

N° Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de **Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**L'effet néfaste de l'éthylène Glycol Mono- méthyle éther
(EGME) sur la reproduction chez les lapins impubères
(*Oryctolagus Cuniculus*).**

Présenté par :

- DERADAR Souhila.
- DRAOUI Halima.
- ZIMOUCHE Imane.

Devant le jury composé de :

- Présidente : RIHANI Lamia.
- Examinateur : KADECHE Lilya.
- Promoteur : BENDJEDDOU Mouna.

Année Universitaire: 2018/2019

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir donné la force et le courage d'entamer et de finir ce mémoire dans les bonnes conditions.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements est le plus grand respect à notre encadreur Mme bendjeddou Mouna, d'avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétences :

Merci pour votre indéfectible disponibilité, votre rigueur scientifique et la confiance que vous nous accordée au cours de l'élaboration de ce mémoire, merci ainsi que pour l'acuité de vos critiques et pour vos conseils éclairés.

Nous voulons aussi remercier nos professeur de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années du notre parcours.

Nous désirons exprimer nos profonds remerciement aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail :

Mme RIHANI Lamia qui nous a fait l'honneur de présider ce jury

Mme KADECHE Lilya qui a bien voulu examiner ce travail.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Grand merci

Dédicace

« La réussite ne se trouve pas dans la meilleure des places, la plus haute ou la plus payante mais dans le maximum qu'on peut tirer de soi-même ».

RENAUD TREMBLAY

Je dédie ce travail :

En termes d'amour et de fidélité, je dédie ce mémoire,

À ma mère rebiha son vent Allah et sa concubine spacieuse, c'était sa volonté et lui m'aiment une forte incitation à compléter les titres de l'école.

À mon très cher père sebti, qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite. Quoique je fasse, je ne pourrai vous rendre ce que vous avez fait pour moi, je dois toute ma vie et tous mes succès pour vous, puisque si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous.

Que vous garde et vous protège pour nous.

À mon petit frère : marwan

À mes sœurs : Farida, youssra

La personne plus proche de mon cœur : mon grand-mère, pour leur aide et leurs encouragements.

À toute ma famille surtout : mon oncle abed aarazake et leur épouse Fatiha, ma tante karima.

À mes amis : Zinabe, Jihan, Siham, Manal, Samira, Zahra, Ilham.

À tous mes camarades de promotion pour ces années mémorables.

Imane

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A mon très chère père Mohamed Tahar, le premier et le dernier homme de ma vie, source d'amour, d'affection, de générosité et de sacrifices. Tu étais toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec les précieux conseils. Que ce travail soit le témoignage des sacrifices que vous n'avez cessé de déployer pour mon éducation et mon instruction. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'admiration que je porte au grand homme que vous êtes. Puisse Dieu le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A ma très chère mère Simoucha, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes frères: Mansour, Salim, Ahmed, Aziz et Noriddin, et mes sœurs Mounira, Zahira et Dalila, qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A mes amis : Noura, Mimi, Habiba, Amel, Samira, Fayza, Fatima, Lamia, Fahima, Djamila, Djouhra, Sara, Dalila, Chriifa, Nadjla, Halima, Iman, Ilham, Siham.

A ma famille et toutes les personnes que j'aime.

A tous mes camarades de promotion pour ces années mémorables.

Souhila

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance...

Je dédie ce travail

A mes chers parents Massoud et Naima.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes chers et adorable frères et sœurs : Siham, Sabrina, Rami, Maria, Chahla, Ayoub.

A mes amis de toujours : Hanane, Hasna, Massaouda, Dounia, Souhila, Iman, Farial, Samira, Ilham, Nadjla, Amel, Fatan, Faiza, Zohra.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail à tous ceux que j'ai omis de citer.

A tous mes camarades de promotion pour ces années mémorables.

Halima

Résumé:

Dans ce travail, nous visons à étudier l'effet négatif de l'éthylène glycol mono méthyl éther (EGME) sur certains indicateurs de la reproduction et certains paramètres biochimiques chez les lapins mâles d'*Oryctolagus Cuniculus*, impubères où la peau de ces animaux reçoit une injection d'éthylène glycol monométhyl éther à raison de 200 ppm une fois par jour en moyenne 6 jours par semaine et pendant quatre semaines consécutives.

Après avoir étudié le poids testiculaire et le poids de l'épididyme, quelques paramètres biologiques des spermatozoïdes (concentration, mobilité, vitesse et vitalité) et le taux de la testostérone, et quelques paramètres biochimiques (cholestérol), résultats ont montré ce qui suit:

Une diminution non significative du poids des testicules et une baisse très hautement significative du poids de l'épididyme chez les individus traités avec EGME par rapport au groupe témoin.

Variation et diminution du taux de reproduction (diminution des indicateurs biologiques du sperme tels que la concentration, la mobilité et la vitesse) chez le lot traité à l'EGME par rapport au groupe témoin.

Les résultats ont montré une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes morts et une diminution du pourcentage de spermatozoïdes vivants observé dans la cohorte EGME par rapport à la cohorte témoin.

En ce qui concerne la testostérone, son rapport plasmiatique était faible chez le lot traité à l'EGME par rapport au groupe témoin.

De plus, les résultats révèlent qu'il ya une augmentation significative du taux de cholestérol chez le lot traité par rapport au témoin.

En conclusion, cette étude a montré que l'éthylène monoéthylglycol éther a un effet toxique sur la fertilité et les paramètres de reproduction.

Mots clés: l'éthylène glycol mono méthyle éther (EGME), *Oryctolagus cuniculus*, testicule, épидidyme, testostérone, toxicité, lapin.

Summary:

In this work, we aim to investigate the negative effect of ethylene glycol mono methyl ether (EGME) on certain reproductive indicators and biochemical parameters in male rabbits of *Oryctolagus Cuniculus*, prepubescent where the skin of these animals receives injection of ethylene glycol monomethyl ether at a rate of 200 ppm once a day on average 6 days a week and for four consecutive weeks.

After studying the testicular weight and weight of the epididymis, some biological parameters of sperm (concentration, mobility and speed) and the rate of testosterone, and some biochemical parameters (cholesterol), results showed the following:

A non-significant decrease in testicular weight and a very highly significant decrease in epididymal weight in EGME-treated individuals compared to the control group.

Variation and decrease in reproduction rate (decrease in sperm biological indicators such as concentration, mobility and speed) in the EGME-treated group compared with the control group.

The results showed an increase in the percentage of dead spermatozoa and a decrease in the percentage of live spermatozoa observed in the EGME cohort compared to the control cohort.

With respect to testosterone, its plasmid ratio was low in the EGME-treated lot compared to the control group.

In addition, the results reveal that there is a significant increase in cholesterol level in the batch treated compared to the control.

In conclusion, this study has shown that ethylene monoethylglycol ether has a toxic effect on fertility and reproductive parameters.

Key words: ethylene glycol monomethyl ether, *Oryctolagus cuniculus*, testicular, epididymis, testosterone, toxicity, rabbit.

الملخص:

نهـدف من خـلال هـذا العـمل إـلى درـاسة التـأثير السـلبـي لـلأثير مـونومـيثـيل غـليـكول الـايـثـيلـين (EGME) عـلى بـعض مـؤشـرات التـكاثـر وكـذلك بـعض المـؤشـرات البـيوكـيميائـية عـند ذـكور الأـرانب من نـوع (Oryctolagus) cuniculus ، ما قـبل البـلوغ حـيـث يـحقن جـلد هـذه الحـيوانـات بـالأثير مـونومـيثـيل غـليـكول الـايـثـيلـين بـجرعة 200ppm يـومـيا ، كـما أن الحـقن يـكون مـرة فـي الـيـوم بـمعدـل 6 أـيام فـي الأـسبـوع لـمـدة أربـعة أسـابـيع مـتـعاقـبة .

بـعد درـاسة وـزن الخـصية والبـريـخ وبـعض المـؤشـرات البـيولـوجـية للـحيوانـات المـنوية (الـتركـيز، التـنقـل الحـيوية والسـرعة) وهـرمون التـيسـتوسـتيرون ، وبـعض المـؤشـرات البـيوكـيميائـية (الكولـسترول) اظـهـرت النـتـائـج ما يـلي :

انـخـفاـض غـير مـهم فـي وـزن الخـصية وانـخـفاـض كـبير لـلغايـة فـي وـزن البـريـخ فـي الأـفـراد الذـين عـولجـوا بـالـ "EGME" مـقارنـة مـع الفـوج الشـاهد.

تـذبـذب وانـخـفاـض فـي مـعدلات الإـنـجاب (انـخـفاـض فـي المـؤشـرات البـيولـوجـية للـحيوانـات المـنوية كـالـتركـيز، السـرعة ،الحـركة والتـنقـل) عـند الفـوج المـعامـل بـالـ "EGME" مـقارنـة بـالفـوج الشـاهد.

كـما اظـهـرت لـنا النـتـائـج فـيـما يـخص حـيوية الحـيوانـات المـنوية أن هـناك زيـادة فـي نـسبة النـطاف المـيتة و فـي المـقابـل تـناقص فـي نـسبة النـطاف الحـية الذـي لـوحـظ عـند حـيوانـات الفـوج المـعامـلة بـالـ "EGME" مـقارنـة بـالفـوج الشـاهد ، طـبعا كان هـذا بـعد اجـراء تـلوين أسـاسـي عـلى مـستوى هـذه النـطاف.

أـما فـيـما يـخص هـرمون التـيسـتوسـتيرون فـنسبـته البـلازمـية كـانت أـيضا مـنخـفضة عـند الأـرانب المـعالـجة مـقارنـة بـالفـوج الشـاهد.

بـالإضـافة إـلى ذـلك، تـكشـف النـتـائـج أن هـناك زيـادة كـبيرة فـي مـستوى الكولـسترول فـي الدـفعة المـعالـجة مـقارنـة بـالفـوج الشـاهد.

وفـي الخـتام ،اظـهـرت لـنا هـذه الدـراسـة ان الإـثير مـونومـيثـيل غـليـكول الـايـثـيلـين له تـأثير سـام عـلى الخـصوبة وعـلى بـعض مـؤشـرات التـكاثـر وكـذلك بـعض المـؤشـرات البـيوكـيميائـية.

الكلمات المفتاحية : الإـثير مـونومـيثـيل غـليـكول الإـيـثـيلـين ،Oryctolagus cuniculus ،الخـصية ،البـريـخ ،التـيسـتوسـتيون ،سـمية ،أـرنـب.

LISTE D'ABREVIATIONS

LISTE D'ABREVIATIONS

ADH :	Alcool déshydrogénase.
ALDH :	Aldéhyde déshydrogénase.
BAA :	Acide butoxyacétique.
BALD :	Butoxyaldéhyde.
CAS :	Chemical Abstracts Service.
CO₂ :	Dioxyde de carbone.
COOH :	Groupement carboxyle.
DEGDME:	Diéthylène glycol diméthyle éther.
DEGEE:	Diéthylène glycol éthyl éther.
DEGME:	Diéthylène glycol méthyle éther.
DL:	Dose létale.
DO:	Densité optique.
EAA:	Acide éthoxyacétique.
EALD:	Ethoxyaldéhyde.
EG:	Ethers de glycol.
EGBE:	Ethyl glycol n-butyl ether.
EGBEA:	Ethylène glycol butyl ether acetate.
EGE:	Ethylène glycol ether.
EGEE:	Ethylène glycol mono éthyle ether.
EGME:	Ethylène glycol mono méthyle ether.
FSH:	Hormone stimulante de la folliculogénèse.
INRS :	Institut national de la santé et de la recherche médicale.

LISTE D'ABREVIATIONS

LH :	Hormone lutéinisante.
MAA :	Acide méthoxyacétique.
MALD :	Méthoxyaldéhyde
Ppm :	Partie par million.



Liste des Figures

LISTE DES FIGURES

Figures	Titre	Page
01	Structure générale des différents types de dérivés des glycols de série E et série P.	06
02	Synthèse des éthers de glycol.	08
03	Métabolisme de l'EGME.	12
04	Lapin <i>Oryctolagus Cuniculus</i> .	19
05	Formule de l'EGME en 3D.	20
06	Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono methyl (EGME).	20
07	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	23
08	Fragment d'organe dans des boites contenant du Bouin alcoolique.	30
09	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) des testicules chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI (n= 05).	35
10	Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) de l'épididyme chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME DI (n= 05).	36
11	Variation moyenne du nombre total des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (Nombre spz x 10 ⁶ /ml) entre les deux groupes (n=5).	37
12	Variation moyenne de la mobilité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) entre les deux groupes (n=5).	38
13	Variation moyenne de la vitesse des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) entre les deux groupes (n=05).	39
14	Variation moyenne de la vitalité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) (Après un test de coloration à l'éosine) entre les deux groupes (n=5).	40
15	Variation moyenne ($X \pm SD$) dans le taux de la testostérone (ng/ml) (n=5).	41
16	Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du cholestérol chez le lot témoin et les lots traités à l'EGME (n=05).	42

Liste des Figures

17	Variation de l'aspect histologique des testicules entre les 2 groupes (Gr x 100).	43
18	Les modifications histologiques de l'épididyme du lapin dans les différents groupes de traitement (Gr x 100).	44

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME.	07
02	Répartition des groupes et traitement des animaux.	21
03	Variation du poids du testicule chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n=05).	34
04	Variation du poids de l'épididyme chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n=05).	35
05	Variation du taux de concentration des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 05).	36
06	Variation du taux de mobilité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 5).	37
07	Variation du taux de vitesse des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 05).	38
08	Variation du taux de vitalité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 05).	39
09	Variation du taux de la Testostérone chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n=05).	40
10	Variation de la concentration du cholestérol chez le témoin (T) et le lot traité DI (n=05).	41

TABLE
DES
MATIERES

TABLE DES MATIERES

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les données générales sur les éthers de glycol	05
2. L'éthylène glycol monométhyl éther (EGME)	06
2.1. Définition	06
2.2. Identité et propriétés physico-chimiques	07
2.3. Caractérisation de la pénétration de l'EGME dans l'environnement	08
2.3.1. Synthèse.....	08
2.3.2. Production et utilisations	08
2.4. Devenir dans l'organisme	09
2.4.1. Absorption	09
2.4.2. Distribution.....	10
2.4.3. Métabolisme	11
2.4.4. Elimination	12
2.5. La toxicité chez l'animal.....	13
2.5.1. Toxicité aiguë	13
2.5.2. Toxicité chronique	13
2.5.3. Génotoxicité	14
2.5.4. Foetotoxicité.....	14
2.5.5. La toxicité pour la reproduction	14
2.5.6. La Toxicité pour le développement	16
2.6. La toxicité chez l'homme	17
2.6.1. Effets aiguë	17
2.6.2. Toxicité chronique.....	18

Chapitre II. Matériel et méthodes

1. Matériels	19
1.1. Matériel biologique.....	19
1.2. Matériel chimique	19
1.3. Condition d'élevages.....	21
2. Méthodologie	21
2.1. Protocole expérimental	21
2.2. Préparation des prélèvements	22
2.3. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine ...	24
2.4. Dosage des paramètres biochimiques	25
2.5. Etude histologique.....	27
2.6. Etude hormonal	30
3. Traitement statistique des résultats.....	33

Chapitre III : Résultats

1. Etude pondérale	34
1.1. Etat pondéral des organes	34
2. Etude de la reproduction.....	36
2.1. Concentration.....	36
2.2. Mobilité.....	37
2.3. Vitesse.....	38
2.4. Vitalité.....	39
2.5. Taux de testestosterone.....	40
3. Etude des paramètres biochimiques.....	41
3.1. Cholestérol.....	41
4. Etude histologique	42
4.1. Atteinte tissulaire au niveau des testicules	42

4.2. Atteinte tissulaire au niveau de l'épididyme43

CHAPITRE IV: DISCUSSION et CONCLUSION

Discussion.....45

Conclusion

Référence

INTRODUCTION

Introduction

Introduction :

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, l'humanité et le globe terrestre ont connu des perturbations graves au niveau de l'ensemble des écosystèmes et leurs constituants

vivants. Ces perturbations sont dues à l'utilisation intensive et spontanée des substances chimiques nécessaires dans les domaines agricoles, domestiques et industriels, citons : les pesticides, les solvants et les produits cosmétiques [1].

L'exposition aux produits chimiques déversés dans les différents écosystèmes représente un danger qui menace la survie des populations animales et végétales, l'homme actuellement a besoins d'utiliser ces produits pour des raisons industriels et/ou domestiques sans prendre en considération leurs effets sur la santé et l'environnement [1].

Le remplacement des solvants dangereux, par leur impact sur l'environnement ou la santé est un problème auquel sont confrontées les entreprises, les sociétés industrielles utilisatrices de solvants dans leurs procédés. Un grand nombre de solvants sont condamnés au vu des nouvelles directives nationales [2].et internationales concernant les composés organiques volatils (COV) et les solvants toxiques [3]. Parmi ces solvants figurent les éthers de glycol, utilisés dans de nombreuses applications industrielles en particulier dans les peintures [4].

Les éthers de glycol sont des solvants oxygénés dont l'usage s'est largement développé ces trente dernières années [5]. Dont l'utilisation s'est particulièrement développée depuis une soixantaine d'années. Ils entrent dans la composition de nombreux produits industriels ou domestiques (peintures, colles, vernis, encres, produits d'entretien. . .) mais aussi de cosmétiques, de médicaments, de produits vétérinaires [6]. 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 [7].

Les éthers dérivés de l'éthylène glycol ont été majoritairement employés dans un premier temps, puis progressivement remplacés par des dérivés du propylène glycol depuis les années 1990 en raison de la toxicité élevée de plusieurs des éthers de la série E [8].

Au Canada, la plus grande partie de l'éthylène glycol est utilisée dans les antigels (surtout pour les moteurs des véhicules automobiles, mais aussi pour le dégivrage des avions), soit 66 % (105 kilotonnes) de la consommation domestique [9].

Introduction

La pénétration cutanée de ces molécules est importante, d'autant plus que le poids moléculaire est faible [10]. et elle est accentuée par la mise en solution aqueuse, néanmoins la voie respiratoire ne peut pas être négligeable dans certaines conditions de température et d'hygrométrie. Ces substances se distribuent dans la plupart des compartiments biologiques y compris dans les tissus foetaux [11].

Leur caractère amphiphile leur confère une grande miscibilité dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques. De plus, 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 [5].

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 [11]. c'est la raison pour laquelle plusieurs recherches étudies l'effet des solvants sur la physiologie des êtres humains comme l'Éthylène Glycol Mono Méthyle Ether (EGME) qu'est l'un de ces produits [12].

EGME est l'éther de glycol le plus testé et sert en quelque sorte de molécule de référence pour les autres EG. Sur toutes les espèces animales (souris, rat, lapin), EGME induit une atteinte de l'appareil génital (atrophie) et de la fertilité chez le mâle ainsi qu'une atteinte du développement en cas d'exposition maternelle de nature tératogène et foetotoxique. Chez la femelle, une réduction significative du nombre de follicules ovariens a été mise en évidence chez la souris [13].

L'intoxication par l'éthylène glycol (EG) est rare mais grave [14]. Leurs métabolites semblent être plus toxiques que leurs produits initiaux [15].

Depuis la première publication de Nagano en 1979 [16], 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 [17].

Cependant, tous les éthers de glycol ne présentent pas le même niveau de toxicité, celle-ci étant liée au métabolisme, lui-même variable selon l'éther de glycol considéré [5]. Les dérivés de la série E sont métabolisés en aldéhydes puis en acides. Les acides

Introduction

méthoxyacétique pour l'EGME, et éthoxyacétique pour l'EGEE sont connus pour leur toxicité sur les fonctions de reproduction [18].

La toxicité des éthers de glycol sur la fonction de reproduction peut s'exprimer au niveau des organes reproducteurs (en particulier sur les gonades), du système endocrinien ou des événements qui font suite à la fécondation. Les manifestations d'une telle toxicité peuvent inclure des effets délétères sur la maturation sexuelle, la production, la qualité et le transport des gamètes à l'âge adulte, le comportement sexuel, la gestation et sur toutes les autres fonctions dépendantes de l'intégrité du système reproducteur. Les effets toxiques des éthers de glycol sur la fonction de reproduction se manifestent en particulier sur la fertilité (mâle ou femelle) et sur le développement, ces derniers pouvant se manifester par une toxicité maternelle chez la femelle gravide, une toxicité fœtale ou des malformations [19].

Notons dès à présent que les études de toxicité sur le développement doivent tenir compte d'une éventuelle toxicité maternelle pour ne pas entraîner d'erreurs dans l'interprétation des résultats car il est difficile de dissocier cette toxicité de l'effet tératogène. D'ailleurs, une toxicité maternelle chez la femelle gravide est fréquemment rapportée comme c'est le cas pour l'EGME [20; 21]. Dans toutes les études pour lesquelles une toxicité maternelle a été observée, il est toujours noté une diminution de la prise d'aliments par la mère et/ou une diminution de la prise de poids durant la gestation [5].

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) [22].

Les études publiées depuis l'expertise Inserm de 1999 confirment l'importante pénétration cutanée des éthers de glycol, ainsi que la variabilité de pénétration en fonction de l'espèce, du modèle d'étude utilisé et des conditions environnementales. Globalement, le passage transcutané des éthers de glycol est plus faible chez l'homme que chez le rat ; il est augmenté en atmosphère chaude et humide [19].

La publication dans les années mille neuf cent quatre-vingt de travaux expérimentaux montrant la toxicité de deux éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol (l'éther méthylique ou EGME et l'éther éthylique ou EGEE) a conduit le Conseil des Communautés Européennes à arrêter une directive imposant des restrictions d'usage et de marché pour ces deux éthers de glycol et leurs acétates. En France, trois arrêtés et deux

Introduction

décisions de 1997, 1998, et 1999 ont interdit leur utilisation dans les produits à usage domestique, dans les cosmétiques et les médicaments [5].

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 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, les caractères physico-chimiques, utilisation et les effets sur la santé.
- Le second est une étude expérimentale, dans laquelle nous présentons le matériel et les méthodes, 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. Les données générales sur les éthers de glycol :

Les éthers de glycol (EG) forment une famille de solvants mis sur le marché dans les années 1930. En raison de leurs propriétés amphiphiles (capacité de mélanger l'eau et les solvants organiques) et de leur faible toxicité aiguë, ils ont été utilisés massivement à partir des années 1960 comme solvants des résines polyuréthanes, époxydiques, vinyliques et acryliques, principalement dans les produits dits « à l'eau ». Leur usage était industriel et domestique : peintures, encres, vernis, produits d'entretien, fluides de coupe, phytosanitaires, carburants aéronautiques, produits photographiques... Une utilisation non négligeable a eu lieu dans les cosmétiques (laques, désodorisants) et même comme excipient de médicament (EGEE dans deux médicaments antiacné).

Les EG se subdivisent en deux grands groupes :

- La série E, dite aussi éthylénique, comprend les dérivés de l'éthylène glycol, de nom générique alkoxyéthanol et de formule chimique $R-O-CH_2-CH_2-OH$;
- La série P, dite aussi propylénique, comprend les dérivés du propylène glycol, de nom générique alkoxypropanol et de formule chimique $R-O-CH_2-CH(CH_3)-OH$ [23].

Les éthers de glycol sont des composés liquides, incolores, à odeur légèrement étherée. Ils sont modérément volatils avec une tension de vapeur variant de 0,9 à 12,5 mmHg et d'une viscosité moyenne, d'où leur emploi très aisé comme solvant ou co-solvant [24].

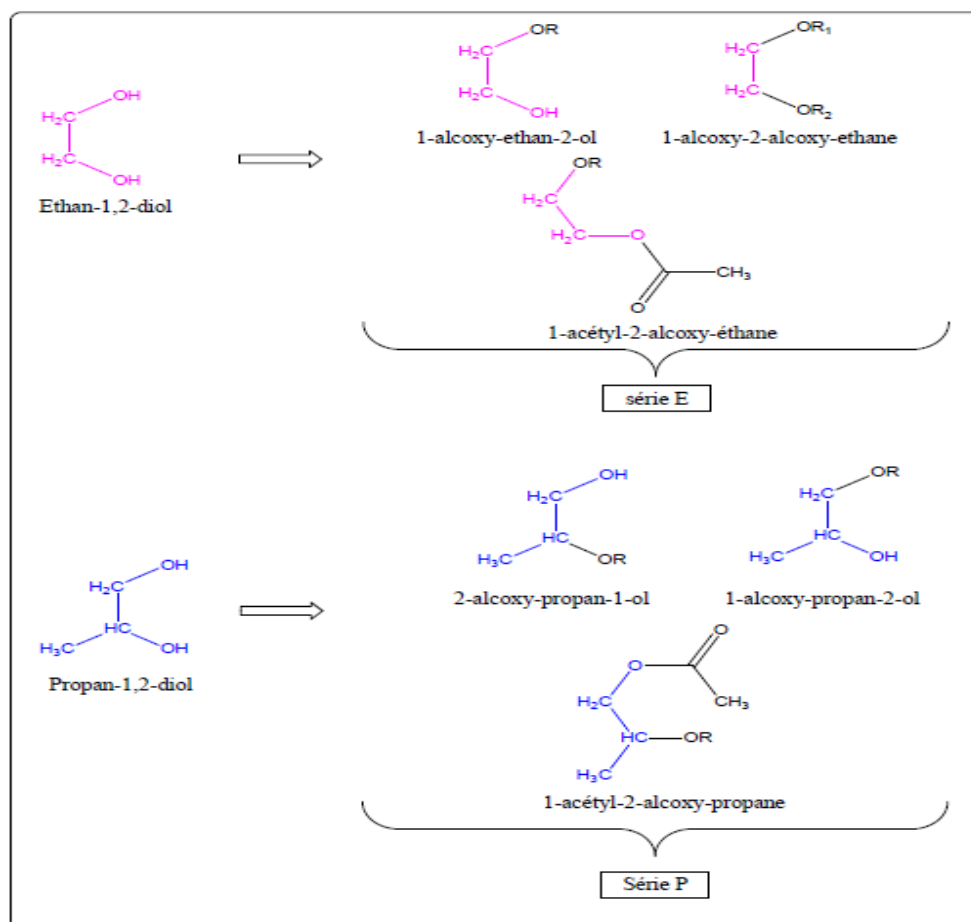


Figure 01: Structure générale des différents types de dérivés des glycols de série E et série P [4].

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

2.1. Définition :

L'EGME fait partie des dérivés de l'éthylène glycol (série E) : $\text{R-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$: 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 [25]. Ces acides alkoxyacétiques sont responsables d'effets toxiques sur la reproduction, notamment l'acide méthoxyacétique (MAA), métabolite de l'éthylène glycol monométhyl ether (EGME) [26; 27].

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) [12].

L'éthylène glycol monométhyl éther est un liquide visqueux et incolore, d'une solubilité de 500 000 mg/L dans l'eau [28]. Son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ($\log K_{oe}$) est de $-0,77$ [29]; il a une tension de vapeur de 1 300 Pa à 25 °C [30] et une constante de la loi de Henry égale à 0,198 Pa·m³/mole (valeur théorique) [28]. Le facteur de conversion de l'EGME dans l'air correspond à 1 ppm = 3,11 mg/m³ [8].

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

Tableau 01: Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME [12].

Paramètre	Valeur /description	Référence
Nom chimique	2-méthoxyéthanol (ou éthylène glycol méthyle éther ou éthylène glycol monométhyl éther)	[31]
Numéro CAS	109-86-4	[31]
Numéro EINECS	203-713-7	[31]
Formule chimique	$C_3H_8O_2$	[31]
Etat physique	Liquide incolore	[31]
Poids moléculaire	76,09 g.mol ⁻¹	[31]
Tension de vapeur	13 hPa (25°C)	[32]
Solubilité	Complètement soluble dans l'eau	[33]
Températures d'ébullition/fusion	123-126°C / -85°C	[31]
Point d'éclair	37-39°C En coupelle fermée	[31]

Limites d'explosibilité	(En volume) Limite inférieure : 2,4% Limite supérieure : 20%	[31]
Facteurs de conversion à 20°C et 1013 hPa	1ppm = 3,11mg/m ³ 1mg /M ³ =0,32 ppm	[31]

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

2.3.1. Synthèse:

Les éthers monoalkylés de la série E sont obtenus par la réaction de l'oxyde d'éthylène sur un alcool [34].

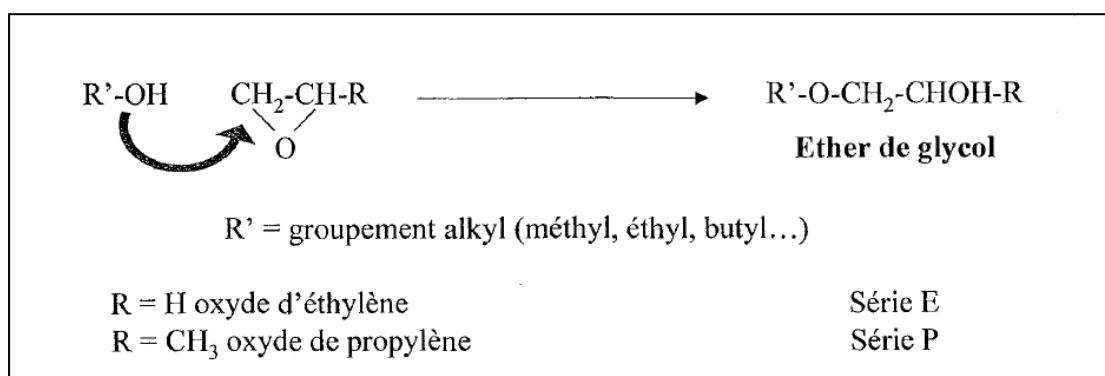


Figure 02 : Synthèse des éthers de glycol [34].

2.3.2. Production et utilisations :

La capacité de production mondiale totale d'éthylène glycol dépasse les 10 000 kilotonnes par année et on s'attend à des augmentations importantes en 2000 et 2001 [9]. La production de fibre et de PETE explique la demande mondiale d'éthylène glycol [35].

L'utilisation des éthers de glycol de série éthylénique remonte aux années trente. L'éthylène glycol méthyl éther (EGME) était utilisé comme solvant sous le nom de méthylcellosolve (*Union Carbide*). Ce nom commercial de cellosolve provient d'un des premiers usages des éthers de glycol éthyléniques comme solvant des nitrocelluloses. Mais c'est dans les années soixante, et surtout soixante-dix, avec le développement des peintures polyuréthanes et époxydiques d'une part et des peintures à l'eau (acryliques, vinyliques) d'autre part, que leur emploi va s'amplifier [36 ; 37 ; 38 ; 39].

2.4. Devenir dans l'organisme :

Du fait de leur caractère amphiphile, les éthers de glycol traversent facilement les membranes et se répartissent dans les compartiments aqueux et lipidiques. Absorbés de manière importante quelle que soit la voie de pénétration (orale, cutanée, pulmonaire), ils se distribuent dans la plupart des tissus biologiques, y compris dans les tissus fœtaux. Cependant, les données précises de distribution relatives à chaque éther de glycol restent éparses. Les systèmes enzymatiques transforment ensuite les éthers de glycol en composés hydrosolubles plus facilement éliminés ou en métabolites réactifs, responsables de manifestations toxiques [19].

2.4.1. Absorption :

De façon globale, en raison de leur structure chimique et solubilité, les éthers de glycol sont rapidement absorbés que ce soit par voie digestive, pulmonaire ou cutanée [40].

2.4.1.1. Absorption par voie digestive :

➤ Chez l'animal

A l'exception des poly-éthers de glycol ayant un nombre de résidus éther supérieur à 5, tous les éthers testés pénètrent en totalité dans l'organisme par voie orale, un très faible pourcentage (moins de 5 %) se retrouvant inchangé dans les fèces [10].

2.4.1.2. Absorption par voie respiratoire :

➤ Chez l'homme

L'absorption par la voie respiratoire de certains éthers de glycol (EGME, EGEE, EGBE) varie de 50 à 80 % chez des volontaires exposés expérimentalement [41 ; 42]. Une fraction négligeable d'éthers de glycol est exhalée à la fin de l'exposition [10].

➤ Chez l'animal

La pénétration par inhalation est proportionnelle aux concentrations des composés. L'absorption est optimale dans le cas de faibles concentrations: la relation entre la concentration atmosphérique et la dose absorbée est linéaire quand la première est inférieure à 50 ppm, puis diminue au-delà. Elle est augmentée lorsque les

animaux ont été prétraités avec de l'éthanol. Cette absorption diminue en fonction de la tension de vapeur du composé, et donc lorsque la taille de la molécule augmente [10].

2.4.1.3. L'absorption par voie cutanée :

L'expertise Inserm de 1999 rapportait que l'absorption des éthers de glycol par voie cutanée est très importante pour la plupart d'entre eux. La pénétration cutanée varie de 20 à 2 800 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{cm}^{-2}$, en fonction inverse du poids moléculaire. Ce mode de pénétration est facilité lorsque les éthers de glycol sont en solution aqueuse ou éthanolique et/ou lorsque la température ambiante est élevée. Après exposition aux « vapeurs » ou aérosols d'EGBE, les mesures indiquent que la pénétration par la peau peut être quantitativement plus importante que par voie pulmonaire. La perméabilité de la peau humaine aux éthers de glycol est inférieure à celle de la peau des rongeurs avec des rapports rat/homme de 2 à 30 selon les composés [19].

2.4.2. Distribution :

➤ **Chez l'animal :**

Suite à l'administration d'EGME radiomarqué chez la souris, la radioactivité est préférentiellement retrouvée au niveau du foie, de la vessie, des reins, de la moelle osseuse et de l'épididyme [43].

Passage placentaire et distribution chez le fœtus :

Le passage placentaire a été étudié chez l'animal. L'EGME et le DEGDME principalement se retrouvent dans les fœtus, après administration à des souris gravides, à des concentrations supérieures aux concentrations sanguines maternelles [10]. Administré par gavage à la souris gravide au II^{ème} jour de gestation, l'EGME est distribué à travers le compartiment maternel et fœtal [17].

➤ **Chez l'homme :**

Quelle que soit la voie d'administration, les éthers de glycol accèdent à tous les compartiments dans les minutes qui suivent l'absorption [10]. Chez l'homme exposé à 20 ppm d'EGBE, le volume de distribution a été estimé à 0,7 l/kg [40]. Quelques heures après l'exposition, de fortes concentrations se retrouvent dans le foie, les reins

et les graisses. Les concentrations tissulaires sont alors supérieures aux concentrations circulantes [24].

2.4.3. Métabolisme :

Les éthers de glycol absorbés sont très rapidement métabolisés. La voie métabolique prédominante est un processus de biotransformation hépatique oxydatif faisant intervenir de manière prépondérante l'alcool déshydrogénase (ADH), puis l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Ce processus aboutit pour la majorité d'entre eux à la production de métabolites acides dont certains sont bien plus toxiques que le produit d'origine [24].

Les dérivés monosubstitués de l'éthylène glycol, du diéthylène glycol et du triéthylène glycol (série E) possèdent une fonction alcool primaire et sont transformés majoritairement en aldéhydes (alcoxyacétaldéhyde) et en acides (alcoxyacétiques) par des alcools et des aldéhydes déshydrogénases. La désalkylation par des mono-oxygénases de type P450, générant de l'éthylène glycol et de l'alcool puis du CO₂, représente une voie métabolique minoritaire. La fonction alcool primaire des dérivés du diéthylène ou du triéthylène glycol est également transformée en aldéhydes et acides du diéthylène ou triéthylène glycol [1].

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 [44].

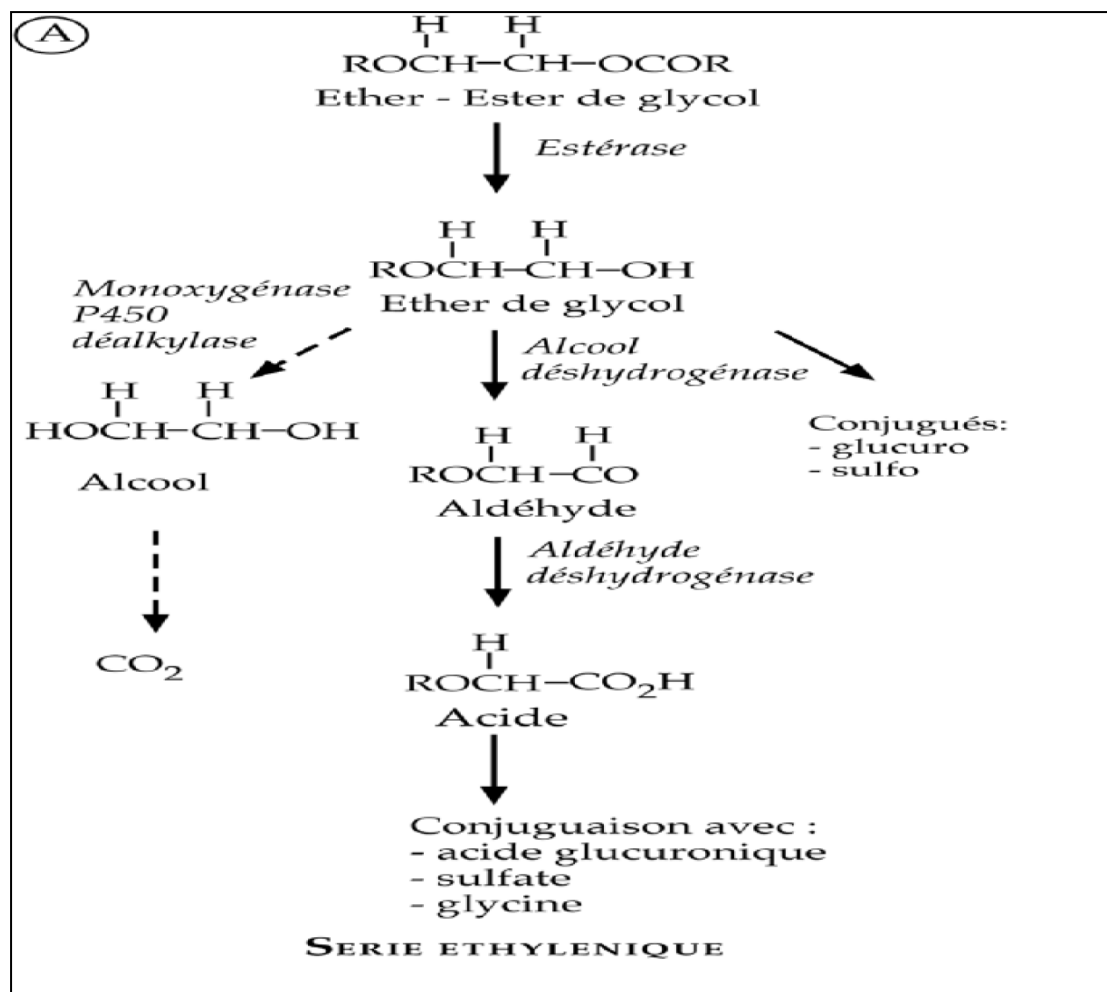


Figure03: Métabolisme de l'EGME [10].

Ces résultats montrent que l'EGME peut entrer dans le cycle de Krebs via la formation de méthoxyacétyl-Coenzyme A [45].

2.4.4. Elimination :

L'expertise Inserm de 1999 rapporte que les éthers de glycol sont rapidement métabolisés, le temps de demi-vie plasmatique étant de l'ordre de 20 à 30 minutes. Il varie cependant selon les éthers de glycol, les espèces animales et les modes d'administration [19]. Les taux d'élimination sont également très différents selon les cas [24].

De plus, la vitesse d'élimination urinaire des métabolites acides, obtenus suite à la dégradation enzymatique de certains éthers de glycol de la série E, dépend de la longueur de la chaîne de la fonction éther. Ainsi, les éthers à chaînes longues sont plus facilement éliminés que les dérivés méthylés ou éthylés. Cette vitesse

d'élimination plus rapide permet d'obtenir des concentrations plasmatiques plus faibles des intermédiaires nocifs acides et aldéhydes [46].

A titre de comparaison, la demi-vie d'élimination urinaire de l'acide méthoxyacétique chez l'homme a été évalué à 77 heures [47]. Cette élimination plus longue peut être l'un des facteurs expliquant la toxicité plus importante de l'EGME comparé à EGEE [24].

Les temps de demi-vie biologique des acides alkoxyacétiques sont différents chez l'animal et chez l'homme. L'excrétion est plus lente chez l'homme. Pour le MAA, métabolite de l'EGME, et l'EAA, métabolite de l'EGEE, les temps de demi-vie chez l'homme sont respectivement de 77 et 42 heures, alors qu'ils ne sont que de 20 heures et 7 heures chez le rat [48].

2.5. La toxicité chez l'animal :

2.5.1. Toxicité aiguë :

Plusieurs travaux font état d'une mortalité par hémolyse intravasculaire avec différents EG (EGBE, EGBEA) chez les souris, rats et lapins après administration systémique. La toxicité aiguë est variable selon la voie d'administration et selon l'espèce. Chez le cobaye, la DL50 (dose létale 50 %) est de 1,5 à 2 g/kg [49].

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 [50 ; 51 ; 38].

2.5.2. Toxicité chronique :

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) [52].

2.5.3. Génotoxicité :

Les éthers de glycol dont la génotoxicité est démontrée in vitro sont l'EGBE, l'EGEE, l'EGME et le DEGME (et surtout leur métabolites le méthoxyaldéhyde [MALD], le butoxyaldéhyde [BALD], l'éthoxyaldéhyde [EALD], le BAA, le MAA et le EAA) [27].

Les éthers de glycol dont la génotoxicité est démontrée in vivo chez l'animal sont l'EGME et le DEGME (et surtout MALD) [27].

L'administration de DEGDME a été associée à une fertilité réduite chez le rat et à une morphologie anormale de la tête du sperme; il y avait une réponse létale dominante équivoque [53]. Il est probable que les effets indésirables in vivo de l'administration de DEGDME soient dus à la toxicité testiculaire plutôt qu'à la génotoxicité [54].

2.5.4. Foetotoxicité :

Certains EG ont une nette toxicité maternelle que ce soit par inhalation ou par ingestion chez la souris ou la lapine gestante, ce qui rend plausible l'hypothèse d'une foetotoxicité, non pas spécifique (directe), mais plutôt indirecte par le biais d'une toxicité maternelle [55].

2.5.5. La toxicité pour la reproduction :

La toxicité sur la fonction de reproduction est la survenue d'effets adverses sur le système de reproduction de l'un ou l'autre sexe résultant d'une exposition à des agents extérieurs. Cette toxicité peut s'exprimer au niveau des organes reproducteurs (au premier chef, les gonades), du système endocrinien associé (l'axe hypothalamo-hypophysogonadique) ou des événements qui font suite à la fécondation. Les manifestations d'une telle toxicité peuvent inclure des effets délétères sur la maturation sexuelle, la production et le transport des gamètes à l'âge adulte, le comportement sexuel, la gestation, et sur toutes autres fonctions dépendantes de l'intégrité du système reproducteur [5].

❖ Effets sur le système reproducteur des mâles :

Dès 1979, des chercheurs japonais ont signalé pour la première fois chez des mammifères des effets délétères de certains éthers de glycol sur le fonctionnement testiculaire. Depuis cette date, de nombreux travaux ont confirmé ces effets et souligné la très haute sensibilité du testicule à ces composés et la spécificité des lésions induites chez le rat, la souris, le chien ou le lapin [56]. Cette reprotoxicité se manifeste principalement par une atrophie testiculaire et une dégénérescence de l'épithélium germinale, avec diminution du nombre de spermatozoïdes, infertilité et anomalies morphologiques des spermatozoïdes [57 ; 56 ; 58].

La toxicité testiculaire de certains éthers de glycol s'observe de manière dose-dépendante, quelle que soit la voie de pénétration dans l'organisme. Elle est présente sur l'ensemble des espèces animales étudiées, et des données *in vitro* ont confirmé la susceptibilité du testicule humain [59].

L'effet testiculaire des éthers de glycol 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. Pour des faibles doses et/ou des expositions de courte durée, les lésions sont réversibles. Pour des expositions prolongées ou à fortes doses, les lésions peuvent toucher le pool des cellules souches (spermatogonies). Dans ce cas, l'arrêt de la spermatogenèse peut être définitif et le testicule s'atrophie. L'atteinte de la lignée germinale par certains éthers de glycol a plusieurs conséquences. En diminuant le niveau de production de spermatozoïdes, ces éthers de glycol diminuent le potentiel de fertilité pouvant aboutir à une stérilité. En atteignant les spermatocytes au stade pachytène, caractérisé par un intense processus d'échange des chromosomes homologues, la possibilité d'induire des mutations géniques ou chromosomiques et de les transmettre à la descendance n'est pas exclue [60].

L'EGME fait partie des toxiques testiculaires unanimement reconnus. Une littérature riche lui est consacrée, aussi bien sur la description des effets testiculaires que sur son mécanisme d'action [10].

❖ Effets sur le système reproducteur des femelles :

La toxicité des éthers de glycol sur la fonction de reproduction chez la femelle non gravide a été très peu étudiée. Chez l'animal, le seul indicateur recherché a été celui de la fertilité (femelles exposées et accouplées à des mâles non exposés). Au cours de ces dernières années, des travaux se sont intéressés aux effets des éthers de glycol sur le cycle ovarien [61].

Davis *et al* [61] ont montré que l'administration quotidienne de 300 mg/kg/j d'EGME par voie orale chez des rates adultes supprime, au terme de 3 à 8 jours d'exposition, le rythme du cycle ovarien sans induire d'autre effet systémique. Cet effet est accompagné d'une augmentation des taux circulants de progestérone alors que ceux de l'hormone stimulante de la folliculogénèse (FSH), de l'hormone lutéinisante (LH) et de la prolactine restent inchangés [61].

Au niveau histologique, une hypertrophie du corps jaune a été observée. Ces données combinées, suggèrent que les cellules lutéales ovariennes sont la cible primaire de l'EGME [5].

2.5.6. La Toxicité pour le développement :

Notons dès à présent que les études de toxicité sur le développement doivent tenir compte d'une éventuelle toxicité maternelle pour ne pas entraîner d'erreurs dans l'interprétation des résultats car il est difficile de dissocier cette toxicité de l'effet tératogène. D'ailleurs, une toxicité maternelle chez la femelle gravide est fréquemment rapportée comme c'est le cas pour l'EGME [20; 21]. Dans toutes les études pour lesquelles une toxicité maternelle a été observée, il est toujours noté une diminution de la prise d'aliments par la mère et/ou une diminution de la prise de poids durant la gestation [5]. La toxicologie du développement de l'EGME a été étudiée selon deux types de protocoles :

- Administration journalière pendant la durée de l'organogénèse (ou du moins dans sa plus grande partie) : dans ces travaux les doses élevées entraînent invariablement la mort de tous les foetus : 1000 mg/kg/j chez la souris selon Nagano et al [21] ; 264 mg/kg/j pour le rat selon Nelson et al [62] ; 35,8 mg/kg/j chez le singe

selon Scott et al [63]. Cette embryofétotoxicité est variable selon les doses et les espèces utilisées ; elle peut se manifester selon la dose par une résorption foetale totale ou partielle [5].

- Administration de dose unique ou pendant un temps très court de l'embryogenèse : cette approche a pour but d'étudier les phases sensibles du développement. L'exencéphalie est induite par une administration précoce d'EGME entre G7 et G10 chez la souris [64]. Au contraire, les anomalies des extrémités sont générées par des administrations plus tardives avec un maximum d'efficacité à G11 [65]. Ce fait témoigne de données classiques concernant la formation du système nerveux et des membres [5].

2.6. La toxicité chez l'homme :

L'ingestion d'éthylène-glycol provoque des troubles neurologiques, digestifs, une acidose métabolique, des convulsions et une atteinte tubulaire rénale .En cas d'exposition répétée, une dépression du système nerveux central et une hyperlymphocytose ont été rapportées .Il est irritant pour les voies respiratoires et les yeux [66].

2.6.1. Effets aiguë :

L'intoxication aiguë, généralement due à une ingestion accidentelle, peut être responsable de troubles neurologiques (dépression du système nerveux central), hématologiques, métaboliques et rénaux. Les cas publiés sont très peu nombreux et ne concernent que l'EGME, l'EGEE et l'EGBE. Quelques cas de dermites de contact, peu nombreux si l'on se réfère à la très large diffusion de ces solvants, ont été reportés en milieu professionnel. Dans les cas publiés, les lésions dermatologiques sont probablement imputables aux éthers de glycol ; le mécanisme est plus probablement irritatif qu'allergique [18].

La toxicité de certains éthers de glycol a été démontrée suite à une expertise collective de l'INSERM publiée en octobre 2000. Le bilan des études effectuées à ce jour désigne l'EGME, l'EGEE, le DEGEE et le DEGDME comme toxiques pour la fertilité masculine [4].

Selon l'Inserm [10], les EG et parmi eux les EGE induisent, à fortes doses, comme tous les solvants organiques, une dépression du système nerveux central qui peut se manifester sous la forme d'une ébriété, de troubles de la conscience, voire d'un coma en fonction de l'intensité et de la durée de l'exposition. En cas d'exposition aiguë, les EGE peuvent provoquer chez l'homme, une acidose métabolique [67].

2.6.2. Toxicité chronique :

Des signes de dépression du système nerveux central, plusieurs cas de nystagmus et d'hyperlymphocytose ont été signalés chez des ouvrières exposées aux vapeurs de l'éthylène –glycol.

Des volontaires, exposés à un mélange d'aérosols et de vapeurs d'éthylène – glycol, ne se plaignaient d'aucune gêne à une concentration de 68.5mg/m³ ; à 137mg/m³, ils signalaient une irritation des muqueuses oculaires et des voies aériennes supérieures ; au –delà de 200mg / m³, l'intensité de l'irritation rendait la poursuite de l'exposition impossible. Aucun effet systémique n'a été constaté [68].

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et méthodes

1. Matériels :

1.1. Matériel biologique :

Les animaux qui ont servi à cette étude sont composés de 10 lapins mâles (*Oryctolagus Cuniculus*), impubères, poids corporel moyen 1200 ± 120 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche.



Figure 04 : lapin *Oryctolagus Cuniculus*.

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 antigél 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.

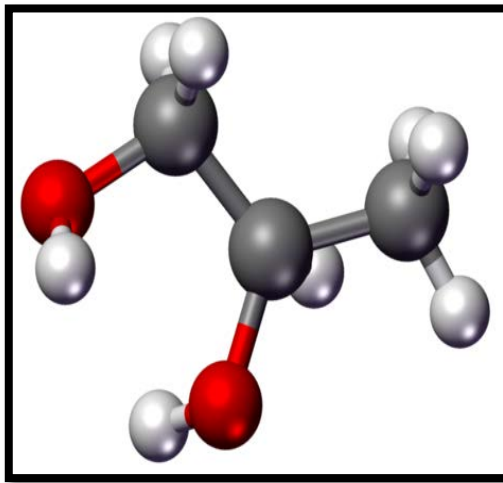


Figure 05 : Formule de l'EGME en 3D[69].

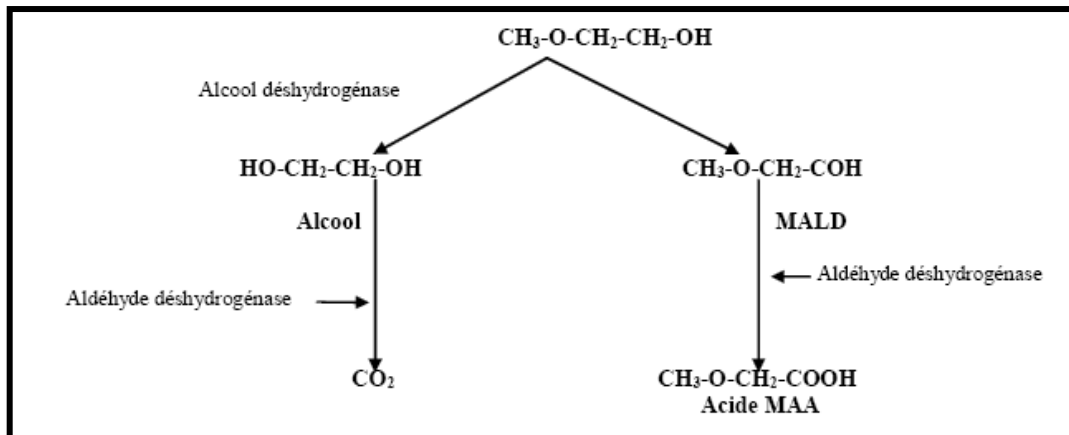


Figure 06: Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol mono methyl (EGME)

[70 ; 26].

Conditions d'élevages :

Ces lapins ont été regroupés à raison de 2 ou 3 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 dix lapins a été répartie en deux groupes égaux de 05 lapins chacun à raison de 2 ou 3 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.

Tableau 02: Répartition des groupes et traitement des animaux.

Groupes	Témoins	Groupe DI
Doses	n=05	n=05(200ppm)

2.2. Préparation des prélèvements :

Le sacrifice des animaux a été effectué dans la matinée.

➤ Prélèvement du sperme :

Le prélèvement du sperme se fait à 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 secs, 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 hormonal.

➤ Prélèvements des organes :

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

Un fragment des testicules et de l'épididyme de chaque animal sont conservés dans une solution de Bouin alcoolique pour l'étude histologique.

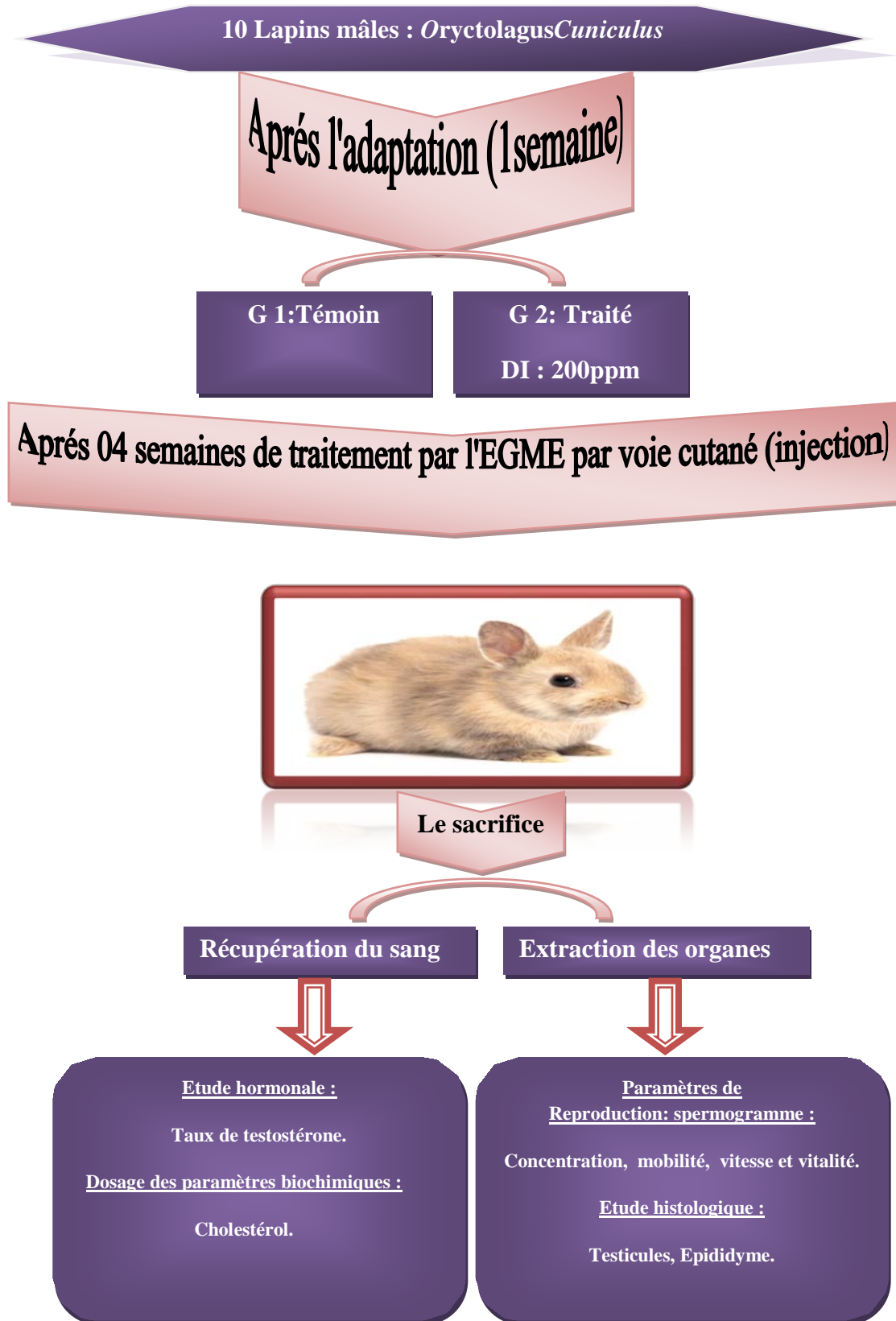


Figure 07 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.3. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine :

Après décapitation et dissection de 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 utilisé pour l'étude des paramètres de la reproduction (concentration, vitesse, mobilité et la vitalité). Dans ce cadre, on met une goutte (1 μ l) du sperme et l'ajoutée dans 49 μ l 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 [71].

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

- La concentration des spermatozoïdes est calculée par la méthode suivante :
 - **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 [71].

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 [71].

✓ **la vitalité des spermatozoïdes :**

➤ **coloration vitale :**

Cette étude est une technique de coloration basée sur le principe que les cellules mortes ayant des membranes plasmiques lésées laissent certains colorants 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.

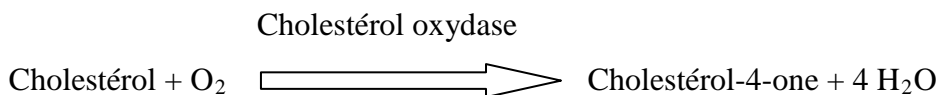
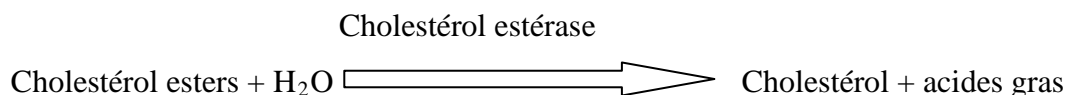
La Vitalité est déterminée par la numération des spermatozoïdes colorés et incolores dans 3 champs d'observation, puis on calcule le pourcentage de chaque catégorie (spermatozoïdes colorés et incolores) [71].

2.4. Dosage des paramètres biochimiques :

- **Dosage du cholestérol :** [72]. 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	Echantillon
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	...	1.0	...

Echantillon (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

2.5. Etude histologique :

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Ibn Rochedd'Annaba, Service d'anatomie et histologie. Les préparations des coupes histologiques ont été effectuées selon la méthode de [73], 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 a réalisé 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 [73] 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 distillée, 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 que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont immergées dans la paraffine qui a 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 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 déplier 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 : 50ml

- 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 violacé 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 08 : Fragment d'organe dans des boîtes contenant du Bouin alcoolique.

2.6. 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 coatés 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
FOIL	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 Étalon, 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 cubicspline, 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 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:

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

3. 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 17).

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

RESULTATS

III. Résultats :**1. Etude pondérale :****1.1. Etat pondéral des organes :**

Nous avons suivi l'évolution des poids des organes suivants : les testicules et l'épididyme chez les lapins témoins et les lapins recevant de l'EGME.

1.1.1. Testicules :

On note une diminution non significative du poids des testicules du groupe DI recevant 200 ppm de l'EGME comparant au témoin (tab.03 ; fig. 09).

Tableau 03 : Variation du poids du testicule chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n=05).			
Organe	Poids (g)	Les lots expérimentaux	
		Témoin (T)	DI (200ppm)
Testicule		1,19±0,2	0,79±0,50

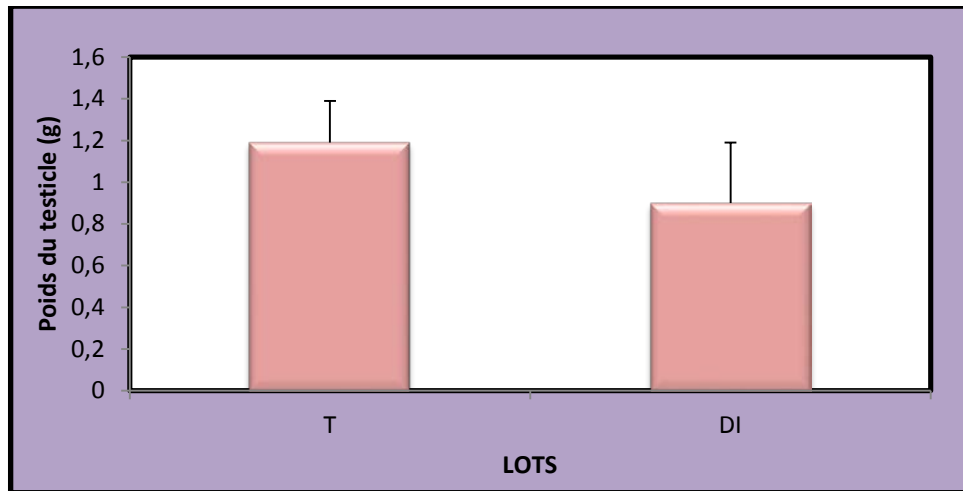


Figure 09 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (**PA**) des testicules chez le lot témoin et le lot traité à l'EGME DI (n= 05).

1.1.2. Epididyme :

Les résultats illustrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du poids de l'épididyme chez le groupe traité à l'EGME (tab.04 ; fig.10).

Tableau 04 : Variation du poids de l'épididyme chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n=05).			
Organe	Poids (g)	Les lots expérimentaux	
		Témoin (T)	DI (200ppm)
épididyme		0,62±0,24	0,21±0,06***

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

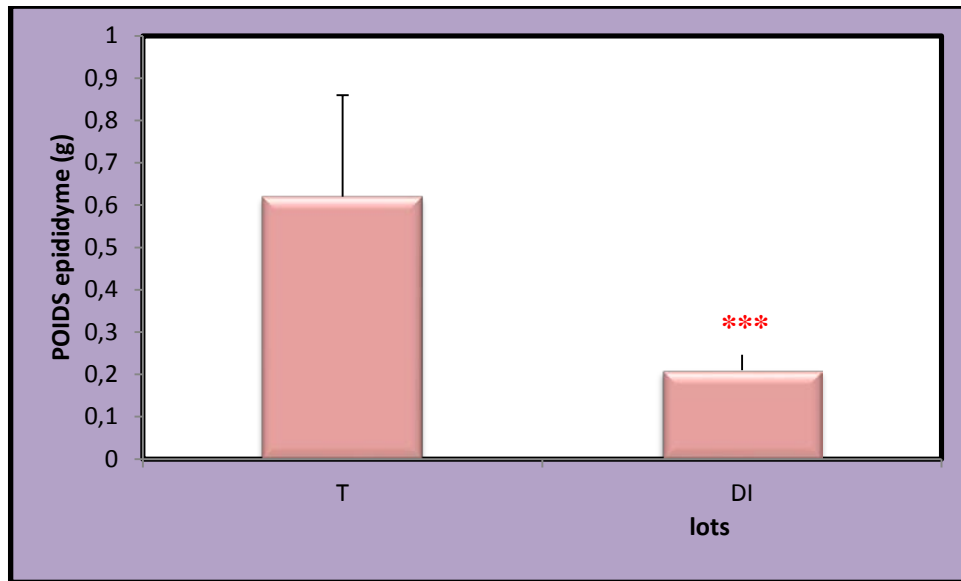


Figure 10 : Variation moyenne ($X \pm SD$) du poids absolu (PA) de l'épididyme chez le lot témoin et le lot traité à l'EGME DI (n= 05).

2. Etude de la reproduction :

2.1. Concentration :

Une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration des spermatozoïdes du lot DI traité à l'EGME comparés au témoin à été observée. (Tab.05 ; Fig.11).

Tableau 05 : Variation du taux de concentration des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 05).		
Paramètres	Les lots expérimentaux	
	Témoin (T)	DI (200 ppm)
Concentration (Nombrex10 ⁶ /ml)	401,8± 3,11	327±7,35***

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

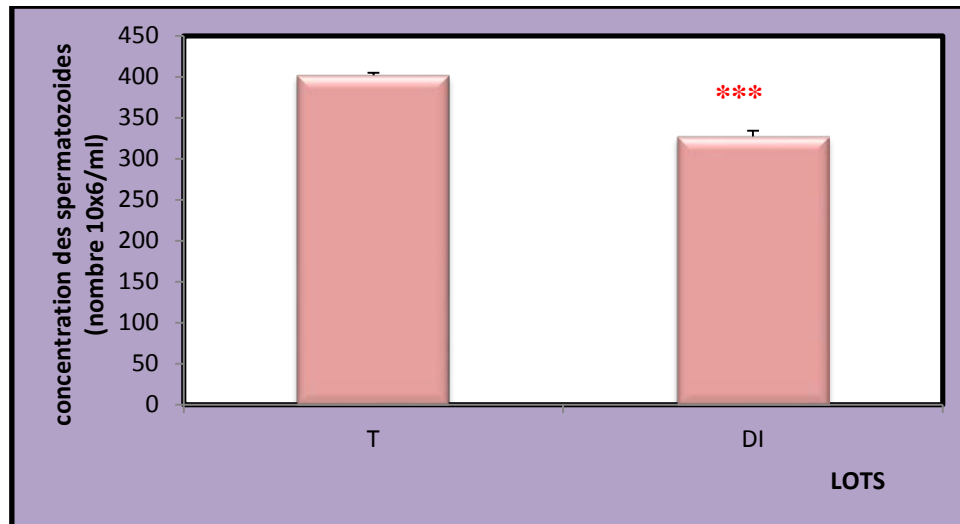


Figure11 : Variation moyenne du nombre total des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en

(Nombre spz x 10⁶/ml) entre les deux groupes (n=5).

2.2. Mobilité :

En ce qui concerne la mobilité, les résultats dans la figure 12 montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot traité à l'EGME par rapport au lot témoin. (Tab.06 ; Fig.12).

Tableau06: Variation du taux de mobilité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI (n= 5).		
Paramètres	Les lots expérimentaux	
	Témoin (T)	DI (200 ppm)
Mobilité (%)	63,4±6,95	33,2±3,77***

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

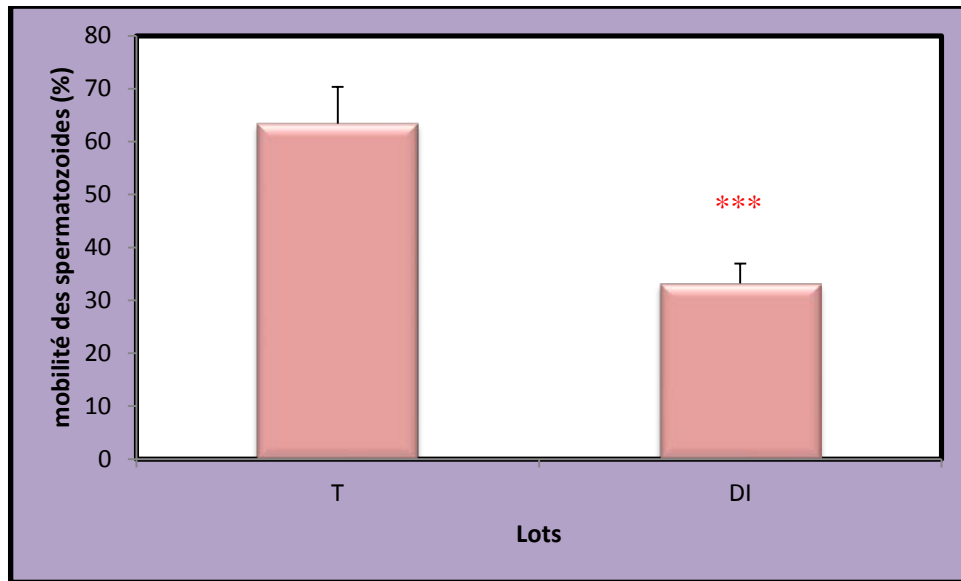


Figure 12: Variation moyenne de la mobilité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) entre les deux groupes ($n=5$).

2.3. Vitesse :

Les résultats obtenus révèlent pour le lot traité une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) dans la vitesse des spermatozoïdes comparés au lot témoin (Tab.07 ; Fig.13).

Tableau 07 : Variation du taux de vitesse des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI ($n= 05$).		
Paramètres	Les lots expérimentaux	
	Témoin (T)	DI (200ppm)
Vitesse ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	$33,36 \pm 4,25$	$13,15 \pm 0,67^{***}$

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

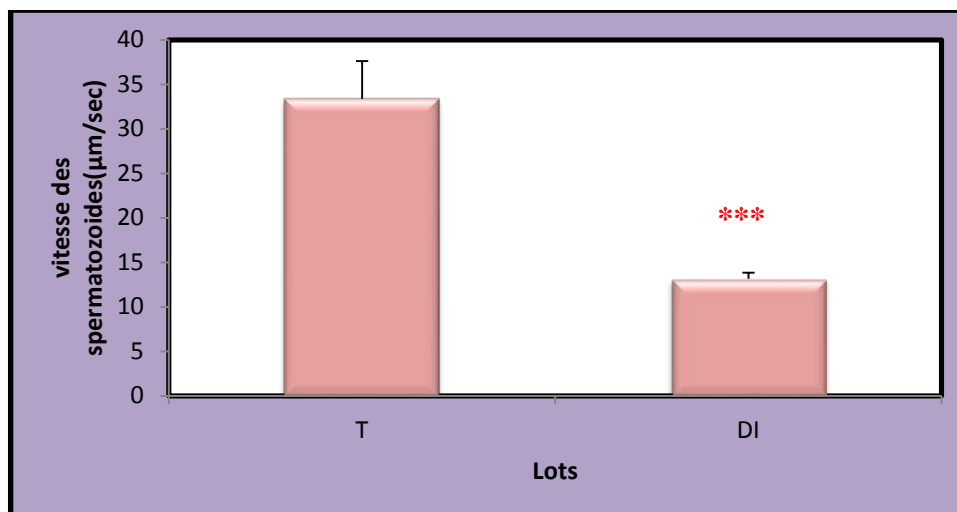


Figure13 :Variation moyenne de la vitesse des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) entre les deux groupes ($n=05$).

2.4. Vitalité :

2.4.1. Coloration vitale :

Il existe une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux des spermatozoïdes morts chez le lot traité à l'EGME DI par rapport au lot témoin.

Concernant le taux des spermatozoïdes vivants, les résultats montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot DI par rapport au lot témoin (**Tab.08 ; Fig14**).

Tableau 08 : Variation du taux de vitalité des spermatozoïdes chez le lot témoin (T) et le lot traité DI ($n= 05$).				
Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin (T)		DI (200ppm)	
Vitalité (%)	TSV	TSM	TSV	TSM
		$70 \pm 9,35$	$30 \pm 9,35$	$39 \pm 9,62^{***}$

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

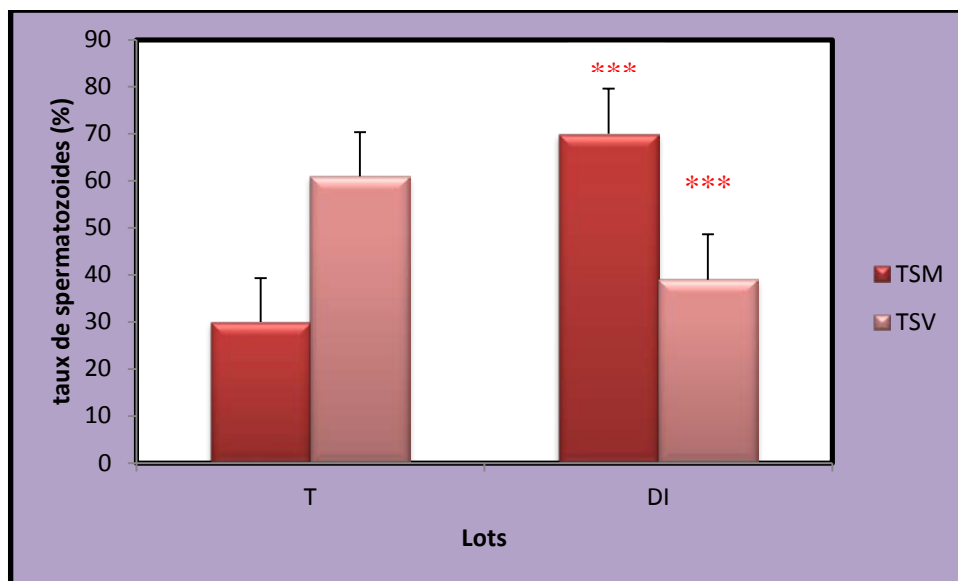


Figure 14: Variation moyenne de la vitalité des spermatozoïdes ($X \pm SD$) en (%) (Après un test de coloration à l'éosine) entre les deux groupes ($n=5$).

2.5. Taux de testostérone :

L'effet de l'EGME sur le taux plasmatique de la testostérone se manifeste chez les animaux appartenant au lot DI, traité avec 200 ppm d'EGME. En effet, chez ces animaux, la teneur plasmatique de la testostérone présente une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) par rapport au lot témoin. (Tab.09., Fig.15).

Tableau 09: Variation du taux de la Testostérone chez le lot témoin (T) et le lot traité DI ($n=05$).		
Paramètres	Les lots expérimentaux	
	Témoin (T)	DI (200ppm)
Testostérone (ng/ml)	1,74±0,32	0,34± 0,098***

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

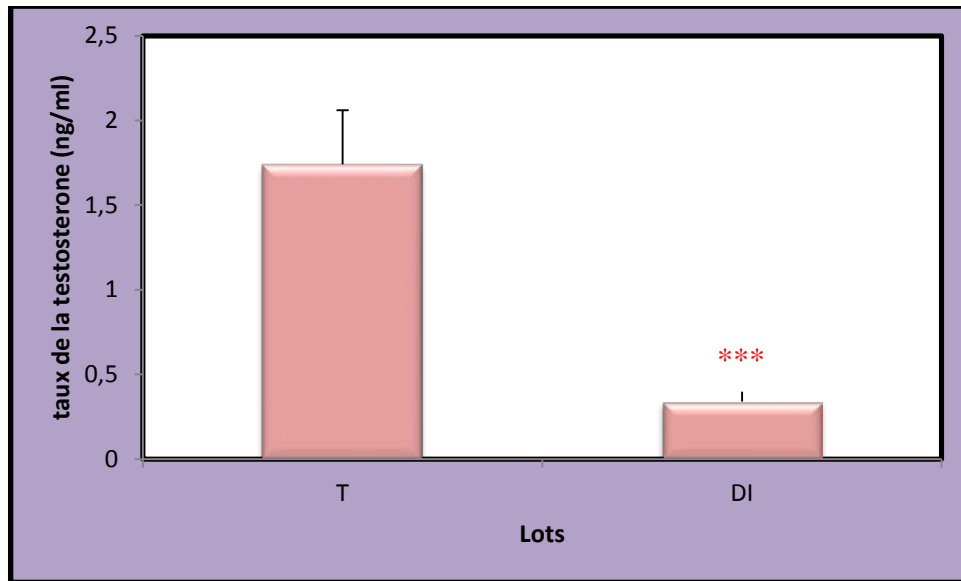


Figure 15: Variation moyenne ($X\pm SD$) dans le taux de la testostérone (ng/ml) ($n=5$).

2. Etude des paramètres biochimiques :

3.1. Cholestérol :

Nos résultats montrent aussi une augmentation significative ($p<0.001$) du taux de cholestérol chez le lot traité DI par rapport au témoin (Tab.10, Fig. 16).

Tableau 10 : Variation de la concentration du cholestérol chez le témoin (T) et le lot traité DI ($n=05$).		
Paramètres	Les lots expérimentaux	
	Témoin (T)	DI (200ppm)
Cholestérol (g/l)	0,053±0,03	0,11±0,04*

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

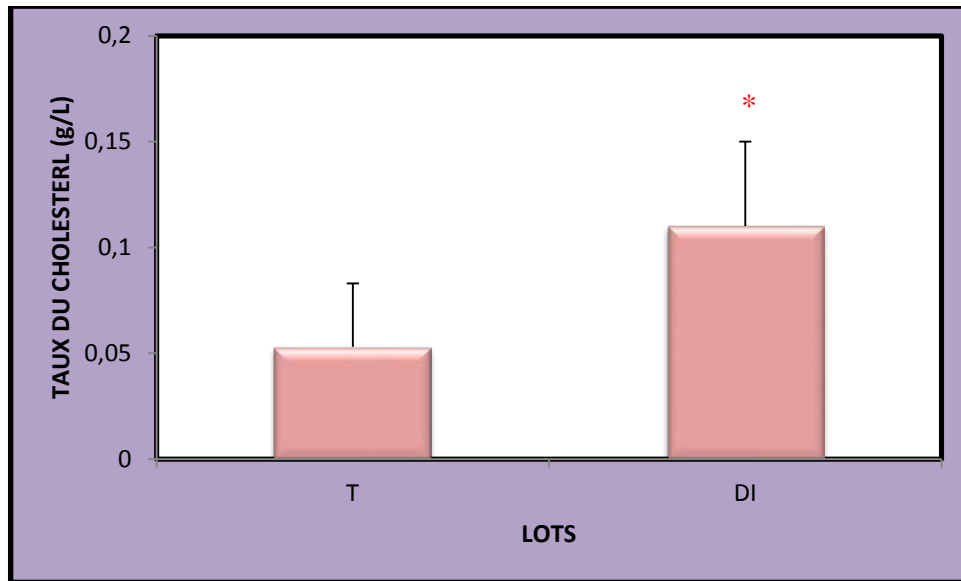


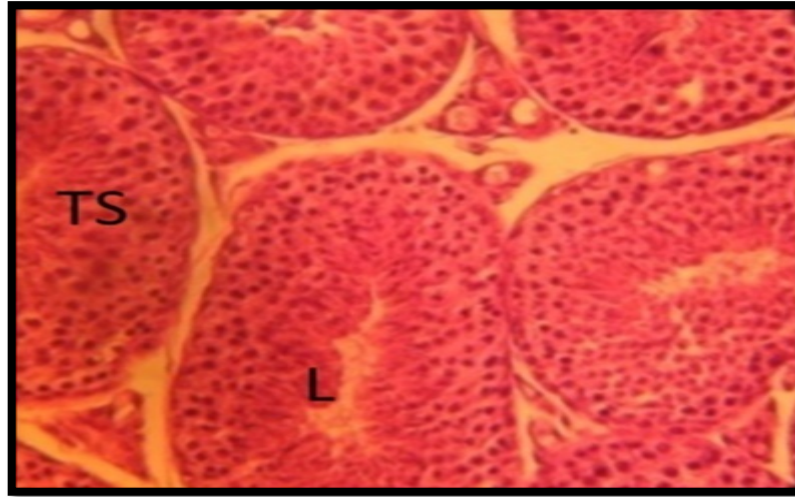
Figure 16 : Variation moyenne ($X \pm SD$) de la concentration sérique du cholestérol chez le lot témoin et le lot traité à l'EGME (n=05).

4. Etude histologique :

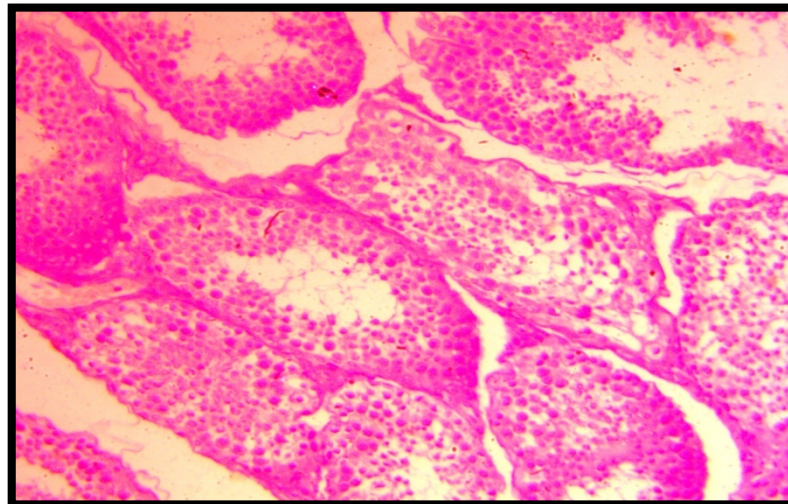
4.1. Atteinte tissulaire au niveau des testicules :

L'observation microscopique du testicule du témoin montre une structure normale des tubes séminifères avec une forme cylindrique, et une occupation de la lumière (L) de chaque tube par des spermatozoïdes matures.

En revanche, L'analyse histologique du groupe traité à l'EGME à la dose de 200 ppm (DI), montre des tubes séminifères anormaux et complètement déformés, et que la diminution du volume de la masse des spermatozoïdes.



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



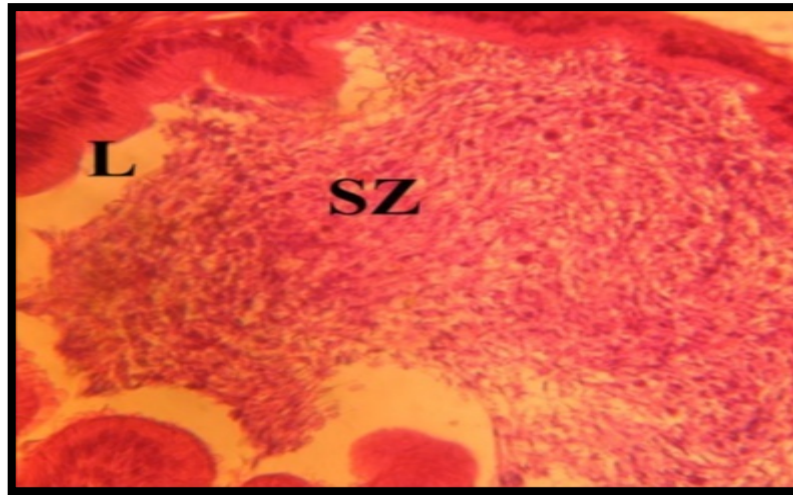
DI: Coupe histologique des testicules d'un lapin traité à l'EGME 200 ppm montrant les tubes séminifères déformés et la diminution de la masse spermatique.

Figure 17 : Variation de l'aspect histologique des testicules entre les 2 groupes (Gr x 100).

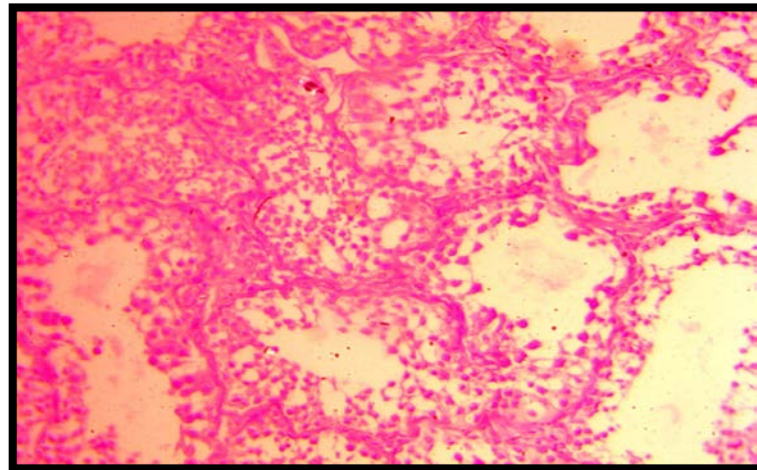
4.2. Atteinte tissulaire au niveau de l'épididyme :

L'analyse microscopique de l'épididyme du groupe témoin (T) présente une structure normale avec une lumière pleine de spermatozoïdes L.

Alors que, l'examen histologique du groupe traité à l'EGME avec la dose 200ppm (DI) montre une diminution de la quantité des spermatozoïdes dans la lumière des tubes.



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 était oligozoospermique.

Figure 18 : Les modifications histologiques de l'épididyme du lapin dans les différents groupes de traitement (Gr x 100).

DISCUSSION

IV. Discussion

IV. Discussion

La plupart des solvants 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 sur la croissance et le développement cellulaire [74].

Dans le cadre de ce travail, nous allons essayer d'évaluer l'impact de ce produit toxique (l'éthylène glycol mono méthyle éther (EGME) sur des lapins *Oryctolagus Cuniculus*. La discussion s'articulera essentiellement autour de nos résultats par rapport aux travaux publiés dans plusieurs autres études.

Plusieurs études menées à l'échelle internationales ont confirmé l'effet reprotoxique des solvants, et ont démontrés que les testicules sont des organes cible aux produits toxiques déversés dans l'environnement [75;76].

Nos résultats obtenus ont mis en évidence une réduction considérable du poids des testicules chez le lot traité à l'EGME (DI) en comparaison au lot témoin. Ceci est en accord avec les constatations de Nagano et al., 1979 qui ont observés une baisse de poids des testicules avec un effet - dose a été mentionnée à partir de 1000 mg/kg/J. les examens histopathologique révèlent une atrophie de l'épithélium des tubes séminifères. [77]. Ainsi que les résultats illustrent une diminution très hautement significative du poids de l'épididyme chez le groupe traité à l'EGME (DI) en comparaison au lot témoin. Les Même 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. [12].

L'étude d'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 [12].

IV. Discussion

Les données expérimentales obtenues à partir des études réalisées chez la souris ont permis de démontrer que le 2-éthoxyéthanol entraîne des effets sur l'appareil reproducteur des mâles (atrophie testiculaire) que sur les paramètres et la morphologie du sperme. [78].

Les effets spécifiques du 2-éthoxyéthanol sur l'appareil reproducteur des mâles (atrophie testiculaire) ont été également démontrés dans de nombreuses autres études sur plusieurs espèces et par différentes voies d'exposition. La toxicité spermatique a clairement été identifiée à de plus faibles niveaux de doses/concentrations que les autres paramètres étudiés. [78].

Depuis Nagano et al. en 1979, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence les effets délétères de certains EG sur le fonctionnement testiculaire. [79].

Nos 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.

Concernant la quantité, il y a une diminution de la concentration des spermatozoïdes du lot DI traité à l'EGME comparé au témoin. Ce résultat est similaire à le résultat 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 de Hanley et al. (1984a et 1984b) qui ont constatés que les rats mâles exposés à 300 ppm sont devenus complètement infertiles.

Sur les bases d'un ensemble de résultats, l'expertise collective de 1999 avait conclu en faveur de l'existence d'un lien entre infertilité masculine (diminution de la concentration du sperme, difficulté à concevoir) et exposition professionnelle à l'EGEE, l'EGME et leurs acétates, et peut-être à d'autres éthers de glycol. [19].

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. [80]. 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 [81; 82].

D'autres études ont proposé l'hypothèse du phénomène d'apoptose (mort cellulaire) des cellules germinales spermatocytes ou spermatozoïdes pour expliquer la réduction du nombre total des spermatozoïdes [83; 84]. C'est pour cela que chez le groupe traité on peut

IV. Discussion

remarquer la présence de quelques débris cellulaires au niveau de la lumière des tubes séminifères [1].

La mobilité et la vitesse des spermatozoïdes sont fortement diminuées chez le lot traité par rapport au groupe témoin, cette diminution étant peut-être due à la baisse au niveau de LDH-C4 qui est une isoenzyme spécifique synthétisée par les cellules germinales pour fournir l'énergie aux spermatozoïdes [12]. Même résultat enregistré chez des travailleurs d'une usine de peinture de bâtiments [85].

Nos résultats sont bien en accord avec ceux de Youn et al. (2001) et Holloway et al. (1990), qui ont constaté une diminution de la mobilité et la concentration des Spermatozoïdes [1].

Chez l'animal, l'EGME et l'EGEE ont des effets démontrés, très spécifiques sur le stade pachytène de la spermatogenèse. Chez l'homme, un certain nombre d'études mettent en évidence un lien possible entre infertilité masculine avec oligospermie, hypofertilité et exposition professionnelle à l'EGME, EGEE et leurs acétates [79].

De plus, on enregistre une diminution très élevée du nombre de spermatozoïdes vivants et une augmentation du taux des spermatozoïdes morts dans le groupe traité 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 [86]. Ou les cellules germinales se nourrissent et se développent donc leur destruction entraîne la mort des spermatozoïdes [12].

Sur le plan hormonal, la teneur plasmatique de la testostérone présente une diminution chez le lot traité DI comparativement à ce du lot témoin. 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 [86].

Nous avons remarqué une augmentation significative de la concentration du cholestérol chez le lot traité par rapport au témoin, Ces résultats sont similaires à ceux de Bendjeddou (2014) enregistrés chez lapins mâles (*Oryctolagus Cuniculus*), sexuellement matures âgées de 06 mois, exposés à l'EGME quotidiennement par voie cutané (injection), ce qui est peut être due à un déséquilibre dans les enzymes responsables de la conversion

IV. Discussion

de cholestérol en hormones sexuelles mâles, ce qui provoque une diminution de la concentration de testostérone [87].

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

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.

Les résultats obtenus ont montré que l'exposition cutané des lapins males impubères (*Oryctolagus Cuniculus*) pendant 4 semaines par l'éthylène glycol monométhyl éther à raison de 200 ppm provoque une altération dans les paramètres de la reproduction (diminution du poids des testicules et d'épididyme, diminution de la concentration, de la mobilité, de la vitesse et la vitalité des spermatozoïdes) et dans certains paramètres biochimiques (cholestérol).

L'étude hormonale montre qu'une diminution du taux plasmatique de testostérone.

L'étude biochimique montre aussi une augmentation significative du taux de cholestérol.

L'étude histologique montre que l'exposition à l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) provoque des altérations structurales au niveau des testicules et de l'épididyme chez les animaux traités comparé aux les témoins.

A partir de ces résultats, il serait important de dégager les perspectives suivantes:

- 1- Il faut informer le public sur les dangers d'EGME sur la santé et l'environnement.
- 2- Réduire l'usage d'EGME et contrôler leur utilisation pour limiter son effet toxique.
- 3- faire plus des études de toxicocinétique et de métabolisme des éthers de glycol, en particulier pour les acides alkoxyacétiques.
- 4- Découvrir des inhibiteurs efficaces de métabolite de ce substrat.
- 5- S'intéresser à la caractérisation de la toxicité du produit chez l'homme à travers la réalisation des enquêtes épidémiologiques dans les milieux professionnels.
- 6- La substitution et le changement des substances chimiques plus toxiques par autres substances moins toxiques.

REFERENCES

Référence

[1]. **DJabali N.**, Effets d'un solvant : éthylène glycol monométhyl éther (egme) sur la fertilité masculine et quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin oryctolagus cuniculus. Thèse de doctorat : biologie et physiologie animale. Université badji mokhtar annaba. p. 1-25.

[2]. **Patai S.**, 1967. "the chemistry of the ether linkage", wiley-interscience. new-york.

[3]. **Kreevoy, T & Thomas, S.J.**, 1977. "mechanism of the reaction of diazomethane with Weak acids". *j. Org. Chem.* 42. 3979.

[4]. **Sambou, S.M.**, 2005. Chimie du glycerol pour la synthèse de dérivés du glycérol applicables comme solvants ou diluants réactifs. thèse de doctorat : sciences des agroressources. L'institut national polytechnique de toulouse. P. 3-25.

[5]. **Lemazurier, E., Multigner, L., Lecomte, A., Robidel, F., Frédéric, Y., bois.,** 2003. Mécanisme de latotoxicité de l'éthylène glycol méthyl Ether (egme) et des isomères du propylène glycol méthyl éther (pgme) sur la reproduction et le développement. Environnement, risques and santé. John libbey eurotext. 2(2). p. 3-9.

[6]. **Afsset.**, 2008 Les éthers de glycol. Synthèse des connaissances sur les expositions de la population générale et professionnelle en France. Rapport. Saisine no2003/016. Afsset. [133p. Document consulté sur le site: <https://www.anses.fr/fr/system/files/chim2003et0016ra-3.pdf>/ le 20 juin2017].

[7]. **INRS.**, 2004. Les éthers de glycol. *Fic. Sol. Ed.*, 4222 : 1-6.

[8]. **Nissea, C., Labatd, L., Thomasd, J., Leroyera, A.**, 2017. Caractérisation de l'exposition aux éthers de glycol d'un échantillon de population générale du Nord-Pas-de-Calais par biométrie urinaire. Elsevier masson sas, **29** : 418-440. 419p

[9]. **Camford Information Services.,** 1997. Cpi product profile: ethylene glycols (mono, di, triethylene glycols). Don mills. ontario. 4 pp.

[10]. **INSERM. Expertise collective.,** 1999. éthers de glycol : quels risques pour la santé. [362 p. Document consulté sur le site: publi.inserm.fr/handle/10608/29/ le 20 juin 2017]. P. 12-15.

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

[12]. **Bendjeddou, M.,** 2014. 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*). Thèse de doctorat lmd : biologie animale environnementale. Université badji mokhtar – annaba. p. 1-85.

[13]. **Cicolella, A.,** 2006. glycol ethers reproductive risks. Gynécologie obstétrique & fertilité. **34** : p 955–963. p. 6-9.

[14]. **Graine, H., Toumi, K., Roullier, V. C., Apeau, J., Lefèvre, G.,** 2007. Interférences des métabolites de l'éthylène glycol avec les dosages du lactate interference of ethylene glycol on lactate assays. *Ann biol clin* , **65** (4) : p. 421-4.

[15]. **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.

[16]. **Nagano, K., Nakayama, E., Koyano, M., Oobayashi, H., Aadachi, H., Yamada, T.,** 1979. Testicular Atrophy of micz induced by ethylene glycol mono alkyl ethers. *Sangyo igatu-japanese journal of ind health*.vol. **21**: p.29-35.

[17]. **Johanson, G.,** 2000. Toxicity review of ethylene monomethyl ether and its acetate ester. *Critical review of toxicology.* **30**: 307-345.

[18]. **Groupe D'experts Du Conseil Supérieur D'Hygiène Publique De France Section Des Milieux De Vie.**, les éthers de glycol dans les produits de consommation et la sante.p. 18,19.

[19]. **INSERM (Institut National De La Santé Et De La Recherche Médical.**, 2005. éthers de glycol (nouvelles données toxicologiques). p. 1-81.

[20]. **Wickramaratne.**, 1986. The teratogenic potential and dose response of dermally administered ethylene glycol monomethyl ether (egme) estimated in rats with the chernoff-kavlock assay. *Journal of applied toxicology*. 6: 165-166.

[21]. **Nagano, K., Nakayama, E., Oobayashi, H., Yamada, T., Adachi, H et al.**, 1981. Embryotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in mice. *Toxicology*. 20: 335-343.

[22]. **Hobson, D.W., A.P., D'addario, R.H., Bruner 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.

[23]. **Cicoella, A.**, Santé Pub1997. Évaluation des risques pour la reproduction liés aux éthers de glycol. 2:157–83.

[24]. **SIMONET, N.**, 2005. évaluation et prévention des risques liés a l'utilisation de produits contenant des éthers de glycol. thèse de doctorat. universite henri poincare – nancy 1. p. 9-28.

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

[26]. **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 répétée dans l'eau de boisson. *Toxicol. Rep.* **00-102** : 8-27.

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

[28]. **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.).

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

[30]. **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**.

[31]. **INRS.**, 1999. *Fiche toxicologique* . **103** : 2-Méthoxyéthanol.

[32]. **IPCS.**, 2004. *CICAD. 2-méthoxyéthanol*.

[33]. **ECETOC (Centre d'écologie et de toxicologie de l'industrie chimique européenne)**., 1994. The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. Technical report. **6**.

[34]. **Kirk, E & Othmer, D.F.**, 1980. *Encyclopaedia of chemical technology*. Vol.2,3 édition new york: wiley-interscience .pp.933-962.

[35]. **Loi Canadienne Sur La protection De L'environnement.**, 2000. Ethylène glycol. p. 7.

- [36]. **Donley, D.E.**, 1936. toxic encephalopathy and volatile solvents in industry. *J ind hyg toxicol.* 18: 571-577
- [37]. **Cicolella, A.**, 1992. Les éthers de glycol. Etat actuel des connaissances. Perspectives de recherche. *Cah notes doc.* 148: 359-378
- [38]. **ECETOC (Centre d'écologie et de toxicologie de l'industrie chimique européenne) Working Group.**, 1995. technical report. The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. *Eur centre ecotoxicol toxicol of chemicals.* 64: 1-348
- [39]. **Vincent, R.**, 1996. Ethers de glycol: matrices emplois-expositions. *Inrs. cahiers de notes documentaires.* 162: 5-17.
- [40]. **Browning, R.G & Curry, S.C.**, 1994. clinical toxicology of ethylene glycol monoalkyl ethers. *Hum. Exp.toxicol.* 13(5). pp.325-335.
- [41]. **Groeseneken, D., Veulemans, H., Masschelein, R.**, 1986. Respiratory uptake and elimination of ethylene glycol monoethyl ether after experimental human exposure. *Br j ind med.* 43: 544-549
- [42]. **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
- [43]. **Ahmed, A., &Al.**, 1994. Quantitative whole body autoradiographie disposition of glycol ether in mice: effect of route of administration. *Fundam. Appl. Toxicol.* .22(2). pp. 266-276.
- [44]. **Desinger, P.J & Boatman, R.J.**, 2004. In vivo metabolism and kinetics of ethylene Glycol monobutyl ether and this metabolites. 2-butoxyacetaldehyde and 2-Butoxyacetic acid. as measured in blood. liver and forestomach of mice. *Xenobiotica.* 34: 675-685.
- [45]. **Jenkins-summer, S.**, 1996. Etal.characterization ofurinarymetabolites produced following administration of[1,2, methoxy-13c]-2-methoxyethanol to male and pregnant cd-1 mice. *Occup.hyg.* 2. pp.25-31.
- [46]. **Asmoe, L., Mathiesen, M., Sager, G.**, 1999. Elimination of methoxyacetic acid and ethoxyacetic acid in rat. *Xenobiotica,* 29. pp.417-424.

- [47]. **Johanson, G.**, 1996. An overview of glycol ethers metabolism and toxicokinetics. *Occup. Hyg.* 2, pp.5-24.
- [48]. **Hardin, B.D., Goad, P.T & Burg, J.R.**, 1984. Developmental toxicity of four glycol Ethers applied cutaneously to rats. *Environ. Health. Perspect.* 57: 69-74.
- [49]. **Gingell, R., Boatman, R.J., Lewis, S.**, 1998. Acute toxicity of ethylene glycol mono-n-butyl ether in the guinea pig. *Food chemtoxicol*;36:825-829.
- [50]. **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.
- [51]. **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.
- [52]. **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).
- [53]. **M C Gregor, D.B., Willins, M.J., M C Donald, p., Holmstrom, m., M C Donald, P., Nieneier, R.w.**, 1983 .genetic effects of 2-metoxyethanol and bis (2-methoxy)ether .*toxicol appl pharmacol* 70:303-316.
- [54]. **ECETOC (Centre d'écologie et de toxicologie de l'industrie chimique européenne)**, 2005.the toxicology of glycol ethers and its relevance to man (fourth edition). 1. p. 25.
- [55]. **Fastier, A., Herve-bazin, B., Mcgregor, D.B.**, 2005. Inrs activities on risk assessment of glycol ethers. *Toxicollett*;156:59-76.
- [56]. **Hardinb, D.**, 1983. Reproductive toxicology of glycol ethers. *Toxicology*.27. pp.91-102.
- [57]. **Kalfg, F., Post, G.b et Snyder, R.**, 1987. Solvent toxicology : recent advances in the toxicology of benzene, the glycol ethers and carbon tetrachloride. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27,399-427.

- [58]. **Notice Of Osha Response To Environmental Protection Agency Referral Of Four Glycol Ethers (51fr44699,dec. II, 1986).**, 1986. occupational safety and health reporter.pp.809-811.
- [59]. **Cordier, S., Szabova, E., Fevotte, J., Bergeret, A., Plackova, S & Mandereau I.**, 2001. Congenital malformation and maternal exposure to glycol ethers in the Slovak republic. *Epidemiology*. 12 (5): 592-593.
- [60]. **Bendridi, N., Lejeune, H & Pugeat, M.**, 2001. Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolimes. Hormones. Nutrition*.6: 281-285.
- [61]. **Davis, B.J., Almekinder, J.L., Flagler, Travlos, G., Wilson, R., Maromlot, R.R.**, 1997. ovarian luteal cell toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and methoxy acetic acid in vivo and in vitro. *Toxicology applied pharmacology* ; 142: 328-337.
- [62]. **Nelson, B.K & Brightwell, W.S.**, 1984. Behavioral teratology of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers. *Environmental health perspectives*. 57: 43-46.
- [63]. **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.
- [64]. **Horton, V.L., Sleet, R.B., Greene J, J.A., Welsch, F.**, 1985. Developmental phase-specific and dose-related teratogenic effects of ethylen glycol monomethyl ether in cd-1 mice. *Toxicology applied pharmacology* . 80: 108-118.
- [65]. **Sleet, R.B., Welsch, F., Myers, C.B., Marr, M.C.**, 1996. Developmental phase specificity and dose-response effects of 2-methoxyethanol in rats. *Fundamental applied toxicology* 29(131-139).
- [66]. **INRS.**, 2016. fiche toxicologique n°25 : éthylene-glycol. p. 4.

- [67]. **Vale, J.A & Buckley, B.M.**, 1985. Metabolic acidosis in diethylene glycol poisoning. *Lancet*.2:394.
- [68]. **Wiley, J & Sous.**, 2012. glycols in patty's toxicology. 6th ed.vol4.new York. 595-640.
- [69]. **Welsch, F.**, 2005. toxicology letters. 156 : 13-28.
- [70]. **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. *Toxical. Lett.*, 32: 73-80 .
- [71]. **OMS (Organisation Mondiale De La Santé).**, 1993. Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoides avec le mucus cervical. Ed. INSERM.
- [72]. **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.
- [73]. **Martoja, R., Martoja, M.**, 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed Masson et Cie. Paris.
- [74]. **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.
- [75]. **Samuels, D.M., Doe JE & 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.
- [76]. **Fort, D.J., Stover, E.L., Bantle, J.A., Dumont, J.N & Finch, R.A.**, 2001. Evaluation of a reproductive toxicity assay using *Xenopus laevis*: boric acid, cadmium and ethylene glycol monomethyl ether. *J. Appl. Toxicol* . 21 (1): 41-52.
- [77]. **Nagano, K., Nakayama, E., koyano, M., Oobayashi, H & al.**, 1979. testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol mono alkyl ethers

(author's transl). sangyo igaku,21(1):29-35.

[78]. **European Chemicals Bureau-European Union Risk Assessment.**, 2007. 2-ethoxyethanol.lux embourg: office for official publications of the European communities: 222p.

[79]. **Sylvaine, R.M.**, 2005. Évaluation de l'exposition professionnelle à l'Ethylène glycol n Butyl Ether et son acétate".Médecine humaine et pathologie. fdumas-00859917f. p. 50-63

[80]. **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.

[81]. **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.

[82]. **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.

[83]. **Yan, W., Samson, M., Jegou, B & Toppari, J.**, 2000. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. Mol. Endocrinol. 14: 682-699.

[84]. **Jindo, T., Wine, R.N., Li, L.H & Chapin, R.E.**, 2001. Protein kinase is central to rat germ cell apoptosis induced by methoxyacetic acid. Toxicol. Pathol. 29: 607-616.

[85]. **Cherry, N., Labreche, F., Collins, J., Tulandi, T.**, 2001. Occupational exposure to solvents and male infertility. Occup. Environ. Med. 58: 635-640.

[86]. **Dalgard, M., Hossaini, A., Hougarrd, K.S., 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.

[87]. **Husmann, D.S., Mephaul, M.J.**, 1991 Time specific androgen blockage with fluramide in hibits testicular deseent in the rat. Endocrinol. 129:1409-1416.