'adaptation d'une semaine environ. A une température de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ et une photopériode naturelle.

Les lapins sont nourris quotidiennement, l'alimentation est composée de légumes et d'aliment sec constitué de maïs et de l'orge.

2. Méthodologie :

2.1. Protocole expérimental :

Une cohorte de trente lapins a été répartie en trois groupes égaux de 10 lapins chacun à raison de 3 ou 4 lapins/cage. Les animaux témoins et traités sont pesés chaque début et fin de semaine, durant la période de traitement.

L'EGME est préparé dans le sérum physiologique et administré quotidiennement par voie cutanée (injection). Les traitements ont été effectués comme suite :

- ✚ **Groupe 1 :** lapins témoin (T) qui ne reçoit rien durant la période du traitement.

✚ **Groupe 2** : lapins traités avec l'EGME à raison de 200 ppm (DI) quotidiennement par voie cutanée (injection) une fois par jour (1ml) en moyenne 6 jours/semaine et pendant 4 semaines.

✚ **Groupe 3** : des lapins traités avec l'EGME à raison de 300 ppm (DII) quotidiennement par voie cutanée (injection) une fois par jour (1ml) en moyenne 6 jours/semaine et pendant 4 semaines. (Tableau 2).

Tableau 2: Répartition des groupes et traitement des animaux.

Groupes	Témoins	Groupe DI	Groupe DII
Doses	n=10	n=10 (200 ppm)	n=10 (300 ppm)

2.2. Préparation des prélèvements :

Le sacrifice des animaux a été effectué dans la matinée.

➤ Prélèvement du sperme :

Le prélèvement du sperme ce fait a partir de l'épididyme après dissection à l'aide d'une lame.

➤ Prélèvement sanguin :

Les prélèvements sanguins ont été faits après décapitation rapide, le sang a été recueilli, sur des tubes :

✓ EDTA, pour le dosage des paramètres hématologiques (nombres des globules blancs et rouges, hématocrite, hémoglobine, les constantes hématologiques (VGM, CCMH, TGMH)).

✓ Sec, sans anticoagulant qui subit une centrifugation de 3000 tours/ minute, pendant 10 minutes, le sérum obtenu est séparé en trois fractions dans des tubes Ependorf, puis mis au- 20°C jusqu'au moment du dosage biochimique et hormonales.

➤ Prélèvements des organes :

Après la dissection des animaux, les testicules, l'épididyme et le foie sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution chlorure de sodium à 0.9%, puis pesés.

-Un fragment des testicules, de l'épididyme et du foie de chaque animale sont conservés dans une solution de Bouin alcoolique pour l'étude histologique.

- Le 2^{ème} fragment des testicules, de l'épididyme et du foie est maintenue à (-20°C) pour le dosage de glutathion.

2.3. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine :

Après décapitation et dissection d l'animal : nous prélevons les testicules puis l'épididyme : dès que le corps est coupé, on remarque la sortie d'un liquide blanc, il s'agit du sperme qui a été utilisée pour l'étude des paramètres de la reproduction (concentration, vitesse, mobilité et la vitalité).dans ce cadre, on met une goutte (1ul) du sperme et l'ajoutée dans 49µl d'eau physiologique Na cl 0.9%.

✓ **Concentration des spermatozoïdes (nombre total) :** La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant une cellule de Malassez.

- Après mélange de l'échantillon dilué ; une goutte est introduit dans la cellule de Malassez puis recouverte par une lamelle.
- Cette étude repose sur le comptage des spermatozoïdes dans 05 carrés au grossissement 40 (OMS ; 1993)
- La concentration des spermatozoïdes est calculée par la méthode suivante :

$$\text{Concentration (Spz } 10^6/\text{ml)} = \frac{(D \times V \times n)}{N}$$

- **D** : coefficient de dilution (50)
 - **V** : volume de la cellule de Malassez.
 - **n** : nombre de spermatozoïdes calculé dans 5 champs.
 - **N** : nombre de petits carrés de la lame.
- ✓ **La vitesse des spermatozoïdes :** une goutte du sperme diluée et déposée sur la lame de Nagoatte à l'aide d'une micro pipette puis recouvert par une lamelle.et examinée sous microscope par le grossissement 40.

La vitesse des spermatozoïdes est évaluée par le temps (en seconde) nécessaire pour traverser une distance de 0,05mm entre 2 lignes parallèles par 10 spermatozoïdes à l'aide d'un chronomètre (OMS ; 1993).

Puis calculer la vitesse en appliquant la formule suivant :

$$\text{vitesses (mm/s)} = \frac{\text{Distance (mm)}}{\text{Temps (s)}}$$

- ✚ On calcule la vitesse de 10 spermatozoïdes ; puis on calcule la vitesse moyenne

✓ **Mobilité des spermatozoïdes:** Une goutte de sperme est mise entre lame normale et lamelle puis examinée sous microscope optique par l'agrandissement 40.

La mobilité des spermatozoïdes est déterminée par la numération des spermatozoïdes mobiles et immobiles dans 3 champs d'observation, puis calculer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles. (OMS ; 1993).

✓ **la vitalité des spermatozoïdes :**

➤ **coloration vitale :**

Cette étude est une technique de coloration basée sur le principe que les cellules mortes ayant des membranes plasmique lésées laissent certaines colorant de pénétrer. Réactif utilisé : Eosine à 1%.

Une goutte de sperme est mise entre lame normale et lamelle en ajoutant une goutte d'éosine (1%).on laisse 2 à 3 min. Puis on examine sous microscope par le grossissement 40.

La Vitalité est déterminée par la numération des spermatozoïdes colorés et incolores dans 3 champs d'observation, puis on calcule le pourcentage de chaque catégorie (spermatozoïdes colorés et incolores). (OMS ; 1993)

➤ **Test de gonflement hypo osmotique :**

Ce test est réalisé pour étudier les modifications morphologiques des spermatozoïdes exposées à un stress hypo osmotique.

1. Solution utilisée :

- Dissoudre 0.367g de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 0.675g de fructose dans 50ml d'eau distillée

Méthode : Réchauffé à 37 °C pendant 5 minutes environ 1ml de la solution placé dans un tube Eppendorf fermé, ajouter 0.1ml de sperme liquide et mélanger doucement à l'aide d'une pipette. Ensuite laisser incuber à 37 °C pendant 30 minutes.

On observe les spermatozoïdes sous microscope à un grossissement 40. Enfin on calcule le pourcentage des spermatozoïdes présentant des modifications du flagelle (vivants) sur un total de spermatozoïdes comptés (OMS ; 1993 ; Jeyendran *et al* ; 1984)

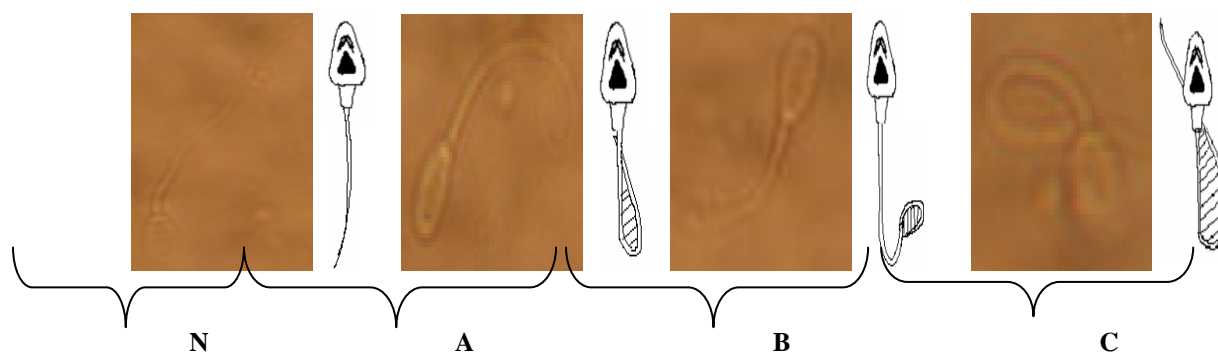


Figure 5 : Modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposées à un stress hypo osmotique.

N : normale (morts).

A : modification faible du flagelle.

B : modification importante au niveau du flagelle.

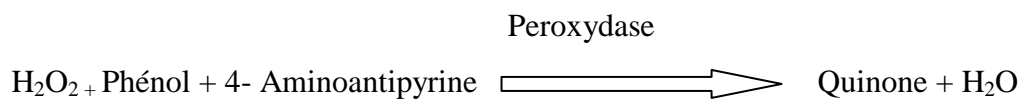
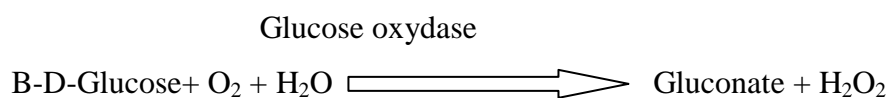
C : modification importante au niveau du flagelle et de la pièce intermédiaire.

2.4. Dosage des paramètres biochimiques :

2.4.1. Dosage du glucose : (Kaplan, 1984). Selon la fiche technique Spinreact.

▪ Principe :

Le glucose subit des réactions couplées décrites ci-dessous pour donner un complexe coloré, qui peut être mesuré à la spectrométrie.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

▪ Echantillon : Sérum

▪ **Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
R ₁ Tampon	Tris pH 7.4 Phénol	92 m mol/l 0.3 m mol/l
R ₂ enzymes	Glucose oxydase (GOD) Peroxydase (POD) 4- Aminophenazone (4-AP)	15000 U/l 1000 U/l 2.6 m mol/l
Glucose cal	Etalon du glucose aqueux primaire	100 mg/dl

▪ **Préparation des réactifs de travail (RT) :**

- Dissoudre le contenu de R₂ dans la fiole de R₁.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 4 mois à 2-8, ou 40 jours à 15-25 C°.

▪ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon n
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	...	1.0	...
Echantillon n (µl)	1.0

- Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37C°.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 500 nm et de l'étalon contre le blanc. La couleur est stable après 30 min.

- **Calcul :** la concentration du glucose dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{(A)échantillon}}{\text{(A)étalon}} \times 100$$

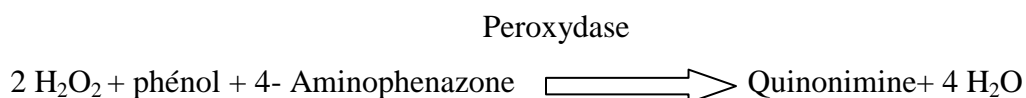
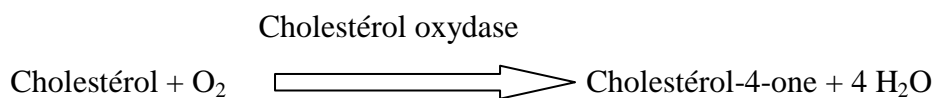
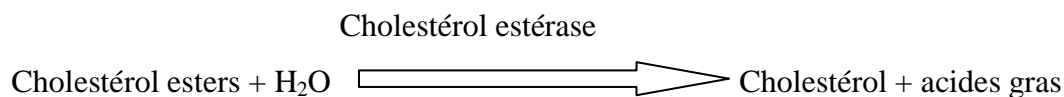
La concentration de l'étalon = 100 mg/dl

Facteur de conversion = mg/dl x 0.055 = m mol/l

2.4.2. Dosage du cholestérol : (Naito, 1984). Selon la fiche technique **Spinreact**

- **Principe :**

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

- **Echantillon :** Sérum

▪ **Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
R ₁ Tampon	PIPES pH 6.9 Phénol	90 m mol/l 26 m mol/l
R ₂ enzymes	Cholestérol estérase (CHE) Cholestérol oxydase (CHOD) Peroxydase (POD) 4- Aminophenazone (4-AP)	300 U/l 300 U/l 1250 m mol/l 0.4 m mol/l
Cholestérol cal	Etalon du Cholestérol aqueux primaire	200 mg/dl

▪ **Préparation des réactifs du travail :**

- Dissoudre le contenu de R₂ dans la fiole de R₁.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 1 mois à 2-8 C° à l'abri de la lumière.

▪ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillo n
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	...	1.0	...
Echantillo n (µl)	1.0

- Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min à la température de 25C°.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc. La couleur est stable après 60 min.

$$\text{Concentration du cholestérol (mg/dl)} = \frac{(\text{A})\text{échantillon}}{(\text{A}) \text{étalon}} \times 200$$

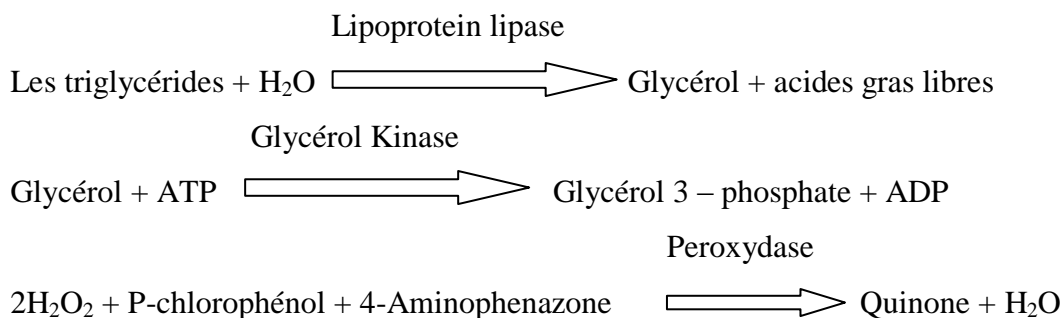
La concentration de l'étalon = 200 mg/dl

Facteur de conversion = mg/dl x 0.025 = m mol/l

2.4.3. Dosage des triglycérides : (Kaplan *et al.*, 1984). Selon la fiche technique **Spinreact**

▪ **Principe :**

Les triglycérides présents dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

▪ **Echantillon :** Sérum

▪ **Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
R ₁ Tampon	GOOD pH 7.5 P- chlorophénol	50 m mol/l 2 m mol/l
R ₂ enzymes	Lipoprotein lipase Glycérol kinase Glycérol 3- phosphate Peroxydase (POD) 4- Amin antipyrine (4-AP) ATP	150000 U/l 500 U/l 2500 m mol/l 440 U/l 0.1m mol/l 0.1 m mol/l
Triglycérides cal	Etalon de triglycérides aqueux primaire	200 mg/dl

▪ **Préparation des réactifs du travail :**

- Dissoudre le contenu de R₂ dans la fiole de R₁.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 6 semaines C° ou une semaine à 15-25 °C.

▪ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon n
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	...	1.0	...
Echantillon n (µl)	1.0

- Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min à la température de 25C°.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc. La couleur est stable après 30 min.

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ étalon}} \times 200$$

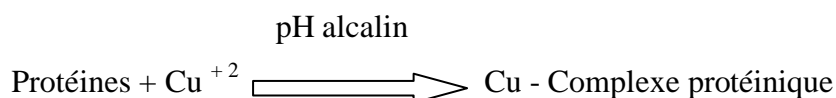
La concentration de l'étalon = 200 mg/dl

Facteur de conversion = mg/dl x 0.011 = m mol/l

2.4.4. Dosage des protéines totales : (Burtis *et al.*, 1999). Selon la fiche technique **Spinreact**

▪ **Principe :**

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu. L'intensité de couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon.



▪ **Echantillon :** Sérum

▪ **Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif de Biuret	Sodium potassium tartrate	15 m mol/l
	Sodium iodique	100 m mol/l
	Potassium iodique	5 m mol/l
	Cuivre de sulfate	19 m mol/l
Réactif étalon	Sérum Bovine albumine	7 g/dl

▪ **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillo n
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	...	25	...
Echantillo n (µl)	25

- Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min à la température de 25C°.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 540 nm et de l'étalon contre le blanc. La couleur est stable après 30 min.

$$\text{Concentration des protéines (g/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ étalon}} \times 7$$

2.4.5. Dosage de la glutathion (GSH): (Weckbecker et Cory, 1988)

▪ **Principe du dosage :**

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman) par les regroupements

(-SH) du glutathion. On procède ensuite à la déprotéinisation de l'homogénat (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) tout en conservant les groupements -SH spécifique du glutathion.

Préparation de l'homogénat

- Mettre 150 mg du foie, des testicules et de l'épididyme individuellement en présence de 8 ml d'une solution d'EDTA (Acide Ethylène diamine tétra acétique) à 0.02 M.
- Broyer le mélange aux ultrasons (Sounifer B30) pendant 35secondes à une température de 4C°.
- **Mode opératoire**
 - ✓ Prélever 0.8ml de l'homogénat.
 - ✓ Ajouter 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique à 0.25% (SSA).
 - ✓ Mélanger, laisser dans un bain de glace pendant 15min.
 - ✓ Centrifugé pendant 5min à 1000 tours/min. Le surnageant récolté est utilisé pour doser la GSH par les étapes suivantes.
 - ✓ Prélever 0.5ml du surnageant
 - ✓ Ajouter 1ml du tampon Tris Hcl à 0.4 M et 0.025 ml de DTNB (5,5' -dithio-bis-2-nitrobenzoïque) à 0.01M (dissous dans le méthanol absolu 99%).
 - ✓ Laisser pendant 5 min dans la température ambiante par la stabilisation de la couleur.la réaction colorimétrique se développe instantanément.
 - ✓ Mesurer l'absorbance optique à 412 nm, contre le blanc qui correspond à l'eau distillé à la place de l'homogénat.

Les résultats obtenus sont utilisés pour le calcul de la concentration du GSH, selon la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg prt}} = \text{m mol GSH / mg de protéines}$$

DO : Densité optique.

1: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 homogénat + 0.2 ml SSA).

1.525 : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5ml surnageant + 1 ml Tirs EDTA + 0.025ML DTNB 0.01M dissous dans le méthanol absolu).

13100 : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412nm).

0.8 : le volume de l'homogénat trouvé dans 1ml.

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.

2.4.6. Dosage des protéines hépatiques : (Bradford, 1976).

▪ **Principe :**

Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol aussi que le bleu de Coomassie (BBC) , ce réactif

réagit avec le groupement ($-NH_2$) des protéines. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines.

▪ **Mode opératoire :**

➤ Prélever 0.1 ml de l'homogénat et ajouter 5 ml du réactif coloré (BBC).

➤ Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.

➤ Mesurer l'absorbance optique à 595 nm, contre le blanc contenant l'eau distillé à la place de l'homogénat.

La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0....1mg/ml de sérum albumine bovin).

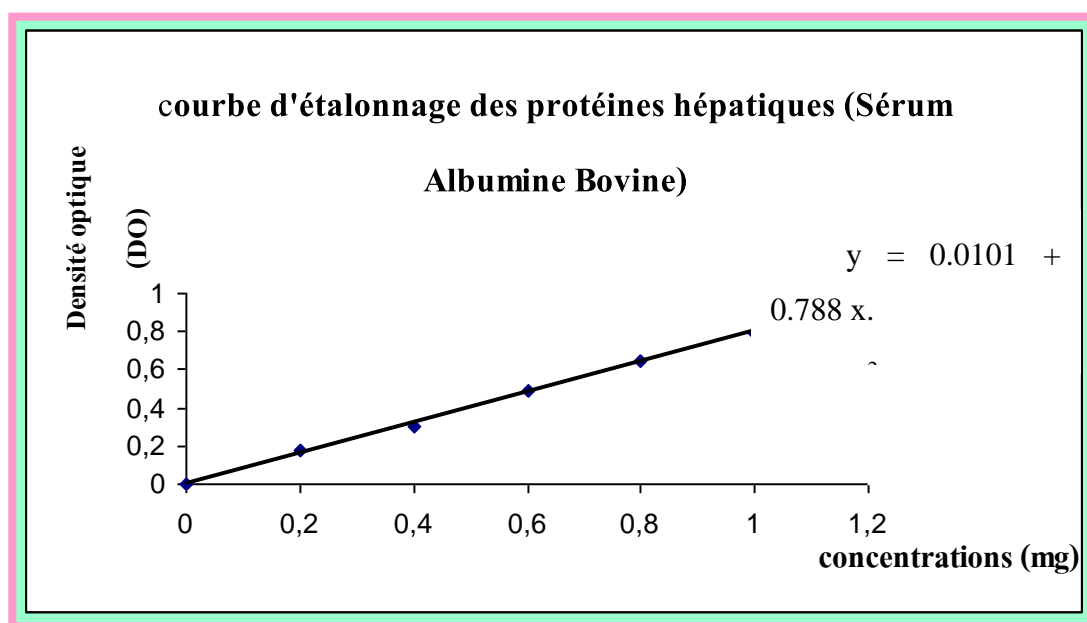


Figure 6 : courbe d'étalonnage des protéines hépatiques.

2.5. Evaluation de la toxicité hématologique :

La toxicologie hématologique à été mise en évidence à travers la détermination de la formule numérique (FNS) à l'aide d'un Coulter automatique (RUBIS) : c'est un analyseur sanguin automatisé pour échantillons de sang entier.

Le Coulter aspire un volume de 32ul du sang et les résultats sont donnés sur une fiche technique. Les paramètres mesurés selon le principe de Coulter sont ou nombres de 18 parmi eux : Les globules blancs et rouges, l'hémoglobine, l'hématocrite, le volume globulaire moyen en hémoglobine (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

- **Principe :** utilisé pour le comptage des cellules sanguines par le RUBIS et celui de la variation d'impédance (principe COULTER). Ce procédé permet la transformation du volume des particules en signal électrique. Les cellules sanguines mises en suspension dans une solution isotonique sont aspirées dans un orifice microscopique au travers duquel on a établi courant électrique d'intensité constante. Ce courant est fourni par l'électrode de platine à l'antérieur de la chambre de comptage. Cette variation de la différence de potentiel entre les deux électrodes, proportionnelle au volume de la cellule traversant l'orifice microscopique ; mesurées triées et numérisées en fonction de leurs volume et de leurs temps de passage.

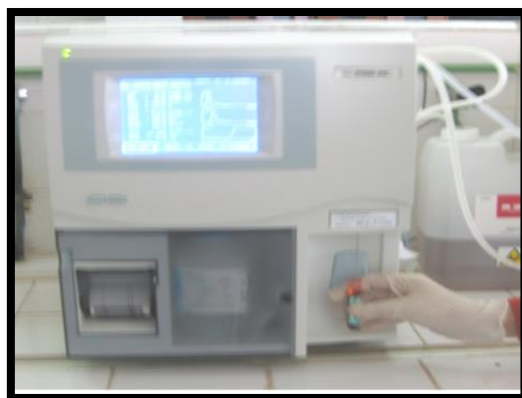


Figure 7 : hémogramme RUBIS.

2.6. Etude histologique :

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Ibn Roched d' Annaba, Service d'anatomie et histologie. Les préparations des coupes histologiques ont été effectuées selon la méthode de Martoja et Martoja (1967), elle comporte plusieurs étapes :

1. Fixation :

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique, elle à pour but d'immobiliser les structures en respectant leurs morphologies et en les conservant.

La fixation doit être réalisée le plus tôt et le plus rapidement possible. Se rappeler que plus un échantillon est petit, plus la pénétration des différents milieux se fera facilement. On à réaliser des prélèvements avec surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 2mm.

Dans notre étude, nous avons utilisé le liquide de Bouin (26ml formol, 7ml d'acide acétique, 45 ml acide picrique de 95%) fixateur couramment utilisé. L'utilisation de ce fixateur a pour avantage de durcir l'échantillon étudié sans le contracter et de ce fait sans l'abimer. Il est déconseillé par Martoja et Martoja (1967) de laisser séjourner les pièces plus de 48h dans ce fixateur.

2. Déshydratation :

La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine.

Une fois le fixateur éliminé par un rinçage à l'eau distillé, on passe à la déshydratation dans un automate qui immerge successivement les pièces dans :

- ✚ 07 bacs d'éthanol de concentration croissante (70%, 90%, 95%, 100%).
- ✚ 03 bacs de xylène.
- ✚ 02 bacs de paraffine chauffée à 70 C°.

On place à l'étuve et on laisse s'évaporer le xylène progressivement ; la durée de la déshydratation est de 17 heures.

3. Inclusion :

Elle ne fera de façon satisfaisante qui est la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont immergées dans de la paraffine qui à été fondue dans une étuve pendant 8 heures (étape de l'enrobage).

4. Réalisation des blocs :

Les pièces induites de paraffine sont passées à l'intérieur des moules qui sont ensuite remplis de paraffine qui en se solidifiant va permettre sa coupe.

Les blocs ainsi constitués sont orientés et étiquetés. Les blocs refroidissent ensuite pendant 15 à 20 minutes puis immergés dans de l'eau froide afin d'homogénéiser le refroidissement.

5. Confection des coupes :

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir la coupe au microtome (GTU « tissu-tek »), ayant généralement une épaisseur de 4 à 5 μ . Ces coupes sont ensuite collées sur des lames préalablement recouvertes de gélatine, ces lames sont placées sur une plaque chauffante afin de déplisser le ruban. Après refroidissement, on procède à la coloration.

6. Coloration :

Il existe plusieurs techniques de coloration qui varient en fonction des tissus. La méthode à l'hématéine et à l'éosine (H et E) est la plus utilisée, cette technique nécessite la présence des solutions suivantes :

- Alcool acide : - alcool éthylique à 70% : 100 ml
- Acide chlorhydrique concentré H Cl : 50 ml
- Eau ammoniacale : - eau distillé : 100 ml
- ammoniacale : 2 ml
- Solution d'éosine : - éosine, solution aqueuse à 3% : 10 ml
- alcool éthylique à 95% : 125 ml
- eau distillé : 375 ml – Acide acétique glacial : 2 gouttes

La coloration suit les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillé.
- Emmarger dans un bain d'hématéine de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée la structure basophile (noyaux). puis laver les coupes à l'eau du robinet.
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) : déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation.
- Bleuir dans l'eau ammoniacale et laver à l'eau du robinet (15 minutes).
- Emmarger dans un bain d'éosine (15 sec à 2 minutes) ; l'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de rose plus vif. Selon l'intensité de l'acidophile des divers éléments.
- Déshydrater sur une lame, éclaircir, monter les lames à l'Eukitt.

Enfin on passe à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.



Figure 8 : Fragment d'organe dans des boîtes contenant du Bouin alcoolique.

2.7. Etude hormonal :

Selon la fiche technique **Testosterone ELISA (RE52151)**.

▪ Principe :

Le test immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA) est basé sur le principe de compétition. La quantité inconnue d'antigènes présents dans l'échantillon et une quantité fixe d'antigènes conjugués à une enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps coâtés dans les puits. Après incubation, les puits sont lavés pour arrêter la réaction de compétition. L'intensité de la couleur développée suivant la réaction substrat est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. Les résultats des échantillons peuvent être déterminés directement à partir de la courbe étalon.

- **Echantillon** : Sérum
- **Réactifs utilisés** :

Les réactifs	Composition	Concentration
MTP	Microplaque Barrettes sécables. Recouvert de anticorps de souris anti-testostérone (monoclonal).	1 x 12 x 8
ENZCONJ	Conjugué Enzymatique Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone conjuguée à HRP, stabilisateurs.	1 x 25 mL
CAL A - G	Étalon A-G 0; 0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 6.0; 16 ng/mL Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone, Sérum humain, stabilisateurs.	1 x 7 x 1 mL

CONTROL 1 + 2	Contrôle 1 + 2 Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone, Sérum humain, stabilisateurs.	2 x 1 mL
TMB SUBS	Solution Substrat TMB Prêt(e) à l'emploi. Contient: TMB, Tampon stabilisateurs.	1 x 12 mL
TMB STOP	Solution d'Arrêt TMB Prêt(e) à l'emploi. 1 M H ₂ SO ₄ .	1 x 12 mL
WASHBUF CONC	Tampon de Lavage Concentré (10x)	1 x 100 mL
FOII	Feuille adhésive	2 x

Préparation de réactif de travail (RT) :

- Diluer / dissoudre 100 mL de Composant (**WASHBUF**) avec 900 mL Diluant (eau bidist).
- Mélanger vigoureusement. Ce réactif de travail est stable 8 semaine à 2 -8 °C.

▪ **Mode opératoire :**

1. Pipeter 25 µL de chaque Etalon, Contrôle et échantillon dans les puits respectifs de la Microplaque.
2. Pipeter 200 µL de Conjugué Enzymatique dans chaque puits.
3. Couvrir la plaque avec une feuille adhésive. Bien mélanger pendant 10 secondes.
4. Incuber 60 min à TA (18-25°C).
5. Retirer la feuille adhésive. Jeter la solution d'incubation. Laver la plaque 3 x avec 300 µL de Tampon de Lavage dilué. Egoutter l'excès de solution en frappant la plaque retournée sur du papier absorbant.
6. Pipeter 100 µL de Solution Substrat TMB dans chaque puits.
7. Incuber 15 min à TA (18-25°C).
8. Arrêter la réaction substrat en ajoutant 100 µL de Solution d'Arrêt TMB dans chaque puits. Mélanger rapidement le contenu en agitant la plaque. La couleur vire du bleu au jaune.
9. Mesurer la densité optique avec un photomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence: 600-650 nm) dans les 10 min suivant l'ajout de la Solution d'Arrêt.

▪ **Calcule :**

Les densités optiques (DO) des étalons (axe y, linéaire) sont reportées en fonction de leurs concentrations (axe x, logarithmique) soit sur papier graphique semi-logarithmique soit en utilisant une méthode automatisée. Une bonne analyse est obtenue avec les méthodes cubic spline, Logistics 4 Paramètres ou Logit-Log.

Pour le calcul de la courbe étalon, appliquer chaque signal des étalons (une valeur apparemment fautive d'un double dosage peut ne pas être prise en compte et peut être remplacée par une valeur plus plausible).

La concentration des échantillons peut être lue à partir de la courbe étalon.

Les échantillons montrant une concentration supérieure à celle de l'étalon le plus concentré doivent être dilués de la façon décrite dans les PREPARATIONS PREALABLES AU TEST et testés de nouveau.

Les résultats des échantillons ayant été prédilués doivent être multipliés par le facteur de dilution appliqué.

Conversion:

$$\text{Testostérone (ng/mL)} \times 3.47 = \text{nmol/L}$$

2.8. Traitement statistique des résultats :

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins (Moy \pm SEM) l'écart type moyen, les moyennes ont été comparées par un test t de Student.

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 15).

Les différences sont considérées comme :

- significatives lorsque ($P \leq 0,05$).
- hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).
- très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$). Avec P : Seuil de signification.



Chapitre III

Résultats

III. Résultats

1. Etude pondérale :

1.1. Variation du poids corporel :

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) du poids corporel et une augmentation très hautement significative de perte du poids corporel chez les lots traités par l'EGME par rapport au groupe témoin (tab. 03, fig. 09).

Tableau 03 : Variation de perte du poids corporel chez le lot témoin (T) et les lots traités à l'EGME DI /DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Poids corporel initial (g)	1534 ± 171.84	1590,28± 180.46	1878± 100.85
Poids corporel final (g)	1528,4± 172.30	1406 ± 141.88***	1653,8 ± 86.73***
Perte du poids corporel (g)	5.6 ± 0.89	184,28 ± 0.94***	224,2 ± 2.17***

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

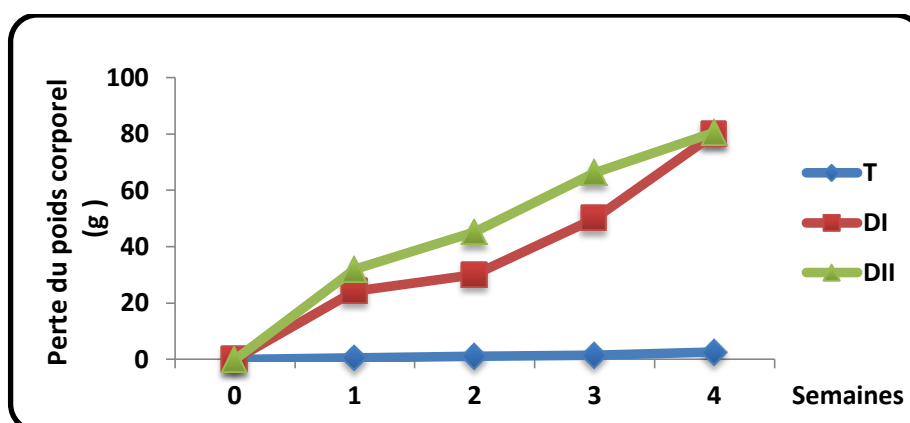


Figure 09 : Variation en fonction du temps (semaines), de perte du poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).

1.2. Etat pondéral des organes :

Nous avons suivi l'évolution des poids absolus (PA) et relatifs (PR) des organes suivants : le foie, les testicules et l'épididyme chez les lapins témoins et les lapins recevant de l'EGME.

1.2.1. Le Foie :

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) poids absolus du foie chez les groupes traités (tab.4 ; fig.10), et qu'il ya aussi une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) du poids relatif de foie chez les groupes traités par l'EGME comparant au groupe témoin (tab.4 ; fig. 11).

Tableau 04 : Variation de poids absolus et relatif de foie chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).

Organe		Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Foie	PA (g)	43.79 ± 5.19	51.98 ± 4.97 **	59.39 ± 3.95 **
	PR (%)	2.86 ± 0.21	3.17 ± 0.23 **	3.29 ± 0.43 **

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

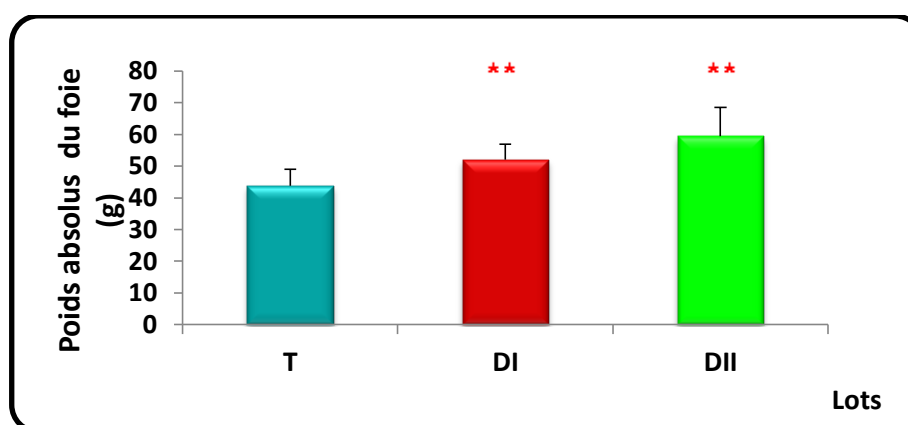


Figure 10 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) du foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).

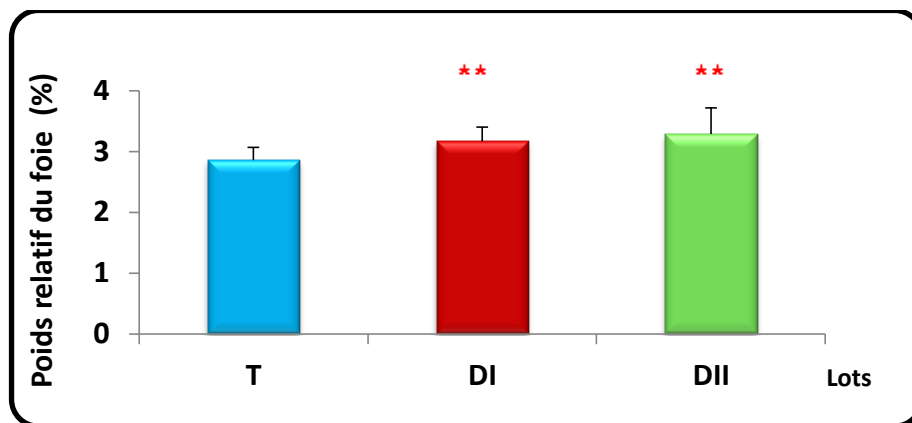


Figure 11: Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids relatif (PR) du foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII ($n=10$).

1.2.2. Testicules :

On note une diminution non significative (NS) du poids absolu du groupe DI comparant au témoin et une diminution significative ($P \leq 0,05$) du poids absolu des testicules du groupe DII recevant 300 ppm de l'EGME (tab.5 ; fig.12).

On note aussi une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) du poids relatif des testicules chez le lot DI recevant 200 ppm d'EGME comparants au groupe témoin, ainsi qu'une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez le lot DII recevant 300 ppm d'EGME comparativement aux témoins (tab.5 ; fig.13).

Tableau 05 : Variation du poids absolu et relatif du testicule chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).				
Organe		Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Testicule	PA (g)	3.12 ± 0.25	2.35 ± 0.098	1.72 ± 0.081 *
	PR (%)	0.20 ± 0.027	0.15 ± 0.01 **	0.09 ± 0.005 ***

* : Différence significative par rapport au témoin ($p < 0.05$).

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

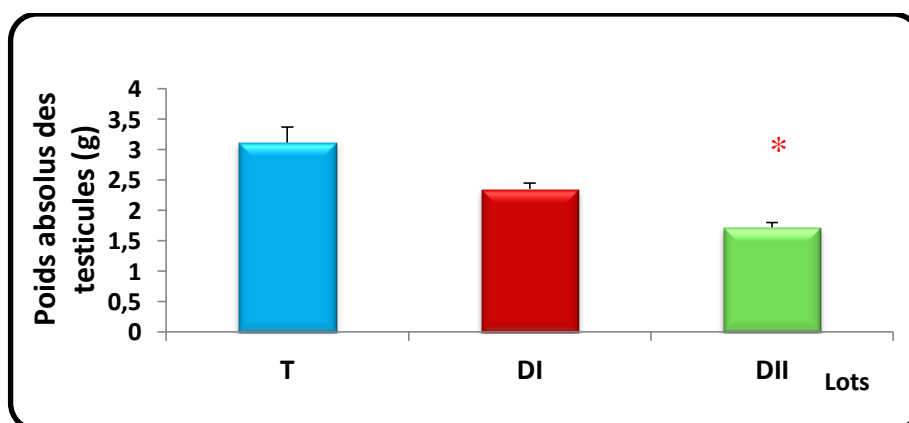


Figure 12 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) des testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).

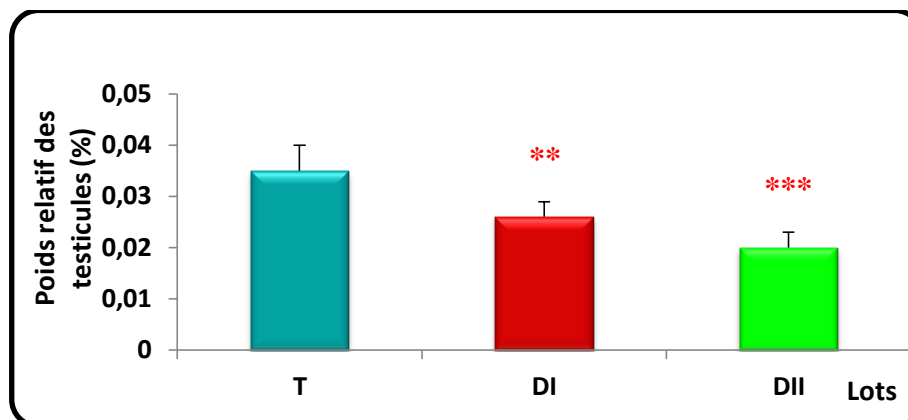


Figure 13: Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids relatif (**PR**) des testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII ($n=10$).

1.2.3. Epididyme :

Les résultats illustrent une diminution non significative du poids absolu de l'épididyme chez les groupes traités à l'EGME (tab.6 ; fig.14).

Nos résultats montrent qu'il y a une différence significative ($P \leq 0,05$) du poids relatif de l'épididyme chez le groupe traité par l'EGME à raison de 200 ppm comparant au groupe témoin. Et qu'il y a eu une diminution hautement significatives ($P \leq 0.01$) du poids relatif d'épididyme chez le lot traité par l'EGME à raison de 300 ppm comparant aux lapins témoins (tab.6 ; fig.15).

Tableau 06 : Variation du poids absolu et relatif de l'épididyme chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).

Organe		Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Epididyme	PA (g)	0.53 ± 0.021	0.42 ± 0.061	0.38 ± 0.042
	PR (%)	0.035 ± 0.005	0.026±0.003 *	0.020 ± 0.003 **

* : Différence significative par rapport au témoin ($p < 0.05$).

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

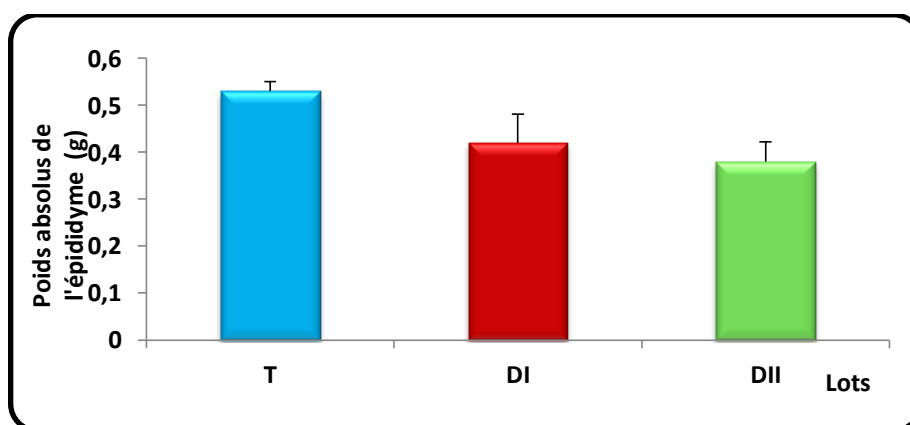
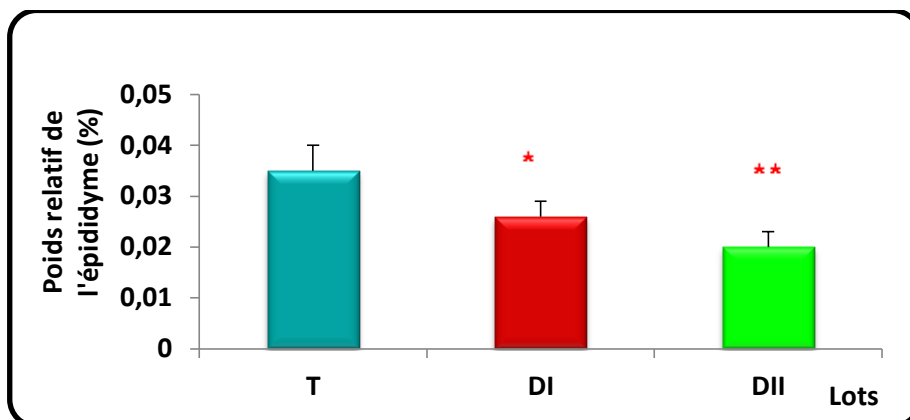


Figure 14 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) de l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (n= 10).



*Figure 15: Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids relatif (**PR**) de l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII ($n=10$).*

2. Etude de la reproduction :

2.1. Concentration :

Une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) de la concentration des spermatozoïdes du lot DI et une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) de la concentration des spermatozoïdes chez le lot DII traités à l'EGME comparés au témoin ont été observées. (Tab.7 Fig.16).

Tableau 07 : Variation du taux de concentration des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Concentration (Nombre $10^6/ml$)	437.64 ± 38.91	353 ± 29.01 **	149 ± 13.53 ***

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

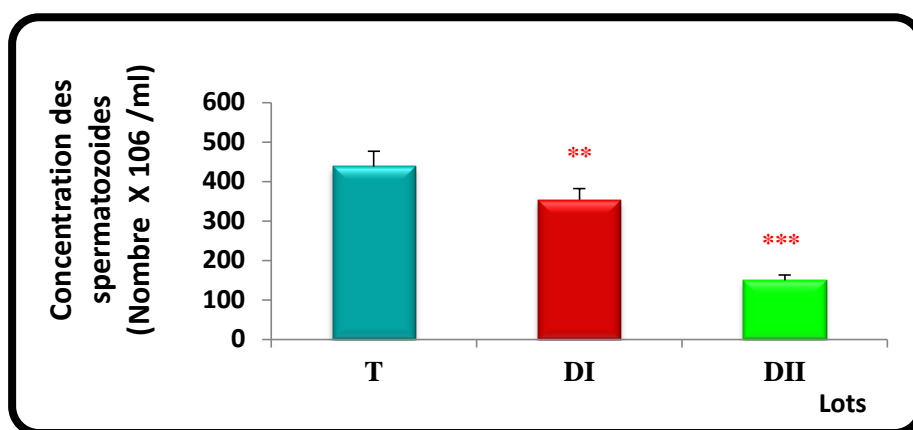


Figure 16: Variation moyenne du nombre total des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (Nombre spz. $\times 10^6/ml$) entre les trois groupes (n=10).

2.2. Mobilité :

En ce qui concerne la mobilité, les résultats dans la figure 17 montrent une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les lots traités à l'EGME par rapport au lot témoin. (Tab.8, Fig.17).

Tableau 08 : Variation du taux de mobilité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Mobilité (%)	69.33 ± 7.51	33.6 ± 8.25***	26.8 ± 6.12***

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

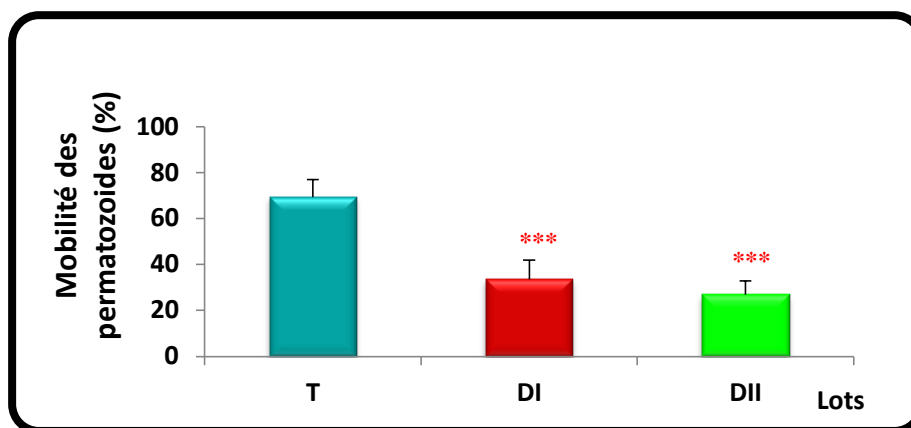


Figure 17: Variation moyenne de la mobilité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) entre les trois groupes (n=10).

2.3. Vitesse :

Les résultats obtenus révèlent pour les lots traités une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) dans la vitesse des spermatozoïdes comparés au lot témoin (Tab.9, Fig.18)

Tableau 09 : Variation du taux de vitesse des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Vitesse ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	40.92 \pm 4.60	13.17 \pm 1.84***	12.22 \pm 1.84***

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

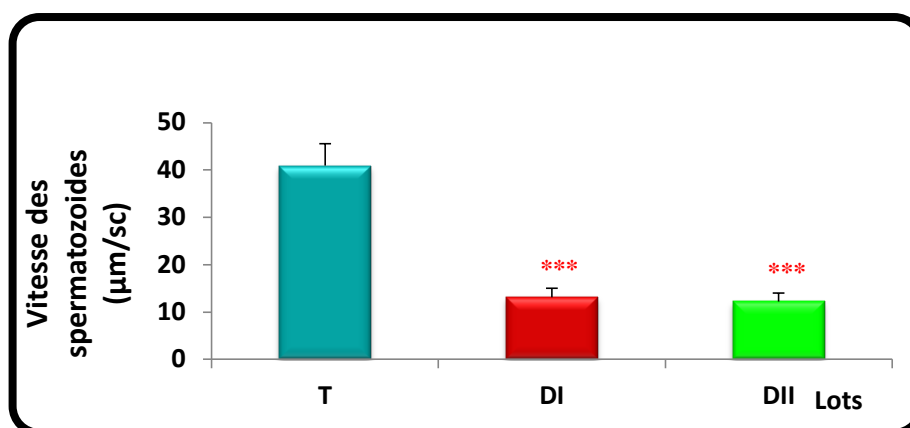


Figure 18 : Variation moyenne de la vitesse des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) entre les trois groupes (n=10).

2.4. Vitalité :

2.4.1. Coloration vitale :

Il existe une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) du taux des spermatozoïdes morts chez les lots traités à l'EGME DI et DII par rapport au lot témoin.

Concernant le taux des spermatozoïdes vivants, les résultats montrent une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les lots DI et DII par rapport au lot témoin (Tab.10, Fig.19).

Tableau 10 : Variation du taux de vitalité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).

Paramètres	Les lots expérimentaux					
	Témoin (T)		DI (200ppm)		DII (300ppm)	
	TSV	TSM	TSV	TSM	TSV	TSM
Vitalité (%)	66 ± 4.18	34 ± 4.18	27.4 ± 3.21***	72.6 ± 3.21***	13.6 ± 6.8***	86.4 ± 6.8***

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

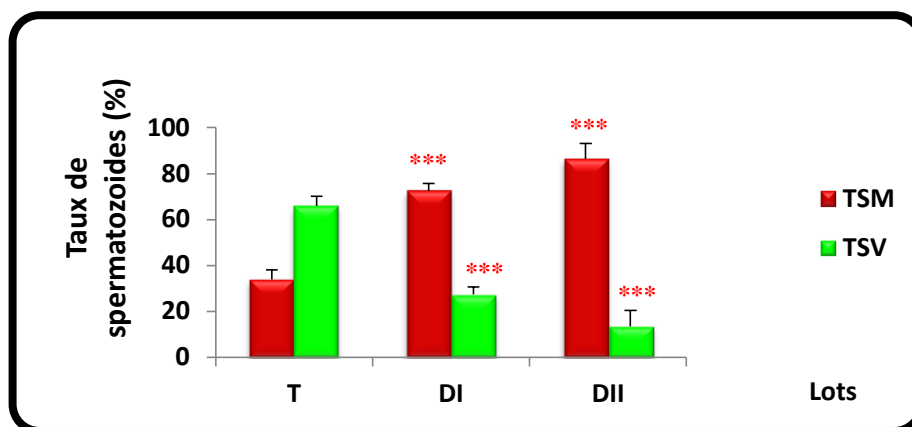


Figure 19: Variation moyenne de la vitalité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) (Après un test de coloration à l'éosine) entre les trois groupes (n=10).

2.4.2. Test hypo-osmotique :

Les résultats montre qu'il existe une diminution significatif ($P \leq 0,05$) des spermatozoïdes à malformation au niveau de la tête **A** chez le lot traité a l'EGME DI et une diminution hautement significatif ($p \leq 0,01$) chez le lot DII par rapport au groupe témoin.

Une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) du nombre de spermatozoïdes à malformations au niveau de la pièce intermédiaire **B** chez le lot traité DI et une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez le lot DII comparé au témoin.

L'observation qui a été faite pour le 3^{ème} cas de modification type **C**, montre qu'il existe une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) du nombre de spermatozoïdes avec des malformations au niveau du flagelle pour le lot DI et une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez le lot DII.

Le résultat montre qu'il y a une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) du nombre des spermatozoïdes normaux (non vivantes **N**) chez les lots traités DI et DII par rapport au témoin (Tab.11, Fig.20).

Tableau 11 : Variation du taux des malformations morphologiques des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n= 10).

Paramètres	Les lots expérimentaux											
	Témoin (T)				DI (200ppm)				DII (300ppm)			
	A	B	C	N	A	B	C	N	A	B	C	N
Malformations morphologiques (%)	18±5.7	26 ±2.24	18 ±4.47	38±7,58	7.8±1.92 *	16±3.94 **	9.2±2.39 **	67±4.06 ***	2.8±0.8 **	14.2±1.92 ***	11.2±2.8 *	71.8±2.05 ***

* : Différence significative par rapport au témoin ($p < 0.05$).

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

*** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

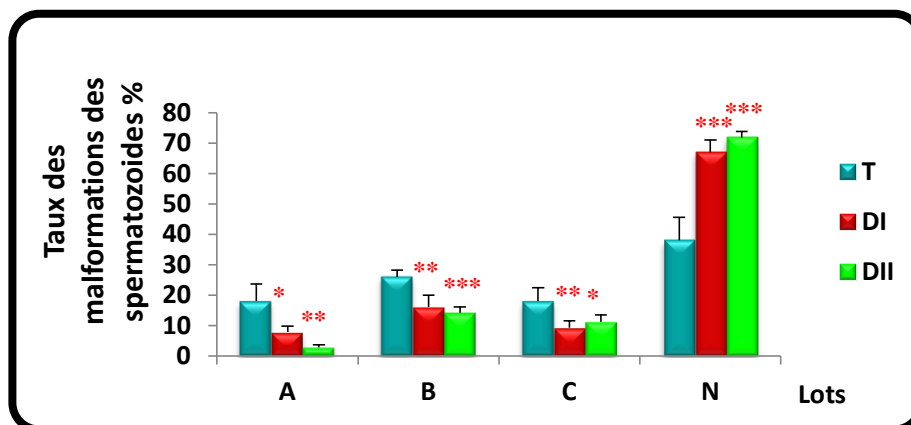


Figure 20: Variation moyenne des types de malformations morphologiques des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) (Après un test hypo-osmotique) entre les trois groupes ($n=10$).

2.5. Taux de testostérone :

L'effet de l'EGME sur le taux plasmatique de la testostérone se manifeste chez les animaux appartenant aux lots DI et DII, traités respectivement avec 200 et 300 ppm d'EGME. En effet, chez ces animaux, la teneur plasmatique de la testostérone présente une diminution très hautement significative. Elle passe de 1.94 ± 0.47 ng/ml chez les témoins à 0.27 ± 0.045 ng/ml chez les animaux du lot DI et à 0.13 ± 0.022 ng/ml chez ceux du lot DII, $p < 0,001$ (Tab.12, Fig.21).

Tableau 12 : Variation du taux de la Testostérone chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Testostérone (ng/ml)	1.94 ± 0.47	$0.27 \pm 0.045^{***}$	$0.13 \pm 0.022^{***}$

*** : Différence très hautement significative ($p < 0,001$).

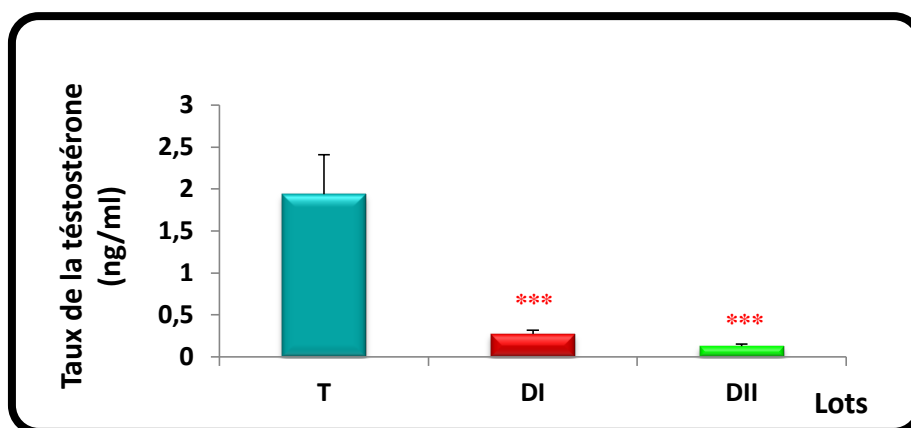


Figure 21: Variation moyenne ($X \pm SD$) dans le taux de la testostérone (ng/ml) (n=10).

3. Effets sur la fonction hématologique :

3.1. Les globules blancs :

En ce qui concerne les paramètres hématologiques, nous constatons une diminution non significative dans le nombre des globules blancs (GB) chez les groupes traités par l'EGME en comparaison avec le lot témoin. (Tab.13, Fig.22).

Tableau 13 : Variation du nombre des globules blancs (n GB) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).

Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
n GB ($10^3 / \text{mm}^3$)	8.46±1.2	8.25 ± 1.64	8.1±0.77

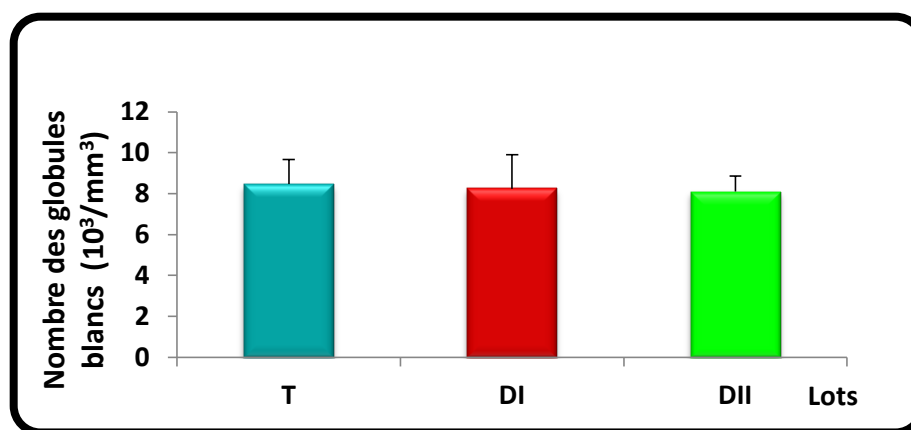


Figure 22: Variation moyenne ($X \pm SD$) du nombre des globules blancs (n GB), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.2. Les globules rouges :

L'analyse du taux des globules rouges (GR) révèle l'existence d'une diminution chez les lots traités. Cette diminution est statistiquement significative

($p < 0.05$) chez le groupe DI et très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot DII comparés aux témoins (Tab.14, Fig.23).

Tableau 14 : Variation du nombre des globules rouges (n GR) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
n GR ($10^6 / \text{mm}^3$)	5.74±0.33	4.85 ± 0.51*	4.06±0.47***

- * : Différence significative par rapport au témoin ($p < 0.05$).
- *** : Différence très hautement significative ($p < 0.001$).

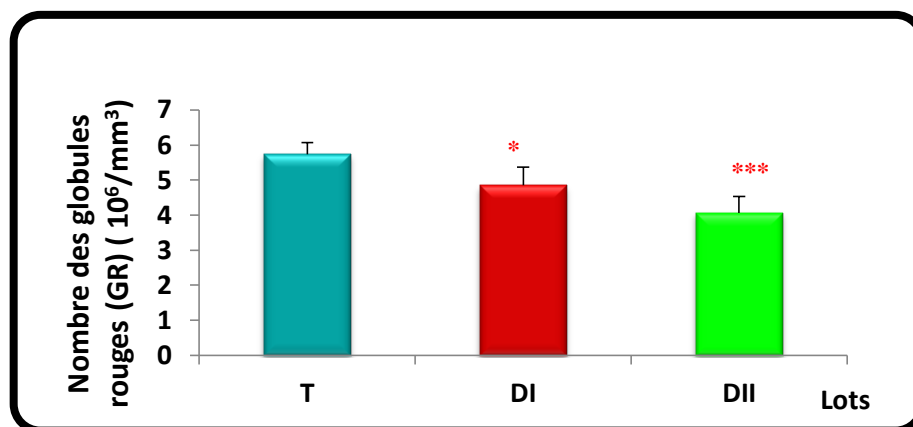


Figure 23: Variation moyenne ($X \pm SD$) du nombre des globules rouges (n GR) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.3. L'hémoglobine :

Les résultats obtenus révèlent l'existence d'une diminution significative ($p < 0.05$) dans le taux d'hémoglobine (Hb) chez le groupe traité par l'EGME DI et une diminution hautement significative chez le lot DII comparés aux témoins (Tab.15, Fig.24).

Tableau 15 : Variation du taux d'hémoglobine (Hb) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
Hb (g/l)	11±0.81	9.66 ± 0.25*	8.58±0.41**

* : Différence significative par rapport au témoin ($p < 0.05$).

** : Différence hautement significative ($p < 0.01$).

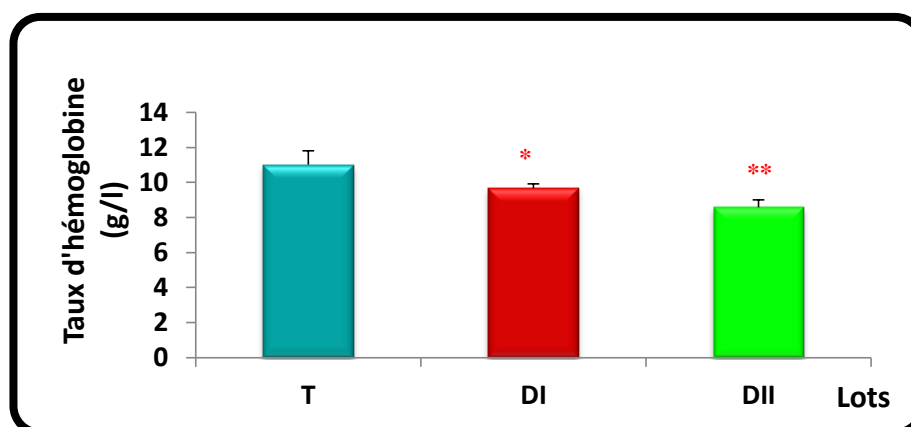


Figure 24: Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux d'hémoglobine (Hb) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.4. L'hématocrite :

Notons aussi une diminution significative chez le lot traité à l'EGME DI et une diminution hautement significative chez le lot DII dans le taux d'hématocrite (Ht) comparés au témoin. (Tab.16, Fig.25).

Tableau 16 : Variation du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Ht (%)	35.86±2.06	32.02 ± 0.50*	28.8±0.95**

- * : Différence significative par rapport au témoin (p<0.05).
- ** : Différence hautement significative (p<0.01).

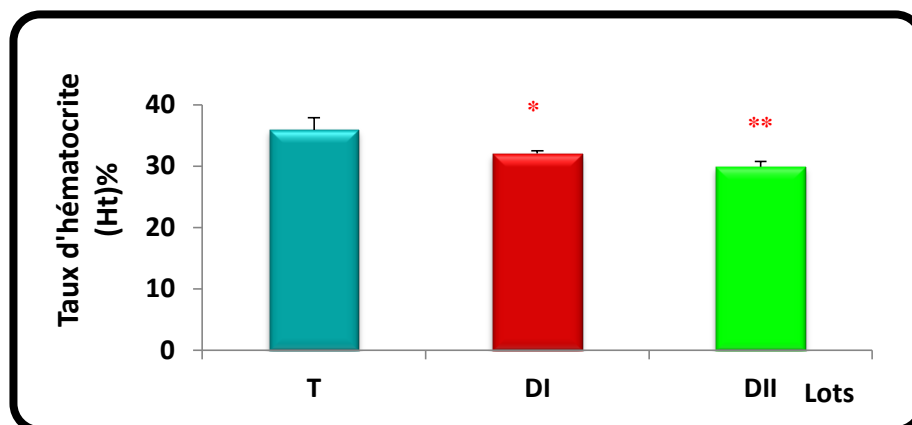


Figure 25 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du pourcentage d'hématocrite (Ht), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.5. Volume globulaire moyen :

L'analyse du taux moyen du volume globulaire moyen (VGM), révèle l'existence d'une augmentation hautement significative chez le lot DI et une augmentation très hautement significative chez le lot DII comparés aux témoins (Tab.17, Fig.26).

<i>Tableau 17 : Variation du volume globulaire moyen (VGM) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).</i>			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
VGM (femtolitères)	53.82±1.56	58.18 ± 1.13**	63.46±2.60***

** : Différence hautement significative (p<0.01).

*** : Différence très hautement significative (p<0.001).

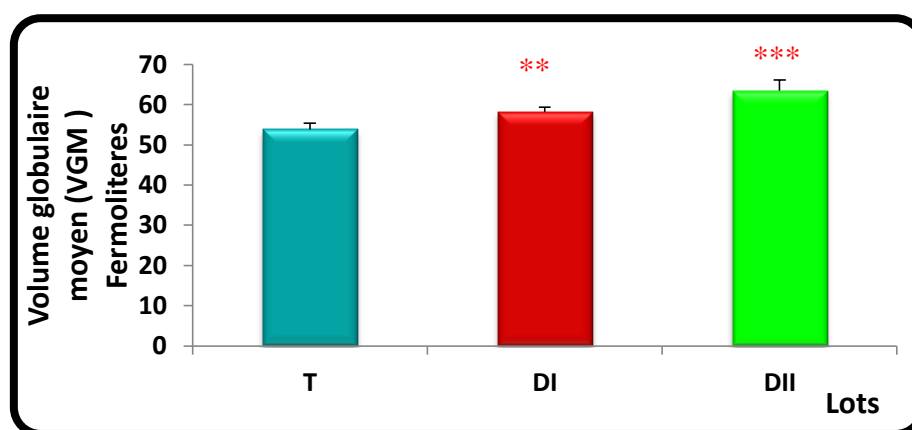


Figure 26: Variation moyenne (X±SD) du taux moyen du volume globulaire moyen (VGM) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.6. Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine :

De plus la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) montre une augmentation hautement significative chez les lots traités DI et DII en comparaison avec le témoin (Tab.18, Fig.27).

Tableau 18 : Variation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
CCMH (femtoliteres)	28.76±0.86	31.12 ± 0.82**	34.74±1.69**

** : Différence hautement significative (p<0.01).

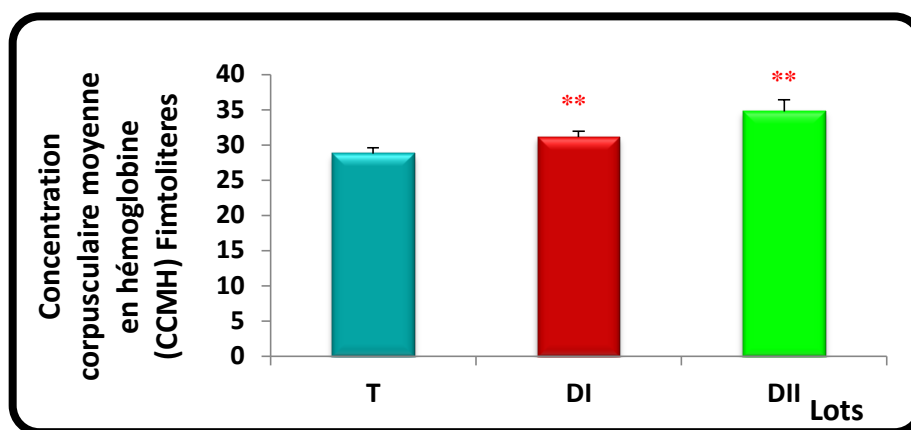


Figure 27 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

3.7. Teneur globulaire moyenne en hémoglobine :

Autre part, on constate une augmentation hautement significative du taux de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), chez les lots DI et DII comparés au témoin (Tab.19, Fig.28).

Tableau 19 : Variation de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200ppm)	DII (300ppm)
TGMH (picogramme)	16.09±0.27	17.52 ± 0.23**	18.86±1.19**

** : Différence hautement significative (p<0.01).

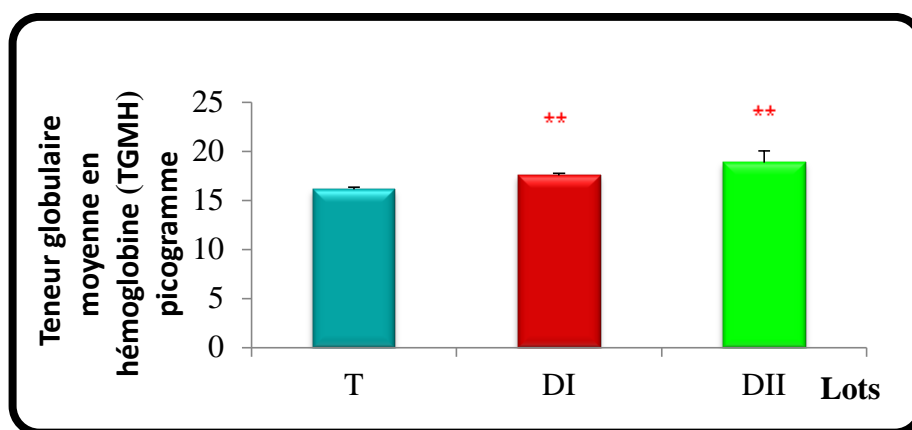


Figure 28 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux moyen de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10)

4. Etude des paramètres biochimiques:

4.1. Glucose :

Les résultats illustrent une diminution très hautement significative de la concentration sérique du glucose entre le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI et DII (Tab.20, Fig.29).

<i>Tableau 20</i> : Variation de la concentration sérique du glucose chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Glucose (g/l)	1.35 ± 0.04	0.74 ± 0.08***	0.66 ± 0.04***

*** : Différence très hautement significative (p<0.001).

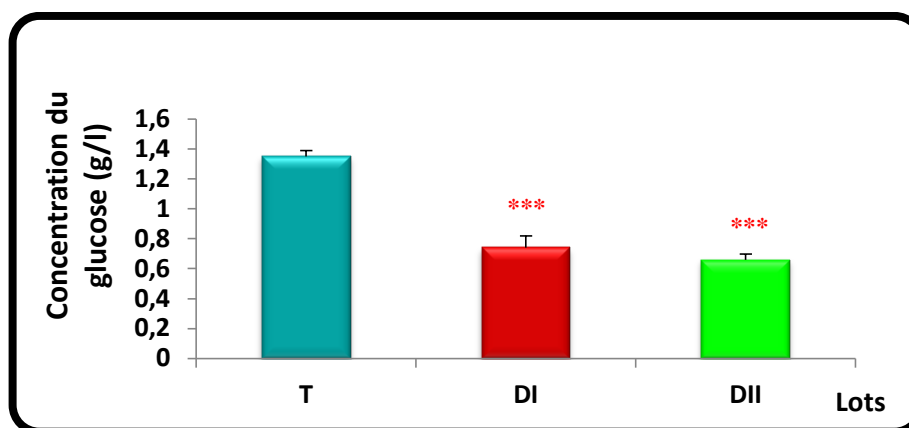


Figure 29 : Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.2. Cholestérol :

Nos résultats montrent aussi une augmentation très hautement significative du taux de cholestérol chez les lots traités DI / DII par rapport au témoin (Tab.21, Fig. 30).

Tableau 21 : Variation de la concentration du cholestérol chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).

Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Cholestérol (g/l)	0.15 ± 0.03	0.26 ± 0.04***	0.58 ± 0.05***

*** : Différence très hautement significative (p<0.001).

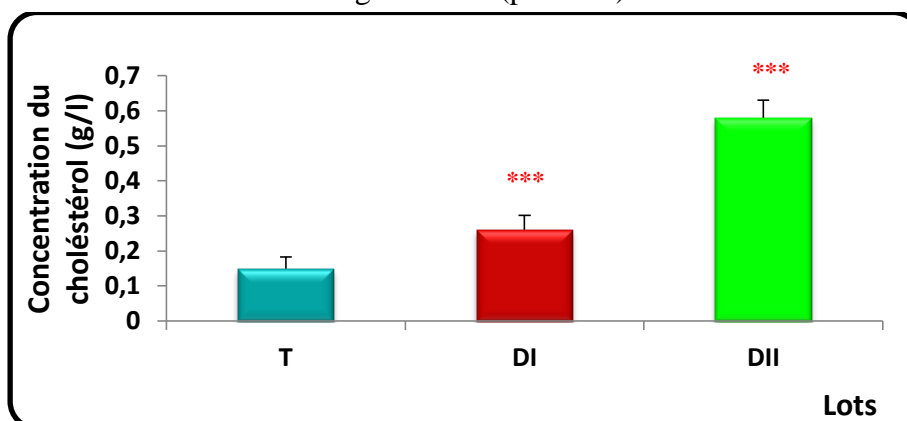


Figure 30 : Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du cholestérol chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.3. Triglycérides :

Nous enregistrons aussi une augmentation statistiquement significative des triglycérides chez les lapins traités à l'EGME DI par rapport au témoin, et elle est très hautement significative chez les lapins du lot DII par rapport au témoin (Tab.22, Fig. 31).

Tableau 22 : Variation de la concentration sérique des triglycérides chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Triglycérides (g/l)	1.51 ± 0.05	1.59 ± 0.04*	1.7 ± 0.05***

* : Différence significative par rapport au témoin (p<0.05).

*** : Différence très hautement significative (p<0.001).

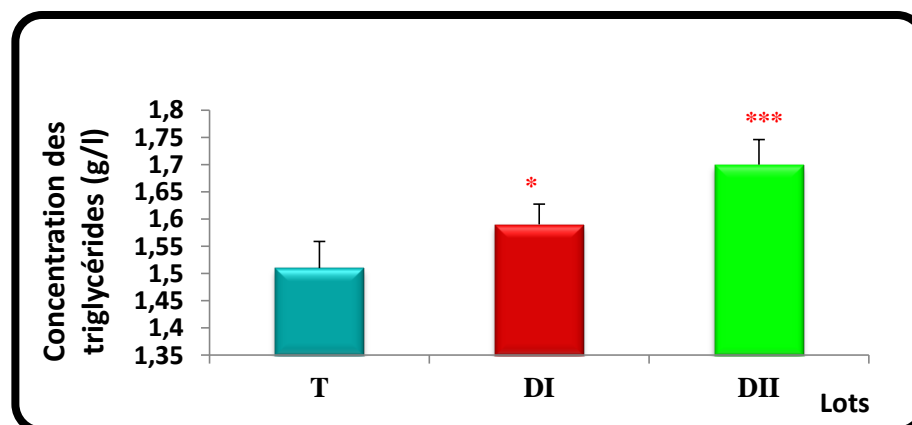


Figure 31 : Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique des triglycérides chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.4. Protéines totales :

Autre part, la concentration sérique des protéines totales présente une augmentation très hautement significative chez les lots traités à l'EGME DI/DII par rapport au témoin (Tab.23, Fig. 32).

<i>Tableau 23</i> : Variation de la concentration sérique des protéines totales chez le témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).			
Paramètres	Les lots expérimentaux		
	Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
Protéines totales (g/l)	10.7 ± 0.51	13.78 ± 0.40 ^{***}	15.57 ± 0.30 ^{***}

^{***} : Différence très hautement significative (p<0.001).

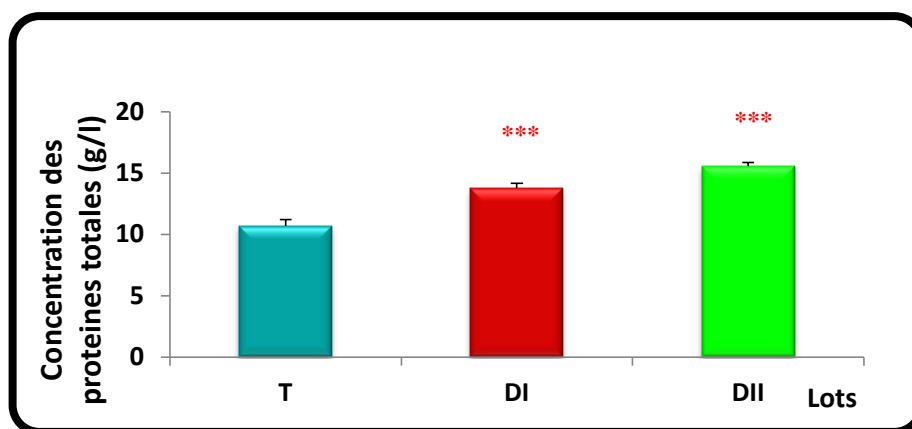


Figure 32 : Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique des protéines totales chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.5. Le glutathion :

Nos résultats révèlent que le traitement des lapins par l'EGME diminue la teneur hépatique, testiculaire et épидидymaire de taux du glutathion.

4.5.1. Hépatique :

Cette diminution de la teneur hépatique est très hautement significative chez les lots traités par rapport au témoin (Tab.24, Fig.33).

Tableau 24 : Variation du taux du glutathion hépatique (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10) .				
Paramètres	Organes	Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
GSH (n mol / mg prot)	Hépatique	57.11 ± 1.94	49.4 ± 1.39***	44.1 ± 1.85***

*** : Différence très hautement significative (p<0.001).

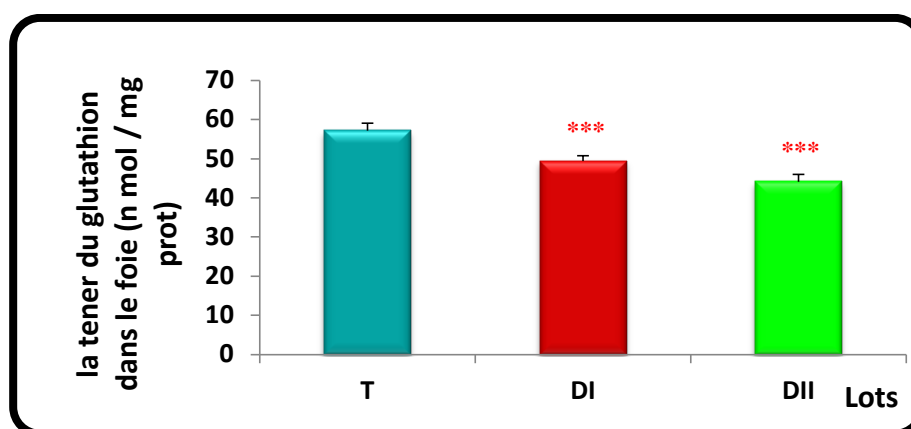


Figure 33 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de glutathion dans le foie chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.5.2. Testiculaire :

La diminution de la teneur testiculaire est significative chez le lot DI et hautement significative chez le lot DII par rapport au témoin (Tab.25, Fig.34).

Tableau 25: Variation du taux du glutathion testiculaire (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).

Paramètres	Organes	Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
GSH (n mol / mg prot)	Testiculaire	28.53 ± 2.67	23.98 ± 1.22*	22.94 ± 2.16**

* : Différence significative par rapport au témoin (p<0.05).

** : Différence hautement significative (p<0.01).

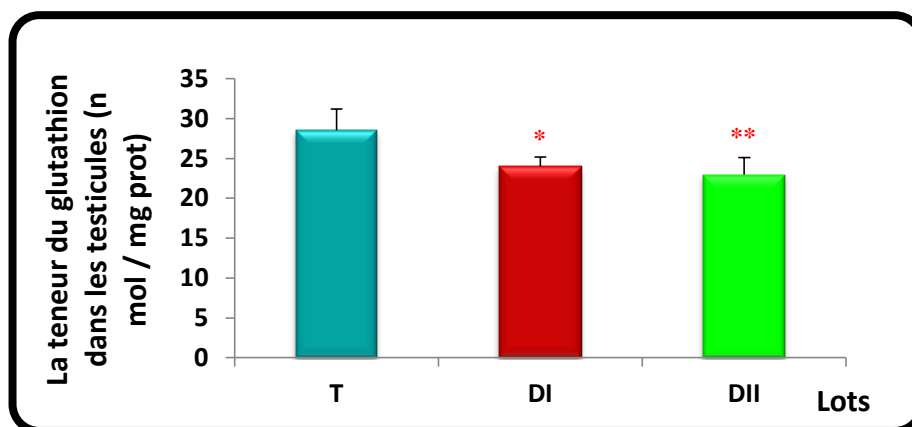


Figure 34 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du taux de glutathion dans les testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

4.5.3. Epididymaire :

Concernant la teneur épидидymaire du glutathion on observe une diminution significative chez les lots traités par rapport au lot témoin (Tab.26, Fig.35).

<i>Tableau 26</i> : Variation du taux du glutathion épидидymaire (GSH) chez le lot témoin (T) et les lots traités DI/DII (n=10).				
Paramètres	Organes	Les lots expérimentaux		
		Témoin (T)	DI (200 ppm)	DII (300 ppm)
GSH (n mol / mg prot)	Epididymaire	0,53 ± 0,04	0,43 ± 0,05*	0,40 ± 0,05*

* : Différence significative par rapport au témoin (p<0.05).

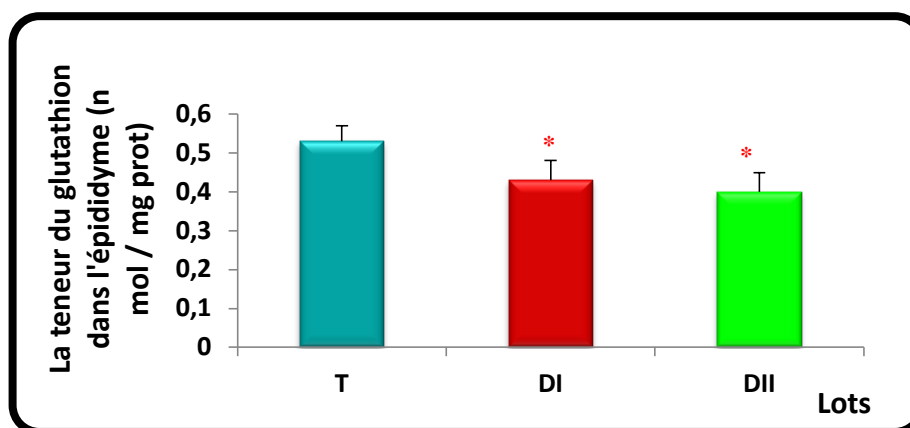
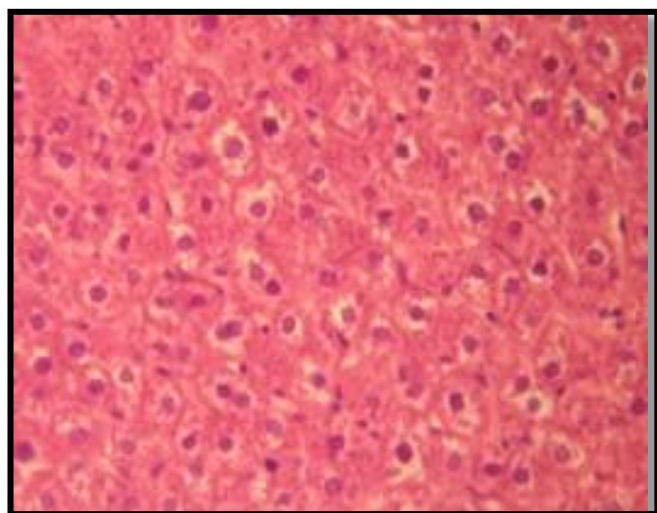


Figure 35 : Variation moyenne (X±SD) du taux de glutathion dans l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=10).

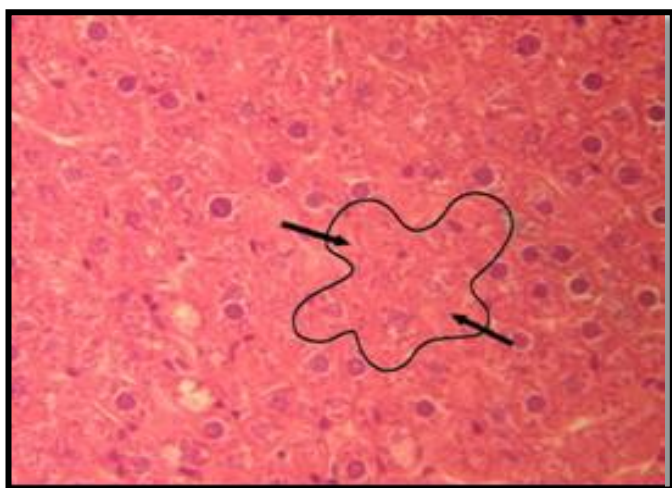
5. Etude histologique :

5.1. Atteinte tissulaire au niveau du foie :

L'observation microscopique du foie des lapins traités par l'EGME pendant 4 semaines (fig.36) révèle une modification cellulaire bien visible, qui est traduite par la présence d'une nécrose hépatique caractérisée par une clarification de la couleur du cytoplasme, hyperplasie, l'éclatement des hépatocytes et des lésions vasculaires, ces altérations graves de la structure affectent la fonction hépatique et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe.



T : Coupe histologique de foie d'un lapin témoin, aspect normal des hépatocytes avec leurs noyaux.



DI : Coupe histologique de foie d'un lapin traité par l'EGME à **200 ppm** pendant 4 semaines, la zone cerclée montre une nécrose.



DII : Coupe histologique de foie d'un lapin traité par l'EGME à **300 ppm** pendant 4 semaines, la zone cerclée montre une nécrose plus intense.

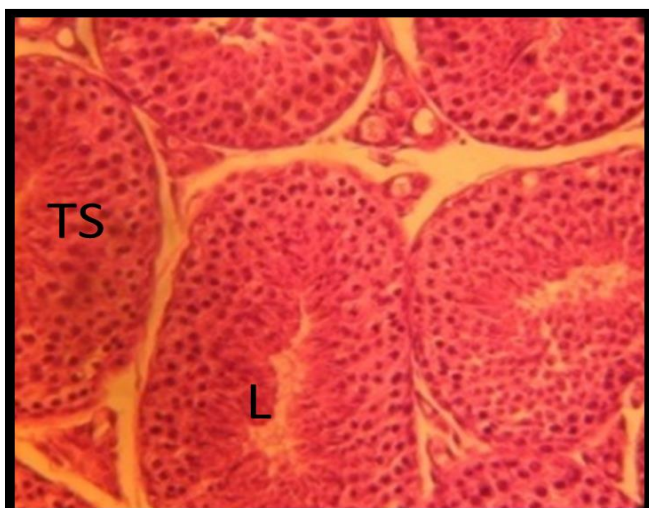
Figure 36 : Coupes histologiques du foie de lapin témoin et traités par l'EGME colorées à Hématéine-Eosine (Gr x 400).

5.2. Atteinte tissulaire au niveau des testicules :

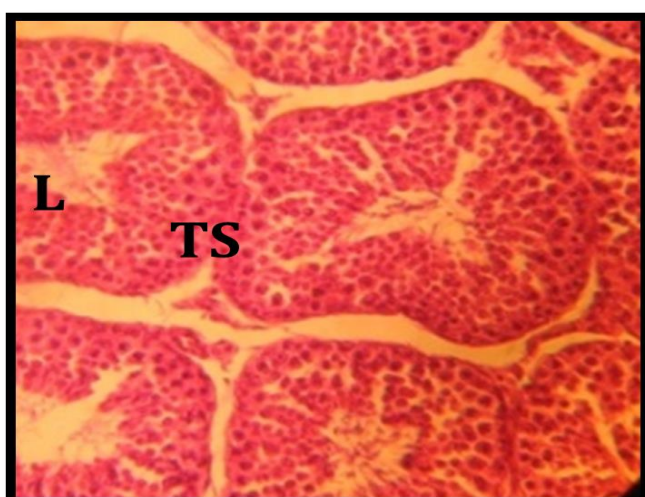
L'analyse histologique (figure 37) permet de visualiser les altérations testiculaires. L'histologie du groupe témoin (T) montre des tubes séminifères (TS) serrés avec une forme cylindrique, et la lumière (L) de chaque tube est presque occupée par la masse des spermatozoïdes matures.

En revanche, chez les lapins traités à l'EGME à la dose de 200 ppm (DI), nous remarquons que les tubes séminifères (TS) ont perdu leur forme cylindrique, et que le volume de la masse spermatique a diminué.

Ces modifications sont plus accentuées chez le groupe 3 traité par la dose de 300 ppm du solvant (DII): l'action du produit est très claire, les tubes séminifères (TS) sont déformés et la lumière (L) est presque vide (coupe C).



T: Coupe histologique des testicules d'un lapin témoin, montrant la lumière pleine et les tubes sérés.



DI: Coupe histologique des testicules d'un lapin traité à l'EGME **200 ppm** montrant les tubes séminifères déformés et la diminution de la masse spermatique.



DII : Coupe histologique des testicules d'un lapin traité à l'EGME **300 ppm** montrant les tubes séminifères complètement déformés et la lumière vide.

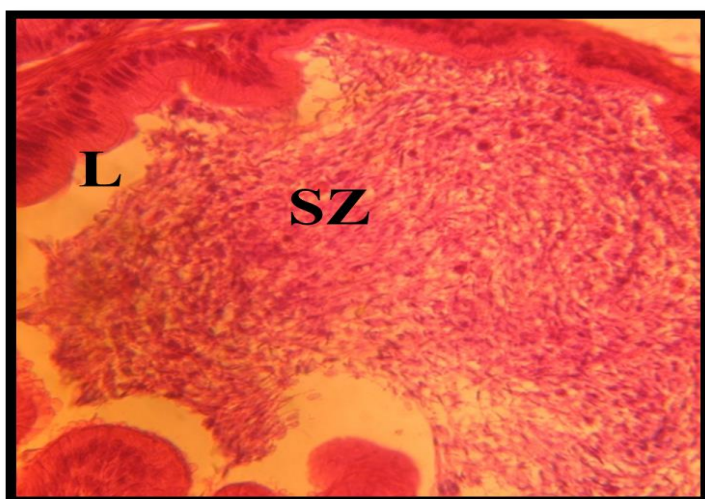
Figure 37 : Variation de l'aspect histologique des testicules entre les 3 groupes (Gr x 100).

5.3. Atteinte tissulaire au niveau de l'épididyme :

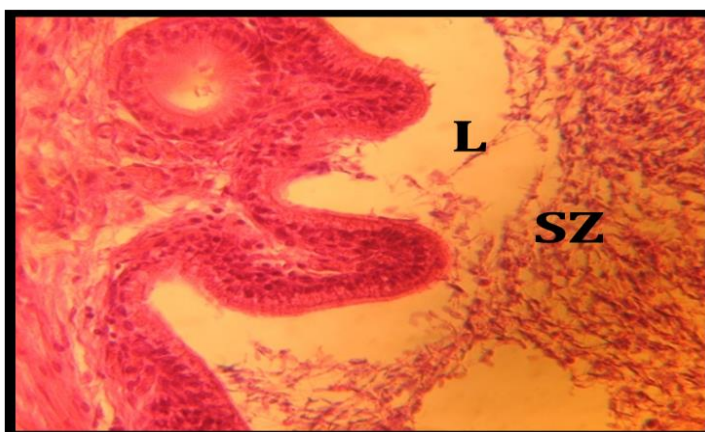
Les résultats des coupes histologiques montrent au niveau du groupe témoins (T) une structure normale avec une lumière pleine de spermatozoïdes L.

En ce qui concerne l'histologie du groupe traité à l'EGME avec la dose 200ppm (DI) on observe une discrète diminution de la quantité des spermatozoïdes dans la lumière des tubes.

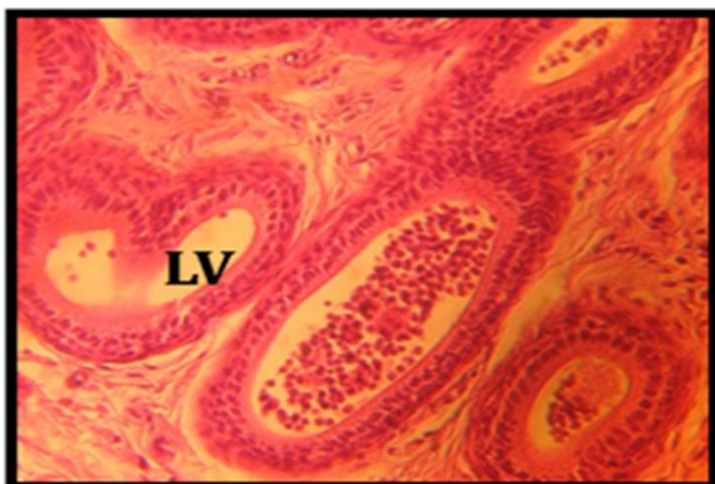
On note aussi une absence des spermatozoïdes dans la lumière de quelques tubes séminifère (LV) au niveau du groupe DII traité à l'EGME avec la dose 300 ppm.



T : Coupe histologique de l'épididyme d'un lapin témoin



DI : Coupe histologique de l'épididyme d'un lapin traité à l'EGME 200 ppm montrant une atrophie des tubes épидидymaire, les lumières étaient oligozoospermiques.



DII : Coupe histologique de l'épididyme d'un lapin traité à l'EGME 300 ppm montrant l'absence des spermatozoïdes dans la lumière de quelques tubes épididymaire.

Figure 38 : Les modifications histologiques de l'épididyme du lapin dans les différents groupes de traitement (Gr x 100).

Chapitre IV
Discussion et
conclusion générale

IV. Discussion

La plupart des produits chimiques destinés à être utilisés dans les domaines industriels ont des effets toxiques sur les paramètres de reproduction, biochimiques et hématologiques chez l'homme et l'animal. L'éthylène glycol monométhyle éther (EGME) comme exemple d'étude exerce sa toxicité par l'intermédiaire des métabolites acides et plus encore aldéhydes. Ceux-ci sont capables de pénétrer dans le noyau des cellules et d'altérer la structure et le fonctionnement du génome régissant la croissance et le développement cellulaire.

Nous avons tenté dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact de ce solvant toxique (l'éthylène glycol mono méthyle éther (EGME)) sur des lapins *Oryctolagus Cuniculus*. Nous discuterons de nos résultats au regard des travaux publiés dans plusieurs autres études.

Les résultats obtenus ont tout d'abord mis en évidence une réduction considérable de poids chez les lots traités à l'EGME (DI, DII) en comparaison au lot témoin. Ceci est en accord avec les constatations de Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a qui ont observés une perte pondérale chez la femelle à 100 ppm (311 mg/m³) d'EGME . Et ils sont similaires avec les travaux de Hobson *et al.*, 1986 qui ont constatés que l'exposition par voie cutanée des cobayes à 1 000 mg/kg-mc de l'EGME par jour pendant 13 semaines engendre une réduction du poids des organes et une perte pondérale.

Cette perte de poids peut être due à l'hypotrophie de quelques organes : thymus, testicules , épидидyme comme le montre plusieurs études, comme celle de Miller *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1983; Hanley *et al.*, 1984a qui ont remarqué que les rats Sprague-Dawley exposés par inhalation à 300 ppm (933 mg/m³) de l'EGME pendant 13 semaines présentaient une atrophie des testicules, et l'étude de U.S. EPA, 1992 qui ont trouvés que les rats à qui on administre 285 mg/kg-mc d'EGME par jour (la plus petite dose testée) ou plus du produit par voie orale pendant 6 semaines souffrent d'une atrophie des testicules et d'épididyme.

En ce qui concerne le poids relatif et absolus des organes, nos remarquons une augmentation du poids relatif et du poids absolus du foie chez les lapins traités à l'EGME, par rapport aux témoins. Ceci est explicable, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire de cet organe causé par ce solvant et d'autre part, par l'accumulation intense de l'EGME dans cet organe cible aux solvants. Ce résultat est en accord avec les travaux de Djabali *et al.*, 2009.

Le traitement par l'EGME a provoqué aussi une diminution du poids relatif et du poids absolu des testicules et de l'épididyme, cette diminution est semblable aux observations de Chapin *et al.* (1993) et Foote *et al.* (1995) publiées précédemment. Les Mêmes résultats ont été observés chez le groupe INSERM (1999) qui a illustré que le poids du testicule et de l'épididyme de rats Sprague Dawley notamment est diminué significativement, qu'ils soient traités pendant 2 semaines avec 200mg/kg/j ou pendant 4 semaines avec 100mg/kg/j d'EGME.

L'hypotrophie est due probablement à des lésions cellulaires consécutives à l'action du produit sur les tissus, qui vont conduire à une atrophie testiculaire (Lee et Kinney, 1989). Lors d'expositions prolongées ou à de fortes doses les lésions peuvent toucher les cellules-souches (spermatogonies), dans ce cas, l'arrêt de la spermatogenèse peut être définitif et le testicule s'atrophie, comme décrit par Yoon *et al.* (2003). L'étude de la génotoxicité des éthers de glycol relève d'une préoccupation récente, née de la description par Nagano en 1979 des effets d'atrophie testiculaire et épидидymaire chez le rat. Foote *et al.* (1995) ont signalé que les testicules et l'épididyme de lapin apparaissent à être plus sensibles aux EGME que les testicules et l'épididyme des rats ou des souris.

Nous résultats révèlent qu'il y a une altération dans les paramètres de la reproduction chez les groupes des lapins traités par l'EGME par rapport aux groupes témoins.

L'évaluation des effets de l'EGME sur la qualité et la quantité des spermatozoïdes montre une diminution significative de quelques paramètres biologiques des spermatozoïdes : concentration, mobilité, vitesse et vitalité chez les individus traités par rapport aux témoins. Ces résultats sont similaires à ceux de Djabali *et al.* (2009) enregistrés chez des lapins adultes mâles exposés à l'EGME par gavage avec des doses croissantes (1 mL / jour de solutions à 50, 100 et 150 ppm) et ceux de Hanley *et al.* (1984a et 1984b) qui on constatés que les rats mâles exposés à 300 ppm sont devenus complètement infertiles.

Plusieurs études réalisées chez des peintres exerçant dans les chantiers navals ont tenté d'évaluer les effets de l'exposition à l'EGEE et l'EGME sur les fonctions de reproduction. Les auteurs ont mis en évidence une diminution de la concentration du sperme et une augmentation du pourcentage d'oligospermie et d'azoospermie chez les hommes exposés. (Sparer *et al.*, 1988). Ce sont les cellules de la lignée germinale (spermatocytes au stade pachytène) qui en sont la cible. L'atteinte de la lignée germinale conduit à un arrêt de la spermatogenèse (Lee & Kinney, 1989 ; Creasy *et al.*, 1985).

La mobilité et la vitesse des spermatozoïdes sont fortement diminuées chez les lots traités par rapport au groupe témoin, cette diminution étant peut-être due à la baisse de niveau de LDH-C4 qui est une isoenzyme spécifique synthétisée par les cellules germinales pour fournir l'énergie aux spermatozoïdes.

On incrimine aussi l'action du produit au niveau de la pièce intermédiaire et du flagelle, ces deux zones étant les parties qui assurent le mouvement et la vitesse du spermatozoïde (indicateurs de fertilité). De leur côté, Foster *et al.* (1983) ont montré que la première lésion visible au niveau des spermatocytes pachytènes se situe au niveau des mitochondries, et que l'atteinte des spermatides à noyaux allongés se traduit par une réduction de la mobilité des spermatozoïdes. La diminution de la production de lactate de la cellule de Sertoli est une manifestation habituelle de l'action de nombreux toxiques testiculaires qui diminue les apports énergétiques de la lignée germinale (Mebus *et al.*, 1989). On tient peut-être là la raison de la diminution de la vitesse et de la mobilité des spermatozoïdes.

D'autre part, on enregistre une baisse très élevée du nombre de spermatozoïdes vivants et une augmentation du taux des spermatozoïdes morts dans les groupes traités par rapport au groupe témoin ces résultats sont corrélés avec les travaux de Welch *et al.* (1988) qui prouve que les 73 peintres exposés à l'EGME ont montré un accroissement de l'oligospermie (peu de spermatozoïdes) et de l'azoospermie (pas de spermatozoïdes) et avec ceux de Cai *et Xiao.* (1996) qui ont prouvé que les solvants travers la barrière hémato testiculaire ce qui provoque des effets directs sur la morphologie des cellules de sertoli (Dalgard *et al.* , 2001) ou les cellules germinales se nourrissent et se développent donc leur destruction entraîne la mort des spermatozoïdes.

Sur le plan hormonal, la comparaison des taux de testostérone chez les différents lots de lapins révèle une baisse hautement significative ($p < 0.001$) chez les animaux des lots DI et DII (respectivement $0,27 \pm 0,045$ ng/mL et $0,13 \pm 0,022$ ng/mL) comparativement à ceux du lot témoin ($1,94 \pm 0,47$ ng/mL). Selon Reader *et al.* (1991), ces molécules peuvent être capables de se fixer sur les récepteurs de LH (Luteinizing hormone) au niveau de la cellule de Leydig, ce qui induit un déséquilibre et/ou un blocage de la production de la testostérone, d'autres travaux ont démontré que ce solvant peut agir sur le taux du LH lui-même ainsi que sur la structure et la forme des cellules Sertoli (Reader *et al.*, 1991; Tirado *et al.*, 2004).

Concernant l'évaluation de la toxicité hématologique, nous avons enregistré une diminution significative dans le taux d'hémoglobine (Hb), d'hématocrite (Ht) et celui des

globules rouges (GR), avec une diminution non significative dans le taux des globules blancs (GB). Notons aussi une augmentation du volume globulaire moyen (VGM), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH). Cette toxicité a été largement étudiée sur des modèles animaux: une hémolyse (Barbee *et al.*, 1984; Breslin *et al.*, 1991; Boiron, 1991), une délétion lymphocytaire responsable d'immunosuppression (Delbarre *et al.*, 1980; Kayama *et al.*, 1991) et une toxicité sur les progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse (Ghanayame, 1996).

L'effet hémolytique des dérivés de l'éthylène glycol, dépend de la dose du produit, de l'espèce animale, et au sein d'une même espèce, de l'âge des animaux (Ward *et al.*, 1992). Ce ne sont pas les substances mères qui sont responsables de l'hémolyse, mais les acides alkoxyacétiques (AAA). De nombreux travaux ont révélé que les éthers de glycol de la série E présentent la propriété de détruire les globules rouges. Une exposition des rats à l'EGnPE à la dose 200 ppm par voie orale (gavage) pendant 11 jours provoque une hémolyse (Katz *et al.*, 1984). Le même résultat obtenu avec une dose de 30ppm de l'EGIPE par inhalation pendant 28 jours (Gage, 1970) et à 100 ppm pendant 3 semaines (Arts *et al.*, 1992) chez les rats.

Les résultats observés dans des modèles animaux ayant reçu, par voie orale, intraveineuse, par inhalation et par voie transcutanée des dérivés d'éther de glycol sont, dans toutes les publications, une hémolyse intravasculaire avec anémie régénérative (augmentation du taux de réticulocytes et parfois érythroblastose sanguine), chute du taux d'haptoglobine sanguine, hémoglobinurie. Cette hémolyse est précédée par une augmentation du volume des globules rouges, se traduisant par une augmentation du volume globulaire moyen (VGM). Elle est associée à des déformations des hématies. (Barbee *et coll.*, 1984; Grant *et coll.*, 1985; Breslin *et coll.*, 1991; Boiron, 1991; Ghanayem, 1996).

L'EGME agit après transformation en MAA. Ce produit est responsable, dans les modèles animaux, d'une déplétion sélective en thymocytes matures. Des travaux (NTP 1992) rapportent également une anémie avec l'EGEE.

En ce qui concerne la toxicité de la moelle osseuse, les études effectuées sur des animaux de laboratoire (Ghanayem, 1996) ont montré que les dérivés de l'éthylène glycol, principalement ceux qui ont une chaîne alkyl courte (EGME) sont responsables d'une hypocellularité (une diminution des lignes sanguines), une diminution des progéniteurs en particulier granulocytaires et érythrocytaires. Ces effets sont responsables de leucopénie avec neutropénie, et une anémie.

Le mécanisme de la toxicité de la moelle osseuse des éthers de glycol a été très peu étudié, quelques travaux ont montré que les éthers de glycol peuvent inhiber la synthèse de l'ADN et/ou entraîner des anomalies du fuseau mitotique au niveau des précurseurs médullaires. Les effets immunosuppresseurs sont essentiellement liés à une déplétion lymphocytaire et de façon moins importante à une altération fonctionnelle des lymphocytes (Delbarre *et al.*, 1980).

D'une manière générale, les globules rouges humains semblent être moins sensibles. Pour d'autres éthers de glycol de la même série, une atteinte des cellules de la moelle osseuse accompagnée d'une diminution du nombre des globules blancs a été observée (INSERM, 1999).

De plus, certains de ces éthers de glycol provoquent une déplétion lymphocytaire (Etiemble, 2003), une chute du taux d'hémoglobine (Barbee *et al.*, 1984) .

Nos résultats mis en évidence une perturbation des produits du métabolisme, nous avons remarqué une diminution du taux de glucose chez les lots traités avec l'EGME (DI, DII) par rapport au lot témoin, Cela est dû à un déséquilibre au niveau des processus métaboliques dans l'organisme, en raison de lésions du foie (Poon *et al.*, 1994).

Dans le même contexte, nous avons remarqué une augmentation significative de la concentration du cholestérol chez les lots traités par rapport au témoin, en raison des dommages aux tissus du foie, ce qui est peut être due à un déséquilibre dans les enzymes responsables de la conversion de cholestérol en hormones sexuelles mâles, ce qui provoque une diminution de la concentration de testostérone (Husmann et Mephaul, 1991).

La première indication de la perturbation de cholestérol est l'élévation dans la pression artérielle. (Liber *et al.*, 1968 ; Kotoku *et al.*, 1977 ; Savolainen *et al.*, 1977).

Nous avons remarqués aussi une augmentation de la concentration des triglycérides chez les lapins traités à l'EGME (DI, DII) plus une augmentation des protéines totales par rapport aux témoins. L'ensemble de ces perturbations sont dues à l'altération des fonctions du foie par les métabolites de l'EGME (Marie, 2002).

Les résultats sont cohérents avec les résultats de (Djabali *et al.*, 2009) qui ont été réalisées sur des lapins mâles traités avec 50.100.150 ppm d'EGME, ils ont observés une augmentation de la concentration des triglycérides et des protéines totales, sauf pour le taux de la concentration du cholestérol ils ont observés une diminution de ce dernier.

Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion (Kaplowitz *et al.*, 1985). Cette importance résulte dans sa grande capacité de détoxifier un grand nombre de composés nuisibles pouvant être endogéniques (métabolites actifs des hormones) ou exogéniques (métabolites toxiques des xénobiotiques).

L'analyse des résultats a mis en évidence une diminution de la teneur hépatique, testiculaire et épидидymaire en glutathion des lapins traités à l'EGME avec les doses de 200 et 300 ppm pendant quatre semaines par rapport aux témoins. Cette diminution est expliquée par la participation du foie, des testicules et de l'épididyme dans l'élimination des différents métabolites toxiques résultant de la dégradation du xénobiotique tels que les peroxydes lipidiques, les électrophiles et les radicaux libres responsables des lésions tissulaires importantes (Duke *et al.*, 1996 ; Saka *et al.*, 2003). Le glutathion est un tripeptide qui joue un rôle essentiel à divers niveaux dans la lutte contre les substances chimiques toxiques (Masella *et al.*, 2005).

L'étude histologique fait apparaître un changement qualitatif au niveau de l'histologie des testicules et de l'épididyme. HOLLOWAY *et al.* (1990) ont montré que l'exposition aux éthers de glycol peut provoquer des effets délétères sur le fonctionnement des tubes séminifères, une nette diminution des spermatozoïdes occupant la lumière de ces tubes étant de surcroît observée ; elle paraît plus accentuée avec la dose la plus forte (300 ppm) et suggérerait une modification du déroulement de la spermatogenèse.

Des groupes de 90 rats mâles ont été exposés à 1000 et 2500 ppm de l'EGME pendant 4h, et sacrifiés à différents moments après l'exposition. Une diminution du poids des testicules a été observée dès 48h après exposition à 1000 et 2500 ppm. Entre 24h et 96h, des effets ont été observés au niveau de l'épithélium séminifère avec notamment une altération des spermatocytes primaires, des modifications au niveau des cellules de Sertoli (grosses mitochondries) et des désordres dans l'épithélium (dont la nature n'est pas précisée). Dix-neuf jours après l'exposition à 2500 ppm, des désordres persistaient dans l'épithélium séminifère. (Doe J.E. (1984).

Des rats mâles ont été exposés corps entier pendant une heure à 1000 ppm de l'EGME. Le nombre de rats exposés n'est pas précisé. Toutes les 8h, pendant 2 jours, quatre animaux ont été sacrifiés, afin de déterminer les effets précoces sur l'épithélium séminifère. Les effets

suivants ont été observés entre 8h et 32h après l'exposition : atteintes des cellules de Sertoli (vacuoles), diminution du nombre de spermatocytes et de spermatides (Vachhrajani K.D, 2005).

Nous avons également enregistré un changement histologique hépatique, l'administration répétée d'éthers de glycol produit parfois des altérations fonctionnelles et/ou histologiques hépatiques. Elles sont toujours bénignes (modulation d'activités enzymatiques, gonflement des hépatocytes, augmentation du poids du foie) et traduiraient plutôt une réponse métabolique adaptative qu'un effet toxique hépatique (Heinonen et Vainio ,1981), Chez toutes les espèces animales étudiées et quelle que soit la voie d'exposition, l'éthylène glycol monométhyl ether

(EGME) provoque une dépression du système nerveux central, des lésions pulmonaires, rénales et hépatiques. Des signes d'irritation des muqueuses apparaissent également (INRS, 1999).

Conclusion générale

L'exposition par injection cutanée des animaux à l'EGME provoque des perturbations très significatives, ce qui nous a conduit à dire que la voie cutanée est plus dangereuse que la voie orale. De plus, étant donné que la pénétration des éthers de glycol dans l'organisme se fait principalement lors d'un contact direct, à travers la peau, nos résultats semblent être très utiles pour confirmer les effets néfastes de ce solvant.

Nous avons montré que l'administration d'EGME à 200 ppm et 300 ppm par injection cutanée chez les lapins mâles adultes pendant 30 jours, provoque divers effets reprotoxiques (diminution du poids des testicules et d'épididyme, diminution de la concentration, de la mobilité, de la vitalité et de la vitesse des spermatozoïdes et diminution de la teneur testiculaire et épидидymaire en glutathion). L'étude histologique montre une altération structurale des testicules, épидидyme. L'étude hormonale montre quant à elle une diminution des taux plasmatiques de testostérone.

Quant à l'étude biochimique et l'étude hématologique elles ont confirmés l'effet toxique de l'EGME, l'EGME a aussi une toxicité sur la croissance pondérale.

À partir de ces résultats, il serait intéressant de quantifier les hormones hypothalamiques et hypophysaires impliquées dans la régulation de la spermatogenèse (GnRh, FSH, LH), et d'entreprendre des études de terrain sur des volontaires, ainsi que des suivis de femmes gestantes et de leurs fœtus.

On désire aussi quantifier un nombre plus important de paramètres biochimiques (urée, créatine, les phosphatases alcalins etc.) et aussi quelques paramètres de stress oxydant (GPx, GST).

Même si l'exposition massive aux EG a baissé considérablement au cours des dernières années, une interdiction de ces substances comme le demandent deux organismes officiels (CSC, CSHPF) paraît justifiée au vu de l'importance du risque.



Références

Références

- Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corsi, C., Corti, G., Fiorio, R., Leporini, C., Mazzaccaro, A., Nieri, R.** (1980). The use of organic solvents in mutagenicity testing. *Mutat. Res.*, **79**: 141-150.
- AFSSET.** (2006). La toxicologie. [En ligne]. [consulté le 15/11/2008]. Disponible sur : http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/025623733973546055207083958/fiche_afsset_toxicologie.pdf.
- Ahmed, A.E., Jacob, S., AU, WW.** (1994). Quantitative whole body autoradiographic disposition of glycol ether in mice: effect of route of administration. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22** : 266-276.
- Aich, S., Manna, C.K.** (1996). Action of ethylene glycol monomethyl ether on male reproductive organs of Indian wild rat. *Endocr. Regul.*, **30**: 153-162.
- Agache, P.** (2000). Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées Cachan : EM inter.
- Anderson, D., Brinkworth, M.H., Jenkinson, P.C., Clode, S.A., Creasy, D.M., Gangolli, S.D.** (1987). Effect of ethylene glycol monomethyl ether on spermatogenesis, dominant lethality, and F1 abnormalities in the rat and the mouse after treatment of Fo males, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **7**: 141-158.
- Anderson, D., Dhawan, A., Yu, T.-W., Plewa, M.J.** (1996). An investigation of bone marrow and testicular cells *in vivo* using the comet assay. *Mutat. Res.*, **370**: 159-174.
- Arts, JHE., Reuzel, PGJ., Woutersen, RA., Kuper, CF., Falke, HE.** (1992). Repeated-dose (28-day) inhalation toxicity of isopropylethylene glycol ether in rats. *Inhalation Toxicol.*, **4** : 43-55.
- Au, W.W., Morris, D.L., Legator, M.S.** (1993). Evaluation of the clastogenic effects of 2-methoxyethanol in mice. *Mutat. Res.*, **300**: 273-279.

Barbee, S.J., Terril, J.B., Desousa, D.J., Conaway, C.C. (1984). Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and rabbit. *Environ Health Perspect.*, **57** : 157-163.

Barber, E.D., Teetsel, N.M., Kolberg, K.F., Guest, D. (1992). A comparative study of the rates of in vitro percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. *Fundam Appl Toxicol.*, **19**: 493-497.

Bartnik, F.G., Reddy, A.K., Klecak, G., Zimmermann, V., Hostynek, J.J., Kunstler, K. (1987). Percutaneous absorption, metabolism, and hemolytic activity of n-butoxyethanol. *Fundam Appl Toxicol.*, **8**: 59-70.

Basler, A. (1986). Aneuploidy-inducing chemicals in yeast evaluated by the micronucleus test, *Mutat.Res.*, **174** : 11-13.

Beaumont, J.J., Swan, S.H., Hammond, S.K., Samuels, S.J., Green, R.S., Hallock, M.F., Dominguez, C., Boyd, P., Schenker, M.B. (1995). Historical cohort investigation of spontaneous abortion in the semiconductor health study: epidemiologic methods and analyses of risk in fabrication overall and in fabrication work groups. *Am. J. Ind. Med.*, **28**: 735-750.

Berndtson, W.E., Foote, R.H. (1997). Disruption of spermatogenesis in rabbits consuming ethylene glycol monomethyl ether. *Reprod. Toxicol.*, **11(1)**: 29-36.

Benville, P. (1974). Acute toxicity of nine solvents to rainbow trout fingerlings. Inédit. Transmis depuis Tiburon Laboratory, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), 10 juillet 1974 (cité par Dawson *et al.*, 1977).

Bonnefoy, S. (2009). Exposition cutanée aux toxiques volatils et risque pour la santé. 46.

Boatman, R., Schum, D.B., Guest, D., Stack, C.R. (1993). Toxicology of diethylene glycol butyl ether: 2. Disposition studies with ¹⁴C-diethylene glycol butyl ether and ¹⁴C-diethylene glycol butyl ether acetate after dermal application to rats. *J Am Coll Toxicol.*, **12**: 145-154.

Boiron, O. (1991). Glycol alkyl ethers as hemopoietic toxins, *Nouv Rev Fr Hematol.*, **33** : 541-542.

Bradford, NM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.*, **72**:248-254.

Brashear, A. (1996). Ethylene oxide neurotoxicity: a cluster of 12 nurses with peripheral and central nervous system toxicity. *Neurology.*, **46(4)** : 992-998.

Breslin, WJ., Phillips, JE., Lomax, Ig., Bartels, MJ., Dittenber, DA., al. (1991). Hemolytic activity of ethylene glycol phenyl ether (EGPE) in rabbits. *Fundam Appl Toxicol.*, **17** : 466-481.

Bringmann, G., Kuehn, R. (1981). Comparison of the effect of harmful substances on flagellates and ciliates as well as on bacteriophage and saprozoic protozoans. *Gas-Wasserfach : Wasser Abwasser.*, **122**: 308-313.

Bringmann, G., Kuehn, R. (1978). Grenzwerte der Schwadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*), *Im. Vom Wasser.*, **50**: 45-60.

Brisson, P. (1974). Percutaneous absorption. *CMAJ.*, **110** : 1182-1185.

Brooke, I., Cocker, J., Delic, JI., Payne, M., Jones, K., Gregg, NC., Dyne, D. (1998). Dermal uptake of solvents from the vapour phase : an experimental study in humans. *Ann Occup Hyg.*, **42** : 531-540.

Burtis, A et al. (1999). Tietz Textbook of clinical chemistry, 3rd ed AACC.

Butterworth, M., Creasy, D., Timbrell, J.A. (1995). The detection of subchronic testicular damage using urinary creatinine: studies with 2-methoxyethanol, *Arch. Toxicol.*, **69**: 209-211.

Cai, Y., Xiao, G. B., Wang, T.Y. (1996). Effect of benzene, toluene and xylene on male sexual hormone. *Chin J. Pub Health.*, **15** : 198-199.

Carpenter, C.P., Pozzani, U.C., Weil, C.S., Nair, J.H., Keck, G.A., Smyth, H.F. Jr. (1956). The toxicity of butyl Cellosolve solvent, *Arch. Ind. Health.*, **14**: 114-131.

Carpenter, C.P., Smyth, H.F., Jr. (1946). Chemical burns of the rabbit cornea, *Am. J. Ophthalmol.* **29**: 1363-1372.

Chang, FK., Chen, ML., Cheng, SF., Shih, TS., Mao IF. (2007). Dermal absorption of solvents as a major source of exposure among shipyard spray painters. *J Occup Environ Med.*, **49** : 430-6.

Chang, HY., Lin, CC., Shih, TS., Chan, H., Chou ,JS., Huang, YS. (2004). Evaluation of the protective effectiveness of gloves from occupational exposure to 2-methoxyethanol using the biomarkers of 2-methoxyacetic acid levels in the urine and plasma. *Occup Environ Med .*, **61**: 697-702.

Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D., Lamb, J.C. (1985a). Effects of ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on mating performance and epididymal sperm parameters in F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**: 182-189.

Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D., Swaisgood, R.R., Lamb IV, J.C. (1985b). The recovery of the testis over 8 weeks after short-term dosing with ethylene glycol monomethyl ether: histology, cell-specific enzymes, and rete testis fluid protein. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**: 515-525.

Chapin, R.E., Lamb, J.C. (1984). Effects of ethylene glycol monomethyl ether on various parameters of testicular function in the F344 rat, *Environ. Health Perspect.* **57**: 219-224.

Chapin, RE., Morrissey, RE., Gulati, DK., Hope, E., Barnes, LH., Russell, SA., Kennedy, SR. (1993). Are mouse strains differentially susceptible to the reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether? A study of three strains. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21** : 8-14.

Chiewchanwit, T., Au, W.W. (1994). Cytogenetic effects of 2-methoxyethanol and its metabolite, methoxyacetaldehyde, in mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, **320**: 125-132.

Chiewchanwit, T., Ma, H. , El Zein, R. , Hallberg, L. , Au, W.W. (1995). Induction of deletion mutations by methoxyacetaldehyde in Chinese hamster ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutat. Res.*, **335**: 121-128.

Cicolella, A. (2006). Effets des éthers de glycol sur la reproduction. *Gynécol. Obstét. Fertil.*, **34(10)** : 955-963.

Clarke, DO., Elswick, BA ., Welsch, F., Conolly, RB . (1993). Pharmacokinetics of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid in the pregnant mouse: a physiologically based mathematical model. *Toxicol Appl Pharmacol .*, **121**: 239-252.

Clarke, DO., Welsch, F., Conolly, RB . (1991a). Development of physiologically based description of 2- methoxyethanol (2-ME) pharmacokinetics in the pregnant mouse. *Teratology.*, **43** :437.

Communauté Européenne (C.E.). (2006). Instructions pratiques à caractère non contraignant concernant la protection de la santé et la sécurité des travailleurs face aux risques liés aux agents chimiques sur le lieu de travail [En ligne].[consulté le 15/11/2008]. Disponible sur : http://ec.europa.eu/employment_social/health_saftey/publications/ke6805058_fr.pdf

Commission. Adopted by the **SCCP** during their 10th plenary meeting of 19 December 2006.

Cook, R.R., Bodner, K.M., Kolesar, R.C., Uhlmann, C.S., VanPeenen, P.F.D., Dickson, G.S., Flanagan, K. (1982). A cross-sectional study of ethylene glycol monomethyl ether process employees. *Arch. Environ. Health .*, **37**: 346-351.

Corely, RA., Markham, DA., Banks, C., Delorme, P., Masterman, A., Houle, JM. (1997). Physiologically based pharmacokinetics and the dermal absorption of 2-butoxyethanol vapor by humans. *Fundam Appl Toxicol.*, **39** :120-130.

Creasy, D.M., Flynn, J.C., Gray, T.J.B., Butler, W.H. (1985). A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp. Mol. Pathol.*, **43**: 321-336.

Dalgard, M., Hossaini, A., Hougarrd, KS., Hass, U., Ladefoged, O. (2001). Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology and apoptotic neurodegeneration . *Arch Toxicol.*, **75**:103-9.

Daniel, FB., Cheever, KL., Begley, KB., Richards, DE., Weigel, WW., Eisenmann, CJ. (1991). Bis (2- methoxyethyl) ether: metabolism and embryonic disposition of a developmental toxicant in the pregnant CD-1 mouse. *Fundam Appl Toxicol .*, **16**: 567-575.

Davis, J.B., Almekinder, J.L., Flagler, N., Travlos, G., Wilson, R., Maronpot, R.R. (1997). Ovarian luteal cell toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and methoxy acetic acid *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**: 328-337.

Delbarre, F., Kahan, A., De gery, A., Kathalin, K. (1980). Action immunomodulatrice du méthoxy-2 éthanol et de dérivés homologues chez le rat. *C R Acad Sci 111.*, **291** : 215 218.

Denkhaus, W., Steldern, D.V., Botzenhardt, U., Konietzko, H. (1986). Lymphocyte subpopulations in solvent-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **57**: 109-115.

Derosa, G., Cicero, AF., Murdolo, G., Ciccarelli, L., Fogari, R. (2004). Comparison of metabolic effects of orlistat and sibutramine treatment in Type 2 diabetic obese patients, Diabetes. *Nutr Metab.*, **17** : 222-229.

Devanthéry, A., Berode, M., Droz, P.O. (2002). Propylene glycol monomethylether occupational exposure. 3. Exposure of human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health.*, **75**:203-208.

Devillers, J., Chessel D. (1995). Can the enucleated rabbit eye test be a suitable alternative for the *in vivo* eye test? A chemometrical response, *Toxicol. Model.*, **1**: 21-34.

Djabali, N., Khelili, K., Hamdi, L. (2009). Etude de l'effet d'un solvant: éthylène glycol monométhyl éther (EGME) sur quelques paramètres indicateurs de la fertilité masculine chez le lapin *Oryctolagus cuniculus*. *Eur. J. Sci. Res.*, **27(1)** : 93-103.

DMER (Don Mackay Environmental Research) ., AEL (Angus Environmental Limited). (1996). *Pathways analysis using fugacity modelling of 2-methoxyethanol for the second Priority Substances List*. Rapport préparé pour la Division de l'évaluation des produits chimiques, Direction de l'évaluation des produits chimiques commerciaux, Environnement Canada, par DMER, Peterborough (Ont.), et AEL, Don Mills (Ont.), mars 1996.

Doe, JE. (1984a). Ethylene glycol monoethyl ether and ethylene glycol monoethyl ether acetate teratology studies. *Environm. Health. Perspect.*, **57** : 33-41.

Doe, J.E., Samuels, D.M., Tinston, D.J., Wickramaratne, G.A. de S. (1983). Comparative aspects of the reproductive toxicology by inhalation in rats of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**: 43-47.

Duke, R.C., Ojcius, D.M., Young, J.D.E. (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci Am.*, **23** : 79-87.

Dugard, PH., Walker, M., Mawdsley, SJ., Scott, RC. (1984). Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environ Health Perspect .*, **57**: 193-197.

ECETOC. (1994).The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. Technical report., **64**.

ECETOC (Centre d'écologie et de toxicologie de l'industrie chimique européenne). (1995). The toxicology of glycol ethers and its relevance to man, Bruxelles (Belgique), 350p. (ECETOC Rapport technique n° **64**).

Eckel, W., Foster, G., Ross, B. (1996). Glycol ethers as ground water contaminants. *Occup. Hyg.*, **2** : 97-104.

Elias, Z., Daniere, M.C., Marande, A.M., Poirot, O., Terzetti, F., Schneider, O. (1996). Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers: results of different short-term tests. *Occup. Hyg.*, **2**: 187-212.

Etiemble, J. (2003). Les éthers de glycol : une toxicité variable selon les composés. *Actu, Chim. Chimie et Santé Publique.*, **1** : 145-149.

Exon, J.H., Mather, G.G., Bussiere, J.L., Olson, D.P., Talcott, P.A. (1991). Effects of subchronic exposure of rats to 2-methoxyethanol or 2-butoxyethanol: thymic atrophy and immunotoxicity, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **16**: 830-840.

Fairhurst, S., Knight, R., Marrs, T.C., Scawin, J.W. , Spurlock, M.S., Swanston, D.W. (1989). Percutaneous toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and of dipropylene glycol monomethyl ether in the rat, *Toxicology.*, **57**: 209-215.

Fastier, A., Herve-Bazin, B., McGregor, D. (2005). Activities on risk assessment of glycol ethers, *Toxicol. Letters.*, **156** : 59-76.

Feuston, M.H., Bodnar, K.R., Kerstetter, S.L., Grink, C.P., Belcak, M.J., Singer, J. (1989). Reproductive toxicity of 2-methoxyethanol applied dermally to occluded and nonoccluded sites in male rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **100**: 145-161.

Feuston, M.H., Kerstetter, S.L., Wilson, P.D. (1990). Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15**: 448-456.

Foote, R.H., Farrel, P.B., Schlafer, D.H., McArdle, M.M., Trouern-Trend, V., Simkin, M.E., Brockett, C.C., Giles, J.R., Li, J. (1995). Ethylene glycol monomethyl ether effects on health and reproduction in male rabbits. *Reprod. Toxicol.* **9(6)**: 527-539.

Foster, P.M.D., Creasy, D.M., Foster, J.R., Thomas, L.V., Cook, M.W., Gangolli, S.D. (1983). Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**: 385-399.

Francois, R. (2002). Dictionnaire encyclopédique d'écologie et de science de l'environnement, 2^{ème} édition DUNOD. Paris. **704**.

Gage, J.C. (1970). The subacute inhalation toxicity of 109 industrial chemicals. *Br J Ind Med.*, **27** : 1-18.

Ghanayem, B.I. (1996). An overview of the hematotoxicity of ethylene glycol ethers. *Occup Hyg.*, **2** : 253-268.

Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B. (1987). Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: role of alcohol and aldehyde dehydrogenases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **24**: 222-231.

Ghanayem, B.I., Chapin, R.E. (1990). Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol)-induced testicular toxicity. *Exp. Mol. Pathol.*, **52**: 279-290.

Gijsbers, J.H., Tielemans, E., Brouwer, D.H., van Hemmen, J.J. (2004). Dermal exposure during filling, loading and brushing with products containing 2-(2-butoxyethoxy)ethanol. *Ann Occup Hyg.*, **48**: 219-227.

Goldberg, M.E., Haun, C., Smyth, H.F., Jr. (1962). Toxicologic implication of altered behavior induced by an industrial vapor, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **4**: 148-164.

Greenburg, L., Mayers, M.R., Goldwater, L.J., Burke, W.J., Moskowitz, S. (1938). Health hazards in the manufacture of "fused collars." I. Exposure to ethylene glycol monomethyl ether. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **20**: 134-147.

Groeseneken, D., Veulemans, H., Masschelein, R., Van vlem, E. (1989). Experimental human exposure to ethylene glycol monoethyl ether. *Int Arch Occup Health* ., **61**: 243-247.

Grant, D., Sulsh, S., Jones, H.B., Gangolli, S.D., Butler, W.H. (1985). Acute toxicity and recovery in the hemopoietic system of rats after treatment with ethylene glycol monomethyl and monobutyl ethers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**: 187-200.

Groeseneken, D., Veulemans, H., Masschelein, R., Van Vlem, E. (1989). Experimental human exposure to ethylene glycol monomethyl ether. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **61**: 243-247.

Guest, D., Hamilton, ML., Deisinger, PJ., Divincenzo, GD. (1984). Pulmonary and percutaneous absorption of 2-propoxyethyl acetate and 2-ethoxyethyl acetate in beagle dogs. *Environ Health Perspect* ., **57**: 177-183.

Gulati, D.K., Hope, E., Barnes, L.H., Hommell, L., Russell, S., Poonacha, K.B. (1990a). Reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether (CAS No. 109-86-4) in Sprague-Dawley rats, litter two, 1-76. Environmental Health Research and Testing Inc. Rapport inédit (NTIS-PB 90-252313) [cité par ECETOC, 1995].

Gulati, D.K., Hope, E., Christman, K.L., Barnes, L.H., Russell, S. (1990b). Reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether (CAS No. 109-86-4) in Sprague-Dawley rats, litter two, 1-72. Environmental Health Research and Testing Inc. Rapport inédit (NTIS-PB 90-252321) [cité par ECETOC, 1995].

Hanley, TR., Calhoun, LL., Yano, BL., Rao, KS. (1984a). Teratologic evaluation of inhaled propylene glycol monomethyl ether in rats and rabbits. *Fund. Appli. Toxicol.*, **4** : 784-794.

Hanley, T.R., Jr, Yano, B.L., Nitschke, K.D., John, J.A. (1984b). Comparison of the teratogenic potential of inhaled ethylene glycol monomethyl ether in rats, mice, and rabbits, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**: 409-422.

Hanley, T.R., Jr, Young, J.T., John, J.A., Rao, K.S. (1984a). Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and propylene glycol monomethyl ether (PGME): Inhalation fertility and teratogenicity studies in rats, mice and rabbits, *Environ. Health Perspect.*, **57**: 7-12.

Hanley, TR., Young, JT., Sohn, JA., Rao, KS., (1984b). Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) and propylene glycol monomethyl ether (PGME). Inhalation fertility and teratogenicity studies in rats, mice and rabbits. *Environ. Health Persp.*, **57** : 7-12.

Hansch, C., Leo, A.J. (1985) . *Medchem project. Issue No. 26*, Pomona College, Claremont (Calif.).

Harada, T., Nagashima, Y. (1975). Utilization of alkyl ether compounds by soil bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **53**: 218-222.

Heinonen, T., Vaino, H. (1981). Dose-dependent toxicity of ethylene glycol monomethyl ether vapour in the rat. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **6** : 275-280.

Hellwig, J. (1993). Study of the prenatal toxicity of 2-méthoxyéthanol in rats after dermal application. Rapport inédit, Abstract Toxicologie, BASF AG, Ludwigshafen (Allemagne) (n° OR53/89002) [cité par ECETOC, 1995].

Hobson, D.W., A.P. D'Addario, R.H. Bruner et D.E. Uddin. (1986). A subchronic dermal exposure study of diethylene glycol monomethyl ether and ethylene glycol monomethyl ether in the male guinea pig. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**: 339-348.

Hoflack, J.C., Lambolez, L., Elias, Z., Vasseur, P. (1995). Mutagenicity of ethylene glycol ethers and of their metabolites in *Salmonella typhimurium* his. *Mutat. Res.*, **341**: 281-287.

Holladay, S.D., Comment, C.E., Kwon, J., Luster, M.I. (1994). Fetal hematopoietic alterations after maternal exposure to ethylene glycol monomethyl ether: prolymphoid cell targeting. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **129**: 53-60.

Holloway, A.J., Moore, H.D.M., Foster, P.M.D. (1990). The use of rat *in vitro* fertilization to detect reductions in the fertility of spermatozoa from males exposed to ethylene glycol monomethyl ether, *Reprod. Toxicol.*, **4**: 21-27.

Hong, H.L., Canipe, J., Jameson, C.W., Boorman, G.A. (1988). Comparative effects of ethylene glycol and ethylene glycol monomethyl ether exposure on hematopoiesis and histopathology in B6C3F1 mice, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **8(7)** : 27-38.

House, R.V., Lauer, L.D., Murray, M.J., Ward, E.C., Dean, J.H. (1985). Immunological studies in B6C3F1 mice following exposure to ethylene glycol monomethyl ether and its principal metabolite methoxyacetic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**: 358-362.

Howard, P.H., Boethling, R.S., Jarvis, W.F., Meylan, W.M., Michalenko, E.M. (1991). *Handbook of environmental degradation rates*. Lewis Publishers Inc., Chelsea (Mich.).

Howard, P.H. (1990). *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals*, vol. II, *Solvents*, Lewis Publishers Inc., Chelsea (Mich.).

Humbert, P. (2003). Fonctional consequences of cutaneous lipid perturbation. *Pathol Biol* .., **51** : 271-4.

Hursh, JB., Clarkson, TW., Miles, EF., Goldsmith, LA. (1989). Percutaneous absorption of mercury vapor by man. *Arch Environ Health.*, **44** : 120-7.

Husmann, DS., Mephaul, MJ. (1991) Time specific androgen blockage with fluramide inhibits testicular descent in the rat. *Endocrinol.*, **129**:1409-1416.

INRP (Inventaire national des rejets de polluants). (1996). Rapport de 1994. *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, Environnement Canada, Ottawa (Ont.), **240**.

INRP (Inventaire national des rejets de polluants). (1998). *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (www2.ec.gc.ca/pdb/npri/).

INRS. (1999). *Fiche toxicologique.*, **103** : 2-Méthoxyéthanol.

INRS. (2004). Les éthers de glycol. *Fic. Sol. Ed.*, **4222** : 1-6.

INRS. (2005). Utilisation des éthers de glycol: une enquête dans des PME. *Document pour le médecin de travail.* ,**139**: 65-74.

INSERM. (2006). Ethers de glycol : nouvelles données toxicologiques. [En ligne] [Consulté le 15 / 11/ 2008]. Disponible sur : <http://ist.inserm.fr/baisirapports/ethers2006.html>.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). (1999). Ethers de glycol : quels risques pour la santé ?, *Expertise Collective INSERM.*\$

IPCS. (2004). CICAD, 2-méthoxyéthanol.

Jacobs, G.A., Castellazzi, A., Dierickx, P.J. (1989). Evaluation of a non-invasive human and an *in vitro* cytotoxicity method as alternatives to the skin irritation test on rabbits, *Contact Dermatitis.*, **21**: 239-244.

Jacobs, G.A. (1992). Eye irritation tests on two ethylene glycol ethers, *J. Am. Coll. Toxicol.*, **11**: 738.

Jacobs, G., Martens, M., Mosselmans, G. (1987). Proposal of limit concentrations for skin irritation within the context of a new EEC directive on the classification and labelling of preparations, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **7**: 370-378.

Jakasa, I., Mohammadi, N., Krüse, J., Kezic, S. (2004). Percutaneous absorption of neat and aqueous solutions of 2-butoxyethanol in volunteers *Int Arch Occup Environ Health.*, **77**: 79-84.

Jeyendran, RS. , vander ven, HH., perez- pelaz, M., Gabob, G., Zameveld, LJD. (1984). Development of an assay assess the functional integrity of human sperm membrane and its relation shipto the other semen characteristics. *J. hep. Fert.* **70**: 219-228.

Johanson, G. (1994). Inhalation toxicokinetics of butoxyethanol and its metabolite butoxyacetic acid in the male Sprague-Dawley rat. *Arch. Toxicol.*, **68** : 588-594.

Johanson, G., Boman, A. (1991). Percutaneous absorption of 2-butoxyethanol vapour in human subjects. *Br J Ind Med.*, **48** : 788-92.

Johanson, G., Boman, A., Dynesius, B. (1988) .Percutaneous absorption of 2-butoxyethanol in man *Scan J Work Environ Health.*, **14**: 101-109.

Johanson, G., Fernstrom P. (1986). Percutaneous uptake rate of 2-butoxyethanol in the guinea pig. *Scand J Work Environ Health .*, **12**: 499-503.

Johanson, G., Fernstrom P. (1998). Influence of water on the percutaneous absorption of 2-butoxyethanol in guinea pigs. *Scand J Work Environ Health .*, **14**: 95-100.

Johanson, G., Wallen, M., Byfalt Nordqvist M.(1986). Elimination kinetics of 2-butoxyethanol in the perfused rat liver-dose dependence and effect of ethanol. *Toxicol Appl Pharmacol .*, **83**: 315-320.

Jones, K., Cocker, J. (2003). A human exposure study to investigate biological monitoring methods for 2-butoxyethanol. *Biomarkers.*, **8(5)** : 360-370.

Jones, K., Cocker, J., Dodd, LJ., Fraser, I. (2003). Factors affecting the extent of dermal absorption of solvent vapours : a human volunteer study. *Ann Occup Hyg.*, **47** : 145-50.

Kaplan, L.A. (1984). Glucose. Kaplan A *et al* .*Clin chem. The C.V. mosby Co. Si lous.Tronto. Princeton* ; 1032-1036.

Kaplan, A et al. (1984). Tryglycerides. *Clin. Chem. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* P : 437 and Lipids. pp : 1194-1206.

Kaplowitz, N., Aw , TY., Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annual Review of Pharmacol. Toxicol.*, **25 (1)** : 715-744.

Katz, GV., Krasavage, WJ., Terhaar, CJ. (1984). Comparative acute and subchronic toxicity of ethylene glycol monopropyl ether and ethylene glycol monopropyl ether acetate. *Environ Health Perspect.*, **57** : 165-175.

Kawai, F. (1995). Bacterial degradation of glycol ethers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**: 532-538.

Kawamoto, T., Matsuno, K. , Kayama, F. , Hirai, M. , Arashidani, K. , Yoshikawa, M. , Kodama, Y. (1990). Acute oral toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**: 602-608.

Kayama, F., Yamashita, U., Kawamoto, T., Kodama, Y. (1991). Selective depletion of immature thymocytes by oral administration of ethylene glycol monomethyl ether. *Int. J. Immunopharmacol.*, **13(5)**: 531-540.

Kezic, S., Mahieu, K., Monster, AC., de Wolff , FA. (1997). Dermal absorption of vaporous and liquid 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol in volunteers. *Occup Environ Med.*, **54** : 38-43.

Korinth, G., Goen, T., Lakemeyer, M., Broding, HC., Drexler, H. (2003). Skin strain and its influence on systemic exposure to a glycol ether in offset printing workers Contact Dermatitis., **49**: 248-254.

Kotuku, S., Takahashi, S., Suenaga, K. (1977) effects of ethanol on plasma free fatty acide in rabbits . *Alcohol.*, **12**:80-90.

Ku, W.W., Ghanayem, B.I., Chapin, R.E., Wine, R.N. (1994). Comparison of the testicular effects of 2-méthoxyéthanol (ME) in rats and guinea pigs, *Exp. Mol. Pathol.*, **61**: 119-133.

Ku, W.W., Win, R.N., Chae, B.Y., Ghanayem, B.I., Chapin, R.E. (1995). Spermatocyte toxicity of 2 methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**: 100-110.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (1997). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de l'environnement. Lavoisier, Tec Doc.

Larese, F., Fiorito, A., Dobetti, L., Furlan, G., Fernetich, E. , Bussani, R. (1994). Skin absorption of solvents: evaluation in experimental conditions. *Occup Hyg .*, **1**: 191-198.

Lee, K.P., Kinney, L.A. (1989). The ultrastructure and reversibility of testicular atrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the rat. *Toxicol. Pathol.*, **17(4) (Part 2)**: 759-773.

Lee, K.P., Kinney, L.A., Valentine, R. (1989). Comparative testicular toxicity of bis (2-methoxyethyl) ether and 2-méthoxyéthanol in rats. *Toxicology.*, **59**: 239-258.

Lemazurier, E., Lecomte, A., Robidel, F., (2003). Etude de la toxicité des éthers de glycol sur la reproduction et le développement de rongeurs en administration réitérée dans l'eau de boisson. *Toxicol. Rep.*, **00-102** : 8-27.

Lieber, CS. , John, DR., Mendelson, J. (1968) Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption , despite adequate dietary intake .*Trans.Assoc. Am . Physicians.*, **76**: 289-300.

Lockley, D.J., Howes, D. & Williams, F.M. (2002). Percutaneous penetration and metabolism of 2-ethoxyethanol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **180** : 74-82.

Lorente, C., Cordier, S., Bergeret, A., Walle, H.E., Goujard, J., Ayme, S., Knill-Jones, R., Calzolari, E. & Bianchi, F. (2000). Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scand. J. Work Environ. Health.*, **26** : 137-145.

Loveday, K.S., Anderson, B.E., Resnick, M.A., Zeiger, E. (1990). Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. V: Results with 46 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **16**: 272-303.

Lyman, W.J., Reehl, W.F. , Rosenblatt, D.H. (1982). *Handbook on chemical property estimation methods. Environmental behavior of organic compounds*, McGraw-Hill, New York (N.Y.).

Ma, H., An, J., Hsie, A.W., Au., W.W. (1993). Mutagenicity and cytotoxicity of 2-methoxyethanol and its metabolites in Chinese hamster cells (the CHO/HPRT and AS52/GPT assays). *Mutat. Res.*, **298**: 219-225.

Marie, J.L. (2002). Prévention des risques liés à la fabrication et à l'utilisation des éthers de glycol. *Travail Sécurité.*, **616**: 2-10.

Martoja, R., Martoja, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed Masson et Cie.* Paris.

Marz, J., Nohova, H. (1992). Percutaneous absorption of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health.*, **64** : 79-83.

Masella, R., Di benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. , Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, **16**: 577-586.

McGregor, D.B. (1984). Genotoxicity of glycol ethers. *Environ. Health Perspect.*, **57**: 97-103.

McGregor, D.B., Willins, M.J., McDonald, P., Holmström, M., McDonald, D., Niemeier, R.W. (1983). Genetic effects of 2-methoxyethanol and bis (2-methoxyethyl) ether. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **70**: 303-316.

Mebus, C.A., Welsch, F. (1989). The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid-induced developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**: 98-109.

Medinsky, MA., Singh, G., Bechtold, WE., Bond, JA., Sabourin PJ et al. (1990). Disposition of three glycol ethers administered in drinking water to male F3441N rats. *Toxicol Appl Pharmacol .*, **102**: 443-455.

Miller, R.R., Ayres, J.A. , Calhoun, L.L. , Young, J.T., McKenna, M.J.(1981). Comparative short-term inhalation toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in rats and mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **61**: 368-377.

Miller, R.R., Ayres, J.A., Young, J.T., McKenna, M.J. (1983). Ethylene glycol monomethyl ether. I. Subchronic vapor inhalation study with rats and rabbits, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **3**: 49-54.

Miyauchi, H., Tanaka, S., Nomiya, T., Seki, Y., Imamiya, S., Omae, K. (2001). N,N-Dimethylformamide (DMF) Vapor Absorption through the Skin in Workers [Short Communication]. *J Occup Health.*, **43** : 92-94.

Nagano, K., Nakayama, E., Koyano, M., Oobayashi, H., Adachi H., Yamada, T. (1979). Testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol mono alkyl ethers, *Jpn. J. Ind. Health.*, **21**: 29-35 [en japonais, avec résumé et tableaux en anglais].

Nagano, K., Nakayama, E., Koyano, M., Oobayashi, H., Nishizawa, T., Okuda, H., Yamazaki, K.(1984). Experimental studies on toxicity of ethylene glycol alkyl ethers in Japan, *Environ. Health.Perspect.*, **57**: 75-84.

Nagano, K., Nakayama, E., Oobayashi, H., Yamada, T., Adachi, H., Nishizawa, T., Ozawa, H., Nakaichi, M., Okuda, H., Minami, K., Yamazaki, K. (1981). Embryotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in mice. *Toxicology.*, **20**: 335-343.

Naito H. K. (1984). Cholestérol. In : Kaplan A et al. *Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* ; 1194 – 1206 and 437.

Nelson, B.K., Brightwell, W.S., Burg, J.R., Massari, V.J. (1984b). Behavioral and neurochemical alterations in the offspring of rats after maternal or paternal inhalation exposure to the industrial solvent 2-méthoxyéthanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **20**: 269-279.

Nelson, B.K., Conover, D.L., Brightwell, W.S., Shaw, P.B., Werren, D., Edwards, R.M., Lary, J.M. (1991). Marked increase in the teratogenicity of the combined administration of the industrial solvent 2-methoxyethanol and radiation in rats. *Teratology.*, **43**: 621-634.

Nelson, B.K., Setzer, J.V., Brightwell, W.S., Mathinos, P.R., Kuczuk, M.H., Weaver, T.E., Goad, P.T. (1984a). Comparative inhalation teratogenicity of four glycol ether solvents and an amino derivative in rats. *Environ. Health Perspect.*, **57**: 261-271.

Nelson, B.K., Vorhees, C.V., Scott, W.J., Hastings, L. (1989). Effects of 2 méthoxyéthanol on fetal development, postnatal behavior, and embryonic intracellular pH of rats, *Neurotoxicol. Teratol.*, **11**: 273-284.

NTP (National Toxicology Program). (1993). *NTP technical report on toxicity studies of ethyleneglycol ethers 2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol, 2-butoxyethanol (CAS Nos.109-864,110-80-5, 111-76-2) administered in drinking water to F344/N rats and B6C3F1 mice,*

U.S.Department of Health and Human Services, 122 . et annexes. (NTP Toxicity Report Series No.26; NIH Publication No. 93-3349).

Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). (2004). Lignes Directrices pour les Essais de Produits Chimiques. LD n°427 : Absorption cutanée, méthode *in vivo*. 13 avril 2004.

OMS (Organisation mondiale de la santé). (1993). Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoides avec le mucus cervical. Ed. INSERM.

OMS (Organisation mondiale de la santé). (1990). *2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol, and their acetates*, Programme international sur la sécurité des substances chimiques, Genève (Suisse) ,126 . (PISPC Critère d'hygiène de l'environnement 115).

Paul, M D., Foster, S., Diane, M., Moore sara, C. (1986). Testicular toxicity of 2- methox-acetaldehyde, A possible metabolite of ethylene glycolmonomethyl ether in the rat. *Toxicol. Lett.*, **32**: 73-80 .

Poon, R., Chu, TH., Bjamason, S. (1994). Inhalation toxicity study of methanol, toluene and methanol / toluene mixtures in rats: effects of 28-day exposure. *Toxicol Ind Health.*, **10**:231-245.

Rachamin, G., Kusiak, R., Wong, L., Guirguis, S. (1996) . *Exposure to glycol ethers in Ontarioworkplaces*, Section des études sur la santé et la sécurité, Direction de la santé et de la sécurité au travail, ministère du Travail de l'Ontario, janvier 1996.

Rao, K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R., Jr., Hayes, W.C., John, J.A., Miller, R.R. (1983). Ethylene glycol monomethyl ether II. Reproductive and dominant lethal studies in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **3**: 80-85.

Reader, S.C.J., Shingles, C., Stonard, M.D. (1991). Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: Evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **16**: 61-70.

Riddick, J., Bunger, W.B., Sakano, T.K., (1986) . *Organic solvents: physical properties and methods of purification*, 4e édition, John Wiley and Sons. New York (N.Y.). **1325**.

Riddle, M., Williams, W., Andrews, D., Copeland, C., Luebke, R., Smialowicz, R. (1992). Species and strain comparisons of immunosuppression by 2-methoxyethanol (ME) and 2-methoxyacetic acid (MAA). *Toxicologist* ., **12**: 177 (résumé 632).

Ritter, E.J., Scott, W.J., Jr., Randall, J.L., Ritter, J.M. (1985). Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology*., **32**: 25-31.

Rogozen, M.B., Rich, H.E., Gutman, M.A., Grosjean, D. (1987). *Evaluation of potential toxic air contaminants, Phase I*, State of California Air Resources Board, Sacramento (Calif.), 23 décembre 1987 (Rapport final Contrat A4-131-32).

Sabourin, P.J., Medinsky, M.A., Birnbaum, L.S., Griffith, W.C., Henderson, R.F. (1992a). Effect of exposure concentration on the disposition of inhaled butoxyethanol by F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* ., **114**: 232-238.

Sabourin, P.J., Medinski, M.A., Thurmond, F., Birnbaum, L.S., Henderson, R.F. (1992b). Effect of dose on the disposition of methoxyethanol, ethoxyethanol, and butoxyethanol administered dermally to male F344/N rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **19** : 124-132.

Saka, S., Bairi, A. & Guellati, M. (2003). Relations immuno-corticotropes dans un environnement nociceptif chez la ratte wistar. *J. Soc. Biol.*, **197** :67-71.

Savolainen, H. (1980). Glial cell toxicity of ethyleneglycol monomethylether vapor. *Environ. Res.*, **22**: 423-430.

Savolainen, M.J. , Jauhonen, V.P., Hassinen, I. (1977). Effects of clofibrate on ethanol induced metabolism : role of hepatic redox state and hormonal mechanism. *Biochem .pharmacol* ., **26**:425-431.

Schenker, M.B. (1996). Reproductive health effects of glycol ether exposure in the semiconductor industry. *Occup. Hyg.*, **2**: 367-372.

Schenker, M.B., Gold, E.B., Beaumont, J.J., Eskenazi, B., Hammond, S.K., Lasley,

B.L., McCurdy, S.A., Samuels, S.J., Saiki, C.L., Swann, S.H. (1995). Association of spontaneous abortion and other reproductive effects with work in the semiconductor industry. *Am. J. Ind. Med.*, **28**: 639-659.

Scientific Committee on Consumer Products. (2006c). The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 6th revision. Health and Consumer Protection. Directorate-General. European.

Samuels, D.M., Doe, J.E., Tinston, D.J. (1984). The effects on the rat testis of single inhalation exposures to ethylene glycol monoalkyl ethers, in particular ethylene glycol monomethyl ether. *Arch. Toxicol., Suppl.*, **7**: 167-170.

Scott, W.J., Fradkin, R., Wittfoht, W., Nau, H. (1989). Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology.*, **39**: 363-373.

Shih, TS., Wang, PY., Chen, CY., Smith, TJ., Hu, YP. (2000). Measurement of percutaneous uptake of 2-methoxy ethanol vapor in humans. *J Occup Environ Med.*, **42** :475-82.

Sleet, R.B., Greene, J.A., Welsch, F. (1988). The relationship of embryotoxicity to disposition of 2-méthoxyéthanol in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **93**: 195-207.

Sleet, R.B., Welsch, F., Myers, C.B., Marr, M.C. (1996). Developmental phase specificity and doseresponse effects of 2-methoxyethanol in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **29**: 131-139.

Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Luebke, R.W., Copeland, C.B., Andrews, D., Rogers, R.R., Gray, L.E., Laskey, J.W. (1991a). Immunotoxicity of 2-methoxyethanol following oral administration in Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **109**: 494-506.

Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Rogers, R.R., Copeland, C.B., Luebke, R.W.,

Andrews, D.L. (1991b). Evaluation of the immunotoxicity of orally administered 2-methoxyacetic acid in Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **17**: 771-781.

Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Williams, W.C. (1993). Methoxyacetaldehyde, an intermediate metabolite of 2-methoxyethanol, is immunosuppressive in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21**: 1-7.

Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Williams, W.C. (1994). Species and strain comparisons of immunosuppression by 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid, *Int. J. Immunopharmacol.*, **16(8)**: 695-702.

Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Williams, W.C., Copeland, C.B., Luebke, R.W., Andrews, D.L. (1992b). Differences between rats and mice in the immunosuppressive activity of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid. *Toxicology.*, **74**: 57-67.

Smialowicz, R.J., Williams, W.C., Riddle, M.M., Andrews, D.L., Luebke, R.W., Copeland, C.B. (1992a). Comparative immunosuppression of various glycol ethers orally administered to Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **18**: 621-627.

Smyth, H.F., Jr., Seaton, J., Fischer, L. (1941). The single dose toxicity of some glycols and derivatives, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **23**: 259-268.

Sparer, J., Welch, L.S., Mcmanus, K., Cullen, M.R. (1998). Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters. I. Evaluation of exposure. *Am. J. Ind. Med.*, **14(5)** : 497-507.

Stemmler, K., Mengon, W. , Kinnison , D.J. , Kerr, J.A., (1997). OH radical-initiated oxidation of 2- butoxyethanol under laboratory conditions related to the troposphere: product studies and proposed mechanism, *Environ. Sci. Technol.*, **31**: 1496-1504.

Stucker , M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgartl, H., Lubbers, DW. (2002). The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J Physiol.*, **538** : 985-94.

Swan, S.H., Beaumont, J.J., Hammond, S.K., VonBehren, J., Green, R.S., Hallock,

M.F., Woskie, S.R., Hines , C.J., Schenker, M.B. (1995). Historical cohort study of spontaneous abortion among fabrication workers in the semiconductor health study: agent-level analysis. *Am. J. Ind. Med.*, **28**: 751-769.

Swan, S.H., Forest, W. (1996). Reproductive risks of glycol ethers and other agents used in semiconductor manufacturing. *Occup. Hyg.*, **2**: 373-385.

Timbrell, J.A., Draper, R.P., Butterworth, M., Creasy, D.M. (1996). Detection of testicular toxicity of 2-methoxyethanol using urinary creatine. *Occup. Hyg.*, **2**: 153-160.

Toraason, M., Breitenstein, M. (1988). Prenatal ethylene glycol monomethyl ether (EGME) exposure produces electrocardiographic changes in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**: 321-327.

Toraason, M., Breitenstein, M.J., Smith, R.J. (1986a). Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) inhibits rat embryo ornithine decarboxylase (ODC) activity. *Drug Chem. Toxicol.*, **9**: 191-203.

Toraason, M., Niemeier, R.W., Hardin, B.D. (1986b). Calcium homeostasis in pregnant rats treated with ethylene glycol monomethyl ether (EGME). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **86**: 197-203.

Toraason, M., Stringer, B., Smith, R. (1986c). Ornithine decarboxylase activity in the neonatal rat heart following prenatal exposure to ethylene glycol monomethyl ether. *Drug Chem. Toxicol.*, **9**(1): 1-14.

Toraason, M., Stringer, B., Stober, P., Hardin, B.D. (1985). Electrocardiographic study of rat fetuses exposed to ethylene glycol monomethyl ether (EGME). *Teratology.*, **32**: 33-39.

Traynor, M.J., Wilkinson, S.C., Williams, F.M. (2007). The influence of water mixtures on the dermal absorption of glycol ethers. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **218** : 128-134.

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). (1986). *Health and environmental effects profile for 2-methoxyethanol*, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati (Ohio) (EPA/600/x-87/025; NTIS PB89-119531).

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). (1992). Initial submission: Letter from Eastman Kodak Co. to Office of Toxic Substances regarding toxicity studies of nine glycol ethers with attachments and cover letter dated 092892 (Doc #88-920008915; NTIS/OTS0570960).

- Vachhrajani, K. D.** (2005) Earlier changes in seminiferous epithelium of rats exposed to ethylene glycol monomethyl ether. *Journal of cell and tissue resarchy.*, **5 (1)** : 303-308.
- Vachhrajani, K.D., Dutta, K.K.** (1992). Stage specific effect during one seminiferous epithelial cycle following ethylene glycol monomethyl ether exposure in rats. *Ind. J. Exp. Biol.*, **30**: 892-896.
- Van Hemmen, JJ., Auffarth J., Evans, PG., Rajan-Sithamparanadarajah, B., Marquart H.**(2003). Oppl R RISKOFDERM : risk assessment of occupational dermal exposure to chemicals. An introduction to a series of papers on the development of a toolkit. *Ann Occup Hyg.*, **47** : 595-8.
- Venier, M., Adami, G., Larese, F., Maina, G., Renzi, N.** (2004) .Percutaneous absorption of 5 glycol ethers through human skin in vitro . *Toxicol in vitro .*, **18**: 665-671.
- Villalobos-Pietrini, R., S., Gómez-Arroyo, Altamirano-Lozano, M., Orozco, P., Ríos, P.** (1989). Cytogenetic effects of some cellosolves. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, **5**: 41-48.
- Wang, W., Win, R.N., Chapin, E.** (2000). Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **163** : 125-134.
- Ward, S., Wall, C., Ghanayem, Gl.** (1992). Effects of 2-butoxyethanol (BE) and its toxic metabolite, 2butoxyacetic acid (BAA) on blood from various mammals in vivo and in vitro. *Toxicologist .*, **12** : 282.
- Weckbeker, G., Cory, J.G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters.*, **40** : 257-264.
- Welch, L.S., Cullen, M.R.** (1988). Effect of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: III. Hematologic effects. *Am. J. Ind. Med.*, **14**: 527-536.
- Welch, L.S., Schrader, S.M., Turner , T.W. , Cullen, M.R.** (1988). Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction. *Am. J. Ind. Med.*, **14**: 509-526.

Welsch, F. (2005). *Toxicology Letters*. **156** : 13-28.

Welsch, F., Sleet, R.B. (1987). Metabolism and disposition of a teratogenic dose of 2-méthoxyéthanol (ME) in pregnant CD-1 mice. *Teratology.*, **36**: 16A.

Whittaker, S.G., Zimmermann, F.K., Dicus, B., Piegorsch, W.W., Fogel, S., Resnick, M.A. (1989). Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* — an interlaboratory study. *Mutat. Res.*, **224**: 31-78.

Wickramaratne, G.A. de S. (1986). The teratogenic potential and dose–response of dermally administered ethylene glycol monomethyl ether (EGME) estimated in rats with the Chernoff-Kavlock assay. *J. Appl. Toxicol.*, **6**: 165-166.

Williams Faith, M. (2004). EDETOX . evaluations and predictions of dermal absorption of toxic chemicals. *International Archives of Occupational and Environmental Health.*, **77** : 150-151.

Williams, W.C., Riddle, M.M. , Copeland, C.B., Andrews, D.L., Smialowicz, R.J. (1995). Immunological effects of 2-methoxyethanol administered dermally or orally to Fischer 344 rats, *Toxicology.*, **98**: 215-223.

Wilkinson, SC., Williams, FM. (2002) .Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin in vitro . *Int Arch Occup Environ Health.*, **75**: 519-527.

World Health Organization (W.H.O). (2006). Environmental Health Criteria Series – N°. **235**-[en ligne].[consulté le 15/11/2008]. Disponible sur :

http : // www.inchem.org/documents/ehc235.pdf.

Yoon, C.Y., Hong, C.M., Cho, Y.Y., Chang, Y.H., Min, H.K., Yun, Y.W., Lee, B.J., Yang, K.H., Lee, Y.S., Kim, C.K. (2003). Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats. *J. Vet. Med. Sci.*, **65(2)**: 207-212.

Zeiger E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. (1992). *Salmonella* mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* , **19 (Suppl. 21)**: 2-141.

Zimmermann, F.K., Mayer, V.W, Scheel, I., Resnick, M.A. (1985). Acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, acetonitrile and other polar aprotic solvents are strong inducers of aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **149**: 339-351.

Zissu, D. (1995). Experimental study of cutaneous tolerance to glycol ethers, *Contact Dermatitis* **32**:74-77.



Annexes

Annexes

Composition des solutions, des tampons et des réactifs :

1. Dosage du glutathion:

- **Solution d'EDTA (0.02 M)**

- EDTA.....7.4448 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

- **Solution de SSA (0.25 %)**

- SSA.....0.25 g.
- Eau distillée..... 100 ml.

- **Tampon Tris +EDTA (0.4 M Tris + 0.02 M EDTA, pH = 9.6)**

- Tris.....63.04 g.
- EDTA.....7.4448 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

- **Solution de DTNB (0.01 M)**

- DTNB.....3.96 g.
- Méthanol absolu..... 1000 ml.

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

- **Réactif de Bradford**

- Bleu de Coomassie (G 250)0.1 g.
- Ethanol (95 %).....50 ml.

Agitation pendant deux heures (agitateur magnétique) puis ajouter :

- Acide Orthophosphorique (85%).....100 ml.
- Eau distillée..... 1000 ml.

Ce réactif doit être filtré puis conservé pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

3. Préparation du Bouin alcoolique (100 ml) :

- Solution d'acide picrique 1 % dans de l'éthanol (95 %).....45 ml.
- Formol26 ml.
- Acide acétique07ml.
- Eau distillée22 ml.