BADJI MOKHTAR ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

جامعة باجي مختار – عنابة

Faculté des Sciences
Département de Biologie

Thèse
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
en Biologie et physiologie animale

Thème

Effets d'un solvant : Ethylène Glycol Monométhyl Éther (EGME) sur la fertilité masculine et quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin Oryctolagus cuniculus

Présentée par: **M^lle^ DJABALI Nacira**

Devant le jury:

Président	**Boulakoud Med Salah**	**Professeur**	**Univ. Annaba**
Directeur de thèse	**Khelili Kamal**	**Professeur**	**Univ. Annaba**
Examinateurs	**Khennouf Seddik**	**MC**	**Univ. Sétif**
	Baaziz Nacer	**MC**	**Univ. Constantine**
	Khebbeb Med ElHadi	**MC**	**Univ. Annaba**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu **Dieu** le tout puissant de m'avoir accordé la réussite durant toutes mes années d'études et de recherche scientifique, de m'avoir donné la patience et la volonté pour réaliser ce travail de thèse.

Tout d'abord, mes sincères et profonds remerciements s'adressent à la personne qui m'a proposé le sujet de thèse et qui m'a encadré tout au long de ces années d'études: ***Pr. Khelili Kamal***. Au travers de nos discussions, il m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet, je salue aussi sa souplesse et son ouverture d'esprit qui ont su me laisser une large marge de liberté et de confiance pour mener à bien ce travail de recherche.

C'est un devoir d'exprimer un double remerciement à ***Mr. Boulakoud Mohamed Salah***, responsable du laboratoire d'écophysiologie animale, le premier pour avoir si humblement bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse et le second pour ses précieux conseils au laboratoire ainsi que pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont il a toujours fait preuve.

Je suis très reconnaissante à ***Mr. Khebbeb Mohamed ElHadi, Mr. Baaziz Nacer et Mr. Khennouf Seddik*** d'avoir accepté, sans me connaître, le rôle d'examinateur et de m'honorer par leurs présences.

Je remercie tous mes amis (es) et collègues de laboratoire qui m'ont beaucoup aidé surtout au cours de la partie expérimentale, leurs encouragements et leurs soutien morale m'ont donné plus de volonté.

Je tiens également à remercier et saluer ici les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse et qui m'ont facilité les procédures de travail:

Professeur Soltani Nourreddine, Chef de laboratoire de biologie animale appliquée ;
Docteur Chekkat, Chef de laboratoire d'analyses de Annaba ;
Docteur Niha, Chef de laboratoire d'anatomie pathologique de Annaba ;
Professeur Alain Botta, Chef de laboratoire de biogénotoxicologie de l'université de Marseille, France ;
Professeur Guichaoua Marie-Roberte, Professeur des Universités Praticien Hospitalier de Marseille, responsable du laboratoire de biologie de la reproduction.

Sans oublier, sans doute, tous les étudiants (es) de Magister et Doctorat à l'institut de Biologie qui ont participé considérablement à la réalisation de ce travail.

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à mes parents, mes frères et soeures et aux quelques amis (es) que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années de travail.

SOMMAIRE

Listes des tableaux

Liste des figures

Résumés

Introduction générale……..... 1

Chapitre I : Etude bibliographique……..... 7

1. Généralités sur les solvants……... 7

1.1. Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylènes, cumène…)....……. 8

1.2. Solvants pétroliers (hors aromatiques : alcanes, alcènes…)…….. 8

1.3. Alcools (méthanol, éthanol, glycols…) ……..…… 9

1.4. Cétones (acétone, méthyéthylcétone…)……..... 9

1.5. Ethers (éther éthylique, dioxane…)……..……... 10

1.6. Hydrocarbures halogénés (chlorés, bromés ou fluorés)…….…… 10

1.7. Solvants particuliers (amines, amides, terpènes…)……..….. 11

1.8. Esters……...……..……. 12

1.9. Les éthers de glycol…… 13

2. Les éthers de glycol……... 13

2.1. Synthèse et propriétés physicochimiques des éthers de glycol…….……. 14

2.2. Principales caractéristiques des éthers de glycol…… 15

2.3. Principales abréviations des éthers de glycol....……...…….. 16

2.4 Utilisation et marché des éthers de glycol. ……..…….. 17

2.5. Devenir des éthers de glycol dans les compartiments environnementaux……. 17

2.6. Devenir des éthers de glycol dans l'organisme ……...……... 19

2.7. Données sur les expositions aux éthers de glycol……..…… 21

2.7.1. Pénétration cutanée……..…… 22

2.7.2. Métabolisme……...……..…… 24

2.8. Toxicité des éthers de glycol……...……..... 30

2.8.1. Effets des éthers de glycol sur les gonades et la fertilité chez l'animal……... 30

2.8.2. Effets des éthers de glycol sur la gestation et le développement chez l'animal…… 31
2.8.3. Effets génotoxiques in vitro et in vivo et les effets cancérogènes des éthers de glycol chez l'animal ……..……..... 33
2.8.4. Effets aigus et chroniques des éthers de glycol chez l'homme ……..... 36
2.8.5. Toxicité hématologique des éthers de glycol chez l'homme……..... 37
2.8.6. . Effets des éthers de glycol sur la reproduction, le développement du foetus et le cancer chez l'homme ……..…..... 38
Chapitre II: Etude expérimentale……..…….. 42
1. Matériel biologique…..……. 42
2. Matériel chimique ……...…….. 42
3. Principes et protocole expérimental …….…… 44
3.1. Etude des effets de l'EGME selon la voie orale (mode d'ingestion)…….. 44
3.2. Etude des effets de l'EGME selon la voie respiratoire (mode d'inhalation)..... 45
3.3. Etude des paramètres biochimiques et cellulaires du sang…….. 45
a. Dosage du glucose plasmatique…….. 46
b. Dosage du cholestérol plasmatique……..…….. 47
c. Dosage des triglycérides plasmatiques ……..……..…….. 49
d. Dosage des protéines plasmatiques ……..……..……... 51
e. Dosage de la testostérone plasmatique ……..……..... 52
f. mesure des paramètres cellulaires du sang.……..……..... 53
3.4. Prélèvement des organes …….……... 54
a. Dosage du glutathion GSH dans le foie et le testicule…..…….. 54
b. Etude histologique du testicule …..…….…….. 56
3.5. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine ……...….. 57
a. La mobilité des spermatozoïdes ……..... 57
b. La vitesse des spermatozoïdes ……..……..... 57
c. La concentration des spermatozoïdes (nombre total)…….…….... 58
d. La vitalité des spermatozoïdes (coloration vitale)……..……..... 58
e. Les malformations morphologiques des spermatozoïdes……..…….…….... 59
3.6. Etude statistique ……..……... 59

Chapitre III: Résultats……. 60
1. Etude de l'impact de l'éthylène glycol monométhyl éther selon le mode ingestion ……...…… 60
1.1. Effets sur les paramètres de la fertilité masculine ……...….. 60
1.2. Effets sur les paramètres biochimiques et cellulaires du sang……..…. 66
1.3. Effets sur le poids des organes …….. 74
1.4. Effets sur le taux du glutathion GSH……..…… 76
1.5. Résultats de l'étude histologique du testicule …….….. 78
2. Etude de l'impact de l'éthylène glycol monométhyl éther selon le mode inhalation…… 83
2.1. Effets sur les paramètres de la fertilité masculine ……..…….. 83
2.2. Effets sur les paramètres biochimiques et cellulaires du sang …….. 89
2.3. Effets sur le poids des organes…… 97
2.4. Effets sur le taux du glutathion GSH……...… 99
2.5. Résultats de l'étude histologique du testicule ……..…….. 101
Chapitre IV: Discussion……..……. 106
Conclusion et perspectives.…..…… 118
Références bibliographiques...…… 120
Productions scientifiques

Liste des tableaux

	Titre	Page
1	Principales abréviations utilisées pour la dénomination des éthers de glycol	16
2	Principaux produits susceptibles de contenir des éthers de glycol	17
3	Métabolites acides formés ou supposés être formés selon la molécule d'éthers de glycol	20
4	Effets génotoxiques des éthers de glycol et de leurs métabolites in vitro	35
5	Effets des éthers de glycol chez l'homme : principales études épidémiologiques	38
6	principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME	43

Liste des figures

	Titre	Page
1	Métabolisme des éthers de glycol	25
2	Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol monométhyl ether (2- méthoxy-éthanol)	44
3	Variations moyennes (X±SD) de la concentration des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).	60
4	Variations moyennes (X±SD) de la mobilité des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).	61
5	Variations moyennes (X±SD) de la vitesse des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).	62
6	Variations moyennes (X±SD) des malformations morphologiques des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode ingestion).	63
7	Variations moyennes (X±SD) de la vitalité des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode ingestion).	64
8	Variations moyennes (X±SD) du taux de la testostérone entre les 04 groupes (mode ingestion).	65

9	**Variations moyennes (X±SD) du taux de glucose entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**66**
10	**Variations moyennes (X±SD) du taux du cholestérol entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**67**
11	**Variations moyennes (X±SD) du taux des triglycérides entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**68**
12	**Variations moyennes (X±SD) du taux des protéines entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**69**
13	**Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules rouges entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**70**
14	**Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules blancs entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**71**
15	**Variations moyennes (X±SD) du nombre des lymphocytes entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**72**
16	**Variations moyennes (X±SD) du taux d'hémoglobine entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**73**
17	**Variations moyennes (X±SD) du poids du testicule entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**74**

18	**Variations moyennes (X±SD) du poids du foie entre les 04 groupes (mode ngestion).**	**75**
19	**Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion hépatique entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**76**
20	**Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion testiculaire entre les 04 groupes (mode ingestion).**	**77**
21	**Coupes histologiques du testicule (X40). (T, D1, D2 et D3) (mode ingestion).**	**80**
22	**Coupes histologiques du testicule (X10). (T, D3) (mode ingestion).**	**82**
23	**Variations moyennes (X±SD) de la concentration des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**83**
24	**Variations moyennes (X±SD) de la mobilité des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**84**
25	**Variations moyennes (X±SD) de la vitesse des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**85**
26	**Variations moyennes (X±SD) de malformations morphologiques des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**86**
27	**Variations moyennes (X±SD) de la vitalité des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**87**

28	**Variations moyennes (X±SD) du taux de la testostérone entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**88**
29	**Variations moyennes (X±SD) du taux de glucose entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**89**
30	**Variations moyennes (X±SD) du taux du cholestérol entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**90**
31	**Variations moyennes (X±SD) du taux des triglycérides entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**91**
32	**Variations moyennes (X±SD) du taux des protéines entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**92**
33	**Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules rouges entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**93**
34	**Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules blancs entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**94**
35	**Variations moyennes (X±SD) du taux des lymphocytes entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**95**
36	**Variations moyennes (X±SD) du taux d'hémoglobine entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**96**
37	**Variations moyennes (X±SD) du poids testiculaire entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**97**

38	**Variations moyennes (X±SD) du poids du foie entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**98**
39	**Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion hépatique entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**99**
40	**Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion testiculaire entre les 04 groupes (mode inhalation).**	**100**
41	**Coupes histologiques du testicule (X40). (T, D1, D2 et D3) (mode inhalation).**	**102**
42	**Coupes histologiques du testicule (X10). (T, D3). (mode inhalation).**	**104**

Résumé

Ce travail s'intéresse à étudier l'effet d'un solvant : Ethylène glycol monométhyl éther (EGME) qui appartient à la famille des éthers de glycol éthylènique sur quelques paramètres indicateurs de la fertilité masculine et quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang selon deux modes d'exposition: ingestion et inhalation chez le lapin *Oryctolagus cuniculus*. Le solvant a été appliqué a raison de trois doses: 50ppm, 100ppm et 150ppm pendant 04 semaines successives.

Les résultats obtenus révèlent qu'il y a une altération hautement significative dans les paramètres de la fertilité masculine (poids testiculaire, nombre, mobilité, vitalité, vitesse, malformations morphologiques des spermatozoïdes ainsi qu'une diminution dans le taux de la testostérone) chez les individus traités par le solvant comparés aux témoins, ces altérations sont plus sévères chez les groupes qui reçoivent le produit par voie orale que par voie respiratoire.

Une altération hautement significative dans le poids du foie et les paramètres biochimiques du sang qui englobent l'étude des produits de métabolisme hépatique (glucose, cholestérol, triglycérides et protéines plasmatiques) chez les individus traités par l'EGME comparés au témoins, de même façon ces altérations sont plus importantes lors de l'exposition par voie orale.

Des perturbations hautement significatives dans les paramètres cellulaires du sang qui englobent la numération des cellules sanguines (globules blancs, globules rouges et lymphocytes) et le taux d'hémoglobine chez les individus traités par l'EGME comparés au témoins, ces perturbations sont plus importantes lors de l'exposition par voie orale.

Une altération du système détoxifiant (taux du glutathion hépatique et testiculaire).

Mots clés: Ethylène glycol monométhyl éther, Lapin, Fertilité, Toxicité, Santé, Ingestion, Inhalation.

Abstract

This work is interested to study the effect of a solvent: Ethylene glycol monométhyl ether (EGME) that take part into the family of the ethylenic ethers of glycol on some parameters of male fertility and some biochemical and cellular parameters of blood according to two methods of exposure: ingestion and inhalation in rabbit *Oryctolagus cuniculus*. The solvent has been applied as reason of three doses: 50ppm, 100ppm and 150ppm during 04 successive weeks.

The results reveal that there is a highly significant change in the parameters of male fertility (testicular weight, number, mobility, vitality, speed, morphological malformations of spermatozoids as well as a reduction in the testosterone level) at treated groups compared to control, these changes are so important at groups that receive the product by oral route than by respiratory route.

A highly significant change in weight of liver and in biochemical parameters of blood that include the study of hepatic metabolism products (glucose, cholesterol, triglycerides and proteins levels) at treated groups compared to control, in the same way these changes are more important at the groups that receive the product by oral route than by respiratory route.

A highly significant disruptions in the cellular parameters of blood that include the numeration of the blood cells (white cells, red cells and lymphocytes) and the hemoglobin level at the individuals treated by the EGME compared to control, these disruptions are more important by oral route.

A change of the detoxifying system (hepatic and testicular glutathione level)

Key words: Ethylene glycol monomethyl ether, Rabbit, Fertility, Toxicity, Health, Ingestion, Inhalation.

الملخـص

يهدف هذا العمل الى دراسة تأثير أحد المذيبات و هو Ethylene glycol monométhyl éther (EGME) الذي ينتمي الى عائلة ايثيرات الغليكول الايثيلينية، على خصائص الخصوبة الذكرية و بعض الخصائص البيوكيميائية و الخلوية للدم عند ذكور الأرانب *Oryctolagus cuniculus* .
تمت معاملة الأرانب ب 03 جرعات متفاوتة من المذيب50ppm 100ppm 150ppm لمدة 04 أسابيع متتالية. حسب طريقتين مختلفتين: عن طريق الفم و عن طريق الشم.
أظهرت النتائج اضطراب معنوي عالي في خصائص الخصوبة الذكرية (وزن الخصية، تركيز، حركة، سرعة، حيوية، تشوهات الحيوانات المنوية إضافة إلى انخفاض في تركيز هرمون التستسترون) وذلك عند الأفراد المعاملة بالمذيب مقارنة بالفوج الشاهد. هذه التشوهات كانت مهمة جدا أثناء المعاملة عن طريق الفم عنه عن طريق الشم.
لقد تسبب هذا المركب في اضطراب معنوي عالي في وزن الكبد و الخصائص البيوكيميائية للدم بما فيها تركيز الغلوكوز، الكولسترول، الغلسريدات الثلاثية و البروتينات، هذه الاضطرابات كانت مهمة جدا أثناء المعاملة عن طريق الفم أكثر منه عن طريق الشم.
من جهة أخرى، سجلنا اضطرابات في الخصائص الخلوية للدم بما فيها عدد الكريات الحمراء، الكريات البيضاء، الخلايا اللمفاوية إضافة إلى تركيز الهموغلوبين عند الأفراد المعاملة بالمذيب مقارنة بالفوج الشاهد. هذه الاضطرابات كانت مهمة جدا اثناء المعاملة عن طريق الفم.
أخيرا، أثبتنا وجود اضطراب في نظام إزالة التسمم المتمثل في تركيز GSH في الكبد و الخصية.

الكلمات المفتاحية: ايثيلان الغليكول، أرنب، خصوبة، تسمم، صحة، شم، بلع

Introduction générale

Depuis la fin du 19ème 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.

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.

La toxicologie industrielle peut se définir comme l'étude de la toxicité induite par les agents rencontrés dans le milieu professionnel et dans l'environnement, cet aspect implique tout les systèmes tissulaires qui sont directement exposés à ces substances lors de leurs premier contact avec l'organisme et leurs passage dans le milieu intérieur, soit par la peau, le système respiratoire ou le système digestif mais aussi tous les autres organes ou tissus (sang, foie) qui sont rapidement ou plus tardivement exposés à ces substances **(Bujan, 1998)**.

Les solvants sont directement ou indirectement omniprésents dans notre monde moderne, au travail, chez soi, dans les loisirs... à point qu'on ne peut pas imaginer un monde sans peintures, sans colles, sans encres, sans matières plastiques. Ces produits font, depuis quelques années, beaucoup parler d'eux. Ils développent des propriétés toxiques altérant la santé à court, mais surtout à long terme. Ils sont porteurs de sombres présages pour l'environnement et les écosystèmes planétaires.

En général, les solvants ont quatre utilisations dans divers secteurs:

- Dégraissage, nettoyage, décapage: industrie du nettoyage (teinturerie, nettoyage des sols, des métaux..), industrie des plastiques, métallurgique (traitement de surface, dégraissage des métaux) ;

- Extraction, séparation, purification: industrie chimique, agro-alimentaire, pharmaceutique ou parfumerie ;
- Application de produits sous forme liquide: imprimerie (encres), bâtiment (peintures, colles) ;
- Modification de texture d'un produit: industrie chimique, peintures ;

Ils sont classés en:

- 200 substances d'usage courant.
- 9 familles chimiques.
- 3 grands groupes:
  - Solvants oxygénés: au moins un atome d'oxygène
  - Solvants hydrocarbonés: hydrogène et du carbone
  - Hydrocarbures halogénés: un atome d'halogène (chlore, fluor, iode et brome)

Les éthers de glycol (EG) et leurs dérivés (éthylène glycol et propylène glycol) font partie des solvants oxygénés, ce sont des solvants organiques industriels utilisés par milliers de tonnes à des fins très diverses: nettoyage et dégraissage des métaux et des textiles, peintures et vernis, extraction et explosion. En effet, ces composés sont à la fois solubles dans l'eau et dans d'autres solvants organiques: ils sont amphiphiles (hydrophiles et lipophiles). Ils entrent dans la formulation de nombreux produits à usage industriel ou domestique: peintures, encres d'imprimerie, vernis, teintures, produits de nettoyage, savons liquides, cosmétiques et même certaines formulations pharmaceutiques.

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.

En 1992, aux Etats Unis, environ 1 700 tonnes d'EGME (Ethylène glycol monomethyl éther) et 500 tonnes d'EGEE (Ethylène glycol ethyl éther) étaient rejetées dans les milieux environnementaux **(Eckel *et al*., 1996)**. Ces éthers de glycol étaient retrouvés dans les sites de décharge comme les polluants habituels.

Cela conduit à dire que ce n'est pas uniquement l'homme qui est en danger, mais également les populations animales et végétales, ceci implique le déclenchement de l'alerte.

Les dérivés de l'éthylène glycol sont 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, ce sont des composés liquides, incolores, à odeur légèrement éthérée modérément volatils et d'une viscosité moyenne rendant aisé leur emploi comme solvants ou cosolvants.

La plupart des travaux expérimentaux ont déterminé la toxicité et l'impact de ces produits sur la santé **(Fastier *et al*., 2005)**, leurs métabolites semblent être plus toxiques que leurs produits initiaux (**Wang *et al*., 2000)**, l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) qui appartient à la catégorie éthylénique des éthers de glycol montre un large spectre de toxicité chez plusieurs espèces animales, il exerce son action après sa métabolisation par l'alcool et l'aldéhyde-déhydrogénase en aldéhydes et en acides alkoxyacétiques, les résultats de plusieurs études montrent que les acides alkoxyacétiques ont des propriétés toxicologiques similaires à celle de leur molécule de départ car la liaison ester est très rapidement hydrolysée ce qui suggère que ces métabolites sont responsables de la toxicité **(Miller, 1987)**.

Ces produits peuvent pénétrer dans l'organisme par voie pulmonaire, cutanée ou digestive, ils peuvent altérer la plupart des fonctions du corps, ils sont considérés comme des produits reprotoxiques atteignant la fonction de reproduction **(Lorente *et al*., 2000; Ku *et al*., 1995)**, hémato-immunotoxiques : atteinte des cellules sanguines **(INSERM, 1999)** et neurotoxiques : atteinte du système nerveux **(Brashear, 1996)**.

L'ensemble des études menées à l'échelle internationales s'intéresse actuellement aux effets des éthers de glycol sur les paramètres de reproduction y compris la fertilité masculine et féminine **(Cicolella, 2006)**. Il s'agit de l'altération de la spermatogenèse et les propriétés biologiques des spermatozoïdes, l'ovogenèse ou de la perturbation du développement embryonnaire, la toxicité des éthers de glycol sur le développement se

base sur trois types de données : des données sur la toxicité chez les femelles gestantes, des données sur la mortalité fœtale et enfin des données sur les malformations **(Maldonado *et al.*, 2003)**, bien que l'hématotoxicité des éthers de glycol est moins documentée chez l'homme que chez l'animal, à l'exception de quelques cas d'hypoplasie médullaire touchant principalement la lignée neutrophile. Selon **Welch & Cullen (1988)**, dans une étude effectuée chez des peintres des chantiers exposés à 0,8 ppm d'EGME et 2,6 ppm d'EGEE, ont rapporté une anémie dans 10 % des cas et une neutropénie dans 5 % des cas, par comparaison à des salariés non exposés. Ces anomalies étaient apparues depuis l'embauche. En fait, en regardant les observations, sur les 9 diminutions du taux d'hémoglobine observées depuis l'embauche, 3 ou 4 seulement paraissent significatives, et dans 1 seul cas, le taux d'hémoglobine pendant l'exposition était < à 13 g/dl.

D'autres travaux ont démontré que l'administration répétée d'éthers de glycol produit parfois des altérations fonctionnelles et/ou histologiques hépatiques **(INSERM, 1999)**. Les effets hépatiques rapportés avec l'EGME ont été observés pour des doses supérieures à celles susceptibles d'induire des atteintes hématologiques ou testiculaires.

La pénétration des éthers de glycol dans l'organisme se fait principalement lors d'un contact direct, à travers la peau, leur faible volatilité limite la contamination par voie respiratoire sauf dans des situations où les produits sont chauffés ou utilisés sous forme d'aérosols **(Marie, 2002; Etiemble, 2003)**. 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, ils se distribuent dans la plupart des tissus biologiques.

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 transformés en métabolites réactifs, responsables de manifestations toxiques. L'absorption des éthers de glycol par voie cutanée est très importante pour la plupart d'entre eux. Cette pénétration cutanée varie 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.

L'objectif de ce travail réalisé au niveau du laboratoire d'écophysiologie animale du département de biologie, est de compléter les informations disponibles dans la littérature et la bibliographie concernant les effets de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) selon deux modes d'exposition (ingestion et inhalation) sur les paramètres de la fertilité masculine ainsi que quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin *Oryctolagus cuniculus.*

Ce manuscrit se divise en quatre chapitres:
Le premier est une étude bibliographique des solvants en général, leurs familles, groupes et classification, plus particulièrement les éthers de glycol, en étudiant leurs caractères physico-chimiques, métabolisme, utilisation, leurs effets sur la santé (humaine et animale) et sur l'environnement.

Le second est une étude expérimentale, dans laquelle nous présentons le matériel et les méthodes de travail, les modes d'exposition des lapins au solvant (ingestion et inhalation), 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) sous forme d'histogrammes et de figues (photos numériques des coupes histologiques).

Dans le quatrième chapitre, nous essayons de discuter les résultats obtenus et les comparer avec les données disponibles au niveau international.

Notons qu'une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication internationale, et la majorité des résultats ont été communiqués dans plusieurs manifestations scientifiques.

Chapitre I: Etude bibliographique

1. Généralités sur les solvants

Un solvant, de point de vue chimique, est un liquide qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans provoquer de modification chimique de ces substances et sans lui-même se modifier. Les solvants permettent de mettre en oeuvre, d'appliquer, de nettoyer ou de séparer des produits **(INSERM, 1999).**
Cette propriété permet:

- L'utilisation des solvants pour nettoyer ou séparer différentes substances.
- Leur régénération quand leur utilisation première les a chargé en impuretés.

Couramment utilisés dans l'industrie, (peinture, chimie, pharmacie, mécanique…), ils sont également présents en quantités dispersées dans l'artisanat (carrosserie, vernisseurs, pressings…), dans les laboratoires de recherche ou d'enseignement et même chez les particuliers (produits de nettoyage, détachants…). Ils sont utilisés pour le dégraissage, nettoyage, décapage, l'extraction à partir d'un autre produit, la séparation, la purification, le stockage ou transport sous forme liquide, la modification de texture d'un produit, dans l'industrie chimique, du plastique, métallurgique, alimentaire, pharmaceutique, agriculture, bâtiment…
Les solvants se classent principalement en trois grands groupes auxquels s'ajoute un groupe de solvants particuliers **(Mahieu & Boust, 2007)**:

- **Solvants oxygénés:** contiennent au moins un atome d'oxygène, ils comprennent: les alcools (méthanol, éthanol…), les cétones (acétone, méthylcétone…), les éthers de glycol (séries éthylénique et propylénique…), les éthers (éther éthylique…) et les esters (acétate, agrosolvants…).
- **Solvants hydrocarbonés:** contiennent de l'hydrogène et du carbone, ils comprennent: les hydrocarbures aromatiques (benzène, xylène, toluène…) et les solvants pétroliers non aromatiques (essences spéciales, white-spirit…).
- **Hydrocarbures halogénés:** contiennent un atome d'halogène (chlore, fluor, iode et brome), ils comprennent: trichloroéthylène, tetrachloroéthylène ou perchloroéthylène, dichlorométane ou chlorure de méthylène et le chlorobenzène.

- **Les solvants particuliers**: comprennent: les hydrocarbures nitrés (nitrométhane, nitrobenzène…), les composés azotés (diméthylformamide, triéthylamine…), les dérivés soufrés (diméthylsulfoxide) et les hydrocarbures complexes (familles des terpènes: essence de térébenthine…).

Et en neuf familles chimiques **(Charretton *et al*., 2005; Gauthier, 2002)** qui sont les suivantes:

1.1. Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylènes, cumène…)

La principale source de production des hydrocarbures aromatiques est le raffinage du pétrole brut. On peut aussi produire ces composés par distillation des goudrons de houille mais cette voie tend à disparaître. De plus, on retrouve des composés aromatiques dans des végétaux odorants (d'où le terme aromatique) tels que le pin, l'eucalyptus, le thym ou la menthe **(Boust, 2004)**. Ce sont des liquides volatils a température ambiante, incolores, à odeur agréable, peu solubles dans l'eau mais miscibles aux solvants organiques, huiles minérales, végétales et animales, inflammables, à accumulation de charges électrostatiques. Ils sont responsables de la toxicité du système nerveux central, la peau, les muqueuses, le sang, et de quelques cas de foetopathie **(Testud, 1998)**.

1.2. Solvants pétroliers (hors aromatiques : alcanes, alcènes…)

Des mélanges obtenus par séparations physiques du pétrole brut, ce sont des liquides à température ambiante des 5^0 C, incolores, parfois jaunes, à odeur souvent caractéristique et désagréable, volatils, insolubles dans l'eau, miscibles avec de nombreux solvants organiques, inflammables. Ils sont utilisés comme solvants dans les peintures, adhésifs, vernis et laques, intermédiaires de synthèse, agents de dégraissage à froid ou à chaud en machine. Ils sont toxiques pour le système nerveux central, la peau et les muqueuses l'hexane par exemple peut atteindre les nerfs périphériques et paralysie des membres inférieurs. Ils provoquent un danger d'intoxication chronique faible **(Petit, 2004)**.

1.3. Alcools (méthanol, éthanol, glycols…)

Les alcools sont très utilisés comme diluants des encres d'imprimerie, des résines, des vernis, des peintures et des colles à moquette. Ce sont d'excellents agents déshydratants possédant une bonne action dégraissante ; ils sont donc utilisés comme agents de séchage en mécanique ou en optique et pour les nettoyages difficiles (encres, silicones…). Ils sont aussi largement utilisés comme excipients pour les produits pharmaceutiques ou cosmétiques ou comme milieu réactionnel dans l'industrie chimique. Ce sont des liquides à t° ambiante, très volatils, incolores, à odeur agréable, qualifiée de sucrée, acre ou piquante selon l'alcool, miscibles à l'eau totalement ou partiellement, inflammables sauf les glycols, mélanges explosifs avec l'air, dissolvent les graisses et certaines matière plastiques, déshydratants. Les alcools provoquent des troubles du système nerveux central, la toxicité de la peau et les muqueuses, le plus toxique est le méthanol qui est capable de conduire à la cécité et la mort, l'éthanol peut causer des troubles digestifs (signes d'alcoolémie), l'alcool furfurylique est le plus agressif à de très faibles expositions, il provoque une irritation respiratoire **(Forsberg & Mansdorf, 2007).**

1.4. Cétones (acétone, méthyéthylcétone…)

Synthétisées industriellement par déshydrogénation d'alcools, ils sont utilisés comme solvants de peintures, laques, vernis, colles, adhésifs, intermédiaires de synthèse de matières plastiques, imprégnées sur lingette pour petits nettoyages, éliminent à froid en machines graisses, huiles, cires ou encres, agents séchant des pièces humides, nettoyage des métaux, pièces de précisions et composants électroniques. Ce sont des liquides incolores, à odeur suave et sucrée, très volatiles pour les non cycliques, inflammables, se dissolvent dans l'eau et dans nombreux solvants organiques.

Ils provoquent une toxicité du système nerveux central, la peau et les muqueuses, le méthylbutylcétone (MBK) par exemple cause des pertes de sensibilité et déficit moteur **(Gerin, 2002)**.

1.5. Ethers (éther éthylique, dioxane…)

Synthétisés à partir de Déshydratation de deux alcools, ce sont des liquides volatils à température ambiante. Ils sont incolores, d'odeur caractéristique (sucrée ou éthérée), perceptibles à l'odorat à des valeurs de concentration dans l'atmosphère variant de 0,05 ppm pour le Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) à 30 ppm pour le Tetrahydrofuran (THF). Ils sont plus ou moins solubles dans l'eau, mais tous miscibles à la plupart des solvants organiques.

Tous les éthers de faible poids moléculaire sont inflammables voire extrêmement inflammables**.** Par exemple, l'éther diéthylique a un point d'éclair égal à – 45°C. Ils sont susceptibles d'accumuler des charges électrostatiques lors de leur manipulation. Sous l'action de la lumière et au contact de l'oxygène de l'air, les éthers peuvent s'oxyder plus ou moins rapidement pour se transformer en peroxydes, composés instables et explosifs. Ils ont des effets toxiques sur le système nerveux central en altérant la mémoire et les capacités psychiques, sur la peau et les voies respiratoires pouvant causer des irritations et des dermatoses. L'éthers diethylique et dimethoxymethane ont des effets anesthésiques et le dimethoxymethane est hépatotoxique et responsable des œdème des reins et des poumons chez l'animal **(Stellman, 2004)**.

1.6. Hydrocarbures halogénés (chlorés, bromés ou fluorés)

Synthétisé à partir du remplacement d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène d'un hydrocarbure par un ou plusieurs atomes d'halogène : chlore (Cl), brome (Br), fluor (F), iode (I). Ils sont utilisés dans les domaines agricoles, industriels, médical et domestiques, intermédiaires de synthèse (insecticides, matières plastiques), anesthésiques, retardateurs de flamme, fluide frigorifique, fluides propulseurs des générateurs d'aérosols, graissage de métaux, nettoyage a sec, extraction, de principes actifs en pharmacie, diluants de colles, adhésifs et peintures, milieux de synthèse en chimie fine. Ce sont des liquides incolores, moins volatils, ininflammables (sauf certains bromes), insolubles dans l'eau, forte odeur, souvent agréable et etherée, souvent stabilises par des antioxydants pour éviter la dégradation en présence d'air, lumière ou humidité. Ces composés sont responsables d'une toxicité aigue provoquant la dépression du Système nerveux central et une atteinte

pulmonaire, cardiaques, rénale et hépatique, ainsi qu'une toxicité chronique (céphalées, troubles de la mémoire), à noter que le trichloroethylène, chloroforme et le tetrachlorure de carbone sont des produits cancérogènes **(Testud, 1998).**

1.7. Solvants particuliers (amines, amides, terpènes…)

Des liquides volatils à température ambiante, incolores ou légèrement jaunâtres, à odeurs variables, solubles dans nombreux solvants organiques plus ou moins dans l'eau, inflammables de façon variable. Il existe:

- **Hydrocarbures nitrés** : solvants de cire, peintures, résine ou encres. Ce sont des composés aliphatiques ou aromatiques sur lesquels a été greffé le groupement NO_2.
- **Amines, amides et dérivés azotés** : solvant de pesticide, d'extraction dans l'industrie pharmaceutique et pétrolière, fabrication de vernis, peintures, décapants. Ce sont des composés dans lesquels un atome d'azote est directement lie à un ou plusieurs atomes de carbones
- **Dérivés soufrés** : solvant de polymérisation ou d'extraction, nettoyants de dérivés cellulosiques
- **Hydrocarbures complexes** : solvants de peintures, vernis, cirages, insecticides, parfums. Principalement l'essence de terebenthine, dipentene.

Ces produits sont toxiques pour le système nerveux central, la peau et les muqueuses, le 2-nitropropane est un composé hépatotoxique et cancérogène, le nitrobenzène provoque des troubles hématologiques, hépatiques et neurologiques, le diméthylformaldéhyde (DMF) a un effet reprotoxique, cause des brûlures et peut aussi atteindre les poumons et les reins.

1.8. Esters

Des liquides incolores. Les acétates sont volatils à température ambiante alors que les esters d'acides dicarboxyliques ou les agrosolvants possèdent des tensions de vapeur relativement faibles.

Tous les esters ont une odeur agréable et légère, souvent caractérisée de fruitée. Les acétates sont perceptibles à l'odorat à des valeurs de concentration dans l'atmosphère très faibles (0,04 ppm pour l'acétate de *n*-butyle, par exemple).

Ils sont tous solubles dans de nombreux solvants organiques mais peu ou pas solubles dans l'eau (exception faite de l'acétate de méthyle).

Leurs caractéristiques d'inflammabilité dépendent des substances. En effet, les acétates les plus légers (acétate de méthyle, acétate d'éthyle, acétate de propyle et acétate d'isobutyle par exemple) sont facilement inflammables (point d'éclair < 21°C).

Les autres esters, tout en restant combustibles, ne sont pas considérés comme inflammables.

Ils sont, de plus, susceptibles d'accumuler les charges électrostatiques lors de leur manipulation (circulation dans des tuyaux, transfert en pluie...).Il existe:

- **Acétates** : produit à partir de la réaction d'un alcool avec de l'acide acétique, ils sont utilisés mélangés a d'autres solvants dans les peintures, les laques, les encres d'imprimerie et les produits anticorrosifs. Les faibles doses ont une toxicité moindre et les fortes doses sont neurotoxiques **(Mahieu & Boust, 2007)**.
- **Esters d'acides dicarboxyliques** : sous-produits de la synthèse du nylon, ils entrent dans la formulation de peintures, préparations décapantes ou de nettoyage.
- **Esters d'acides gras** : issus d'huiles végétales par transésterification, ce sont principalement des carburants, solvants de nettoyage des presses offset en imprimerie, nettoyant métallique, façades, graffiti, solution de dégoudronnage, décapant de peinture sèche, peu de données sur leurs toxicité.
- **Lactate d'éthyle** : produits à partir de la fermentation du sucre, ils sont utilisés comme nettoyant et dégraissant de pièces métalliques, solvant de résines techniques, peu de données sur leurs toxicité **(Gauthier, 2002)**.

1.9. Les éthers de glycol

Des liquides incolores, à odeur légèrement éthérée, agréable, moyennement ou peu volatils et légèrement visqueux, amphiphiles (à la fois hydrophiles et lipophiles) d'où un fort pouvoir de pénétration de la peau, miscibles dans l'eau et solvants organiques, dissolvant nombreux cires, huiles et résines. Ce sont des produits utilisés dans la fabrication de peintures, encres, vernis et colles, dans les produits d'entretien, cosmétiques, dégraissants, produits phytosanitaires et fluides de coupe. Ils comprennent deux séries : les dérivés de l'éthylène glycol et ceux du propylène glycol, dans chaque série il existe deux types de composés: éthers et éthers-esters (acétates):

- **Ethers**: obtenus par réaction de l'oxyde d'éthylène ou de propylène sur un alcool
- **Acétates**: obtenus par réaction d'un acide organique (acide acétique) sur la fonction alcool de l'éther précédemment constitué.

Les principales substances utilisées: méthyle glycol et éthyle glycol, butylglycol, dérivés du diéthylène glycol et le méthoxypropanol.

Les éthers de glycol sont toxiques pour la peau, les muqueuses et le système nerveux central. Les dérivés de l'éthylène glycol (EGME et EGEE) ont des effets sur la reproduction (diminution de la fertilité masculine et mortalité des embryons), et peuvent également provoquer des cas de leucémies et d'hémolyse chez l'animal, tandis que les dérivés du propylène glycol sont moins toxiques **(Brasseur, 2001)**.

2. Les éthers de glycol

Les éthers de glycol sont des solvants à la fois hydrophiles (solubles dans l'eau) et lipophiles (solubles dans les graisses) **(Marie, 2002)**. Du fait de ce caractère amphiphile, ils entrent dans la composition de nombreux produits à usage industriel ou domestique. Plus d'une trentaine d'éthers de glycol sont synthétisés aujourd'hui par l'industrie chimique. Ils se répartissent en deux séries: les dérivés de l'éthylène (série éthylénique « E ») et les dérivés du propylène glycol (série propylénique « P »).

Jusqu'en 1990, les dérivés de l'éthylène glycol étaient les principaux éthers de glycol commercialisés, probablement parce que l'oxyde d'éthylène nécessaire à leur synthèse est un important sous produit de l'industrie pétrolière **(INRS, 2004)**. La publication de travaux expérimentaux montrant la toxicité de deux éthers de glycol de cette série (EGME et EGEE) et de leurs acétates a eu pour conséquence d'amorcer leur remplacement par des dérivés propyléniques. En 1997, le marché européen de l'ensemble des éthers de glycol était de 350 000 tonnes **(Laudet-hesbert *et al*., 2002)**.

De nombreux secteurs professionnels utilisent des éthers de glycol qui sont présents dans différentes catégories de produits industriels ou domestiques largement diffusés **(INRS, 2005; Marie 2002)**.

Connus depuis les années trente, les éthers de glycol ont fait l'objet de travaux chez l'animal pour rechercher les effets d'une exposition à court terme (effets aigus) et à moyen terme (effets à doses répétées). La plupart des études publiées dans la littérature internationale concernent les éthers de glycol de la série éthylénique et en particulier l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME).

2.1. Synthèse et propriétés physico-chimiques des éthers de glycol

La synthèse des éthers de glycol s'effectue principalement par l'action d'un alcool sur l'oxyde d'éthylène ou de propylène. On obtient alors un éther monoalkylé (méthyl, éthyl, propyl, butyl…) qui, par réaction avec un acide organique, donnera un éther-ester (acétate d'éther de glycol) **(Edwards *et al*., 2001).**

Deux séries d'éthers de glycol peuvent ainsi être différenciées :

- **Les dérivés de l'éthylène glycol "E": R-O-CH_2-CH_2-OH**

  Possède une fonction alcool primaire qui se métabolise dans l'organisme par voie de l'alcool déshydrogénase puis de l'aldéhyde déshydrogénase en acides alkoxyacétiques **(Etiemble, 2003)**. Certains de ces acides alkoxyacétiques sont responsables d'effets toxiques sur la reproduction, notamment l'acide méthoxyacétique (MAA), métabolite de l'éthylène glycol monométhyl ether (EGME), et l'acide éthoxyacétique (EAA)

métabolite de l'éthyléne glycol éthyl éther (EGEE) **(Lemazurier *et al*., 2003; INRS, 2005)**.

- **Les dérivés du propylène glycol "P" R-O-CH_2-CH (CH_3)-OH**

Ils existe deux types d'isomères α et β. Les dérivés α testés se sont révélés moins toxiques et en particulier n'ont montré aucun effet sur la reproduction **(Laudet-Hesbert *et al*., 2002)**. Les dérivés de cette série sont dégradés en propylène glycol et en alcool, puis finalement en CO_2 éliminé par la respiration. Toutefois certains composés propyléniques sont métabolisés en aldéhydes et acides comme les dérivés éthyléniques **(Soulat, 2001).**

Les éthers de glycol ont comme principale propriété d'être solubles dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques (alcool, esters, hydrocarbures aromatiques): ils sont amphiphiles, c'est-à-dire hydrophiles et lipophiles. Ces propriétés en font d'excellents cosolvants eau-huile, mais aussi des solvants de bonne qualité.

2.2. Principales caractéristiques des éthers de glycol

- Stabilité à long terme des formulations.
- Bonnes performances techniques de petites quantités suffisent (peintures à l'eau par exemple).
- Evaporation lente.
- Pas d'odeur résiduelle.

Retrouvés dans tous les produits dits "à l'eau", ils interviennent également dans la composition de nombreuses préparations à usage industriel (encres, vernis, produits à usage métallurgique et mécanique) ou domestique (cosmétiques, produits d'entretien….) **(INRS, 2001)**.

2.3. Principales abréviations des éthers de glycol (Tableau 1)

Tableau 1 : Principales abréviations utilisées pour la dénomination des éthers de glycol (INRS, 2006).

Numéro CAS	Acronyme	Dénomination anglaise courante
Série éthylénique (série E)		
109-86-4	EGME	Ethylene glycol methylether
110-49-6	EGMEA	Ethylene glycol methylether acetate
110-71-4	EGDME	Ethylene glycol dimethylether
110-80-5	EGEE	Ethylene glycol ethylether
111-15-9	EGEEA	Ethylene glycol éthylether acetate
629-14-1	EGDEE	Ethylene glycol diéthylether
2807-30-9	EGnPE	Ethylene glycol n-propylether
20706-25-6	EGnPEA	Ethylene glycol n-propylether acetate
109-59-1	EGiPE	Ethylene glycol isopropylether
111-76-2	EGBE	Ethylene glycol butylether
112-07-2	EGBEA	Ethylene glycol butylether acetate
7580-85-0	EGtertBE	Ethylene glycol tert-butylether
112-48-1	EGDBE	Ethylene glycol dibutylether
112-25-4	EGHE	Ethylene glycol hexylether
122-99-6	EGPhE	Ethylene glycol phenylether
111-77-3	DEGME	Diethylene glycol methylether
111-96-6	DEGDME	Diethylene glycol dimethylether
111-90-0	DEGEE	Diethylene glycol ethylether
112-15-2	DEGEEA	Diethylene glycol ethylether acetate
112-36-7	DEGDEE	Diethylene glycol diethylether
6881-94-3	DEGnPE	Diethylene glycol n-propylether
112-34-5	DEGBE	Diethylene glycol butylether
124-17-4	DEGBEA	Diethylene glycol butylether acetate
112-59-4	DEGHE	Diethylene glycol hexylether
112-35-6	TEGME	Triethylene glycol methylether
112-49-2	TEGDME	Triethylene glycol dimethylether
112-50-5	TEGEE	Triethylene glycol ethylether
143-22-6	TEGBE	Triethylene glycol butylether
23783-42-8	TetraEGME	Tetraethylene glycol methylether
1559-34-8	TetraEGBE	Tetraethylene glycol butylether
Série propylénique (série P)		
1320-67-8 (107-98-2 / 1589-47-5)	PGME	Propylene glycol methylether (mélange d'isomères)
108-65-6 / 79657-70-4	PGMEA	Propylene glycol methylether acetate (mélange d'isomères)
7778-85-0	PGDME	Propylene glycol dimethylether
1569-02-4 et autres isomères	PGEE	Propylene glycol ethylether (mélange d'isomère)
10221-57-5	PGDEE	Propylene glycol diethylether
110-48-5	PGiPE	Propylene glycol iso-propylether
1569-01-3	PGnPE	Propylene glycol n-propylether
5131-66-8 / 57018-52-7	PGBE	Propylene glycol butylether (mélange d'isomères)
57018-52-7	PGtBE	Propylene glycol tert-butylether
41593-38-8	PGPhE	Propylene glycol phenylether (mélange d'isomères)
34590-94-8	DPGME	Dipropylene glycol methylether
88917-22-0	DPGMEA	Dipropylene glycol methylether acetate
111109-77-4	DPGDME	Dipropylene glycol dimethylether
30025-38-8	DPGEE	Dipropylene glycol ethylether
29911-27-1	DPGnPE	Dipropylene glycol n-propylether
24083-03-2	DPGBE	Dipropylene glycol butylether
29911-28-2	DPGnBE	Dipropylene glycol n-butylether
132739-31-2	DPGtBE	Dipropylene glycol tert-butylether
20324-33-8 / 25498-49-1	TPGME	Tripropylene glycol methylether (mélange d'isomères)
96077-04-2	TPGnPE	Tripropylene glycol n-propylether
55934-93-5	TPGBE	Tripropylene glycol butylether
2517-43-3	1BG3ME	Butylene glycol monomethylether (3-méthoxy-1-butanol)

2.4. Utilisation et marché des éthers de glycol

L'utilisation des éthers de glycol remonte aux années trente, mais s'est surtout développée à partir des années soixante avec l'apparition des peintures polyuréthannes, époxydiques, vinyliques et acryliques **(Costes & Henry, 1998)**. Vers le milieu des années quatre-vingt, en raison de la mise en évidence expérimentale des propriétés toxiques de certains dérivés éthyléniques, des dérivés propyléniques sont apparus sur le marché (Tableau 2).

Tableau 2: Principaux produits susceptibles de contenir des éthers de glycol (FIPEC, 2004; INRS, 2006).

Produits	Ethers de glycol
Peintures, encres, vernis, teintures, colles et adhésifs	EGME, EGEE(A), EGBE(A), DEGME, DEGBE(A), DEGEE, 2PG1ME(A), 2PG1EE(A), DPGME
Produits d'entretien	EGBE, DEGBE, 2PG1ME(A), 2PG1BE, DPGME, EGEE(A), DEGME, DEGEE
Cosmétiques	2PG1ME, EGBE, DEGEE, DEGBE, EGPhE, TPGME, DPGME
Fluides de coupe	EGBE, EGEE, DEGBE, DEGEE,
Phytosanitaires	EGBE, DEGDME, DEGBE, DPGME, EGME
Carburant aéronautique	EGME, DEGME
Produits photographiques	DEGBEA

2.5. Devenir des éthers de glycol dans les compartiments environnementaux

Les industries qui fabriquent, transforment et utilisent les éthers de glycol peuvent en émettre dans l'air, en libérer dans les eaux de surface et les eaux souterraines. En 1992, aux Etats-Unis, environ 1 700 tonnes d'EGME et 500 tonnes d'EGEE étaient rejetées dans les milieux environnementaux. Ces éthers de glycol étaient retrouvés dans les sites de décharge comme les polluants habituels. Le devenir des éthers de glycol dans les milieux

environnementaux n'a pas fait l'objet d'une analyse exhaustive dans cette expertise. Les données actuellement disponibles suggèrent une répartition à 96 % dans le compartiment aquatique, près de 2 % dans le compartiment sol-sédiments et moins de 0,1 % dans l'air. D'après leurs propriétés physico-chimiques, les éthers de glycol peuvent être considérés comme des polluants mobiles dans les sols et donc susceptibles de contaminer les nappes aquifères. Quant aux niveaux de concentration des éthers de glycol dans l'air, on peut donner à titre d'exemple, les niveaux d'EGBE mesurés en 1993 en Europe et au Népal : ils étaient respectivement de 1,6 et 0,1 µg/m3. Dans l'air des habitations situées en milieu non industriel, ils sont de l'ordre de 1 µg/m3 dans des bureaux aux Etats-Unis et de 8 %µ/m3 dans des logements en Italie. Dans l'atmosphère, la demi-vie des éthers de glycol est estimée à moins d'une journée **(INSERM, 1999)**.

Les données concernant la contamination de l'eau sont encore fragmentaires. Il peut exister un relargage des éthers de glycol dans les eaux de surface et les eaux souterraines à partir des décharges mixtes de déchets industriels et domestiques particulièrement dans les panaches anaérobies. Des niveaux inférieurs à 100 µg/l d'EGBE ont été mesurés dans des eaux d'effluents industriels aux Etats-Unis, mais au Japon, dans une rivière polluée par les rejets de l'industrie du cuir, des concentrations allant de 1 300 à 5 700 µg/l ont été rapportées. Ne figurant pas parmi les polluants prioritaires, les éthers de glycol ne sont pas souvent recherchés. L'absence de méthodes analytiques spécifiques des éthers de glycol dans les milieux complexes explique également le peu de connaissance sur leur statut environnemental **(Mitchell *et al*., 2000)**.

La demi-vie dans l'eau des éthers de glycol a été estimée de 1 à 4 semaines dans les eaux de surface et moins de deux mois dans les eaux souterraines. Des travaux ont montré que les éthers de glycol sont dégradés in vitro par des bactéries en culture et les dérivés du propylène sont même dégradés in situ dans des échantillons de sol. Dans les sols, la durée de vie des éthers de glycol varie en fonction de la nature du sol, mais le temps de demi-vie n'excède pas quatre semaines. Il n'existe pas de données quantitatives sur la présence d'éthers de glycol dans l'eau de boisson et les aliments. L'EGBE aurait été détecté dans l'eau de boisson de plusieurs villes aux Etats-Unis (taux non précisés) **(OMS, 2004)**.

L'ensemble des travaux suggère que les éthers de glycol et leurs acétates ne s'accumulent pas dans l'environnement puisqu'ils sont dégradés par photolyse et biodégradables en milieu aérobie. Compte tenu de leur répartition prédominante dans le compartiment hydrique, ils ont été testés sur les espèces aquatiques où ils ne semblent pas induire d'effet toxique à court terme. Cependant, combinés à d'autres polluants, ils pourraient en potentialiser les effets en augmentant leur bioabsorption. L'étude du niveau de contamination des sites à risque semble nécessaire au même titre que celle de leur impact à long terme sur les écosystèmes naturels **(INSERM, 1999; ACGIH, 2007)**.

2.6. Devenir des éthers de glycol dans l'organisme

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

Le métabolisme des éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol s'effectue majoritairement via l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase, avec production d'aldéhyde et d'acide alkoxyacétique. Pour certains éthers de glycol (EGHE, DEGHE...), il n'existe pas de données sur leur métabolisme. Le métabolisme des éthers de glycol dérivés du propylène glycol dépend de la nature des fonctions alcool **(Gijsbers *et al*., 2004)**.

Dans le cas des dérivés du 2propylène glycol (alcool secondaire), le métabolisme se fait essentiellement via une désalkylation par les cytochromes P450 et aboutit à la libération de CO_2. Dans le cas des dérivés 1propylène glycol (alcool primaire), la voie métabolique principale est identique à celle des dérivés de l'éthylène glycol et conduit à la formation d'aldéhyde et d'acide. Il y a peu de données précises concernant l'élimination des structures di- et trimères (polypropylène glycol mixtes), et sur une éventuelle stéréo-sélectivité de reconnaissance et de métabolisme. Les métabolites aldéhydiques ayant une durée de vie brève ne peuvent pas être facilement mis en évidence. Par contre, les métabolites ultimes acides peuvent être détectés et même dosés dans les urines des

individus exposés **(Ben-Brick *et al*., 2004)**. Suivant la nature de l'acide alkoxyacétique formé (et de l'aldéhyde) les éthers de glycol peuvent être rassemblés en " famille ". À l'intérieur de chaque famille, la quantité d'acide alkoxyacétique produite va en déclinant des monoéthers au triéthers (Tableau 3).

Tableau 3: Métabolites acides formés ou supposés être formés selon la molécule d'éthers de glycol (Gijsbers *et al*., 2004).

Acide alkoxyacétique	Ethers de glycol
Acide méthoxyacétique (MAA)	EGME, EGDME, DEGME, DEGDME, TEGME, TEGDME
Acide éthoxyacétique (EAA)	EGEE, EGDEE, DEGEE, DEGDEE, TEGEE
Acide butoxyacétique (BAA)	EGBE, DEGBE, TEGBE
Acide isopropoxyacétique (iPAA)	EGiPE
Acide propoxyacétique (PAA)	EGnPE
Acide phénoxyacétique (PhAA)	EGPhE
Acide méthoxypropionique (MPA)	1PG2ME
Acide éthoxypropionique (EPA)	1PG2EE

Les acides formés sont éliminés sous forme libre ou conjuguée.

Dans la série de l'éthylène glycol, la vitesse d'élimination augmente avec la longueur de la chaîne alkyl (butyl, éthyl, méthyl). Pour des quantités absorbées équivalentes, les concentrations tissulaires d'aldéhyde et d'acide formés seront donc moins importantes dans le cas d'éthers de glycol à longue chaîne.

La présence de concentrations cellulaires d'aldéhyde et d'acide suffisantes pour provoquer des effets nocifs résulte de l'équilibre entre leur vitesse de formation par des enzymes aisément saturables (alcool et aldéhyde déshydrogénases) et leur vitesse d'élimination.

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 **(Hardin *et al*., 1984)**.

Un certain nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme sont inductibles, et voient donc leur activité augmentée lors d'exposition réitérée aux éthers de glycol. De plus, les polymorphismes génétiques décrits pour les deux déshydrogénases, ainsi que l'absence ou la sous-représentation de divers isozymes constituent un facteur de variabilité interindividuelle de production des métabolites. Tous ces facteurs pourraient conduire à l'apparition de manifestations plus toxiques dans des groupes de population particuliers **(Cheever *et al*., 1988)**.

2.7. Données sur les expositions aux éthers de glycol

La plupart des données métrologiques disponibles sur les expositions des travailleurs et de la population générale aux éthers de glycol sont des résultats de mesures de l'exposition externe et généralement des concentrations atmosphériques des agents étudiés.

La concentration atmosphérique des éthers de glycol évalue principalement l'absorption respiratoire des personnes exposées ne bénéficiant pas de moyens de protection. C'est, presque toujours, un médiocre indicateur de l'exposition globale des individus et de la dose interne, parce qu'aux températures ambiantes habituelles, les éthers de glycol sont peu volatils et parce que la plupart d'entre eux sont très bien absorbés par voie percutanée.

Les mesurages atmosphériques ne devraient être utilisés pour l'évaluation des expositions aux éthers de glycol, que lorsque ces derniers sont chauffés ou quand leur mise en oeuvre implique la production d'aérosols. Dans tous les autres cas, la biométrologie est, en principe, préférable. Cependant, on ne dispose d'indicateurs biologiques d'exposition validés que pour un petit nombre de substances de cette famille **(Winder & Gonzalez-Calderon, 1998).**

2.7.1. Pénétration cutanée

Un certain nombre d'éthers de glycol ont fait l'objet d'études de pénétration cutanée, in vitro ou in vivo. Les méthodologies utilisées sont très variées et permettent difficilement des comparaisons.

Les études in vivo ont été réalisées chez des animaux de laboratoire (rat, cobaye, lapin), des volontaires humains ou des travailleurs exposés. Les différences de méthode portent notamment sur : le type de peau (peau intacte, lésée, sous occlusion ou non) ; le produit (pur, en solution aqueuse ou acétonique, à l'état de vapeurs) ; les conditions d'exposition (température, hygrométrie relative, port de gants ou de vêtements, exercice physique) ; le choix du marqueur et le milieu de prélèvement (produit parent et/ou métabolites, dans l'air expiré, le sang ou les urines) ; la méthode de dosage **(Kezic *et al*., 1997)**.

Pour les études in vitro, ici encore, de nombreux facteurs de variations ont été mis en évidence (type de peau : humaine, porc, rat, dermatomée ou entière, membrane synthétique ; type de cellule : diffusion statique ou flux continu ; concentration du produit ; liquide récepteur ; temps de prélèvement…). Par ailleurs, elles sont rarement conformes aux lignes directrices récentes relatives aux produits chimiques **(OCDE, 2004)** ou aux ingrédients cosmétiques **(SCCP, 2006)**.

Les études in vivo récentes chez l'animal montrent, d'une façon générale, une absorption cutanée chez le rongeur supérieure à celle observée chez l'homme **(Sabourin *et al*., 1992; Lockley *et al*., 2002).**

Les études sur des volontaires humains ont été réalisées pour l'EGBE sous forme de vapeurs ou liquide, et pour l'EGME et le PGME sous forme de vapeurs. L'EGBE est l'éther de glycol qui a été le plus étudié sur les volontaires humains.

Les études indiquent que deux types d'exposition sont responsables de l'absorption des éthers de glycol, en fonction des usages et des produits étudiés : par voie cutanée (sous forme liquide ou de vapeurs) et par inhalation (sous forme de vapeurs) **(Lockley *et al*., 2002 ; Jakasa *et al*., 2004)** :

- lors de l'utilisation d'un produit qui entraîne une exposition aux éthers de glycol par contact, c'est la voie percutanée qui apparaît être la plus importante ;
- lors de l'utilisation d'un produit qui entraîne une exposition aux éthers de glycol sans contact cutané direct, sous forme de vapeurs (par exemple lors de l'utilisation d'une peinture), c'est l'exposition par voie respiratoire qui apparaît être la plus importante, même si la voie cutanée reste non négligeable (4 à 10 % pour le PGME par exemple).

Concernant les vapeurs d'EGBE, l'analyse des diverses études montre qu'avec l'amélioration des protocoles d'exposition aux vapeurs d'EGBE et les progrès analytiques pour le dosage de l'acide butoxyacétique (BAA), on peut estimer que, dans les conditions « normales » d'exposition, la voie cutanée représente environ 10 % de l'absorption totale des vapeurs d'EGBE **(Corley *et al.*, 1997)**. Cependant, dans certaines conditions industrielles, elle peut atteindre environ 40 % **(Jones & Cocker, 2003)**.

Concernant la forme liquide, si une variabilité extrême a été mise en évidence sur les paramètres permettant d'étudier l'absorption (mesure du BAA urinaire), la plupart des études indique que l'absorption cutanée par contact direct avec la forme liquide est nettement plus élevée à partir des solutions aqueuses que du produit pur **(Jakasa *et al.*, 2004 ; Johanson *et al.*, 1988)**. Les études in vitro confirment l'augmentation du passage cutané pour la plupart des éthers de glycol par la dilution à l'eau ou d'autres solvants **(Venier *et al.*, 2004 ; Wilkinson & Williams, 2002).**

Pour les vapeurs de PGME, la part de l'absorption cutanée dans l'exposition globale a été estimée à 4 à 10 % **(Brooke *et al.*, 1998)**.

Les études sur des travailleurs exposés sont peu nombreuses. Elles concernent l'influence de différents facteurs sur la pénétration cutanée : une diminution significative de la pénétration de l'EGME a été observée avec le port de gants en caoutchouc (moindre avec des gants en coton) **(Chang *et al.*, 2004)**, une augmentation (non significative) de la pénétration cutanée du DEGBE a été observée lors de la présence de lésions cutanées (desquamation et érythème sur les mains) **(Korinth *et al.*, 2003)**, ou encore une exposition cutanée plus importante a été mise en évidence pour les tâches nécessitant une forte

contamination des mains (remplissage par rapport au chargement ou à la peinture) (**Gijsbers *et al*., 2004)**.

2.7.2 Métabolisme

2.7.2.1 Voies métaboliques

Les esters, généralement sous la forme d'acétates, sont hydrolysés en quelques minutes au contact des muqueuses ou dans le sang par des carboxylestérases. Les transformations ultérieures, de type oxydation et de conjugaison dépendent de la nature des substituants portés par les dérivés de l'éthylène, du diéthylène ou du triéthylène glycol ou de la position des substituants portés par les propylène, dipropylène ou tripropylène glycols (Figure 1).

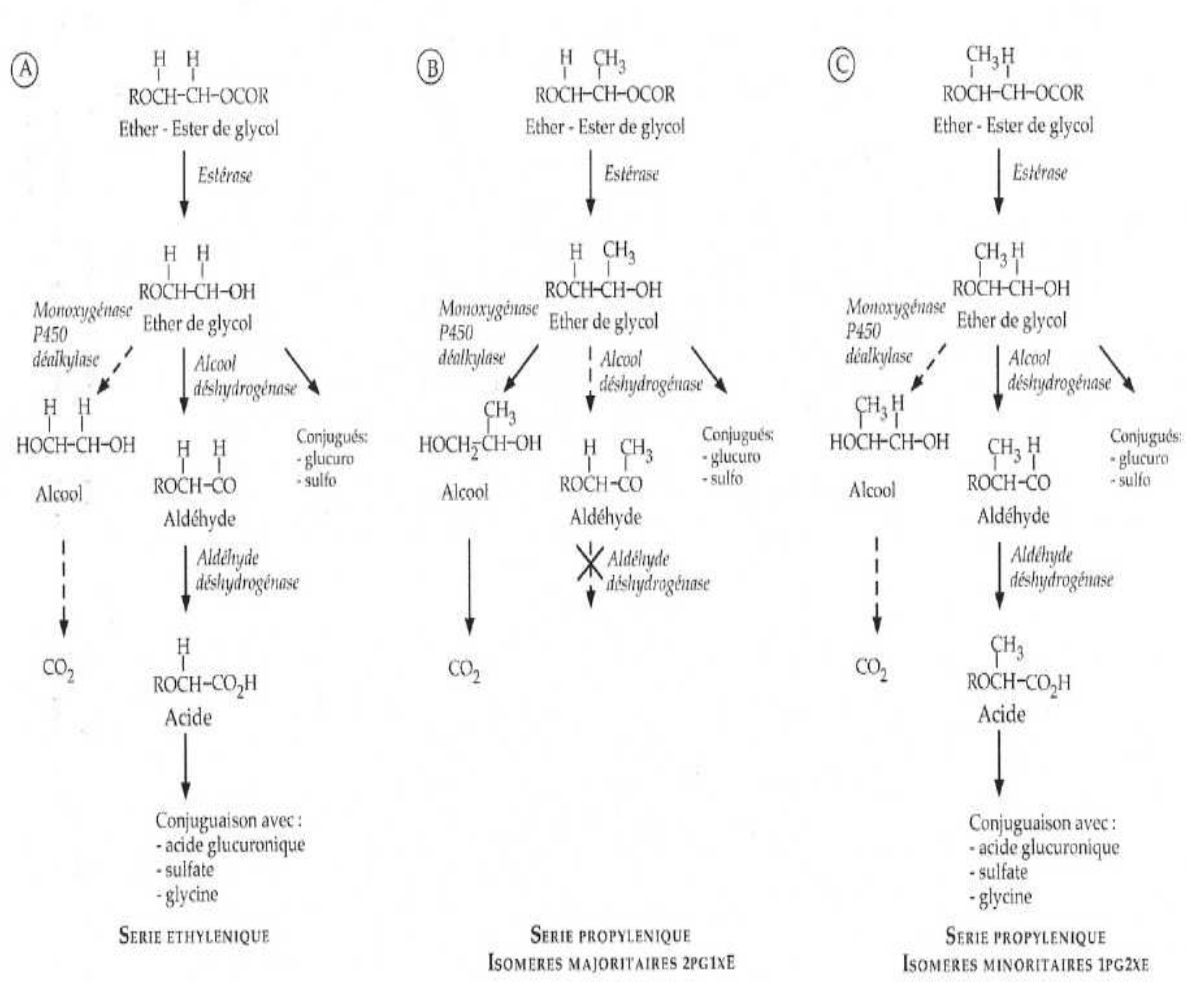


Figure 1: Métabolisme des éthers de glycol (INSERM, 2006)

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 (alkoxyacétiques) 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 CO_2, 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.

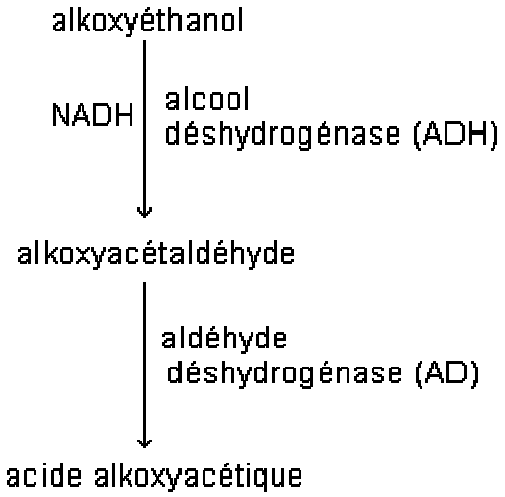
Les liaisons éthers de ces derniers peuvent être coupées par des mono-oxygénases, les déshydrogénases réagissant ensuite sur l'éthylène glycol ainsi formé. Les glymes, dérivés disubstitués de l'éthylène glycol, du diéthylène glycol et du triéthylène glycol, subissent au préalable une désalkylation d'un groupement méthoxyle aboutissant à la production d'un dérivé monosubstitué. Ce dernier subit alors une voie métabolique commune aux dérivés monosubstitués **(Desinger & Boatman, 2004)**.

Les dérivés monosubstitués du propylène glycol, du dipropylène glycol et du tripropylène glycol (série P) ne possèdent pas de fonction alcool primaire lorsque le groupe méthyle est vicinal de la fonction alcool (comme c'est le cas pour les dérivés commercialisés, par exemple l'isomère a, soit le 2PG1ME dans le cas du PGME) et ne peuvent être métabolisés en aldéhydes puis en acides par l'alcool et l'aldéhyde déshydrogénases. Ils subissent une désalkylation conduisant à la libération et à l'élimination de propylène glycol et de l'alcool. Lors de la synthèse des dérivés propyléniques, des isomères possédant une fonction alcool primaire (le groupe méthyle étant alors vicinal de la fonction éther) sont synthétisés (par exemple, l'isomère b ou 1PG2ME dans le cas du PGME). Ils subissent alors la même voie métabolique que les dérivés éthyléniques par l'alcool puis l'aldéhyde déshydrogénases générant des aldéhydes et des acides alcoxypropioniques. Le métabolisme est en fonction de l'encombrement: quand le radical est un méthyle il y a directement formation de l'aldéhyde et de l'acide ; quand le radical est un éthyle ou un butyle, il y a d'abord désalkylation avant la formation d'aldéhyde et d'acide. Les dérivés du dipropylène et du tripropylène glycol peuvent avoir quatre isomères (ou plus) et ainsi huit énantiomères (ou plus) **(Kim & Smialowiez, 1997)**.

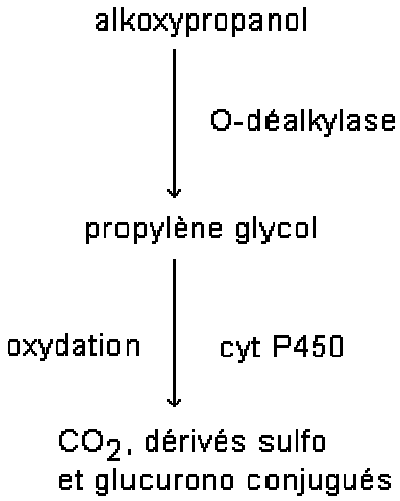
Une faible proportion des isomères possède une fonction alcool pouvant être substrat de l'alcool déshydrogénase, soit directement, soit après une désalkylation. La principale voie métabolique semble être une désalkylation **(Gargas *et al*., 2000)**.

En conclusion, les divers produits du métabolisme excrétés sont : les acides alkoxyacétiques ou alkoxypropioniques, éthylène ou propylène glycol, molécules mères inchangées et CO_2.

Métabolisme des dérivés de l'éthylène glycol



Métabolisme des dérivés du propylène glycol



2.7.2.2. Elimination

Le temps de demi-vie plasmatique des molécules mères est court, de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes. Cela contraste avec le plus long séjour des métabolites acides dans l'organisme et de leur élimination urinaire, de quelques heures à plus de 48 heures pour certains d'entre eux (71 h pour le MAA) **(Aasmoe *et al*., 1999)**.

Pour les éthers monosubstitués, la vitesse d'élimination des métabolites urinaires va dépendre de la longueur de la chaîne alkyl : les métabolites acides des éthers de glycol à chaînes longues (butyles) sont plus rapidement éliminés (demi-vie de 6 h) que les dérivés éthylés ou méthylés (demi-vies de 40 et 80 h respectivement). L'alcool et l'aldéhyde déshydrogénases sont des systèmes enzymatiques saturables, expliquant que la quantité de composé administré va également intervenir dans la vitesse d'élimination et le mode de transformation métabolique **(Groeseneken *et al*., 1986)**. L'administration simultanée d'autres composés (alcool éthylique) substrats de ces enzymes va diminuer la vitesse de transformation métabolique des éthers de glycol **(Humbert *et al*., 2003)**.

2.7.2.3. Rôle des métabolites dans la toxicité des éthers de glycol

L'étude du métabolisme des éthers de glycol a montré que, pour certains d'entre eux, la voie préférentielle de métabolisation transforme la fonction alcool des substances mères (alkoxyalcools) en fonction aldéhyde (alkoxyaldéhydes) puis acide (alkoxyacides) via l'intervention d'une alcool déshydrogénase et d'une aldéhyde déshydrogénase, respectivement. Les effets toxiques hématologiques, immunologiques, testiculaires ou sur le développement foetal semblent dépendants de la formation de ces métabolites aldéhydiques et acides **(Megarbane *et al*., 2001)**.

Le prétraitement d'animaux exposés à l'EGME et à l'EGEE par un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase prévient les effets testiculaires, suggérant un rôle des alkoxyacides dans la genèse des lésions testiculaires. Un certain nombre de travaux ont vérifié le rôle des alkoxyacides sur la toxicité testiculaire en administrant ces métabolites par voie orale chez le rat. Le MAA (acide méthoxyacétique), principal métabolite de l'EGME, et l'EAA (acide éthoxyacétique), principal métabolite de l'EGEE, reproduisent chez le rat les effets de la

substance mère. En revanche, le BAA (acide butoxyacétique), principal métabolite de l'EGBE, n'induit aucun effet **(INSERM, 2006)**.

Des études in vitro, réalisées sur des cultures primaires testiculaires animales et humaines ont confirmé la spécificité et la sensibilité des spermatocytes pachytènes au MAA et à l'EAA, alors que le BAA ne produit aucun effet. Le nPAA (acide n-propoxyacétique), principal métabolite de l'EGnPE, produit les mêmes modifications mais pour des doses 4 à 5 fois plus élevées. Cette observation est intéressante, car elle suggère un effet potentiel pour l'EGnPE sur lequel on ne dispose guère d'informations. La toxicité des métabolites sur la fonction de reproduction de la femelle non gravide a été très peu étudiée. Sur des cellules lutéales humaines en culture, le MAA réduit de manière significative le nombre de follicules ovariens **(Sekiguchi *et al*,. 2002)**.

Concernant la toxicité des métabolites sur le développement foetal, il a été montré que le MAA est tératogène, comme l'EGME. Sur des cultures d'embryons de rat, MAA et EAA induisent des retards de croissance et des anomalies structurales. Le MAA apparaît plus embryotoxique que l'EAA, lui-même plus actif que le PAA et le BAA **(Saillenfait & Robert, 2000)**.

On sait que l'hémolyse due à certains éthers de glycol est liée à leurs métabolites, essentiellement les acides alkoxyacétiques (AAA). En effet, une substance comme l'EGBE n'est pas hémolysante in vitro, alors que le BAA entraîne une hémolyse. L'administration d'un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase, limitant la formation d'AAA, protège contre l'hémolyse **(Kim *et al*., 1999)**.

L'effet immunosuppresseur est principalement décrit avec l'EGME, les dérivés avec chaîne alkyl plus longue ayant peu ou pas d'activité immuno-suppressive. Il a été démontré que le MAA est responsable, dans les modèles animaux, d'une déplétion sélective en thymocytes matures. Une réduction de la cellularité médullaire a également été montrée après administration de MAA chez l'animal **(Williams *et al*., 1995)**.

2.8.Toxicité des éthers de glycol

2.8.1. Effets des éthers de glycol sur les gonades et la fertilité chez l'animal

Des chercheurs japonais ont signalé, pour la première fois et chez des mammifères, les effets délétères de certains éthers de glycol sur le fonctionnement testiculaire. De nombreux travaux ont confirmé ces premières observations, en soulignant la très haute sensibilité du testicule à ces éthers de glycol ainsi que la spécificité des lésions induites par ces derniers.

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 **(Cordier *et al.*, 2001)**.

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 **(Bendridi *et al.*, 2001)**.

La sensibilité du testicule est variable selon la molécule d'éther de glycol considérée. Pour certains d'entre eux, EGME et EGEE, la toxicité testiculaire est définitivement avérée et bien documentée. Pour d'autres (EGnPE,EGPhE, DEGME, DEGEE, DEGBE, EGDME, DEGDME et TEGDME), une toxicité testiculaire est suspectée. Pour les éthers de glycol tels que l'EGiPE, EGDEE, DEGDEE, TEGME, TEGEE, TEGBE, 2PG1EE, 2PG1BE, 2PG1PhE,1PG2ME, DPGME, DPGEE et TPGME, les données ne sont pas suffisantes

pour conclure. Une spécificité des lésions au niveau des spermatocytes pachytène est toujours observée lorsqu'un effet est signalé **(Syed & Hecht, 1998)**. Sous réserve d'études complémentaires, l'EGBE et le 2PG1ME semblent être dépourvus de toxicité testiculaire **(Horimoto *et al*., 2000)**.

Très peu d'études ont été consacrées à la toxicité sur les gonades femelles. Des travaux préliminaires montrent une altération du cycle ovarien secondaire à une atteinte de la cellule lutéale et une diminution du potentiel de fertilité des femelles **(Davis *et al*., 1997)**.

La majorité des résultats révèlent les données suivantes :

- Effets sur les gonades mâles chez l'animal: il existe des éthers de glycol pour lesquels un effet sur les gonades mâles est démontré et ayant un effet sur la fertilité (EGME, EGEE), des éthers de glycol ayant probablement un effet sur les gonades mâles (EGnPE, EGPhE, EGDME, DEGME, DEGEE, DEGBE, DEGDME, TEGDME) et des éthers de glycol n'ayant probablement pas d'effet sur les gonades mâles (EGBE, 2PG1ME).
- Effets sur les gonades femelles chez l'animal : il existe des éthers de glycol ayant probablement un effet sur les gonades femelles (EGME, EGEE, EGBE, EGPhE, TEGDME).

2.8.2. Effets des éthers de glycol sur la gestation et le développement chez l'animal

Les nombreuses études qui ont été prises en considération pour répondre à la question de la toxicité des éthers de glycol sur le développement rapportent trois types de données: des données sur la toxicité chez les femelles gestantes, des données sur la mortalité foetale et enfin des données sur les malformations. Treize éthers de glycol ont été testés sur deux espèces de mammifères (dont une n'est pas un rongeur) : EGME, EGEE, EGnPE, EGBE, EGDEE, EGDME, DEGBE, DEGDME, TEGME, TEGDME, EGHE, 2PG1ME, DPGME **(Garlantezec *et al*., 2006).**

Deux types de protocoles sont utilisés dans les études : soit une administration journalière pendant la plus grande partie de l'organogenèse, soit l'administration d'une dose unique ou pendant un temps très court de l'organogenèse, ce qui permet d'étudier les phases sensibles du développement **(Saillenfait & Robert, 2000)**.

Des manifestations d'intolérance chez la femelle gravide ont été décrites avec tous les éthers de glycol testés à l'exception du DEGDEE et du DPGME. Ces manifestations sont variables selon les produits. Certains éthers de glycol (EGME, EGEE, EGnPE, EGBE, EGPhE, EGDME, EGDEE, DEGME, DEGDME, TEGME et 2PG1ME) peuvent provoquer la mort de la mère, des signes neurologiques (léthargie, ataxie) et une anémie hémolytique. L'effet toxique se manifeste à faible dose par une diminution de la prise de poids durant la gestation avec ou non restriction des apports alimentaires **(Karaman, 2002)**. Il faut des doses très élevées (supérieures à 1000 mg/kg/j) d'EGME, EGEE, EGBE, EGPhE, DEGME, DEGDME, 2PG1ME pour provoquer la mort de la femelle. Ces doses sont très supérieures à celles provoquant les premiers effets, (250 mg/kg/j pour EGME et DEGDME, 120 mg/kg/j pour EGDME). Cependant, pour l'EGDEE la mortalité survient dès la dose de 100 mg/kg/j **(Carney *et al.*, 2003)**.

Une mort foetale peut être provoquée après administration d'EGME, EGEE, EGnPEA, EGBE, DEGME, DEGDME, DEGDEE, TEGME, TEGDME et 1PG2ME. Cette embryotoxicité est variable selon les doses et les espèces utilisées.

Les doses, administrées pendant toute l'organogenèse, qui entraînent la mort de tous les foetus sont de 1 000 mg/kg/j chez la souris, 200 ppm chez le rat, 35,7 mg/kg/j chez le singe pour EGME **(Hoberman *et al.*, 2000)**. Ceci suggère la nécessité d'une prudence accrue concernant l'espèce humaine.

Des malformations, qui ne témoignent pas d'un simple retard de croissance in utéro, sont observables après exposition à l'EGME, EGEE, EGDEE, DEGME, DEGDME, TEGDME et 1PG2ME. Ces malformations varient en fonction des espèces et touchent de nombreux organes (anomalies digitales, exencéphalie, dysplasie caudale, malformations craniofaciales, anomalies squelettiques axiales). Avec l'EGME, on constate que l'exencéphalie est induite par une administration précoce chez la souris, alors que les anomalies des extrémités sont générées plus tardivement.

Ces résultats révèlent les données suivantes :

- Ethers de glycol pour lesquels un effet sur le développement (foetotoxicité et tératogénicité) est démontré (EGME, EGEE).
- Ether de glycol pour lequel un effet foetotoxique sans effet tératogène est démontré (EGBE).
- Ethers de glycol pour lesquels il existe une forte suspicion d'un effet sur le développement (foetotoxicité et tératogénicité) (DEGME, DEGDME, TEGDME, EGDEE, 1PG2ME).
- Ether de glycol pour lequel il existe une forte suspicion d'un effet foetotoxique sans effet tératogène (TEGME).
- Ethers de glycol pour lesquels des données expérimentales suggèrent un effet sur le développement (foetotoxicité et tératogénicité) (EGDME, DEGDEE).
- Ethers de glycol pour lesquels des données expérimentales suggèrent une innocuité (2PG1ME, DPGME).

2.8.3. Effets génotoxiques in vitro et in vivo et les effets cancérogènes des éthers de glycol chez l'animal

L'évaluation des potentialités mutagènes et génotoxiques s'effectue à l'aide de modèles cellulaires validés in vitro et in vivo. La mutagénicité, dans cette expertise, fait référence à l'induction de mutations de gènes, résultant de modifications du matériel génétique, ponctuelles (portant sur un nombre très limité de bases), transmissibles et non visibles en microscopie. La génotoxicité a une signification plus large et englobe les altérations affectant la structure et le fonctionnement du génome, ainsi que les mécanismes de contrôle du cycle et de la division cellulaire.

Des effets génotoxiques peuvent être responsables de tumeurs, mais la cancérogénicité peut également résulter d'altérations non génomiques, ou «épigénétiques», qui peuvent être détectées par des études in vitro complémentaires.

Les études in vitro ont permis également d'étudier la toxicité des métabolites réactifs qui ne peuvent pas être retrouvés in vivo. Les effets génotoxiques mis en évidence avec les éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol et leurs métabolites sont de différents types **(Elias, 1996)**:

- mutagénicité sur bactéries et cellules de mammifères du métabolite aldéhydique de l'EGME (MALD) et de l'EGBE ; - clastogénicité (aberrations chromosomiques sur cellules de mammifères) des métabolites aldéhydiques (MALD, EALD, BALD) à faible concentration (0,1 à 1 mM) ;
- Induction in vitro de la formation de micronoyaux et d'aneuploïdie, partagée par EGME, EGEE, EGBE, molécules parentes et métabolites ;
- Induction d'échanges entre chromatides soeurs pour ces mêmes éthers de glycol;
- inhibition de la communication intercellulaire pour des concentrations très élevées (100 mM) pour EGME, EGEE, EGBE, 2PG1ME et DPGBE.

Aucun des effets précédents, à l'exception de l'inhibition de la communication intercellulaire, n'a été rapporté pour les dérivés du propylène glycol étudiés (2PG1ME, 2PG1BE, DPGBE).

L'implication des métabolites dans la génotoxicité des éthers de glycol est bien démontrée in vitro. Des études ont souligné la cytotoxicité élevée des métabolites aldéhydiques, par rapport aux métabolites acides et aux éthers de glycol **(Herbold *et al*., 1998)**.

La cytotoxicité des aldéhydes se manifeste à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 mM, tandis que celle des acides alkoxyacétiques est observée pour des concentrations dix fois plus élevées, et celle des éthers de glycol parents pour des concentrations encore supérieures, pouvant dépasser 100 mM (sauf pour l'EGBE dont les effets peuvent se produire à des concentrations voisines de 10 mM). Les métabolites les plus actifs sont ceux dont la chaîne carbonée est la plus courte (le MALD est ainsi le métabolite étudié le plus génotoxique) **(Oh *et al*., 2005)**.

Tableau 4: Effets génotoxiques des éthers de glycol et de leurs métabolites in vitro (Oh *et al*., 2005).

Mutation	ECS	AC	MicroN			Aneupl	ICI	TM
Composé		B				M		
EGME	-	-	±	-	+	+	+	-
MALD (aldéhyde)	+	+	+	+	+	+	-	+
MAA (acide)	-	-	+	-		+	+	-
EGEE	-	+	±	+		+	+	-
EALD (aldéhyde)	-	-	+	+	+	+	-	-
EAA (acide)	-	-	-	-		+	+	-
EGBE	±	-	+, ±	-	+	+	+	-
BALD)	-	-	+	+	+	+	-	-
BAA (acide)	-	-	-			+	+	-

B : bactérie, **M** : cellule de mammifère, **ECS** : échanges de chromatides sœurs, **AC** : aberrations chromosomiques, **MicroN** : micronoyau, **Aneupl** : aneuploïdie, **ICI** : inhibition des communications intercellulaires, **TM** : transformation morphologique.

Les études de génotoxicité in vivo sur mammifères (rat et souris) ont confirmé la toxicité de l'EGME sur les cellules germinales et ses effets d'induction in vivo des échanges de chromatides soeurs, alors que les effets clastogènes apparaissaient moins constants. Des dommages à l'ADN de cellules de moelle osseuse et de cellules testiculaires ont été mis en évidence par le test des comètes. Ces altérations génomiques étaient plus marquées sur les cellules testiculaires, mais sont apparues transitoires **(Ballantyne & Vergnes, 2001)**.

2.8.4. Effets aigus et chroniques des éthers de glycol chez l'homme

Les cas publiés d'intoxication aiguë par des éthers de glycol sont très peu nombreux et ne concernent que l'EGME, l'EGEE et l'EGBE. L'intoxication aiguë systémique fait généralement suite à une ingestion. Elle pourrait également résulter d'une contamination cutanée étendue, mais aucun cas où cette voie était en cause n'a été rapporté. L'intoxication aiguë par l'EGME, l'EGEE ou leurs acétates se traduit par une dépression du système nerveux central, une acidose métabolique avec augmentation des indosés anioniques et une néphropathie tubulaire **(Carpenter *et al*., 1998).**

Il n'y a, en revanche, pas d'hyperosmolalité car, aux doses toxiques, les concentrations plasmatiques des éthers de glycol sont insuffisantes pour augmenter significativement le taux osmolaire. Une cytolyse hépatique modérée est possible. Ces manifestations étant dues aux métabolites des éthers de glycol, leur survenue est retardée de quelques heures.

En cas d'ingestion d'une solution concentrée ou du produit pur, des signes d'irritation du tube digestif seraient également observés. Le traitement de l'intoxication est symptomatique. L'administration d'un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase (éthanol ou 4-méthylpyrazole) est susceptible de prévenir les effets toxiques des éthers de glycol en inhibant leur biotransformation. L'intoxication aiguë par l'EGBE ou son acétate entraîne une dépression du système nerveux central, une hypotension artérielle, une acidose métabolique avec augmentation des indosés anioniques (mais sans trou osmolaire), une hémolyse habituellement modérée, une néphropathie aiguë tubulaire. Une hypokaliémie est parfois notée. Le traitement proposé est le même que pour l'EGME et l'EGEE **(Wang *et al*., 2004)**.

Quelques cas de dermite de contact sont rapportés en milieu professionnel avec certains éthers de glycol, en particulier avec l'EGPhE. Les notifications restent peu nombreuses, si l'on se réfère à la très large diffusion de ces solvants. Dans les cas publiés, l'imputabilité des lésions dermatologiques à l'éther de glycol est en règle générale probable; en revanche, le mécanisme allergique invoqué est incertain **(Larese *et al*., 1994)**.

Plusieurs publications rapportent la survenue de troubles mentaux organiques (troubles mnésiques, difficultés de concentration...) chez des travailleurs exposés à deux éthers de

l'éthylène glycol, l'EGME et l'EGPhE. Il n'y a pas d'observation publiée avec les autres éthers de glycol **(INRS, 2001)**.

2.8.5. Toxicité hématologique des éthers de glycol chez l'homme

Quelques cas d'hémolyse aiguë, toujours modérée, faisant suite à l'ingestion de plusieurs dizaines de millilitres d'EGBE sont publiés. En revanche, aucun cas d'hémolyse n'a été rapporté après exposition chronique aux éthers de glycol, y compris chez des salariés plus âgés, ou chez les personnes atteintes d'une maladie hémolytique constitutionnelle. Les travaux menés in vitro confirment la faible sensibilité des hématies humaines aux éthers de glycol, en particulier l'EGBE, qui est le plus hémolysant chez les animaux. En effet, de très fortes doses d'EGBE sont nécessaires pour observer des anomalies des hématies humaines **(Udden, 1994)**.

Chez les salariés exposés aux éthers de glycol, un nombre relativement élevé de travaux ont rapporté des cytopénies sanguines a priori d'origine centrale, médullaire. Même si une co-exposition à d'autres solvants ne peut être exclue, il n'en demeure pas moins que l'accumulation des cas suggère une toxicité possible des éthers de glycol sur les lignées sanguines, en particulier sur la lignée polynucléaire neutrophile. Neutropénie et hypoplasie médullaire ont été observées après des expositions associant ou non des solvants différents à l'EGME, l'EGEE et leurs acétates. Sous réserve des précautions que l'on doit prendre dans l'interprétation de certains travaux, où les éthers de glycol étaient associés à d'autres produits éventuellement toxiques pour la moelle osseuse, il est nécessaire de s'interroger sur le fait que certains éthers de glycol pourraient être responsables chez l'homme d'une hypoplasie médullaire, touchant préférentiellement la lignée neutrophile. Mais les produits en cause, les doses toxiques ainsi que les éventuelles susceptibilités individuelles sont très mal connus **(Hours *et al*., 1995)**.

La toxicité des éthers de glycol sur les populations lymphocytaires chez l'homme semble moins importante que la toxicité observée sur la lignée granuleuse. Peu d'études rapportent des lymphopénies. Un rôle leucémogène possible des éthers de glycol n'est pas confirmé par les études récentes ni le risque de maladie de Hodgkin ou de myélome.

2.8.6. Effets des éthers de glycol sur la reproduction, le développement du foetus et le cancer chez l'homme

Un ensemble de résultats concordants est en faveur de l'existence d'un lien entre infertilité masculine (diminution de la concentration du sperme, oligospermie, difficulté à concevoir un enfant) et exposition professionnelle à l'EGEE, l'EGME et leurs acétates, et peut-être à l'un des autres éthers de glycol présents dans l'industrie des semi-conducteurs (DEGDME, 2PG1MEA). Toutefois, la qualité des études est inégale et les effets observés souvent difficiles à attribuer aux seuls éthers de glycol en raison des coexpositions à d'autres solvants **(Figa-Talamanka *et al*., 2001)**.

Tableau 5: Effets des éthers de glycol chez l'homme : principales études épidémiologiques (INRS, 2006).

Effet recherché	Secteur d'activité	Exposition
Fertilité masculine		
Oligospermie	Peintres chantier naval	EGME, EGEE, dosage métabolites urinaires
-	Fonderie	EGEE, dosage métabolites urinaires
Difficulté à concevoir	Semi-conducteurs (SHS)	EGME(A), EGEE(A), 2PG1MEA
-	Semi-conducteurs (IBM)	EGEE(A), DEGDME, 2PG1MEA
-	Cas/témoins	Dosages métabolites urinaires, EAA, MAA
Fertilité féminine		
Anomalies menstruelles	Semi-conducteurs (SHS)	EGME(A), EGEE(A), 2PG1MEA
Difficulté à concevoir	Semi-conducteurs (IBM)	EGEE(A), DEGDME, 2PG1MEA
Embryotoxicité		

Avortements spontanés	Semi-conducteurs (SHS)	EGME(A), EGEE(A), 2PG1MEA
-	Semi-conducteurs (IBM)	EGEE(A), DEGDME, 2PG1MEA
Syndrome malformatif	Fabrication de transistors	EGME
Anomalie tube neural		Cas/témoins
Toutes malformations	Cas/témoins	EGEE, EGBE, DEGEE, DEGBE, EGnPE, DEGME
Cancérogénicité		
Leucemie aigüe, myéloide	Cas/témoins	Toute exposition aux éthers de glycol
Cancer du testicule	Royal Navy	EGME, DEGME

L'évaluation du potentiel reprotoxique des produits pour l'homme prend en compte les données fournies par différents types d'études :

- Etudes épidémiologiques;
- Etudes chez l'animal (in vivo) ;
- Autre études toxicologiques in vitro ;

Nombreuses études ont évalué, pour plusieurs substances chimiques, les effets néfastes sur la fonction de reproduction et ont établi différentes catégories **(FIPEC, 2004)**:

- Catégorie 1 : « substances connues pour altérer la fertilité ou pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine ». Il existe une relation de cause entre l'exposition de l'homme à la substance et l'effet reprotoxique.
- Catégorie 2 : « substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine ». Il existe une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut entraîner des effets reprotoxiques, ceci

est généralement fondé sur la mise en évidence nette d'une altération de la fertilité ou d'effets sur le développement dans des études sur l'animal.

- Catégorie 3 : « substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine ou substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement ». Généralement basé sur des résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte altération de la fertilité et/ou de la toxicité pour le développement, les preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance en catégorie 2 **(Wennborg *et al*., 2001).**

Il existe à l'heure actuelle moins d'évidences concernant les effets des éthers de glycol sur la fertilité féminine. Toutefois, des anomalies de la durée ou de la régularité des cycles menstruels ainsi qu'une diminution de la fertilité (taux de fécondabilité abaissé ou difficulté à concevoir un enfant) ont été rapportées chez des femmes travaillant dans les secteurs les plus exposés aux éthers de glycol **(Hassan *et al*., 2004)**.

Les composantes historiques et prospectives de deux études américaines menées dans l'industrie des semi-conducteurs sont concordantes pour montrer un effet de l'exposition aux éthers de glycol présents dans l'industrie sur le risque d'avortements spontanés. Le risque augmente avec le niveau d'exposition aux dérivés éthyléniques.

Un syndrome malformatif particulier a été décrit au Mexique, proche mais différent du syndrome d'alcoolisme foetal, qui pourrait être lié à une forte exposition à l'EGME pendant la grossesse. Toutefois, la part génétique dans la survenue de ces malformations est difficile à estimer **(Davis *et al*., 1997)**.

Les autres études sur les malformations (anomalies multiples, anomalies du tube neural, fentes orales) sont peu nombreuses et contradictoires : ainsi, l'existence d'un risque accru d'anomalie du tube neural, en association avec une exposition professionnelle principalement à l'EGBE et au DEGBE dans le cadre de métiers de service, a été remise en cause par les résultats d'une étude menée de façon très similaire.

Les quelques études épidémiologiques conduites sur la relation entre exposition aux éthers de glycol et différents types de cancer chez l'homme (leucémies aiguës myéloïdes, cancer de l'estomac, cancer du testicule) n'apportent pas de résultats convaincants sur un effet cancérigène potentiel de ces solvants **(Berger & Ayyar, 1999)**.

Chapitre II: Etude expérimentale

1. Matériel biologique

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des lapins males de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, largement utilisés dans divers domaines de recherche.

Classification de l'animal :

- Règne animal
- Embranchement des vertébrés
- Classe des mammifères
- Super ordre des glires
- Ordre des lagomorphes
- Famille des léporidés
- Genre *Oryctolagus*
- Espèce *oryctolagus cuniculus*

Au début de l'expérimentation, ces lapins étaient âgés entre 7 et 9 mois et pesaient entre 1300 g et 1900 g. Les lapins ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de laboratoire pendant 30 jours.

Les animaux sont élevés dans des cages en aluminium (53 x 60 x50) cm^3, le nettoyage des cages est assuré régulièrement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les lapins sont nourris quotidiennement (3 fois par jours), l'alimentation est composée de légumes et d'aliment sec constitué de mais, de l'orge et de complément vitaminique. L'eau est fournie dans des abreuvoirs des cages.

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'Ethylène glycol.

L'EGME (2-méthoxyéthanol) est principalement utilisé comme solvant pour la fabrication de peintures, vernis, encres, colorants. Il est également utilisé comme antigel pour les carburants de l'aviation et comme produit de nettoyage et de dégraissage.

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

T : Toxique

R60 : Peut altérer la fertilité.

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

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

Tableau 6: Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'EGME

Paramètre	Valeur/description	Référence
Nom chimique	2-méthoxyéthanol (ou Ethylène glycol méthyl éther ou Ethylène glycol monométhyl éther)	INRS, 1999
Numéro CAS	109-86-4	INRS, 1999
Numéro EINECS	203-713-7	INRS, 1999
Formule chimique	$C_3H_8O_2$	INRS, 1999
Etat physique	Liquide incolore	INRS, 1999
Poids moléculaire	76,09 $g.mol^{-1}$	INRS, 1999
Tension de vapeur	13 hPa (25℃)	IPCS, 2004
Concentration de vapeur saturante	40,6 mg/l (13 000 ppm) à 20℃ et 1033 hPa	Calculée
Solubilité	complètement soluble dans l'eau	ECETOC 1994
Températures d'ébullition/fusion	123-126℃ / -85℃	INRS, 1999
Point d'éclair	37-39 ℃ en coupelle fermée	INRS, 1999
Limites d'explosibilité	(en volume) Limite inférieure : 2,4 %, Limite supérieure : 20 %	INRS, 1999
Facteurs de conversion à 20℃ et 1013 hPa	1 ppm = 3,11 mg/m^3 1mg/m^3 = 0,32 ppm	INRS, 1999

Métabolisme de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME)

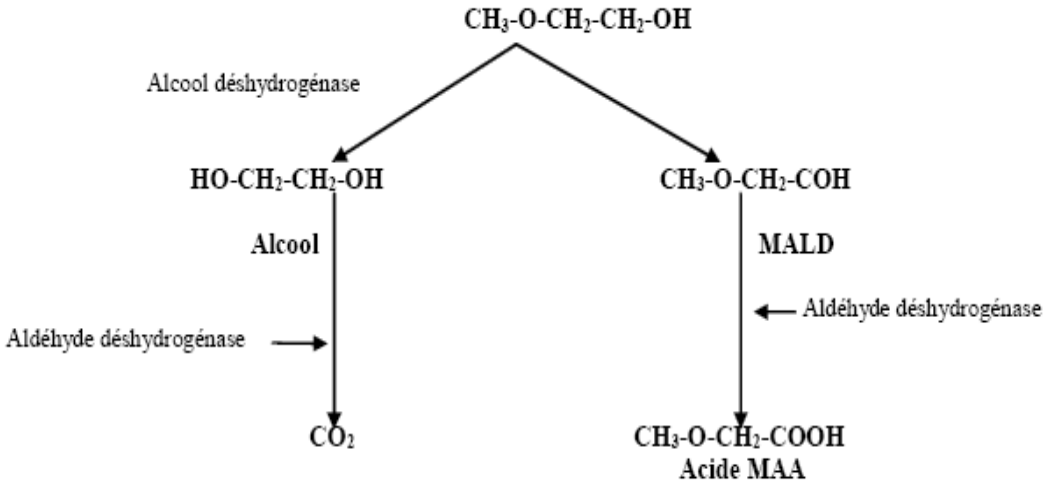


Figure 2: Formule développée et métabolisme de l'éthylène glycol monométhyl ether (2- méthoxy-éthanol) (Paul *et al*., 1986; Lemazurier *et al*., 2003).

3. Principes et protocole expérimental

3.1. Etude des effets de l'EGME selon la voie orale (mode d'ingestion)

L'expérimentation consiste à administrer aux lapins trois doses croissantes de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME): 50, 100, et 150ppm. Pour cela nous avons répartis 24 individus de lapin male en quatre lots, chaque lot comprend six lapins (n=6), il s'agit du:

Lot témoin (T)

Lot traité par l'EGME à raison de 50 ppm (D1)

Lot traité par l'EGME à raison de 100ppm (D2)

Lot traité par l'EGME à raison de 150ppm (D3)

Le produit est administré par voie de gavage une fois par jour (1ml), 5 jours par semaine, pendant 4 semaines successives.

3.2. Etude des effets de l'EGME selon la voie respiratoire (mode d'inhalation)

Dans cette partie, l'expérience consiste à exposer les animaux à trois doses de l'éthylène glycol monométhyl éther 50, 100 et 150 ppm selon le mode inhalation.

24 individus de lapin male répartis en quatre lots, chaque lot comprend six lapins (n=6):

Groupe témoin (T)

Groupe traité par l'EGME à raison de 50 ppm (D1)

Groupe traité par l'EGME à raison de 100ppm (D2)

Groupe traité par l'EGME à raison de 150ppm (D3)

Nous essayons de faire imbiber un morceau de cotton dans le produit et le fixer sur l'un des cotés de la cage recouverte par un morceau de plastique qui laisse passer l'air.

Les lapins reçoivent les doses 6 heures /jour et 5 jours par semaine, pendant 4 semaines successives.

A la fin de la période de l'expérimentation, nous sacrifions les animaux, et nous proposons, pour les deux modes d'exposition, d'étudier les paramètres suivants:

3.3. Etude des paramètres biochimiques et cellulaires du sang

Le sang recueilli dans des tubes héparine est utilisé pour le comptage des cellules sanguines (globules blancs neutrophiles, lymphocytes, globules rouges) et le taux d'hémoglobine. Trois autres fractions de sang sont récoltées dans des tubes héparines, puis centrifugées, le plasma obtenu est aliquote et conservé à une température de -20^0 C pour le dosage des différents paramètres biochimiques : protéines, glucose, cholestérol, triglycérides et la testostérone

Les méthodes de travail sont les suivantes :

a. Dosage du glucose plasmatique

Principe

Le glucose est mesuré après oxydation enzymatique en présence de la glucose oxydase; le péroxyde d'hydrogène formé réagit grâce à l'action catalytique d'une péroxydase, avec du phénol et la 4-aminophénazane pour former un composé rouge violet de quinonéimine qui sert d'indicateur coloré, selon les réactions suivantes **(Trinder, 1969)** :

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textbf{Glucose oxydase}} H_2O_2 + \text{acide gluconique}$$

$$2H_2O_2 + \text{phénol} + \text{aminophénazone} \xrightarrow{\textbf{Péroxydase}} \text{quinonéimine} + H_2O$$

Réactifs

Réactif 1 :

Tris pH 7.4 ……..92 mmol/l

Phénol ……..0.3 mmol/l

Réactif 2 :

Glucose oxydase (GOD)……..15000 U/l

Péroxydase (POD) ……1000U/l

4- aminophénazone ……2.6 mmol/l

Préparation et stabilité

Dissoudre le contenu d'un flacon du réactif 2 dans un flacon du réactif 1.

Le réactif de travail est stable pendant un mois à 20-25^0 C et deux mois à 2-8^0 C.

Echantillon

Plasma recueilli sur héparine.

Mode opératoire

Longueur d'onde : 505 nm

Température : 37^{0}C

Cuve : 1cm d'épaisseur.

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

Tubes	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

Mélanger, lire les densités optiques (DO) après une incubation de 5 minutes à 37^0C.
La coloration est stable pendant 30 minutes.

Calcul de la concentration :

$$[C]\ (g/l) = \frac{DO\ échantillon}{DO\ standard} \times \text{concentration du standard}$$

b. Dosage du cholestérol plasmatique

Principe

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinonéimine est formé à partir du péroxyde d'hydrogène et du amino-4-antipyrine en présence de phénol et de péroxydase, selon les réactions suivantes **(Trinder, 1969)** :

$$\text{Ester de cholestérol} + H_2O \xrightarrow{\textbf{Cholestérol estérase}} \text{cholestérol} + \text{acides gras}$$

$$\text{Cholestérol} + O_2 \xrightarrow{\textbf{Cholestérol oxydase}} \text{cholestérol- 4- one-3} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{phenol} + \text{amino-4-antipyrine} \xrightarrow{\textbf{Péroxydase}} \text{quinonéimine}$$

La quantité du quinonéimine formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol.

Réactifs

Réactif 1

Pies pH 6.9……..90 mmol/l

Phénol ……26 mmol/l

Réactif 2

Péroxydase……1250 U/l

Cholestérol estérase …….300U/l

Cholestérol oxydase …….300U/l

4- aminophénazone……0.4 mmol/l

Préparation et stabilité

Dissoudre le contenu d'un flacon du réactif 2 dans un flacon du réactif 1.

Le réactif de travail est stable pendant un mois à 20-25^0 C et deux mois à 2-8^0 C.

Echantillon

Plasma recueilli sur héparine.

Mode opératoire

Longueur d'onde : 505 nm

Température : 37^{0}C

Cuve : 1cm d'épaisseur.

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

Tubes	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

Mélanger, lire les densités optiques (DO) après une incubation de 5 minutes à 37^{0}C.

La coloration est stable pendant 30 minutes.

Calcul de la concentration :

$$[C]\ (g/l) = \frac{DO\ échantillon}{DO\ standard} \times \text{concentration du standard}$$

c. Dosage des triglycérides plasmatiques

Principe

Les triglycérides sont déterminés selon les réactions suivantes **(young & Pestaner, 1975)**:

$$\text{Triglycérides} \xrightarrow{\textbf{Lipoprotéine lipase}} \text{glycérol + acides gras}$$

$$\text{Glycérol + ATP} \xrightarrow{\textbf{Glycérolkinase, } Mg^{++}} \text{glycérol-3-Phosphate + ADP}$$

$$\text{Glycérol-3-phosphate + } O_2 \xrightarrow{\textbf{Glycérol-3- phosphate oxydase}} H_2O_2 + \text{dihydroxyacétone-P}$$

$$H_2O_2 + \text{amino-4-antipyrine + chloro-4- phénol} \xrightarrow{\textbf{Péroxydase}} \text{quinonéimine rose + } H_2O$$

Réactifs

Réactif 1

Pipes pH 7.2……..50 mmol/l

Solution tampon chloro-4-phénol ……2 mmol/l

Réactif 2

Lipoprotéines lipase ……150000 U/l

Glycérolkinase …….800 U/l

Péroxydase ……...440 U/l

Glycérol-3-p- oxydase ……..4000 mmol/l

Amino-4- antipyrine ……..0.7 mmol/l

ATP ……0.3 mmol/l

Préparation et stabilité

Dissoudre le contenu d'un flacon du réactif 2 dans un flacon du réactif 1.

Le réactif de travail est stable pendant un mois à 20-25^0 C et deux semaines à 2-8^0 C.

Echantillon

Plasma recueilli sur héparine.

Mode opératoire

Longueur d'onde : 505 nm

Température : 37^{0}C

Cuve : 1cm d'épaisseur.

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

Tubes	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

Mélanger, lire les densités optiques (DO) après une incubation de 5 minutes à 37^{0}C.

La coloration est stable pendant 30 minutes.

Calcul de la concentration :

$$[C]\ (g/l) = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO standard}} \times \text{concentration du standard}$$

d. Dosage des protéines plasmatiques (Bradford, 1976)

Solution de Bradford :

Bleu brillant de Comassie (BBC)…….100 mg

Ethanol (95%)……..50 ml

Agitation pendant deux heures.

Acide orthophosphorique ……...100 ml

Eau distillée…….1000 ml

Agitation pendant deux heures.

Conserver la solution du réactif au froid pendant deux à trois semaines.

Réalisation de la gamme d'étalonnage

- Préparer une solution d'albumine sérum de bœuf (BSA) à une concentration de 1mg/ml dans l'eau distillée.
- Pipeter 20, 40, 60, 80 µl de la solution standard BSA.
- Compléter le volume jusqu'à 100 µl avec l'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 4 ml de réactif BBC.
- Bien vortexer.
- Lire les absorbances à 595 nm contre un blanc de (100 µl d'eau distillée + 4 ml de BBC).

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Pour l'échantillon: 100µl de plasma + 4 ml de BBC.

e. Dosage de la testostérone plasmatique

Le dosage de l'hormone sexuelle male a été effectué en appliquant le test d'electrochimiluminescence (ECLIA) qui est adapté aux dosages immunologiques sur un appareil Elecsys 1010 **(Litwack, 1992)**.

Principe

Le test fait appel à un principe de compétition en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre la testostérone. La testostérone endogène, libérée par l'action de l'acide 8-anilino-naphtalène sulfonique (ANS) et du norgestrel, entre en compétition avec la testostérone exogène marquée au ruthénium pour les sites de liaison des anticorps anti-testostérone biotinylés.

Réactifs utilisés

Les réactifs sont contenus dans un coffret Elecsys-testostérone (Ref 1177606) pour 100 tests :

- Microparticules tapissées de strepatividine: un flacon contenant 6.5 ml.
- Microparticules tapissées de strepatividine: 0.72 mg/ml, la capacité de liaison est de 470 ng de biotine/mg de microparticules.
- R1: anticorps anti-testostérone-biotine: un flacon contenant 8ml anticorps de souris anti-testostérone marquée à la biotine 55ng/ml, pH7.
- R2: peptide testostérone: un flacon contenant 8ml d'un dérivé de testostérone marqué au ruthénium 3ng/ml, pH7.

Etapes de dosage

1ère incubation

Une prise d'essai de 50µl d'échantillon est incubée avec un anticorps anti-testostérone biotinylé et une testostérone marquée au ruthénium. Les sites de liaison de l'anticorps biotinylé sont occupés en partie par la testostérone plasmatique et en partie par les haptènes marqués au ruthénium pour former des immuno-complexes.

2ème incubation

Les microparticules tapissées de strepatividine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison strepatividine-biotine.

Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant.

L'élimination de fraction libre est effectuée par le passage de ProCell.

Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production du luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code-barre du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé par une calibration en deux points.

f. mesure des paramètres cellulaires du sang

Le comptage des cellules sanguines ainsi que le taux de l'hémoglobine se fait à partir de la détermination de la formulation numérique sanguine (FNS) à l'aide d'un appareil "Coulter".

Cet appareil est capable d'aspirer un volume de 2 ml du sang à partir du tube de prélèvement, à travers les compartiments de cet appareil, le sang subit des mécanismes complexes au cours de 10 secondes pour identifier et marquer enfin le nombre de chaque type de cellules sanguines ainsi que le taux d'hémoglobine.

Les résultats seront figurés sur l'ordinateur puis imprimés.

Quatre paramètres choisis :

Globules blancs neutrophiles;

Lymphocytes;

Globules rouges;

Taux d'hémoglobine;

3.4. Prélèvement des organes

Nous avons procédé à la dissection des animaux afin de prélever et peser le foie et les testicules. Une partie de chaque organe prélevé est conservée au froid à (-10^0C) pour le dosage du glutathion GSH et une autre partie du testicule conservée dans le liquide de Bouin pour l'étude histologique.

a. Dosage du glutathion GSH dans le foie et le testicule

Préparation de l'homogénat

- Mettre 500 mg de foie ou de testicule en présence de 8ml d'une solution de EDTA à 0.02M.
- Broyer le mélange aux ultrasons pendant 3 minutes pour le foie et 5 minutes pour le testicule.
- Centrifuger l'homogénat obtenu à 5000 tours/mn pendant 15 minutes.
- Récupérer le surnageant pour le dosage des protéines tissulaires et le glutathion GSH.

Dosage des protéines tissulaires

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de **Bradford (1976)**.

- Prélever 0.05 ml de l'homogénat.
- Ajouter 4 ml de BBC.
- Agiter pendant 5 minutes.
- Lire les absorbances à 595 nm contre un blanc qui correspond à l'eau distillée.
- Evaluer la concentration des protéines selon une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

Dosage du glutathion

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique par spectrophotomètre de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoique par les groupement (-SH) du glutathion.

Une fois préparé, le surnageant doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalycilique 0.25%) afin de protéger les groupements (–SH) du glutathion **(Weckbecker & Cory, 1988).**

La procédure expérimentale du dosage du GSH est la suivante :

- Prélever 0.8 ml du surnageant.
- Ajouter 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalycilique (SSA) 0.25%.
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA, pH = 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) à 0.01 M (dissous dans le méthanol absolu 99%).
- Laisser pendant 5 minutes dans la température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Lire l'absorbance optique à 412 nm.
- La concentration du glutathion est obtenue à partir de la formule suivante :

[GSH] = (DO x 1 x 1.525) / (13100 x 0.8 x 0.5 mg protéines) = nM GSH/mg de proteines

DO: densité optique.

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

1.525 : le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris EDTA + 0.025 ml DTNB).

13100 : coefficient d'absorbance concernant le groupement –SH à 412nm.

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

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.

b. Etude histologique du testicule

Nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau du testicule prélevé et conservé dans le liquide de Bouin alcoolique.

La technique histologique que nous avons appliqué est celle de **Martoja & Martoja (1967)**, selon les étapes suivantes :

Fixation de l'échantillon

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique, elle a pour but d'immobiliser les structures en respectant leurs morphologies et en les conservant. La fixation se fait pendant 24 à 48 heures dans le liquide de Bouin, fixateur couramment utilisé.

Le liquide de Bouin est préparé à partir des solutions suivantes :

- Solution d'acide picrique (1%) : 75 ml.
- Formol : 20 ml.
- Acide acétique : 7 ml.

Déshydratation

La paraffine n'est pas miscible dans l'eau, l'échantillon doit être entièrement déshydraté avant l'inclusion dans la paraffine. Le fixateur est éliminé, l'échantillon est rincé à l'eau distillée, puis déshydraté par l'alcool éthylique 70^0, 90^0, et 100^0.

La paraffine n'est pas non plus miscible dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, pour cela on procède à une substitution par le toluène renouvelé 3 fois (durée des bains 30 minutes).

Inclusion

L'échantillon est inclus dans la paraffine qui a été fondue dans une étuve à 60^0 C pendant 08 heures, la mise en blocs se fait en utilisant des barres de Leuckard.

Coupes et coloration

Les blocs d'inclusion sont portés sur un porte-échantillon. Les coupes sont réalisés à l'aide d'un microtome (Microtome 2030 Reichert Jung), les séries de coupes sont reliées entre elles sous forme de ruban, ce qui facilite la reconstitution tridimensionnelle des structures observées. L'épaisseur des coupes est 4 à 7 µ.

Les rubans de coupes obtenus sont collés sur des lames de verre dégraissées, posées sur une platine chauffante (à température inférieure à la température de fusion de la paraffine). La chaleur permet l'étalement des rubans de coupes.

Enduire les lames de glycéalbumine, recouvrir d'eau distillée et poser les rubans dessus. Les coupes déparaffinées sont colorées à l'hémalun-éosine, déshydrater la préparation dans deux bains d'alcool et monter par le dépôt d'une goutte d'Eukitt sur laquelle on place une lamelle. Enfin, on passe à l'observation au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

3.5. Etude des paramètres indicateurs de la fertilité masculine

Nous prélevons les testicules avec l'épididyme, dés que le corps est coupé, on remarque la sortie d'un liquide blanc, il s'agit du sperme, cette quantité du sperme est utilisée pour l'étude des caractères biologiques des spermatozoïdes:

a. La mobilité des spermatozoïdes

Une goutte de sperme est déposée sur une lame puis recouverte d'une lamelle. La préparation est examinée sous microscope optique (x40). Le champ d'observation est subdivisé en 5 zones distinctes pour pouvoir classer 100 spermatozoïdes, puis nous calculons le pourcentage des spermatozoïdes mobiles **(OMS, 1993)**.

b. La vitesse des spermatozoïdes

Après dilution du sperme dans une goutte de NaCl, nous déposons une goutte de cette préparation sur la lame de Nageotte, puis la recouvrir d'une lamelle. Chaque lame contient des lignes horizontales (0.5mm entre deux lignes), le principe de cette étude est de calculer le temps de déplacement d'un spermatozoïde entre deux lignes (grossissement x40). La vitesse est calculée par la relation suivante **(OMS, 1993)**.

V= L / T

V: vitesse des spermatozoides (µm/sec)

T: le temps de déplacement (seconde)

c. La concentration des spermatozoïdes (nombre total)

La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant une lame de comptage (cellule de Malassez). Une goutte de la même préparation déposée sur la lame de Malassez et recouverte d'une lamelle, le comptage se fait dans 5 champs de la lame au grossissement (x40).

La concentration des spermatozoïdes est calculée par la méthode suivante **(OMS, 1993)**.

C (nombre x 10^6 /ml) = D x Vx n / N

D: facteur de dilution (50 fois)

V: volume de la lame de comptage

n : nombre de spermatozoïdes calculé dans 5 champs.

N: nombre de petits carrés de la lame.

d. La vitalité des spermatozoïdes (coloration vitale)

C'est une technique de coloration qui permet de donner de bons résultats sur la vitalité des spermatozoïdes, elle est basée sur le principe de chaque cellule morte ayant une membrane lésée laisse pénétrer certains colorants.

Réactif utilisé: Eosine à 0.5%

Méthode:

- Mélanger une goutte de sperme dilué avec une goutte d'éosine 0.5% sur une lame, puis la recouvrir d'une lamelle.
- Après une à deux minutes, nous observons la préparation au grossissement x40.
- Compter les spermatozoïdes vivants (non colorés) et morts (colorés).
- 100 spermatozoïdes sont comptés, puis on calcule le pourcentage des spermatozoïdes vivants **(OMS, 1993)**.

e. Les malformations morphologiques des spermatozoïdes

Les malformations morphologiques du corps spermatique sont classées en trois types **(OMS, 1993)**:

Type A : malformation au niveau de la tête : soit un corps avec double tête, ou avec une tête complètement déformée (tête allongée ou irrégulière).

Type B : malformations au niveau de la pièce intermédiaire : forme d'absence de la pièce ou complètement déformée.

Type C : malformations au niveau du flagelle : enroulement du flagelle sur lui-même ou sur la tête.

Le taux des malformations de chaque type est donné en (%).

3.6. Etude statistique

Les résultats obtenus sont présentés en moyenne ± écart type (X±SD) et représentés schématiquement sous forme de tableau et histogrammes.

Quant au test de traitement statistique de données, nous avons choisi l'analyse de la variance à un seul critère de classification suivi de test de **Newman et Keuls** à l'aide du logiciel Sigma stat. Ainsi que l'application du test *t de student* pour la comparaison entre chaque deux groupes.

Chapitre III: Résultats

1. Etude de l'impact de l'éthylène glycol monométhyl éther selon le mode ingestion

1.1. Effets sur les paramètres de la fertilité masculine

1.1.1. Variations moyennes de la concentration des spermatozoïdes

Les résultats obtenus montrent que l'administration orale de l'éthylène glycol monométhyl ether (EGME) a provoqué une diminution dans la concentration des spermatozoïdes chez les groupes traités comparés aux témoins.

Cette diminution est significative ($p<0.05$) entre le groupe témoins et les deux groupes traités par les dose 50 ppm et 100 ppm (D1 - D2), et est très hautement significative ($p<0.001$) entre le témoins et le groupe traité par la dose 150 ppm (D3).

A noter que la diminution de la concentration des spermatozoïdes est significative ($p<0.05$) entre les trois groupes traités (D1-D2-D3), ce qui donne une idée sur l'effet de la substance toxique de manière dose dépendante **(Figure 3)**.

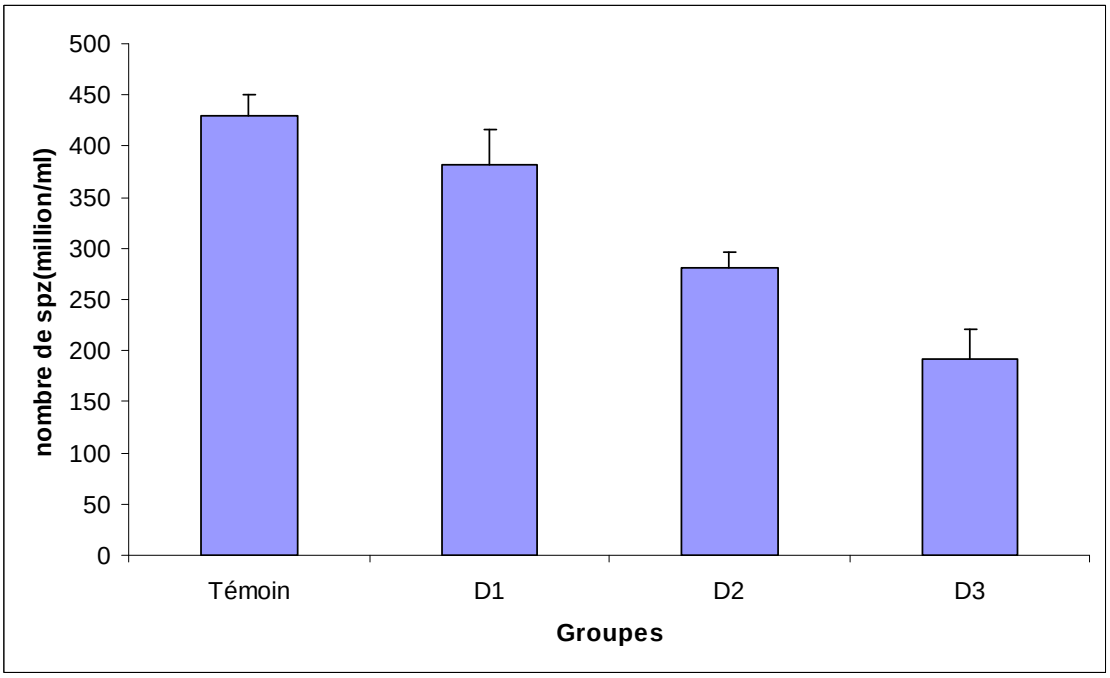


Figure 3: Variations moyennes (X±SD) de la concentration des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).

1.1.2. Variations moyennes de la mobilité des spermatozoïdes

Les résultats présentés dans **la figure (4)** montrent une diminution dans le taux de la mobilité des spermatozoïdes chez les groupes traités par l'éthylène glycol monométhyl éther comparés aux témoins.

Les individus du groupe témoins ont marqué la valeur physiologique moyenne de la mobilité des spermatozoïdes chez les lapins selon les données de **l'OMS (1993)**. Cette valeur diminue de manière très hautement significative ($p<0.001$) chez les trois groupes traités (D1-D-2D3) par rapport aux témoins, et de manière significative ($p<0.05$) entre les groupes traités par l'EGME.

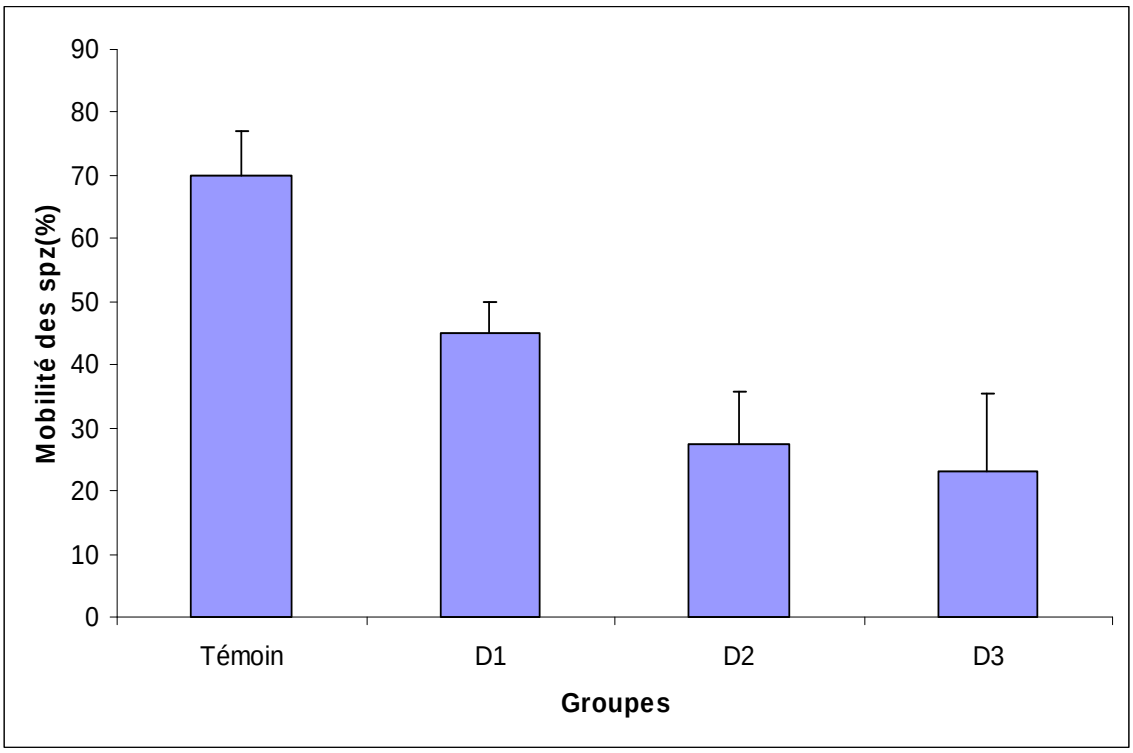


Figure 4: Variations moyennes (X±SD) de la mobilité des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).

1.1.3. Variations moyennes de la vitesse des spermatozoïdes

Chez les groupes traités par l'EGME, la vitesse des spermatozoïdes a marqué une diminution très hautement significative ($p<0.001$) comparé aux témoins, ainsi qu'une diminution hautement significative ($p<0.01$) entre les trois groupes traités**.**

A noter que le groupe traité par la dose 150 ppm (D3) a enregistré la vitesse la plus minimale **(Figure 5)**.

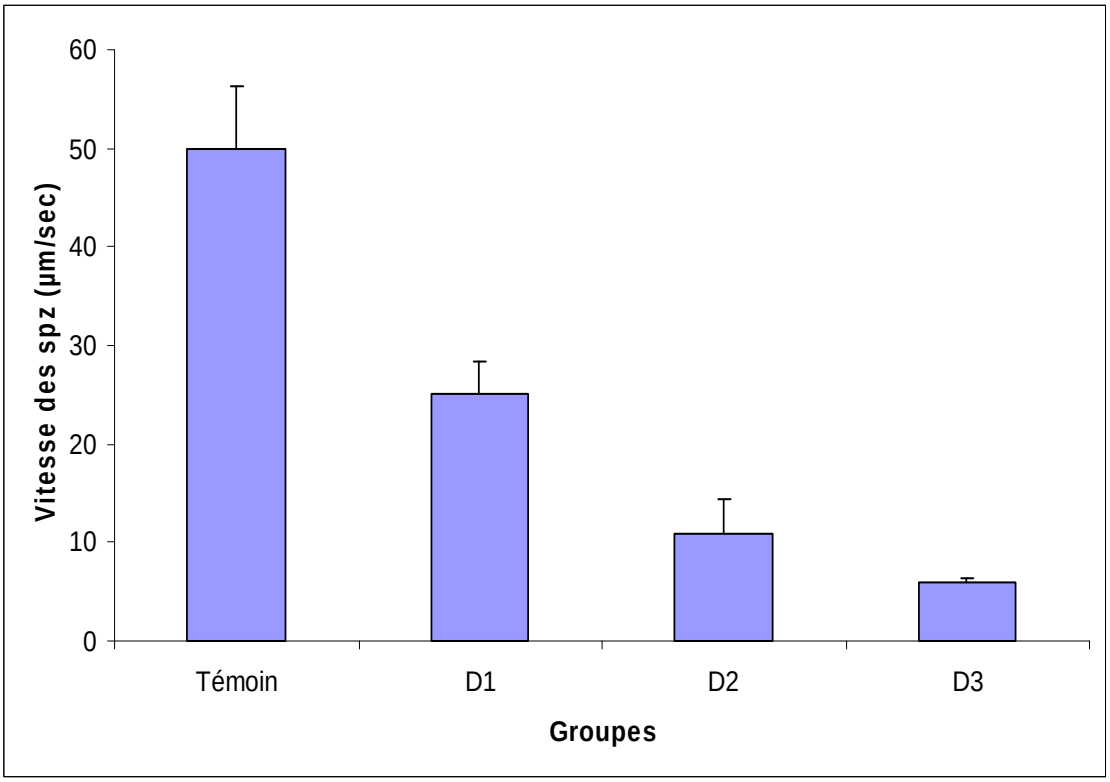


Figure 5: Variations moyennes (X±SD) de la vitesse des spermatozoïdes entre les quatre groupes (mode ingestion).

1.1.4. Variations moyennes des malformations morphologiques des spermatozoïdes

Les résultats obtenus assurent qu'il existe une augmentation significative ($p<0.001$) dans le taux des malformations morphologiques au niveau de la tête (type A) et au niveau du flagelle (type C). Une augmentation significative ($p<0.05$) dans le taux des malformations de type B (au niveau de la pièce intermédiaire) chez les groupes traités, notons que les malformations de type C ont marqué la valeur la plus élevée chez le groupe traité par la dose 150 ppm (D3**) .**

Cette augmentation est significative ($p<0.05$) entre les trois groupes traités (pour chaque type de malformation) **(Figure 6)**.

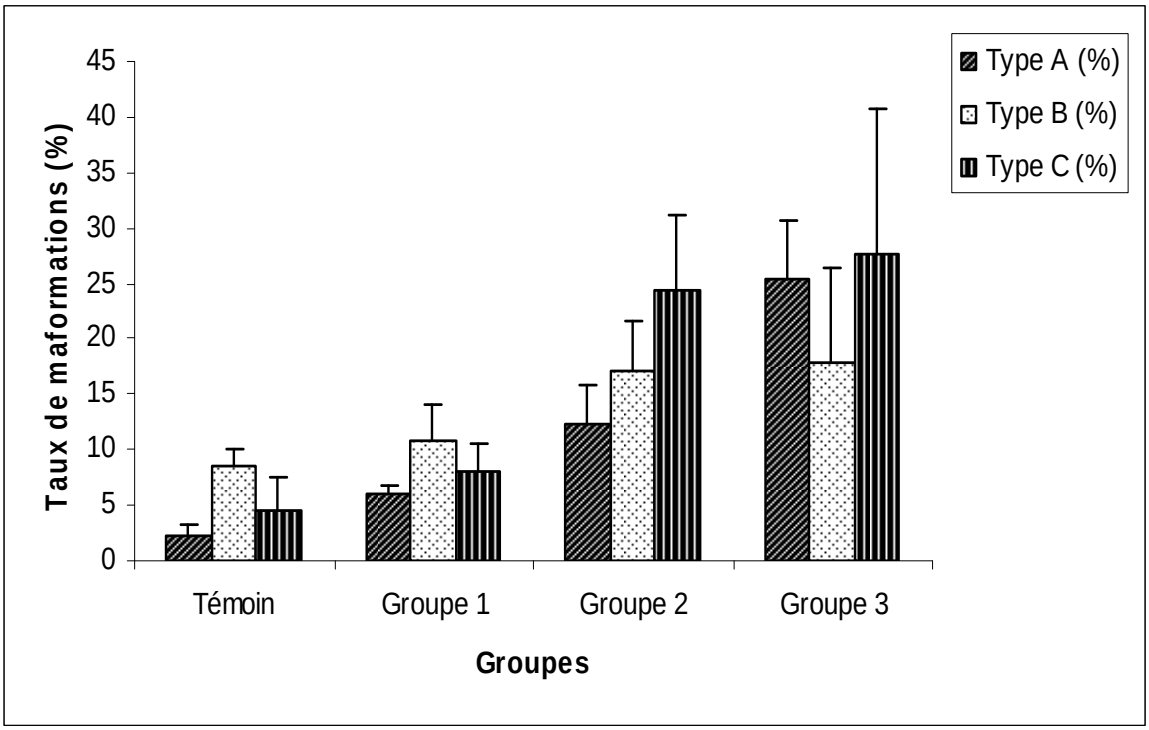


Figure 6: Variations moyennes (X±SD) des malformations morphologiques des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.1.5. Variations moyennes de la vitalité des spermatozoïdes

Nous avons enregistré une augmentation très hautement significative ($p<0.001$) dans le taux des spermatozoïdes morts chez les groupes traités par l'EGME par rapport au témoins, accompagnée d'une diminution très hautement significative ($p<0.001$) dans le taux des spermatozoïdes vivants.

De même façon, ces variations sont hautement significatives ($p<0.01$) entre les trois groupes traités **(Figure 7)**.

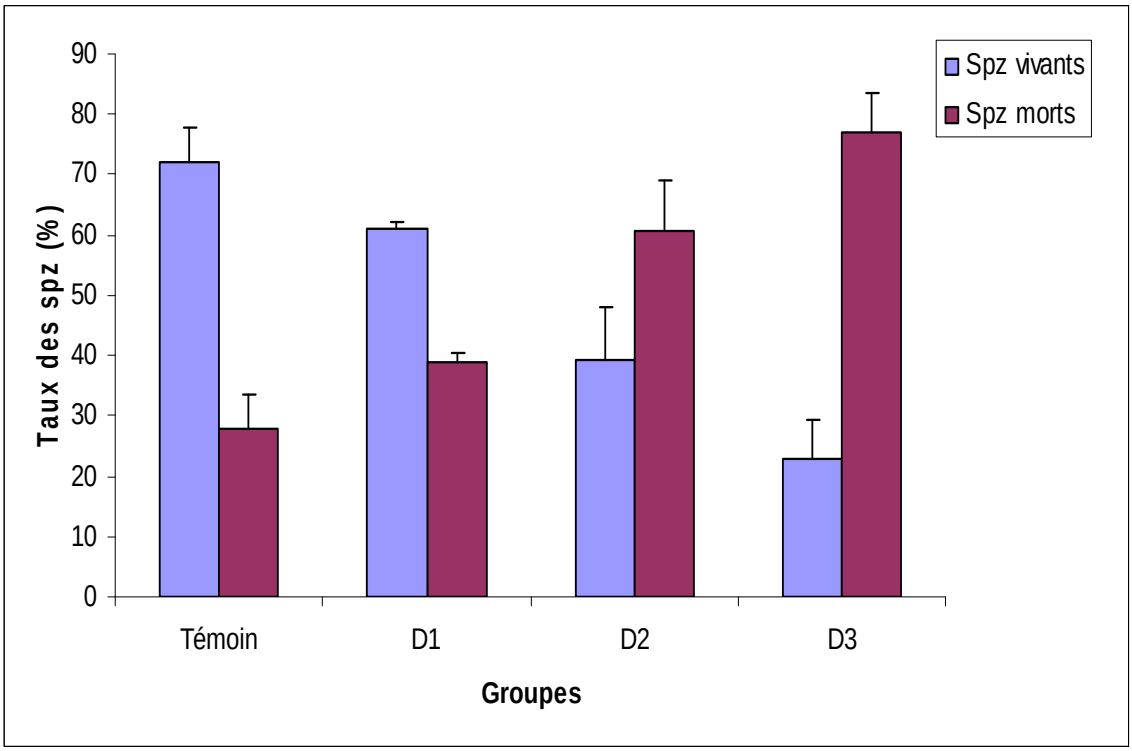


Figure 7: Variations moyennes (X±SD) de la vitalité des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.1.6. Variations moyennes du taux de la testostérone

Les résultats montrent une diminution très hautement significative ($p<0.001$) dans la concentration de la testostérone chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins. Et une diminution significative ($p<0.05$) entre les groupes traités **(Figure 8)**.

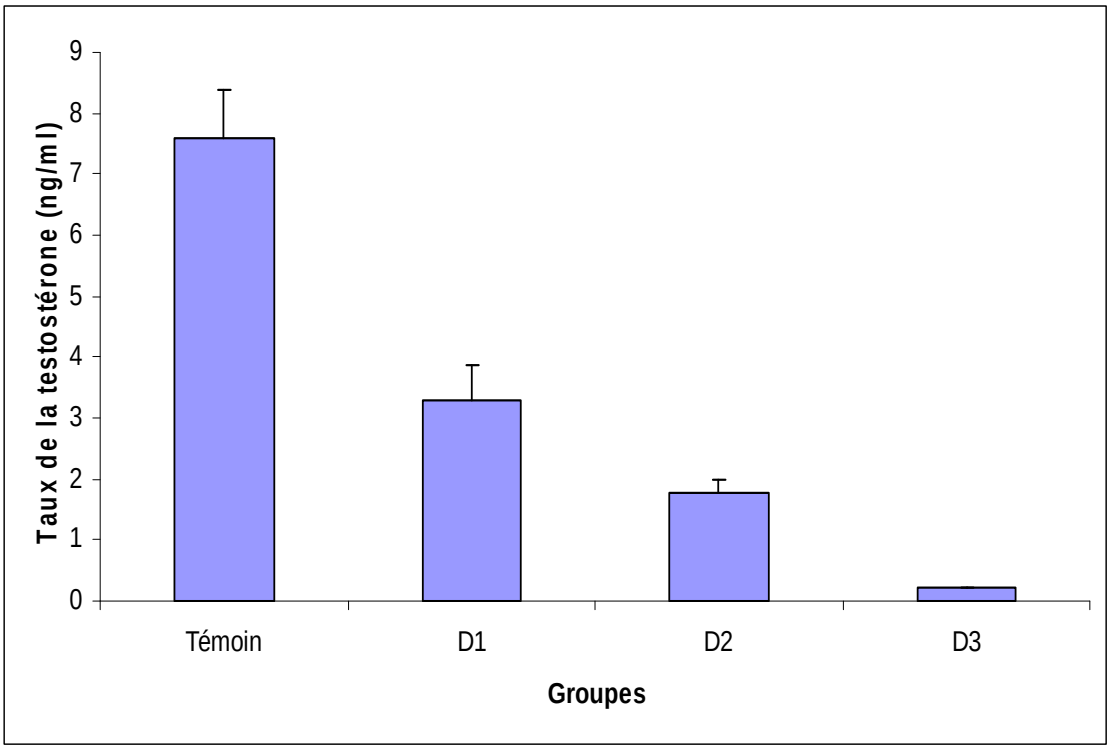


Figure 8: Variations moyennes (X±SD) du taux de la testostérone entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2. Effets sur les paramètres biochimiques et cellulaires du sang

1.2.1. Variations moyennes du taux de glucose

Nous avons enregistré une diminution significative ($p<0.001$) dans le taux de glucose chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 9)**.

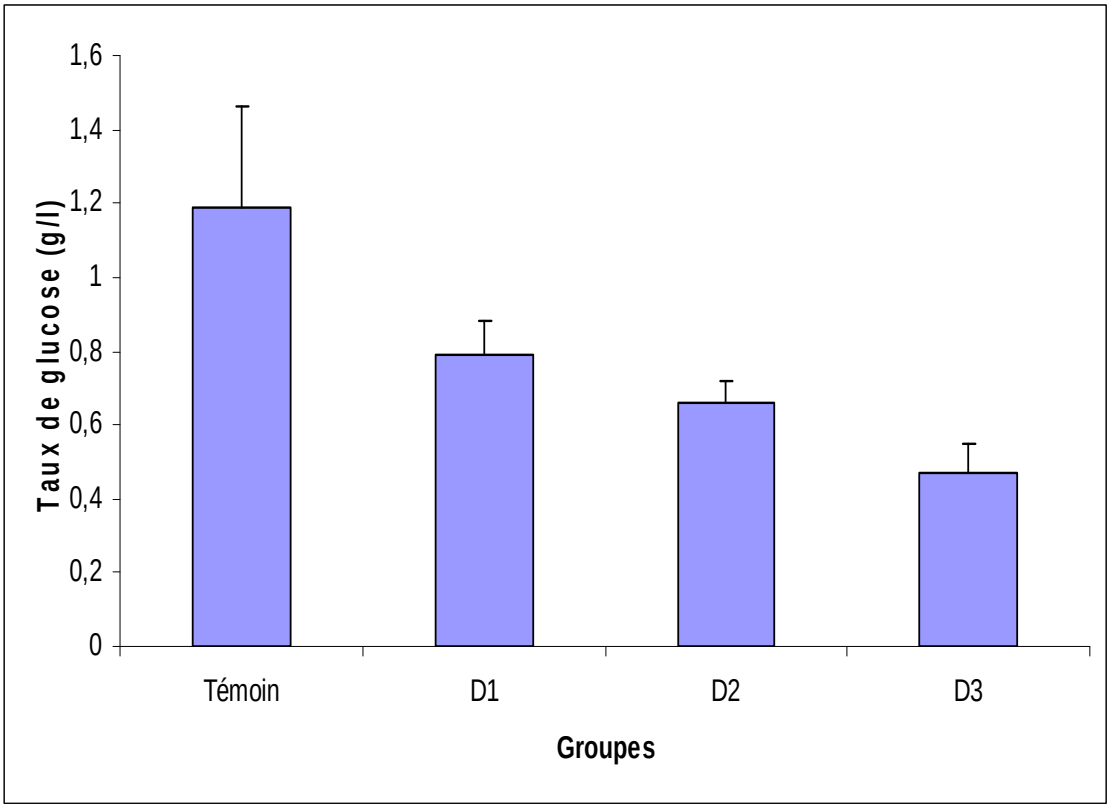


Figure 9: Variations moyennes (X±SD) du taux de glucose entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.2. Variations moyennes du taux du cholestérol

Les résultats présentés dans **la figure (10)** montrent une diminution non significative dans le taux du cholestérol chez les groupes traités comparés aux témoins.

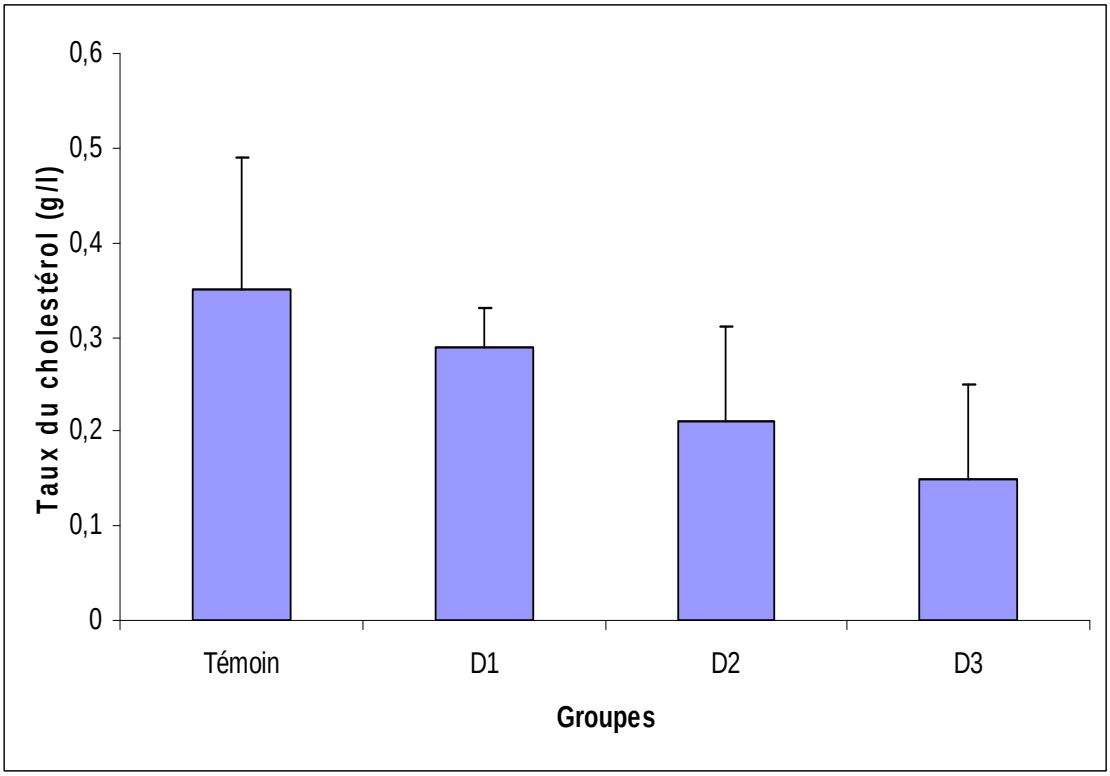


Figure 10: Variations moyennes (X±SD) du taux du cholestérol entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.3. Variations moyennes du taux des triglycérides

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une augmentation significative ($p<0.05$) dans le taux du triglycérides chez les groupes traités comparés aux témoins **(Figure 11)**.

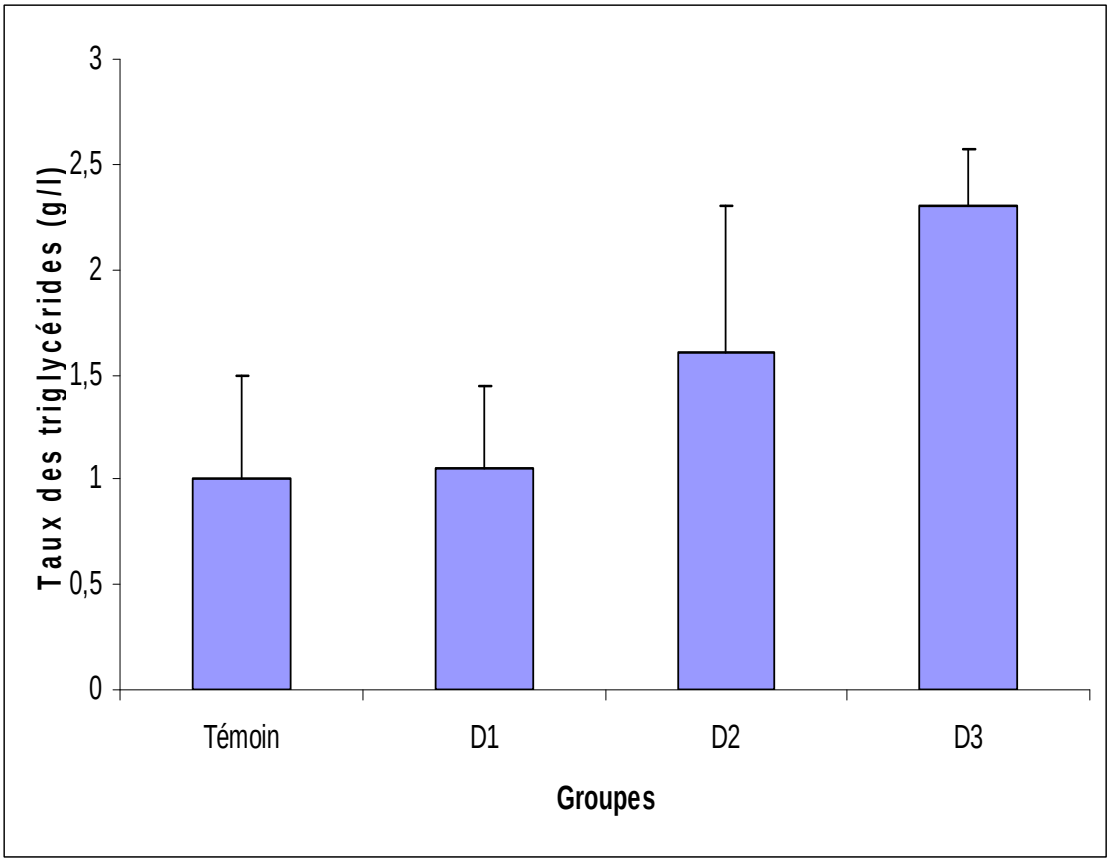


Figure 11: Variations moyennes (X±SD) du taux des triglycérides entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.4. Variations moyennes du taux des protéines plasmatiques

Il existe une augmentation significative ($p<0.05$) dans le taux des protéines plasmatiques chez les groupes traités par rapport aux témoins.

Même variations enregistrés entre les trois groupes traités **(Figure 12)**.

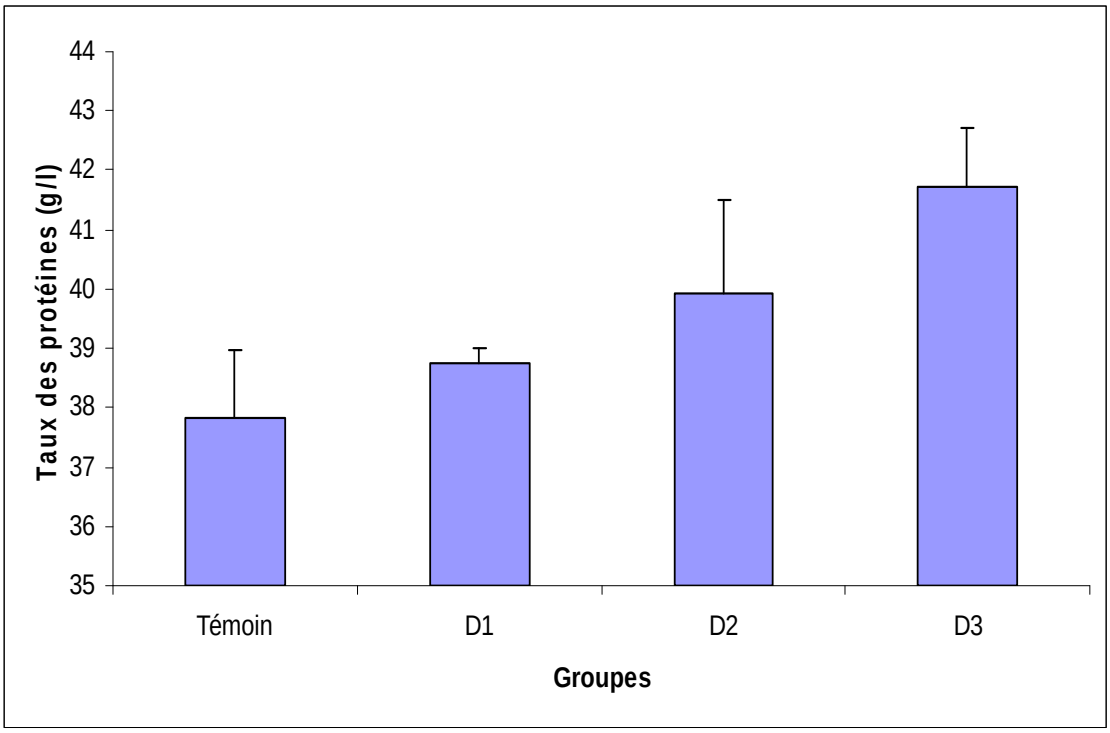


Figure 12: Variations moyennes (X±SD) du taux des protéines entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.5. Variations moyennes du nombre des globules rouges (GR)

Le nombre total des globules rouges a marqué une diminution hautement significative ($p<0.01$) chez les groupes traités par le produit utilisé comparés aux témoins, mais cette diminution est non significative entre les trois groupes traités **(Figure 13)**.

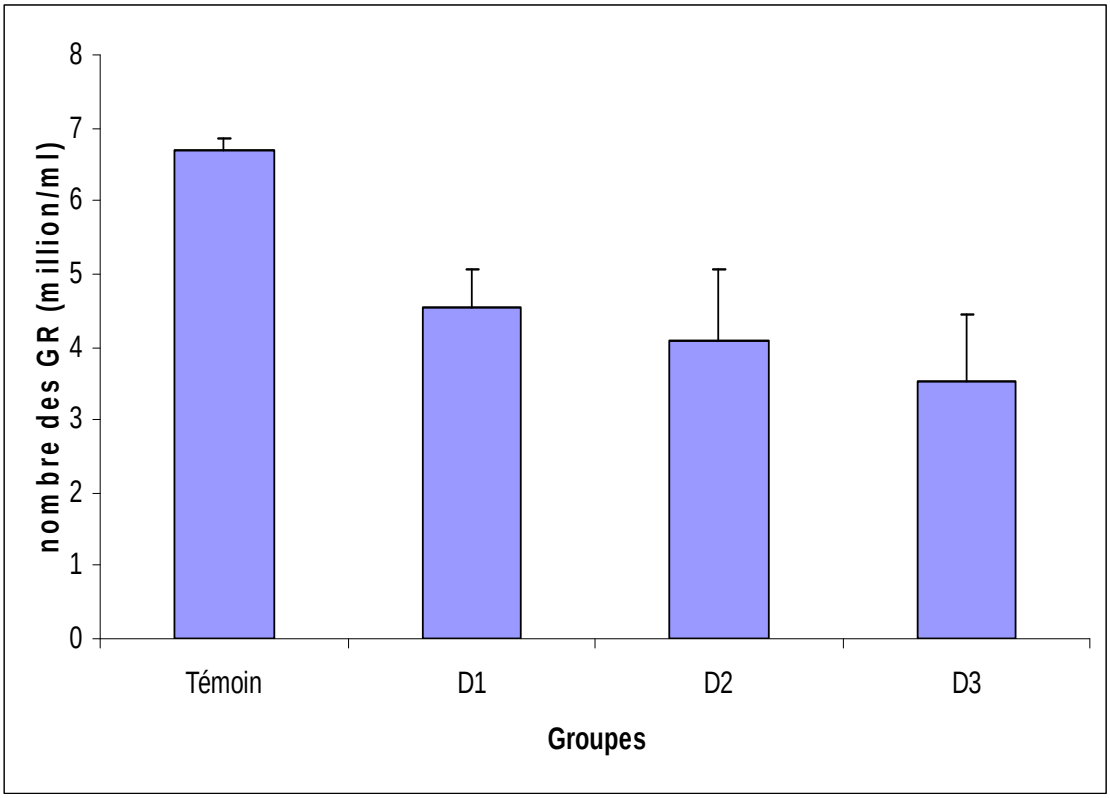


Figure 13: Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules rouges entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.6. Variations moyennes du nombre des globules blancs (GB)

Il existe une diminution non significative dans le nombre des globules blancs chez les groupes traités par le produit utilisé comparés aux témoins **(Figure 14)**.

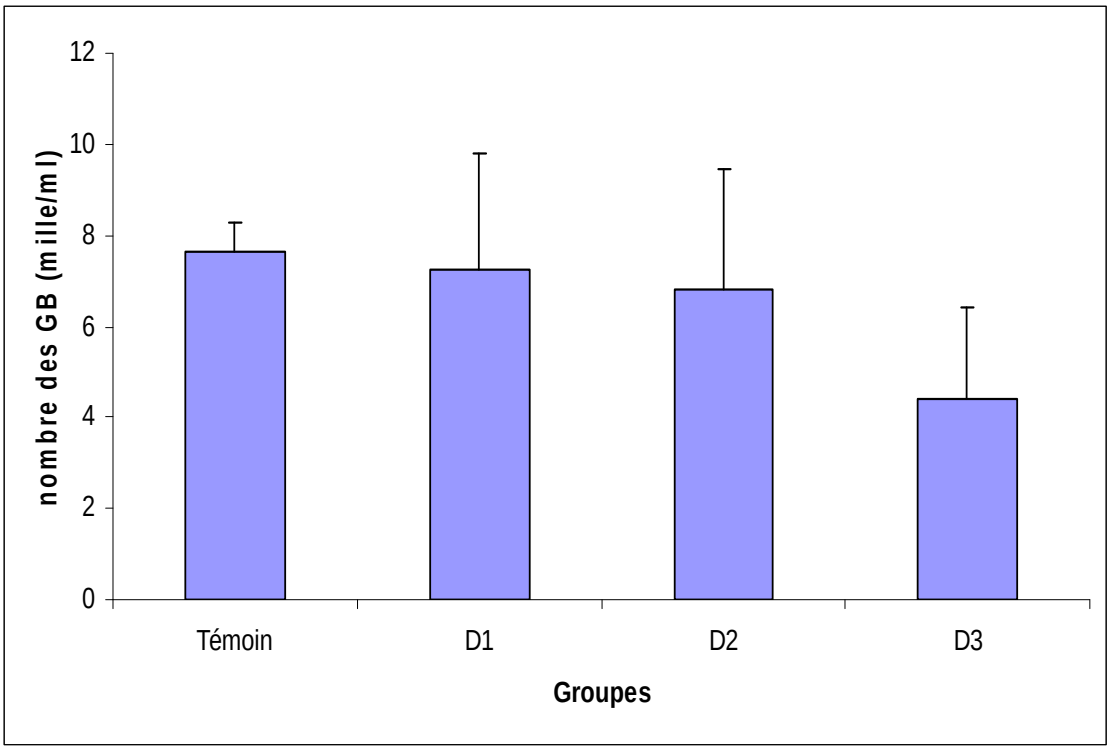


Figure 14: Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules blancs entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.7. Variations moyennes du nombre des lymphocytes

Nous avons enregistré une diminution non significative dans le nombre des lymphocytes chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 15)**.
Même variations entre les trois groupes.

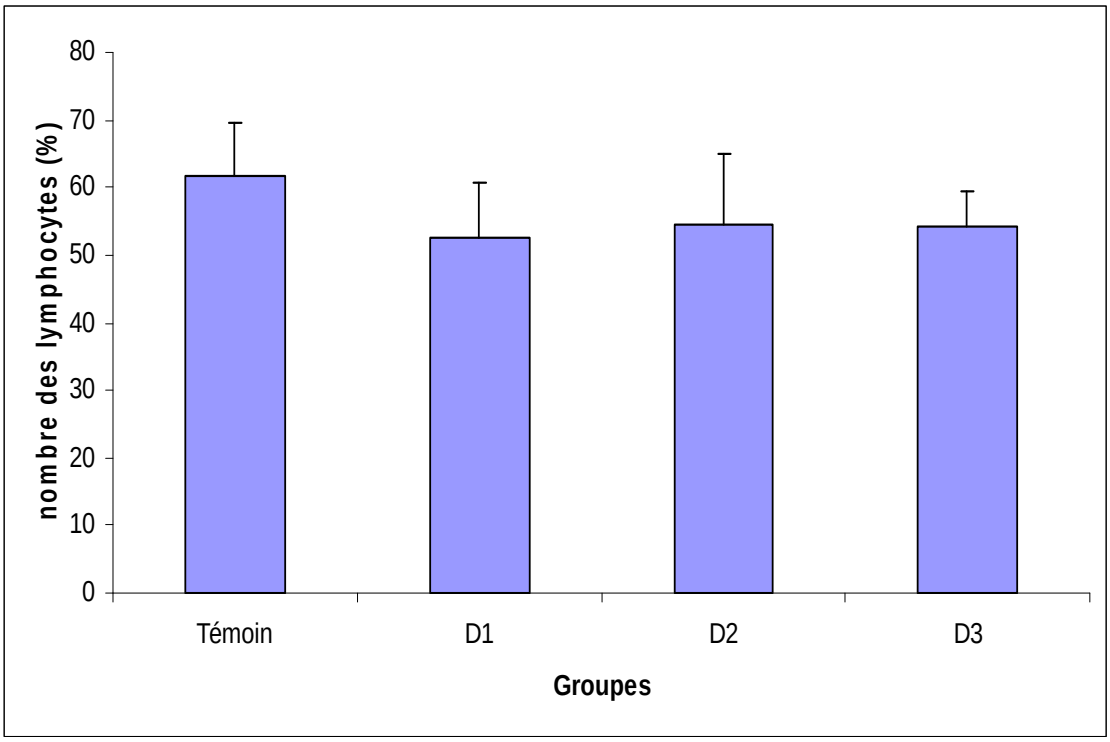


Figure 15: Variations moyennes (X±SD) du nombre des lymphocytes entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.2.8. Variations moyennes du taux d'hémoglobine (Hb)

Les résultats obtenus révèlent l'existence d'une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux d'hémoglobine chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins, et non significative entre les groupes traités. **(Figure 16)**.

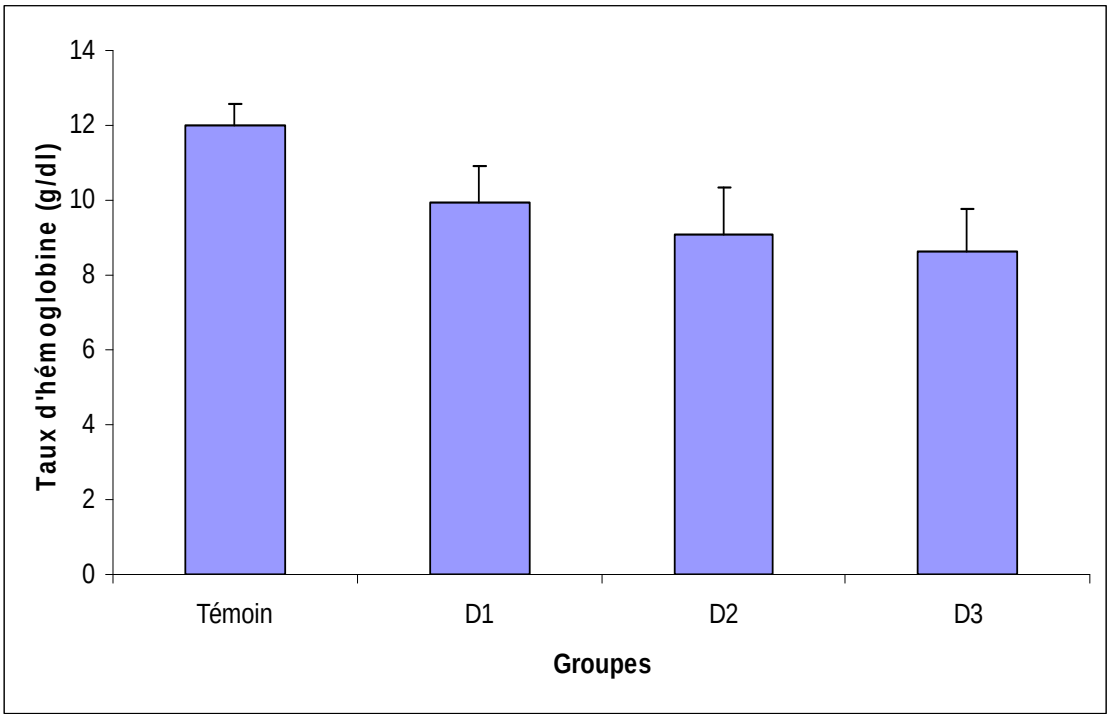


Figure 16: Variations moyennes (X±SD) du taux d'hémoglobine entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.3. Effets sur le poids des organes

1.3.1. Variations moyennes du poids de testicule

Les résultats obtenus révèlent que le poids de testicule diminue significativement ($p<0.05$) chez les groupes traités par rapport aux témoins, cette diminution est en fonction de la dose utilisée **(Figure 17)**.

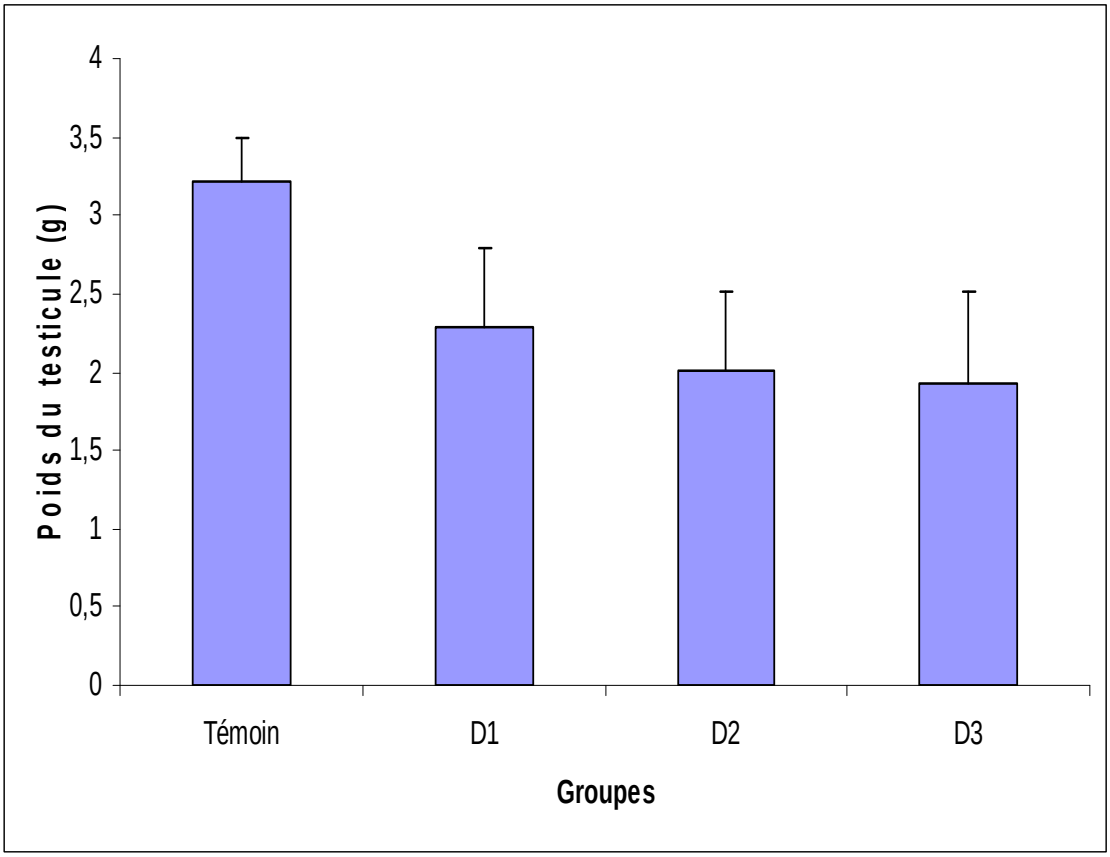


Figure 17: Variations moyennes (X±SD) du poids du testicule entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.3.2. Variations moyennes du poids du foie

Il existe une augmentation significative ($p<0.01$) dans le poids du foie chez les groupes traités par rapport aux témoins **(Figure 18)**.

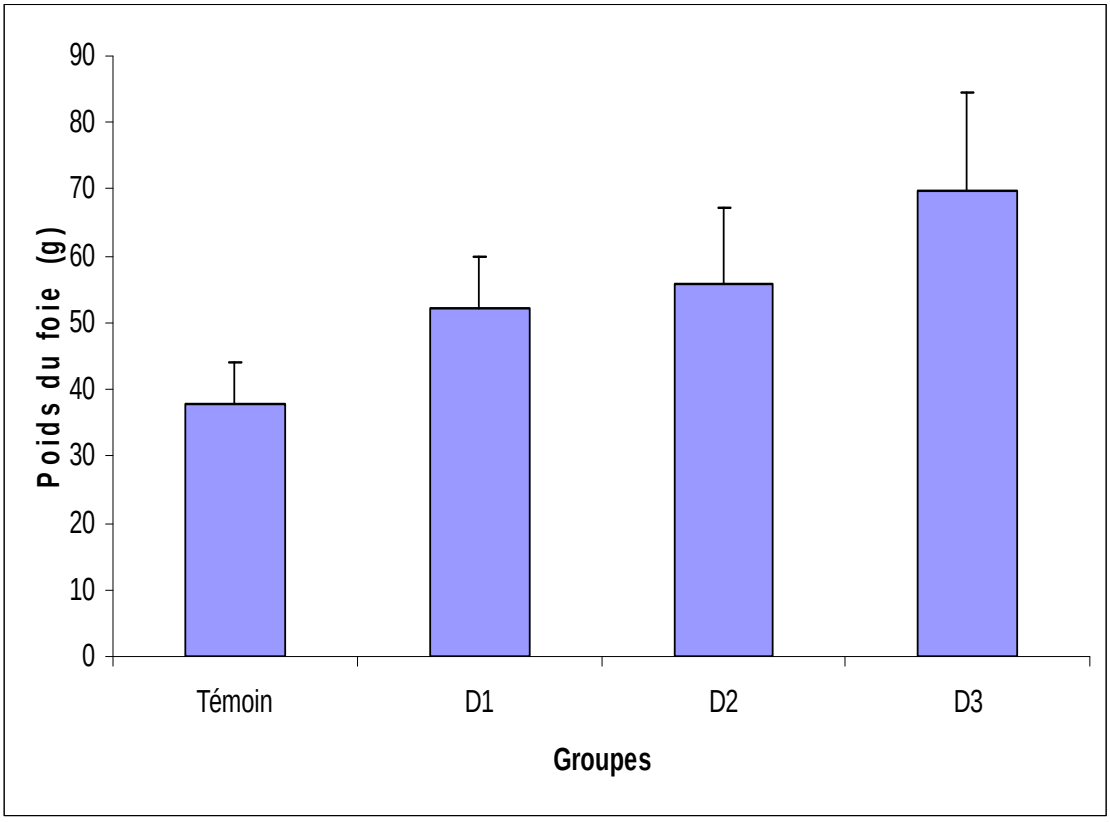


Figure 18: Variations moyennes (X±SD) du poids du foie entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.4. Effets sur le taux du glutathion GSH

1.4.1. Variations du taux du glutathion hépatique

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux du glutathion dans le foie chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 19)**.

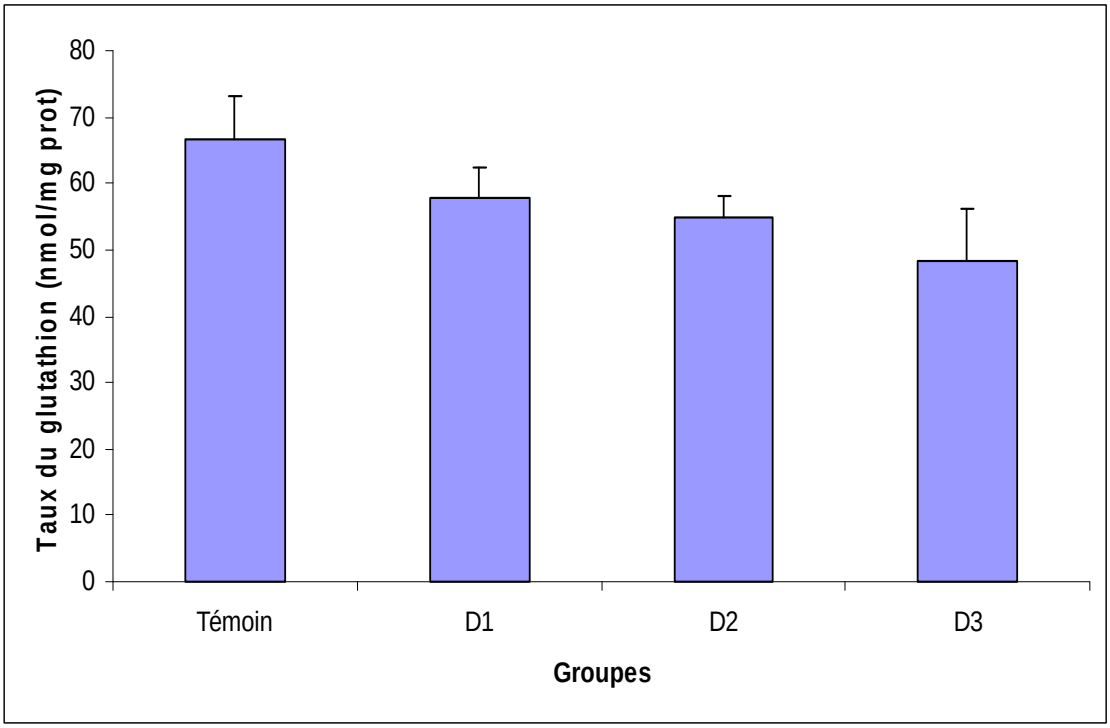


Figure 19: Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion hépatique entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.4.2. Variations du taux du glutathion testiculaire

Le dosage du glutathion dans le testicule montre qu'il existe une diminution très hautement significative ($p<0.001$) chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins, surtout entre le témoins et les groupes (D2-D3). **(Figure 20)**.

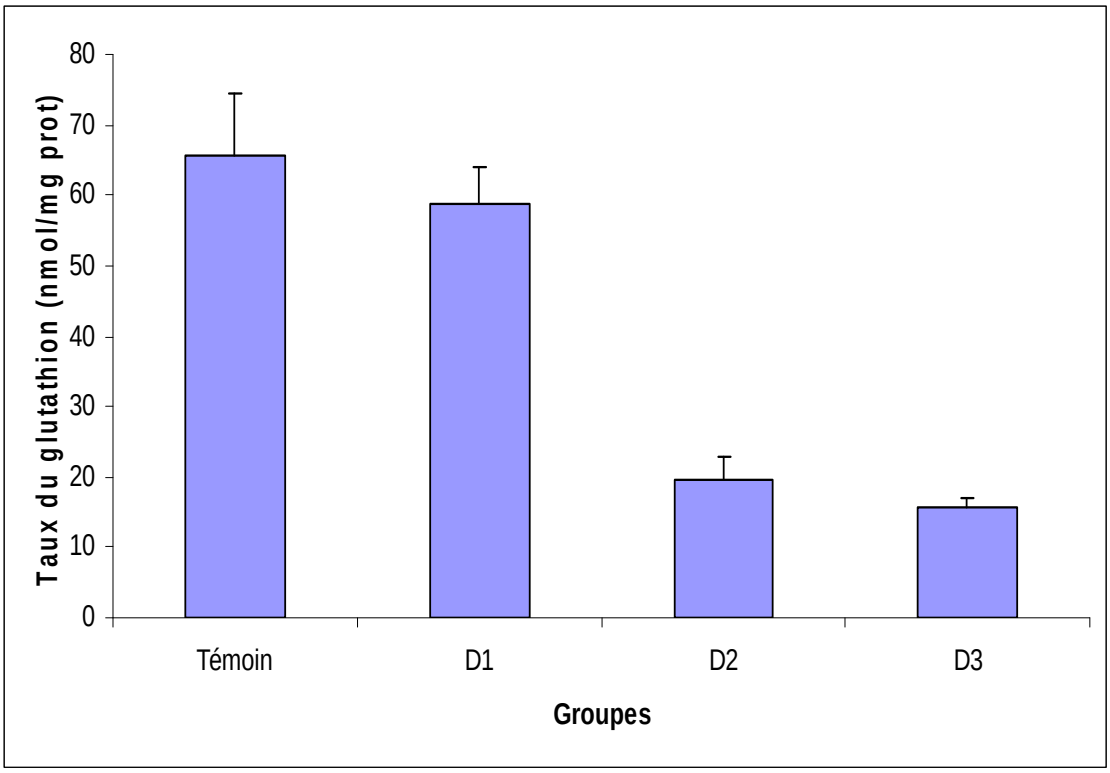


Figure 20: Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion testiculaire entre les 04 groupes (mode ingestion).

1.5. Résultats de l'étude histologique du testicule

La **figure (21)** représente les coupes histologiques réalisées au niveau des testicules des individus des 04 groupes **(T, D1, D2, D3)** selon le mode ingestion.

- Le testicule du témoin **(Figure 21. T)** présente la forme normale des tubes séminifères, chaque tube est délimité par une gaine tubulaire mince formée de la lame ou membrane basale. Ces tubes sont entourés de tissu conjonctif (de «remplissage») et aussi de tissu interstitiel formé de cellules de Leydig (cellules endocrines qui sécrètent essentiellement de la testostérone).

La paroi du tube séminifère est formée d'un épithélium stratifié comprenant deux types de cellules :

- Les cellules de la lignée germinale disposées sur 4 à 8 couches en division).
- Les cellules de Sertoli, cellules hautes s'appuyant sur la membrane basale et atteignant la lumière du tube par leur pôle apical.

Dans les tubes séminifères, les différentes couches de cellules germinales représentent les phases de la spermatogenèse qui s'effectuent de façon centripète, depuis la spermatogonie située contre la membrane basale jusqu'au spermatozoïde libéré dans la lumière. On observe que ces tubes sont remplis de cellules apparemment différentes, organisées en masses centrales (la lumière du tube séminifère est complètement occupée par une masse de spermatozoïdes matures, et on peut voir aussi là le rassemblement des flagelles au centre). Donc, à la périphérie, on trouve des cellules souches (spermatogonies), tandis qu'au centre (lumière) se trouvent les spermatozoïdes. En fait, les cellules non différenciées se développent pour finalement devenir des gamètes mâles :

- Spermatogonie
- Spermatocyte I
- Spermatocyte II
- Spermatide
- Spermatozoïde

- Chez les individus traités par la dose 50 ppm du solvant **(Figure 21.D1)**, la structure des tubes séminifères ne présente pas de modifications importantes, nous pouvons remarqué les différents stades de la spermatogenèse, la forme cylindrique des tubes séminifères, ainsi que la présence des cellules Leydig et Sertoli. La lumière des tubes séminifères contient aussi une masse de spermatozoïdes matures.

- l'examen microscopique montre que l'administration orale de 100 ppm du produit **(Figure 21. D2),** entraîne des altérations bien remarquables, soit au niveau de la structure des tubes séminifères ou encore sur les stades de la spermatogenèse. Nous avons constaté que la forme du tube séminifère commence à perdre l'aspect cylindrique et commence à avoir une forme un peu allongée. Le volume des différentes couches de cellules souches a diminué (éclaircissement de la zone des cellules), ainsi que la lumière du tube est plus ou moins claire et élargie avec une diminution de la masse centrale occupée par les spermatozoïdes.

- Des altérations considérables remarquées chez les lapins traités par la forte dose de 150 ppm **(Figure 21. D3) :** le tube séminifère est complètement déformé, l'éclaircissement de la zone des cellules souches, l'espace de la lumière est très élargie et presque vide sauf quelques débris cellulaires. Nous avons constaté aussi des lésions au niveau de l'espace interstitiel et la membrane basale.

Les différences remarquées entre le groupe témoin (T) et le groupe traité par la dose 150 ppm (D3) sont illustrées dans **la figure (22)** après examen microscopique à (x10), et cela pour avoir plus d'idées sur l'ensemble des tubes séminifères.

- Tubes séminifères normaux **(Figure 22.T)**.
- Tubes séminifères anormaux et complètement déformés **(Figure 22.D3)**.

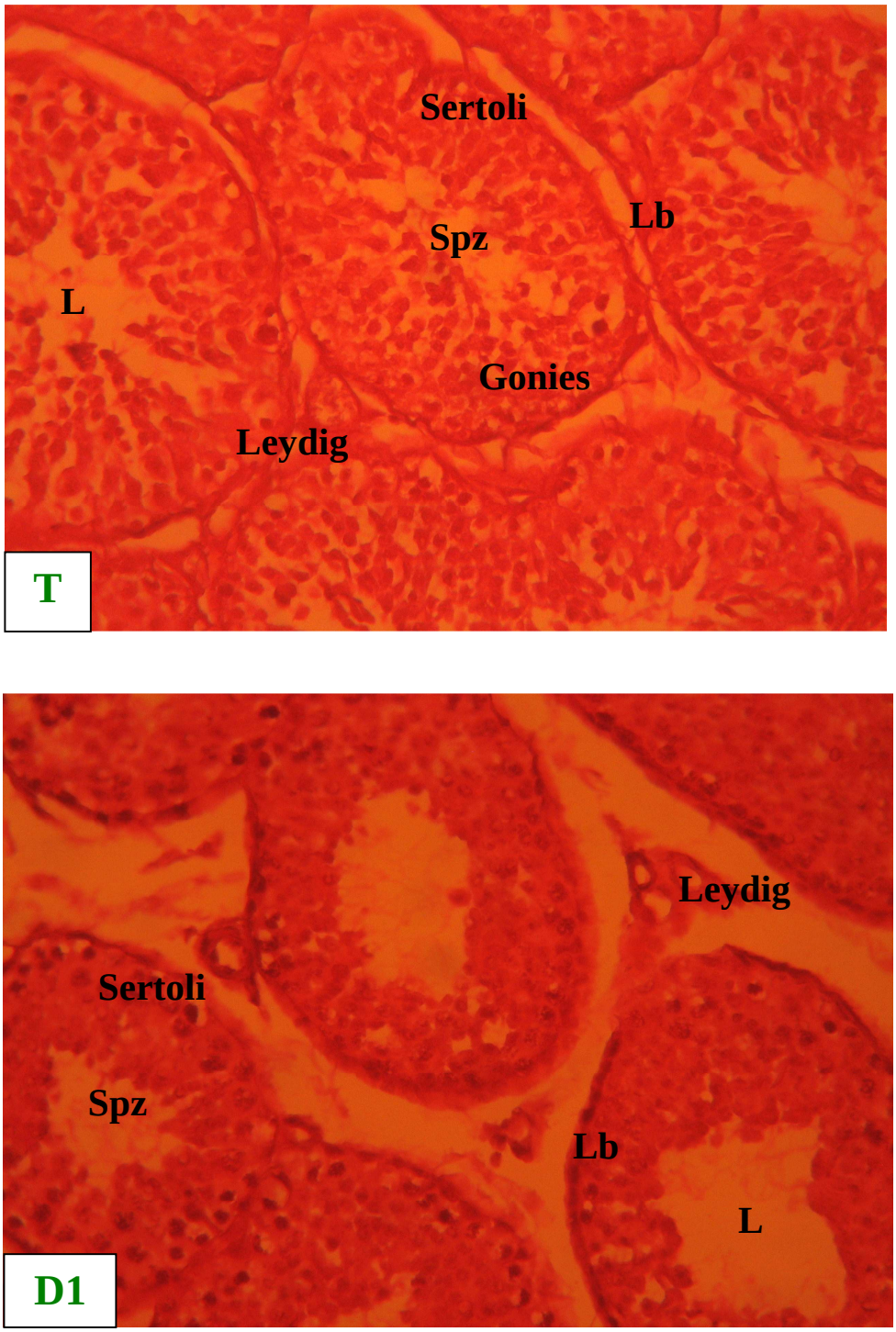


Figure 21 : Coupes histologiques du testicule (X40). (Témoins, D1) (mode ingestion).

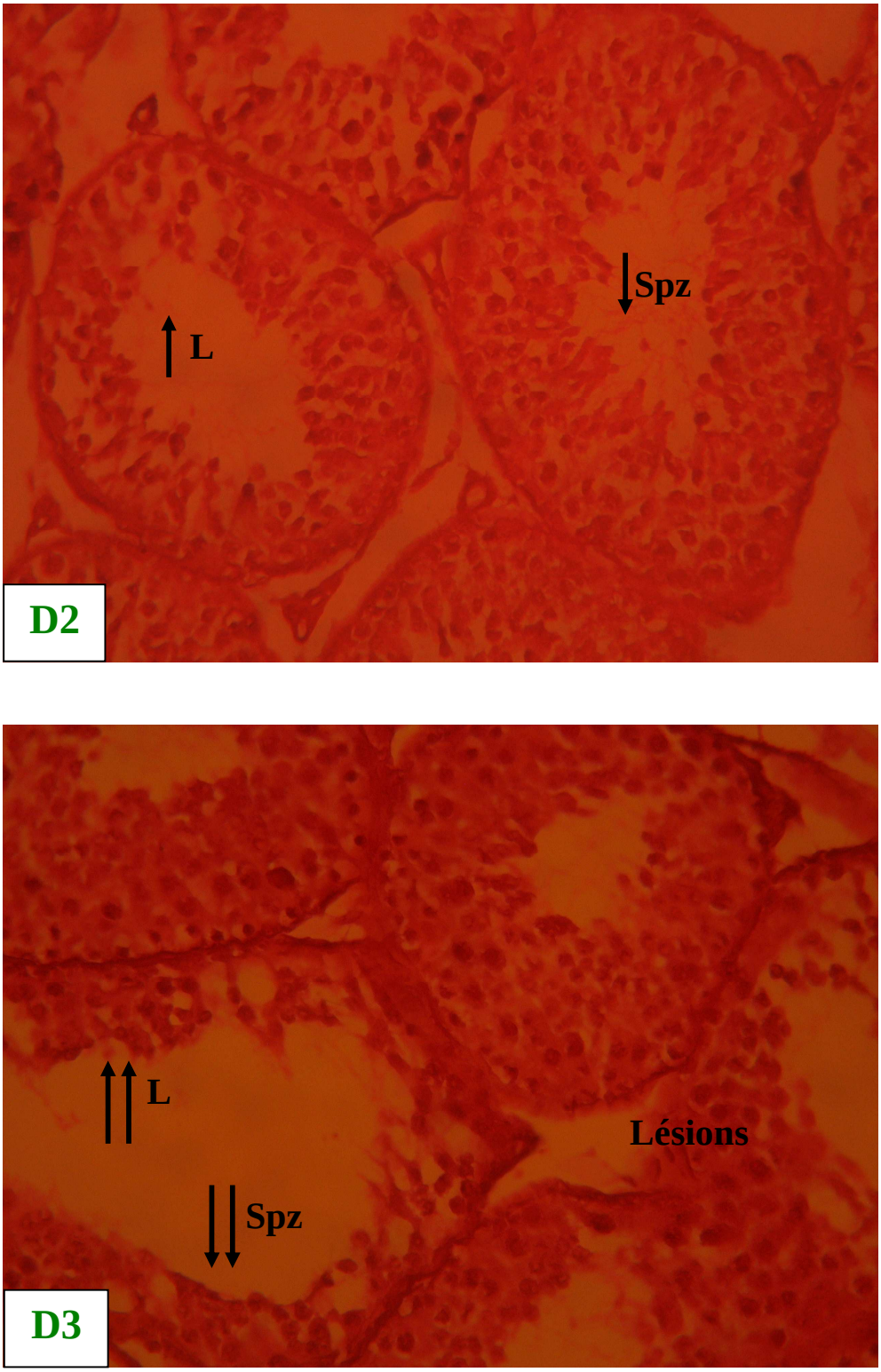


Figure 21 : Coupes histologiques du testicule (X40). (D2, D3) (mode ingestion).

L : Lumière du tube séminifère **; Lb :** Lame basale **; Spz :** Spermatozoïdes **; Gonies :** la lignée des spermatogonies en division **; Leydig :** les cellules interstitielles de Leydig **; Sertoli :** les cellules nourricières des spermatozoïdes.

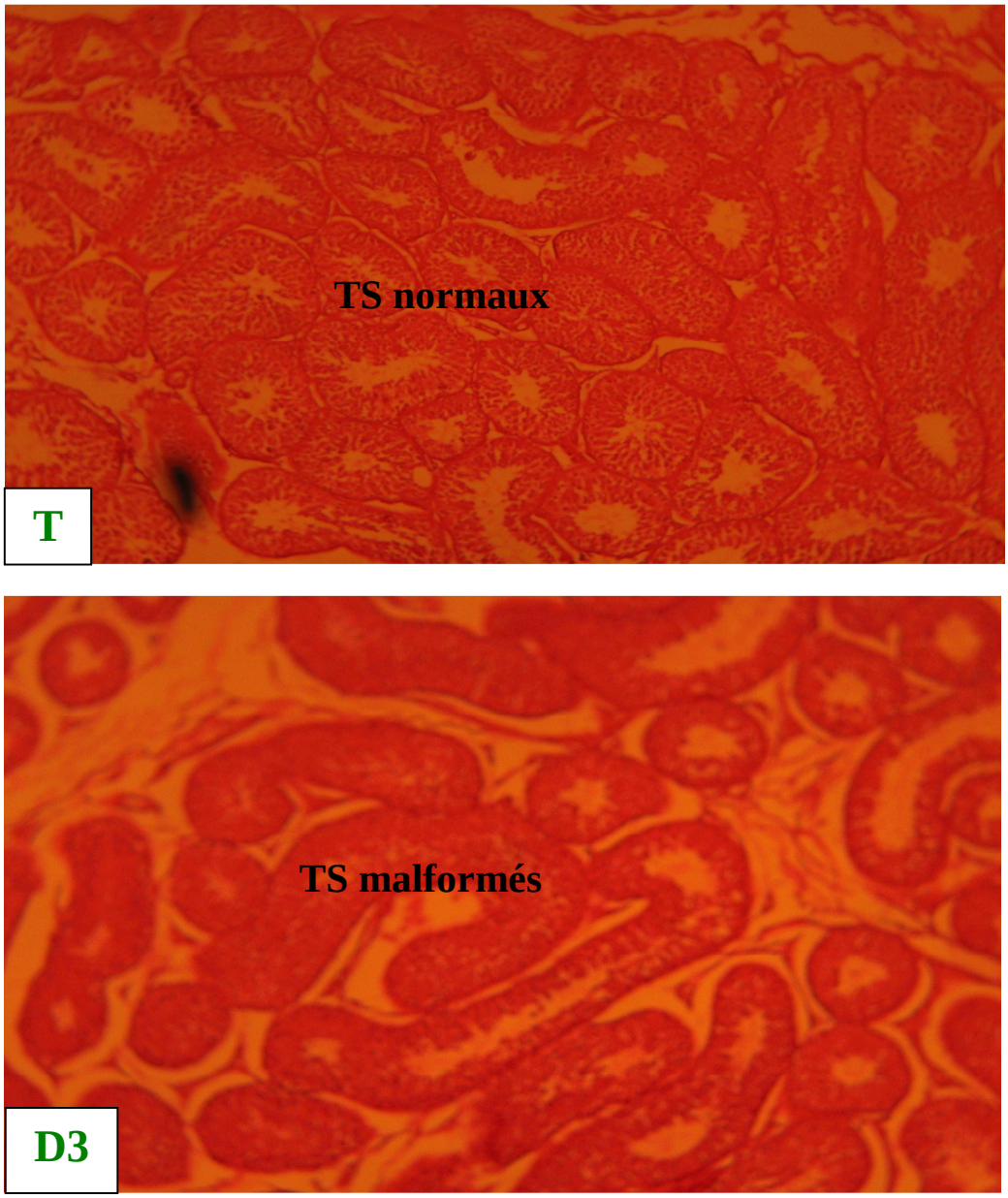


Figure 22 : Coupes histologiques du testicule (X10). (T, D3) (mode ingestion).

TS : Tube séminifère.

2. Etude de l'impact de l'éthylène glycol monométhyl éther selon le mode inhalation

2.1. Effets sur les paramètres de la fertilité masculine

2.1.1. Variations de la concentration des spermatozoïdes

Nous avons enregistré une diminution non significative dans la concentration des spermatozoïdes chez les groupes traités par le produit comparés aux témoins **(Figure 23**).

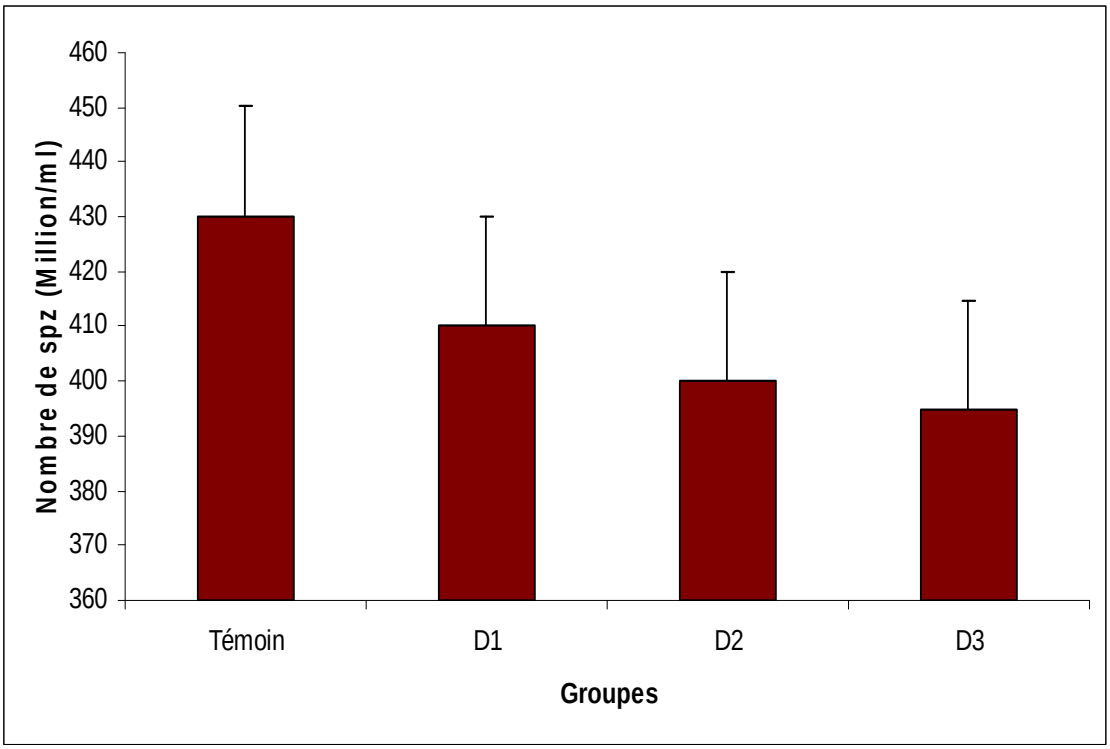


Figure 23: Variations moyennes (X±SD) de la concentration des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.1.2. Variations moyennes de la mobilité des spermatozoïdes

L'inhalation de l'EGME à provoqué une diminution légère (non significative) dans la mobilité des spermatozoïdes chez les groupes traités comparés aux témoins **(Figure 24)**.

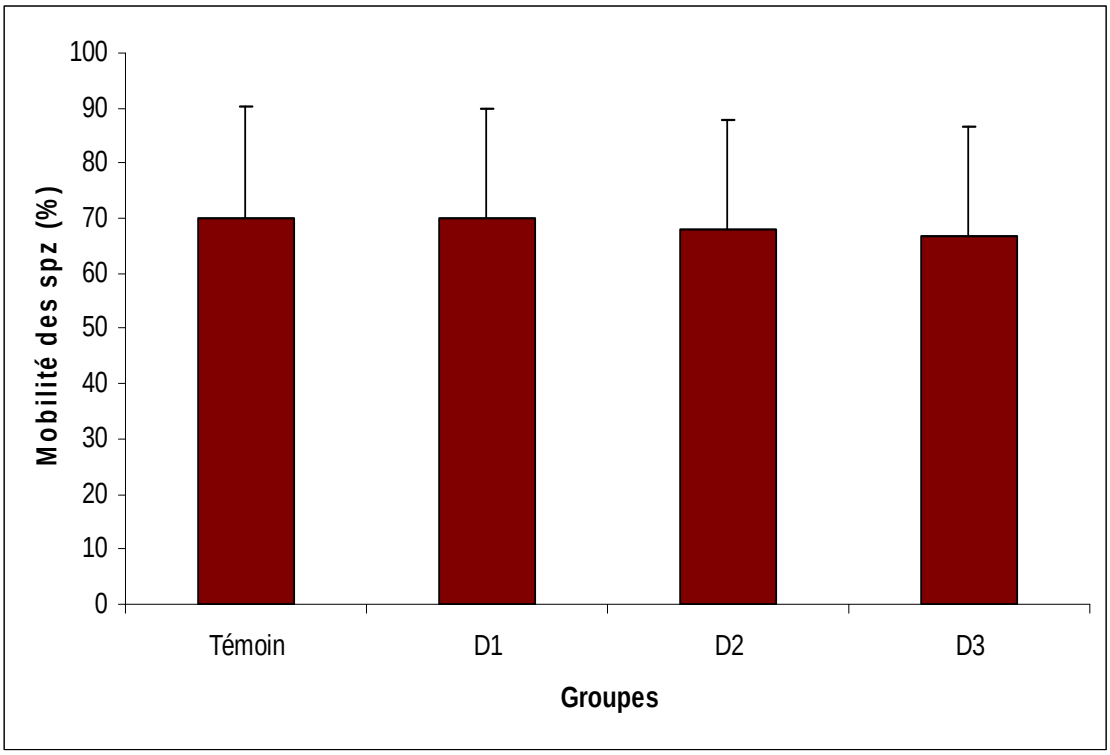


Figure 24: Variations moyennes (X±SD) de la mobilité des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.1.3. Variations moyennes de la vitesse des spermatozoïdes

Nous avons remarqué une diminution non significative dans la vitesse des spermatozoïdes chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 25)**. Cette diminution est légère par rapport à la diminution de la vitesse chez les groupes traités par l'EGME selon le mode ingestion.

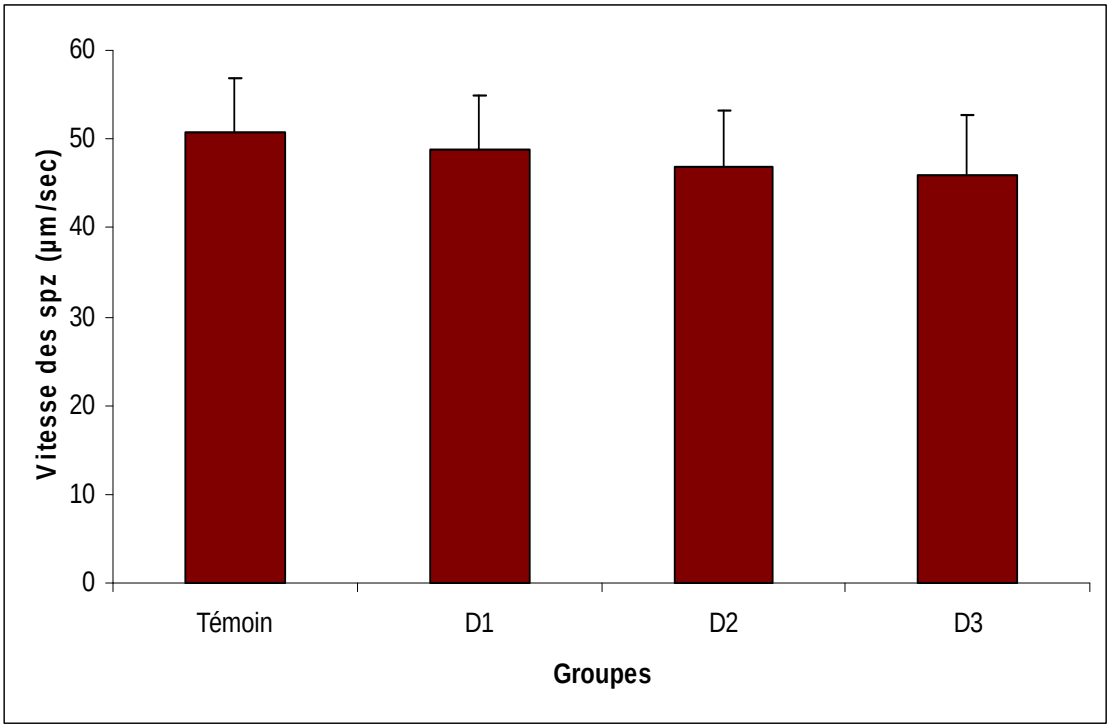


Figure 25: Variations moyennes (X±SD) de la vitesse des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.1.4. Variations moyennes des malformations morphologiques des spermatozoïdes

Les malformations morphologiques au niveau des trois zones du corps spermatique (tête, pièce intermédiaire et flagelle) ont marqué une augmentation significative ($P<0.05$) chez les groupes traités comparés aux témoins, cette augmentation est moins importante comparée à l'augmentation enregistrée chez les groupes traités selon le mode ingestion **(Figure 26)**.

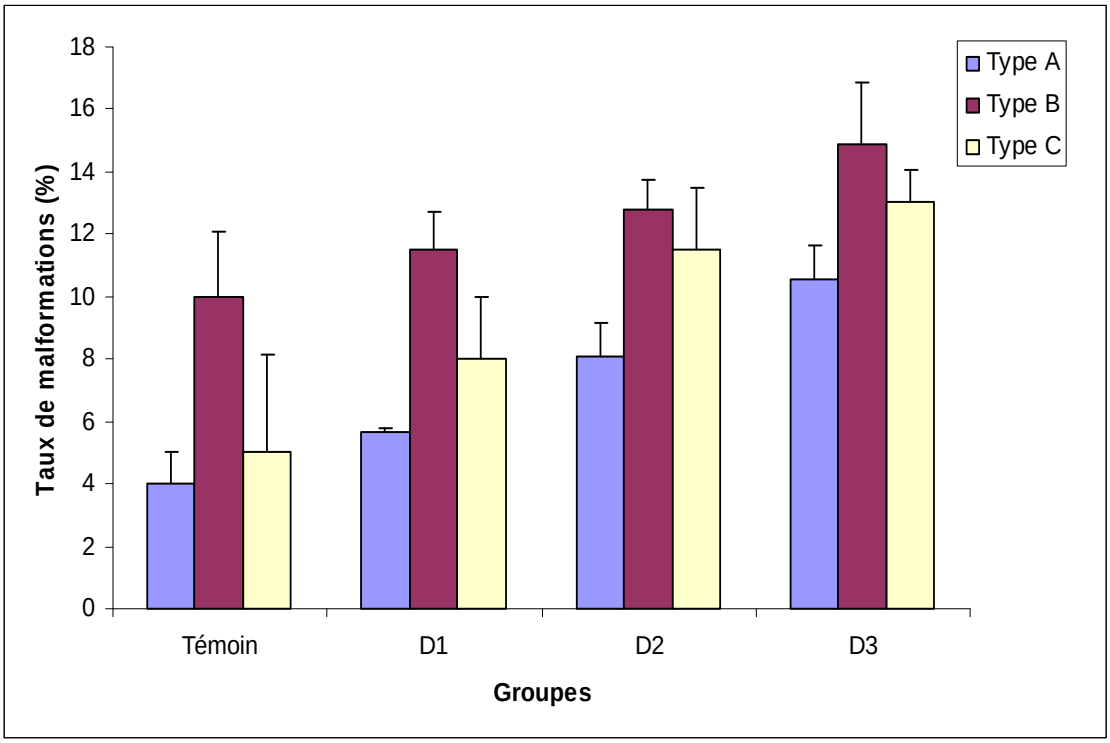


Figure 26: Variations moyennes (X±SD) de malformations morphologiques des spermatozoïdes entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.1.5. Variations moyennes de la vitalité des spermatozoïdes

Nous avons enregistré une augmentation hautement significative ($p<0.01$) dans le taux des spermatozoïdes morts chez les groupes traités par l'EGME par rapport au témoins, ainsi qu'une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux des spermatozoïdes vivants **(Figure 27)**.

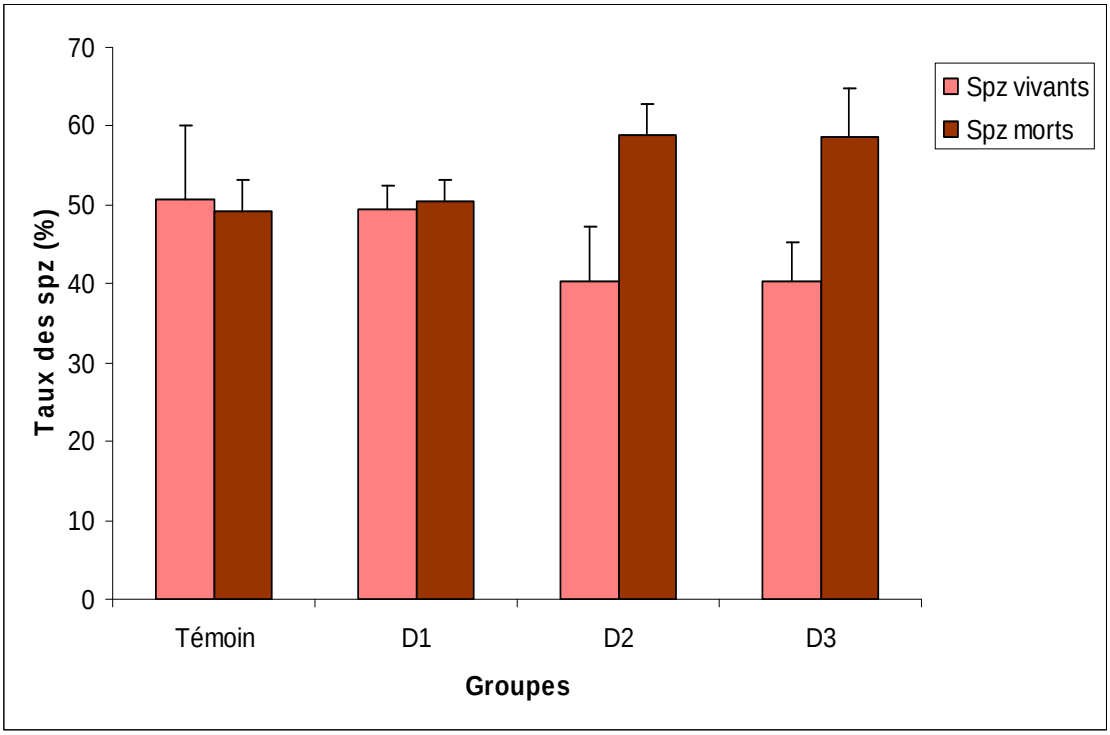


Figure 27: Variations moyennes (X±SD) de la vitalité des spermatozoïdes (%) entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.1.6. Variations moyennes du taux de la testostérone

Les résultats montrent une diminution significative ($p<0.05$) dans la concentration de la testostérone chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 28)**. De même façon cette diminution est légère par rapport à la diminution du taux de la testostérone chez les groupes traités selon le mode ingestion.

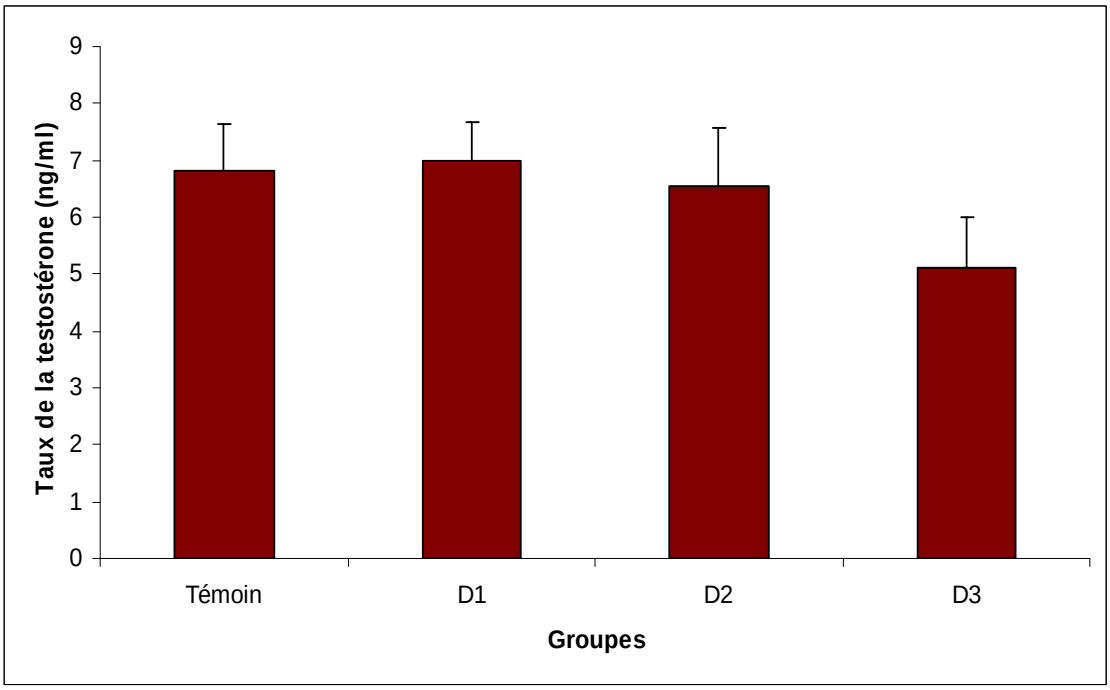


Figure 28: Variations moyennes (X±SD) du taux de la testostérone entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2. Effets sur les paramètres biochimiques et cellulaires du sang

2.2.1. Variations moyennes du taux de glucose

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux de glucose chez les groupes traités par l'EGME (D1, D2) comparés aux témoins, à noter que le groupe D3 a marqué une augmentation non significative par rapport au groupe D2 **(Figure 29)**.

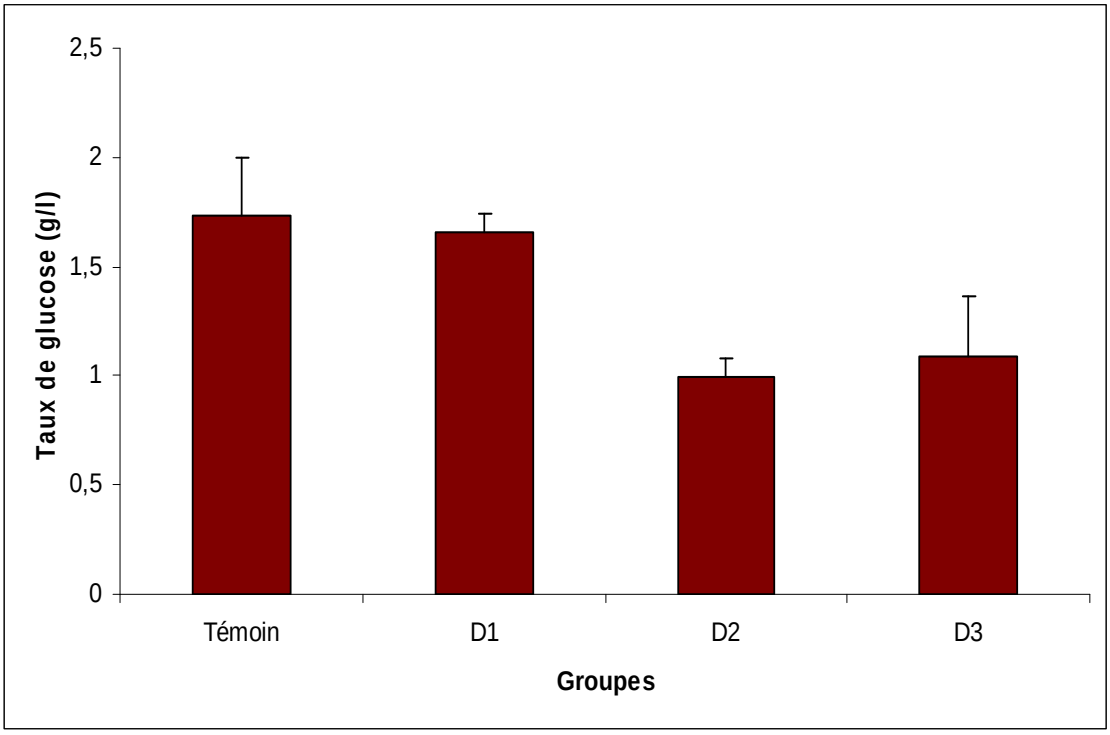


Figure 29: Variations moyennes (X±SD) du taux de glucose entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.2. Variations moyennes du taux du cholestérol

Nous avons constaté qu'il existe une diminution non significative dans le taux du cholestérol chez les groupes traités par l'EGME comparés aux témoins **(Figure 30)**.

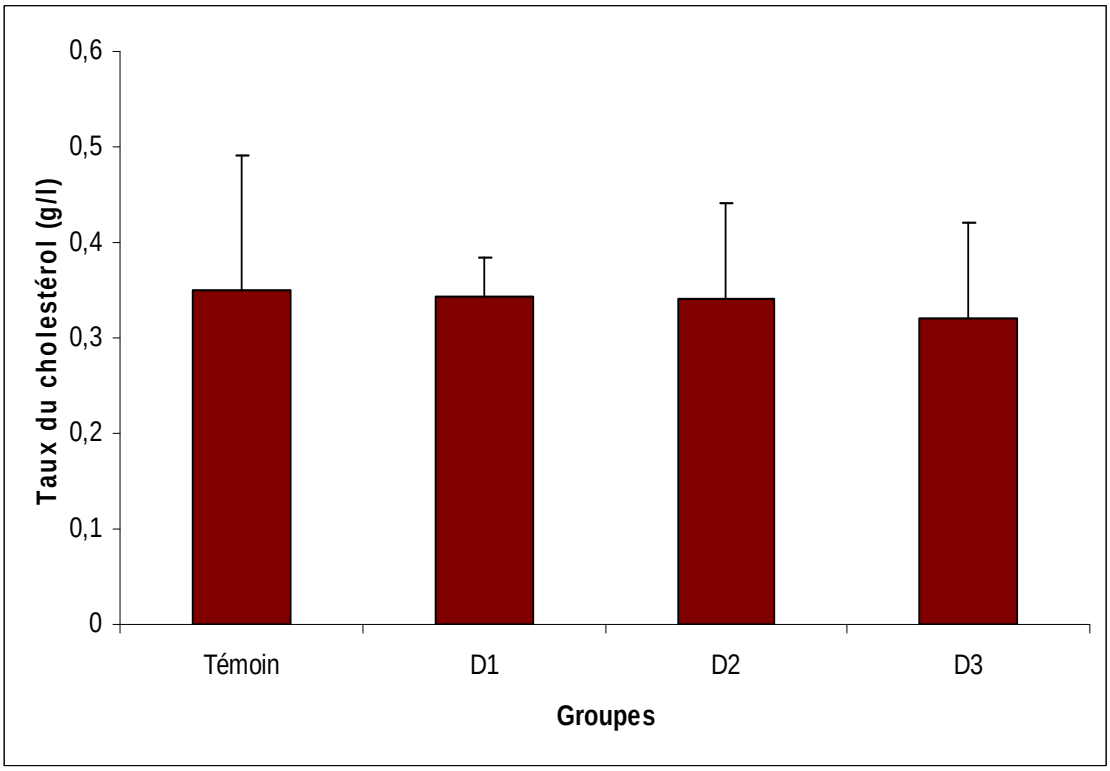


Figure 30: Variations moyennes (X±SD) du taux du cholestérol entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.3. Variations moyennes du taux des triglycérides

Les triglycérides ont marqué une augmentation non significative chez les individus traités (D1, D2) comparée aux témoins, cette augmentation est significative ($p<0.05$) entre les témoins et le groupe D3 **(Figure 31)**.

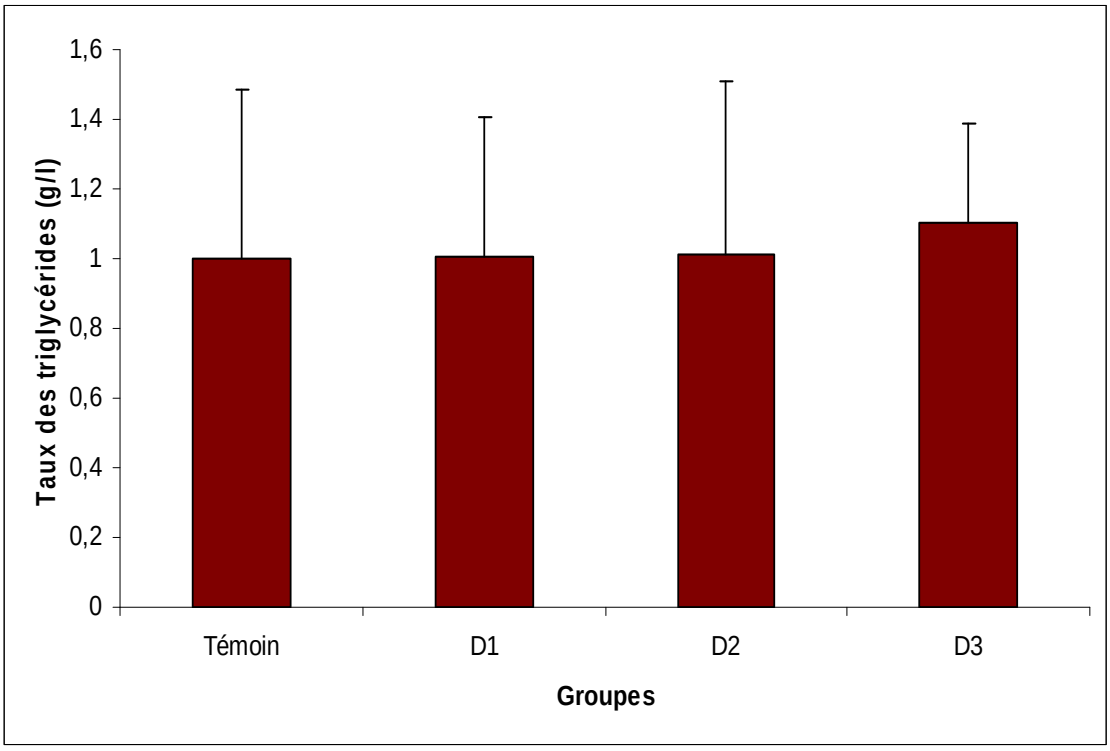


Figure 31: Variations moyennes (X±SD) du taux des triglycérides entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.4. Variations moyennes du taux des protéines

Une augmentation significative ($p<0.05$) dans le taux des protéines a été enregistrée chez les groupes traités par le solvant par rapport aux témoins **(Figure 32)**.

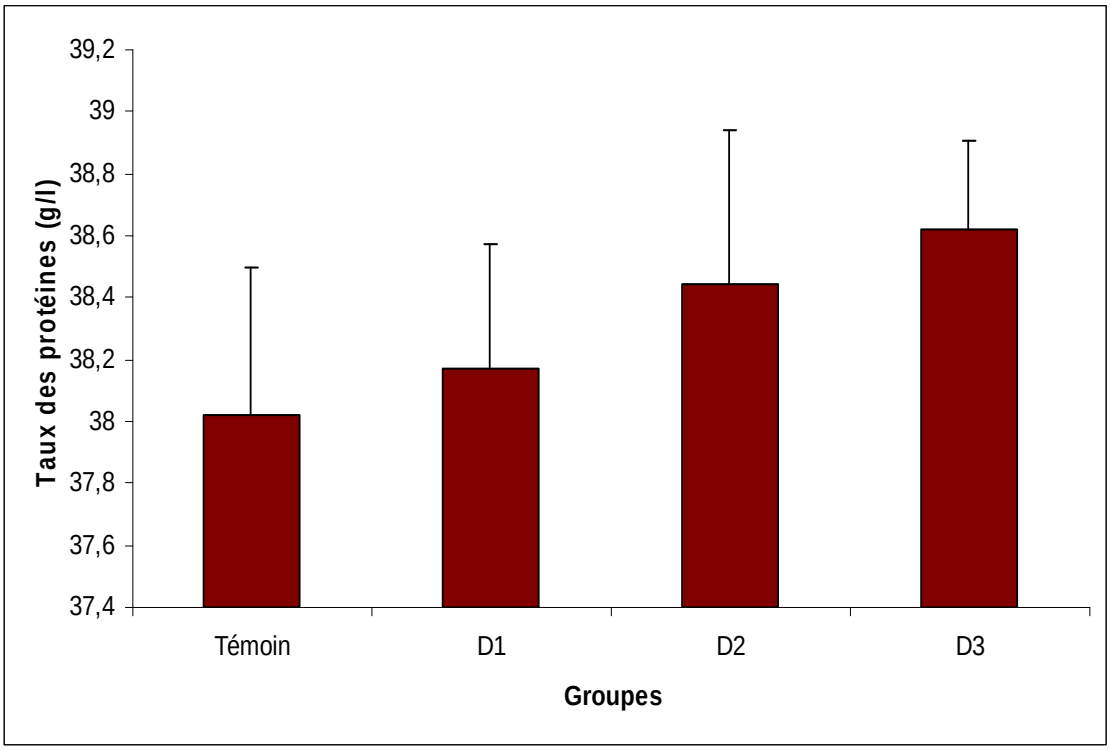


Figure 32: Variations moyennes (X±SD) du taux des protéines entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.5. Variations moyennes du nombre des globules rouges (GR)

Aucune diminution significative n'a été enregistrée dans le nombre des globules rouges chez les individus traités par le solvant par rapport aux témoins **(Figure 33).**

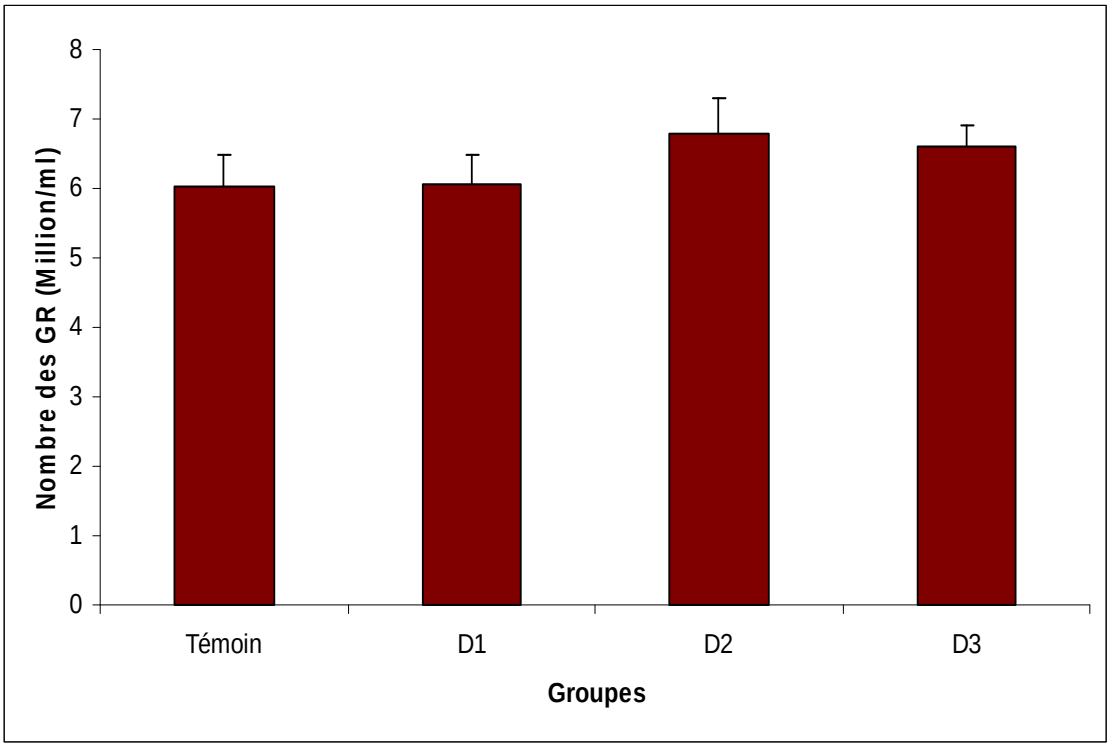


Figure 33: Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules rouges entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.6. Variations moyennes du nombre des globules blancs (GB)

Nous avons remarqué qu'il n'existe pas de différence significative dans le nombre des globules blancs entre le groupe témoins et les groupes traités **(Figure 34)**.

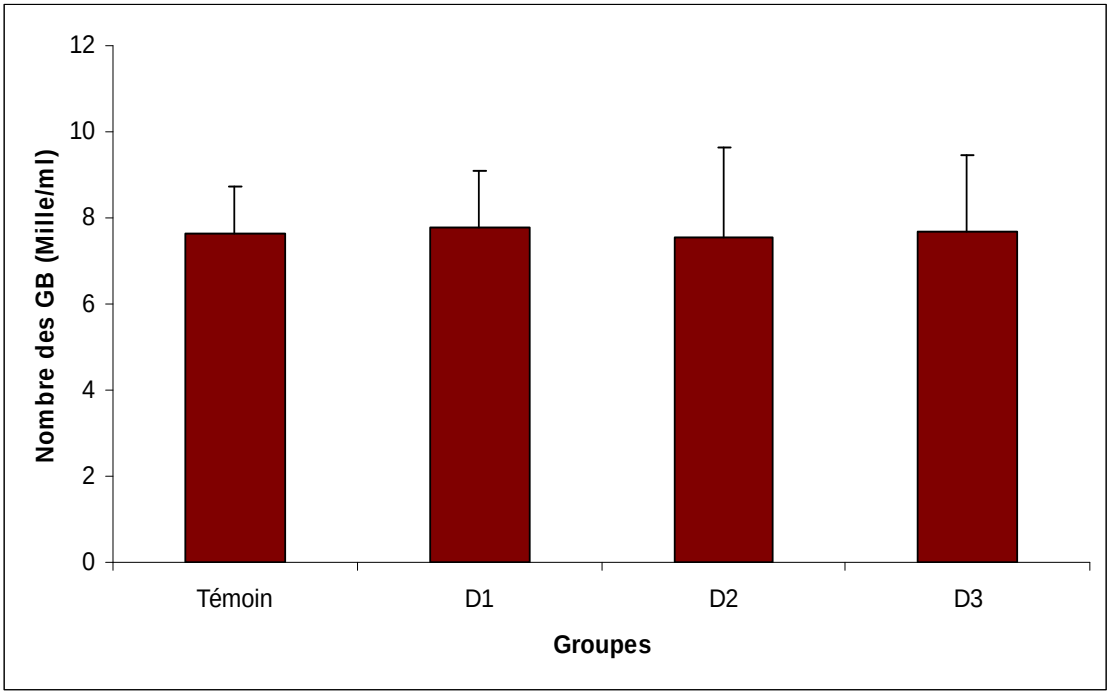


Figure 34: Variations moyennes (X±SD) du nombre des globules blancs entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.7. Variations moyennes du taux des lymphocytes

Une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux des lymphocytes chez les groupes traités (D1, D2) comparés aux témoins. Cette différence est hautement significative ($p<0.01$) entre les témoins et le groupe D3 **(Figure 35)**.

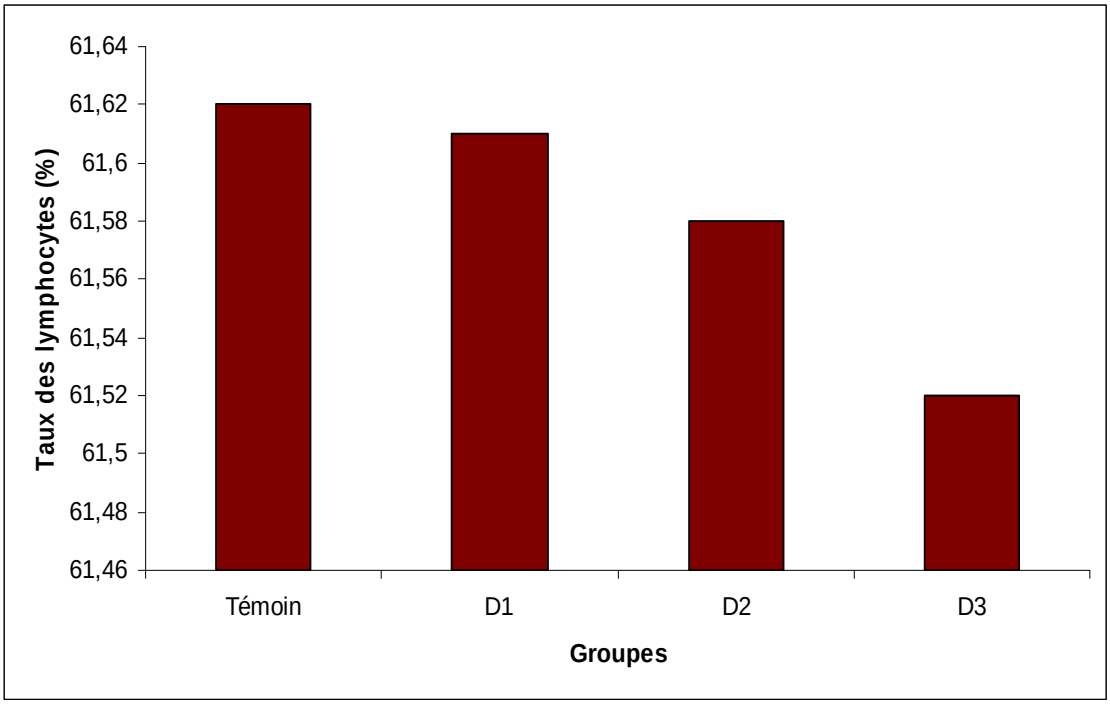


Figure 35: Variations moyennes (X±SD) du taux des lymphocytes entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.2.8. Variations moyennes du taux d'hémoglobine (Hb)

Aucune diminution significative dans le taux d'hémoglobine chez les groupes traités par le solvant **(Figure 36)**.

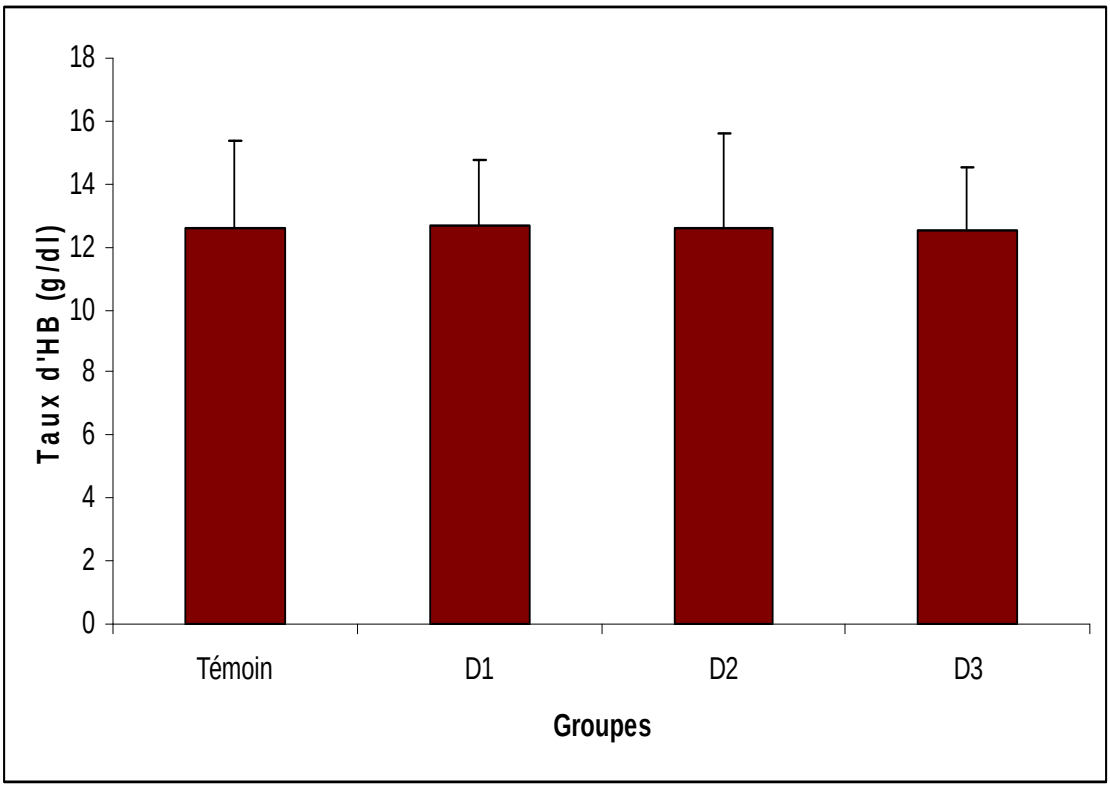


Figure 36: Variations moyennes (X±SD) du taux d'hémoglobine entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.3. Effets sur le poids des organes

2.3.1. Variations moyennes du poids de testicule

Le poids du testicule a marqué une diminution non significative entre les témoins et les individus traités par l'EGME **(Figure 37)**.

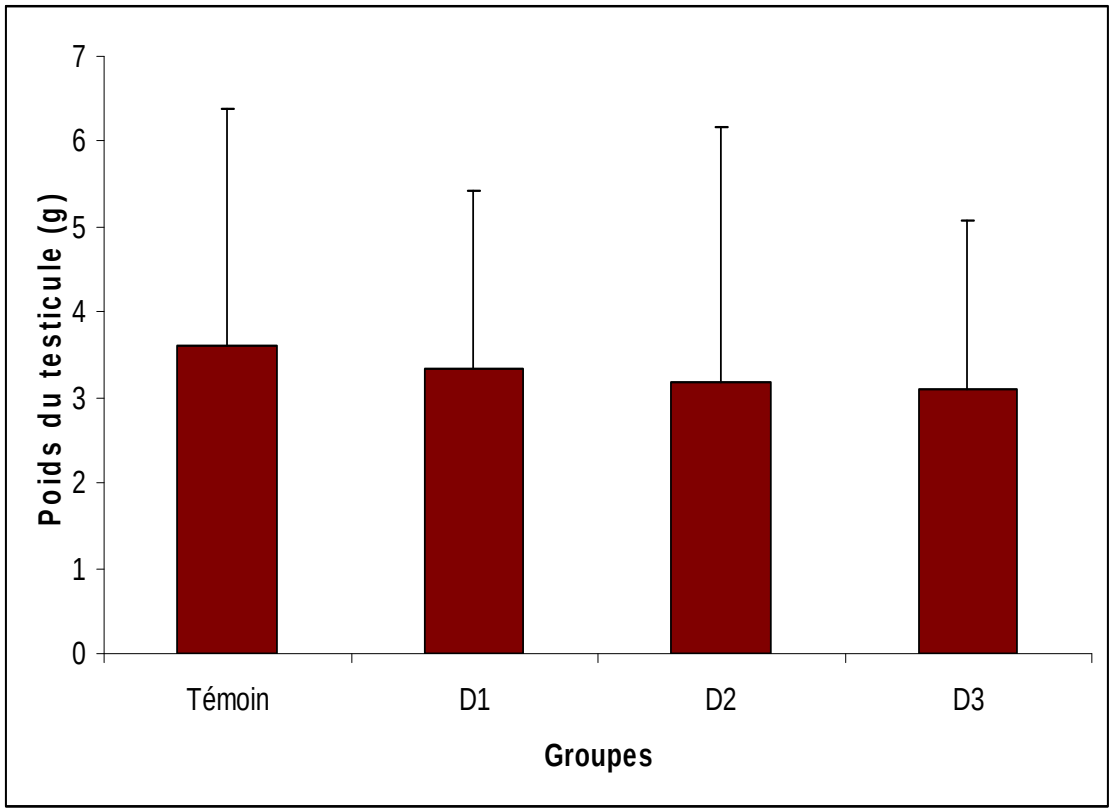


Figure 37: Variations moyennes (X±SD) du poids testiculaire entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.3.2. Variations moyennes du poids du foie

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une augmentation non significative dans le poids du foie chez les individus traités par l'EGME **(Figure 38)**.

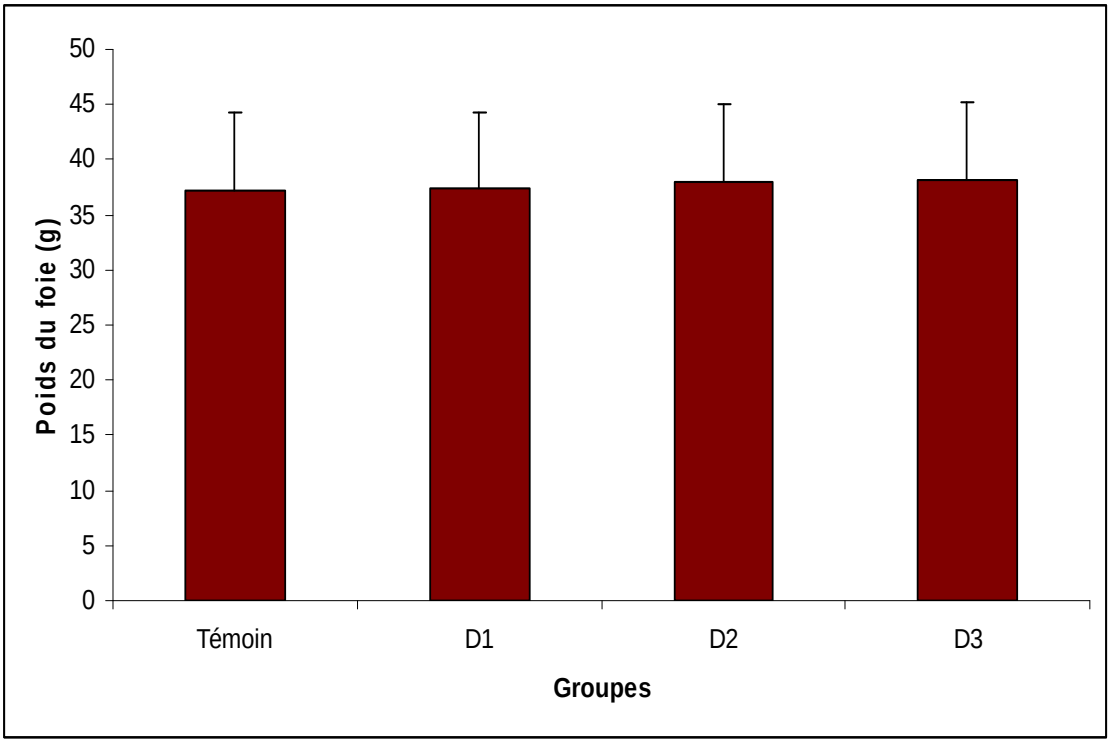


Figure 38: Variations moyennes (X±SD) du poids du foie entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.4. Effets sur le taux du glutathion

2.4.1. Variations du taux du glutathion hépatique

Il existe une diminution significative ($p<0.05$) dans le taux du glutathion au niveau du foie chez les groupes traités (D1, D2) comparés aux témoins, cette diminution est très hautement significative ($p<0.001$) entre les témoins et le groupe D3 **(Figure 39)**.

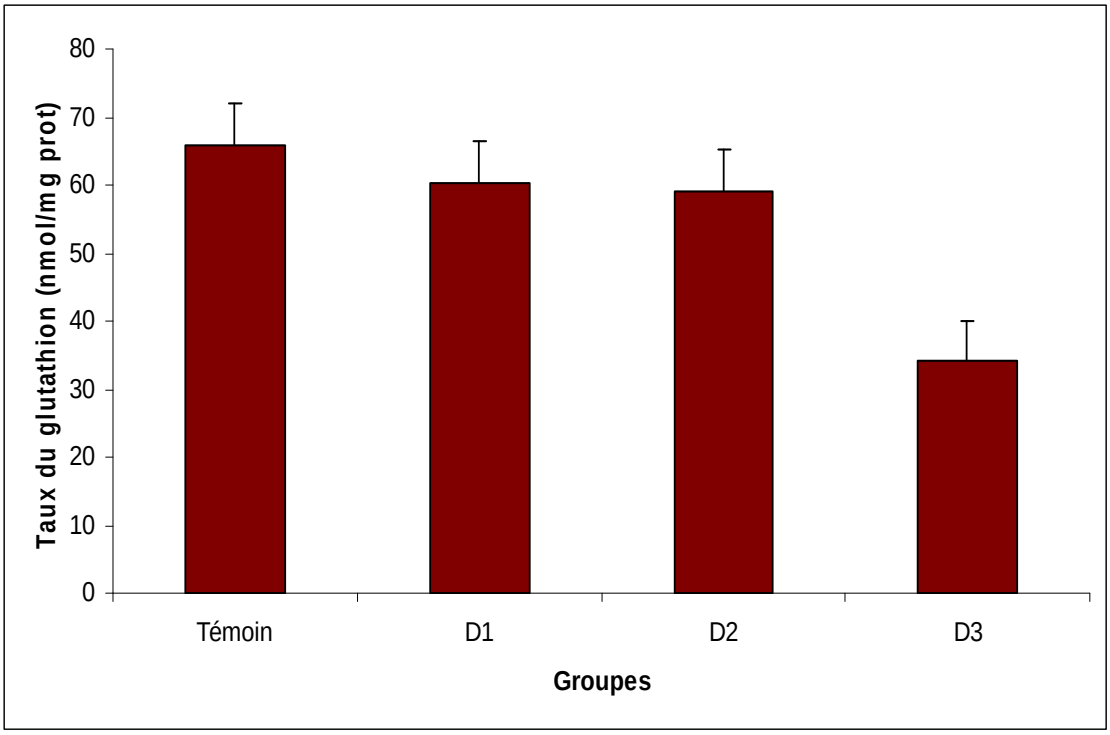


Figure 39: Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion hépatique entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.4.2. Variations du taux du glutathion testiculaire

Nous avons constaté l'existence d'une diminution non significative dans le taux du glutathion au niveau du testicule chez les groupes traités (D1, D2) comparés aux témoins, mais cette diminution est encore très hautement significative ($p<0.001$) entre le groupe témoin et le groupe D3 **(Figure 40)**.

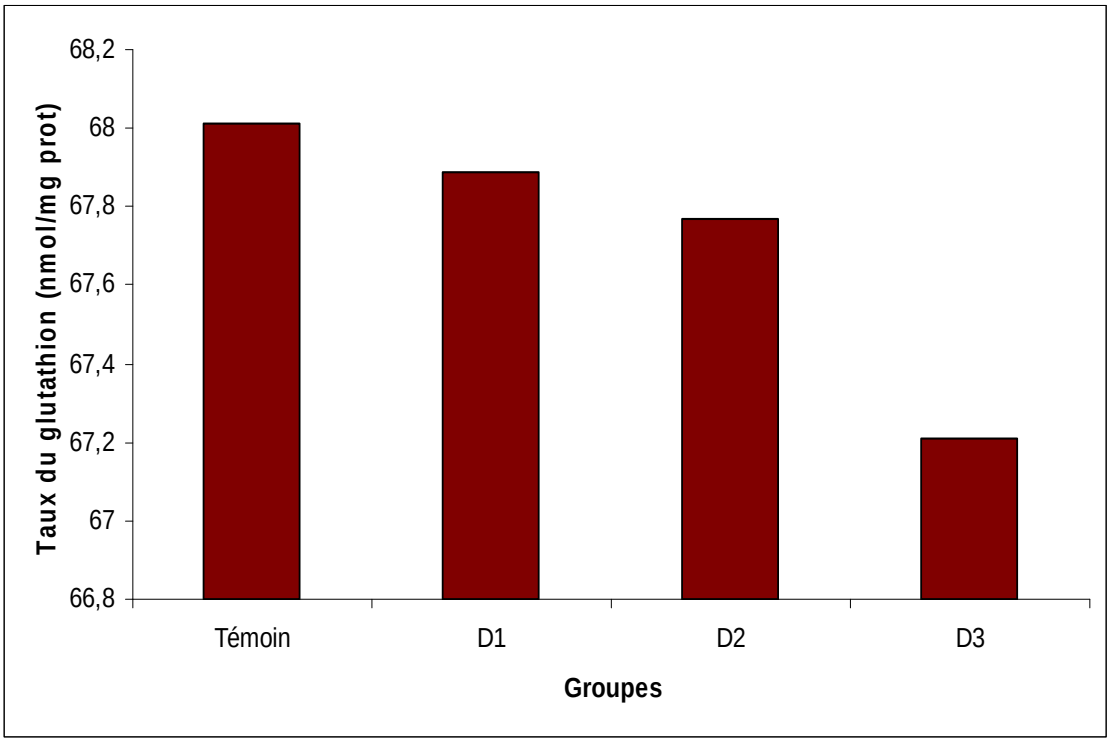


Figure 40: Variations moyennes (X±SD) du taux du glutathion testiculaire entre les 04 groupes (mode inhalation).

2.5. Résultats de l'étude histologique du testicule

La **figure (41)** représente les coupes histologiques réalisées au niveau des testicules des individus des 04 groupes **(T, D1, D2, D3)** selon le mode inhalation.

- Le testicule du témoin **(Figure 41. T)** présente la forme normale des tubes séminifères et les mêmes observations remarquées selon le mode ingestion : lame basale, tissu interstitiel, cellules de Leydig, un épithélium stratifié comprenant les deux types de cellules : les cellules de la lignée germinale en division et les cellules de Sertoli, les différentes couches de cellules germinales qui représentent les phases de la spermatogenèse, la lumière du tube séminifère est occupée par la masse de spermatozoïdes matures.

- Chez les individus traités par les doses 50 ppm et 100 ppm d'EGME **(Figure 41.D1, D2)**, aucune modification remarquée, la coupe représente les mêmes aspects du témoin.

- l'examen microscopique montre que l'inhalation d'une dose de 150 ppm du produit **(Figure 41. D3),** entraîne aussi des altérations plus ou moins remarquables, les tubes séminifères ont changé de forme, ils sont devenus plus ou moins allongés. Le volume des différentes couches de cellules souches est légèrement touché, ainsi que la lumière du tube est un peu claire et élargie avec une diminution de la masse centrale occupée par les spermatozoïdes.

Les différences remarquées entre le groupe témoin (T) et le groupe traité par la dose 150 ppm (D3) sont illustrées dans **la figure (42)** après examen microscopique à (x10), et cela pour avoir plus d'idées sur l'ensemble des tubes séminifères.

- Tubes séminifères normaux **(Figure 42.T)**.
- Tubes séminifères anormaux et complètement déformés **(Figure 42.D3)**.

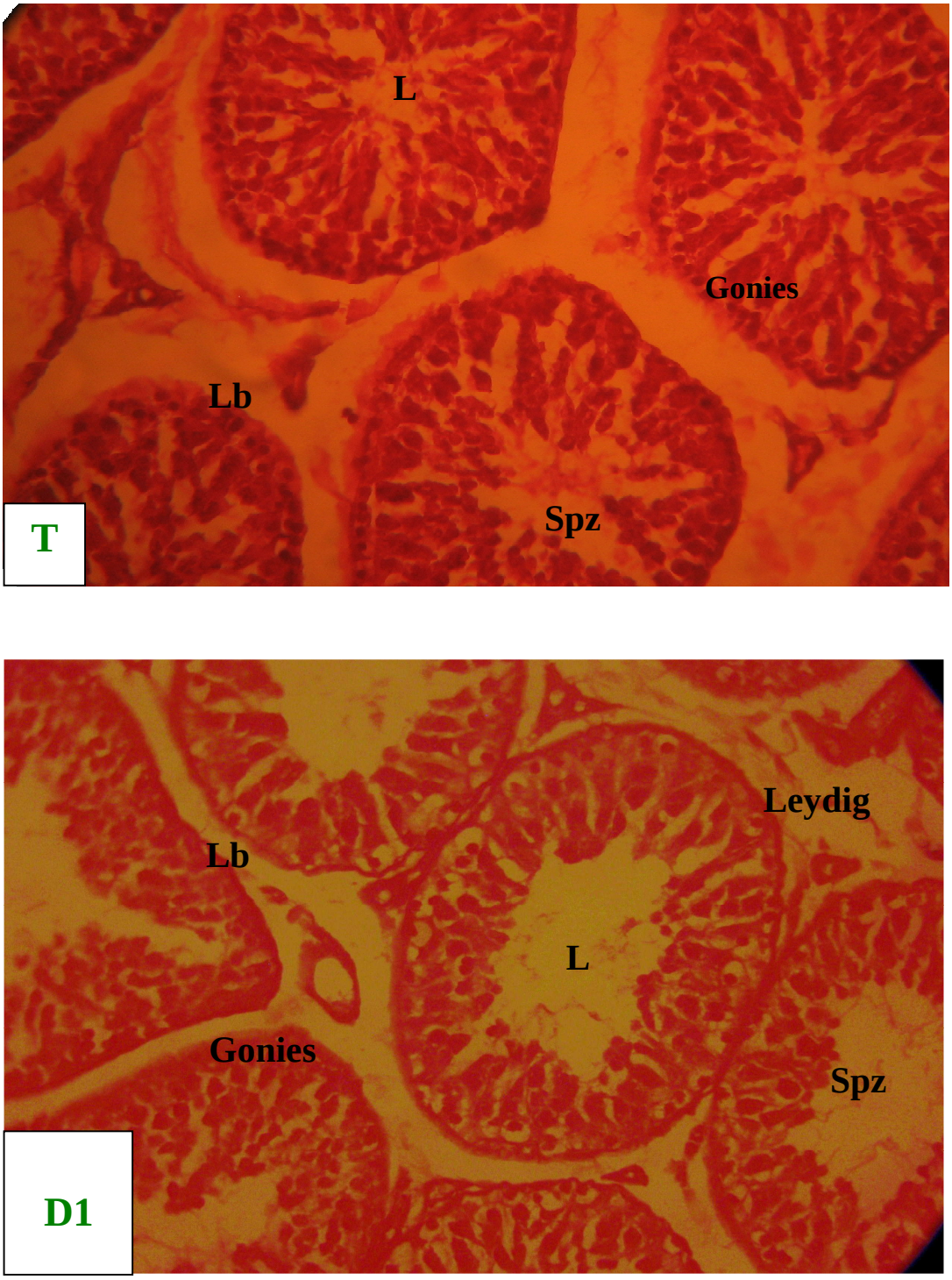


Figure 41 : Coupes histologiques du testicule (X40). (Témoins, D1) (mode inhalation).

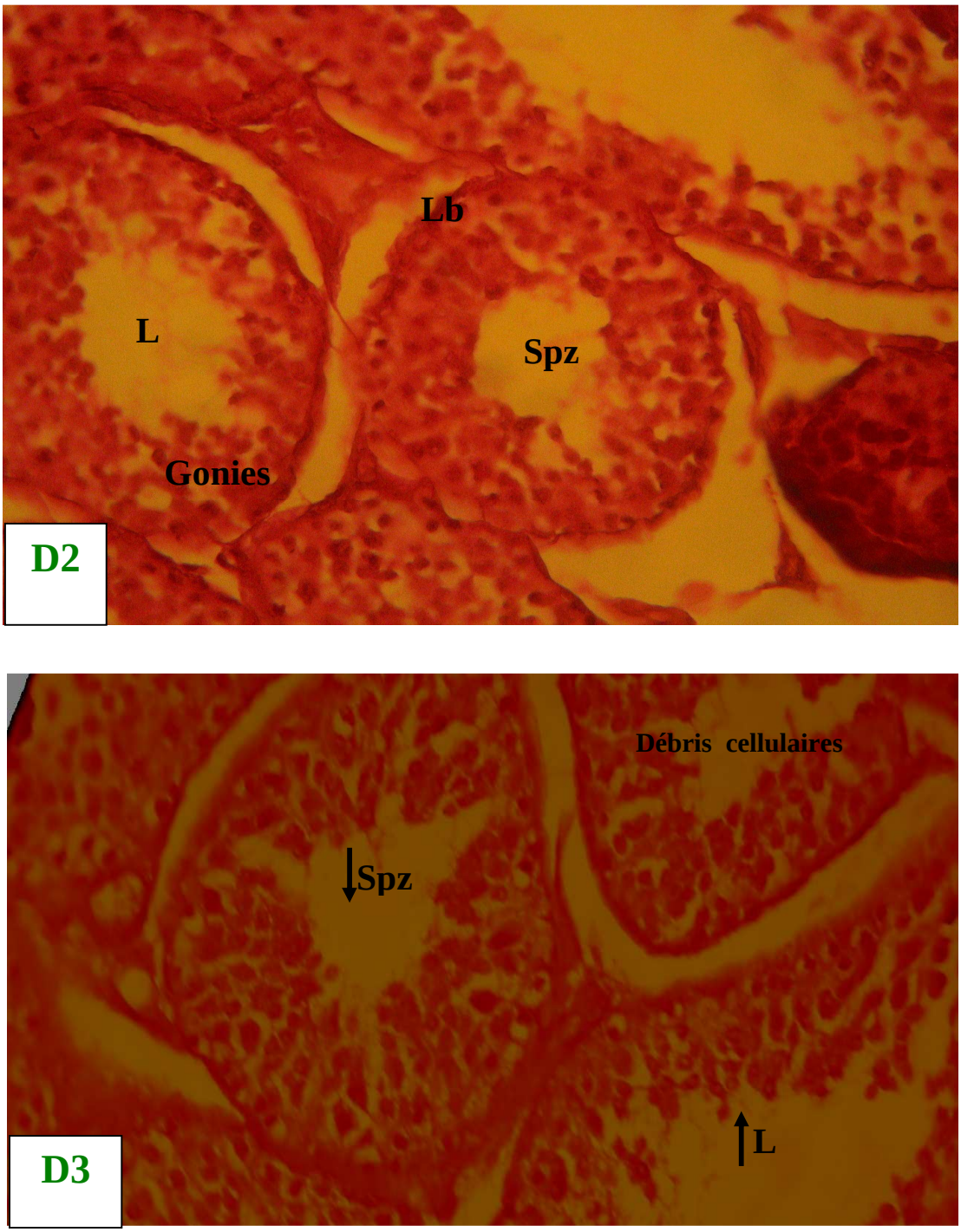


Figure 41 : Coupes histologiques du testicules (X40). (D2, D3) (mode inhalation).

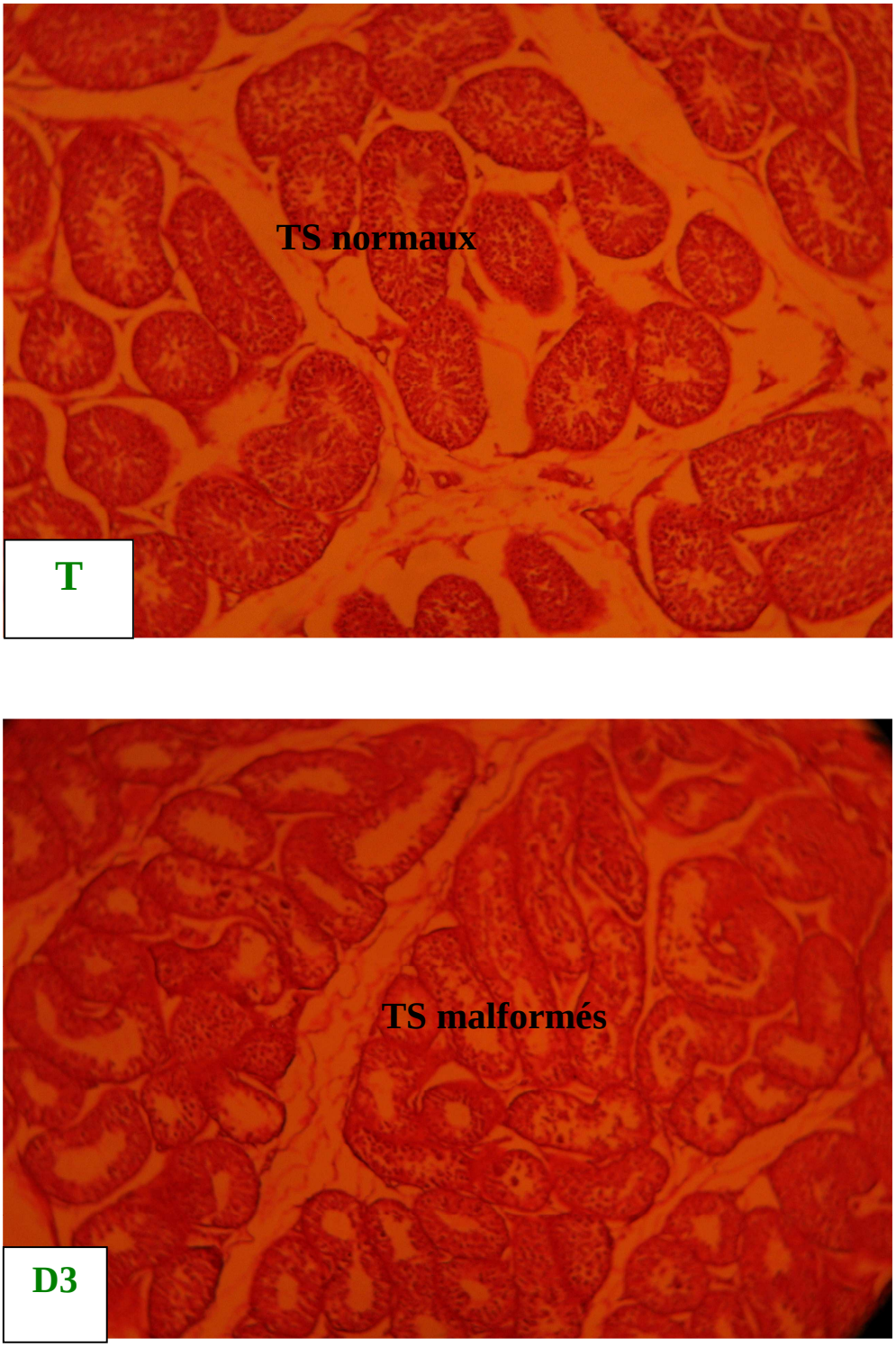


Figure 42 : Coupes histologiques du testicule (X10). (T, D3). (mode inhalation).

En conclusion, les modifications et les dégâts induits par l'éthylène glycol monométhyl éther sur la structure des testicules sont très remarquables, bien claires et plus importantes chez les individus traités qui reçoivent la dose selon le mode ingestion (voie digestive) que selon le mode inhalation (voie respiratoire). Mais dans les deux cas, les effets sont de manière dose-dépendante.

Chapitre IV: Discussion

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

L'effet du solvant est hautement spécifique sur la structure et le fonctionnement des testicules provoquant la diminution du poids testiculaire. Cette diminution est due à l'action du produit (ses métabolites) sur les tissus induisant des lésions cellulaires qui vont conduire à une atrophie testiculaire **(Lee & Kinney, 1989)**, soulignant que la toxicité testiculaire est de manière dose-dépendante quelle que soit la voie de pénétration dans l'organisme **(Sheiner *et al*., 2003)**.

Plusieurs études menées à l'échelle internationales ont confirmé l'effet reprotoxique des solvants, et ont démontré que les testicules sont des organes cible aux produits toxiques déversés dans l'environnement **(Samuels *et al*., 1984; Fort *et al*., 2001)**.

Dans le même contexte, l'exposition aux éthers de glycol peut provoquer des effets délétères sur la structure et le fonctionnement des tubes séminifères **(Holloway *et al*., 1990)**, ces effets sont spécifiques, ce sont les cellules de la lignée germinale (spermatocytes au stade pachytène) qui en sont la cible. L'atteinte de la lignée germinale bloquant la méiose peut conduire à un arrêt de la spermatogenèse **(Lee & Kinney, 1989; Creasy *et al*., 1985)**.

Pour les faibles doses ou des expositions de courte durée, les lésions sont réversibles. Pour des expositions prolongées ou à fortes doses, les lésions peuvent toucher les cellules souches (spermatogonies) et en plus les cellules Leydig, dans ce cas, l'arrêt de la spermatogenèse peut être définitif et le testicule s'atrophie **(Yoon *et al*., 2003; Vachhrajani, 2005)**.

L'atteinte de la lignée germinale par les éthers de glycol a plusieurs conséquences. En diminuant le niveau de production des spermatozoïdes, ces produits peuvent diminuer le potentiel de la fertilité pouvant aboutir à une stérilité, en atteignant les spermatocytes au stade pachytène qui est caractérisé par un intense processus d'échange des chromosomes homologues, la possibilité d'induire des mutations génétiques et de les transmettre à la descendance n'est pas exclue **(Ballantyne & Vergnes, 2001; El-zein *et al*., 2002)**.

D'un autre coté, l'éthylène glycol monométhyl éther est considéré comme un complexe spermatotoxique (atteinte des caractères biologiques des spermatozoïdes) **(Shih *et al*., 2000).** La diminution du nombre total (concentration) des spermatozoïdes chez les animaux traités est peut être due à une perturbation endocrinienne, il s'agit de l'effet des métabolites de l'éthylène glycol sur le fonctionnement de la cellule Leydig responsable de la production de la testostérone, ces molécules sont capables de se fixer sur les récepteurs à LH hypophysaire (Luteinizing hormone) au niveau de la cellule Leydig, ce qui induit un déséquilibre et/ou un blocage de la production de la testostérone **(Baccarelli *et al*., 2000)**.

Le déséquilibre enregistré dans les niveaux de la testostérone chez les animaux traités par le solvant peut être expliqué encore par la perturbation des taux du cholestérol, précurseur de la stéroidogénèse.

D'autres travaux ont démontré que ce solvant peut agir sur le taux du LH lui-même ainsi que sur la structure, la forme et les fonctions des cellules Sertoli **(Reader *et al*., 1991; Tirado *et al*., 2004)**.

D'autres études ont proposé l'hypothèse du phénomène d'apoptose (mort cellulaire) des cellules germinales spermatocytes ou spermatides pour expliquer la réduction du nombre total des spermatozoïdes **(Yan *et al*., 2000 ; Jindo *et al*., 2001)**, c'est pour cela que chez les groupes traités on peut remarquer la présence de quelques débris cellulaires au niveau de la lumière des tubes séminifères.

Les animaux exposés à la dose 150 ppm du solvant ont marqué une forte diminution dans le taux de la mobilité des spermatozoïdes, même résultat enregistré chez des travailleurs d'une usine de peinture de bâtiments **(Cherry *et al*., 2001)**, cette diminution est due à l'effet du produit (ses métabolites) sur la structure et la fonction du flagelle et la pièce intermédiaire induisant des malformations qui rendent le flagelle plus fragile et incapable

de faire pousser le spermatozoïde, cet effet peut être expliqué aussi par l'action de peroxydation des lipides membranaires induite par le produit toxique **(Jansen *et al.*, 2004 ; Kido & Namiki, 2000)**, le solvant peut agir également sur le nombre des mitochondries responsables de la production de l'énergie nécessaire au mouvement des spermatozoïdes, l'atteinte des spermatides (noyau allongé) entraîne une réduction dans la mobilité des spermatozoïdes en agissant sur la phase de spermiogenèse (transformation des spermatides en spermatozoïdes matures), et en altérant aussi les cellules Sertoli: cellules nourricières des cellules spermatiques **(Barone *et al.*, 2004)**.

Concernant les malformations enregistrées au niveau de la tête, elles peuvent être expliquées par la cytotoxicité du solvant au moment de la spermiogenèse durant lequel se forme la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle, il peut induire un déséquilibre lors de l'accumulation des fibres de Tubulin et Dynein **(Baccetti *et al.*, 2002)**.

La concentration des spermatozoïdes et la détermination de la morphologie sont unanimement considérés comme les meilleurs indicateurs de fertilité, ainsi que le taux de la mobilité.

L'étude du métabolisme des éthers de glycol a montré que, pour certains d'entre eux, la voie préférentielle de métabolisme transforme la fonction alcool des substances mères (alkoxyalcool) en fonction aldéhyde (alkoxyaldéhyde) puis en acide (alkoxyacide) via l'intervention d'une alcool déshydrogénase et d'une aldéhyde déshydrogénase. Le prétraitement d'animaux exposés (rats) à l'EGME par un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase prévient les effets testiculaires **(Pusch *et al.*, 2000)**.

La première lésion visible au niveau des spermatocytes pachytènes se situe au niveau des mitochondries, c'est le mode d'action des alkoxyacides et des alkoxyaldéhydes qui est à expliquer et à chercher **(Ku & Chapin, 1994)**.

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.

Le MAA (méthoxyacétique, principal métabolite de l'EGME), mais pas l'EGME, induit une déplétion des spermatocytes pachytènes, le MALD (alkoxyaldéhyde provenant de la métabolisation de l'EGME) génère les mêmes effets mais semble plus efficace que le MAA, ces substances pourraient, en réduisant la production de lactate des cellules de Sertoli, diminuer les apports énergétiques de la lignée germinale. Cependant, la diminution de la production de lactate de la cellule de Sertoli est une manifestation habituelle de l'action de nombreux toxiques testiculaires et donc non spécifique. Pour d'autres, les alkoxyacides pourraient intervenir sur la synthèse d'ADN et d'ARN de la lignée germinale. Les alkoxyacides (en particulier le MAA) inhibent la synthèse d'ADN de cellules en culture d'embryons de souris, cette inhibition est atténuée par l'adjonction de molécules simples comme la sarcosine, le glucose ou la glycine. Ces composés physiologiques préviennent in vivo la toxicité de l'EGME. Une explication serait que le MAA entrerait en compétition avec le transfert des résidus mono-carbonés (méthyl, formyl), provenant de ces molécules simples, vers les bases puriques et pyrimidiques. Il en résulterait un déficit de bases pouvant conduire à un blocage des divisions cellulaires. Dans le cas des spermatocytes pachytènes la synthèse d'ARN serait affectée **(Jegou, 1995 ; Hays *et al*., 2000).**

L'étude de la génotoxicité des éthers de glycol relève d'une préoccupation récente d'effets d'atrophie testiculaire chez la souris. La question posée était celle de la cancérogénicité potentielle de ces substances. En l'absence de résultats d'études épidémiologiques et d'expérimentations à long terme chez l'animal, il convenait en première approche d'évaluer les potentialités mutagènes et génotoxiques de ces substances à l'aide des modèles cellulaires validés à cet effet (**Gollapudi *et al*., 1993).**

Les études ont porté essentiellement sur les premiers représentants de la série des éthers de l'éthylène glycol, comme l'EGME, l'EGEE et l'EGBE. Ce choix était justifié par la toxicité expérimentale de ces substances et par leur utilisation alors très importante en tant que solvants. En l'absence d'effets mutagènes des éthers de l'éthylène glycol sur les modèles in vitro classiques, les recherches se sont orientées vers l'étude de leurs métabolites, la formation de métabolites plus actifs que la molécule mère.

La gamme des essais mis en oeuvre et des critères étudiés s'est simultanément élargie et ouverte à des approches moins conventionnelles, intégrant l'utilisation de cellules testiculaires par exemple, ou l'étude des interactions avec d'autres substances chimiques. Il apparaît actuellement que les éthers de l'éthylène glycol ne sont pas intrinsèquement mutagènes ou clastogènes. Ils induisent cependant des effets d'aneuploïdie, la formation de micronoyaux et les échanges entre chromatides soeurs, et interfèrent avec les systèmes d'agrégation de la tubuline. Ces effets témoignent d'un caractère génotoxique susceptible de rendre compte de leur toxicité sur la reproduction.

Nos résultats ont également mis en évidence une perturbation des produits du métabolisme physiologique, nous avons remarqué l'augmentation du taux des triglycérides et des protéines plasmatiques, ainsi qu'une diminution du taux de glucose et du cholestérol chez les individus traités au EGME. L'ensemble de ces perturbations sont dues à l'altération des fonctions du foie par les métabolites de l'EGME (à fonction aldéhyde) qui peuvent inhiber la phosphorylation oxydative, le métabolisme du glucose (glycolyse et cycle de Krebs, principaux producteurs d'ATP), la synthèse des protéines, la réplication du DNA et le RNA ribosomal **(Marie, 2002)**.

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

Les effets hépatiques rapportés avec l'EGME ont été observés pour des doses supérieures à celles susceptibles d'induire des atteintes hématologiques ou testiculaires **(Yao *et al.*, 1997).**

Heinonen & Vainio (1981) ont exposé des rats Wistar 6 heures par jour et 5 jours par semaine, pendant 2 semaines, à 50, 100 et 400 ppm d'EGME; ils ont observé une diminution dose dépendante de la concentration en glutathion réduit des hépatocytes et de l'activité de l'UDPglucuronyltransférase hépatique avec une diminution parallèle de l'activité de la NADPH-cytochrome c réductase.

Dans une série d'expériences chez des rats *Wistar* recevant 100 et 300 mg/kg/j d'EGME, per os, pendant 20 jours, une augmentation de 1'activité de la gamma-glutamyltranspeptidase hépatique, dès 100 mg/kg/j **(Kawamoto *et al*., 1991; 1992)**; une augmentation de 1'activité de 1'alcool-déshydrogénase cytosolique était également observée à 300 mg/kg; il n'y avait pas d'effet notable sur le cytochrome P450 et la NADPH-cytochrome c réductase **(Kawamoto *et al*., 1990a & b)**.

Moslen *et al*. **(1995)** ont exposé des rats et des lapins à 30, 100 et 300 ppm d'EGME, 6 heures par jour et 5 jours par semaine, pendant 13 semaines; ils ont observé une augmentation du poids du foie des animaux exposés à 300 ppm; cette anomalie est lice à la diminution globale du poids des rats et des lapins observée dès 100 ppm.

Concernant l'évaluation de la toxicité hématologique, nous avons observé une diminution dans le taux d'hémoglobine, des globules rouges, des lymphocytes et des globules blancs. Cette toxicité a été largement étudiée sur des modèles animaux: une hémolyse **(Breslin *et al*., 1991)**, une délétion lymphocytaire responsable d'immunosuppression **(Kayama *et al*., 1991)** et une toxicité sur les progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse **(Ghanayem, 1996)**.

L'effet hémolytique des dérivés de l'éthylène glycol dépend de la dose du produit, de l'espèce animale, et au sein d'une même espèce, de l'age des animaux. Ce ne sont pas les substances mères qui sont responsables de l'hémolyse, mais les acides alkoxyacétiques (AAA) **(Corley *et al*., 2005).**

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

Le mécanisme de la toxicité de la moelle osseuse des éthers de glycol a été très peu étudié, quelques travaux ont montré que les éthers de glycol peuvent inhiber la synthèse de l'ADN et/ou entraîner des anomalies du fuseau mitotique au niveau des précurseurs médullaires.

Les effets immunosuppresseurs sont essentiellement liés à une déplétion lymphocytaire et de façon moins importante à une altération fonctionnelle des lymphocytes **(Boiron *et al*., 1994).**

D'une manière générale, les globules rouges humains semblent être moins sensibles. Pour d'autres éthers de glycol de la même série, une atteinte des cellules de la moelle osseuse accompagnée d'une diminution du nombre des globules blancs a été observée.
De plus, certains de ces éthers de glycol provoquent une déplétion lymphocytaire, une chute du taux d'hémoglobine avec une baisse de la numération sanguine pour l'EGBE **(Etiemble, 2003).**
La toxicité des éthers de glycol est nettement moins bien documentée chez l'homme que chez l'animal, à l'exception très probable de cas d'hypoplasie médullaire touchant principalement la lignée neutrophile. Elle comporte encore d'importances inconnues. L'hémolyse semble très rare, sauf peut-être en cas d'intoxication massive. En ce qui concerne la toxicité sur la moelle osseuse, les éthers de glycol semblent pouvoir être responsables de neutropénie et plus rarement d'aplasie. En revanche, leur responsabilité éventuelle dans l'induction d'hémopathies malignes ne paraît pas documentée.

Les données publiées ne modifient pas fondamentalement notre connaissance de ces effets et elles apportent quelques informations complémentaires utiles. Ces données confirment le caractère hémolysant de l'EGBE chez le rat et précisent l'histoire naturelle des accidents hémolytiques : ils sont précédés par une diminution de la plasticité des hématies, leur déformation (sphérocytose, stomatocytose) et une augmentation du volume globulaire **(Breslin *et al*., 1991)**.
Quand l'hémolyse est importante, elle se complique d'une coagulation intravasculaire responsable de thromboses et d'infarctus disséminés, de précipitation d'hémoglobine dans les tubules rénaux entraînant une nécrose tubulaire et de l'apparition de foyers d'hématopoïèse extra-médullaires **(Pitten, 2000)**.
L'hémolyse induite par l'EGBE chez le rat n'a, en fait, aucun caractère spécifique et des phénomènes exactement semblables sont observés au cours de toutes les maladies hémolysantes, dont elle constitue un bon modèle animal. L'utilisation de ce modèle a déjà

permis une meilleure compréhension des effets procoagulants des accidents hémolytiques. Par ailleurs, les publications récentes confirment que c'est le principal métabolite de l'EGBE, l'acide butoxyacétique (BAA), qui est responsable de l'hémolyse. Les hématies humaines sont très résistantes aux effets hémolysants du BAA. Chez le rat, les femelles sont plus sensibles que les mâles aux effets de l'EGBE, mais cette particularité ne traduit pas une plus grande fragilité de leurs hématies : elle résulte de différences toxicocinétiques entre les deux sexes. Le mécanisme des effets de l'EGBE sur les hématies n'est pas encore parfaitement élucidé **(Ghanayem *et al*., 2000)**.

Des données récemment publiées confirment aussi la capacité de l'EGiPE, de l'EGPhE et du DEGBE d'induire une hémolyse. Le pouvoir hémolysant de ces trois substances est toutefois moins marqué que celui de l'EGBE, et celui de l'EGiPE est beaucoup plus important que celui de l'EGPhE ou du DEGBE. Une étude *in vitro* a montré que l'hémolyse induite par ce dernier était probablement due à son principal métabolite, l'acide butoxyéthoxyacétique (BEAA). Les hématies humaines sont très peu sensibles à l'effet hémolysant du BEAA **(Siesky *et al*., 2002)**.

D'autres études épidémiologiques ont confirmé l'effet hypoplasiant médullaire de l'EGME, l'EGEE et l'EGEEA, en montrant un excès de risque de cytopénies périphériques corrélé à l'exposition chez les travailleurs de divers secteurs d'activité. Une étude expérimentale établit l'hématotoxicité du TEGDME chez le rat : chez cette espèce, l'administration répétée de fortes doses de l'éther de glycol a induit des diminutions des comptes des plaquettes et des leucocytes, ainsi qu'une atteinte thymique **(INRS, 2001)**.

Une autre étude conduite chez le rat confirme l'effet hypoplasiant du DEGDME au niveau de la moelle osseuse et établit sa toxicité pour les organes lymphoïdes **(Exan *et al*., 1991)**.

Deux études expérimentales ont confirmé que la toxicité de l'EGME pour la moelle osseuse et pour les organes lymphoïdes était médiée par ses deux principaux métabolites, l'acide méthoxyacétique (MAA) et surtout, le méthoxyacétaldéhyde (MALD) ; elles ont apporté des arguments en faveur d'un mécanisme apoptotique de l'atteinte des cellules souches **(INSERM, 2005)**.

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

Le glutathion est un tripeptide (L-gamma-glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui joue un rôle essentiel à divers niveaux dans la lutte contre les substances chimiques toxiques.

La synthèse du glutathion est liée aux enzymes γ glutamylcystéine synthétase (γ GSH) et glutathion synthètase (GS). Pratiquement toutes les cellules en contiennent une concentration élevée, il est représenté de manière simplifiée par GSH (forme réduite) ou GSSG (forme oxydée), la fonction thiol lui conférant ses principales propriétés biochimiques **(Renes *et al*., 1999)**.

Le glutathion fait l'objet de nombreuses recherches qui toutes démontrent son rôle fondamental dans les mécanismes anti-oxydants, dans le fonctionnement du système immunitaire et dans les processus de détoxication. Certains chercheurs considèrent le glutathion comme élément clé de la santé et de la longévité cellulaire. La présence de cystéine dans le glutathion, donc d'un groupement thiol porteur d'un atome de soufre, et le fait que cet élément se lie avec une grande avidité aux atomes des substances toxiques y compris les éthers de glycol, cela nous amènent à penser que ces toxiques peuvent être directement impliqués dans la baisse des taux de glutathion.

Chaque cellule du corps possède son propre réseau de défense silencieux contre la maladie, les dommages causés par l'environnement et le vieillissement. Une partie de ce réseau combat les fragments chimiques dangereux et des destructeurs appelés radicaux libres ou oxyradicaux, Le foie et les reins sont les deux principaux organes de détoxication et d'élimination et possèdent les plus hauts niveaux de GSH intracellulaire dans le corps.

Le GSH est le thiol (acide aminé contenant du soufre) le plus important dans les organismes vivants, il joue un rôle critique non seulement chez les humains et les mammifères, mais chez tous les vertébrés, insectes, plantes et micro-organismes **(Valencia & Hardy, 2002)**.

D'après les résultats obtenus, le traitement des lapins selon les deux voies avec les doses 50, 100 et 150 ppm pendant quatre semaines a provoqué une diminution de la teneur hépatique et testiculaire en glutathion. Sachant que le foie est considéré comme le centre de détoxication du corps, donc à l'état normal, les cellules hépatiques produisent des taux élevés de glutathion GSH, ces taux ont diminué lors de l'exposition à l'EGME surtout à l'administration orale de la dose 150 ppm, ce qui prouve que la quantité de GSH a été consommée dans le processus de détoxication. Egalement le GSH a marqué une diminution au niveau des testicules, à noter que les testicules sont des organes cibles aux différents agents toxiques, dans ce cas, cet organe a besoin de se défendre contre ces agressions en impliquant le GSH dans la détoxication. La diminution des taux de GSH hépatique et testiculaire est le facteur qui explique tout les dégâts et les effets provoqués par ce produit toxique.

En effet, la conjugaison du GSH et de substances toxiques (tels que l'éthylène glycol monométhyl éther) par la glutathion S-transférase (GST) réduirait leurs effets toxiques et faciliterait leur excrétion par les urines, ce sont les aldéhydes qui réagissent avec les fonctions SH (**Van Bladeren, 2000; Rao & Shaha, 2002).**

Les plus grandes quantités de glutathion sont synthétisées au niveau du foie où il contribuera à l'élimination des toxines, mécanisme préventif contre la survenue des agressions des produits toxiques. En tant qu'antioxydant, le glutathion neutralise l'activité des molécules de radicaux libres. Comme il manque un électron aux molécules de radicaux libres, l'agression causée aux cellules naît de leur « vol » d'électrons à d'autres molécules susceptible de nuire à la fonction moléculaire des cellules touchées. Le glutathion arrive à couper court au phénomène en faisant don d'un électron aux molécules de radicaux libres à un seul électron. Par un processus similaire, le glutathion neutralise également les molécules peroxydées et autres espèces réactives de l'oxygène

(Wu *et al*., 2004). De par ses propriétés détoxicantes, il se lie aux éthers de glycol afin qu'ils puissent être évacués des cellules pour se retrouver dans l'urine. Le glutathion possède de puissantes propriétés dépuratives pour permettre l'évacuation des xénobiotiques (pesticides, solvants etc). Ces toxines sont transformées dans l'organisme au cours du phénomène de détoxication appelée conjugaison au glutathion **(Townsend *et al*., 2003)**.

Concernant l'exposition des animaux à l'EGME selon le mode inhalation, nous avons remarqué des perturbations non significatives comparées aux résultats de l'exposition selon le mode ingestion, ce qui nous conduit à dire que la voie orale est plus dangereuse que la voie respiratoire.

Ces résultats peuvent être expliqués en fonction des propriétés volatils des éthers de glycol, la pénétration des éthers de glycol dans l'organisme se fait principalement lors d'un contact direct, à travers la peau, leur faible volatilité limite la contamination par voie respiratoire sauf dans des situations où les produits sont chauffés ou utilisés sous forme d'aérosols **(Dill *et al*., 2004)**. Du fait de leur caractère amphiphile, les éthers de glycol traversent facilement les membranes et se répartissent dans les compartiments aqueux et lipidiques. 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 (**Dévanthéry *et al*., 2002)**. Cependant, les données 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 transformés en métabolites réactifs, responsables de l'ensemble des manifestations toxiques **(Domradzki *et al*., 2003)**.

L'absorption des éthers de glycol par voie cutanée est très importante pour la plupart d'entre eux. Cette pénétration cutanée varie 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 **(Traynor *et al*., 2007)**.

L'absorption respiratoire des éthers de glycol est proportionnelle aux concentrations atmosphériques. Expérimentalement, chez des volontaires, l'absorption de vapeurs de divers éthers de l'éthylène glycol a été évaluée à 50-80 % de la quantité inhalée, selon les dérivés **(Jones *et al*., 2003)**. À l'exception des polyéthers de glycol ayant un nombre de résidus éthers 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. Le risque de l'inhalation est élevé lors de l'utilisation à température ambiante avec dispersion favorisée par l'utilisation d'aérosols, d'agitation qui provoque l'évaporation sélective, ou à température élevée (techniques de séchage à air chaud) **(Lockley *et al*., 2002 ; Gargas *et al*., 2000)**.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus ont montré que l'administration de l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) aux lapins par voie digestive ou par voie respiratoire a provoqué des perturbations de nombreuses fonctions de l'organisme, à noter que ces perturbations sont plus significatives selon le mode ingestion que par inhalation:

- Une altération des paramètres de la fertilité masculine (spermatotoxicité, atrophie testiculaire et atteinte hormonale).
- Une hématotoxicité traduite par une diminution dans le taux d'hémoglobine, lymphocytes, le nombre des globules blancs et des globules rouges.
- Une perturbation dans le taux des produits du métabolisme (hépatotoxicité).
- Une diminution du potentiel détoxifiant (taux de GSH).

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

- Etude de l'effet du produit sur les facteurs hypothalamo-hypophysaires impliqués dans le déroulement de la spermatogenèse.
- Se concentrer sur les études de toxicocinétique et de métabolisme des éthers de glycol, en particulier pour les acides alkoxyacétiques.
- Compléter l'étude des effets génotoxiques des éthers de glycols de la série éthylénique et propylénique, en particulier des effets d'aneuploïdie, d'induction d'échanges de chromatides-soeurs et d'inhibition des communications intercellulaires.
- S'intéresser à la caractérisation de la toxicité du produit chez l'homme à travers la réalisation des enquêtes épidémiologiques dans les milieux professionnels.
- Appliquer et essayer de diffuser les résultats des travaux d'identification des effets toxiques des éthers de glycol et d'évaluation de l'exposition des populations à ces substances chimiques.
- Les connaissances sur les effets et la nature de ces produits toxiques sont encore incomplètes. La plupart des études publiées concernent l'expérimentation animale et /ou humaine sont peu nombreuses, les données connues imposent l'application

de mesures de protection appropriées ainsi que la présence des pouvoirs publics. Les voies de recherche dans ce domaine sont très étendues, il apparaît important qu'elles impliquent des équipes multidisciplinaires pouvant regrouper les aspects très variés de cette approche.

- Pour limiter les effets toxiques des produits actuels, il faut réduire l'usage des substances chimiques et contrôler leur utilisation. Les autorités proposent des législations. Cependant, la prise de conscience est longue. Aujourd'hui, le meilleur moyen de se protéger de ces produits est de les substituer et de changer ses habitudes, mais pour cela, il faudrait informer le public des dangers qu'ils peuvent encourir et des dangers que les produits toxiques peuvent produire sur l'environnement. Cependant, il faudrait aussi réduire le coût des produits sains et produire des produits non toxiques.

Références bibliographiques

- **Aasmoe L, Mathiesen M & Sager G (1999).** Elimination of methoxyacetic acid in rat. *Xenobiotica*. **29:** 417-424.

- **ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2007).** Threshold Limit Values for Chemicals Substances and Physical Agents. *Cincinnati OIH*.

- **Baccarelli A, Pesatori AC & Bertazzi PA (2000).** Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: experimental and human evidence. *Journal of Endocrinological Investigation*. **23 (2):** 771-781.

- **Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E & Piomboni P (2002).** Recent advances in human sperm pathology. *Rev. Art*. **65:** 183-287.

- **Ballantyne B & Vergnes JS (2001).** *In vitro* and *in vivo* genetic toxicology studies with diethylene glycol monohexyl ether. *J. Appl. Toxicol*. **21:** 449-460.

- **Barone F, Aguanno S, D'alessio A & D'agostino A (2004).** Sertoli cell modulates MAA-induced apoptosis of germ cells throughout voltage-operated calcium channels. *FASEB.* **18:** 353-354.

- **Ben-Brick E, Jérôme L, Arnaud I, Yous S, Labat L, Haguenoer JM & Multigner L (2004).** Exposure to glycol ethers in a population of French men evaluated by measurement of urinary alkoxycarboxylic acids. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. **77 (5):** 368-372.

- **Bendridi N, LeJeune H & Pugeat M (2001).** Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolimes. Hormones. Nutrition*. **6:** 281-285.

- **Berger JR & Ayyar DR (1999).** Neurological complications of ethylene glycol intoxication « Report of a case ». *Archives of neurology*. **38 (11):** 724–726.

- **Boiron O, Ruchaud S & Lanotte M (1994).** Teheux concerning the hematotoxic effects of glycol esters. *Lentemia*. **8:** 1252.

- **Boust C (2004).** Les hydrocarbures aromatiques, Fiche solvant. *Ed. 4226*. 6.

- **Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for cellular production of microgram quantities of proteins utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem*. **72:** 248-254.

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

- **Brasseur G (2001).** Ethers de glycol : bien choisir ses gants de protection. *Travail et sécurité*. **607:** 14-16.

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

- **Brooke I, Cocker J & Delic JI (1998).** Dermal uptake of solvents from the vapour phase: an experimental study in humans. *Ann. Occup. Hyg*. **42:** 531-540.

- **Bujan L (1998).** Environnement et spermatogenèse. *Contracept. Fertil. Sex*. **26 (1):** 39-48.

- **Carney EW, Pottenger LH, Johnson KA, Liberacki AB & Tornesi B (2003).** Significance of 2-MPA formed from 2PG1ME : integration of pharmacokinetic and developmental toxicity assessments in rabbits. *Toxicol. Sci*. **71:** 217-228.

- **Carpenter DO, Arcaro KF & Bush B (1998).** Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ. Health. Perspect*. **106:** 1263-1270.

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

- **Charreton M, Falcy M & Triolet J (2005).** Peintures en phase aqueuse (ou peintures à l'eau). Composition, risques toxicologiques, mesures de prévention. *Ed. 955*. 16.

- **Cheever KL, Richards DE, Weigel WW, Lal JB, Dinsmore AM & Daniel FB (1988).** Metabolism of bis(2-methoxyethyl) ether in the adult male rat: evaluation of the principal metabolite as a testicular toxicant. *Toxicol. Appl. Metabolism*. **94:**150-159.

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

- **Cicolella A (2006).** Effets des éthers de glycol sur la reproduction. *Gynécologie. Obstétrique. Fertilité*. **34 (10):** 955-963.

- **Cordier S, Szabova E, Fevotte J, Bergeret A, Plackova S & Mandereau L (2001).** Congenital malformation and maternal exposure to glycol ethers in the Slovak Republic. *Epidemiology*. **12 (5):** 592-593.

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

- **Corley RA, Grant DM, Farris E, Weitz KK & Soelberg JJ (2005).** Determination of age and gender differences in biochemical processes affecting the disposition of 2-butoxyethanol and its metabolites in mice and rats to improve PBPK modeling. *Toxicol. Letters*. **156:** 127-161.

- **Costes B & Henry Y (1998).** Guide de choix et d'utilisation des solvants et dégraissants industriels. *Centre technique des industries mécaniques (Cetim).* 333.

- **Creasy DM, Flynn JC, Gray TG & Butler WH (1985).** A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp. Mol. Pathol*. **43 (3):** 321-336.

- **Davis BJ, Alme Kinder JC, Flagler N, Travlos G, Wlsol R & Maromlpot RR (1997).** Ovarien lutel cell toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and methoxyacetic acid in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **142:** 328-337.

- **Desinger PJ & Boatman RJ (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.

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

- **Dill JA, Fuciarelli AF, Lee KM, Mellinger KM, Burka LT & Roycroft JH (2004).** Toxicokinetics of propylene glycol mono-t-butyl ether following intravenous of inhalation exposure in rats and mice. *Inhal. Toxicol*. **16:** 271-290.

- **Domradzki JY, Brzak KA & Thornton CM (2003).** Hydrolysis kinetics of propylene glycol monomethyl ether acetate in rats in vivo and in rat and human tissues in vitro. *Toxicol. Sci*. **75:** 31-39.

- **ECETOC: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1994).** The toxicology of glycol ethers and its relevance to man. *Technical report No 64.*

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

- **Edwards RD, Jurvelin J & Koistinen K (2001).** Source identification from personnal and residential concentrations indoor, outdoor and workplace microenvironements samples in Expolis-Helsinki, Finland. *Atmospheric Environement*. **35:** 4829-4841.

- **Elias Z (1996).** Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers: results of different short-term tests. *Occup. Hyg.* **2:** 187-212.

- **El-zein RA, Abdel-rahman SZ, Morris DL & Legator MS (2002).** Exposure to ethylene glycol monomethyl ether: clinical and cytogenetic findings. *Arch. Environ. Health*. **57:** 371-376.

- **Etiemble J (2003).** Les ethers de glycol: une toxicité variable selon les composés. *Actu. Chim*. **1:** 145-149.

- **Exan JH, Mather GG, Bussiere JL, Olsan DP & Talcote PA (1991).** Effects of subchronic exposure of rats to 2-méthoxy ethanol or 2-butoxy ethanol: thymic atrophy and immunotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol*. **16:** 830-840.

- **Fastier A, Herve-Bazin B & McGregor D (2005).** Activities on risk assessment of glycol ethers. *Toxicol. Letters*. **56:** 59-76.

- **Figa-Talamanka I, Traina ME & Urbani E (2001).** Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occupational. Medecine*. **51 (3):** 174-188.

- **FIPEC : Fédération des Industries des Peintures, Encres, Couleurs, colles et adhésifs (2004).** Charte relative aux éthers de glycol toxiques pour la reproduction de catégorie 2.

- **Forsberg K & Mansdorf SZ (2007).** Quick Selection Guide to chemical protective clothing. *Ed. John Wiley & Sons Inc.*

- **Fort DJ, Stover EL, Bantle JA, Dumont JN & Finch RA (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.

- **Gargas ML, Tyler TR, Sweeney LM, Corley RA, Weitz KK & Mast TJ (2000).** A toxicokinetic study of inhaled ethylene glycol ethyl ether acetate and validation of a physiologically based pharmacokinetic model for rat and human. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **165:** 63-73.

- **Garlantezec R, Monfort C, Labat L, Multigner L & Cordier S (2006).** Exposure to Glycol ethers During Pregnancy in the General Population: A Biomonitoring pilot study. *Epidemiology*. **17:** 296.

- **Gauthier F (2002).** Manipulation des solvants. Une machine étanche pour sécuriser le nettoyage. *Travail & sécurité.* **615:** 38-40.

- **Gerin M (2002).** Solvants industriels, Santé, sécurité, substitution, Collection Médecine du travail. *Ed. Masson.* 257.

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

- **Ghanayem BI, Ward SM, Chanas B & Nyska A (2000).** Comparison of the acute hematotoxicity of 2-butoxyethanol in male and female F344 rats. *Human and Experimental Toxicology*. **19:** 185–192.

- **Gijsbers JH, Tielemans E, Brouwer DH & Van Hemmen JJ (2004).** Dermal exposure during filling, loading and brushing with products containing 2-(2-butoxyethoxy) ethanol. *Ann. Occup. Hyg.* **48:** 219-227.

- **Gollapudi B, Linscombe VA, McClintock ML, Sinha AK & Stack CR (1993).** Toxicology of diethylene glycol butyl ether: 3. Genotoxicity evaluation in an in vitro gene mutation assay and an in vivo cytogenetic Test. *J. Am. Coll. Toxicol*. **12:** 155-160.

- **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 (8):** 544-549.

- **Hardin BD, Goad PT & Burg JR (1984).** Developmental toxicity of four glycol ethers applied cutaneously to rats. *Environ. Health. Perspect.* **57:** 69-74.

- **Hassan M & Killick S (2004).** Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertility and sterility*. **81 (2):** 384-392.

- **Hays SM, Elswick BA, Blumenthal GM, Welsch F, Conolly RB & Gargas ML (2000).** Development of a physiologically based pharmacokinetic model of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid disposition in pregnant rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **163:** 67-74.

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

- **Herbold B, Haas P, Seel K & Walber U (1998).** Studies on the effect of the solvents dimethylsulfoxide and ethyleneglycoldimethylether on the mutagenicity of four types of diisocyanates in the *Salmonella*/microsome test. *Mutat. Res.* **412:** 167-175.

- **Hoberman AM, Krasavage WJ, Christian MS & Stack CR (2000).** Developmental toxicity studies of triethylene glycol monomethyl ether administred orally to rats and rabbits. *Journal of the American College of Toxicology*. **15:** 349-370.

- **Holloway AJ, Moore HD & Foster PM (1990).** The use of rat in vitro fertilization to detect reductions in the fertility of spermatozoa from males exposed to ethylene glycol monomethyl ether. *Reprod. Toxicol*. **4 (1):** 21-27.

- **Horimoto M, Isobe Y, Isogai Y & Tachibana M (2000).** Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monomethyl ether, sulfasalazine, and 2,5 hexandione. *Reprod. Toxicol*. **14 (1):** 55-63.

- **Hours M, Fevotte J, Ayzac L, Dananche B & Bergeret A (1995).** Occupational exposure and malignant hemopathies: a case-control study in Lyon (France). *Rev. Epidemiol. Santé. Publique*. **43:** 231-241.

- **Humbert L, Labat L, David X, Dehon B & Lhermitte M (2003).** Dosage des métabolites urinaires des éthers de glycols en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *Annales de Toxicologie Analytique.* **3:** 167-168.

- **INRS: Institut National de Recherche et de Sécurité (1999).** Fiche toxicologique n°103 : 2-Méthoxyéthanol.

- **INRS: Institut National de Recherche et de Sécurité (2001).** Expertise INSERM sur les éthers de glycol.

- **INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité (2004).** Les éthers de glycol. *Fic. Sol. Ed. 4222*. 1-6.

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

- **INRS: Institut National de Recherche et de Sécurité (2006).** Ethers de glycol.

- **INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (1999).** Ethers de glycol: quels risques pour la santé ?

- **INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (2005).** Expertise collective, Ethers de glycol : Nouvelles données toxicologiques.

- **INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (2006).** Expertise collective. Ethers de glycol: nouvelles données toxicologiques.

- **IPCS: International Program on Chemical Safety (2004).** 2-méthoxyéthanol. *Concise International Chemical Assessment Document (CICAD)*.

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

- **Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, Lobenhoffer EK, Afshari CA & McDonnell DP (2004).** Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone diacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **101:** 7199-7204.

- **Jegou B (1995).** Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol*. **377:** 67–86.

- **Jindo T, Wine RN, Li LH & Chapin RE (2001).** Protein kinase is central to rat germ cell apoptosis induced by methoxyacetic acid. *Toxicol. Pathol*. **29:** 607-616.

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

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

- **Jones K, Cocker J, Dodd LJ & Fraser I (2003).** Factors affecting the extent of dermal absorption of solvent vapours: a human volunteer study. *Ann. Occup. Hyg*. **47:** 145-150.

- **Kaplowitz NT & Awy-Okhtens M (1985).** The regulation of the hepatic glutathione. *Ann. Rev. Phar. Toxicol*. **25:** 715-744.

- **Karaman C (2002).** Maternal exposure to diethylene glycolmonomethyl ether: a possible role in the etiologie of retrocaval ureter. *Pediatric. Surgey.* **37 (8):** 23.

- **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Hirai M & Arashidani K (l990a).** Effect of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether on hepatic metabolizing enzymes. *Toxicology*. **62:** 265-274.

- **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Hirai M & Arashidani K (l990b).** Acute oral toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **44:** 602-608.

- **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Hirai M & Arashidani K (1991).** Induction of r-GTP by ethylene glycol monomethyl ether. *Toxicol. Ind. Health*. 7: 473-478.

- **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Arashidani K, Yoshikawa M & Kodama Y (1992).** The effect of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether on hepatic gamma-glutamyl transpeptidase. *Toxicology*. 76: 49-57.

- **Kayama F, Yamashita V & Kodami Y (1991).** Selective depletion of immature thymocytes by orale administration of ethylene glycol monomethyl ether. *Int. Immuno. Pharmacol*. **13:** 521-540.

- **Kezic S, Mahieu K, Monster AC & Wolff FA (1997).** Dermal absorption of vaporous and liquid 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol in volunteers. *Occupotional and Environmental Medicine*. **54:** 38-43.

- **Kido T & Namiki H (2000).** Expression of testicular fatty acid-binding protein PERF 15 during germ cell apoptosis. *Develop*. *Growth*. *Differ*. **42:** 359-366.

- **Kim BS & Smialowiez RJ (1997).** The role of metabolism in 2-methoxyethanol induced suppression of in vitro polyclonal antibody responses by rat and mouse. *Toxicology*. **123:** 227-239.

- **Kim Y, Lee N, Sakai T, Kim KS & Yang JS (1999).** Evaluation of exposure to ethylene glycolmonoethyl ether acetates and their possible haematological effects on shipyard painters. *Occup. Environ. Med*. **56:** 378-382.

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

- **Ku WW & Chapin RE (1994).** Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol *in vivo* and *in vitro*, requirement for an intact seminiferous tubule structure for germ cell degeneration. *Toxicol. In Vitro*. **8:** 1191–1202.

- **Ku WW, Win RN, Chae BY, Ghanayem BI & Chapin RE (1995).** Spermatocyte toxicity of 2 methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **134:** 100-110.

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

- **Laudet-Hesbert A, Le fevre B, Mahien C, Triolet A & Dornier G (2002).** Le point des connaissances sur les éthers de glycol. *Ed. INRS*. **5014:** 1-4.

- **Lee KP & Kinney LA (1989).** The ultrastructure and reversibility of testicular atrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the rat. *Toxicol. Pathol*. **17 (4):** 759-773.

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

- **Litwack G (1992).** Biochemistry of hormones 2: steroid hormones, text book of biochemistry with clinical correlation. *Ed. Wiley & Sons*. 901-925.

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

- **Lorente C, Cordier S, Bergeret A, Walle HE & Goujard J (2000).** Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scand. J. Work. Environ. Health*. **26:** 137.

- **Mahieu JC & Boust C (2007).** Dégraissage des métaux. Choix des techniques et des produits, *Fiche pratique de sécurité. Ed. 48*. 4.

- **Maldonado G, Delzell E, Tyl RW & Sever LE (2003).** Occupational exposure to glycol ethers and human congenital malformations. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. **76:** 405-423.

- **Marie JL (2002).** Prévention des risques liés à la fabrication et à l'utilisation des éthers de glycol. *Tra. Sec*. **616:** 2-10.

- **Martoja R & Martoja M (1967).** Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed. Masson & Cie*. 329.

- **Mégarbane B, Brahmi N & Baud F (2001).** Intoxication aiguë par les glycols et alcools toxiques: diagnostic et traitement. **10 (4):** 426-434.

- **Miller RR (1987).** Metabolism and disposition of glycol ethers. *Drug. Metab. Rev*. **18:** 1-22.

- **Mitchell R, Summer C, Blonde S, Bush D, Hurlburt G, Snyder E & Giesy J (2000).** A scoring and ranking system for persistent, bioaccumulative, and toxic substances for the North American Great Lakes. Resulting chemical scores and ranking. *Human and ecological risk assessment*. **8 (3):** 537-557.

- **Moslen MT & Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM & Au WW (1995).** Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*. **96:** 217-224.

- **OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques (2004).** Lignes Directrices pour les Essais de Produits Chimiques. Absorption cutanée, méthode *in vivo*.

- **Oh E, Lee E, Im H, Kang HS, Jung WW, Won NH, Kim EM & Sul D (2005).** Evaluation of immuno-and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology*. **210:** 65-80.

- **OMS : Organisation Mondiale de la Santé (1993).** Analyse du sperme humain et de l'intéraction des spermatozoides avec le mucus cervical. *Ed. INSERM*. 55-56.

- **OMS: Organisation Mondiale de la Santé (2004).** Critères de qualité d'air (air quality guidelines) et critères de qualité de l'eau potable (water sanitation).

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

- **Petit JM (2004).** Les mélanges explosifs, Gaz et vapeurs. *Ed. 911*.

- **Pitten FA (2000).** Air pollution by volatile organic compounds (VOC) and health complaints. *Dtsch. Med. Wschr*. **125 (18):** 545-550.

- **Pusch W, Balvers M, Weinbauer GF & Ivell R (2000).** The rat endozepine-like peptide gene is highly expressed in late haploid stages of male germ cell development. *Biol. Reprod*. **63:** 763-768.

- **Rao VS & Shaha C (2002).** N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: role of glutathione and cytochrome c. *FEBS. Letters*. **527:** 133-137.

- **Reader SC, Schingles C & Stonard MD (1991).** Acute testicular of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. *Fundam. Appl. Toxicol*. **16 (1):** 61-70.

- **Renes J, Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL & Muller M (1999).** ATP and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRPI. *Br. J. Pharmacol*. **126 (3):** 681-688.

- **Sabourin PJ, Medinski MA, Thurmond F, Birnbaum LS & Henderson RF (1992).** Effect of dose on the disposition of methoxyethanol, ethoxyethanol, and butoxyethanol administered dermally to male F344/N rats. *Fundam. Appl. Toxicol*. **19:** 124-132.

- **Saillenfait AM & Robert E (2000).** Exposition professionnelle aux solvants et grossesse « État des connaissances épidémiologiques ». *Revue d'épidémiologie et de santé publique***. 48 (4):** 374-388.

- **Samuels DM, Doe JE & Tinston DJ (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.

- **SCCP: Scientific Committee on Consumer Products (2006).** The notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation. *6th revision. Health and Consumer Protection.*

- **Sekiguchi S, Suda M, Zhai YL & Honma T (2002).** Effects of 1- bromopropane, 2-bromopropane, and 1,2-dichloropropane on the estrous cycle and ovulation in F344 rats. *Toxicol. Lett*. **126 (1):** 41-49.

- **Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD, Potashnik G & Carel R (2003).** Effects of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind. Health*. **41 (2):** 55-62.

- **Shih TS, Hsieh AT, Liao GD, Chen YH & Liou SH (2000).** Haematological and spermatotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in copper clad laminate factories. *Occup. Environ. Med*. **57:** 348-352.

- **Siesky AM, Kamendulis LM & Klaunig JE (2002).** Hepatic effects of 2-butoxyethanol in rodents. *Toxicological Sciences*. **70:** 252–260.

- **Soulat JM (2001).** Revue critique de la toxicité des éthers de glycol. Intervention prévue à la journée par la société de médecine de travail, Toulouse.

- **Stellman JM (2004).** Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. *Ed. Bureau international du travail*. 3.

- **Syed V & Hecht NB (1998).** Rat pachytene spermatocytes down-regulate a Polo-like kinase and up-regulated a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells downregulate a phosphodiesterase and up-regulated an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology*. **139:** 3503-3511.

- **Testud F (1998).** Pathologie toxique en milieu de travail. *Ed. Alexandre Lacassagne*. 447.

- **Tirado OM, Selva DM, Noran T, Suarez-quian CA & Jansen M (2004).** Increased expression of estrogen receptor B in pachytene speramtocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J. Androl*. **25:** 84-94.

- **Townsend DM, Tew KD & Tapiero H (2003).** The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **57:** 145–155.

- **Traynor MJ, Wilkinson SC & Williams FM (2007).** The influence of water mixtures on the dermal absorption of glycol ethers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **218:** 128-134.

- **Trinder P (1969).** Test enzymatique colorimétrique (CHOD-PAD). *Clin. Biochem*. **6:** 24-33.

- **Udden MM (1994).** Hemolysis and deformability of erythrocytes exposed to butoxyacetic acid, a metabolite of 2-butoxyethanol: II. Resistance in red blood cells from humans with potential susceptibility. *J. Appl. Toxicol*. **14:** 97-102.

- **Vachhrajani KD (2005).** Earlier changes in seminiferous epithelium of rats exposed to ethylene glycol monomethyl ether. *Journal of cell and tissue research.* **5 (1):** 303-308.

- **Valencia E & Hardy G (2002).** Practicalities of glutathione supplementation in nutritional support. *Curr*. *Opin*. *Nutr*. *Metab*. **5:** 321-326.
- **Van Bladeren PL (2000).** Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact*. **129 (1-2):** 61-76.

- **Venier M, Adami G, Larese F, Maina G & Renzi N (2004).** Percutaneous absorption of 5 glycol ethers through human skin in vitro. *Toxicol in vitro.* **18:** 665-671.

- **Wang W, Win RN & Chapin RE (2000).** Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **163:** 125-134.

- **Wang RS, Suda M, Gao X, Wang B, Nakajima T & Honma T (2004).** Health effects of exposure to ethylene glycol monoethyl ether in female workers. *Ind. Health.* **42:** 447-451.

- **Weckbeker G & Cory JC (1988).** Ribonuleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse Leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancer. Letter.* **40:** 257-264.

- **Welch L & Cullen M (1988).** Effect of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: III. Hematologic effects. *Am. J. Ind. Med*. **14:** 527-536.

- **Wennborg H, Bodin L, Vainio H & Axelsson G (2001).** Solvent use and time to pregnancy among female personnel in biomedical laboratories in Sweden. *Occup. Environ. Med*. **58 (4):** 225-231.

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

- **Williams WC, Riddle MM, Copeland CB, Andrews DL & Smialowicz RJ (1995).** Immunological effects of 2-methoxyethanol administered dermally or orally to Fischer 344 rats. *Toxicology*. **98:** 215-223.

- **Winder C & Gonzalez-Calderon D (1998).** Use of EC criteria for determining health and environmental hazards for classification of chemicals for environmental risk. *Regulatory. Toxicology. Pharmacology*. **27:** 38-46.

- **Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR & Turner ND (2004).** Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr*. **134 (3):** 489-92.

- **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.

- **Yao CT, Liao CS & Yin SJ (1997).** Human hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases: Genetic polymorphism and activities. *Proc. Natl. Sci. Counc*. **21:** 106-111.

- **Yoon CY, Hong CM, Song JY, Cho YY & CHoi KS (2001).** Effect of ethylene glycol monoethyl ether on the spermatogenesis in pubertal and adult rats. *J. Vet. Sci.* **2:** 47-51.

- **Yoon CY, Hong CM, Cho YY, Chang YH, Min HK, Yun YW, Lee BJ, Yang KH, Lee YS & Kim CK (2003).** Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats. *J. Vet. Med. Sci*. **65 (2):** 207-212.

- **Young D & Pestaner L (1975).** Test enzymatique colorimétrique. *Clin. Chem.* 21-25.

COMMUNICATIONS

- **Khelili K, Messikh S, Djabali N, Abdennour C & Boulakoud MS :** The effectiveness of the cryoprotector medium and antioxidants and acrosome damage of human sperm. *Les premières journées maghrébines de pharmacie, les 29 et 30 Octobre 2002, Faculté de Médecine, Université de Annaba.* **(Affichée)**
- **Djabali N, Khelili K, Boulakoud MS, Abdennour C, Rekioua N, Boubsil S & Drif F** : Contribution à l'étude de l'effet d'un fongicide – Manébe- sur les paramètres de reproduction et quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin local Cuniculus lepus. *Le premier séminaire méditerranéen sur les pâturages, Alimentation et santé du cheptel, les 26, 27 et 28 Avril 2004, Centre Universitaire d'El Tarf.* **(orale)**
- **Boubsil S, Djabali N, Drif F, Ouanes I & Abdennour C** : Effet chronique du cadmium et sélénium sur les paramètres de reproduction et paramètres biochimiques chez le lapin local Cuniculus lepus *Colloque euro méditerranéen sur l'écologie animale, les 22,23 et 24 Novembre 2004, Faculté des sciences, Université de Annaba.* **(Affichée)**
- **Rekioua N, Djabali N, Drif F & Khelili K** : Effet de quelques maladies génitales sur la fertilité masculine. *Colloque euro méditerranéen sur l'écologie animale, les 22,23 et 24 Novembre 2004, Faculté des sciences, Université de Annaba.* **(Affichée)**
- **Khelili K, Rekioua N & Djabali N** : Effet du stress hypoosmotique sur les déformations flagellaires des spermatozoïdes chez les hypofertiles. *Colloque euro méditerranéen sur l'écologie animale, les 22,23 et 24 Novembre 2004, Faculté des sciences, Université de Annaba.* **(Orale)**
- **Djabali N, Boubsil S, Rekioua N, Ammamra S, Drif F, Khelili K & Abdennour C** : Impact des pesticides déversés dans l'environnement sur les paramètres de reproduction chez les mammifères (atteinte de la fertilité masculine). *Journée mondiale de l'environnement, le 05 Juin 2005, Ecole nationale de santé militaire, Hopital central de l'armée, Alger.* **(Orale)**
- **Djabali N, Hamdi L & Khelili K :** Effet reprotoxique d'un solvant organique (Ethylene glycol monomethyl éther : EGME) chez le lapin male

Cuniculus lepus. *Premier séminaire international de biologie et physiopathologie de la reproduction, les 06 et 07 Décembre 2005, Faculté des sciences, Université El Hadj Lakhdar Batna.* **(Orale)**

- **Djabali N & Khelili K** : Pathologie de la reproduction causée par les pesticides chez le lapin male. *Premier séminaire international de biologie et physiopathologie de la reproduction, les 06 et 07 Décembre 2005, Faculté des sciences, Université El Hadj Lakhdar Batna.* **(Affichée)**
- **Khelili K, Abdennour C, Djabali N & Boulakoud MS** : Effet de la glaire cervicale sur la mobilité des spermatozoïdes chez les bovins. *Premier séminaire international de biologie et physiopathologie de la reproduction, les 06 et 07 Décembre 2005, Faculté des sciences, Université El Hadj Lakhdar Batna.* **(Orale)**
- **Djabali N:** Reproductive toxicity of Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the male rabbit. *First Mediterranean congress on biotechnology, 25-29 March 2006, Association tunisienne de Biotechnologie, Yasmine Hammamat, Tunisia.* **(Affichée)**
- **Djabali N, Drif F, Rekioua N, Khelili K:** Le risque des produits chimiques (pesticides) provoquant des perturbations métaboliques et endocriniennes chez les mammifères. 15èmes journées nationales de médecine du travail, 12-14 mai 2006, Faculté de médecine, Université de Tlemcen. **(Affichée)**
- **Djabali N, Drif F, Amamra S, Rekioua N, Khelili K: Les** pesticides (polluants à usage agricole) provoquent des perturbations dans les paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin local *Cuniculus lepus. Journée mondiale de l'environnement, le 05 Juin 2006, Ecole nationale de santé militaire, Hopital central de l'armée, Alger.* **(orale)**
- **Djabali N & Khelili K:** Rabbit Epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME). *The fourth international conference on biological sciences, 1- 2 November 2006, Faculty of science, Tanta University, Egypt.* **(orale)**
- **Djabali N & Khelili K:** Biotechnologie liée à la reproduction animale (pathologie de la reproduction causée par les produits chimiques). *Sixième*

journées biotechnologiques, 23-26 Décembre 2007, Association tunisienne de Biotechnologie, Sousse, Tunisie. **(Affichée)**

- **Djabali N & Khelili K:** Biotoxicité des éthers de glycol: exploration de quelques paramètres biochimiques chez le lapin suite à une exposition à l'éthylène glycol. *4ème séminaire scientifique et technique sur l'environnement, 3, 4 et 5 Juin 2008, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou*. **(Orale)**
- **Djabali N & Khelili K:** Collaborative work to evaluate the health effects of repeated doses of ethylene glycol monomethyl ether in male rabbit following gavage exposure. *7ème Journées Biotechnologiques, 15-18 Décembre 2008, Association tunisienne de biotechnologie, Hammamet, Tunisie.* **(Affichée).**
- **Djabali N:** Les produits phytosanitaires menacent la fonction de reproduction chez les mammifères. *5ème Congrès international de biotechnologie de l'association maghrébine de biotechnologie & 20ème forum des sciences biologiques de l'association tunisienne des sciences biologiques, 22-25 Mars 2009, Hammamet, Tunisie*

PUBLICATIONS

- **Djabali Nacira[1], Khelili Kamal[2] & Hamdi Leila[2]**

[1]. Instiut de Biologie, Centre Universitaire d'El Tarf, Algérie

[2]. Institut de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie

Etude de L'effet D'un Solvant: Ethylène Glycol Monométhyl Éther (Egme) Sur Quelques Paramètres Indicateurs de la Fertilité Masculine Chez le Lapin *Oryctolagus Cuniculus*. *European Journal of Scientific Research*, Vol.27 No.1 (2009), pp.93-103

- **Nacira DJABALI[1, 2] et Kamal KHELILI [2]**

[1]. Instiut de Biologie, Centre Universitaire d'El Tarf, Algérie

[2]. Institut de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie

Contribution à l'étude de l'impact d'un fongicide (Dithiocarbamate de manganèse : Manèbe) sur quelques paramètres de la fertilité masculine chez le lapin : *Oryctolagus cuniculus*, *Afrique* SCIENCE *05(2) (2009) 321 – 329.*

- **Djabali N, Hamdi L & Khelili K :** Effet reprotoxique d'un solvant organique (Ethylene glycol monomethyl éther : EGME) chez le lapin male Cuniculus lepus. *Premier séminaire international de biologie et physiopathologie de la reproduction, les 06 et 07 Décembre 2005, Faculté des sciences, Université El Hadj Lakhdar Batna.* **(Orale)**

- **Djabali N, Hamdi L and Khelili K:** Rabbit Epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME). *The fourth international conference on biological sciences, 1- 2 November 2006, Faculty of science, Tanta University, Egypt.* **(orale)**

- **Djabali N:** Biotoxicité des éthers de glycol: exploration de quelques paramètres biochimiques chez le lapin suite à une exposition à l'éthylène glycol. *4ème séminaire scientifique et technique sur l'environnement, 3, 4 et 5 Juin 2008, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.* **(Orale)**

- **Djabali N:** Collaborative work to evaluate the health effects of repeated doses of ethylene glycol monomethyl ether in male rabbit following gavage exposure. *7ème Journées Biotechnologiques, 15-18 Décembre 2008, Association tunisienne de biotechnologie, Hammamet, Tunisie.* **(Affichée).**

- **Djabali N:** Reproductive toxicity of Ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the male rabbit. *First Mediterranean congress on biotechnology, 25-29 March 2006, Association tunisienne de Biotechnologie, Yasmine Hammamat, Tunisia.* **(Affichée)**